ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Савина Валерия Александровна

Изучение метаболома сырья растений рода рейнутрия (Reynoutria)

1.5.6. Биотехнология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:
кандидат фармацевтических наук, доцент
Ковалева Татьяна Юрьевна
доктор биологических наук, профессор
Луценко Сергей Викторович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 15
1.1. Ботаническая характеристика 15
1.1.1. Внешний вид растений 16
1.1.2. Ареал и места обитания 18
1.2. Фармакогностическая характеристика 19
1.2.1. Лекарственное растительное сырье 19
1.2.2. Химический состав 21
1.2.3. Фармакологическое действие 26
1.2.4. Препараты сырья рейнутрии 27
1.2.5. Количественное определение действующих веществ 30
1.2.6. Каллусная культура 30
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 32
2.1. Объекты исследования 32
2.2. Методы исследования 33
2.2.1. Макроскопический и микроскопический анализ 33
2.2.2. Качественный анализ биологически активных веществ 34
2.2.3. Определение влажности 38
2.2.4. Определение содержания золы, золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте и минерального состава 38
2.2.5. Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой 39
2.2.6. Определение содержания дубильных веществ 39
2.2.7. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин 40
2.2.8. Определение содержания стильбенов 41
2.2.9. Определение суммы полисахаридов 42
2.2.10. Определение содержания витаминов 42
2.2.11. Определение содержания аминокислот 43
2.2.12. Определение антирадикальной активности 44
2.2.13. Изучение водных извлечений 44

2.2.14. Получение каллусов 45
2.2.15. Определение содержания стильбенов в каллусах 48
2.2.16. Определение минерального состава каллусов 49
2.2.17. Изучение стимулирующего действия экстракта из листьев рейнутрии богемской на морфометрические показатели растений и содержание биологически активных веществ 49
2.2.18. Получение наночастиц серебра в среде водного извлечения листьев рейнутрии богемской 50
2.3. Статистическая обработка данных и валидация методик 51
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ ЛИСТЬЕВ РЕЙНУТРИИ БОГЕМСКОЙ 52
3.1. Макроскопический анализ листьев рейнутрии богемской 52
3.2. Микроскопический анализ листьев рейнутрии богемской 53
3.3. Качественный анализ листьев рейнутрии богемской 60
3.3.1. Первичный скрининг биологически активных веществ листьев рейнутрии богемской при помощи качественных реакций 60
3.3.2. Изучение биологически активных веществ листьев рейнутрии богемской методом тонкослойной хроматографии 61
3.3.3. Изучение биологически активных веществ листьев рейнутрии богемской методом ультраэффективной жидкостной хроматографии 65
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И РАЗРАБОТКА ЧИСЛОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛИСТЬЕВ РЕЙНУТРИИ БОГЕМСКОЙ 76
4.1. Определение влажности листьев рейнутрии богемской 76
4.2. Определение содержания золы общей, золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте и минерального состава 77
4.3. Определение измельченности и посторонних примесей 80
4.4. Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой 80
4.5. Определение содержания дубильных веществ 81
4.6. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин 82

4.7. Определение содержания стильбенов 91
4.8. Определение суммы полисахаридов 94
4.9. Определение содержания витаминов 95
4.10. Определение содержания аминокислот 96
4.11. Определение антирадикальной активности 99
4.12. Изучение водных извлечений 100
ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСОВ 108
5.1. Индукция каллусогенеза 108
5.2. Субкультивирование каллусов на агаризованной среде 110
5.3. Субкультивирование каллусов в жидкой питательной среде 112
5.4. Микроскопия каллусов 114
5.5. Определение содержания стильбенов в каллусах 116
5.6. Элементный анализ каллусов 117
ГЛАВА 6. ПОЛУЧЕНИЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ НА РОСТ КРЕСС-САЛАТА И СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ 122
6.1. Изучение стимулирующего действия экстракта из листьев рейнутрии богемской на морфометрические показатели растений и содержание биологически активных веществ 122
6.2. Получение серебряных наночастиц с использованием водного извлечения листьев рейнутрии богемской 127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 135
ВЫВОДЫ 136
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 139
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 143
Приложение А. Проект фармакопейной статьи 154
Приложение Б. Инструкция по заготовке 163
Приложение В. Акт внедрения в учебный процесс 166

Приложение Г. Акт внедрения..... 167
Приложение Д. Акт внедрения 168
Приложение Е. Патент..... 169

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В реализации стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации фитопрепаратам отведена большая роль, обусловленная их уникальными свойствами: представляя собой многокомпонентные комплексы биологически активных веществ, они обладают широким спектром действия и имеют комплексный органопротекторный эффект. В настоящее время перед фармацией стоят задачи по созданию и внедрению импортозамещающих лекарственных средств растительного происхождения. Особое внимание уделяется препаратам антиоксидантного, тонизирующего, ноотропного, гепатопротекторного, анксиолитического и иммуномодулирующего действия, COVID-19 также до сих пор требует поиска соответствующих препаратов для лечения и реабилитации населения.

Одним из перспективных ресурсов для изготовления таких фитопрепаратов являются растения рода рейнутрия, заинтересованность которыми обусловлена наличием флавоноидов, ресвератрола и эмодина. Но, в целом, метаболом рейнутрий, произрастающих в России, до сих пор практически не изучен. В настоящее время в РФ сырье рейнутрий не является фармакопейным, имеются только биологически активные добавки, однако монографии на сырье рейнутрии японской внесены в фармакопеи стран Восточной Азии, например, Китая, так как препараты из него обладают ранозаживляющим, противовоспалительным и антиоксидантным действием. Корневища R. japonica, произрастающей на территории Китая, являются крупнейшим известным источником ресвератрола, который ингибирует выработку провоспалительных цитокинов, а особенно IL-8 и фактора некроза опухоли-альфа. Эмодин – природный антрахинон, обладающий способностью ингибировать клеточную пролиферацию, вызывать индукцию апоптоза и профилактику метастазов. Эмодин проявляет противоопухолевое действие, обладает антибиотическими свойствами. Имеет потенциал применения

при лечении тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом. Особое внимание заслуживает рейнутрия богемская (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova). Рейнутрия богемская является менее изученным видом, но предполагается сходство фитохимического профиля с родительскими видами. Учитывая высокое содержание полифенолов, рейнутрия богемская имеет потенциал для разработки на ее осное фитопрепаратов с цитопротекторным, антиоксидантным, противовоспалительным действием.

Отсутствие отечественной нормативной документации не позволяет использовать сырье рейнутрий для изготовления лекарственных средств, и актуализирует данное исследовани.

Важным источником физиологически активных веществ вне зависимости от сезона и климата является метод культивирования клеток и тканей высших растений in vitro. Использование каллусной культуры, являющейся уникальной биологической системой, позволяет регулировать и увеличивать выход БАВ. Получение каллусной культуры рейнутрии с высоким содержанием полифенолов актуально.

Степень разработанности темы исследования

Состав и фармакологические свойства биологически активных веществ (БАВ) рейнутрий в настоящее время активно изучаются исследователями разных стран, много работ по изучению рейнутрии японской публикуется коллегами из Китая, рейнутрию богемскую начали изучать в Европе. В отечественной литературе представлены результаты исследований, направленных на изучение БАВ, в том числе фенольных соединений, аскорбиновой кислоты, органических кислот (А.Г. Куклина и Н.С. Цыбулько), также есть данные по микроскопическому изучению листьев. Согласно доступным научным данным, подробных исследований рейнутрии богемской, произрастающей в различных регионах РФ не проводилось. Каллусную культуру из листьев рейнутрии богемской ранее не получали.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является комплексное фармакогностическое изучение листьев рейнутрии богемской, произрастающей на территории средней полосы России и Республики Беларусь, и каллусов, полученных биотехнологически.

Задачи исследования:

1. Провести информационно-аналитические исследования современной научной литературы и нормативной документации, характеризующих состояние изученности сырья растений рода рейнутрия.
2. Провести углубленное морфолого-анатомическое и качественное фитохимическое изучение рейнутрии богемской листьев для разработки характеристик подлинности сырья.
3. Провести количественное определение основных групп БАВ сырья и разработать показатели и нормы качества на рейнутрии богемской листья.
4. Изучить возможности получения каллусной культуры рейнутрии.
5. Провести изучение стимулирующего действия экстракта из рейнутрии богемской листьев.
6. Изучить возможность получения серебряных наночастиц с использованием водного извлечения рейнутрии богемской листьев.

Научная новизна

Разработаны характеристики подлинности листьев рейнутрии богемской, для идентификации среди близко родственных видов данного вида сырья. Впервые получены экспериментальные данные по составу БАВ листьев рейнутрии богемской и водных извлечений, полученных на их основе. С использованием комплекса физико-химического анализа, включающего атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), спектрофотометрию (СФМ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез (КЭ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), исследовано

содержание макро- и микроэлементов, флавоноидов, стильбенов, витаминов и аминокислот, дубильных веществ, полисахаридов.

На основании исследования разработана методика количественной оценки флавоноидов в листьях рейнутрии богемской (предложен пересчет на рутин) и проведена ее валидация.

Установлены показатели и нормы качества на рейнутрии богемской листья.

Изучен состав водных извлечений и подобрана оптимальная лекарственная форма для применения листьев рейнутрии богемской.

Впервые получена каллусная культура рейнутрии, которая в дальнейшем может быть использована для получения БАВ вне зависимости от сезона.

Разработана методика получения серебряных наночастиц с использованием водного извлечения листьев рейнутрии богемской. Изучено стимулирующее влияние экстракта и возможность его использования для разработки препаратов природного происхождения, предназначенных для стимуляции роста растений.

Научная новизна исследования подтверждена патентом Российской Федерации №2854889 от 29.10.2024 г.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в расширении сведений о составе БАВ, анатомо-диагностических признаках листьев рейнутрии богемской, произрастающей в центральной части России и в Беларуси, как потенциально перспективного источника БАВ; влиянии региона и сезона заготовки.

Практическую значимость работы составляют разработанная и валидированная методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин; проекты фармакопейной статьи ФС «Рейнутрии богемской листья» и Инструкции по заготовке и сушке.

Методология и методы исследования

Прикладное исследование – фармакогностический анализ лекарственного растительного сырья, включающий основные этапы: макро- и микроскопическое описание сырья, качественный анализ, количественный анализ.

Биотехнологическое исследование – получение и анализ каллусной культуры, получение наночастиц серебра, изучение стимулирующего действия водно-спиртового извлечения.

Исследование проводилось с использованием таких методов, как спектрофотометрия, титриметрия, гравиметрия, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, а также биологический метод (макро- и микроскопический анализ) и методы биотехнологии растений.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с применением компьютерного программного обеспечения Microsoft Office Excel в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в участии во всех этапах выполнения диссертационной работы. Несомненна приоритетная роль автора при выборе темы, объектов и методов исследования. Автор самолично сделала всю экспериментальную работу, ее вклад стал ключевым в каждом этапе исследования: формулирование цели и задач, сбор, обработка и обсуждение экспериментальных данных, их анализ и подготовка публикаций и представление докладов на конференциях различного уровня.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты морфолого-анатомического и фитохимического исследования БАВ рейнутрии богемской листьев.
2. Результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской спектрофотометрическим методом.
3. Результаты разработки показателей качества рейнутрии богемской листьев и их нормы.
4. Результаты получения каллусов.
5. Результаты изучения стимулирующего действия водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской.
6. Результаты получения серебряных наночастиц с использованием гидрофильных БАВ листьев рейнутрии богемской.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 2, 13, 17 паспорта научной специальности 1.5.6. Биотехнология и п. 2, 3, 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов гарантирована применением комплекса взаимодополняющих современных методов исследования, адекватных поставленным цели и задачам: макро- и микроскопического анализа, качественных реакций, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрии, капиллярного электрофореза, атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектрометрии, а также методов биотехнологии растений. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии

с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания с применением критерия Стьюдента. Разработанная спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин валидирована согласно ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичности, линейности, правильности и прецизионности (повторяемости и внутрилабораторной сходимости). Воспроизводимость результатов подтверждена параллельными определениями и сопоставлением данных, полученных различными аналитическими методами; первичная документация проверена и соответствует материалам диссертации. Совокупность полученных данных подтверждает обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций.

Основные научные положения и результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях: VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (г. Орехово-Зуево, 2026); V Юбилейная международная научно-практическая конференция молодых учёных «Фармация. Вызовы времени» (г. Витебск, 2025); XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (гг. Орехово-Зуево, Электрогорск и Москва, 2025); Международная научно-практическая конференция Pharmaceutical Advancements Forum (PAF) (г. Москва, 2024); III Международная научно-практическая конференция молодых учёных «Фармация. Вызовы времени» (г. Витебск, 2023); The 4th China-Russia International Symposium for Young Scholars (г. Гуанчжоу, 2023).

Апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедры фармацевтического естествознания, кафедры биотехнологии и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 1 от 18 июня 2026 г.).

Внедрение результатов исследования

Результаты изучения химического состава БАВ, характеристик подлинности листьев рейнутрии богемской, использованы в учебном процессе кафедр фармацевтического естествознания и биотехнологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Предложен проект фармакопейной статьи для листьев рейнутрии богемской и проект инструкции по заготовке.

Разработанная методика оценки количества флавоноидов в листьях рейнутрии богемской внедрена в работу ООО «СайнтификКомплайнс» (Акт от 15 мая 2026 г.) и АО «Институт фармацевтических технологий» (Акт от 2 июня 2026 г.).

На разработанный в ходе диссертационного исследования способ получения наночастиц серебра с использованием водного извлечения листьев рейнутрии богемской был получен патент РФ на изобретение №2854889 «Способ получения наночастиц серебра с использованием экстракта листьев рейнутрии богемской» заявка от 29.10.2024 г.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планами и тематиками научно-исследовательских работ на кафедрах фармацевтического естествознания и биотехнологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по темам: «Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья, лекарственных сборов, лекарственных форм из сырья и разработка методов их стандартизации с учетом влияния антропогенных факторов, оценки качества и сертификации» и «Разработка биосовместимых матриц и

композитов для регенеративной медицины и направленной доставки лекарственных средств».

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 9 работ, из них: 2 научные статьи – в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России; 1 научная статья – в журнале, входящем в международные базы данных (Scopus); 5 публикаций в сборниках международных конференций. Получен 1 патент РФ на изобретение №2854889 «Способ получения наночастиц серебра с использованием экстракта листьев рейнутрии богемской» заявка от 29.10.2024 г.

Структура и объем диссертации

Общий объем диссертационной работы составляет 169 страниц, включая 16 страниц приложений. Работа включает введение, литературный обзор (1 глава), 5 глав, посвященных экспериментальным результатам и их обсуждению, общие выводы, список литературы (83 источника, в том числе 63 иностранных), 6 приложений. В работу включены 45 таблиц (43 – в тексте и 2 – в Приложениях) и 73 рисунка (72 – в тексте и 1 – в Приложении).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Ботаническая характеристика

Род Рейнутрия (*Reynoutria*) основан шведским ботаником Мартеном Хауттёйн в 1777 г., когда впервые был описан вид *R. japonica*. Род был назван в честь мецената герра фон Рейнутра (Карела ван Синт-Омаарса), фламандского аристократа и любителя ботаники. Название семейства *Polygonaceae* произошло от греческих слов 'polys' – много и 'gonos' – колено; и дано за узловатый, коленчатый стебель. Относится к царству *Plantae* (Растения), отдел *Magnoliophyta* (Цветковые), класс *Magnoliopsida*, порядок *Polygonales* (Гвоздичноцветные) (Двудольные), семейство *Polygonaceae* (Гречишные) [1, 2, 3, 4].

Род включает 6 видов:

1. Рейнутрия японская – *Reynoutria japonica* Houtt. (*Reynoutria japonica* Houtt. va*R. japonica* и *Reynoutria japonica* var. *compacta* (Hook.f.) Moldenke)

Синонимы:

- *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr.;
- *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc.;
- *Tiniaria japonica* (Houtt.) Hedberg;
- *Fallopia japonica var. uzenensis* (Honda) Yonek. & H.Ohashi;
- *Pleuropterus cuspidatus* (Siebold & Zucc.) H.Gross;
- *Pleuropterus zuccarinii* (Small) Small;
- *Polygonum japonicum* (Houtt.) S.L.Welsh;
- *Polygonum reynoutria* Makino;
- *Polygonum sieboldii* Reinw. ex de Vries;
- *Polygonum zuccarinii* Small;
- *Reynoutria hastata* Nakai ex Ui;
- *Reynoutria henryi* Nakai;
- *Reynoutria japonica var. uzenensis* Honda;
- *Reynoutria japonica var. hastata* (Nakai ex Ui) Honda;

- *Reynoutria uzenensis* (Honda) Honda;
- *Reynoutria yabeana* Honda;

Синонимические названия на русском: горец остроконечный; горец японский, горец заостренный, гречиха японская. В Японии это растение называют “итадори”, что в переводе значит «убирать боль». Считается, что имя оно получило из-за своих ярко выраженных болеутоляющих свойств [3, 5, 6, 7].

2. Рейнутрия сахалинская – *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai.

Синонимы: *Polygonum sachalinense*; *Fallopia sachalinensis*. Синонимические названия на русском: горец сахалинский, гречиха сахалинская.

3. Рейнутрия богемская – Reynoutria ×bohemica Chrtek & Chrtková. Гибрид Reynoutria japonica × Reynoutria sachalinensis.

4. Рейнутрия многоцветковая – *Reynoutria multiflora* (Thunb.) Moldenke

5. *Reynoutria ciliinervis* (Nakai) Moldenke

6. *Reynoutria forbesii* (Hance) T.Yamaz.

В европейской части России произрастают три вида: *R. sachalinensis*, *R. japonica* и их гибрид *R. × bohemica* Chrtek & Chrtková. Гибридизация первых двух инвазивных видов привела к появлению вида с более высоким инвазионным потенциалом, чем у родительских видов. Далее в основном будут описаны данные три вида [8, 9, 10, 11, 12].

1.1.1. Внешний вид растений

Дифференция видов рейнутрии описана в работе Ю. Виноградовой. Растения этого рода многолетние травянистые, имеют полые прямостоячие стебли (поэтому растения по аналогии и называются «японский бамбук» и «сахалинский бамбук»), иногда с антоциановыми пятнами на поверхности. Корневища длинные, разветвленные, излом оранжевый у Р. японской, желтый у Р. богемской и светло-бежевый у Р. сахалинской. Сравнение надземных вегетативных органов представлено в таблице 1 [3, 8, 10, 13, 14, 15, 16].

Таблица 1 - Сравнение надземных вегетативных органов видов рейнутрии

Признак	Рейнутрия богемская (*R.* × *bohemica* Chrtek & Chrtková)	Рейнутрия сахалинская (*R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai)	Рейнутрия японская (*R. japonica* Houtt)
Жизненная форма	Травянистое растение высотой 2,5-4 м	Травянистое растение высотой до 4 м	*var. japonica* – травянистое растение от 1,5 до 3 м; *var. compacta* (Hook. f.) Moldenke – представляет собой более низкорослую форму до 1 м
Листья	Листовая пластинка крупная, длиной 12-25 см, основание усеченное, реже сердцевидное или широко-клиновидное. По жилкам нижней стороны листа - конические 1-3-клеточные волоски	Листовая пластинка очень крупная, может достигать длины 45 см, и характеризуется глубоко сердцевидным основанием. По жилкам нижней стороны листа длинные (от 2 мм) многоклеточне волоски	*var. japonica* – листовая пластинка отличается оттянутой заостренной верхушкой, имеет яйцевидную или овальную форму, основание листа ширококлиновидное или усеченное, нередко неравнобокое. Нижняя сторона голая или по жилкам папиллозная. Длина листа до 20 см; *var. compacta* (Hook. f.) Moldenke – характеризуется мелкими листьями до 10 см

У растений имеются мужские и женские особи. Соцветие сложное, имеет форму метелки и располагается в пазухах, состоит из однополых цветков. Мужские цветки с 8 тычинками, выступающими из беловатого или зеленоватого пятидольчатого околоцветника. Внешние листочки околоцветника женских цветков килеватые, при плодоношении крылатые, не опадающие. Плод представлен семянкой с тремя ребрами, 2-4 мм длиной, около 2 мм шириной, блестяще-чёрный или тёмно-коричневый (рисунок 1) [17, 18].

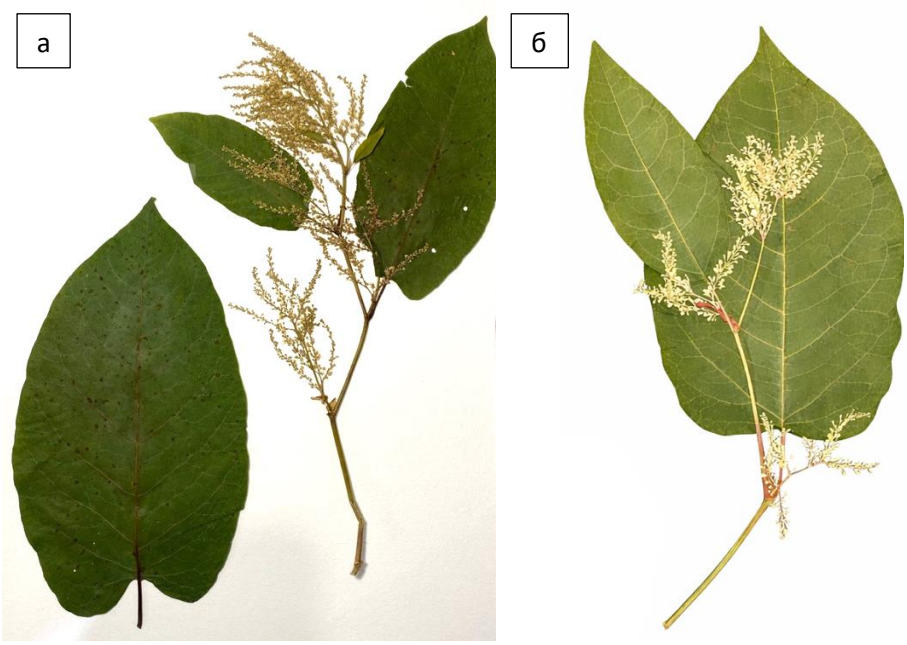


Рисунок 1 – Листья и соцветия рейнутрии сахалинской (а)
и рейнутрии богемской (б)

1.1.2. Ареал и места обитания

Родина растений рода рейнутрия – Япония, Китай и Корея. В Европу, предположительно, завезены в 1849 году, когда стали выращиваться Филиппом Зибольдом. В 1854 году впервые посажена рейнутрия японская в Великобритании, к 1880-м годам растение сбежало из культуры. Примерно в это же время появилась в садах в США. В начале XX века растения активно расселялись по Европе [11, 12].

В Росси первичный ареал рейнутрии японской включает Южные Курилы, Приморье, Южный Сахалин [3, 17].

На протяжении значительной части вторичного ареала размножается исключительно вегетативно, поскольку, в частности, в Северную Америку и Великобританию были завезены только женские растения со стерильными тычиночными цветками, в условиях же Средней полосы России семена позднецветущего растения не вызревают [10, 17, 18, 19, 20].

Естественным ареалом рейнутрии сахалинской являются Южный Сахалин, Курильские острова, Япония, Корейский полуостров. За его пределами растение

широко распространено в различных регионах России, Европе и Северной Америке, где является инвазивным видом и вытесняет местную флору [10].

Гибрид рейнутрия богемская появился в Англии и, являясь высокоинвазивным растением, распространился по Европе и попал в Россию [10].

1.2. Фармакогностическая характеристика

1.2.1. Лекарственное растительное сырье

Лекарственным сырьем рейнутрии могут быть высушенные корневища или высушенные листья. Но они не являются официальным сырьем в Российской Федерации, однако в странах Восточной Азии препараты, получаемые из рейнутрии японской и рейнутрии многоцветковой, широко используются в официальной медицине как противовоспалительные и ранозаживляющие средства [7, 21, 22].

Листья рейнутрии японской и рейнутрии многоцветковой собирают во время цветения, реже до цветения: весной - ранним летом, поскольку цветет поздно, а уже с весны накапливает достаточное количество фитомассы. Перевозят свежее сырье рыхло в твердой таре или насыпью без промедления, так как сочные листья легко самосогреваются, буреют или желтеют. Сушат тонким слоем в тени или тепловых сушилках, периодически перемешивая. Высушенное сырье укладывают в картонные коробки или бумажные мешки, которые должны храниться в сухом и проветриваемом помещении. Срок хранения листьев обычно составляет 1-2 года [23].

Корневища заготавливают в период отмирания надземной части – в конце лета - ранней осенью. Можно собирать и ранней весной до начала отрастания надземных органов, но весной период заготовки короткий (несколько дней). Аккуратно выкапывают корневища, отряхивают от земли, сушат на сетках тонким слоем в теплых проветриваемых помещениях или под навесом при температуре 50-60°С, по мере высыхания переворачивают. Высушенное сырье укладывают в

картонные коробки или бумажные мешки, которые должны храниться в сухом и проветриваемом помещении. Срок хранения корневищ обычно составляет 2-3 года [24].

Фармакопейная статья на корневища рейнутрии японской включена в ГФ Китая. Согласно ФС, сырье рейнутрии японской представляет собой высушенное корневище растения семейства Гречишные. Корневища рейнутрии японской заготавливают весной или осенью, отрезают остатки мочковатой корневой системы и очищают от земли, промывают водой. Свежее сырье режут толстыми пластинками и затем сушат на солнце.

Характеристика. Корневища обычно короткие, цилиндрической или в виде толстых пластинок неправильной формы. Диаметр до 2,5 см. Поверхность продольно-морщинистая, коричневого цвета, со следами от отрезанных корней. На поперечном срезе или изломе корневища под лупой видна тонкая кора, широкая, желтая, лучистая древесная часть. Пробковый слой с поверхности легко слущивается. Корневища часто полые, с поперечными перегородками в сердцевине. Сами по себе корневища твердые. Запах слабый. Вкус горьковатый, вяжущий (терпкий).

Идентификация (ТСХ). Обнаружение франгулаэмодина (эмодина). Система растворителей петролейный эфир (30-60°С) – этилформиат – муравьиная кислота (15:5:1), для детектирования использовались пары аммиака, после чего пластинку просматривают в УФ-свете (365 нм). Обнаруживаются зоны флуоресценции, которые после обработки детектером окрашиваются в красный цвет.

Показатели качества. Влажность – не более 12,0%. Зола общая – не более 5,0%. Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0%.

Количественый анализ БАВ. Вещества, экстрагируемые этанолом 70 % (холодная мацерация), – не менее 9,0%, эмодина – не менее 0,60% (метод ВЭЖХ), полидатина (гликозида транс-ресвератрола) – не менее 0,15% (метод ВЭЖХ) [24].

1.2.2. Химический состав

Исследователи рейнутрии японской отмечают, что во всех органах, как надземных, так и подземных, содержатся БАВ относящиеся к разным классам: дубильным веществам (танины, галловая кислота), полисахаридам (пектиновые вещества, водорастворимые полисахариды, гемицеллюлоза А и Б), флавоноидам (различные вещества флавоноидной природы, в наибольшем количестве - рутин и катехин), витаминам, органическим кислотам, полифенолам (стильбены, лигнаны, кумарины и другие) [15, 25, 26, 27, 48].

Доминирующими соединениями в листьях являются флавоноиды и их производные: (−)-катехин, (−)-эпикатехин, гиперозид, кверцетин, рутин, рейноутрин, процианидин В3. В листьях *R. japonica* обнаружены филлохиноны В и С, органические кислоты (винная, лимонная, гидроксисукциновая), хлорогеновая кислота, стильбены и их производные (пикеатаннол, ресвератрол, ресвератролозид, полидатин), антрахиноны (эмодин, физион) [7, 28, 29, 30, 31, 48].

Химические структуры основных соединений листьев представлены на рисунках 2-5.

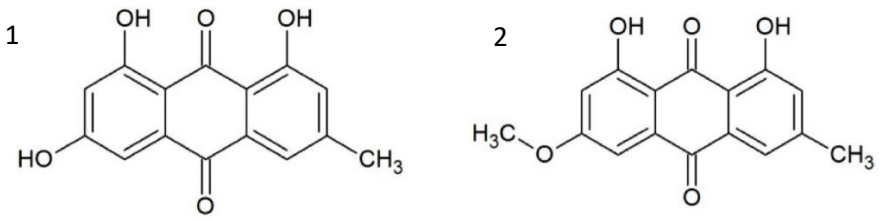


Рисунок 2 – Антрахиноны в листьях *R. japonica*. 1 - эмодин; 2 - физион

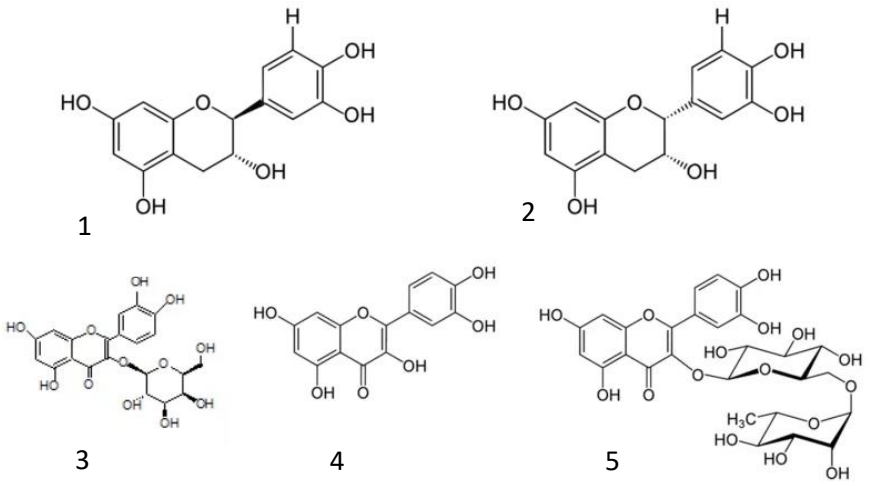


Рисунок 3 – Флавоноиды в листьях *R. japonica*. 1 - (−)-катехин; 2 - (−)-эпикатехин; 3 - гиперозид; 4 - кверцетин; 5 - рутин

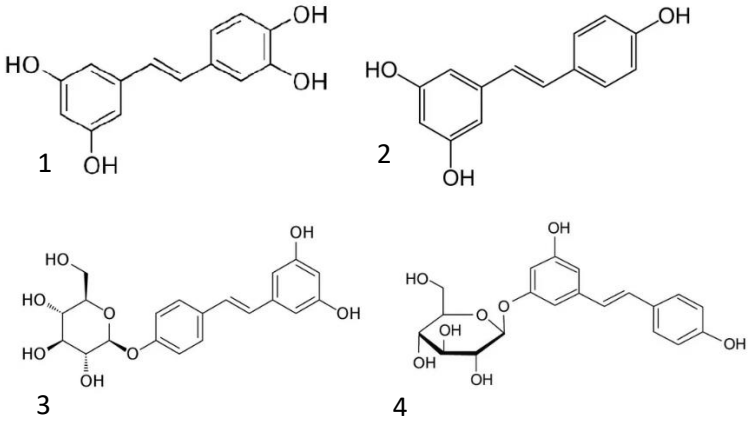


Рисунок 4 – Стильбеноиды и их производные в листьях *R. japonica*. 1 - пикеатаннол; 2 - ресвератрол; 3 - ресвератролозид; 4 – полидатин

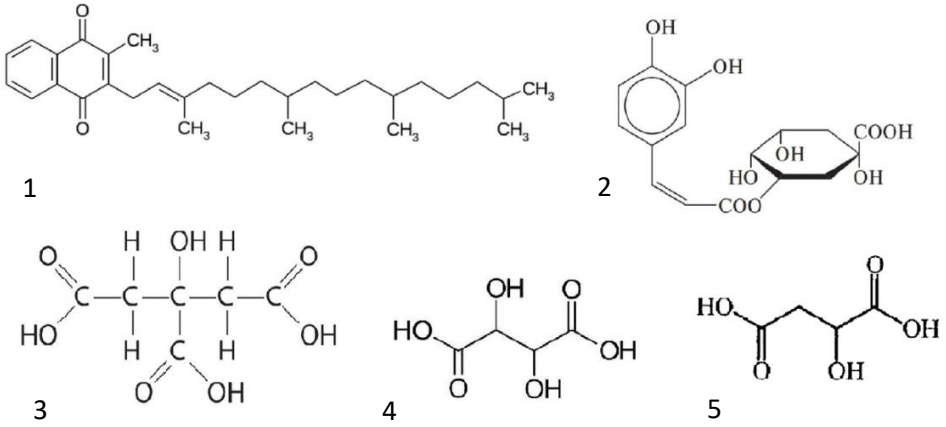


Рисунок 5 – Соединения в листьях *R. japonica*. 1 - филлохинон; 2 - хлорогеновая кислота; 3 - лимонная кислота; 4 - винная кислота; 5 - гидроксисукциновая кислота (яблочная)

Молодые весенние побеги близки к корневищам как по качественному, так и по количественному составу. В них обнаруживается катехин, эпикатехин, пикеид, ресвератрол и его производные, а также органические кислоты (лимонная кислота, винная кислота и гидроксисукциновая кислота) [28, 32].

Корневища *R. japonica* являются крупнейшим известным источником ресвератрола. В корневищах *R. japonica* содержатся соединения, относящиеся к флавоноидам, стильбенам и гидроксиантрахинонам, а именно катехин, эпикатехин, эмодин, глюкозид пикеатаннола, полидатин, физион и ресвератролозид [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 48].

При нанесении на излом корневища 10% раствора натрия гидроксида наблюдается красное окрашивание, что свидетельствует о наличии антраценпроизводных.

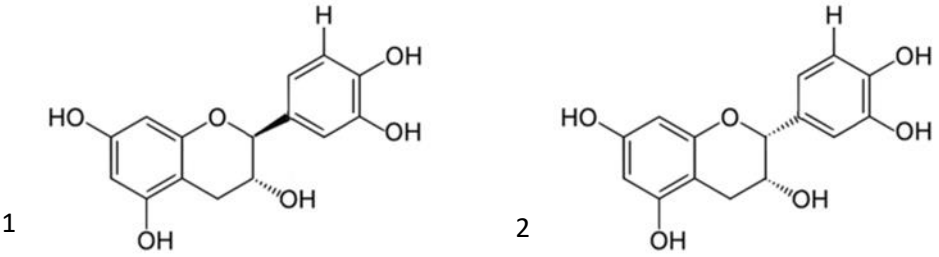
Химические структуры основных соединений из корневищ и корней представлены в таблице 2 и на рисунках 6-7.

Таблица 2 – Химические соединения, выделенные из корневищ и корней Рейнутрии японской

Хиноны	Физион
	Эмодин
	Фаллацинол
	Квестин
	Антрагликозид А
	Антрагликозид В
	Хризофанол
	Цитреорозеин
	Квестинол
	Реин
	Полиганин А
	Полиганин В
	2-Метокси-6-ацетил-7-метилюглон
	Куспидатумин А
	7-Ацетил-2-метокси-6-метил-8-гидрокси-4-нафтохинон
Стильбены	Ресвератрол
	Полидатин
	Ресвератрол-4'-О-глюкозид
	Ресвератрол 4-O-D-(2'-галлоил)-глюкопиранозид
	Ресвератрол 4-O-D-(6'-галлоил)-глюкопиранозид
	Транс-ресвератрол натрия и калия-3-О-β-D-глюкопиранозид-6''-сульфат

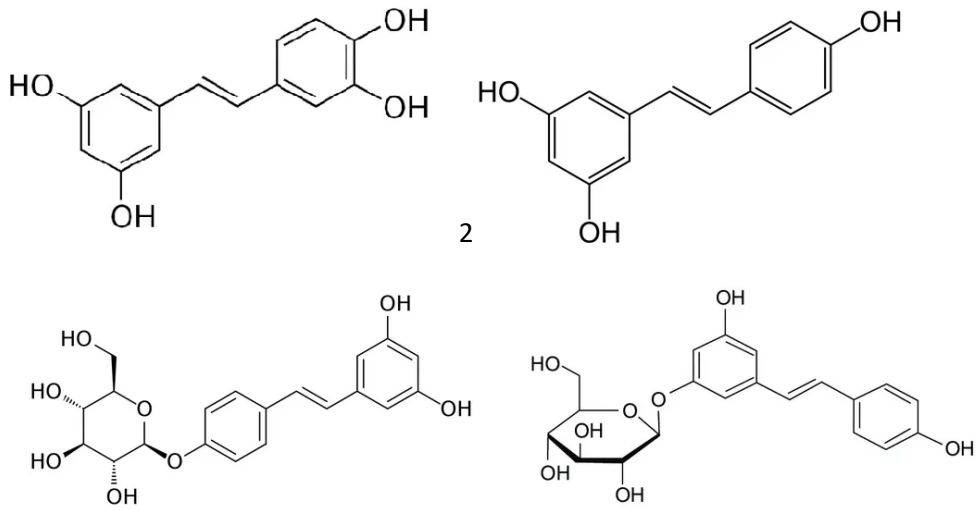
Продолжение Таблицы 2

	Транс-Ресвератрол натрия и калия-3-О-β-D-глюкопиранозид-4''-сульфат
	Транс-ресвератрол натрия и калия-3-О-β-D-глюкопиранозид-2''-сульфат
	Транс-ресвератрол натрия и калия-3-О-β-D-глюкопиранозид-4'-сульфат
	Транс-ресвератрол натрия и калия-3-О-β-D-глюкопиранозид-5-сульфат
	Цис-ресвератрол-3-О-βD-глюкопиранозид-6''-сульфат натрия и калия
	Цис-ресвератрол-3-О-βD-глюкопиранозид-4''-сульфат натрия и калия
	Цис-ресвератрол-3-О-βD-глюкопиранозид-3''-сульфат натрия и калия
	Цис-ресвератрол-3-О-βD-глюкопиранозид-2''-сульфат натрия и калия
	Цис-ресвератрол-3-О-βD-глюкопиранозид-5-сульфат натрия и калия
Кумарины и лигнаны	Кумарин
	(−)-лионирезинол-2а-сульфат натрия
	7-гидрокси-4-метокси-5-метилкумарин
	(+)-изоларицирезинол-2а-сульфат натрия
Флавоноиды	Кверцетин
	Кверцетрин
	Кверцетин-3-О-арабинозид
	Изокверцетин
	Гиперозид
	Лютеолин-7-О-глюкозид
	Апигенин
	(−)-эпикатехин
	(−)-катехин
Другие соединения	Протокатехиновая кислота
	Торахризон-8-О-d-глюкозид
	2,5-диметил-7-гидроксихромон
	5,7-дигидрокси-1(3Н)-изобензофуранон
	β-ситостерол
	Амбреттолид
	Олеаноловая кислота
	Триптофан
	Галловая кислота
	2,6-дигидрокси-бензойная кислота
	1-(3-О-β-D-глюкопиранозил-4,5-дигидроксифенил)-этанон
	Тахиозид
	1-(3',5'- Дигидроксифенил)-2-(4''-гидроксифенил)-этан-1,2-диол
	Натрия 3,4-дигидрокси-5-метоксибензойной кислоты метиловый эфир-4-сульфат
	Изотахиозид
	Хлорогеновая кислота
	Полифлаваностильбен А



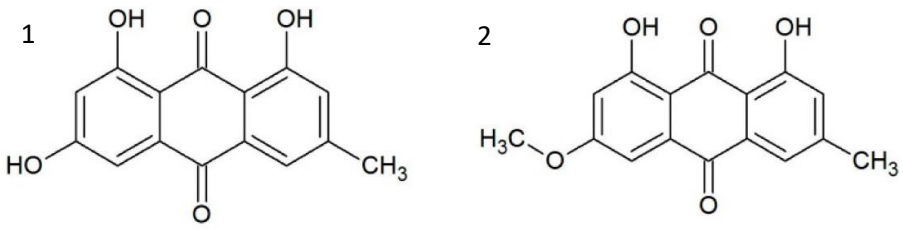
1 2

Рисунок 6 – Флавоноиды в корневищах *R. japonica*. 1 - (−)-катехин; 2 - (−)-эпикатехин



1 2 3 4

Рисунок 7 – Стильбеноиды и их производные в корневищах *R. japonica*. 1 - пикеатаннол; 2 - ресвератрол; 3 - ресвератролозид; 4 - полидатин



1 2

Рисунок 8 – Антрахиноны в корневищах *R. japonica*. 1 - эмодин; 2 - физион

В надземных и подземных органах рейнутрии сахалинской по данным литературы так же содержатся флавоноиды (рутин, кверцетин, изокверцитрин, рейнутрин), стильбены (ресвератрол и его гликозид), антрахиноны (эмодин, физион и др.), фенольные кислоты, в целом качественный состав схож с рейнутрией японской [31, 34, 43, 44].

Состав БАВ рейнутрии богемской менее изучен, в отличии от родительских видов, но считается схожим с ними. Из научных источников известно о наличии в составе листьев рейнутрии богемской флавоноидов [45].

Актуальным является получение каллусной культуры растений из рода рейнутрия и изучение их химического состава. Такой способ получения БАВ является более стандартизованным, не зависит от сезона и климата, а также позволяет снизить влияние выращиваемых растений на экосистемы [46, 47].

1.2.3. Фармакологическое действие

Оксидативный стресс часто является или причиной, или сопровождает большое количество патологий, поэтому растительные антиоксиданты могут профилактировать и облегчать их течение [48, 49, 50, 51, 52].

В растениях рода рейнутрия установлено более 277 соединений. Их фармакологическая активность связана с высоким содержанием стильбеноидов, антрахинонов, флавоноидов и фенольных кислот, а спектр их биологической активности включает антиоксидантное, противовоспалительное, нейропротекторное, противоопухолевое и кардиопротекторное действие [22].

Доказано, что экстракты из корневищ *R. japonica, R. sachalinensis* и *R. ×bohemica* обладают выраженной антиоксидантной активностью, в том числе за счет содержания проантоцианидинов. Основной вклад в антиоксидантный, противовоспалительный и цитопротекторный эффекты вносят такие соединения как ресвератрол, полидатин и эмодин, а также флавоноиды. Особое значение имеет ресвератрол – это мощный антиоксидант, вырабатываемый некоторыми растениями для защиты от неблагоприятных воздействий окружающей среды, является одним из наиболее изученных стилбеноидов рейнутрии. Полидатин представляет собой гликозид ресвератрола и также обладает фармакологической активностью, в том числе противовоспалительным действием. Эмодин является производным антрахинона и по данным литературы обладает

противовоспалительным эффектом и противоопухолевой активностью [22, 34, 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60].

За счет большого содержания в коре корней и корневища антрахинонов, например, эмодина, рейнутрия японская может давать слабительный эффект [21].

Неочищенный экстракт корневищ проявляет мощные антибактериальные свойства в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Исследования проводились на культурах *Bacillus cereus, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli и Salmonella anatum*. Основные биоактивные соединения были идентифицированы как стильбены (пицеид, ресвератролозид и ресвератрол) и гидроксиантрахиноны (эмодин и физион). Также доказана противогрибковая активность экстрактов *R. japonica* проведенными исследованиями на грибах (*Aspergillus fumigatus*) и дрожжах (*Candida albicans*). Обнаружена четкая корреляция между антимикробной активностью и содержанием флавоноидов в растении [61, 62, 63].

1.2.4. Препараты сырья рейнутрии

В Фармакопее Китая зарегистрированы несколько препаратов, в состав которых входят измельченные корневища и корни Рейнутрии японской, в комплексе с другими растениями [64, 65, 66].

1. Shufeng Jiedu капсулы **疏**风解毒胶囊 (рисунок 9А)

Состав: *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* (корневища и корни рейнутрии японской) 450 г; *Forsythia suspensa (Thunb.) Vahl Fructus* (плоды форзиции свисающей) 360 г; *Isatis indigotica Fort. Rhizoma* (корень вайды китайской) 60 г; *Bupleurum chinense Rhizoma* (корень володушки китайской) 360 г; *Patrinia scabiosaefolia Fisch. ex Link Herba* (трава патринии скабиозолистной) 360 г; *Verbenae Officinalis Herba* (трава вербены лекарственной) 360 г; *Phragmitis Rhizoma* (корень тростника) 270 г; *Glycyrrhiza Rhizoma et Radix* (корень и корневище солодки) 180 г;

Описание: представляет собой твердую капсулу, содержащую гранулы или порошок от темно-коричневого до коричневого цвета, ароматный, горьковатый вкус.

Фармакологический эффект: облегчает лихорадку, боль в горле, головную боль, заложенность носа, насморк, кашель и другие симптомы.

Способ применения и дозировка: обычно принимают после еды, чтобы уменьшить дискомфорт в желудочно-кишечном тракте. Запивают теплой водой согласно инструкции. По 4 капсулы каждый раз, 3 раза в день [66, 67].

2. Huganning капсулы 护肝宁胶囊 (рисунок 9Б)

Состав: *Sedi Herba* (трава очитка большого)850 г; *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* (корневища и корни рейнутрии японской) 500 г; *Salviae Miltiorrhizae Rhizoma et Radix* (корневища и корни шалфея многокорневого) 250 г; *Ganoderma* (ганодерма) 200 г.

Описание: твердые капсулы, содержащие гранулы или порошок от желтовато-коричневого до коричневого цвета, вкус горький, слегка кислый и вяжущий.

Фармакологический эффект:

1. Способствует нормальной иммунной функции организма, активирует систему самовосстановления печени, блокирует аутоиммунный ответ и улучшает способность противостоять вирусам.

2. Восстанавливает нормальную функцию печени.

3. Противодействует повреждению печени, эффективно подавляет увеличение аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы в сыворотке.

4. Значительно повышает содержание гемоглобина в плазме.

Показания: распирающая боль в эпигастрии, горечь во рту, желтуха, стеснение в груди и снижение аппетита из-за непроходимости в середине ЖКТ, острые и хронические гепатиты.

Способ применения и дозировка: для перорального применения, 4-5 капсул за раз, три раза в день [65, 68].

3. Shuanghu qinggan Granules 双虎清肝颗粒 (рисунок 9В)

Состав: цветки японской жимолости; корневища и корни рейнутрии японской; корневища лютиков; плод трихозанта; трава олденландии диффузной; трава одуванчика; корневища и корни шалфея многокорневого; цветы хризантемы индийской; трава фиалки; обработанный клубень пинеллии тройчатой; высушенные молодые плоды померанца; корень и корневище солодки.

Показания: заложенность и стеснение в эпигастрии, сухость во рту без позывов к питью, тошнота при виде жирной пищи, уменьшение приема пищи, тупая боль в подреберье, переполнение и вздутие живота, желтуха, темный язык с красным краем, толстый жирный налет на языке и скользкий струнообразный или частый струнообразный пульс; хронический гепатит В с симптомами, описанными выше.

Фармакологические эффекты: испытания in vitro или in vivo показали, что препарат оказывает определенный ингибирующий эффект на репликацию DHBV-DNA, он оказывает определенный защитный эффект на острое и хроническое повреждение печени, вызванное четыреххлористым углеродом, и обладает определенным иммуностимулирующим эффектом.

Способ применения и дозировка: Принимайте лекарство, смешав его с горячей водой, по 1-2 упаковки за раз, два раза в день или по рекомендации медицинских работников [64, 69].



Рисунок 9 – а - упаковка капсул Shufeng Jiedu; б - упаковка капсул Huganning; в - упаковка гранул Shuanghu qinggan

1.2.5. Количественное определение действующих веществ

В Фармакопее Китая сырье рейнутрии – корневища и корни рейнутрии японской – стандартизуется по содержанию полидатина и эмодина, количественно определяемых методом ВЭЖХ (0,15% и 0,6%). Методика довольно сложная и трудоемкая, так же требующая наличия дорогостоящих стандартов [23].

В Фармакопее РФ XIV издания отсутствуют методики количественного определения полидатина или ресвератрола. Имеется методика спектрофотометрического определения эмодина: 1 мл водно-спиртового извлечения (этанол 70%) разбавляют до 50 мл щелочно-аммиачным раствором и измеряют оптическую плотность (510 нм) [70].

Известны различные нефармакопейные методы количественного определения ресвератрола, в том числе спектрофотометрические (при максимуме поглощения 306 нм) [71].

1.2.6. Каллусная культура

Каллусная культура представляет собой совокупность дедифференцированных растительных клеток, формирующих неорганизованную массу *in vitro* под действием фитогормонов (ауксинов и цитокининов). Такие культуры являются удобными моделями для синтеза вторичных метаболитов.

По данным литературы для рода Рейнутрия каллусные и клеточные культуры изучены пока ограниченно и основном описаны для рейнутрии японской. Каллусы рейнутрии японской получали из нескольких видов эксплантов: фрагментов листьев, стебля и апексов побегов. Несмотря на то, что корневища рейнутрии считаются важным источником ресвератрола, получить каллусы из них не вышло, ввиду бактериальной и грибковой зараженности. Было показано влияние освещения на формирование каллуса и накопление БАВ. Для культивирования использовали среды с агаром и перлитом, агаризованную среду Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением фитогормонов в различных соотношениях. Из гормонов

используют цитокинины – 6-бензиламинопурин (6-БАП), кинетин; и ауксины – α-нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). Культуры клеток, полученные из листьев рейнутрии японской, накапливали в основном стильбены. В полученных каллусах исследовали накопление полидатина и ресвератрола методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. В каллусах, полученных из листьев рейнутрии японской определено содержание транс-полидатина и транс-ресвератрола, которое составило 0,33 мг/г и 0,02 мг/г в пересчете на массу высушенного каллуса, соответственно [31, 72].

Выводы к главе 1

1. Анализ научной литературы показал, что рейнутрия богемская является межвидовым гибридом рейнутрии японской и рейнутрии сахалинской (*R. japonica* × *R. sachalinensis*), профиль БАВ которых хорошо изучен. Рейнутрия богемская менее изученный вид, но предполагается сходство фитохимического профиля с родительскими видами. Рейнутрия богемская рассматривается как потенциальный источник фитопрепаратов для терапии заболеваний, связанных с оксидативным стрессом.

2. Также актуально получение каллусных культур растений рода рейнутрия и исследования их химического состава, поскольку это потенциально всесезонный источник БАВ постоянного стандартизованного состава.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования стали листья рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova), собранные в Ботаническом саду ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва) в разные годы (2019, 2020, 2022, 2023, 2024, 2025) в разные периоды вегетации: в сентябре, во время цветения, и в июне, до цветения (рисунок 10). Также объектами исследования являются листья рейнутрии богемской собранные за пределами Москвы и Московской области, а именно в Тверской области, Саратовской области и Могилёвской области (Республика Беларусь).

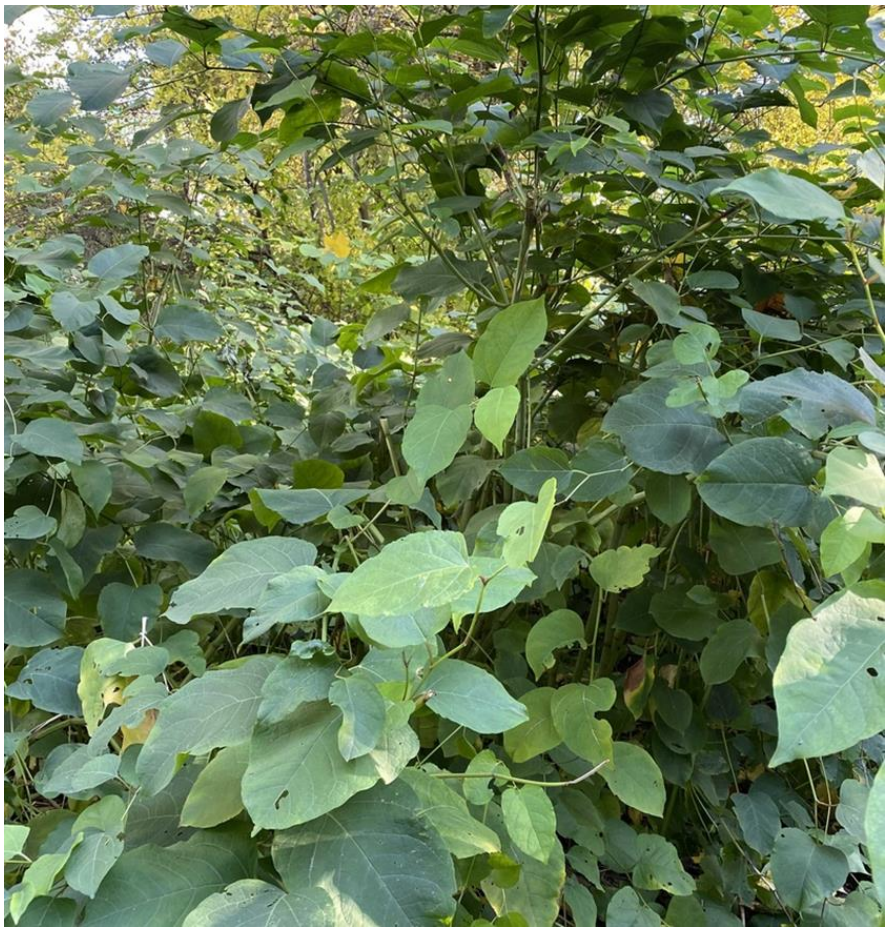


Рисунок 10 – Рейнутрия богемская (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) в Ботаническом саду ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Все образцы высушены воздушно-теневым способом и хранились при комнатной температуре в бумажных пакетах в сухом, защищенном от света месте.

Свежие образцы листьев, собранные в ботаническом саду ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва), были источником получения каллусной ткани.

2.2. Методы исследования

Работа была проведена на базе двух кафедр: биотехнологии и фармацевтического естествознания принадлежащих Институту фармации им. А. П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

2.2.1. Макроскопический и микроскопический анализ

Рейнутрии богемской листьев макроскопические характеристики изучали в согласно требованиям ОФС.1.5.3.0004 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XV издания.

Приготовление микропрепаратов проводили в соответствии с требованиями фармакопейной статьи ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ XV.

При микроскопическом анализе использовали традиционную методику приготовления микропрепарата листа с поверхности и поперечного среза черешка по ГФ XV. Просветляли сырье кипячением в течение 2-5 мин с раствором натрия гидроксида 5 %, разведенным водой (1:1).

Фотоснимки выполнялись на микроскопах «МИКМЕД-6» (окуляр 10Х и объективы: 4Х, 10Х, 40Х, 100Х) и «ЛОМО МИКМЕД-1» (окуляр 7Х и объективы:

10X, 20X, 40X), а также на современных микроскопах «Leica DM 1000 LED» (окуляр 10X и объективы: 4X, 10X, 40X) и электронном JSM-6510LV (Япония).

Реактивы, необходимые для микроскопического и качественного анализа приготовлены согласно ГФ XV ОФС.1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы».

2.2.2. Качественный анализ биологически активных веществ

Для скрининга на основные группы БАВ из листьев рейнутрии богемской были приготовлены водное и водно-этанольное (полученное при нагревании с обратным холодильником, 70% этанол) извлечения при соотношении сырья и экстрагента 1:10. Проведенные реакции представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Качественные реакции и их условия проведения

Открываемая группа веществ	Название реакции	Реактивы, условия	Положительный результат
Аминокислоты	Нингидриновая проба	к 1 мл извлечения добавляют 2 мл 1% раствора нингидрина, кипятят	Осадок сине-фиолетового цвета
	Биуретовая проба	к 1 мл извлечения добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 2-3 капли 1% раствора сульфата меди	Фиолетовая окраска с красным либо синим оттенком
Алкалоиды	Реакции с общеалкалоидными осадительными реактивами	к небольшому количеству извлечения добавлялось 2-3 капли свежеприготовленных растворов фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот	Выпадение цветного осадка или изменение цвета раствора
Флавоноиды	Цианидиновая проба (проба Шинода)	к извлечению добавляют несколько капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 20-30 мг порошка магния или цинка.	Изменение цвета раствора
	Реакции комплексообразования	к извлечению добавляют несколько капель	Изменение цвета раствора

Продолжение Таблицы 3

		2% спиртового раствора хлорида алюминия	
Дубильные вещества	Реакция с железно-аммонийными квасцами	к извлечению добавляют несколько капель 1% раствора сульфата железа аммония	черно-синее окрашивание / черно-зеленое окрашивание (осадок)
	Взаимодействие с железа (III) хлоридом	к извлечению добавляют несколько капель 2% раствора хлорида железа (III) в спирте	черно-синее окрашивание / черно-зеленое окрашивание (осадок)
	Взаимодействие с раствором желатина	к извлечению приливают несколько капель желатина 1% раствора в натрия хлорида 10% растворе	Помутнение или хлопьевидный осадок
	Взаимодействие с ацетатом свинца с добавлением уксусной кислоты.	к извлечению приливают несколько капель 10% раствора ацетата свинца, одновременно добавляют 10% раствор кислоты уксусной	Гидролизуемые танниды – белый осадок, не растворяется уксусной кислоте; конденсируемые – белый осадок, растворимый в уксусной кислоте
	Взаимодействие с ванилином в среде кислоты хлористоводородной (конц.)	к извлечению добавляют несколько капель ванилина 1% раствора в конц. кислоте хлористоводородной	Апельсиново-красное окрашивание
Сапонины	Образование пены	к извлечению добавляют 5 мл 0,1 М HCl или 5 мл 0,1 М NaOH, затем сильно встряхивают.	в двух пробирках образуется пена
	Реакция осаждения	к извлечению добавляют несколько капель раствора гидроксида бария или магния, соли меди, ацетата свинца	Выпадение осадка

Изучен качественный состав фенольных соединений и дубильных веществ листьев рейнутрии богемской с применением хроматографического анализа в тонком слое сорбента в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.2.0003 «Тонкослойная хроматография» ГФ XV издания.

Приготовление образцов для хроматографического анализа. Было получено водно-спиртовое извлечение листьев рейнутрии богемской, для этого 1 г

измельченных листьев (сито 1 мм) трижды извлекали 70% спиртом по 30 мл на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Полученные извлечения объединяли. Горячее извлечение фильтровали через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. После охлаждения объем извлечения доводили 70% спиртом до метки, перемешивали, на хроматографическую пластинку наносили капилляром.

Стандартных образцов растворов приготовление.

Согласно ГФ XV готовили растворы СО флавоноидов (рутина, кверцетина) и галловой кислоты.

Раствор СО ресвератрола. Около 0,05 г (точная навеска) ресвератрола помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл этилового спирта 96%, встряхивают до полного растворения, затем доводят объем раствора этиловым спиртом 96% до метки и перемешивают.

Раствор СО полидатина. Около 0,05 г (точная навеска) полидатина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл этилового спирта 96%, встряхивают до полного растворения, затем доводят объем раствора этиловым спиртом 96% до метки и перемешивают.

Неподвижная фаза. В качестве неподвижной фазы при хроматографическом определении действующих веществ, содержащихся в листьях рейнутрии богемской, использовали следующие пластинки: «Сорбфил» СТХ – 1А (100х100).

Подвижная фаза. В качестве подвижной фазы при хроматографическом определении действующих веществ, содержащихся в листьях рейнутрии богемской, использовали следующие системы растворителей: вода – кислота муравьиная – этилацетат (5:5:40), этилацетат – спирт 96 % – вода (100:17:13), хлороформ – спирт 96 % (8:2), этилацетат – хлороформ – кислота муравьиная – вода (60:19:12:9), этилацетат – этанол – вода – кислота муравьиная (60:25:10:5).

Приготовление детектирующего реактива для обработки хроматограмм. Рутин обнаруживали 5% раствором алюминия (III) хлорида. Также в качестве детектора использовался раствор железа хлорида, для его приготовления 10 г

железа (III) хлорида 6-водного растворяют в 100 мл воды. Щелочно-аммиачный раствор готовят смешиванием 10% аммиака с 10% хлоридом аммония для создания буферной среды (pH ≈9-10).

Хроматограммы прогревались в сушильном шкафу при температуре 100-110°C и изучались при дневном свете и в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм.

Исследование химического профиля водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии проводили методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием на хроматографической системе Waters Acquity, оснащенной диодно-матричным УФ-детектором и тандемным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TQD Waters. Объектом исследования служило водно-спиртовое извлечение из листьев рейнутрии богемской, полученное с использованием 70% спирта. Данный экстрагент был выбран с учетом его способности извлекать широкий спектр фенольных соединений, таких как гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, флаван-3-олы и производные стильбенов. В качестве подвижной фазы А использовали смесь вода–ацетонитрил в соотношении 95:5 с добавлением муравьиной кислоты. Подвижная фаза Б представляла собой ацетонитрил с добавлением муравьиной кислоты. Разделение компонентов проводили на колонке Acquity UPLC BEH C18 размером 0,21 × 15,0 см с размером частиц сорбента 1,7 мкм. Температура колонки составляла 35 °C, объем вводимой пробы – 2 мкл, скорость потока подвижной фазы – 0,25 мл/мин. Схема градиентного элюирования представлена в таблице 4. УФ-детектирование проводили в диапазоне 220-500 нм.

Таблица 4 – Схема градиентного режима хроматографирования

Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %
0	100	0
45	25	75
47	0	100
48	100	0
51	100	0

Детектирование на масс-детекторе и спектрометрическом осуществляли в соответствии с методикой, описанной Боковым и Самылиной [73].

Растворы стандартных образцов фенольных соединений готовились в концентрации 0,1 мг/мл.

Проводение идентификации компонентов извлечения строилось на основании совокупности признаков: времени удерживания, УФ-спектров, молекулярных ионов в положительном и отрицательном режимах ионизации, а также характерных фрагментных ионов. Для ряда соединений использовали совпадение с временами удерживания и спектральными характеристиками стандартных образцов. Для изомерных соединений учитывали предполагаемую последовательность элюирования, связанную с различиями в гидрофобности, а также литературные данные по составу фенольных соединений растений рода рейнутрия. Для анализа отбирали пики, площадь которых составляла не менее 1% от суммы площадей всех пиков при 290 и 360 нм, время удерживания было не менее 3,0 мин, а отклик на масс-спектрометрическом детекторе был достаточным для интерпретации спектров, так как водно-спиртовое извлечение обладает сложным химическим составом.

2.2.3. Определение влажности

Методика из ОФС.1.5.3.0007 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ XV использовалась для определялия влажности.

2.2.4. Определение содержания золы, золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте и минерального состава

Методика из ОФС. 1.2.2.2.0013 «Общая зола» ГФ XV использовалась для определялия содержания золы, определение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, проведено в соответствии с ОФС.1.5.3.0005 «Зола,

нерастворимая в хлористоводородной кислоте» ГФ XV. Минеральный состав качественно и количественно изучался с применением методов атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) на приборе Avio 200 (Perkin Elmer, США) и атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией (ЭТААС) для таких нормируемых тяжелых металлов, как свинец, мышьяк и кадмий, на приборе МГА-1000 (Люмекс, Россия). В качестве стандартов использовались коммерческие смеси с концентрацией элементов 100 мг/л (IV-ICPMS-71A, IV-ICPMS-71B, Inorganic Ventures, США), а также одноэлементные образцы на висмут, кадмий, свинец, мышьяк (Inorganic Ventures, США). Пробоподготовку проводили согласно методу 2д ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XV [74].

2.2.5. Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой

Содержание экстрактивных веществ является суммарным показателем, характеризующим содержание действующих веществ в лекарственном растительном сырье. Определение проводили по методу 1 ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XV.

2.2.6. Определение содержания дубильных веществ

Определение содержания дубильных веществ в листьях рейнутрии богемской проводили согласно ОФС.1.5.3.0008 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов» ГФ XV издания методом 1 (перманганатометрическое титрование).

2.2.7. Определение суммы флавоноидов

Содержание флавоноидов количественно определялось спектрофотометрическим методом после подбора условий. Были приготовлены спиртовое извлечение из листьев рейнутрии богемской и спиртовой раствор СО рутина, затем проведена реакция образования комплекса флавоноидов со спиртовым раствором хлорида алюминия и получены дифференциальные спектры. Этот вариант спектрофотометрии использовался для отделения максимума поглощения исследуемых веществ от перекрывающих максимумов не анализируемых соединений. Использование комплексообразующих добавок позволяет сместить максимум поглощения в длинноволновую область (батохромный сдвиг). Так, СО рутина имеет исходный максимум поглощения 362 ± 1 нм, после реакции с хлоридом алюминия – 410 ± 2 нм. Установлено, что максимум спектра поглощения комплекса флавоноидов из листьев рейнутрии богемской с алюминия хлоридом соответствует максимуму комплекса рутина, поэтому пересчет вели на рутин. Спиртовое извлечение с добавлением уксусной кислоты 30% (CAS №64-19-7, Ч., Panreac, Испания) использовали как раствор сравнения, для исключения влияния сопутствующих фенольных веществ. Спектрофотометр Drawell UV-VIS использовался для получения спектров поглощения в диапазоне длин волн 350-450 нм.

Валидацию методики проводили согласно ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ XV издания по показателям «специфичность», «линейность», «правильность» и «прецизионность».

Дополнительно качественный и количественный состав флавоноидов изучался с использованием метода ВЭЖХ-УФ. Анализ осуществлялся с использованием жидкостного хроматографа с диодно-матричным детектором Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), для разделения использовалась колонка HPLC Column Platinum C8-EPS, 250×4.6 мм, 5 мкм (Grace, США), температура 27 °С, подвижная фаза состояла из водного раствора ортофосфорной кислоты 0,1%

(Элюент А) и ацетонитрила (Элюент Б), скорость потока 0,5 мл/мин, условия градиентного элюирования приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Условия градиентного элюирования

Время, мин	Элюент А, %	Элюент Б, %
0	80	20
30	70	30
31	40	60
31,8	80	20
36	80	20

Детектирование проводилось при длине волны 365 нм. Растворы стандартных образцов получали в концентрации 0,01 мг/мл растворением в этиловом спирте 96%. Используемые стандарты: ориентин (99,63 %, HWI group, Германия), цинарозид (≥98,00 %, Sigma-Aldrich, США), рутин (97,21 %, PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия), гиперозид (98,90 %, HWI group, Германия).

2.2.8. Определение содержания стильбенов

Определение содержания стильбенов проводилось методом ВЭЖХ-УФ. Анализ осуществлялся с использованием жидкостного хроматографа с УФ-ВИД детектором LicArt 62 (Лабконцепт, Россия), для разделения использовалась колонка HPLC Column Spursil C18 150×4.6 мм, 5 мкм (Dikma, Китай), температура 30 °C, подвижная фаза состояла из водного раствора трифторуксусной кислоты 0,1% (Элюент А) и ацетонитрила (Элюент Б), скорость потока 0,8 мл/мин, условия градиентного элюирования приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Условия градиентного элюирования

Время, мин	Элюент А, %	Элюент Б, %
0	85	15
2	80	20
6	72	28
10	60	40
13	30	70
15	30	70
16	85	15

Детектирование проводилось при длине волны 306 нм. Растворы стандартных образцов получали в концентрации 0,01 мг/мл растворением в этиловом спирте 70%. Используемые стандарты: ресвератрол (≥99,00 %, Macklin, Китай), полидатин (≥99,00 %, Macklin, Китай).

Образцы для анализа готовили по методике для определения флавоноидов, а также с использованием ультразвука: к 1 г сухого сырья добавляли 10 мл спирта 70 % и помещали колбу в ультразвуковую баню на 30 мин.

2.2.9. Определение суммы полисахаридов

Определение содержания суммы полисахаридов проводилось гравиметрически. Метод гравиметрии основан на извлечении полисахаридов из лекарственного растительного сырья, осаждении спиртом этиловым 96%, сушке до постоянной массы и взвешивании сухого остатка. Для извлечения полисахаридов бралось 2 г измельченных до размера частиц 2 мм листьев рейнутрии богемской и проводилась трехкратная экстракция горячей водой. Извлечения объединяли, полисахариды осаждали из 25 мл аликвоты добавлением 75 мл этанола 96%, с последующим нагревом на водяной бане 30 мин. Фильтровали через бумажный фильтр, промывали осадок полисахаридов 15 мл смеси этанол 96% – вода (3:1), затем 10 мл смеси этанол 96% – этилацетат (1:1), фильтры высушивали в сушильном шкафу 2 часа при температуре 100-105°С, охлаждали и взвешивали.

2.2.10. Определение содержания витаминов

Для определения содержания витаминов использовался прибор «Капель-104Т» («Люмэкс», СПб, Россия) (капиллярный электрофорез) Экстракцию проводили 30 мин на ультразвуковой ванне ОДАСервис ODA-LQ40 без нагревания: 1 г сырья извлекали 30 мл воды очищенной. В колбе соединяли 1,065 мл натрия тетрабората раствора 0,01 М, 0,24 мл щавелевой кислоты раствора 1%, 0,06 мл кислоты хлористоводородной раствора 1%, 0,5 мл фильтрованного

извлечения. Условия разделения: боратный буфер, додецилсульфат натрия; капилляр (Lэфф/Lобщ = 60/50 см, диаметр 75 мкм); ввод пробы 30 мбар×с; напряжение +25 кВ; УФ-детектирование 254 нм; температура 40°С.

2.2.11. Определение содержания аминокислот

Определение суммы свободных аминокислот в пересчёте на глутаминовую кислоту проводили спектрофотометрическим методом при максимуме поглощения 568 нм после реакции с нингидрином [75].

Методом капиллярного электрофореза проанализирован качественный и количественный состав аминокислот (после гидролиза) на системе «Капель-105/105М» («Люмэкс», СПб, Россия), для этого навески образцов гидролизовали 6 М раствором кислоты хлороводородной (CAS №7647-01-0, Ч., Panreac, Испания) при температуре 110±5°С в течение 16-18 ч. Условия разделения: буфер 30 мМ фосфатный, 4 мМ β-циклодекстрин (pH 7,4); капилляр ($L_{эфф}/L_{общ}$ =65/75 см, диаметр 50 мкм); ввод пробы 150 мбар×с; напряжение +25 кВ; УФ-детектирование 254 нм; температура 30°С. Стандартная смесь аминокислот (Sigma-Aldrich, Швейцария) содержащая 17 аминокислот использовалась в качестве стандартного образца.

Также было проведено выделение белка из замороженных листьев рейнутрии богемской. Замороженные листья рейнутрии богемской гомогенизировали в ступке с кварцевым песком и 10 мМ фосфатным буфером (pH 7.4). Полученный гомогенат обрабатывали ультразвуком в 5 циклов по 1 минуте и центрифугировали на скорости 3500 оборотов 10 минут. Далее проводился диализ супернатанта против фосфатного буфера. Количество выделенного белка определялось методом Брэдфорда. Полученная проба анализировалась методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с использованием маркеров молекулярной массы белков SigmaMarker.

2.2.12. Определение антирадикальной активности

Активность определяли спектрофотометрически по реакции ингибирования радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ, DPPH, CAS №1898-66-4, Sigma-Aldrich, США), измерение проводили при длине волны 519 нм. Для этого спиртовое извлечение из листьев рейнутрии богемской разбавляли 70% спиртом в соотношении 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 для определения значения величины антирадикальной активности. После водно-спиртовые извлечения смешивали с ДФПГ, образцы экспонировали в темном месте 30 минут и спектрофотометрировали. Рабочий раствор ДФПГ использовали в концентрации 0,01 мг/мл. Раствором сравнения был этанол 70%. Для измерения использовался спектрофотометр ПЭ-5400УФ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия).

$$\text{Антирадикальная активность} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100\% \quad (1),$$

где A_0 – величина антирадикального поглощения ДФПГ раствора (контроль);

A_1 – антирадикальная активность исследуемого раствора с ДФПГ реактивом.

2.2.13. Изучение водных извлечений

Для сравнения эффективности полноты выделения биологически активных веществ в воду, в зависимости от метода изготовления, готовили одинаковые объемы водных извлечений по методике ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары» с учетом коэффициента водопоглощения. Определяли коэффициент водопоглощения по ОФС.1.5.3.0012 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья». Далее анализировали количественный состав БАВ в них. Методики использовались те же, что и для листьев рейнутрии богемской. Содержание экстрактивных веществ определяли по методу 1 ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XV. Определение содержания дубильных веществ проводили согласно ОФС.1.5.3.0008 «Определение содержания дубильных веществ в

лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов» ГФ XV издания методом 1 (перманганатометрическое титрование). Количественное определение содержания флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом после реакции с хлоридом алюминия. Определение содержания суммы полисахаридов проводилось гравиметрически. Определение содержания аскорбиновой кислоты проводили титриметрически с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Определение суммы свободных аминокислот в пересчёте на глутаминовую кислоту проводили спектрофотометрическим методом при максимуме поглощения 568 нм после реакции с нингидрином [75]. Методом капиллярного электрофореза проанализирован качественный и количественный состав аминокислот (после гидролиза) на системе «Капель- 105/105М» («Люмэкс», СПб, Россия).

2.2.14. Получение каллусов

Для получения каллусной культуры использовали свежие листья рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova), собранные на территории Ботанического сада ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). В качестве эксплантов отбирали фрагменты листовой пластинки, прилегающие к центральной жилке (сосудисто-волокнистому пучку) в базальной части листа, что позволяло стандартизировать размеры образцов и использовать участки ткани с высокой морфогенетической активностью.

Перед внесением на питательную среду листья подвергали поверхностной стерилизации. Растительный материал предварительно промывали в мыльном растворе, затем последовательно промывали проточной водопроводной и дистиллированной водой. После этого листья помещали на 1 мин в 70%-ный этанол и переносили на 10 мин в стерилизующий раствор препарата «Део-хлор люкс» фирмы ООО «ДЕО», Россия (3,4 г /200 мл воды; концентрация рабочего раствора по активному хлору составляла 0,75%). По завершении стерилизации листья

трижды промывали дистиллированной водой для удаления остатков стерилизующего раствора.

В асептических условиях из стерилизованных листьев вырезали фрагменты квадратной формы размером 10-15 мм, содержащие участок, прилегающий к главной жилке у основания листа. Полученные экспланты размещали на поверхности агаризованной среды Мурасиге-Скуга (MS), содержащей кинетин (КТ) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). Культивирование проводили в термостате (Термостат-инкубатор BD 115, Binder GmbH, Германия) при температуре 26ºС.

Для приготовления гормонсодержащих сред предварительно готовили стоковые растворы КТ и 2,4-Д. Состав использованных стоковых растворов и питательных сред приведен в таблице 7.

Таблица 7 – Состав стоковых растворов и питательных сред

Объект	Состав	Способ приготовления	Назначение
Стоковый раствор КТ	10 мг КТ, 5 мл 1М HCl, дистиллированная вода до 50 мл.	Навеску КТ растворяли в хлористоводородной кислоты растворе, затем объем доводился до метки дистиллированной водой. В стерильных условиях раствор фильтровали, хранили в при 4ºС в защищенном от света месте.	Источник цитокинина для приготовления агаризованной и жидких сред.
Стоковый раствор 2,4-Д	10 мг 2,4-Д, 1,0 мл этанола 96%.	Навеску 2,4-Д растворяли в этаноле. Раствор хранили в при 4ºС в защищенном от света месте.	Источник ауксина для индукции каллусогенеза и поддержания роста культуры.
Агаризованная среда MS+КТ+2,4-Д	30 г сахарозы, 7 г агар-агара, дистиллированная вода 928 мл, 1 мл раствора витаминов 1000-кратного, 50 мл раствора макроэлементов 20-кратного, 1 мл раствора микроэлементов1000-кратного,	В колбу Эрленмейера помещали сахарозу и агар-агар, растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали в автоклаве при температуре 121ºС и остаточном давлении 1 атм в течение 30 мин. После раствор охлаждали до 50ºС и в ламинарном боксе с помощью одноканальных пипеток в раствор вносили термолабильные добавки.	Индукция каллусогенеза и субкультивирование на твердой питательной среде.

Продолжение Таблицы 7

	10 мл раствора хелата железа 100-кратного, 1,5 мл КТ стокового раствора, 100 мкл 2,4-Д стокового раствора.	Полученный раствор перемешивали, затем разливали в стерильные чашки Петри по 20-30 мл. После застывания питательной среды чашки хранили при 4ºС не более 3 дней.	
Жидкая среда MS+КТ+2,4-Д	30 г сахарозы, дистиллированная вода 928 мл, 1 мл раствора витаминов 1000-кратного, 50 мл раствора макроэлементов 20-кратного, 1 мл раствора микроэлементов 1000-кратного, 10 мл раствора хелата железа 100-кратного, 1,5 мл КТ стокового раствора, 100 мкл 2,4-Д стокового раствора.	В колбу Эрленмейера помещали сахарозу, растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали в автоклаве при температуре 121ºС и остаточном давлении 1 атм в течение 30 мин. После раствор охлаждали до 50ºС и в ламинарном боксе с помощью одноканальных пипеток в раствор вносили термолабильные добавки. Полученный раствор перемешивали, среда использовалась немедленно.	Субкультивирование каллусов в жидкой среде.
Жидкая среда MS+КТ	Аналогично предыдущей среде, но без добавления 100 мкл 2,4-Д стокового раствора.	В колбу Эрленмейера помещали сахарозу, растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали в автоклаве при температуре 121ºС и остаточном давлении 1 атм в течение 30 мин. После раствор охлаждали до 50ºС и в ламинарном боксе с помощью одноканальных пипеток в раствор вносили термолабильные добавки. Полученный раствор перемешивали, среда использовалась немедленно.	Субкультивирование каллусов в жидкой среде.

Субкультивирование каллусов на агаризованной среде проводили путем переноса фрагментов рыхлой каллусной ткани на свежую агаризованную среду

того же состава. Перенесенные участки каллуса размещали на поверхности среды и обеспечивали плотный контакт ткани с агаризованной средой, вдавливая фрагменты пинцетом. В условиях темноты и при 26ºС продолжительность одного пассажа составляла более 30 сут.

Для перевода культуры в жидкую систему культивирования использовали фрагменты каллуса, ранее полученные на агаризованной среде. Соответствующий объем жидкой питательной среды вносили в колбы Эрленмейера, заполняя не более 20% объёма колбы. Клетки каллуса вносили в колбу с помощью стерильных пинцета и препаровальной иглы, колбы закрывали ватно-марлевыми пробками, дополнительно герметизировали и защищали от света. Колбы помещали в шейкер-инкубатор (IKA KS 4000 i control, IKS, Германия) и проводили культивирование при 26ºС и скорости перемешивания 110 об/мин.

Оптическая микроскопия клеток проводилась на микроскопе «Leica DM 1000 LED» (окуляр 10X и объективы: 4X, 10X, 40X).

2.2.15. Определение содержания стильбенов в каллусах

Определение содержания стильбенов проводилось методом ВЭЖХ-УФ. Анализ осуществлялся с использованием жидкостного хроматографа с УФ-ВИД детектором LicArt 62 (Лабконцепт, Россия), для разделения использовалась колонка HPLC Column Spursil C18 150×4.6 мм, 5 мкм (Dikma, Китай), температура 30 °C, подвижная фаза состояла из водного раствора трифторуксусной кислоты 0,1% (Элюент А) и ацетонитрила (Элюент Б), скорость потока 0,8 мл/мин, условия градиентного элюирования приведены в таблице. Длина волны 306 нм использовалась для детектирования. Градиентное элюирование соответствует аналогичной методике для листьев.

Растворы СО готовились в концентрации 0,01 мг/мл растворением в этиловом спирте 70%. Используемые стандарты: ресвератрол (≥99,00 %, Macklin, Китай), полидатин (≥99,00 %, Macklin, Китай).

Образцы для анализа готовили с использованием ультразвука, для этого к 1 г высушенного каллуса добавляли 10 мл спирта (70 %) и помещали колбу в ультразвуковую баню на 30 мин.

2.2.16. Определение элементного состава каллусов

Элементный состав каллусов качественно и количественно определяли методами АЭС-ИСП (Avio 200 (Perkin Elmer, США)) и атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией (ЭТААС) на приборе МГА-1000 (Люмекс, Россия), как и для сухих листьев. Пробоподготовку проводили согласно методу 2д ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XV.

2.2.17. Изучение стимулирующего действия экстракта из листьев рейнутрии богемской на морфометрические показатели растений и содержание биологически активных веществ

Для изучения стимулирующего действия из листьев рейнутрии богемской получали дезалкоголизированный водный раствор спиртового экстракта (ДЭРБ). Листья измельчали до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, 30 мин экстрагировали на водяной бане 70 % спиртом, соотношение сырья и экстрагента 1:20, полученное извлечение упаривали на водяной бане до сухого остатка и затем разбавляли водой объемом 200 мл. Биологическую активность экстракта оценивали на модельной культуре – кресс-салате (*Lepidium sativum* L. (сем. капустные – *Brassicaceae*)), который выращивали на почвогрунте и гиропонным способом (субстрат перлит), семена кресс-салата - коммерчески доступные сорта: «Курлед», семена «СеДеК», партия 7977; «Весенний», семена «СеДеК», партия 7555; «Пикант», семена «СеДеК», партия 7336; «Ажур», семена «Сортсемовощ», партия 20820; «Пучковый», семена «СеДеК», партия 10927;

«Ванька кучерявый», семена «Аэлита», партия 22164; «Ореховый», семена ООО «ССПК Агрофирмы МАРС», партия 3047; «Данский», семена ООО «М-Гринс», сборка 04.2023. Состав исходного раствора для приготовления питательной среды для гидропоники: Азот общий (N) – 7,0 %, Фосфор (P_2O_5) – 4,0 %, Калий (K_2O) – 10,0 %, Кальций (CaO) – 4,0 %, Магний (MgO) – 1,5 %, Сера (SO_4^{2-}) – 2,0 %, Железо (Fe) – 0,1 %. Для приготовления питательной среды готовили 2 раствора, каждый раствор, согласно инструкции, использовался 2 недели, а затем утилизировался. Для приготовления 1 раствора использовали 3 мл исходного раствора на 4,5 л воды, а для 2 раствора 6 мл на 4,5 л воды.

Семена перед посевом замачивались в воде или в экстракте рейнутрии на 1 сут, после культивирования определяли морфометрические показатели растений, а также содержание дубильных веществ, аскорбиновой кислоты, суммы флавоноидов. Содержание БАВ определяли стандартными фармакопейными методами по ГФ XV. Определение содержания дубильных веществ проводили согласно ОФС.1.5.3.0008 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов» ГФ XV издания методом 1 (перманганатометрическое титрование). Количественное определение содержания флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом после реакции с хлоридом алюминия. Определение содержания аскорбиновой кислоты проводили титриметрически с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

2.2.18. Получение наночастиц серебра в среде водного извлечения листьев рейнутрии богемской

Для получения наночастиц серебра (НЧAg) использовалось водное извлечение из сухих листьев рейнутрии богемской и раствор нитрата серебра. Извлечение получали из 1 г высушенных и измельченных листьев рейнутрии богемской, к которым добавляли 50 мл дистиллированной воды и экстрагировали в течение 1 ч на водяной бане при 90ºС и непрерывном перемешивании. Извлечение

фильтровали и центрифугировали 10 мин при 3500 об/мин. Синтез проводили при нагревании реакционной смеси с последующей инкубацией в темноте. Для получения НЧAg использовали супернатант извлечения, который добавляли по капле к раствору нитрата серебра ($2x10^{-3}$ М) нагретого до 70ºС и интенсивном перемешивании, до изменения цвета раствора. Остывшую до комнатной температуры реакционную смесь инкубировали в темноте при перемешивании до окончания формирования частиц.

Полученные НЧAg рейнутрии (НЧСР) характеризовали методами УФ-видимой спектроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии и электронной дифракции, используя трансмиссионный электронный микроскоп LEO 912 AB (“Carl Zeiss”, Германия), также определяли распределение частиц по размеру.

Биологическую активность НЧСР оценивали в тесте на прорастание и показатели роста семян кресс-салата (*Lepidium sativum L.)* сорта «Курлед» (семена «СеДеК», партия 7977). Методика исследования аналогична приведенной в работе Луценко с соавторами [75].

2.3. Статистическая обработка данных и валидация методик

Статистическу обработку результатов испытаний провели по ГФ XV ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» с использованием критерия Стьюдента, для статистической обработки результатов была использована программа MS Office Excel.

Руководствуясь ОФС 1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV методика валидирована.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ ЛИСТЬЕВ РЕЙНУТРИИ БОГЕМСКОЙ

Для разработки характеристик подлинности листьев рейнутрии богемской были изучены внешние признаки, анатомо-диагностические характеристики, хроматографическое поведение БАВ из листьев рейнутрии богемской и проведены качественные реакции на ключевые группы биологически активных соединений.

3.1. Макроскопический анализ листьев рейнутрии богемской

Визуализированы, изучены и охарактеризованы макроскопические характеристики цельных листьев рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova, а также измельченных и порошка. На основании полученных данных разработан соответствующий раздел проекта НД на данное сырье.

Листья рейнутрии плотные (кожистые), простые, адаксиальная сторона голая, абаксиальная имеет опушение по жилкам. У листовой пластинки длина может достигать 25 см и быть до 15 см в ширину. Форма листовой пластинки овоидная или широкоэллипсоидальная, край цельный, верхушка острая, но не вытянутая, что отличает данный вид от рейнутрии японской, основание листа или постепенно суженное к черешку (редко), широкотреугольное, иногда прямое (усеченное, будто срезанное), изредка округлоклиновидное. Длина черешка может достигать 2 см. Цвет листьев с верхней и нижней стороны отличается: верхняя сторона зеленая, а нижняя – светлее. Запах очень невыражен, слегка горьковатый вкус (рисунок 11).

У измельченных листьев (7 мм) можно отметить характерный цвет кусочков (с одной стороны зеленый, а с другой стороны – бледно-зеленый). В остальном внешние признаки без особенностей. Аналогично у порошкованных листьев.



Рисунок 11 – Листья рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) заготовленные в Ботаническом саду ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет): а - цельные, б - измельченные

3.2. Микроскопический анализ листьев рейнутрии богемской

Для микроскопического анализа использовалось цельное сырье, заготовленное на территории Ботанического сада Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Проведено изучение анатомо-диагностических признаков образцов листьев рейнутрии богемской.

Изучение микропрепарата листа с поверхности рейнутрии богемской

С целью разработки характеристик подлинности листьев рейнутрии богемской было проведено углубленное изучение анатомо-диагностических признаков листа. Микропрепараты готовились по традиционной методике ГФ XV ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения». При разных увеличениях исследовали верхний и нижний эпидермис, а также глубинные структуры листа, расположенные под эпидермисом (паренхима, включения, сосуды и т.д.).

При изучении микроскопии листа охарактеризован эпидермис: верхний – изодиаметрические некрупные клетки округлой или слегка угловатой (5-7-угольной) формы, с прямыми стенками; нижний: извилистые клеточные стенки.

Устьичный комплекс аномоцитного (3-5 околоустьичных клеток) типа присутствует только с нижней стороны листа. Встречаемость устьиц до 90-100 на 1 мм² (устьичный индекс 8,7). Нижний эпидермис характеризуется многоклеточными (4-8 клеток) железками (диаметр 40-80 мкм) с окрашенным содержимым, их количество составляет 30-80 на 1 мм². Над жилками клетки эпидермиса более вытянутые, практически прямостенные, прямоугольные, длина примерно в 3 раза больше ширины. По крупным жилкам с нижней стороны листа установлено наличие папиллозных волосков, одноклеточных и многоклеточных, длиной в основном 75-200 мкм. Также замечено большое количество друз оксалата кальция, встречаемость 20-40 на 1 мм^2. По краю листа клетки эпидермиса имеют сосочковидные выросты, особенно крупные на верхушке листа.

Изученные микроскопические характеристики представлены на рисунках 12-17.

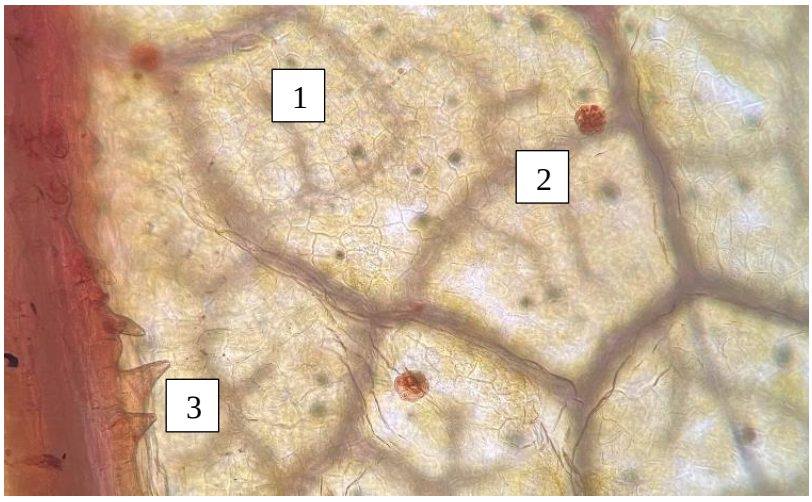


Рисунок 12 – Микропрепарат нижнего эпидермиса листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (увеличение ×100). 1 - аномоцитный устьичный комплекс; 2 - железка; 3 - сосочковидный волосок



Рисунок 13 – Микропрепарат нижнего эпидермиса листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×400). 1 - железка восьмиклеточная; 2 - аномоцитный устьичный комплекс

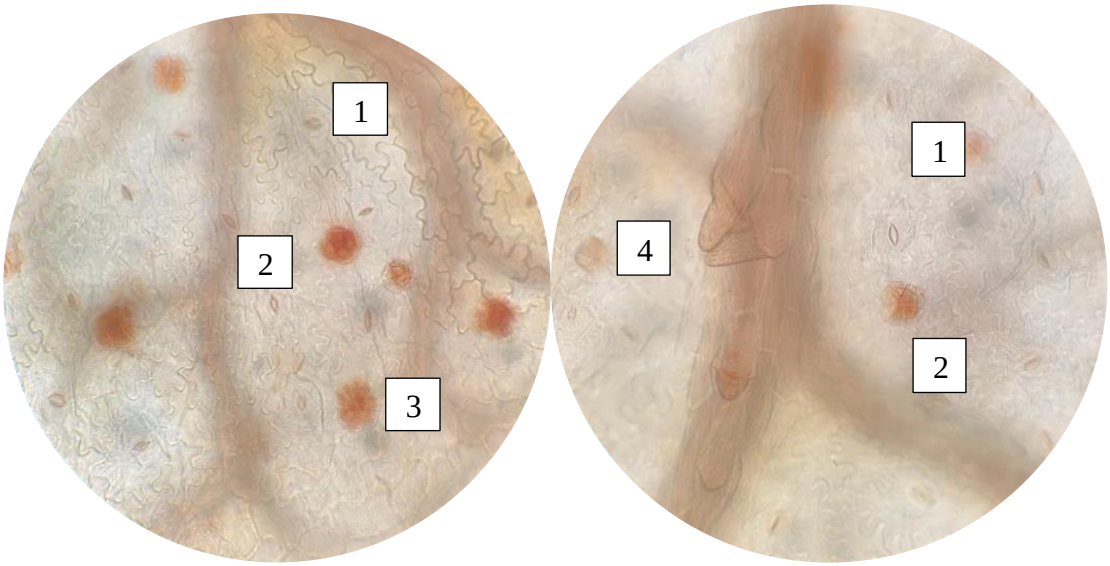


Рисунок 14 – Микропрепарат нижнего эпидермиса листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×400). 1 - аномоцитный устьичный комплекс; 2 - железка четырехклеточная; 3 - железка восьмиклеточная; 4 - сосочковидный волосок

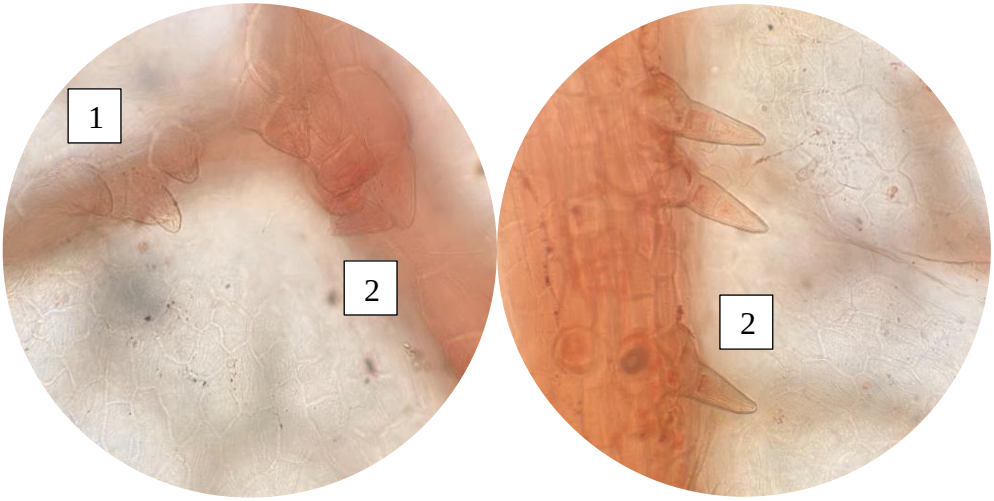


Рисунок 15 – Микропрепарат нижнего эпидермиса листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (увеличение ×400). 1 - сосочковидный волосок; 2 - многоклеточный волосок

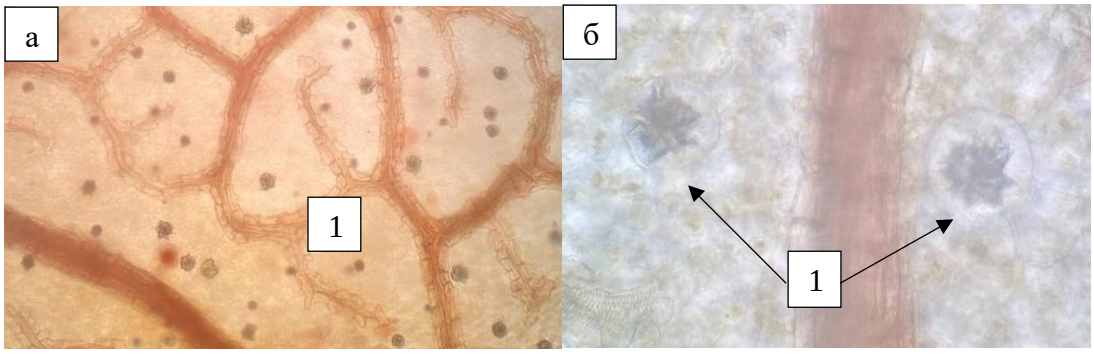


Рисунок 16 – Микропрепарат нижней стороны листа рейнутрии богемской (Reynoutria × bohemica Chrtek et Chrtkova). 1 - друзы оксалата кальция. (увеличение а – ×100; б – ×400)

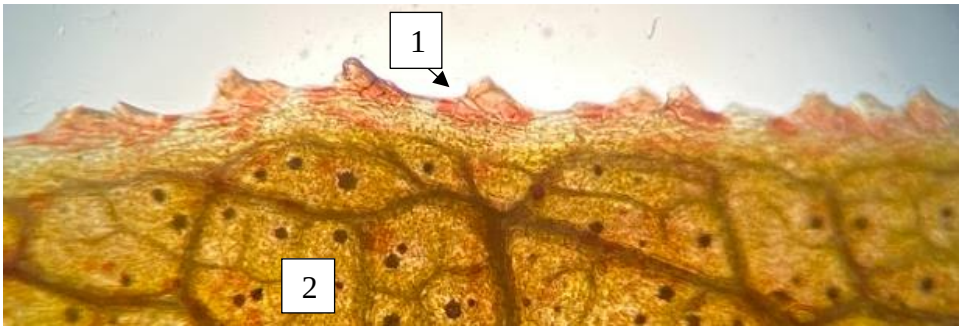


Рисунок 17 – Микропрепарат края листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×100). 1 - сосочковидные выросты; 2 - друзы оксалата кальция

Исследование эпидермиса черешка выявило, что устьиц меньше, чем на листовой пластинке. Клетки эпидермиса более вытянутые, содержат антоцианы.

При изучении поперечного среза черешка установлено, что срез немного вертикально вытянут, имеет выраженный желобок на адаксиальной стороне. Проводящая система представлена коллатеральными пучками закрытого типа. Один крупный пучок располагается в центре, вокруг него подковообразно располаются 10 более мелких пучков. Пучки окружены паренхимными клетками-идиобластами с желтым содержимым. У центральный проводящего пучка обнаружена склеренхимная обкладка. Под эпидермисом располагается колленхима и много слоев хлорофиллоносной паренхимы. В паренхиме визуализируются друзы (рисунки 18-20).

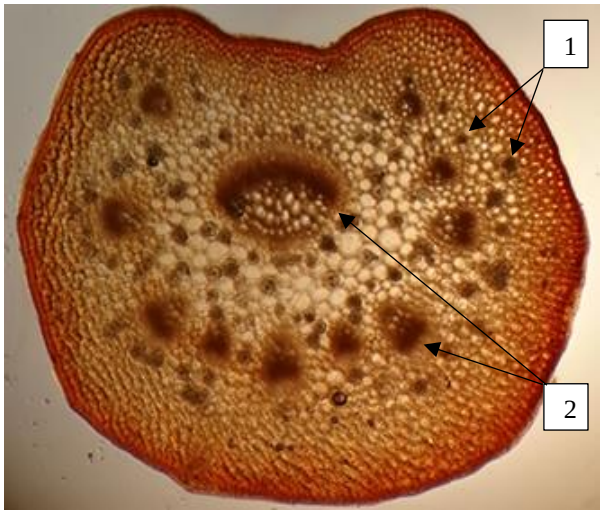


Рисунок 18 – Микропрепарат черешка листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×100). 1 - друзы оксалата кальция; 2 - проводящие пучки

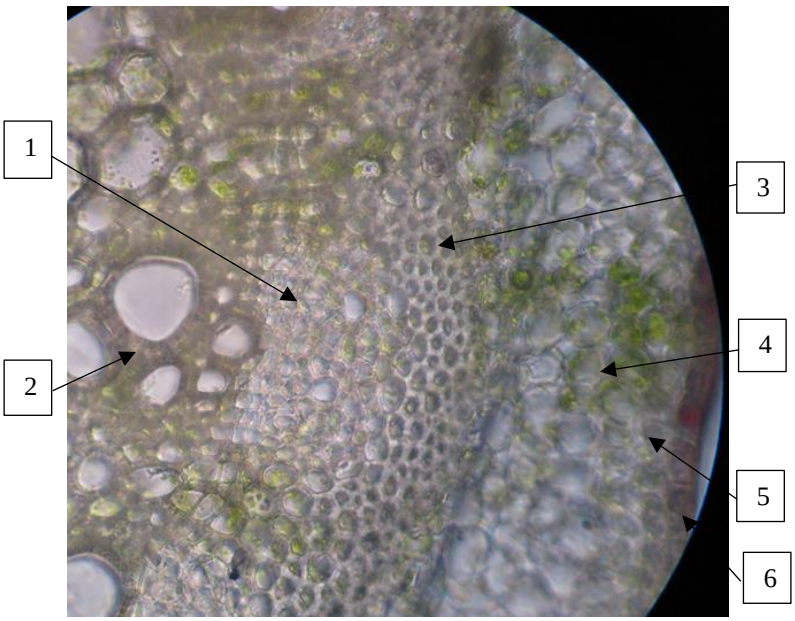


Рисунок 19 – Микропрепарат черешка листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×200). 1 - флоэма; 2 - ксилема; 3 – склеренхима; 4 - хлорофиллоносная паренхима; 5 - колленхима; 6 - эпидермис

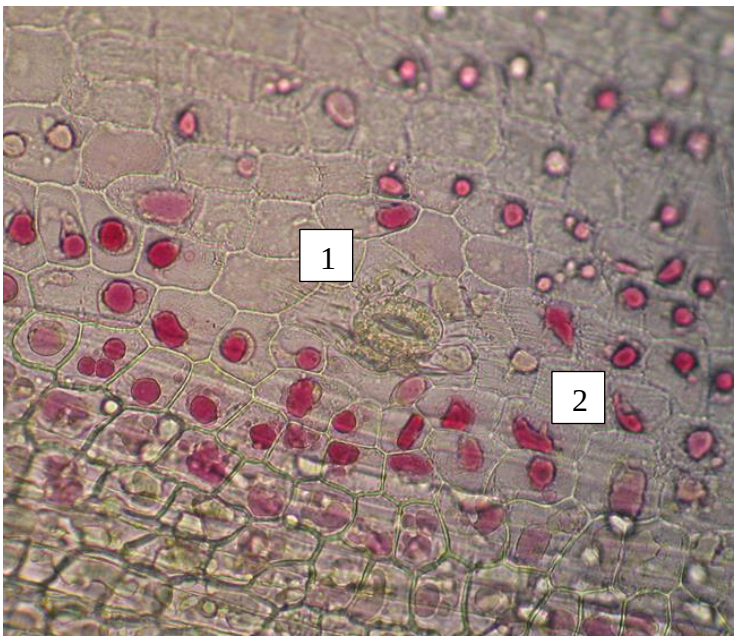


Рисунок 20 – Микропрепарат эпидермиса черешка листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×400). 1 - устьичный комплекс; 2 - клетки эпидермиса с антоцианами

Исследования образцов методом растровой электронной микроскопии проводили на электронном микроскопе JSM-6510LV (Япония) по методике, описанной А.А. Гудковой [77] (рисунки 21-22).

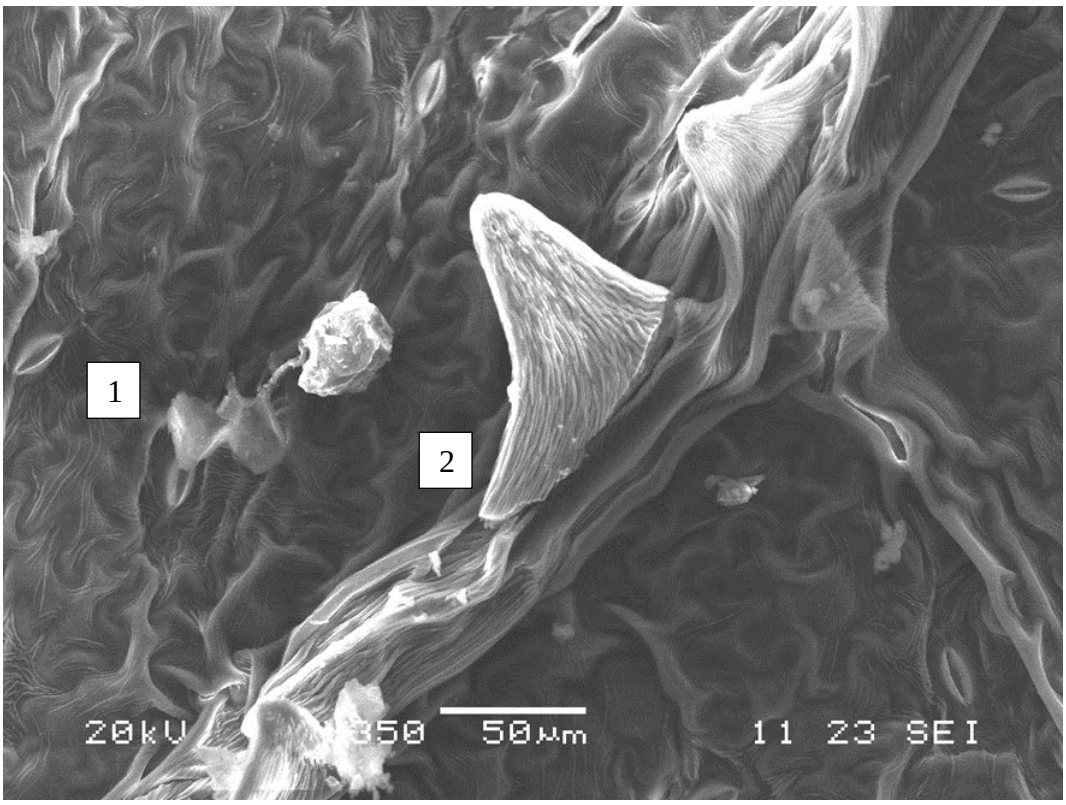


Рисунок 21 – Микропрепарат нижнего эпидермиса листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×1.200). 1 - аномоцитный устьичный комплекс; 2 - сосочковидный волосок

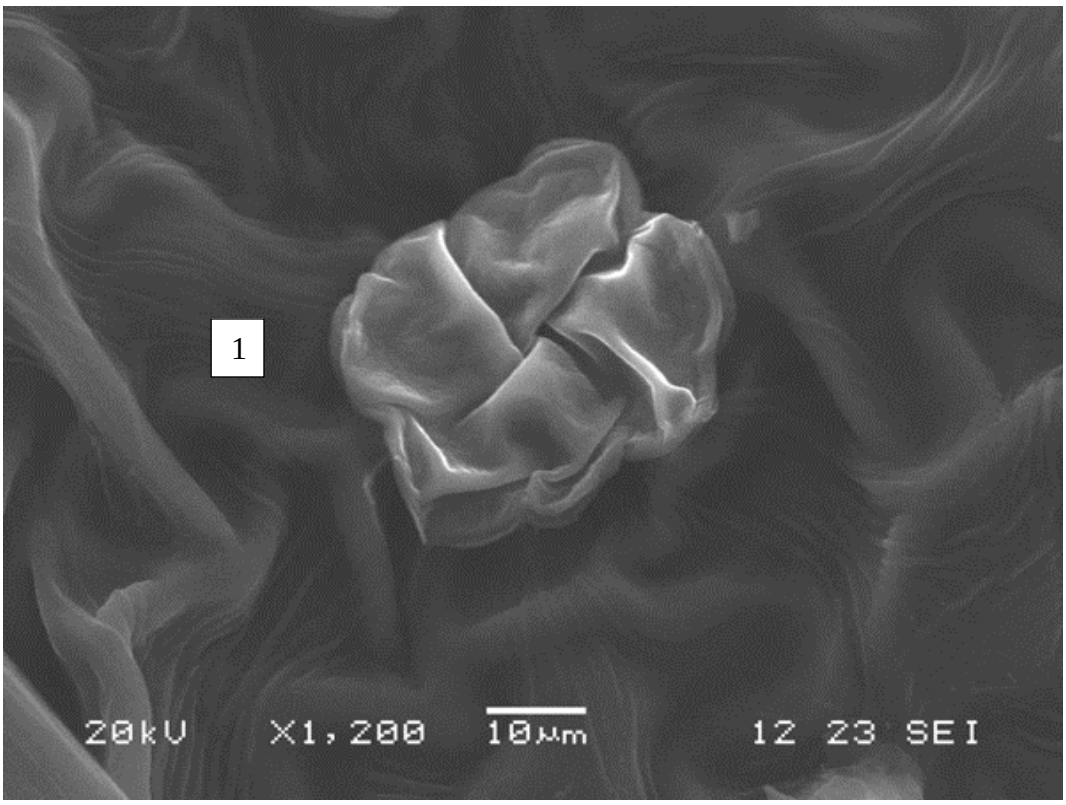


Рисунок 22 – Микропрепарат нижнего эпидермиса листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) (×1.200). 1 - четырехклеточная железка

3.3. Качественный анализ листьев рейнутрии богемской

3.3.1. Первичный скрининг биологически активных веществ листьев рейнутрии богемской при помощи качественных реакций

При помощи качественных реакций было установлено, что в листьях рейнутрии богемской присутствуют аминокислоты, дубильные вещества, флавоноиды (производных флавона, флавонола и флаванона) и сапонины. Присутствие алкалоидов требует дополнительных исследований, так как только одна реакция положительная (положительная с фосфорновольфрамовой кислотой и отрицательная с фосфорномолибденовой кислотой). Результаты проведения качественных реакций представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты качественных реакций на группы БАВ листьев рейнутрии богемской

Реактивы	Ожидаемый эффект	Наблюдаемый эффект
Извлечение + 2 мл нингидрина 1% (кипячение)	Фиолетово-синее окрашивание	+ Обнаружен белок Обнаружены аминокислоты
Извлечение + 1 мл раствор NaOH 10% и 2-3 кап. 1% $CuSO_4$	Фиолетовая окраска с красным или синим оттенком	+ Обнаружен белок
Извлечение + раствор $HCl_{конц}$ и магний	Оранжевая/красная окраска, образование газа	+ Обнаружены флавоноиды
Извлечение + 2% раствор $AlCl_3$	Желтое или желто-зеленое окрашивание	+ Обнаружены флавоноиды
Извлечение + 1% раствор железо-аммонийных квасцов	Черно-зеленое окрашивание – присутствие конденсируемых таннидов Черно-синее – гидролизуемых таннидов	+ Обнаружены дубильные вещества (конденсируемые танниды)
Извлечение + 2% раствор $FeCl_3$	Черно-зеленое окрашивание – присутствие конденсируемых таннидов Черно-синее –	+ Обнаружены дубильные вещества (конденсируемые танниды)

Продолжение Таблицы 8

	гидролизуемых таннидов	
Извлечение + 1% раствор желатина приготовленный в NaCl растворе 10%	Наблюдается появление хлопьевидного осадка/ мути	+ Обнаружены дубильные вещества
Извлечение + 10% раствор свинца ацетата в присутствии уксусной кислоты	Гидролизуемые танины орауют не растворимый белый осадок, Конденсированные – растворимый	+ Обнаружены дубильные вещества (конденсированные таннины)
Извлечение + 2-3 кап. 1% CuSO4	Появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии	+ Обнаружены сапонины

3.3.2. Изучение биологически активных веществ листьев рейнутрии богемской методом тонкослойной хроматографии

При разделении водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе вода – кислота муравьиная – этилацетат (5:5:40) после обработки детектирующим реактивом 5% раствором алюминия (III) хлорида обнаружено 5 зон адсорбции желто-зеленого цвета, идентифицирован рутин (рисунок 23).

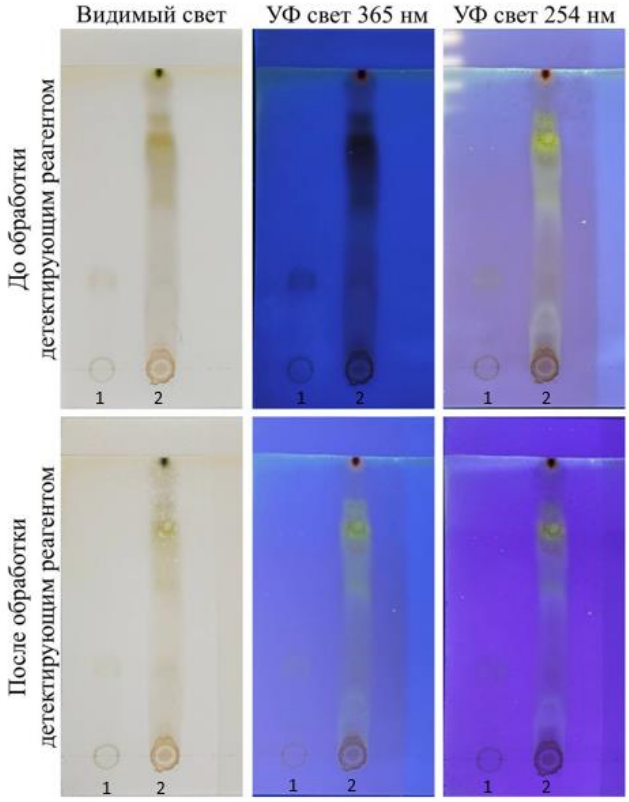


Рисунок 23 – Тонкослойная хроматограмма стандарта рутина (1) и извлечения из листьев рейнутрии богемской (2)

В той же системе вода – кислота муравьиная – этилацетат (5:5:40), но с обработкой детектирующим реактивом раствором железа хлорида, кроме зоны адсорбции, соответствующей рутину, была обнаружена зона адсорбции соответствующая полидатину (рисунок 24).

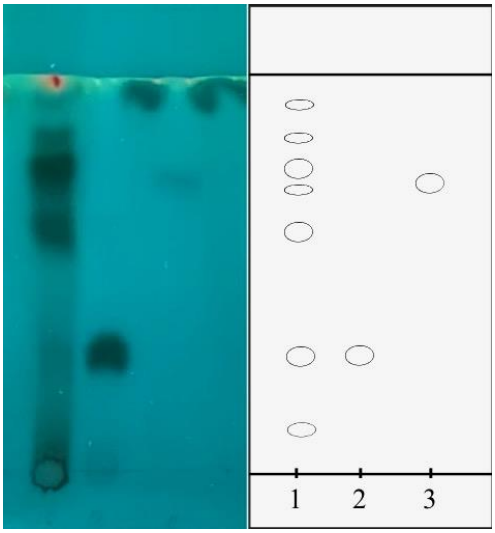


Рисунок 24 – Тонкослойная хроматограмма извлечения из листьев рейнутрии богемской (1), СО рутина (2), СО полидатина (3)

При разделении водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской методом ТСХ в системе, состоящей из этилацетата, спирта 96 % и воды (100:17:13), просматривая при дневном свете и в УФ-свете (длина волны 365 нм), после обработки щелочно-аммиачным раствором, подтверждено наличие антраценпроизводных, была обнаружена зона адсорбции красно-оранжевого цвета (рисунок 25).

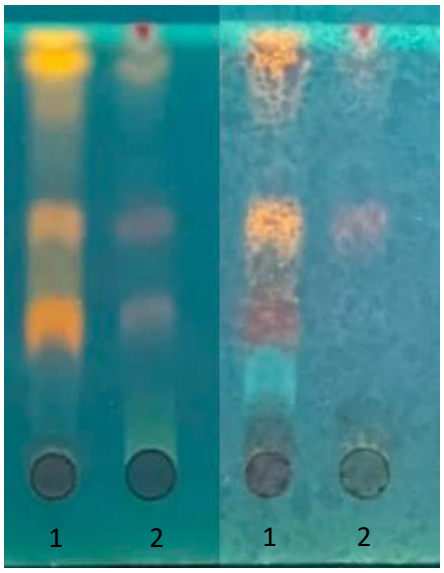


Рисунок 25 – Тонкослойная хроматограмма извлечения из корневищ (1) и листьев (2) рейнутрии богемской

При разделении водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской методом ТСХ в системе хлороформ – спирт 96 % (8:2) после обработки детектирующим реактивом щелочно-аммиачным раствором обнаружено около 9 зон адсорбции желто-зеленого цвета, идентифицированы полидатин, галловая кислота, кверцетин, рутин (рисунок 26).

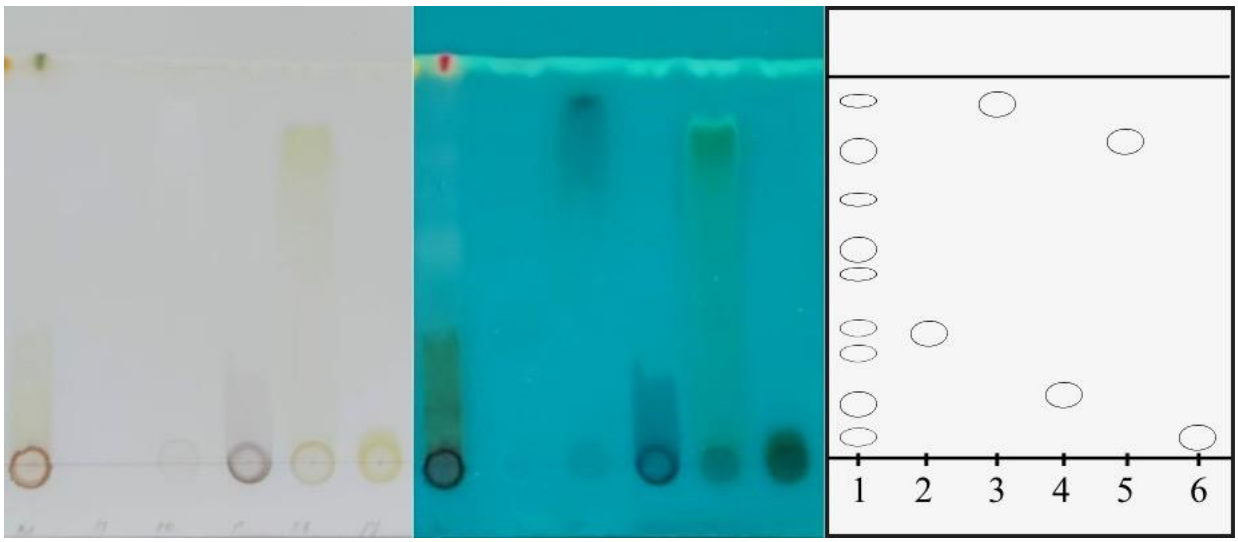


Рисунок 26 – Тонкослойная хроматограмма извлечения из листьев рейнутрии богемской (1), СО полидатина (2), СО ресвератрола (3), СО галловой кислоты (4), СО кверцетина (5), СО рутина (6)

При разделении водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской методом ТСХ в системе этилацетат – хлороформ – кислота муравьиная – вода (60:19:12:9) после обработки детектирующим реактивом щелочно-аммиачным раствором обнаружено около 10 зон адсорбции желто-зеленого цвета, идентифицированы полидатин, галловая кислота, кверцетин, рутин (рисунок 27).

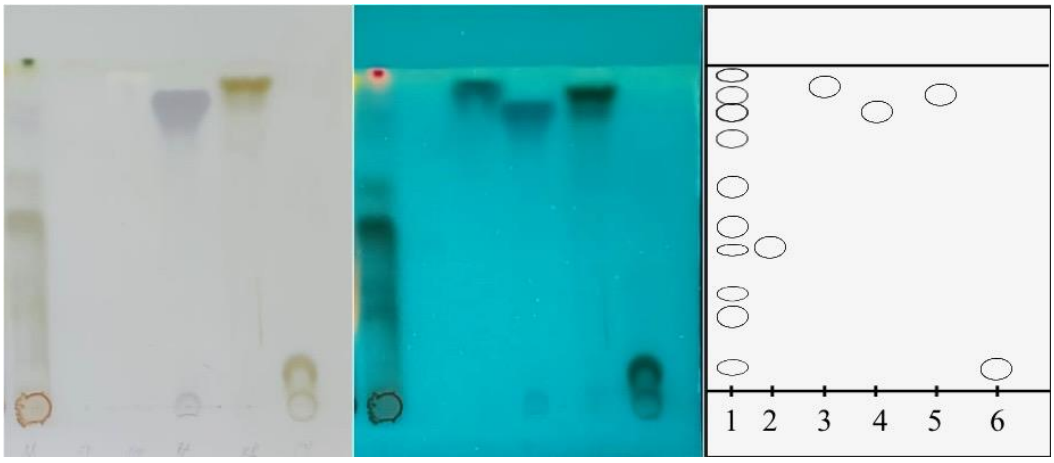


Рисунок 27 – Тонкослойная хроматограмма извлечения из листьев рейнутрии богемской (1), СО полидатина (2), СО ресвератрола (3), СО галловой кислоты (4), СО кверцетина (5), СО рутина (6)

При разделении водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской методом ТСХ в системе этилацетат – этанол – вода – кислота муравьиная (60:25:10:5) обнаружено 3 зоны адсорбции желто-коричневого цвета, идентифицирован полидатин (рисунок 28).



Рисунок 28 – Тонкослойная хроматограмма извлечения из листьев рейнутрии богемской (1), СО полидатина (2)

Таким образом, методом ТСХ в водно-спиртовом извлечении из рейнутрии богемской обнаружены рутин, полидатин, галловая кислота, кверцетин, антраценпроизводные.

3.3.3. Изучение биологически активных веществ листьев рейнутрии богемской методом ультраэффективной жидкостной хроматографии

В выбранных условиях были установлены времена удерживания стандартных соединений, они представлены в таблице 9, рисунок 29.

Таблица 9 – Времена удерживания стандартных соединений

СО	tR (УФ), мин
галловая кислота	3,13
хлорогеновая кислота	7,12
кофейная кислота	8,07
рутин	11,19
феруловая кислота	11,39
гиперозид	11,48
таксифолин	11,87
цинарозид	11,92
нарингин	13,46
космосиин	13,57
лютеолин	17,09
кверцетин	17,15
коричная кислота	18,13
апигенин	19,49
кемпферол	19,99

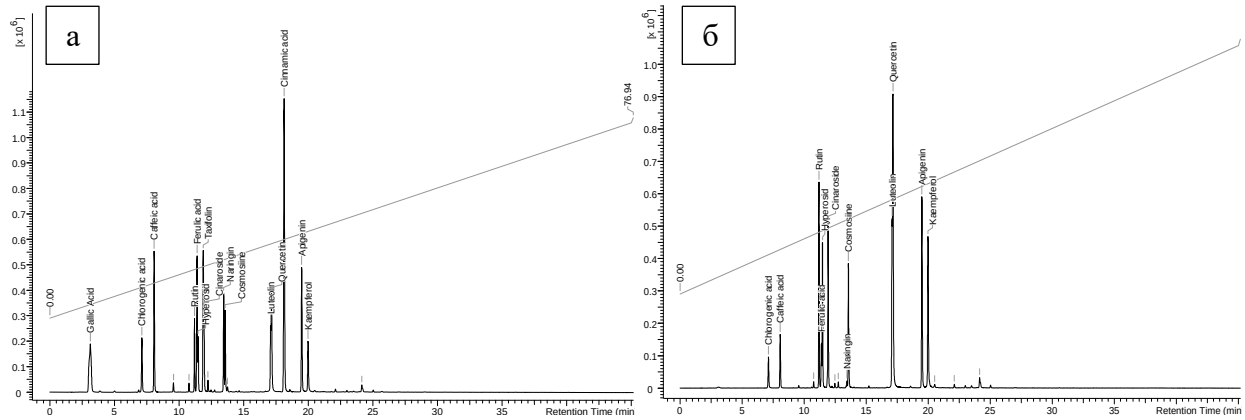


Рисунок 29 – Хроматограммы раствора стандартов при 280 нм (а) и при 360 нм (б)

Анализ методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (UPLC/MS) водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии показал, что исследуемый образец имеет сложный многокомпонентный состав. На хроматограммах, зарегистрированных при 280 и 360 нм, выявлены пики, соответствующие соединениям различных групп. Идентификация компонентов проводилась с учетом данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. На основании масс-спектров в положительном и отрицательном режимах ионизации были определены предполагаемые молекулярные ионы, включая $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ и $[M-H]^-$. По характеру фрагментации и положению максимумов поглощения в УФ-спектрах

были установлены структурные признаки агликонов и отнесение соединений к определенным классам биологически активных веществ (рисунок 30).

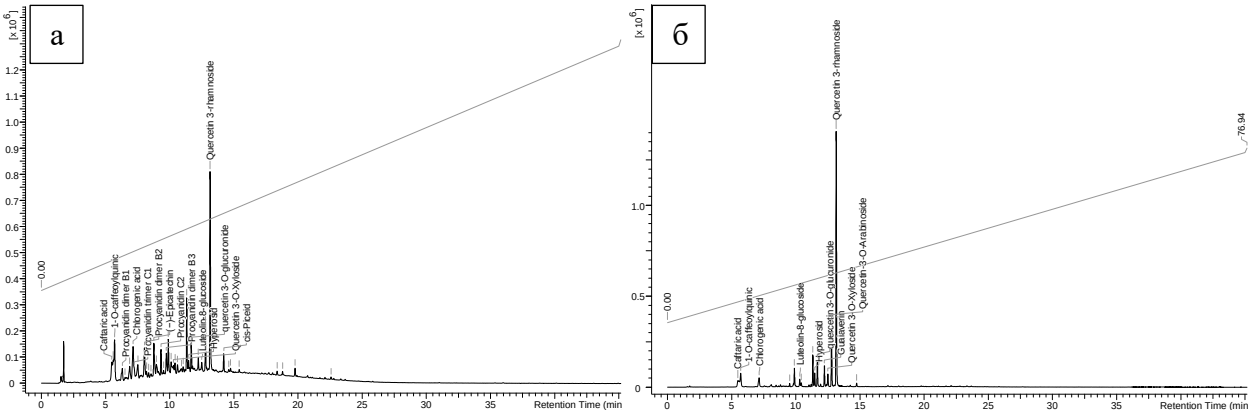
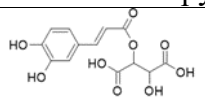
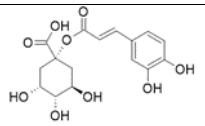
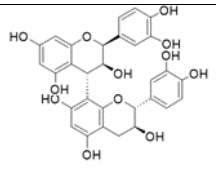
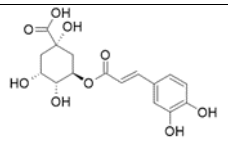
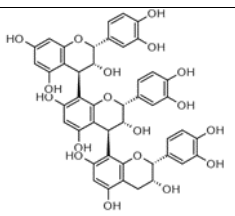


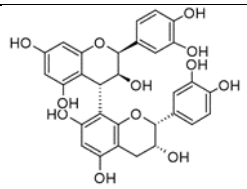
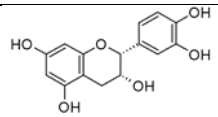
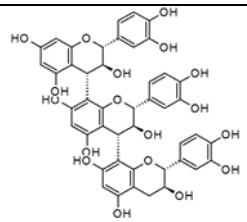
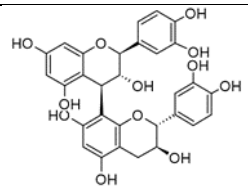
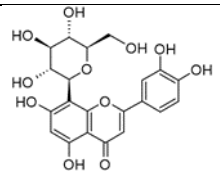
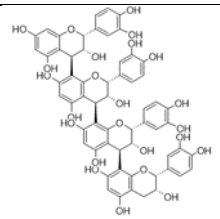
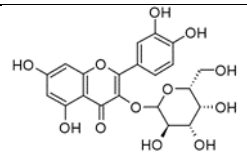
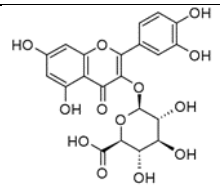
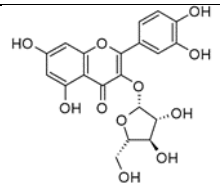
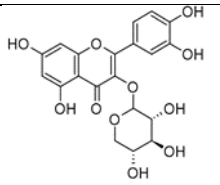
Рисунок 30 – Хроматограммы водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской при 280 нм (а) и при 360 нм (б)

В составе извлечения были обнаружены соединения, характерные для фенольного профиля листьев рейнутрии. Полученные данные приведены в таблице 10.

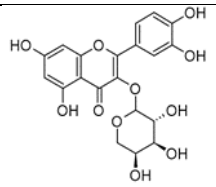
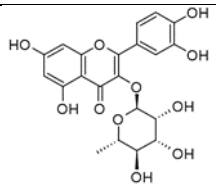
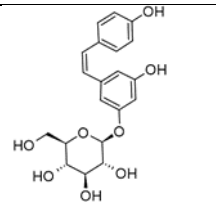
Таблица 10 – Соединения, характерные для фенольного профиля листьев рейнутрии

Соединение	tR	UV, нм	MW	Возможная структура
Кафтаровая кислота	5.49	326	312	
1-О-кофеоилхинная кислота	5.59	326	354	
Процианидин димер В1	6.3	280	578	
Хлорогеновая кислота	7.14	326	354	
Процианидин тример С1	7.23	283	866	

Продолжение Таблицы 10

Процианидин димер B2	8.03	280	578	
(−)-эпикатехин	8.76	280	290	
Процианидин C2	9.31	280	866	
Процианидин димер B3	9.73	280	578	
Лютеолин-8-глюкозид	10.3	344	448	
Процианидин тетрамер	10.6	280	1154	
Гиперозид	11.47	356	464	
Кверцетин-3-О-глюкуронид	11.67	354	478	
Гваяверин	12.22	354	434	
Кверцетин-3-О-ксилозид	12.49	355	434	

Продолжение Таблицы 10

Кверцетин-3-О-арабинозид	12.78	353	434	
Кверцетин-3-рамнозид	13.14	349	448	
цис-полидатин (пицеид)	14.2	286	390	

Одной из выраженных групп соединений в исследуемом извлечении являлись производные кверцетина. Для данных компонентов были характерны сходные УФ-спектры с максимумом поглощения около 350 нм и наличие фрагментного иона с m/z 303 в положительном режиме ионизации, что соответствует агликону кверцетина. Пик гиперозида был идентифицирован по совпадению времени удерживания и спектральных характеристик со стандартным образцом. Остальные соединения данной группы были отнесены к гликозидам кверцетина на основании молекулярных масс, характера фрагментации и литературных данных. В частности, в извлечении были предположительно идентифицированы кверцетин-3-О-глюкуронид, гваяверин, кверцетин-3-О-ксилозид, кверцетин-3-О-арабинозид и кверцетин-3-рамнозид (рисунок 31).

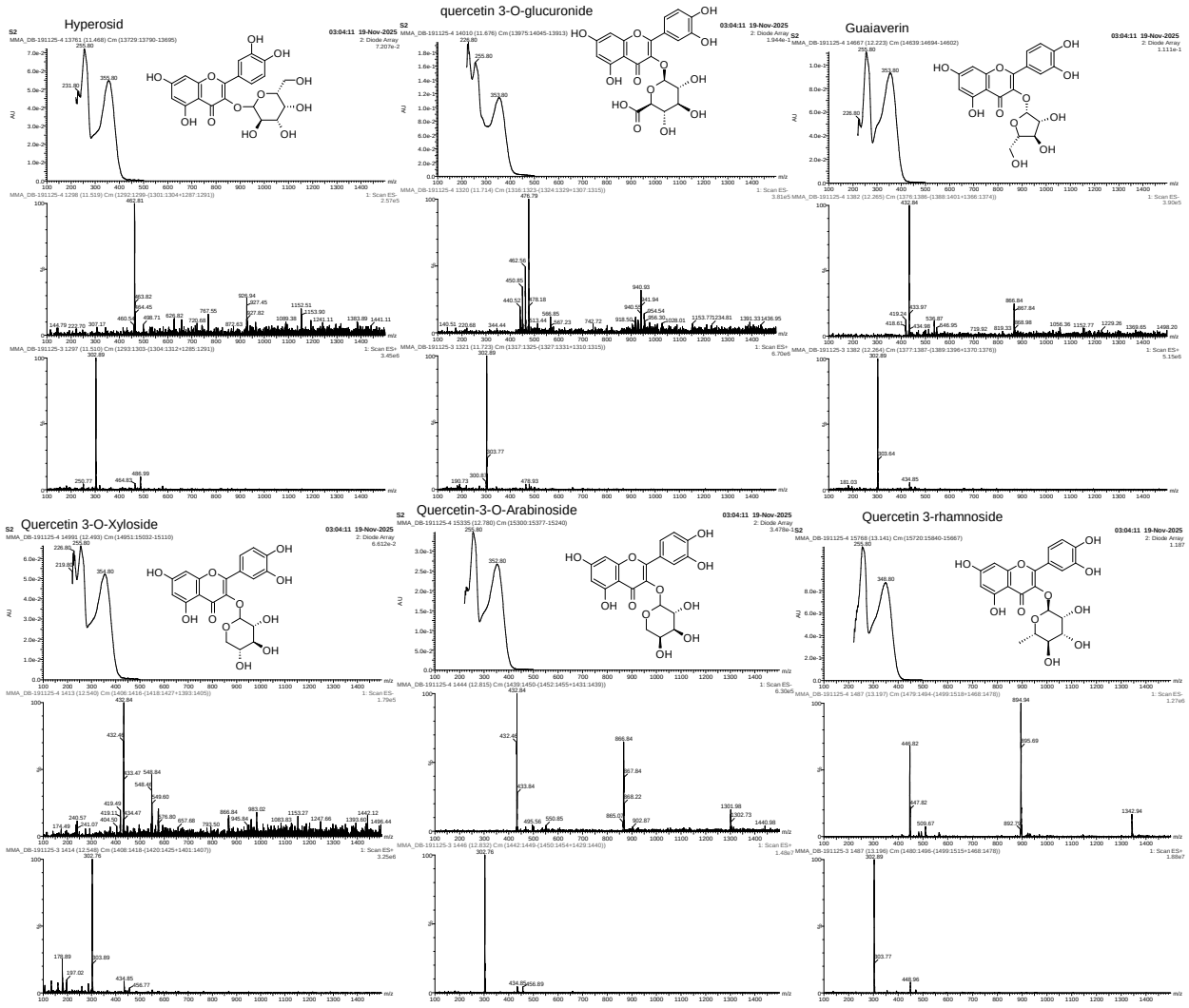


Рисунок 31 – УФ и масс спектры гиперозида, кверцетин-3-О-глюкуронида, гваяверина, кверцетин-3-О-ксилозида, кверцетин-3-О-арабинозида и кверцетин-3-рамнозида

Также выявлена группа соединений, относящихся к производным кофейной кислоты. Для этих пиков был характерен фрагментный ион с массой 163 в положительном режиме ионизации, а также сходные УФ-спектры с максимумом поглощения около 326 нм. Данные признаки позволяют отнести указанные компоненты к производным гидроксикоричных кислот. Хлорогеновая кислота была идентифицирована по совпадению времени удерживания и спектральных характеристик со стандартным образцом. Кроме нее, в образце были выявлены кафтаровая кислота и 1-О-кофеоилхинная кислота. Проанализировав данные литературы, мы предположили положение радикалов в изомерах производных кофейной кислоты, а только по масс-спектрометрическим данным затруднительно однозначно установить положения ацильных остатков (рисунок 32).

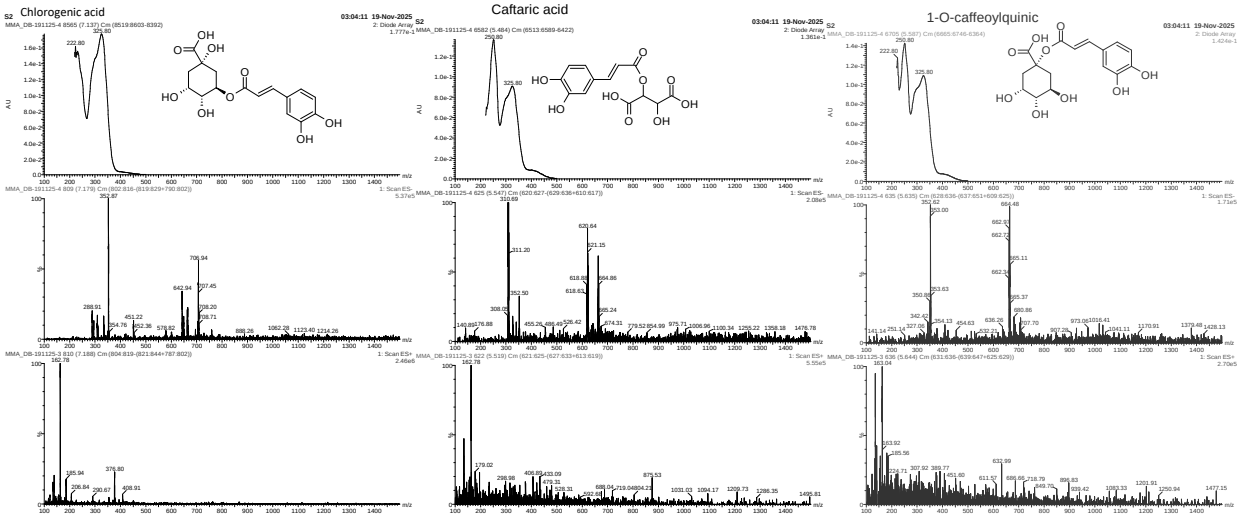


Рисунок 32 – УФ и масс спектры хлорогеновой кислоты, кафтаровой кислоты и 1-О-кофеоилхинной кислоты

Значимую часть фенольного профиля извлечения составили флаван-3-олы и их олигомерные формы. В образце были обнаружены соединения, отнесенные к процианидинам: димеры B1, B2 и B3, тример C1, процианидин C2 и процианидиновый тетрамер (рисунок 33). Также был выявлен пик, соответствующий (−)-эпикатехину (рисунок 34). Для соединений данной группы были характерны УФ-спектры с максимумом поглощения около 280 нм. Структурное отнесение флаван-3-олов проводили по молекулярным ионам и характеру спектров. Последовательность выхода отдельных изомерных форм была определена предположительно, поскольку для ряда таких соединений отсутствуют достаточные литературные данные, позволяющие однозначно соотнести порядок элюирования с конкретной структурой.

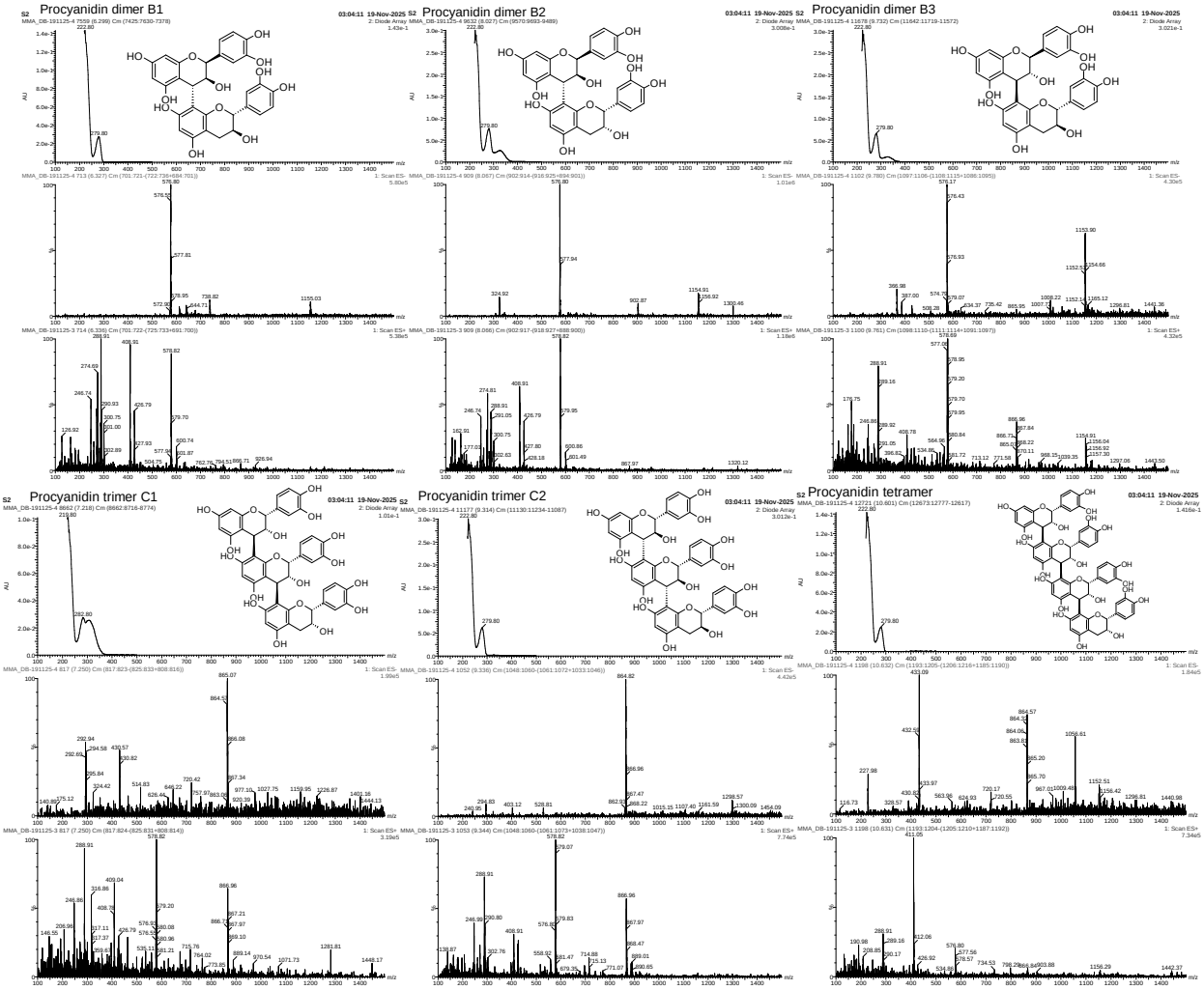


Рисунок 33 – УФ и масс спектры димеров B1, B2 и B3, тримера C1, процианидина C2 и процианидинового тетрамера

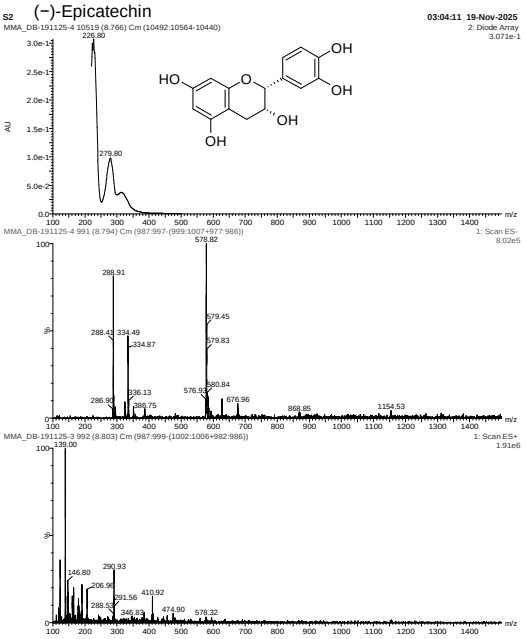


Рисунок 34 – УФ и масс спектры (−)-эпикатехина

Пик с временем удерживания 10,3 мин характеризовался УФ-спектром с максимумом поглощения 344 нм и сложным характером фрагментации, типичным для С-гликозидов флавонов. На основании совокупности спектральных признаков данный компонент был отнесен к лютеолин-8-глюкозиду (рисунок 35).

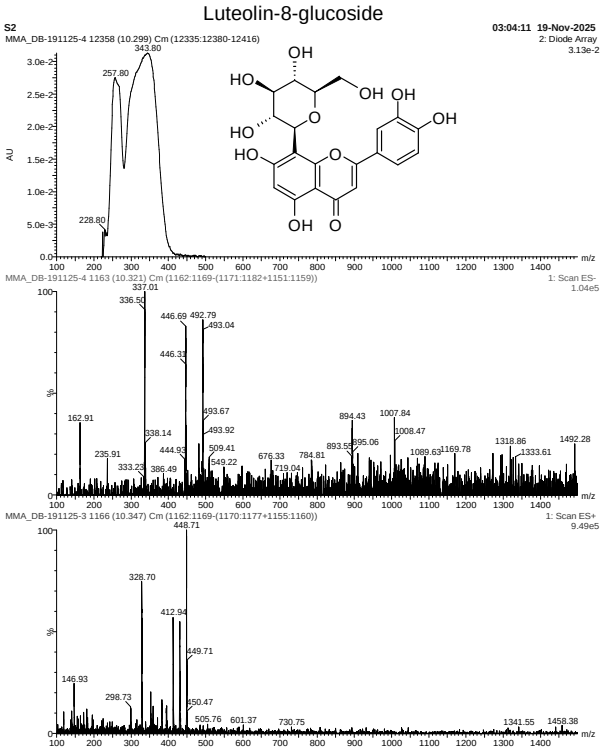


Рисунок 35 – УФ и масс спектры лютеолин-8-глюкозида

Для нас повышенный интерес представил пик с временем удерживания 14,2 мин, имеющий максимум поглощения при 286 нм и образующий фрагментный ион с массой 229. По совокупности признаков данный компонент был предположительно отнесен к гликозиду, содержащему агликон ресвератрол, и идентифицирован как полидатин (cis-пицеид). Обнаружение полидатина является важным для характеристики листьев рейнутрии, поскольку производные стильбенов, включая ресвератрол и его гликозиды, рассматриваются как одна из характерных групп биологически активных веществ растений рода рейнутрия (рисунок 36).

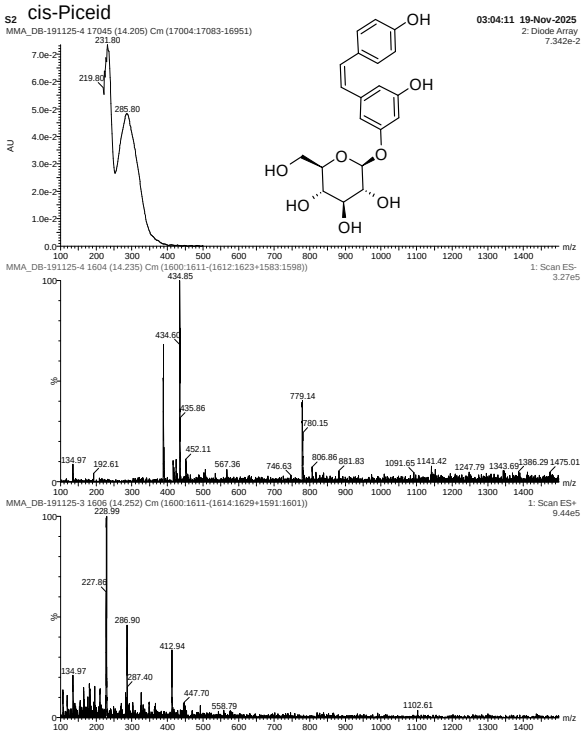


Рисунок 36 – УФ и масс спектры полидатина

С использованием UPLC/MS-анализа показано, что водно-спиртовое извлечение из листьев рейнутрии богемской содержит широкий спектр фенольных соединений. Основными группами обнаруженных веществ являются производные гидроксикоричных кислот, флавонолы, флавоны, флаван-3-олы, процианидины и стильбеновые гликозиды.

Выводы к главе 3

1. Изучены внешние признаки цельных и измельченных листьев рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova). Установлены их основные макроскопические характеристики, а полученные данные были использованы при разработке соответствующего раздела проекта НД на листья рейнутрии богемской.

2. Выделены основные анатомические особенности листьев. Аномоцитный устичный комплекс присутствует только с нижней стороны листа, количество устьиц составляет 90-100 на мм², устьичный индекс составляет 8,7. На нижней поверхности присутствуют четырехклеточные и восьмиклеточные железки размером примерно 40-80 мкм с окрашенным содержимым. Папиллозные волоски

одноклеточные и многоклеточные длиной 75-200 мкм располагаются по крупным жилкам. Клетки эпидермиса прямостенные на адаксиальной и извилистые на абаксиальной стороне листа. Над жилками клетки эпидермиса более вытянутые. Установлено наличие друз оксалата кальция. Также изучены петиолярные признаки.

3. По результатам фитохимического скрининга на основные группы БАВ в листьях рейнутрии богемской обнаружены дубильные вещества, флавоноиды, полисахариды, сапонины, аминокислоты. Подтверждено наличие рутина, полидатина, галловой кислоты, кверцетина, антраценпроизводных методом ТСХ.

4. Методом UPLC/MS в водно-спиртовом извлечении из листьев рейнутрии богемской обнаружен широкий спектр фенольных соединений. Основными группами обнаруженных веществ являются производные гидроксикоричных кислот, флавонолы, флавоны, флаван-3-олы, процианидины и стильбеновые гликозиды.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И РАЗРАБОТКА ЧИСЛОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛИСТЬЕВ РЕЙНУТРИИ БОГЕМСКОЙ

4.1. Определение влажности листьев рейнутрии богемской

Влажность является важным показателем качества лекарственного растительного сырья, поскольку влияет на сохранность материала, его устойчивость при хранении и возможность развития микробиологических процессов. В связи с этим было проведено определение влажности листьев рейнутрии богемской, заготовленных в разные сезоны и в различных регионах. Результаты определения влажности представлены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 – Влажность листьев рейнутрии богемской, заготовленных в Москве

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	7,58	0,14	0,01187	0,10895	95	2,78	1,79
Осень, во время цветения	5,68	0,16	0,01577	0,12558	95	2,78	2,75

Таблица 12 – Влажность листьев рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	5,68	0,16	0,01742	0,13199	95	2,78	2,89
Тверская область	8,48	0,10	0,00637	0,07981	95	2,78	1,17
Саратовская область	5,83	0,04	0,00108	0,032863	95	2,78	0,70

По результатам определения влажности установлено, что влажность листьев рейнутрии богемской зависит от сезона заготовки и региона произрастания. Наибольшее значение влажности отмечено для сырья, заготовленного в Тверской области, наименьшее выявлено в сырье, заготовленном в Республике Беларусь. Также показатель влажности был выше для сырья, заготовленного весной, по сравнению с сырьем, заготовленным осенью. Полученные данные свидетельствуют о влиянии природно-климатических условий и фазы вегетации на содержание

влаги в исследуемом сырье и показывают целесообразность нормирования показателя «влажность» - не более 10%, что использовано при разработке проекта ФС на данный вид сырья.

4.2. Определение содержания золы общей, золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте и минерального состава

Определение содержания золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, является важным этапом фармакогностической оценки качества лекарственного растительного сырья. Показатель золы общей характеризует суммарное содержание минеральных веществ, и позволяет оценить как физиологически обусловленные компоненты растения, так и возможное присутствие посторонних минеральных примесей. Показатель золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, позволяет судить о содержании трудноудаляемых минеральных загрязнений, прежде всего силикатной природы. В связи с этим для листьев рейнутрии богемской было проведено определение указанных показателей, результаты представлены в таблицах 13-16.

Таблица 13 – Содержание золы общей в листьях рейнутрии богемской, заготовленных в Москве

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	9,59	0,28	0,0502	0,22405	95	2,78	2,90
Осень, во время цветения	9,94	0,23	0,03341	0,18279	95	2,78	2,29

Таблица 14 – Содержание золы общей в листьях рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	10,05	0,22	0,0327	0,180831	95	2,78	2,24
Тверская область	10,17	0,32	0,0657	0,25632	95	2,78	3,13
Саратовская область	9,82	0,15	0,0142	0,119164	95	2,78	1,51

Таблица 15 – Содержание золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в листьях рейнутрии богемской, заготовленных в Москве

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	0,1522	0,0039	0,00001	0,00312	95	2,78	2,55
Осень, во время цветения	0,1541	0,0054	0,00002	0,00433	95	2,78	3,49

Таблица 16 – Содержание золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в листьях рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	0,1554	0,0022	0,000003	0,00181	95	2,78	1,45
Тверская область	0,1570	0,0037	0,00001	0,00300	95	2,78	2,37
Саратовская область	0,1571	0,0031	0,00001	0,002464	95	2,78	1,95

По результатам проведённого исследования установлено, что целесообразно нормировать: «зола общая» - не более 11%, «зола, нерастворимая хлористоводородной кислоте» - не более 0,5%, что использовано при разработке проекта ФС на данный вид сырья.

Изучение минерального состава листьев рейнутрии богемской позволяет оценить особенности накопления макро- и микроэлементов в зависимости от условий произрастания. Был определен элементный состав, включая макроэлементы, микроэлементы, ультрамикроэлементы, тяжелые металлы и мышьяк.

Листья рейнутрии богемской характеризуются вариабельным минеральным составом, содержание элементов заметно различалось в зависимости от региона заготовки. Токсикологически значимые элементы, такие как кадмий и мышьяк, находились ниже предела определения, а содержание свинца не превышает предельно допустимого значения, что указывает на благоприятный профиль исследуемого сырья по данному показателю. Результаты анализа представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Содержание элементов в листьях рейнутрии богемской, заготовленных в разных регионах

Элемент	Содержание, мкг/г		
	г. Москва	Республика Беларусь	Тверская область
Макроэлементы			
Ca	20980±745	7930±372	14520±621
K	9400±199	15860±390	6920±323
Mg	4500±223	2340±74	2590±99
Na	52,00±2,48	1290±50	26,00±0,74
P	1950±66	2575±112	1440±62
S	2130±99	1965±87	1045±50
Fe	202,00±9,93	110,00±4,97	51,00±2,48
Микроэлементы			
Al	67,00±2,48	37,00±1,49	53,00±2,48
B	31,00±1,24	17,00±0,74	24,00±0,99
Co	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Cr	0,67±0,02	0,76±0,04	0,61±0,02
Cu	5,80±0,25	3,90±0,17	3,50±0,12
Li	0,56±0,02	0,25±0,01	0,13±0,01
Mn	127,00±4,97	57,00±2,48	171,00±4,97
Mo	3,40±0,12	1,90±0,05	2,80±0,12
Ni	6,10±0,25	2,10±0,10	4,30±0,20
Se	8,60±0,25	5,80±0,25	4,80±0,20
Si	93,00±2,48	68,00±2,48	55,00±2,48
Sr	53,00±2,48	14,00±0,50	22,00±0,43
Zn	64,00±2,48	55,00±2,48	32,00±0,66
V	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Ультрамикроэлементы			
Ag	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Ba	32,00±0,86	11,00±0,43	12,00±0,43
Be	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Ti	20,00±0,86	21,00±0,99	13,00±0,50
Zr	0,23±0,01	< 0,1	< 0,1
Bi	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Sb	0,14±0,01	< 0,1	< 0,1
Sn	0,39±0,01	< 0,1	< 0,1
Тяжёлые металлы и мышьяк			
Pb	1,30±0,04	0,52±0,01	0,49±0,01
Cd	< 0,1	< 0,1	< 0,1
As	< 0,5	< 0,5	< 0,5

4.3. Определение измельченности и посторонних примесей

Изучены показатели качества, такие как показатели измельченности, побуревшие/почерневшие листья, органическая и минеральная примеси, другие части растения.

Для стандартизации рейнутрии богемской листьев предлагаются следующие показатели доброкачественности:

Регламентация измельченности сырья.

Цельные листья: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 2 %.

Измельчённое сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Порошок: частиц, не проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Регламентация допустимых посторонних примесей. Для листьев рейнутрии богемской к посторонним примесям можно отнести листья, изменившие окраску (потемневшие), другие части рейнутрии (соцветия и стебли), минеральную и органическую примеси. Во всех исследованных образцах содержание первых двух примесей не превышало 5%, а последних – 0,5%. Данные стали фрагментом проекта фармакопейной статьи на «Рейнутрии богемской листья».

4.4. Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой

Количественное содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, является важной характеристикой сырья, отражающей суммарное количество водорастворимых соединений. Результаты определения представлены в таблицах 18 и 19.

Таблица 18 – Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в листьях рейнутрии богемской, заготовленных в Москве

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	28,58	0,28	0,04894	0,22122	95	2,78	0,96
Осень, во время цветения	23,04	0,56	0,20477	0,45252	95	2,78	2,44

Таблица 19 – Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в листьях рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	16,84	0,57	0,21020	0,45848	95	2,78	3,39
Тверская область	23,16	0,82	0,43577	0,66013	95	2,78	3,54
Саратовская область	22,54	0,47	0,14148	0,37614	95	2,78	2,07

Показано, что содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, зависит от сезона заготовки и региона произрастания. Наибольшее значение отмечено для сырья, заготовленного в Москве весной, наименьшее выявлено в сырье, заготовленном в Республике Беларусь. Полученные данные свидетельствуют о влиянии природно-климатических условий и фазы развития растения на содержание гидрофильных веществ и обосновывают целесообразность установления для показателя «экстрактивные вещества, извлекаемые водой» нормы не менее 15%, что также вошло в проект ФС на данный вид сырья.

4.5. Определение содержания дубильных веществ

Дубильные вещества представляют собой одну из значимых групп БАВ растительного происхождения и нередко рассматриваются в качестве показателя качества сырья. Оценено содержание в листьях рейнутрии богемской дубильных веществ в образцах листьев, заготовленных в различных регионах и разные фазы вегетации. Результаты представлены в таблицах 20 и 21.

Таблица 20 – Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в листьях рейнутрии богемской, заготовленных в Москве

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	3,75	0,28	0,01265	0,11248	95	2,78	3,72
Осень, во время цветения	4,95	0,22	0,03267	0,18075	95	2,78	4,54

Таблица 21 – Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в листьях рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	4,61	0,09	0,00488	0,06985	95	2,78	1,88
Тверская область	4,19	0,03	0,00065	0,02549	95	2,78	0,76
Саратовская область	10,28	0,44	0,13032	0,36100	95	2,78	4,37

Установлено, что содержание дубильных веществ варьируется в зависимости от сезона заготовки и региона произрастания. Наибольшее значение отмечено для сырья, заготовленного осенью в период цветения, что связано с изменением метаболизма в ходе вегетации. Различия от региона произрастания слабо выражены и в целом сырье характеризуется достаточно высоким содержанием дубильных веществ. Полученные данные обосновывают целесообразность установления для показателя «дубильных веществ в пересчете на танин» нормы не менее 3%, что использовано при разработке проекта ФС на данный вид сырья.

4.6. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин

Флавоноиды являются одной из основных групп фенольных соединений растительного происхождения, обуславливающих биологическую активность сырья, в том числе антиоксидантную. При качественном изучении состава листьев рейнутрии богемской были обнаружены флавоноиды, поэтому целесообразно определять их количественное содержание. Определение проводили спектрофотометрически по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. Для подбора условий количественного определения флавоноидов измеряли выход

при различных параметрах экстракции и реакции комплексообразования (таблица 22).

Таблица 22 – Параметры экстракции флавоноидов из листьев рейнутрии богемской

Экстрагент	Кратность экстракции	Соотношение сырье: экстрагент	Длительность	Размер частиц	Температура	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстрагент						
спирт 95%	3	1:100	30 мин	1 мм	100°С	1,48 ± 0,04
спирт 80%						1,44 ± 0,02
спирт 70%						1,59 ± 0,04
спирт 60%						1,55 ± 0,05
спирт 40%						1,37 ± 0,05
Кратность экстракции						
спирт 70%	1	1:100	30 мин	1 мм	100°С	1,32 ± 0,04
	2					1,36 ± 0,06
	3					1,48 ± 0,05
	4					1,46 ± 0,03
Соотношение сырья к экстрагенту						
спирт 70%	3	1:50	30 мин	1 мм	100°С	1,18 ± 0,03
		1:100				1,57 ± 0,05
		1:150				1,52 ± 0,06
Время экстракции						
спирт 70%	3	1:100	15 мин	1 мм	100°С	1,41 ± 0,04
			20 мин			1,44 ± 0,04
			30 мин			1,50 ± 0,03
			40 мин			1,48 ± 0,04
Размер частиц						
спирт 70%	3	1:100	30 мин	0,5 мм	100°С	1,27 ± 0,03
				1 мм		1,51 ± 0,06
				2 мм		1,47 ± 0,05
Температура						
спирт 70%	3	1:100	30 мин	1 мм	100°С	1,47 ± 0,04
					80°С	1,52 ± 0,03

Оптимальные условия экстракции флавоноидов из листьев рейнутрии богемской, подобранные в ходе эксперимента, это трехкратная экстракция 70% спиртом по 30 мин при соотношении сырья к экстрагенту 1:100, размер частиц сырья 1 мм, температура экстракции 80°С.

Далее подбирались условия реакции комплексообразования, полученные результаты представлены в таблице 23.

Оптимальные условия для реакции комплекссобразования: концентрация спиртового раствора алюминия хлорида 5%, соотношение аликвоты

водно-спиртового извлечения к раствору хлорида алюминия 3:5, время реакции 40 минут.

Таблица 23 – Условия реакции образования комплекса флавоноидов из листьев рейнутрии богемской с алюминия хлоридом

Условия проведения реакции		Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Концентрация спиртового раствора хлорида алюминия, %	2	1,50 ± 0,06
	3	1,49 ± 0,04
	4	1,47 ± 0,05
	5	1,52 ± 0,04
Соотношение аликвоты к спиртовому раствору алюминия хлорида	3:1	1,52 ± 0,05
	3:2	1,50 ± 0,05
	3:3	1,52 ± 0,04
	3:4	1,50 ± 0,03
	3:5	1,53 ± 0,03
Время комплексообразования, мин	20	1,33 ± 0,03
	30	1,44 ± 0,05
	40	1,52 ± 0,06
	50	1,51 ± 0,05

Методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской выглядит так: аналитическую пробу сырья измельчили до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл спирта 70 %. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°С в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляли 30 мл спирта 70 %. Экстракцию повторяли еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводили спиртом 70 % до метки и перемешивали (раствор А испытуемого раствора).

3,0 мл раствора А испытуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 96

%, доводили объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивали (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряли через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 3 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Расчет количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье листьев рейнутрии богемской проводился по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A}\times m_{\mathrm{co}}\times V_{\mathrm{aco}}\times 25\times 100\times 100\times 100\times \mathrm{P}}{\mathrm{A_0}\times m\times V_{ax}\times 25\times 100\times 100\times (100-W)} = \frac{\mathrm{A}\times m_{\mathrm{co}}\times 100\times \mathrm{P}}{\mathrm{A_0}\times m\times (100-W)} \quad (2),$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;

m – навеска сырья, г;

m_{co} – навеска СО рутина, г;

V_{ax} – объем аликвоты испытуемого раствора, мл;

V_{aco} – объем аликвоты СО рутина, мл;

Р – содержание основного вещества в СО рутина, %;

W – влажность сырья, %.

Валидация методики. Проводилась по показателям специфичность, линейность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная сходимость) и правильность.

Специфичность. Для определения специфичности снимали спектры СО рутина и исследуемого извлечения листьев рейнутрии богемской после реакции с алюминия хлоридом. Максимум поглощения образца приходится на 410 нм, что совпадает с максимумом СО рутина (рисунок 37).

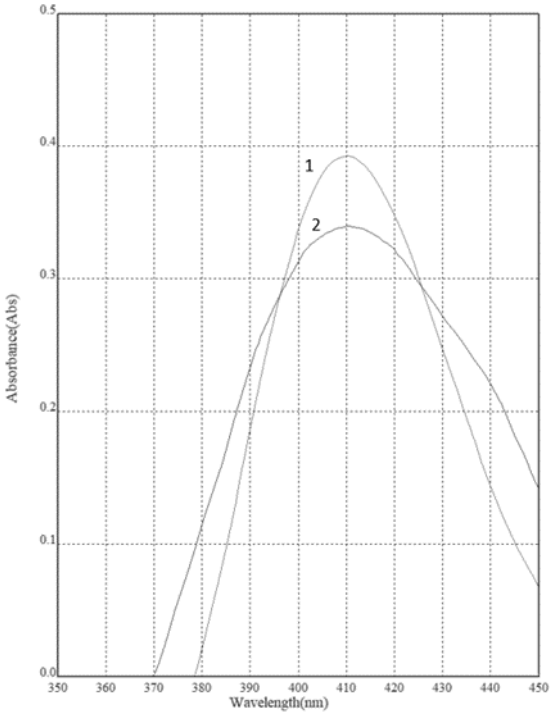


Рисунок 37 – Дифференциальные спектры поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом (1) и комплекса флавоноидов из листьев рейнутрии богемской с алюминия хлоридом (2)

Линейность. Для изучения линейности готовили 9 растворов исследуемого образца используя разный объем аликвоты: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мл. В полученных растворах определяли количественное содержание флавоноидов. График зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов представлен на рисунке. Для оценки линейности рассчитывали коэффициент корреляции и уравнение регрессии. Коэффициент корреляции составил 0,9958, что соответствует требованиям ГФ РФ XV ≥ 0,99, следовательно, имеется линейная зависимость методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской. Уравнение регрессии имеет вид y = 0,1688x + 0,0789. Методика линейна в диапазоне концентраций, эквивалентных содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье, 0,5% - 2,5% (таблица 24, рисунок 38).

Таблица 24 – Результаты определения линейности

Аликвота, мл	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Оптическая плотность	0,160	0,212	0,257	0,312	0,356	0,405	0,446	0,475	0,512

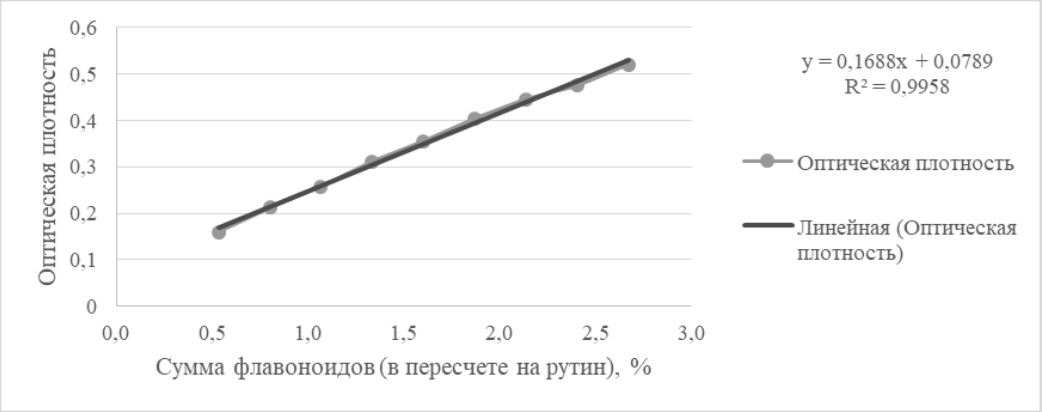


Рисунок 38 – График линейной зависимости оптической плотности от содержания суммы флавоноидов

Прецизионность (воспроизводимость). Прецизионность рассматривалась как повторяемость и сходимость внутрилабораторная.

Повторяемость метода исследовали в 6 параллельных опытах, выполняемых одним исследователем при неизменных условиях. Значение RSD составило 1,73% (таблица 25).

Таблица 25 – Результаты определения повторяемости методики

Содержание, %	Статистические характеристики						
	$\overline{X}\pm\Delta X$	S^2	S	P, %	t(P;f)	E,%	RSD, %
1,56	1,53±0,03	0,00069	0,02636	95	2,57	1,81	1,73
1,55							
1,51							
1,53							
1,53							
1,49							

Внутрилабораторную прецизионность определяли в разные дни два разных аналитика в условиях одной лаборатории. Значение RSD составило 4,53% (таблица 26).

Как видно из результатов, представленных в таблицах, методика удовлетворяет требуемым значениям RSD, которые не превышают 5%.

Таблица 26 – Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики

Исполнитель	№	Содержание, %	Статистические характеристики						
			$\overline{X}\pm\Delta X$	S^2	S	P, %	t(P;f)	E,%	RSD, %
Аналитик 1	1	1,52	1,52±0,07	0,00477	0,06905	95	2,57	4,75	4,53
	2	1,55							
	3	1,61							
Аналитик 2	1	1,58							
	2	1,44							
	3	1,45							

Определение правильности методики. Правильность оценивали методом добавок, путем добавления к спиртовому извлечению из листьев рейнутрии богемской с известным содержанием суммы флавоноидов растворов СО рутина содержащих 0,0013; 0,00254 0,0038 г. Результаты представлены в таблице, относительное стандартное отклонение составляет 2,87% (не превышает 5%), что говорит об отсутствии систематической ошибки. Средняя величина открываемости составила 98,81%, все значения находились в пределах 95,28-104,68% (таблица 27).

Таблица 27 – Результаты определения правильности

№	Исходное содержание флавоноидов, г	Добавлено СО рутина, г	Теоретическое содержание, г	Фактическое содержание, г	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	0,0144	0,0013	0,0156	0,0163	104,68	$\overline{X}\pm\Delta x$= =98,81±2,18; E=2,21%; RSD=2,87%
		0,0025	0,0169	0,0170	100,66	
		0,0038	0,0181	0,0179	98,68	
2	0,0149	0,0013	0,0161	0,0157	97,28	
		0,0025	0,0174	0,0171	98,57	
		0,0038	0,0186	0,0180	96,79	
3	0,0147	0,0013	0,0159	0,0160	100,63	
		0,0025	0,0172	0,0166	96,71	
		0,0038	0,0184	0,0176	95,28	

Приведенные данные показывают, что разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях

рейнутрии богемской имеет линейный характер, является правильной и прецизионной.

С применением полученной методики было проведено определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской. Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской составило 1,16±0,04% для сырья, собранного весной до цветения, и 1,52±0,07% для сырья, собранного осенью во время цветения. Результаты определения представлены в таблицах 28 и 29.

Таблица 28 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской, заготовленных в Москве

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	1,16	0,04	0,00121	0,03472	95	2,78	3,72
Осень, во время цветения	1,52	0,07	0,00279	0,05281	95	2,78	2,44

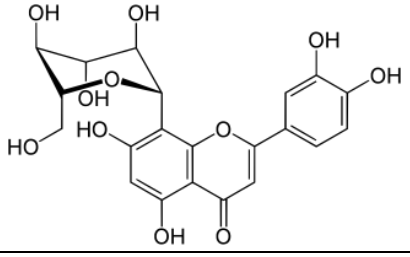
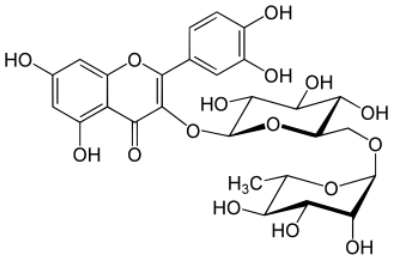
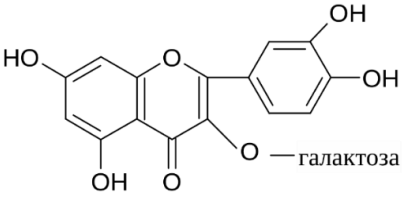
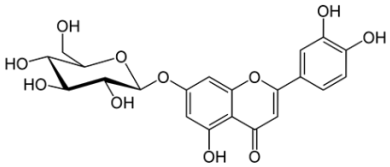
Таблица 29 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	1,02	0,02	0,00017	0,01304	95	2,78	1,59
Тверская область	1,80	0,05	0,00193	0,04393	95	2,78	3,04
Саратовская область	0,81	0,02	0,00022	0,01483	95	2,78	2,27

Полученные данные свидетельствуют о том, что накопление флавоноидов в листьях рейнутрии богемской зависит как от фазы вегетации, так и от региона произрастания. Более высокое содержание суммы флавоноидов обнаружено в образцах, собранных осенью, а самое высокое в сырье из Тверской области. В сырье из Саратовской области обнаружено наименьшее количество флавоноидов, что скорее всего связано со сроками заготовки. Полученные данные демонстрируют, что накопление соединений флавоноидной природы зависит от экологических и сезонных условий и показывают целесообразность нормирования показателя «сумма флавоноидов в пересчете на рутин» - не менее 1,0%, что использовано при разработке проекта ФС на данный вид сырья [77].

По результатам определения флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ были обнаружены ориентин, рутин, гиперозид, цинарозид. Идентифицировались пики в сравнении с хроматограммой стандартов по времени удерживания, концентрации были рассчитаны по площади пиков (таблица 30, рисунок 39).

Таблица 30 – Время удерживания стандартных образцов

Соединение	Время удерживания, мин	Содержание, %	Формула
Ориентин	11,08	0,00173 ± 0,0001 %	
Рутин	14,25	0,00707 ± 0,0002 %	
Гиперозид	15,27	0,0655 ± 0,0028 %	
Цинарозид	19,54	1,12 ± 0,06 %	

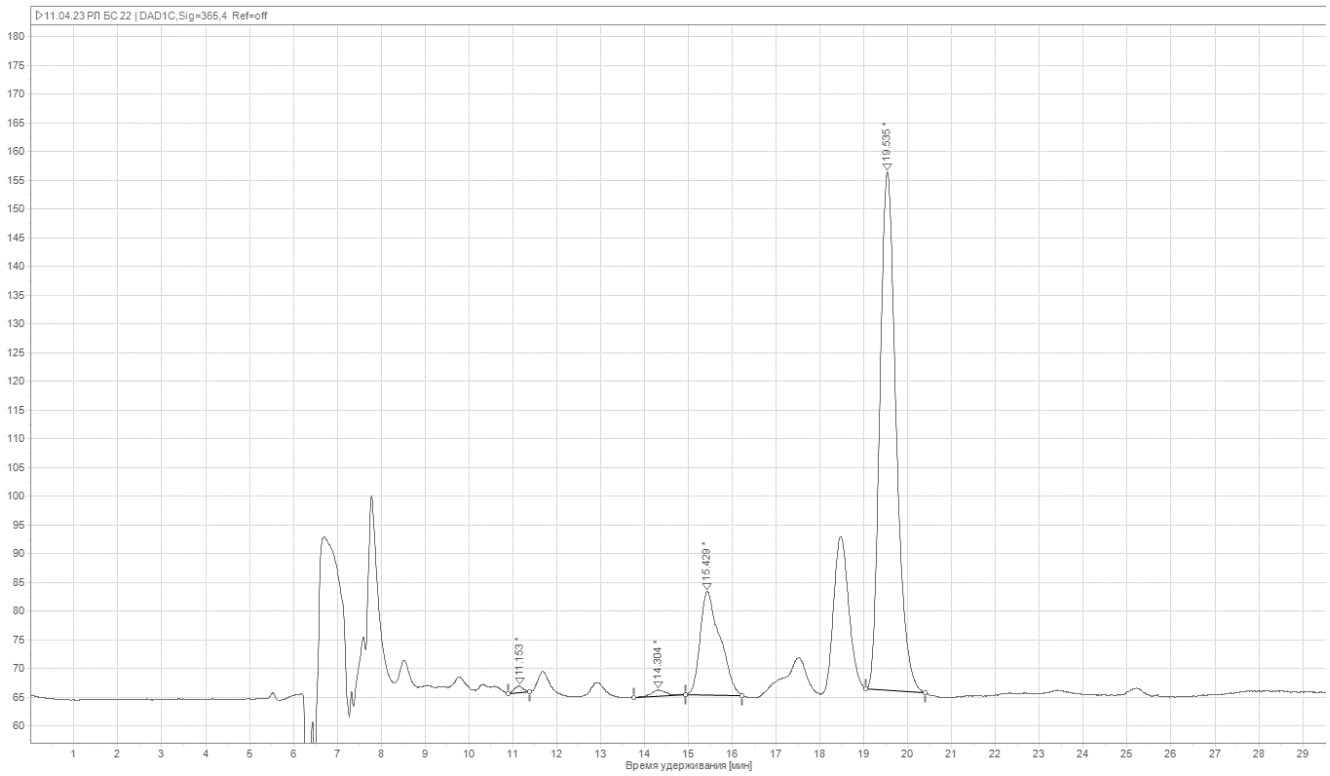


Рисунок 39 – Хроматограмма извлечения из листьев рейнутрии богемской. Разделение проводилось на колонке HPLC Column Platinum C8-EPS, 250×4.6 мм, 5 мкм

Полученные данные подтверждают наличие рутина в листьях рейнутрии богемской, но показывают, что другие флавоноиды могут накапливаться в больших количествах и свидетельствуют о том, что необходимо дальнейшее изучение флавоноидного комплекса листьев рейнутрии богемской.

4.7. Определение содержания стильбенов

Количественное содержание стильбенов определялось методом ВЭЖХ-УФ.

В качестве стандартов использовались растворы полидатина и ресвератрола, а также их смесь. В растворе смеси стандартов концентрации полидатина и ресвератрола были по 10 мкг/мл (рисунок 40).

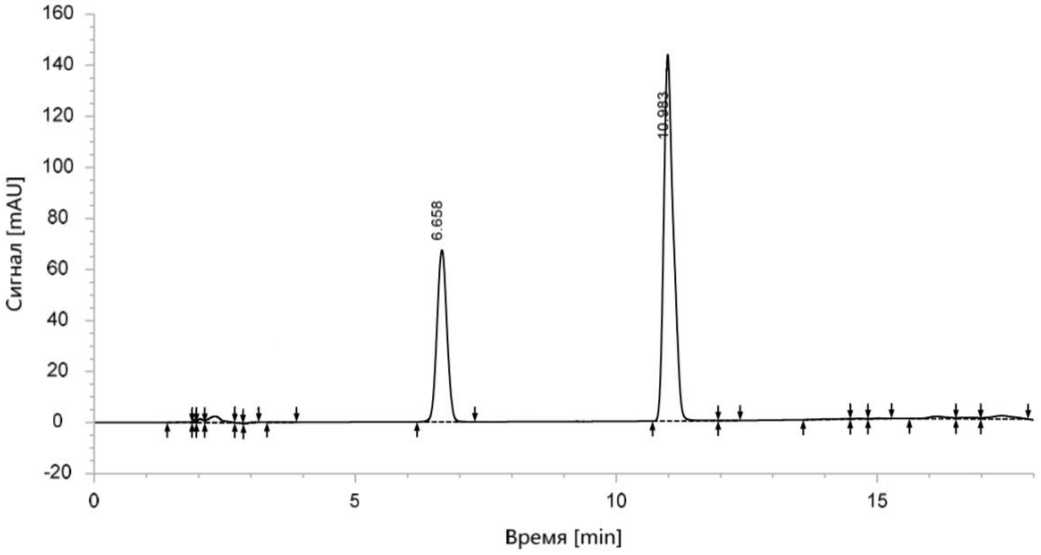
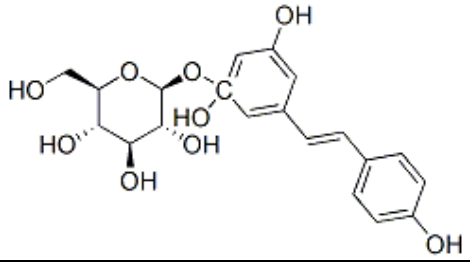
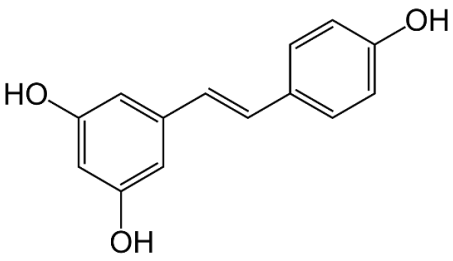


Рисунок 40 – Хроматограмма раствора смеси стандартов полидатина и ресвератрола. Разделение проводилось на колонке HPLC Column Spursil C18 150×4.6 мм, 5 мкм

По результату анализа смеси стандартов в данных условиях было установлено время удерживания полидатина и ресвератрола (таблица 31):

Таблица 31 – Время удерживания стандартных образцов

СО	Время удерживания, мин	Формула
Полидатин	6,658	
Ресвератрол	10,983	

В качестве образцов использовались два водно-спиртовых извлечения из листьев рейнутрии богемской: первое получено по методике определения флавоноидов, второе с использованием ультразвука. При анализе первого образца был обнаружен полидатин в количестве 1,46 мг на 1 г сухих листьев рейнутрии

богемской, ресвератрол был обнаружен в количестве 91,13 мкг (рисунок 41). Во втором образце обнаружено 531,68 мкг и 39,31 мкг полидатина и ресвератрола соответственно (рисунок 42).

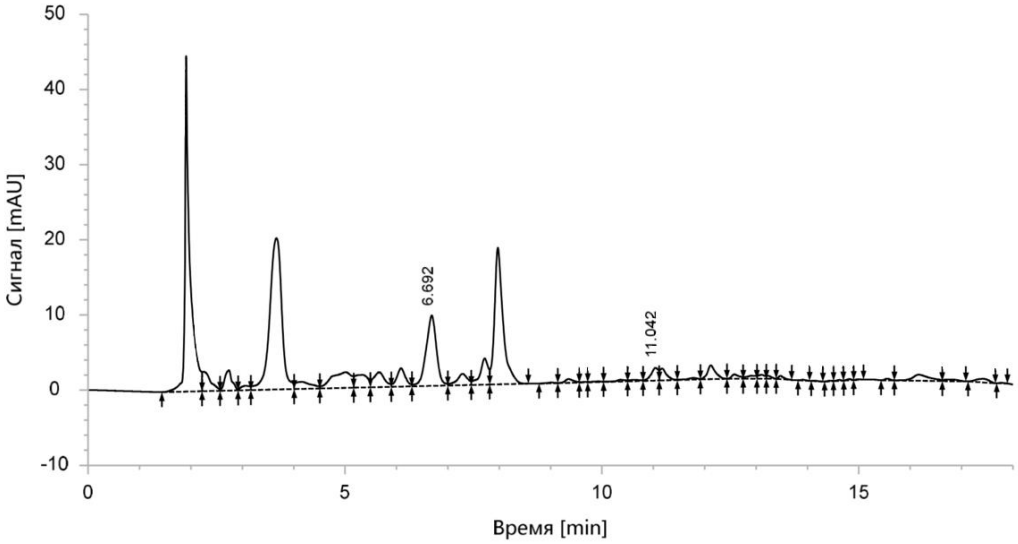


Рисунок 41 – Хроматограмма водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской. Разделение проводилось на колонке HPLC Column Spursil C18 150×4.6 мм, 5 мкм

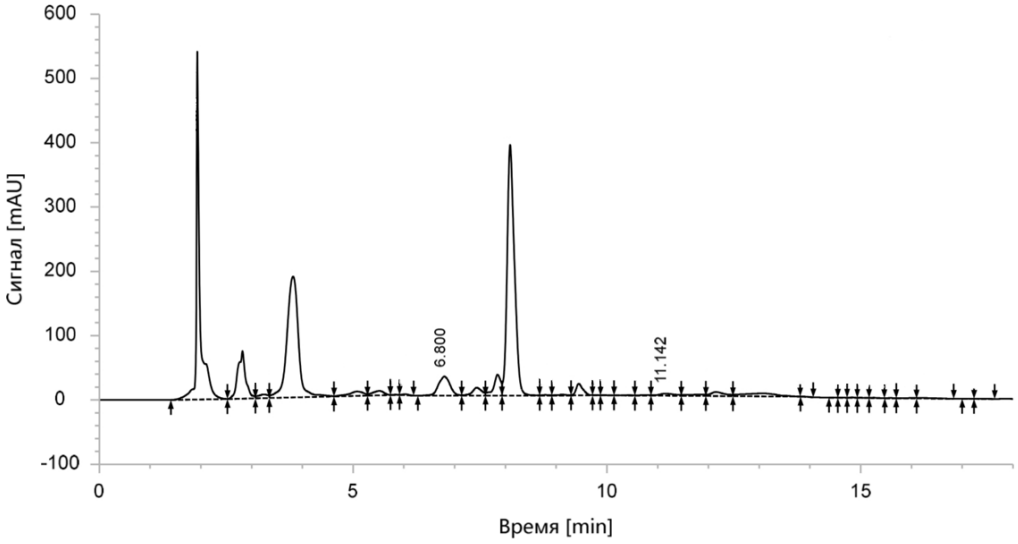


Рисунок 42 – Хроматограмма водно-спиртового извлечения из листьев рейнутрии богемской, полученного с использованием ультразвука. Разделение проводилось на колонке HPLC Column Spursil C18 150×4.6 мм, 5 мкм

С использованием метода ВЭЖХ-УФ удалось не только качественно подтвердить наличие полидатина и ресвератрола, но и определить их количество. В процентах содержание полидатина и ресвератрола составило 0,146 ± 0,006 % и 0,00911 ± 0,00025 % соответственно. Образец, полученный с использованием ультразвука необходим нам для соотнесения с количеством стильбенов в каллусах, так как водно-спиртовые извлечения из каллусов получали именно с использованием ультразвука.

Полученные данные показывают целесообразность нормирования показателя «полидатин» - не менее 0,1%, что использовано при разработке проекта ФС на данный вид сырья.

4.8. Определение суммы полисахаридов

Полисахариды представляют собой важную группу БАВ, вносящих вклад в биологическую активность растительного сырья. Результаты определения суммы полисахаридов в листьях рейнутрии богемской представлены в таблицах 32 и 33.

Таблица 32 – Содержание суммы полисахаридов в листьях рейнутрии богемской

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	5,37	0,07	0,00279	0,05281	95	2,78	4,33
Осень, во время цветения	2,95	0,09	0,00473	0,06878	95	2,78	1,59

Таблица 33 – Содержание суммы полисахаридов в листьях рейнутрии богемской других мест заготовки

Место заготовки	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Республика Беларусь	5,30	0,12	0,00868	0,09317	95	2,78	2,18
Тверская область	5,55	0,11	0,00772	0,08786	95	2,78	1,97
Саратовская область	2,78	0,08	0,00425	0,06519	95	2,78	2,92

Установлено, что содержание суммы полисахаридов заметно изменяется в зависимости от сезона заготовки – в период цветения в листьях накапливается меньше углеводных компонентов.

4.9. Определение содержания витаминов

Витамины обладают способностью моделировать и модулировать разнообразные фармакологические эффекты, что свидетельствует о важности их характеристики в составе сырья. Метод капиллярного электрофореза использовался для количественного определения содержания витаминов. Полученная электрофореграмма представлена на рисунке 43.

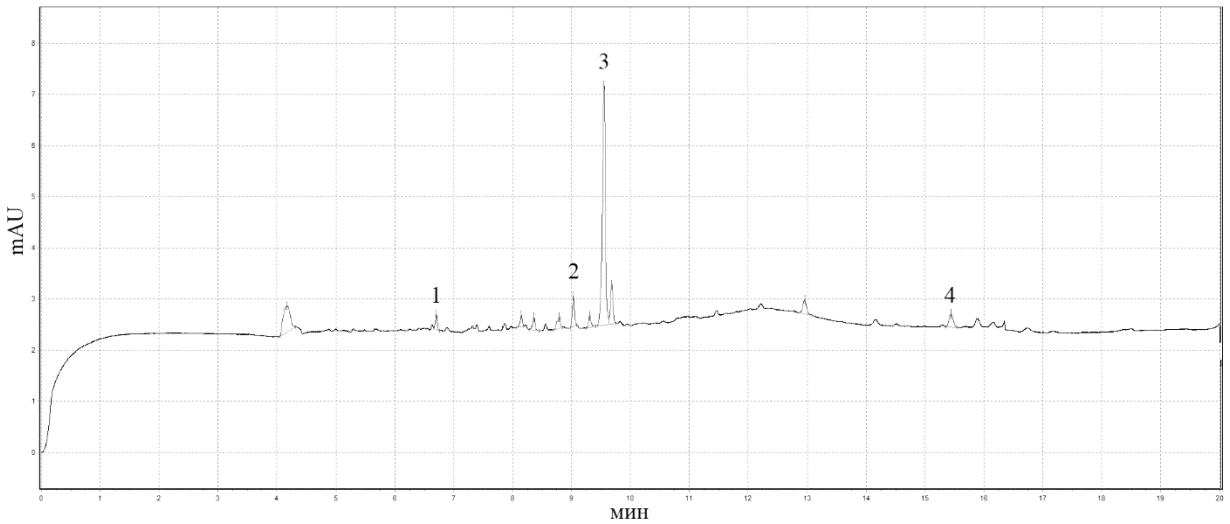


Рисунок 43 – Электрофореграмма витаминов из листьев рейнутрии богемской: 1 - B6, 2 - B2, 3 - C, 4 - B1

Для расчетов использовалась формула:

$$X = \frac{S \times m_{co} \times 0{,}09 \times 30 \times 0{,}5 \times 100 \times 100}{S_{co} \times 10 \times m \times 1{,}825 \times 1{,}865 \times (100 - W)} \quad (3),$$

где S – площадь пика извлечения,

S_{co} – площадь пика стандартного образца

m_{co} – масса стандартного образца, г;

m– масса сырья, г

W – влажность сырья, %.

Результаты количественного определения обнаруженных витаминов представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Содержание витаминов в листьях рейнутрии богемской

Витамин	Содержание, %
B6	0,00520 ± 0,00020
B2	0,0104 ± 0,0004
Аскорбиновая кислота	0,211 ± 0,009
B1	0,00520 ± 0,00020

По результатам исследования в листьях рейнутрии богемской обнаружены аскорбиновая кислота и витамины группы В (В1, В2 и В6). В наибольшем количестве содержится аскорбиновая кислота, однако присутствие витаминов В дополняет общую характеристику химического состава сырья. Таким образом, листья рейнутрии богемской могут рассматриваться как источник витаминов, прежде всего витамина С.

4.10. Определение содержания аминокислот

Аминокислоты являются важными азотсодержащими соединениями, участвующими в метаболизме растений. Для общей характеристики аминокислотного комплекса листьев рейнутрии богемской было проведено спектрофотометрическое определение суммы аминокислот в пересчёте на глутаминовую кислоту. Результаты анализа представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Содержание суммы аминокислот в листьях рейнутрии богемской

Сезон, фаза вегетации	$\overline{X}$	ΔX	S^2	S	P, %	t(0,95;4)	E, %
Весна, до цветения	0,401	0,008	0,00004	0,00658	95	2,78	2,04
Осень, во время цветения	0,410	0,007	0,00006	0,00748	95	2,78	2,25

Установлено, что количественное содержание суммы аминокислот в листьях рейнутрии богемской, заготовленных весной и осенью, различается незначительно.

Это свидетельствует об относительной стабильности общего уровня аминокислот независимо от сезона сбора.

Также методом капиллярного электрофореза определялся качественный и количественный состав аминокислот после гидролиза. На рисунке 44 представлена полученная электрофореграмма.

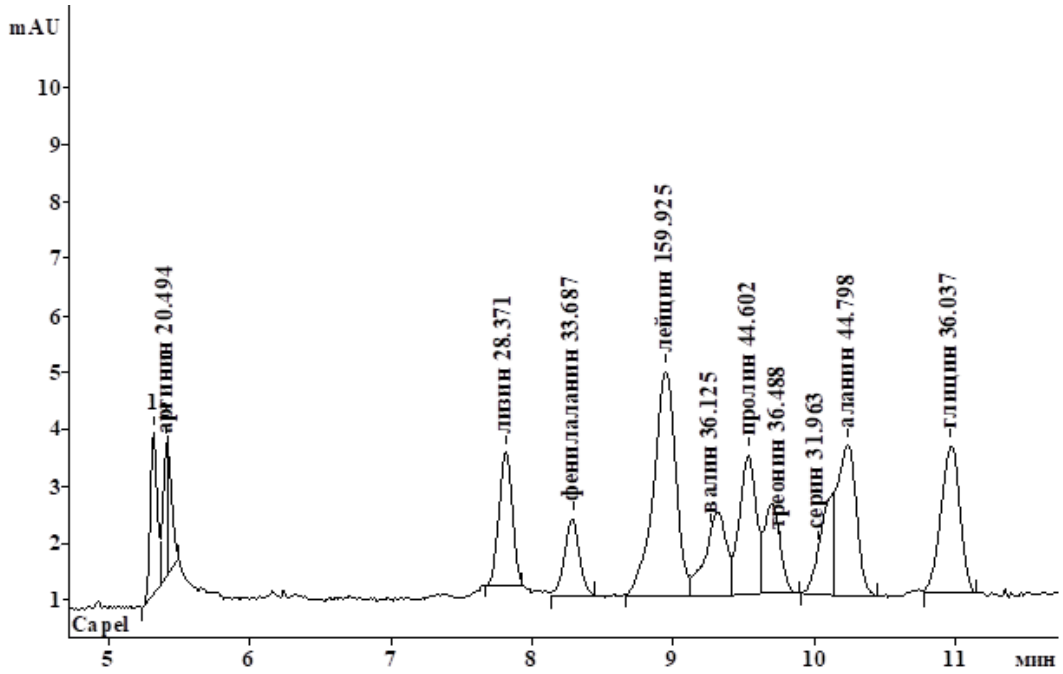


Рисунок 44 – Электрофореграмма аминокислот из листьев рейнутрии богемской

Результаты количественного определения представлены в таблице 36, из них следует, что в листьях рейнутрии богемской в достаточных количествах содержатся 12 аминокислот, из которых незаменимые фенилаланин, лизин, аргинин, валин, треонин, лейцин и изолейцин.

Таблица 36 – Результаты определения состава аминокислот в листьях рейнутрии богемской

Аминокислота	Содержание, %	Аминокислота	Содержание, %
Аргинин	0,81±0,04	Гистидин	<0,01
Лизин	1,21±0,05	Лейцин + Изолейцин	1,74±0,07
Тирозин	<0,01	Метионин	<0,01
Фенилаланин	1,33±0,06	Валин	0,43±0,02
Пролин	0,76±0,04	Глицин	0,42±0,02
Треонин	0,44±0,02	Глутаминовая кислота	1,02±0,05
Серин	0,52±0,02	Цистеин	0,09±0,01
Аланин	0,54±0,02	Аспарагиновая кислота	0,53±0,02

Суммарное содержание аминокислот в листьях рейнутрии богемской составило 9,84%, из которых незаменимых аминокислот 5,96%, заменимых 3,88%.

Из 1 г замороженных листьев рейнутрии богемской было выделено 45,2±1,8 мг общего белка, что свидетельствует о достаточно высоком уровне белкового компонента в сырье. По результатам SDS-PAGE установлено, что молекулярные массы выделенных белков составляли от 45 до 90 кДа, что указывает на наличие преимущественно среднемолекулярных белков, потенциально включающих ферменты, структурные белки и белки, участвующие в защитных реакциях растений (рисунок 45).

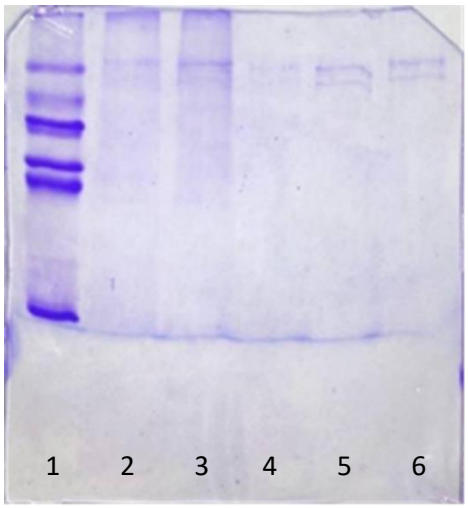


Рисунок 45 – Профиль электрофореза из листьев рейнутрии богемской: 1 - маркеры молекулярной массы, 2-6 - белки, выделенные из листьев рейнутрии богемской

Выявленное содержание белка свидетельствует о потенциальной питательной ценности листьев рейнутрии богемской, особенно как дополнительного источника растительного белка при использовании в качестве кормового ресурса.

4.11. Определение антирадикальной активности

Оценка антирадикальной активности позволяет охарактеризовать способность растительного водно-спиртового извлечения взаимодействовать со свободными радикалами и косвенно судить об его антиоксидантном потенциале.

Максимальное значение оптической плотности (A_0) наблюдается при длине волны 519 нм – 1,307. Спектр поглощения раствора ДФПГ (контроля) представлен на рисунке 46.

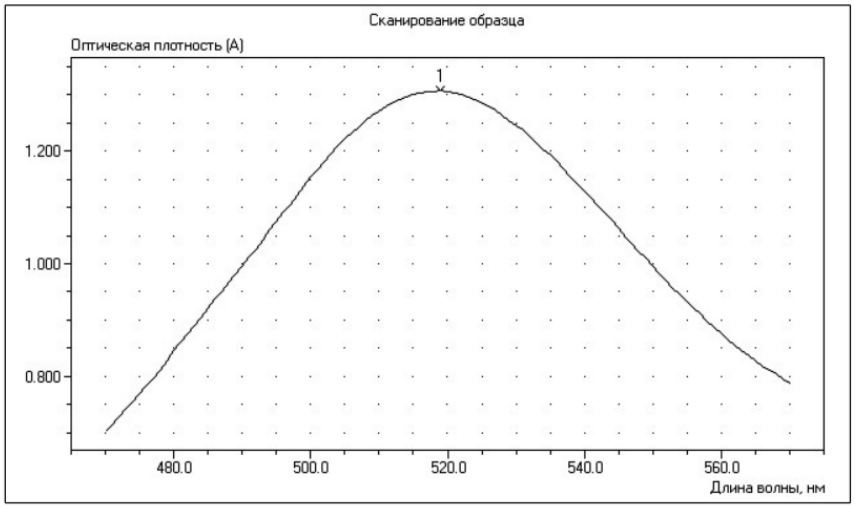


Таблица пиков:

№	Д. в., нм	A	T, %
1	519,0	1,307	4,9

Рисунок 46 – Спектр поглощения ДФПГ

Для оценки антиоксидантной активности рассчитывался показатель IC_{50}, который представляет собой концентрацию необходимую для ингибирования 50% радикалов ДФПГ. Пересчет вели на концентрацию суммы флавоноидов в растворе. Результаты представлены в таблице 37.

По результатам анализа показатель IC_{50} для водно-спиртового извлечения листьев рейнутрии богемской составил 0,63 мкг/мл в пересчете на рутин, что свидетельствует о достаточно высокой антиоксидантной активности. Полученные результаты согласуются с определенным содержанием флавоноидных соединений и подтверждают перспективность данного сырья как источника природных

антиоксидантов. Для сравнения, в литературе для листьев близкородственного вида *R. japonica* при оценке антиоксидантной активности методом DPPH было установлено значение IC_{50} 0,76 мкг/мл, что сопоставимо с полученным в настоящем исследовании результатом [79, 80].

Таблица 37 – Зависимость антиоксидантной активности от концентрации флавоноидов

Разведение	Концентрация флавоноидов, мкг/мл	Антиоксидантная активность, %
1:10	15	92,12
1:20	7,5	86,15
1:40	3,75	83,63
1:80	1,88	81,56
1:160	0,94	72,84
1: 320	0,47	38,03
1:640	0,23	30,07
1:1280	0,12	21,81

4.12. Изучение водных извлечений

Важным этапом фармакогностического изучения листьев рейнутрии богемской является исследование водных извлечений, поскольку это традиционные и потенциально применимые лекарственные формы. С целью обоснования рациональной лекарственной формы были приготовлены настой и отвар из листьев рейнутрии богемской.

Рассчитан коэффициент водопоглощения для данного сырья – 4, следовательно, объем воды, необходимый для изготовления 100 мл извлечения из 1 г листьев рейнутрии богемской – 140 мл. Были приготовлены одинаковые объемы настоя и отвара из листьев рейнутрии богемской, в которых количественно определяли сухой остаток, содержание дубильных веществ в пересчете на танин, суммы флавоноидов в пересчете на рутин, суммы полисахаридов, аскорбиновой кислоты, суммы свободных аминокислот в пересчёте на глутаминовую кислоту и состав аминокислот после гидролиза. Сопоставление указанных показателей позволяет оценить полноту извлечения отдельных групп БАВ и определить наиболее предпочтительную водную лекарственную форму.

Содержание сухого остатка является интегральным показателем, отражающим общее количество веществ, перешедших в водное извлечение. Сравнение данного показателя в настое и отваре позволяет оценить общую полноту экстракции растворимых в воде компонентов из листьев рейнутрии богемской. Сухой остаток в настое составил 2,15±0,02%, в отваре – 2,33±0,04%. Содержание сухого остатка в отваре выше, чем в настое, что свидетельствует о более полном переходе растворимых веществ в извлечение при более интенсивной тепловой обработке. Следовательно, отвар обеспечивает более высокую суммарную экстракцию компонентов по сравнению с настоем.

Дубильные вещества относятся к числу значимых фенольных соединений растительного сырья и во многом определяют его вяжущие и антиоксидантные свойства. В результате исследования было установлено, что режим отвара, предполагающий более длительное термическое воздействие, позволяет более полно извлечь дубильные вещества (в настое 0,284±0,005%, в отваре – 0,298±0,011% дубильных веществ в пересчете на танин) из листьев рейнутрии богемской.

Флавоноиды являются одной из ведущих групп биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих антиоксидантной активностью. Сравнение содержания суммы флавоноидов в настое и отваре представляет интерес для оценки влияния способа получения на сохранность и выход соединений данной природы. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настое составило 0,0370±0,0008%, в отваре – 0,0240±0,0004%. По результатам анализа содержание суммы флавоноидов в настое значительно больше чем в отваре. Это может указывать на частичную деструкцию либо менее благоприятные условия сохранения флавоноидных соединений при приготовлении отвара.

Полисахариды представляют собой важную группу водорастворимых природных соединений, способных вносить вклад в фармакологическую активность растительных извлечений. Изучение их содержания в настое и отваре позволяет оценить влияние температурного режима на выход

высокомолекулярных компонентов. Содержание суммы полисахаридов в настое составило 0,022±0,001%, в отваре – 0,033±0,001%. Полученные данные свидетельствуют о том, что приготовление отвара способствует более полному переходу полисахаридных компонентов в водное извлечение, что, вероятно, связано с лучшим разрушением клеточных структур сырья при нагревании.

Аскорбиновая кислота относится к числу биологически активных низкомолекулярных соединений, чувствительных к условиям обработки. Сравнительное определение ее содержания в настое и отваре позволяет оценить, в какой степени способ приготовления влияет на извлечение и сохранность данного компонента. Содержание аскорбиновой кислоты в настое составило 0,0044±0,0002%, в отваре – 0,0046±0,0002%. Содержание аскорбиновой кислоты в настое и отваре различается незначительно, однако в отваре этот показатель несколько выше. Это свидетельствует о том, что в рассматриваемых условиях приготовления нагревание не привело к выраженному снижению содержания аскорбиновой кислоты, а полнота ее извлечения в обеих лекарственных формах была сопоставимой.

Свободные аминокислоты являются важными азотсодержащими компонентами растительного сырья, а их содержание в водных извлечениях может служить дополнительной характеристикой полноты экстракции низкомолекулярных соединений. Сумма свободных аминокислот в пересчёте на кислоту глутаминовую в настое определена 0,0125±0,0006%, в отваре – 0,0130±0,0006%. Очевидно, что суммы свободных аминокислот в отваре незначительно выше, чем в настое. Это указывает на несколько более полное извлечение аминокислот при приготовлении отвара, хотя в целом различия между двумя лекарственными формами по данному показателю невелики.

Результаты сравнения количественного содержания БАВ в настое и отваре из листьев рейнутрии богемской представлены на рисунке 47.

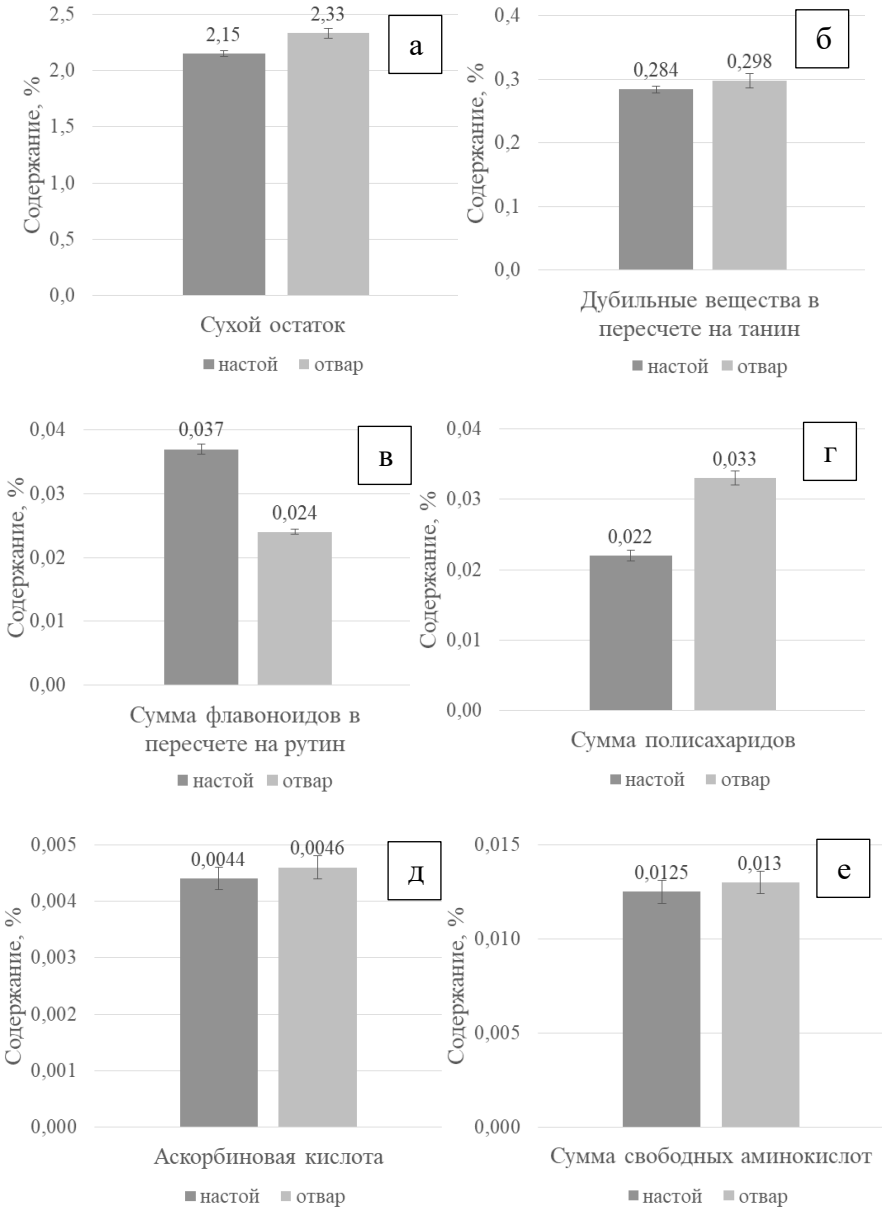


Рисунок 47 – Сравнение количественного содержания БАВ в настое и отваре из листьев рейнутрии богемской. а - сухого остатка; б - дубильных веществ; в - суммы флавоноидов в пересчете на рутин; г - суммы полисахаридов; д - аскорбиновой кислоты; е - суммы свободных аминокислот в пересчёте на глутаминовую кислоту

Для более полной характеристики водных извлечений из листьев рейнутрии богемской был изучен аминокислотный состав после гидролиза. Анализ аминокислотного состава после гидролиза был проведен на системе для капиллярного электрофореза «капель-105/105М», результаты представлены в таблице 38. Большее количество аминокислот было обнаружено в отваре, качественно состав не отличался. Суммарное содержание аминокислот в отваре

2,495±0,122% из которых 0,913% незаменимые аминокислоты и 1,582% заменимые, в настое 0,926% и 1,518%, соответственно.

Таблица 38 – Сравнение качественного и количественного содержания аминокислот в настое и отваре из листьев рейнутрии богемской

Аминокислота	Содержание в настое, %	Содержание в отваре, %
Аргинин	0,112±0,004	0,115±0,004
Лизин	0,025±0,001	0,025±0,001
Тирозин	0,039±0,002	0,041±0,002
Фенилаланин	0,085±0,004	0,081±0,004
Пролин	0,531±0,026	0,544±0,026
Треонин	0,282±0,012	0,266±0,011
Серин	0,123±0,005	0,187±0,005
Аланин	0,119±0,004	0,127±0,004
Гистидин	0,052±0,003	0,057±0,003
Лейцин + Изолейцин	0,205±0,010	0,217±0,010
Метионин	0,029±0,001	0,026±0,001
Валин	0,136±0,006	0,126±0,005
Глицин	0,077±0,004	0,080±0,004
Цистеин	0,020±0,001	0,020±0,001
Глутаминовая кислота	0,252±0,012	0,225±0,011
Аспарагиновая кислота	0,357±0,017	0,358±0,016
Суммарное содержание аминокислот, %	2,444±0,113	2,495±0,122

Показано, что качественный состав аминокислот в настое и отваре не различается, однако суммарное содержание аминокислот в отваре несколько выше. Это подтверждает, что отвар обеспечивает более полное извлечение аминокислот, при сохранении общего профиля аминокислот в обеих лекарственных формах [78].

Выводы к главе 4

1. Комплекс фармакогностических исследований листьев рейнутрии богемской позволил охарактеризовать их химический состав с учётом сезонной и географической вариабельности. Установлено, что показатели влажности, содержания общей и нерастворимой в хлористоводородной кислоте золы, а также уровень экстрактивных веществ, дубильных веществ и суммы флавоноидов

зависят от сезона заготовки и региона произрастания, что необходимо учитывать при стандартизации сырья.

2. Влажность сырья выше в образцах, собранных весной и в Тверской области, а минимальные значения отмечены для сырья из Республики Беларусь, что отражает влияние природно-климатических условий и фазы вегетации на влагосодержание и, следовательно, на стабильность и хранение сырья. Содержание общей золы не превышает 11%, а золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, – 0,5%, что указывает на средний уровень общей минерализации и низкое содержание трудноудаляемых минеральных примесей. Минеральный состав листьев вариабелен по макро- и микроэлементам (Ca, K, Mg, P, S, Fe и др.) в зависимости от региона, при этом уровни токсикологически значимых элементов (Pb, Cd, As) не превышают нормативов или находятся ниже предела определения, что подтверждает благоприятный токсикологический профиль сырья.

3. Количественное содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, также зависит от сезона и региона, максимальные значения отмечены для сырья, собранного весной в Москве, минимальные – для образцов из Республики Беларусь. Количество дубильных веществ выше в сырье, заготовленном осенью в период цветения, тогда как региональные различия выражены слабо, при общем сравнительно высоком уровне таннинов. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии, а также валидирована, что обеспечивает необходимую специфичность, линейность, прецизионность и правильность, что позволяет рекомендовать её для использования в нормативной документации. Показано, что содержание суммы флавоноидов зависит от фазы вегетации и региона, более высокие значения характерны для сырья, собранного осенью, с максимальными уровнями у образцов из Тверской области. По данным ВЭЖХ-УФ в листьях идентифицированы ориентин, цинарозид, рутин и гиперозид. Подтверждено присутствие стильбенов (полидатина и ресвератрола). Изучение полисахаридного комплекса выявило снижение суммы полисахаридов в период цветения при относительно

несущественных региональных различиях, что позволяет рассматривать сезонный фактор как основной для данной группы соединений.

4. Листья рейнутрии богемской содержат аскорбиновую кислоту и витамины группы В (В1, В2, В6), при доминировании аскорбиновой кислоты, а также значимое количество аминокислот (12 аминокислот, суммарно 9,84%, из них незаменимых – 5,96%), что указывает на их потенциальную пищевую и функциональную ценность.

5. Результаты оценки антирадикальной активности (IC_{50} 0,63 мкг/мл в пересчёте на рутин) свидетельствуют о высоком уровне антиоксидантной активности и согласуются с содержанием флавоноидов и стильбенов.

6. Регламентированы показатели доброкачественности листьев рейнутрии богемской (потеря в массе при высушивании, процентное содержание золы общей и золы нерастворимой в кислоте хлористоводородной, посторонних примесей, а также показатели измельченности и содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой, полидатина, суммы дубильных веществ в пересчете на танин и флавоноидов в пересчете на рутин).

7. В совокупности полученные данные подтверждают, что листья рейнутрии богемской являются перспективным лекарственным растительным сырьём с комплексом биологически активных веществ и могут служить основой для разработки нормативной документации и дальнейшего фармакологического изучения. На основании полученных значений количественного содержания БАВ, видится логичным сбор данного сырья во время цветения, когда листья рейнутрии богемской накапливают максимальное количество флавоноидов и дубильных веществ.

8. Определенный для данного сырья коэффициент водопоглощения составил 4, следовательно, объем воды, необходимый для изготовления 100 мл извлечения из 1 г листьев рейнутрии богемской равен 140 мл. В результате проведенного исследования установлено, что настой и отвар из листьев рейнутрии богемской различаются по эффективности извлечения отдельных групп БАВ. Для отвара характерно более высокое содержание сухого остатка (2,333±0,042%), дубильных

веществ (0,298±0,011%), полисахаридов (0,033±0,001%), аскорбиновой кислоты (0,0046±0,0002%) и суммы свободных аминокислот (0,0130±0,0006%). В то же время настой превосходил отвар по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин (в настое – 0,0370±0,0008%, в отваре – 0,0240±0,0004%). Полученные данные показывают, что отвар обеспечивает более полное извлечение большинства исследуемых гидрофильных компонентов. В целом с учетом совокупности показателей отвар может рассматриваться как более рациональная лекарственная форма для получения водного извлечения из листьев рейнутрии богемской.

ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСОВ

5.1. Индукция каллусогенеза

В ходе инкубации листовых эксплантов рейнутрии богемской на твердой агаризованной среде MS+КТ+2,4-Д, было показано, что в выбранных условиях происходит эффективная индукция каллусогенеза с последующим развитием устойчиво пролиферирующей каллусной ткани. Развитие каллуса происходило по типичному для дедифференцирующихся растительных тканей сценарию: после адаптации экспланта к условиям *in vitro* в зоне раневой поверхности и вблизи проводящих тканей появлялись участки разрастающейся недифференцированной ткани. Такая локализация морфогенетического ответа представляется закономерной, поскольку именно области, прилегающие к жилкам, содержат клетки, обладающие более высоким потенциалом к переходу в меристематическое состояние. Активное образование каллусной ткани происходило на 14-30 сутки.

На начальных этапах культивирования формирование каллуса сопровождалось изменением структуры ткани экспланта, края фрагментов уплотнялись, затем наблюдалось разрастание клеточной массы с постепенной утратой признаков исходно организованной листовой ткани (рисунок 48).

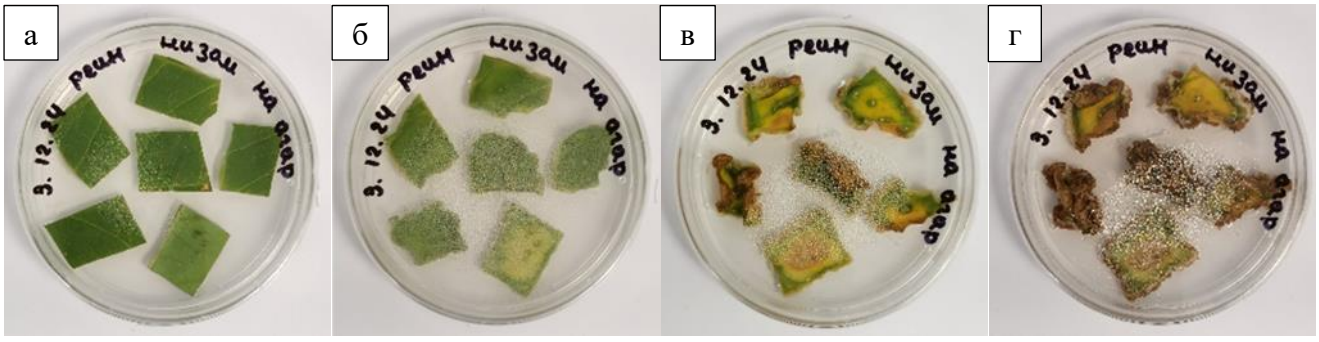


Рисунок 48 – Развитие каллусной ткани на эксплантах рейнутрии при культивировании на твердой агаровой питательной среде. а - исходные экспланты; б, в, г - экспланты на 10, 20, 36 сут культивирования

Полученный каллус имел признаки, характерные для первичной культуры: морфологическую неоднородность, вариабельность плотности и различия в

окраске отдельных участков. Подобная неоднородность обычно отражает различия в физиологическом состоянии клеток и степень их вовлечения в процессы активного деления. В то же время само появление на эксплантах жизнеспособной каллусной ткани свидетельствовало о том, что выбранное сочетание регуляторов роста было достаточным для запуска дедифференцировки и последующей пролиферации клеток (рисунок 49).

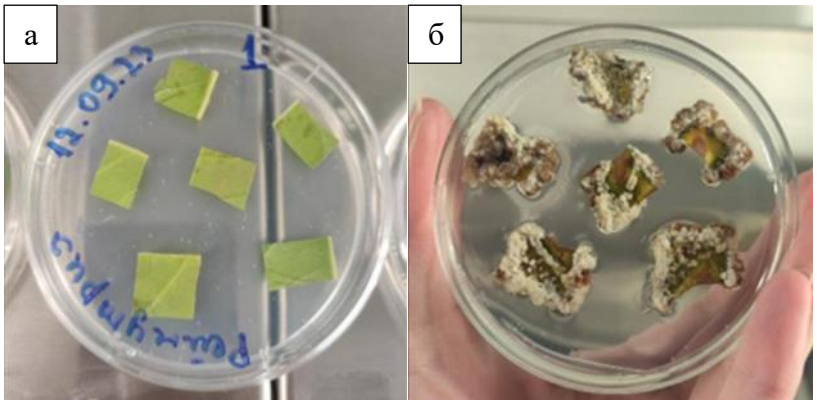


Рисунок 49 – Образование каллусов по краям эксплантов рейнутрии: экспланты на 1 сут (а) и 36 сут (б) культивирования

Ключевую роль в индукции каллусогенеза, вероятно, играло присутствие фитогормона 2,4-Д в составе среды. Ауксин такого типа традиционно рассматривается как один из наиболее эффективных индукторов перехода клеток в недифференцированное состояние, поскольку он стимулирует клеточное деление и способствует формированию каллусной массы. Добавление цитокинина КТ, по-видимому, обеспечивало более сбалансированное гормональное воздействие и поддерживало пролиферативную активность ткани при длительном культивировании. Таким образом, примененное соотношение ауксина и цитокинина можно рассматривать как адекватное для индукции и поддержания роста каллуса рейнутрии богемской.

Наблюдение за первичным каллусом происходило в течении 87 сут, по окончании этого срока происходило полное высыхание каллусной ткани. Уже на 73 сут отмечалось замедление роста ткани, изменение визуальных характеристик, что напрямую связано с истощением питательной среды, накоплением токсичных

продуктов обмена и недостатком влаги. Очевидно, что для стимуляции деления клеток и увеличения выхода растительного материала, необходимы пересевы каллусов на свежую среду.

5.2. Субкультивирование каллусов на агаризованной среде

При последующих пассажах на свежую агаризованную среду каллус сохранял способность к росту, что указывает на возможность поддержания культуры в серии пересевов. Перенос как целых фрагментов, так и предварительно дазагрегированного материала показал принципиальную пригодность обоих подходов для субкультивирования. Вместе с тем более рыхлая и механически разделенная ткань потенциально обладает преимуществом с точки зрения ускоренного контакта клеток с питательной средой и более равномерного распределения пролиферирующих участков, тогда как сохранение крупных фрагментов позволяет в большей степени поддерживать целостность уже сформированных жизнеспособных зон каллуса. С практической точки зрения это означает, что выбор способа пересадки может определяться текущим состоянием культуры и задачами дальнейшего эксперимента.

Источником материала для субкультивирования служил исходный каллус, образовавшийся по краям эксплантов после 36 сут культивирования (рисунок 50). С образовавшегося на эксплантах каллуса были отобраны небольшие (около 3-4 мм) фрагменты и перенесены на свежую твердую питательную среду (рисунок 51). После 27 сут культивирования наблюдался существенный прирост каллусной ткани, которая на периферии клеточной массы сохраняла преимущественно рыхлую структуру, состояла из округлых малодифференцированных, активно делящихся клеток (рисунок 52а) и была окрашена в бело-желтый цвет. Отдельные участки, локализованные ближе к центру каллусной ткани, имели более жесткую структуру, включали начинающие дифференцироваться клетки удлиненной формы (рисунок 52б) и цвет от светло-коричневого до темно-коричневого. Значительные отличия в морфологии клеток из различных участков каллуса вероятно связаны с

неоднородностью поступления нутриентов, витаминов, гормонов, воды и кислорода к клеткам в зависимости от их локализации. При дальнейшем субкультивировании на 50 сут отмечалась значительная неоднородность каллусов, изменение цвета от первоначального светло-желтого до темно-коричневого, различия в плотности структур на периферии и в центре клеточной массы. На 86 сут наблюдались признаки истощения питательной среды и полной гибели клеток.

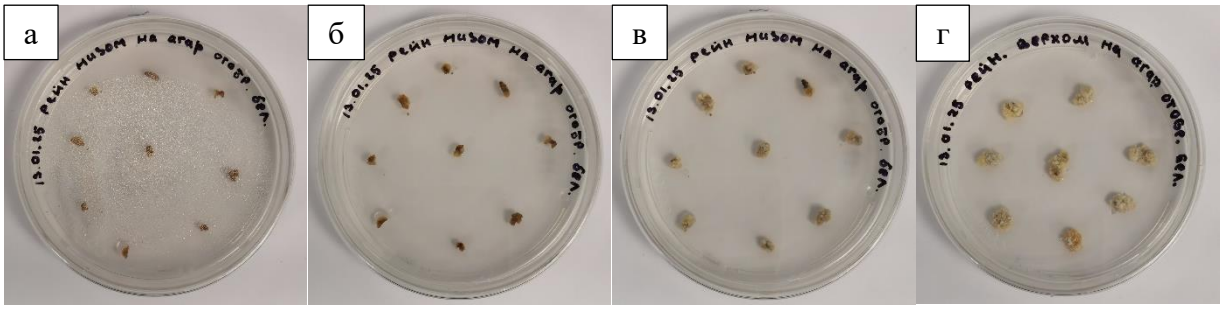


Рисунок 50 – Субкультивирование фрагментов каллуса на твердой питательной среде. а - после перенесения клеток на новую среду; б, в, г - на 8, 27 и 36-е сут культивирования

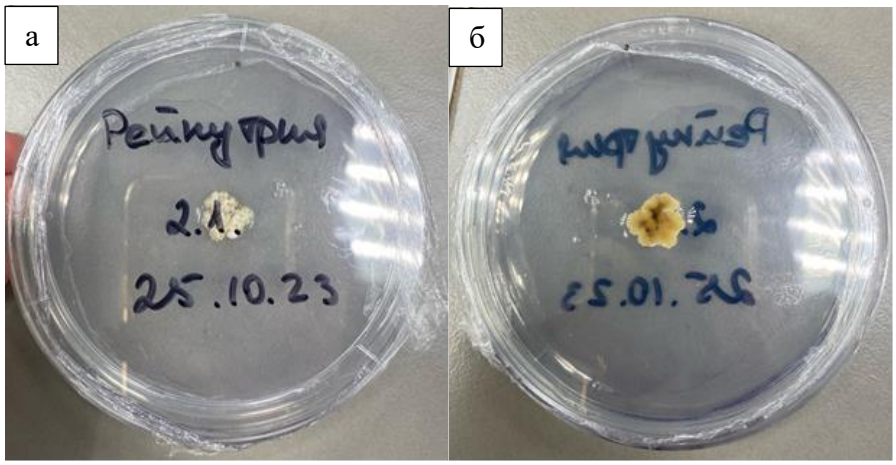


Рисунок 51 – Каллусы на агаризованной среде после 45 сут субкультивирования. а - вид сверху; б - вид снизу через прозрачную питательную среду

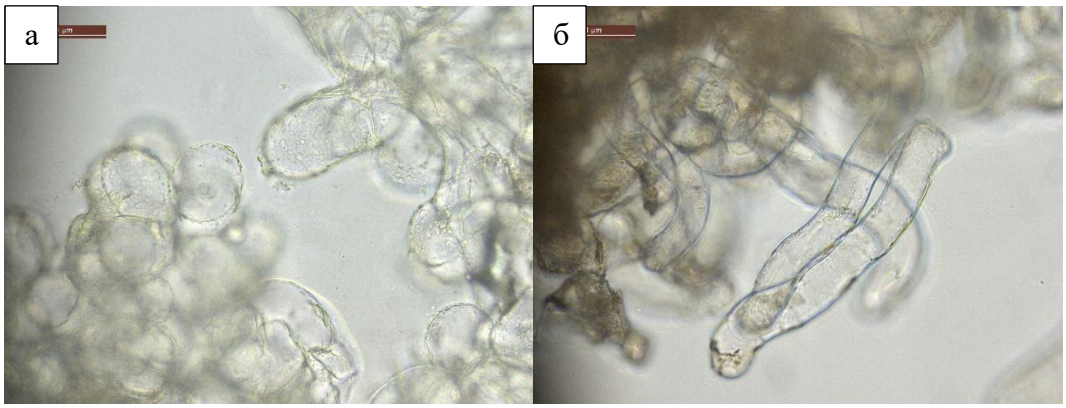


Рисунок 52 – Субкультивирование фрагментов каллуса на твердой питательной среде проводили в течение 36 сут. Увеличение: ×400; Морфология клеток, взятых с периферии клеточной массы каллуса (а) и из его центральной части (б)

Таким образом, индукция каллусогенеза у рейнутрии богемской в использованных условиях может быть оценена как успешная, а предложенная схема субкультивирования – как пригодная для поддержания жизнеспособной культуры.

5.3. Субкультивирование каллусов в жидкой питательной среде

Отдельного внимания заслуживает перевод каллусной ткани в жидкую систему культивирования. Сам по себе такой переход является важным этапом, поскольку позволяет перейти от поверхностного роста на агаризованной среде к более динамичному контакту клеток с компонентами среды. Жидкая культура создает предпосылки для частичной дезагрегации каллусной массы, увеличения площади соприкосновения ткани с питательным раствором и, как следствие, для более интенсивного обмена веществ. В то же время именно на этом этапе особенно важны исходное качество и устойчивость каллуса, поскольку ослабленная и физиологически неоднородная ткань хуже переносит перевод в новые условия.

Использование двух вариантов жидкой среды MS+2,4-Д и MS с комбинацией 2,4-Д и КТ позволяло оценить значение дополнительного цитокининового компонента для поддержания культуры после переноса с твердой среды. С физиологической точки зрения среда, содержащая только ауксин, должна в

большей степени поддерживать недифференцированное состояние клеток, тогда как присутствие КТ может влиять на интенсивность пролиферации и морфологические особенности растущей ткани. Даже при отсутствии выраженных различий по скорости роста сопоставление этих вариантов имеет методическое значение, поскольку позволяет выбрать более удобную систему для последующего накопления биомассы и стандартизовать условия культивирования.

В ходе эксперимента было показано, что более активный рост каллуса наблюдался в жидкой питательной среде с добавлением КТ, так как было визуализировано значительно большее помутнение жидкости, в сравнение со средой, не содержащей КТ (рисунок 53).

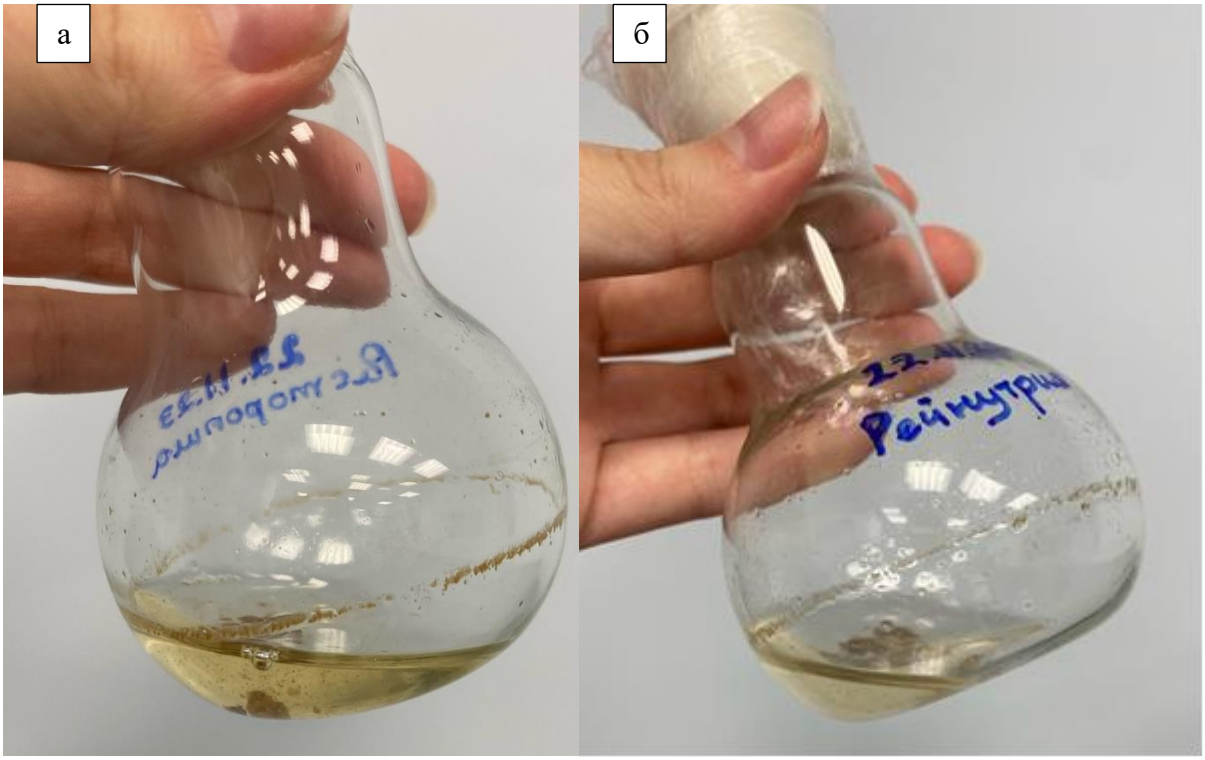


Рисунок 53 – Субкультивирование каллусов в жидкой среде. а - вид сбоку; б - сверху

5.4. Микроскопия каллусов

При рассмотрении микропрепарата каллусов визуализируются небольшие клетки округлой или слегка вытянутой формы средним размером 76,5 мкм (рисунок 54).

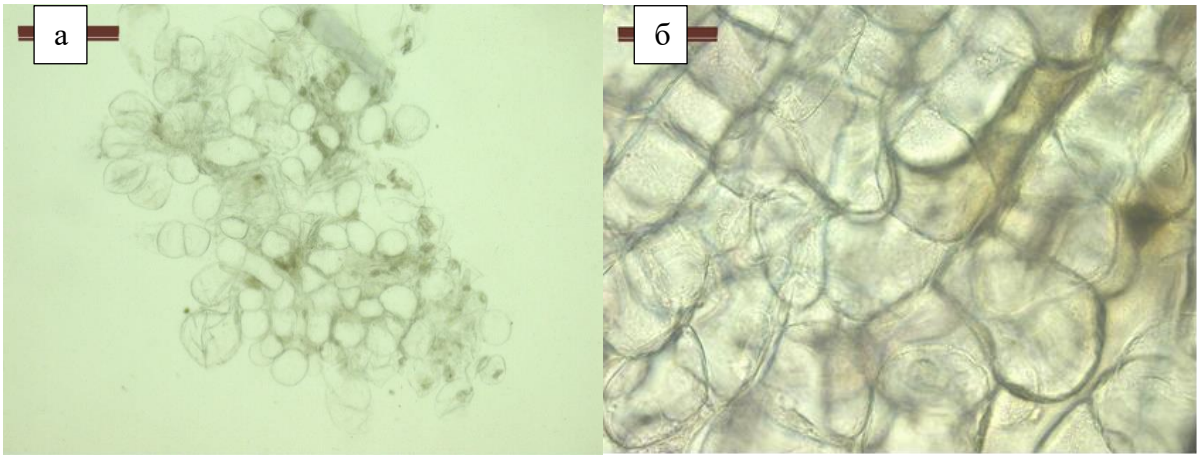


Рисунок 54 – Микропрепарат неокрашенного каллуса из листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) на 20 сут культивирования. Увеличение: а - ×100, б - ×400

В небольшом количестве клеток визуализировалось оранжевое содержимое, которое предположительно является накопленными антраценпроизводными (рисунок 55а). При обработке раствором щелочи препарат визуально становился темно-красным, но слишком темным для визуализации под микроскопом (рисунок 55б). В потемневших зонах также видно окрашенное содержимое клеток.

При окрашивании препарата растворами Люголя и Судана III изменения окраски не происходило, что указывает на отсутствие существенных запасов крахмала и липидов. При окрашивании раствором флороглюцина с соляной кислотой в большинстве клеток не было обнаружено изменений, но были визуализированы клетки зарождавшейся проводящей системы (рисунок 56).

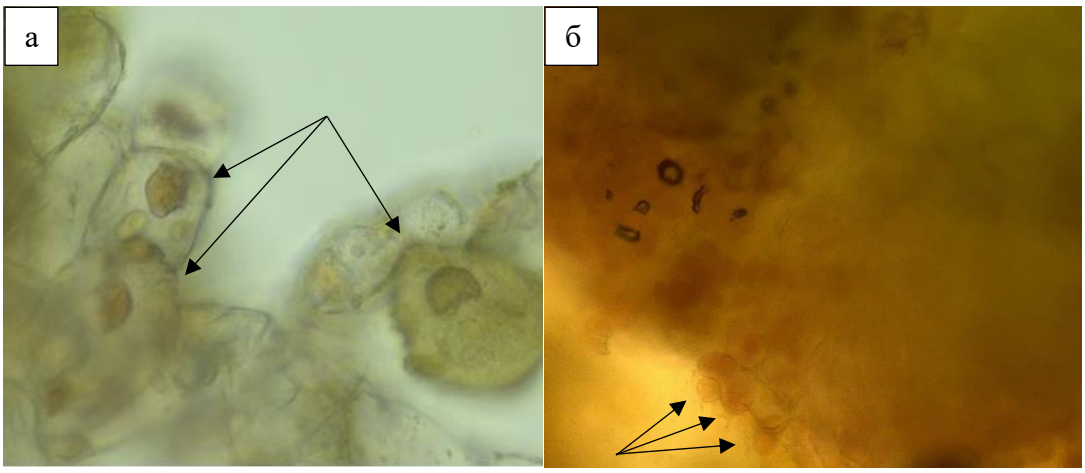


Рисунок 55 – Микропрепарат каллуса из листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) на 36 сут культивирования: а - до окрашивания щелочью. Увеличение: ×400; б - после окрашивания щелочью. Увеличение: ×100; Стрелки указывают на клетки с окрашенным содержимым

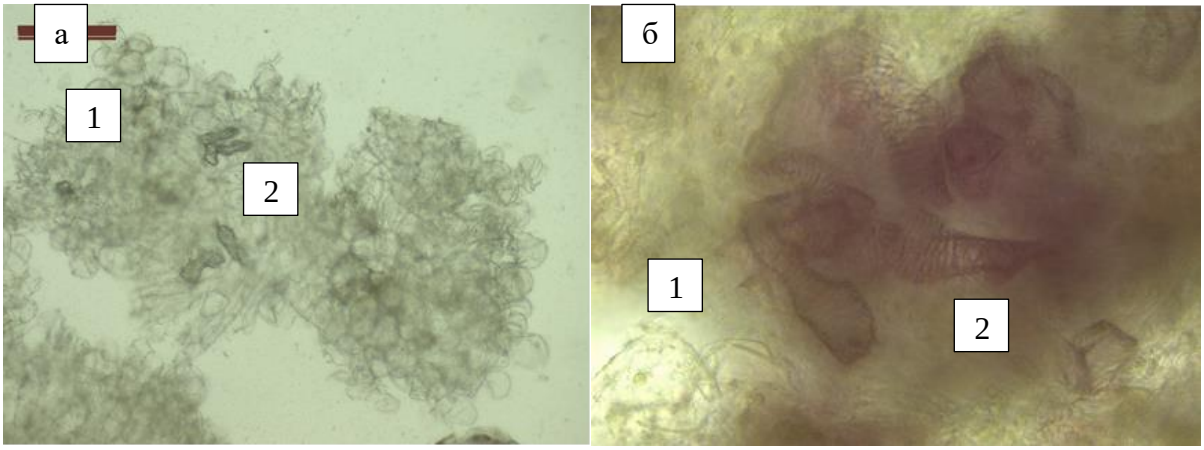


Рисунок 56 – Микропрепарат каллуса из листа рейнутрии богемской (*Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova) на 36 сут культивирования: а - до окрашивания раствором флороглюцина с соляной кислотой. Увеличение: ×100; б - после окрашивания раствором флороглюцина с соляной кислотой. Увеличение: ×400; 1 - клетки каллуса; 2 - клетки проводящей системы

Микроскопический анализ подтвердил формирование типичной каллусной ткани из мелких недифференцированных клеток, а также зафиксировал в некоторых участках появление элементов проводящей системы.

5.5. Определение содержания стильбенов в каллусах

Качественное и количественное содержание стильбенов оценено в каллусах, поскольку они являются важными целевыми БАВ. Количественное содержание стильбенов в каллусах определялось методом ВЭЖХ-УФ (рисунок 57). Образцы водно-спиртовых извлечений из каллусов получали с использованием ультразвука, соотношение сырье-экстрагент 1:10. По результатам анализа в каллусах было обнаружено 0,00502 ± 0,00020 % полидатина и 0,00164 ± 0,00007 % ресвератрола.

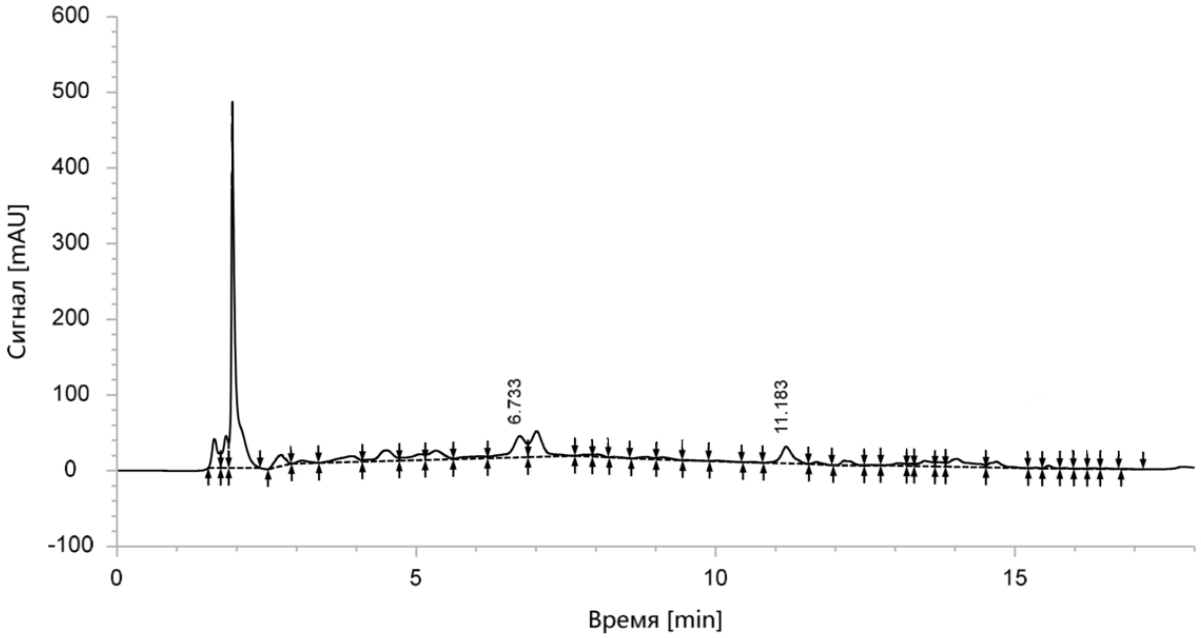


Рисунок 57 – Хроматограмма водно-спиртового извлечения из каллуса листьев рейнутрии богемской, полученного с использованием ультразвука. Разделение проводилось на колонке HPLC Column Spursil C18 150×4.6 мм, 5 мкм

Полученные данные подтверждают сохранение способности к биосинтезу характерных для исходного растения фенольных метаболитов при культивировании *in vitro*, что делает каллусы потенциальным источником целевых БАВ из группы стильбенов. Содержание транс-стильбенов в каллусах, полученных из листьев рейнутрии богемской, существенно ниже, чем в листьях исходного растения и несколько ниже, чем в каллусах рейнутрии японской по данным литературы. По отношению к листьям содержание полидатина в каллусах

снижается примерно в 10 раз, а ресвератрола — примерно в 2,5 раза. Необходимо дальнейшее изучение влияния состава питательной среды, в том числе содержания фитогормонов, на выход стильбенов, для подбора оптимальных условий, позволяющих клеткам накапливать стильбены в количествах, сопоставимых с содержанием в растении.

5.6. Элементный анализ каллусов

По данным элементного анализа установлено, что в минеральном составе каллусной ткани рейнутрии богемской преобладают калий и кальций, составляющие 14530±621 и 11580±348 мкг/г соответственно. В меньших количествах определялись сера, а также натрий, фосфор и магний. Железо обнаружено в колличестве 472±20 мкг/г (таблица 39).

Таблица 39 – Содержание макроэлементов в каллусах рейнутрии богемской

Элемент	Содержание, мкг/г
Ca	11580±348
K	14530±621
Mg	1855±81
Na	2180±99
P	1960±74
S	3605±124
Fe	472±20

Среди микроэлементов наибольшие концентрации установлены для марганца, цинка и бора – 376±12, 67,00±2,48 и 51,00±2,48 мкг/г соответственно. Содержание кремния и молибдена составило 27,00±1,24 и 10,00±0,50 мкг/г. Для селена, алюминия, никеля, хрома и меди были получены более низкие значения. Литий присутствовал в следовых количествах – 0,071±0,003 мкг/г, содержание кобальта и ванадия находилось ниже пределов количественного определения (таблица 40).

Таблица 40 – Содержание микроэлементов в каллусах рейнутрии богемской

Элемент	Содержание, мкг/г
Al	4,40±0,12
B	51,00±2,48
Co	< 0,5
Cr	2,60±0,12
Cu	1,70±0,07
Li	0,071±0,003
Mn	376±12
Mo	10,00±0,50
Ni	3,50±0,15
Se	5,50±0,15
Si	27,00±1,24
Zn	67,00±2,48
V	< 0,1

Анализ ультрамикроэлементов показал, что в образце достоверно определялись барий, стронций, титан и цирконий, при этом содержание титана было наибольшим и составило 14,00±0,50 мкг/г. Серебро, бериллий, висмут, сурьма и олово выявлялись на уровне ниже пределов количественного определения (таблица 41).

Таблица 41 – Содержание ультрамикроэлементов в каллусах рейнутрии богемской

Элемент	Содержание, мкг/г
Ag	< 0,1
Ba	0,39±0,01
Be	< 0,1
Bi	< 0,1
Sb	< 0,1
Sn	< 0,1
Sr	4,40±0,10
Ti	14,00±0,50
Zr	0,14±0,01

При оценке содержания токсикологически значимых элементов установлено, что концентрация свинца составила 0,14±0,01 мкг/г, а содержание кадмия и мышьяка определялось на уровнях ниже 0,1 и 0,5 мкг/г соответственно. Это свидетельствует об отсутствии выраженного накопления тяжелых металлов и мышьяка в исследуемой каллусной ткани (таблица 42).

Таблица 42 – Содержание тяжёлых металлов и мышьяка в каллусах рейнутрии богемской

Элемент	Содержание, мкг/г
Pb	0,14±0,01
Cd	< 0,1
As	< 0,5

Сопоставление минерального состава листьев рейнутрии богемской и каллусной ткани показало, что по ряду элементов каллусы сохраняют общий для растительного объекта профиль накопления, однако количественные соотношения отдельных элементов заметно изменяются. Для каллусов, как и для листьев, характерно высокое содержание кальция и калия, фосфора. В то же время каллусы отличаются более низким содержанием магния и значительно более высоким содержанием натрия, серы и железа по сравнению с листьями. Каллусная ткань характеризуется повышенным накоплением бора, марганца, хрома, молибдена и цинка. Наиболее существенные различия установлены для марганца, молибдена и хрома: их содержание в каллусах превышало показатели, полученные для листьев, собранных во всех исследованных регионах. В то же время для каллусной культуры характерно низкое содержание алюминия, меди, лития и кремния, содержание никеля и селена остаётся в диапазоне, близком к значениям, установленным для листьев. Такие отличия в минеральном профиле каллусов вероятно связаны с особенностями культивирования in vitro и составом питательной среды.

В отношении ультрамикроэлементов и токсикологически значимых элементов каллусы имеют более благоприятный профиль по ряду показателей безопасности. В каллусной ткани существенно ниже содержание бария, стронция и свинца, а сурьма и олово в каллусах не обнаруживаются, тогда как в листьях московского происхождения они определялись в следовых количествах. Содержание кадмия и мышьяка как в листьях, так и в каллусах находилось ниже предела обнаружения метода. Особенно показательно снижение содержания свинца: в каллусах оно составило 0,14 мкг/г, тогда как в листьях варьировало от 0,49 до 1,30 мкг/г. Это указывает на меньшую подверженность каллусной ткани загрязнению элементами техногенного или почвенного происхождения.

Высокое содержание в каллусной ткани рейнутрии богемской калия, кальция и бора, а также более высокое по сравнению с листьями содержание железа, марганца и цинка позволяет рассматривать её как перспективный источник минеральных компонентов при разработке витаминно-минеральных пищевых и кормовых добавок. Существенным преимуществом каллусной биомассы по сравнению с природным сырьём является более низкое содержание токсикологически значимых элементов. Это указывает на потенциальную пригодность каллусных культур рейнутрии в качестве более стандартизованного и безопасного растительного сырья для применения в пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

Выводы к главе 5

1. Разработана технология получения биомассы каллусных клеток рейнутрии богемской на агаризованной и жидкой средах. Каллусная ткань представлена преимущественно небольшими округлыми или слегка вытянутыми клетками среднего размера (~76,5 мкм), что соответствует морфологии активно делящихся недифференцированных клеток.

2. Показано что каллусная ткань рейнутрии богемской способна синтезировать и накапливать стильбены: в 1 г высушенного каллуса обнаружено 16,35 мкг ресвератрола и 50,24 мкг полидатина (гликозид ресвератрола). Полученные значения подтверждают сохранение способности к биосинтезу характерных для исходного растения фенольных метаболитов при культивировании in vitro, что делает каллусы потенциальным источником целевых БАВ стильбеновой природы.

3. Установлено, что в каллусах рейнутрии богемской среди макроэлементов доминирующими являются калий и кальций, содержание которых составляет 14530±621 и 11580±348 мкг/г соответственно. Среди микроэлементов наиболее высокие концентрации характерны для марганца 376±12 мкг/г, цинка 67,00±2,48 мкг/г и бора 51,00±2,48 мкг/г.

4. Обнаружены заметные различия в содержании макро- и микроэлементов в каллусах и листьях рейнутрии из природных источников. Содержание натрия 2180±99 мкг/г, серы 3605±124 мкг/г, железа 472±20 мкг/г, марганца 376±12 мкг/г, молибдена 10,00±0,50 мкг/г, цинка 67,00±2,48 мкг/г и хрома 2,60±0,12 мкг/г в каллусах заметно превышает соответствующие значения для листьев рейнутрии из всех исследованных регионов. В то же время содержание магния 1855±81 мкг/г в каллусах ниже, а содержание селена 5,50±0,15 мкг/г остаётся в диапазоне, близком к значениям, установленным для листьев.

5. Значимого накопления токсичных элементов в каллусах не обнаружено: содержание свинца является низким - 0,14±0,01 мкг/г, а содержание кадмия и мышьяка находится ниже пределов количественного определения.

ГЛАВА 6. ПОЛУЧЕНИЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ НА РОСТ КРЕСС-САЛАТА И СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

6.1. Изучение стимулирующего действия экстракта из листьев рейнутрии богемской на морфометрические показатели растений и содержание биологически активных веществ

Актуальным является поиск растительных стимуляторов роста, способных повышать продуктивность культур без негативного воздействия на человека и окружающую среду. Особый интерес в этом отношении представляет рейнутрия богемская, так как в ее листьях содержится широкий спектр БАВ, среди которых имеются соединения, оказывающие стимулирующее действие на растения. В связи с этим представляло интерес получить экстракт из листьев рейнутрии богемской и оценить его влияние на рост и биохимические показатели модельного растения – кресс-салата.

В полученном дезалкоголизированном водном растворе спиртового экстракта (ДЭРБ) содержание БАВ составляет примерно 45,6 мкг/мл суммы флавоноидов в пересчете на рутин и 4,38 мкг/мл полидатина.

Культивирование кресс-салата длилось 4 недели. При выращивании на гидропонике величина сырьевой фитомассы была в 5-10 раз больше, чем у образцов, выращенных на земле за тот же период. Не все сорта хорошо развивались на гидропонике – сорт «Ажур» без обработки ДЭРБ вообще не вырос. На почве семена с предварительной обработкой ДЭРБ развивались лучше и накапливали фитомассы в 1,2 раза больше, хотя и всходили немного позже не обработанных. В отношении накопления фитомассы предпосевная обработка ДЭРБ семян выбранных сортов кресс-салата имеет выраженный положительный эффект.

Для определения питательной и лечебной ценности выращенной травы кресс-салата изучался количественный состав БАВ в полученных образцах. Исследования проводили по методикам, использующимся в анализе

лекарственного растительного сырья, а именно методикам Государственной Фармакопеи XV издания. Результаты представлены в таблице 43.

Таблица 43 – Влажность и содержание БАВ в кресс-салате в пересчете на абсолютно сухое сырье (при P=0,95, t (95,4)=2,78)

№	сорт	влажность, %	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %	Содержание аскорбиновой кислоты, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
1.	«Курлед», почва без ДЭРБ	92,01±2,03	1,83±0,02	0,028±0,001	0,189±0,002
2.	«Курлед», гидропоника с ДЭРБ	91,00±2,34	0,170±0,004	0,066±0,002	0,719±0,023
3.	«Курлед», гидропоника без ДЭРБ	90,19±1,44	0,37±0,01	0,080±0,003	1,22±0,03
4.	«Весенний», гидропоника с ДЭРБ	90,02±1,70	0,86±0,01	0,055±0,003	0,210±0,010
5.	«Весенний», гидропоника без ДЭРБ	90,01±3,10	1,65±0,07	0,128±0,005	0,560±0,020
6.	«Весенний», почва без ДЭРБ	91,99±3,41	2,83±0,10	0,150±0,007	0,188±0,001
7.	«Весенний», почва с ДЭРБ	92,00±3,63	3,48±0,13	0,184±0,009	0,810±0,040
8.	«Пикант», гидропоника без ДЭРБ	90,09±1,48	0,83±0,04	0,053±0,003	0,192±0,007
9.	«Пикант», гидропоника с ДЭРБ	89,99±1,52	0,78±0,03	0,071±0,004	0,118±0,001
10.	«Пикант», почва без ДЭРБ	92,01±1,75	4,10±0,15	0,159±0,008	0,350±0,010
11.	«Пикант», почва с ДЭРБ	91,99±2,44	5,84±0,20	0,400±0,020	0,680±0,030
12.	«Пучковый», почва без ДЭРБ	92,02±1,13	5,32±0,20	0,141±0,007	0,440±0,020
13.	«Пучковый», гидропоника без ДЭРБ	90,35±1,19	0,47±0,01	0,056±0,001	0,958±0,029
14.	«Пучковый», гидропоника с ДЭРБ	92,88±1,23	0,172±0,002	0,053±0,001	0,777±0,020
15.	«Ванька кучерявый», почва без ДЭРБ	92,05±1,64	2,56±0,12	0,054±0,003	0,240±0,010
16.	«Ванька кучерявый», гидропоника без ДЭРБ	88,72±2,52	3,54±0,13	0,128±0,005	0,941±0,028
17.	«Ванька кучерявый», гидропоника с ДЭРБ	88,35±2,12	1,71±0,02	0,052±0,002	0,904±0,023
18.	«Данский», гидропоника без ДЭРБ	91,56±3,13	0,39±0,01	0,039±0,001	0,302±0,012
19.	«Данский», гидропоника с ДЭРБ	91,09±2,63	0,37±0,01	0,044±0,001	0,234±0,011
20.	«Ореховый», гидропоника без ДЭРБ	91,31±3,93	0,191±0,008	0,036±0,001	0,284±0,013
21.	«Ореховый», гидропоника с ДЭРБ	90,16±3,43	0,169±0,005	0,037±0,001	0,253±0,012
22.	«Ажур», гидропоника с ДЭРБ	92,03±2,53	1,55±0,01	0,049±0,002	0,117±0,005

Содержание дубильных веществ в образцах, выращенных на почве, выше практически в 2 раза, по сравнению с образцами, выращенными на гидропонике. Также предпосевная обработка оказала эффект на накопление дубильных веществ: на почве накопление выше в обработанных образцах, например, для сорта «Весенний» 2,83% без ДЭРБ и 3,48% с ДЭРБ, а для сорта «Пикант» - 4,10% и 5,84%, соответственно, а на гидропонике эффект обратный, но фитомасса после обработки значительно больше. Кроме того, накопление дубильных веществ зависело от

сортовых особенностей, не всем сортам подошли условия выращивания на гидропонике (рисунки 58, 59).

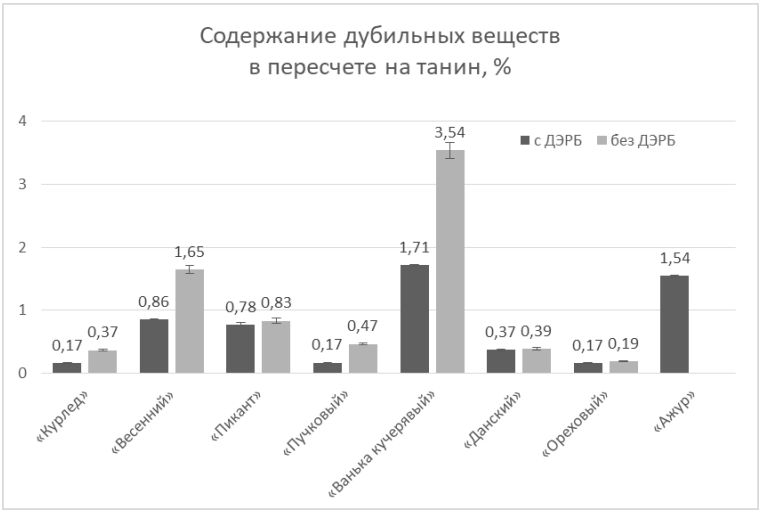


Рисунок 58 – Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в траве кресс-салата, выращенной на гидропонике

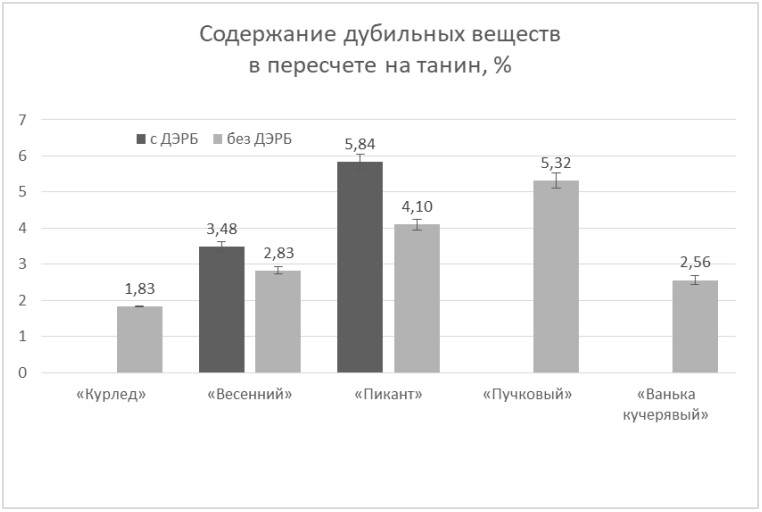


Рисунок 59 – Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в траве кресс-салата, выращенной на почве

Содержание аскорбиновой кислоты в образцах, выращенных на гидропонике, было ниже, чем в образцах, выращенных на почве. В целом, в условиях эксперимента траве кресс-салата не удалось накопить значительного количества аскорбиновой кислоты, сопоставимого с литературными данными (0,0471 % в свежей траве), ближайшее значение было у кресс-салата сорта

«Пикант» при культивировании на почве с предпосевной обработкой ДЭРБ, и это максимальное значение – 0,40% в высушенном сырье. В остальных сортах аскорбиновая кислота обнаружена в небольших количествах (рисунки 60, 61).

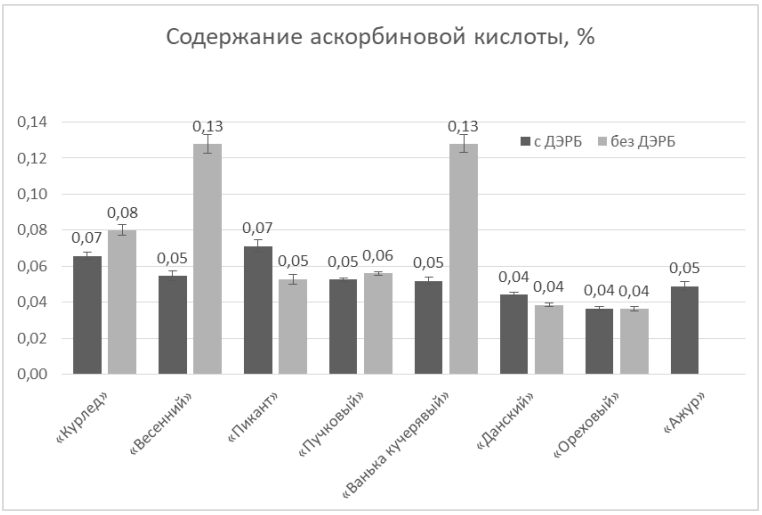


Рисунок 60 – Содержание аскорбиновой кислоты в траве кресс-салата, выращенной на гидропонике

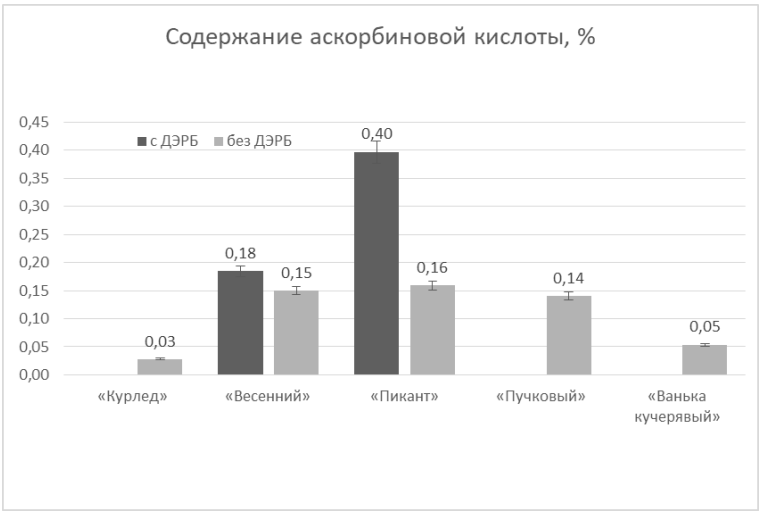


Рисунок 61 – Содержание аскорбиновой кислоты в траве кресс-салата, выращенной на почве

Содержание суммы флавоноидов в большинстве образцов не велико и составляет менее 0,5%, кроме сортов «Курлед», «Весенний», «Пучковый» и «Ванька кучерявый» выращенных на гидропонике, сортов «Весенний» и «Пикант» выращенных на почве с обработкой ДЭРБ. При культивировании на гидропонике

количество флавоноидов выше у образцов без обработки ДЭРБ, при обработке флавоноидов накапливается меньше, вероятно потому, что растение очень быстро увеличивается в размерах (рисунки 62, 63).

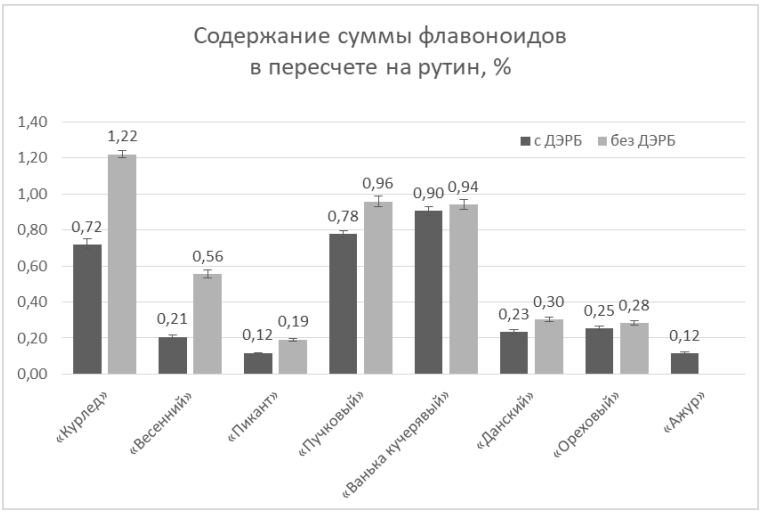


Рисунок 62 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве кресс-салата, выращенной на гидропонике

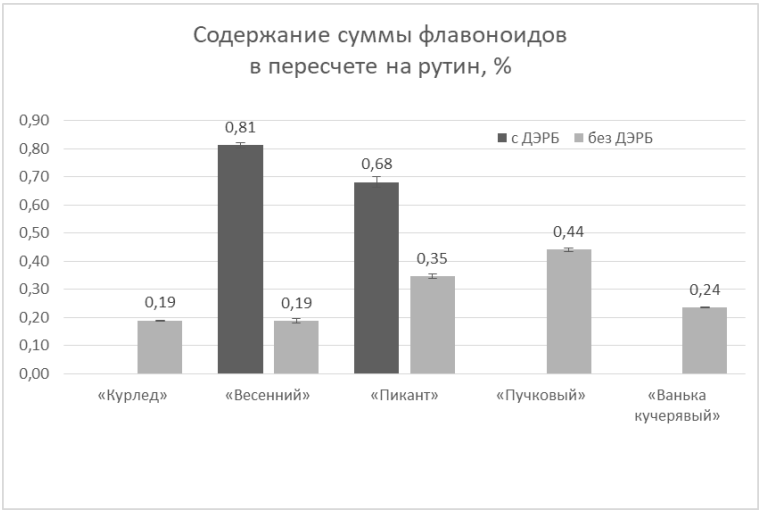


Рисунок 63 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве кресс-салата, выращенной на почве

Показано, что экстракт листьев рейнутрии богемской оказывает стимулирующее действие на модельное растение. Предпосевная обработка семян кресс-салата экстрактом улучшала развитие проростков и увеличивала накопление фитомассы, особенно выраженный положительный эффект отмечен при

выращивании на гидропонике. Также установлено, что под действием экстракта в ряде вариантов при культивировании на почве возрастало накопление БАВ, прежде всего дубильных веществ, аскорбиновой кислоты и флавоноидов. Таким образом, экстракт рейнутрии богемской можно рассматривать как перспективный растительный стимулятор [81].

6.2. Получение серебряных наночастиц с использованием водного извлечения листьев рейнутрии богемской

Актуален поиск экологичных и экономичных способов получения серебряных наночастиц с биологической активностью. В этом отношении большой интерес представляет «зеленый» синтез с использованием растительных экстрактов. Ранее было продемонстрировано получение НЧAg с использованием экстракта корневищ рейнутрии японской [82]. Рейнутрия богемская, богатая БАВ и широко распространенная, может служить перспективным источником восстановителей и стабилизаторов при синтезе НЧAg. Приготовление извлечения из листьев рейнутрии по сравнению с корневищем проще и оправдано с технологической и экономической точек зрения.

Получение НЧAg. Образование НЧAg определялось по изменению цвета реакционной смеси на темно-коричневый и подтверждалось методами УФ-видимой спектроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии и электронной дифракции. В отличие от раствора $AgNO_3$, спектр поглощения НЧ серебра содержит интенсивную широкую полосу поверхностного плазмонного резонанса в видимой области [83]. После охлаждения реакционной смеси до 25°C и дальнейшей инкубации в темноте, процесс образования НЧAg из $AgNO_3$ контролировали путем периодической (6, 24, 48 и 72 ч) регистрации спектров оптического поглощения в диапазоне длин волн 300-550 нм. В процессе инкубации в образцах наблюдалось последовательное увеличение интенсивности оптического поглощения с максимумом при 420 нм, что свидетельствует об образовании НЧAg (рисунок 64).

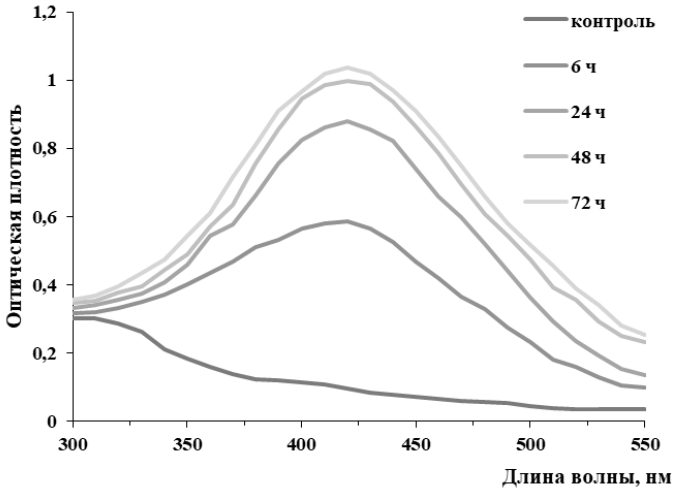


Рисунок 64 – Оптическая спектроскопия образцов НЧAg, полученных восстановлением из раствора $AgNO_3$ с использованием водного извлечения рейнутрии богемской. Образцы отбирали через 6, 24, 48 и 72 ч после начала инкубации. Контроль - водное извлечение листьев рейнутрии богемской без добавления $AgNO_3$

После 48 ч инкубации интенсивность оптического поглощения реакционной смеси медленно увеличивалась, а через 72 ч дальнейшего изменения интенсивности поглощения золя серебра в диапазоне 300-550 нм не наблюдалось, что указывает на завершение процесса образованием НЧAg (рисунок 65).

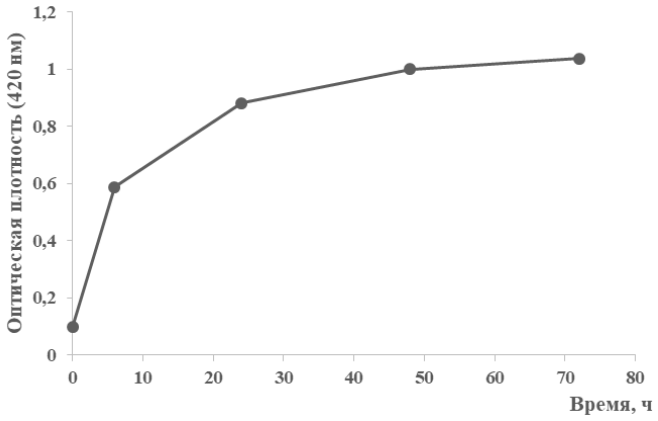


Рисунок 65 – Динамика созревания НЧAg в реакционной смеси, содержащей водное извлечение листьев рейнутрии богемской и $AgNO_3$. Показана зависимость оптической плотности при длине волны 420 нм от времени реакции

Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии, золь серебра, полученный восстановлением Ag^+ до Ag^0 с использованием фитоэкстракта,

содержал НЧAg округлой формы со средним расчетным диаметром 13,49±3,89 нм. Картина электронной дифракции имеет форму колец, соответствующих нанокристаллической фазе (рисунки 66, 67).

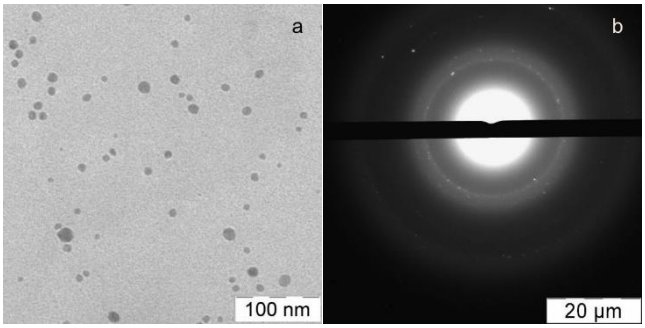


Рисунок 66 – Микрофотография (a) и электронная дифрактограмма (b) образца золя НЧAg, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии

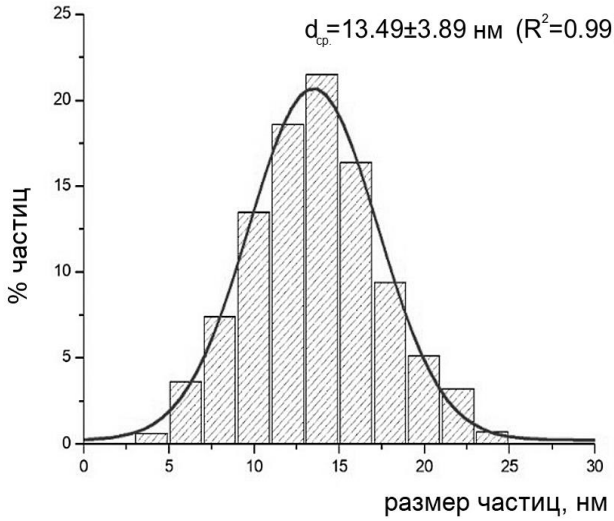


Рисунок 67 – Распределение НЧAg по размерам, полученное путем анализа микрофотографий с использованием программы UTHSCSA Image Tool 3.00

Изучение влияния НЧAg на энергию прорастания и всхожесть семян *L. sativum*. В контрольной группе энергия прорастания семян кресс-салата на третьи сутки составляла 78,3±0,6%. В опытных группах данный показатель различался в зависимости от концентрации НЧAg. Не обнаружено увеличивающего энергию прорастания эффекта при воздействии золя с низкой концентрацией аргентума (2,8 мкг/мл). Увеличение концентрации аргентума в 2 и 4 раза привело к заметному

увеличению энергии прорастания, особенно при концентрации 5,6 мкг/мл - 96,3±1,5%, что на 18% выше контроля. В случае же дальнейшего увеличения концентрации аргентума до 45, 90 и 180 мкг/мл, соответственно, обнаружено уже последовательное увеличение угнетения прорастания, что согласуется с данными литературы на других объектах исследования (рисунок 68) [76].

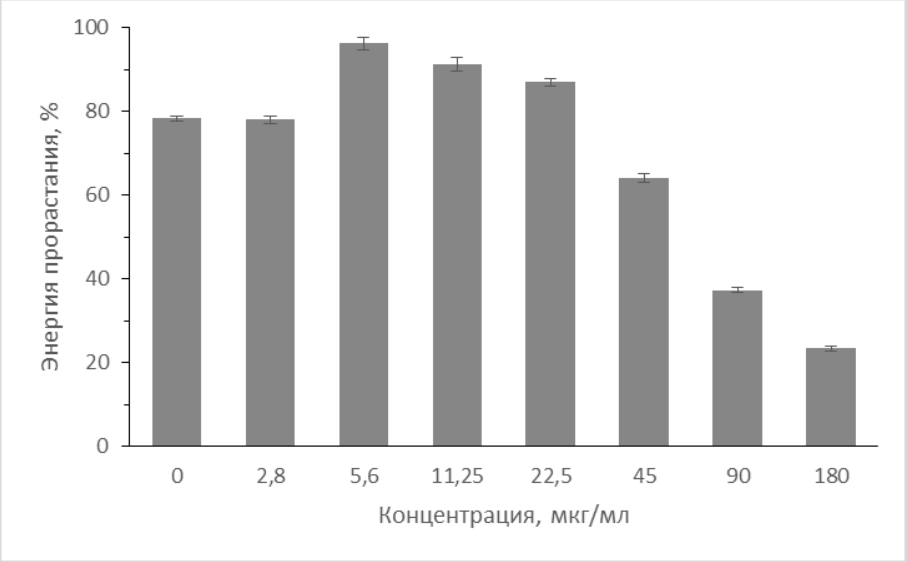


Рисунок 68 – Энергия прорастания семян кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта Curled, обработанных золями НЧСР (n = 10, M±SD)

На 5 сутки проращивания проводили изучение всхожести *Lepidium sativum* L. Не обнаружено влияния на всхожесть при воздействии золя с низкой концентрацией аргентума (2,8 мкг/мл). Увеличение концентрации аргентума в 2 и 4 раза также привело к заметному увеличению всхожести: на 15,3 и 12,3% соответственно. Концентрация аргентума 22,5 мкг/мл влияния не оказала. Дальнейшее повышение концентрации серебра приводило к последовательному снижению всхожести, причем при высоких концентрациях ее уровень был значительно ниже, чем в контроле (рисунок 69).

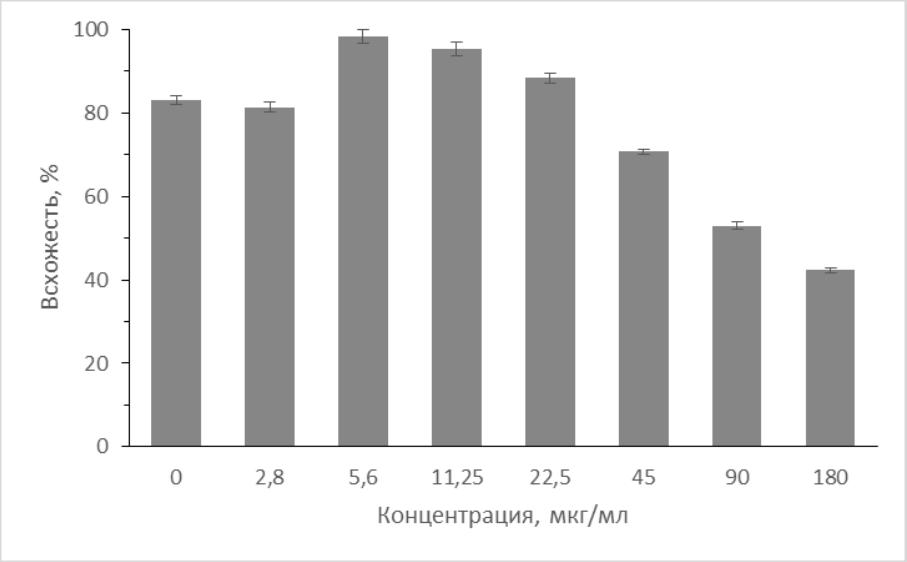


Рисунок 69 – Всхожесть кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта Curled, обработанных золями наночастиц с различными концентрациями серебра (n = 10, M±SD)

Образование гипокотиля и корня проростков кресс-салата изучено при воздействии НЧСР. Исследование проыводилось на 7 сутки. Установлено, что при увеличении концентрации НЧСР развитие гипокотиля замедлялось. Так, при концентрации 22,5 мкг/мл длина гипокотиля была меньше контроля на 21,6%. А на формирование корня, наоборот, было установлено стимулирующее, дозозависимое действие в концентрациях серебра от 5,6 до 22,5 мкг/мл, увеличение по сравнению с контролем, особенно при концентрации 11,25 мкг/мл (на 13,4%, 61,2% и 32,8%). Таким образом при данных концентрациях установлено противоположное воздействие на формирование гипокотиля и корня. При дальнейшем повышении концентрации Ag (45, 90 и 180 мкг/мл) ингибирующее действие увеличивалось, при этом замедлялся рост как гипокотиля, так и корня (рисунок 70).

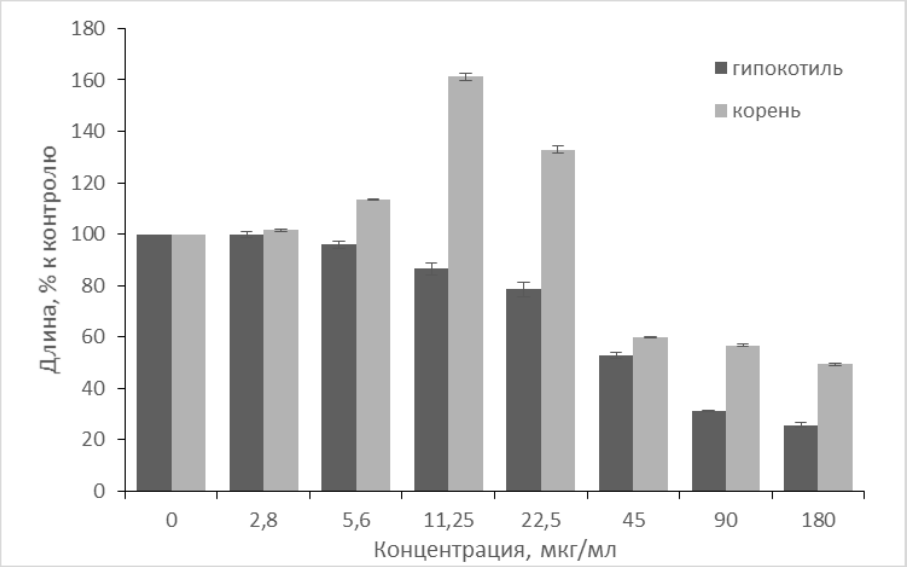


Рисунок 70 – Длина гипокотиля и главного корня у проростков кресс-салата (Lepidium sativum L.) сорта Курлед, обработанных золями наночастиц с различными концентрациями серебра (n = 10, M±SD)

Обработка семян извлечением из рейнутрии и его разведениями в 2, 4, 6, 12 и 24 раза. Исходное извлечение рейнутрии обладал стимулирующим эффектом как на энергию прорастания (7,3%), так и на всхожесть семян (4,6%). При обработке разбавленным в 2 и 4 раза извлечением энергия прорастания и всхожесть увеличились незначительно. При разбавлении извлечения в 6 раз, что соответствует содержанию извлечения в образце наночастиц с концентрацией 180 мкг/мл, влияния на исследуемые показатели не наблюдалось, как и в случае больших разведений в 12 и 24 раза (рисунок 71).

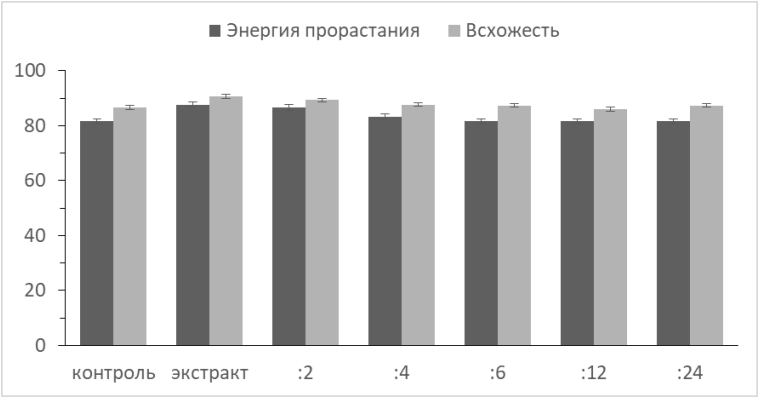


Рисунок 71 – Энергия прорастания и всхожесть семян кресс-салата (Lepidium sativum L.) сорта Курлед, обработанных водным извлечением и его разведениями (n = 10, M±SD)

На седьмые сутки проращивания проводилось измерение длины гипокотиля и корня проростков. Воздействие извлечения на длину гипокотиля было незначительным, различия между опытным и контрольным вариантами не превышали 5%. На размеры корня напротив обработка оказала сильное влияние: в экспериментах с извлечением и разбавлением в 2 раза наблюдается увеличение длинны корня более чем на 50%, с разбавлением в 4 раза увеличение на 29,4% по сравнению с контролем (рисунок 72).

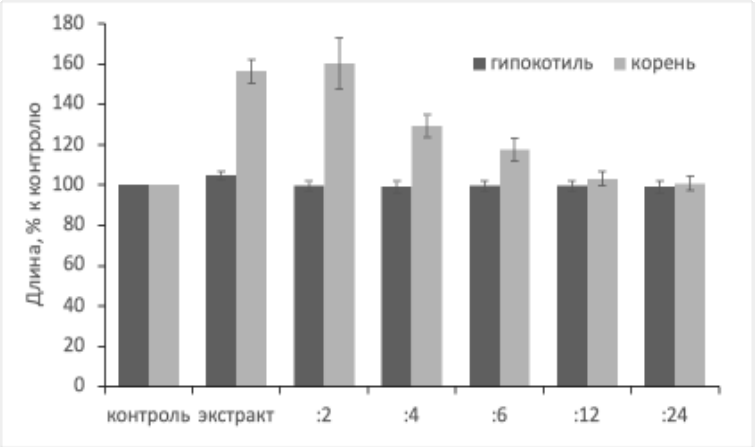


Рисунок 72 – Длина гипокотиля и главного корня у проростков кресс-салата (Lepidium sativum L.) сорта Курлед, обработанных водным извлечением и его разведениями (n = 10, M±SD)

Показано, что с использованием водного извлечения рейнутрии богемской методом «зеленого» синтеза были получены преимущественно сферические наночастицы серебра среднего диаметра 13,5 нм. Наночастицы проявляли дозозависимый биологический эффект. Максимальный стимулирующий эффект по энергии прорастания и схожести наблюдали при концентрации серебра 5,6 мкг/мл, а наиболее выраженное стимулирование роста корня – при 11,25 мкг/мл. В высоких концентрациях (45; 90 и 180 мкг/мл) действие было угнетающее. Само извлечение рейнутрии также оказывало положительное влияние на прорастание и рост, особенно на развитие корней. Полученные данные подтверждают перспективность использования водного извлечения рейнутрии богемской для «зеленого» синтеза наночастиц серебра и их возможного применения в растениеводстве.

Выводы к главе 6

1. Установлено, что экстракт листьев рейнутрии богемской оказывает выраженное стимулирующее влияние на рост модельного растения - кресс-салата. Показано, что предпосевная обработка семян ДЭРБ способствует увеличению накопления фитомассы, причем наиболее выраженный положительный эффект наблюдался при выращивании на гидропонике. Установлено, что применение ДЭРБ в ряде вариантов сопровождается повышением содержания БАВ, в том числе дубильных веществ, аскорбиновой кислоты и флавоноидов. Полученные данные свидетельствуют о наличии у экстракта рейнутрии богемской стимулирующих свойств и позволяют рассматривать данное растение как перспективный источник БАВ для разработки препаратов природного происхождения, предназначенных для стимуляции роста растений.

2. С использованием экстракта листьев рейнутрии богемской, методом «зеленого синтеза» получены и охарактеризованы НЧAg. По данным трансмиссионной электронной микроскопии, золь серебра, полученный восстановлением Ag+ до Ag0 с использованием фитоэкстракта, содержал НЧAg округлой формы со средним диаметром 13,49±3,89 нм.

3. Изучено влияния НЧСР на энергию прорастания и всхожесть семян, а также на рост корня и гипокотиля *L. sativum*. Наночастицы проявляли дозозависимый биологический эффект. Максимальный стимулирующий эффект по энергии прорастания и схожести наблюдали при концентрации серебра 5,6 мкг/мл, а наиболее выраженное стимулирование роста корня – при 11,25 мкг/мл. В высоких концентрациях (45; 90 и 180 мкг/мл) действие было угнетающее. Само извлечение рейнутрии также оказывало положительное влияние на прорастание и рост, особенно на развитие корней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате комплексного фармакогностического и биотехнологического исследования получены сведения о новом виде лекарственного растительного сырья – рейнутрии богемской листья. Установлен состав БАВ и разработаны показатели качества сырья. Доказана возможность получения каллусной культуры in vitro на основе рейнутрии богемской листьев.

Показано, что полученная каллусная ткань обладает способносью накапливать ресвератрол и полидатин, что делает каллусы потенциальным источником целевых БАВ из группы стильбенов и подтверждает возможность использования каллусной ткани при получении фитопрепаратов с контролируемым уровнем БАВ и сниженным риском загрязнения тяжёлыми металлами.

ВЫВОДЫ

1. Анализ научной литературы показал, что рейнутрия богемская является межвидовым гибридом рейнутрии японской и рейнутрии сахалинской (*R. japonica* × R. Sachalinensis), профиль БАВ которых хорошо изучен. Рейнутрия богемская менее изученный вид, но предполагается сходство фитохимического профиля с родительскими видами. Рейнутрия богемская рассматривается как потенциальный источник фитопрепаратов для терапии заболеваний, связанных с оксидативным стрессом. Также актуально получение каллусных культур растений рода рейнутрия и исследования их химического состава, поскольку это потенциально всесезонный источник БАВ постоянного стандартизованного состава.

2. Проведено морфолого-анатомическое изучение цельных и измельченных рейнутрии богемской листьев. Выделены морфолого-диагностические признаки: листья плотные (кожистые), простые, голые с верхней строны и колючеопушенные по жилкам снизу, форма овоидная или широкоэллипсоидальная, край цельный, верхушка острая, основание листа или постепенно суженное к черешку (редко), широкотреугольное, иногда прямое (усеченное), изредка округлоклиновидное, верхняя сторона листьев зеленая, а нижняя – светлее, невыраженный запах, слегка горьковатый вкус; и анатомические особенности: аномоцитный устичный комплекс, четырехклеточные и восьмиклеточные железки, папиллозные волоски по крупным жилкам. По результатам фитохимического скрининга на основные группы БАВ в листьях обнаружены дубильные вещества, флавоноиды, полисахариды, сапонины, аминокислоты. Методом тонкослойной хроматографии подтверждено наличие рутина, полидатина, галловой кислоты, кверцетина, антраценпроизводных. Методом UPLC/MS обнаружены фенольные соединения: производные гидроксикоричных кислот, флавонолы, флавоны, флаван-3-олы, процианидины и стильбеновые гликозиды.

3. Количественно определено содержание экстрактивных веществ (16,84 - 28,58 %), дубильных веществ в пересчете на танин (3,75 - 10,28 %), суммы

флавоноидов в пересчете на рутин (0,81 – 1,80 %), полисахаридов (2,78 – 5,55%) аскорбиновой кислоты и витаминов группы В (В1, В2, В6), а также 12 аминокислот, суммарно 9,84%, из них незаменимых – 5,96%.

Определены товароведческие показатели в рейнутрии богемской листьях и предложены их нормативы: влажность - не более 10,0 %, зольность - не более 11,0 %, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте - не более 0,5 % измельченность (цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 2 %; измельчённое сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %; порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %), допустимые примеси (сырьё, изменившее окраску - не более 5 %, другие части растения - не более 5 %, органическая примесь - не более 0,5 %, минеральная примесь - не более 0,5 %.), содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой - не менее 15%, дубильных веществ в пересчете на танин не менее 3%, суммы флавоноидов в пересчёте на рутин не менее 1,0%, полидатина не менее 0,1%. Показано, что показатели качества листьев рейнутрии богемской существенно зависят от сезона заготовки и региона произрастания, что учтено при нормировании данных показателей в разделе «Испытания» проект ФС на сырье.

4. Разработана технология получения биомассы каллусных клеток рейнутрии богемской на агаризованной и жидкой средах. Каллусная ткань представлена преимущественно небольшими округлыми или слегка вытянутыми клетками среднего размера (~76,5 мкм), что соответствует морфологии активно делящихся недифференцированных клеток. Показано что каллусная ткань рейнутрии богемской способна синтезировать и накапливать стильбены: в 1 г высушенного каллуса обнаружено 16,35 мкг ресвератрола и 50,24 мкг полидатина. Полученные значения подтверждают сохранение способности к биосинтезу характерных для исходного растения фенольных метаболитов при культивировании in vitro, что делает каллусы потенциальным источником целевых БАВ стильбеновой природы.

5. Изучено стимулирующее влияние экстракта рейнутрии богемской листьев на рост модельного растения - кресс-салата (Lepidium sativum L.) различных сортов. Выявлено: ДЭРБ увеличивает фитомассу и накопление дубильных веществ, аскорбиновой кислоты и флавоноидов.

6. Установлено, что водное извлечение из листьев рейнутрии богемской может рассматриваться как перспективный растительный компонент для осуществления «зеленого» синтеза НЧAg, выполняющий функции восстановителя и стабилизатора. По данным трансмиссионной электронной микроскопии, полученный золь серебра содержал НЧСР округлой формы со средним диаметром 13,49±3,89 нм. Наночастицы проявляли дозозависимый биологический эффект на культуру кресс-салата. Максимальный стимулирующий эффект по энергии прорастания и схожести наблюдали при концентрации серебра 5,6 мкг/мл, а наиболее выраженное стимулирование роста корня – при 11,25 мкг/мл. В высоких концентрациях (45; 90 и 180 мкг/мл) действие было угнетающее. Само извлечение рейнутрии также оказывало положительное влияние на прорастание и рост, особенно на развитие корней.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Проведенное исследование расширяет представление о растениях рода Reynoutria и новом виде ЛРС – рейнутрии богемской листьях. Результаты данной диссертационной работы, включающие разработку характеристик подлинности и доброкачественности рейнутрии богемской листьев, а также качественный анализ и количественное содержание комплекса БАВ могут быть использованы в научно-практической работе исследовательских лабораторий и стать базой для создания новых ЛСРП. По итогам данного исследования подготовлен проект фармакопейной статьи «Рейнутрии богемской листья – *Reynoutria* × *bohemica folia*», обоснована инструкция заготовки и сушки сырья. Заложен фундамент для использования каллусов рейнутрии как всесезонного источника БАВ постоянного стандартизованного состава. Данные по стимулирующему влиянию экстракта листьев рейнутрии на рост растений важны для АПК.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Данные настоящей диссертационной работы являются фундаментом для конструирования оптимальной лекарственной формы на основе рейнутрии богемской листьев, целенаправленного изучения ее фармакологической активности, расширения аналитического профиля за счет разработки методик количественного анализа БАВ, не затронутых в рамках настоящей работы.

Дальнейшие биотехнологические исследования предполагают масштабирование каллусной культуры рейнутрии богемской с оптимизацией условий культивирования для повышения выхода стильбенов (полидатина, ресвератрола). Установленный стимулирующий эффект ДЭРБ на рост растений открывает перспективу создания на его основе природных биостимуляторов роста для лекарственного растениеводства. Разработанный способ «зеленого» синтеза НЧAg с использованием водного извлечения листьев рейнутрии является экологичной альтернативой химическим методам, а их дозозависимая фитостимулирующая и потенциальная антимикробная активность позволяет в перспективе создавать экологически безопасные бионанопрепараты двойного действия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2,4-Д	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
АЭС-ИСП	атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
БАВ	биологически активные вещества
ВЭЖХ/HPLC	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ	Государственная фармакопея
ДФПГ	2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
ДЭРБ	дезалкоголизированный водный раствор спиртового экстракта рейнутрии богемской
КТ	кинетин
КЭ	капиллярный электрофорез
НЧAg	наночастицы серебра
НЧСР	наночастицы серебра полученные с использованием водного извлечния листьев рейнутрии богемской
ОФС	общая фармакопейная статья
СО	стандартный образец
СФМ	спектрофотометрический метод анализа
ТСХ	хроматография в тонких слоях сорбента
УФ	излучение ультрафиолетового диапазона
ФС	фармакопейная статья
ЭТААС	атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией
IC_{50}	это концентрация образца, при которой нейтрализуется 50% ДФПГ-радикалов
MS	среда Мурасиге-Скуга
RSD	относительное стандартное отклонение
SDS-PAGE	Электрофоретическое разделение белков в геле полиакриламида с добавлением додецилсульфата натрия

UPLC	ультраэффективная жидкостная хроматография
UPLC/MS	ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Houttuyn, M. Reynoutria. Natuurlijke historie of uitvoerige beschrijving der dieren, planten en mineraalen, volgens het Samenstel van den Heer Linnaeus / M. Houttuyn. – Amsterdam: F. Houttuyn, 1777. – 640 p.

2. Зубкевич, Г. И. Классификация высших растений : методические указания по ботанике / Г. И. Зубкевич, Т. А. Сауткина, В. В. Черник. – Минск : БГУ, 2002. – 34 с.

3. Li, A. R. Flora of China: Reynoutria Houttuyn / A. R. Li, C. W. Park. – St. Louis : Missouri Botanical Garden Press, 2011. – Vol. 5. – P. 319.

4. Щёголева, Н. В. Полевой практикум по ботанике / Н. В. Щёголева, А. С. Ревушкин, А. Л. Эбель. – Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. – 100 с.

5. Reynoutria japonica Houtt. : страница таксона // Плантариум : открытый онлайн-атлас-определитель растений. – URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/31625.html (дата обращения: 01.05.2023).

6. Medicinal Properties and Molecular Mechanisms of Thai Traditional Herbs / edited by J. M. Brimson, T. Tencomnao, C. Isidoro. – Boca Raton : CRC Press, 2025. – 208 p.

7. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc.: A review / W. Peng, R. Qin, X. Li, H. Zhou // Journal of Ethnopharmacology. – 2013. – Vol. 148. – № 3. – P. 729–745.

8. Vinogradova, Yu. K. Taxonomic Characteristics of Vegetative Organs for Invasive Species of Reynoutria Hook. / Yu. K. Vinogradova, A. G. Kuklina, A. S. Ryabchenko // Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality. – 2021. – Vol. 5. – № 1. – P. 160–168.

9. Buhk, C. Hybridisation boosts the invasion of an alien species complex: Insights into future invasiveness / C. Buhk, A. Thielsch // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2015. – Vol. 17. – № 4. – P. 274–283.

10. Виноградова, Ю.К. Черная книга флоры Средней России: чужеродные виды растений в экосистемах средней России / Ю. К. Виноградова, С. Р. Майоров, Л. В. Хорун. – Москва : ГЕОС, 2010. – 512 с.

11. The biology of invasive alien plants in Canada. 5. Polygonum cuspidatum Sieb. & Zucc. [= Fallopia japonica (Houtt.) Ronse Decr.] / J. N. Barney, N. Tharayil, A. DiTommaso, P. C. Bhowmik // Canadian Journal of Plant Science. – 2006. – Vol. 86. – № 3. – P. 887–906.

12. Beerling, D. J. Fallopia japonica (Houtt.) Ronse Decraene / D. J. Beerling, J. P. Bailey, A. P. Conolly // Journal of Ecology. – 1994. – Vol. 82 – № 4. – P. 959–979.

13. Fallopia : plant crib // Botanical Society of Britain & Ireland : official website. – URL: https://bsbi.org/learn/resources/plant-crib/fallopia?colourMode=auto (дата обращения: 01.05.2023).

14. Variation of growth and functional traits of invasive knotweeds (Fallopia spp.) in Belgium / B. Herpigny, N. Dassonville, P. Ghysels [et al.] // Plant Ecology. – 2012. – Vol. 213. – № 3. – P. 419–430.

15. Зорикова, С. П. Рейнутрия японская (Reynoutria japonica Houtt.) в Приморском крае (биология развития, флавоноидный состав, биологическая активность) : специальность 03.02.14 «Биологические ресурсы» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Зорикова Светлана Петровна ; Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук. – Владивосток, 2011. – 135 с.

16. Integrative morphological, phytochemical, and molecular identification of three invasive and medicinal Reynoutria species / M. Stafiniak, M. Bielecka, K. Kujawa [et al.] // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 6001.

17. Зорикова, С. П. Интродукция рейнутрии японской (Reynoutria japonica Houtt.) в условиях юга Приморского края / С. П. Зорикова, О. Г. Зорикова // Биологические исследования на ГТС : сборник научных трудов. – 2011. – № 12. – С. 152–161.

18. Адвентивная флора Москвы и Московской области / С. Р. Майоров, В. Д. Бочкин, Ю. А. Насимович, А. В. Щербаков ; науч. ред. М. С. Игнатов. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, 2012. – 412 с.

19. Barney, J. N. North American History of Two Invasive Plant Species: Phytogeographic Distribution, Dispersal Vectors, and Multiple Introductions / J. N. Barney // Biological Invasions. – 2006. – Vol. 8. – № 4. – P. 703–717.

20. Hollingsworth, M. L. Evidence for massive clonal growth in the invasive weed Fallopia japonica (Japanese Knotweed) / M. L. Hollingsworth, J. P. Bailey // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2000. – Vol. 133. – № 4. – P. 463–472.

21. The Invasive Species Reynoutria japonica Houtt. as a Promising Natural Agent for Cardiovascular and Digestive System Illness / S. Liu, R. Zhang, X. Zhang [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – P. 863707.

22. A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Reynoutria genus / Z.-L. Zhang, Y. Li, G. Wu [et al.] // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2022. – Vol. 74. – № 12. – P. 1718–1742.

23. Zhong yao da ci dian [Большой словарь китайской медицины]. – Shanghai : Shanghai Renmin Chubanshe, 1977. – 2754 с.

24. Pharmacopoeia of the People’s Republic of China. – Beijing : China Medical Science Press, 2020. – Vol. 1. – P. 208–209.

25. Зорикова, С. П. Изучение рейнутрии японской (Reynoutria japonica) на объектах животного и растительного происхождения / С. П. Зорикова, О. Г. Зорикова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13. – № 1-4. – С. 831–834.

26. Зорикова, С. П. Динамика роста и накопления флавоноидов в листьях рейнутрии японской / С. П. Зорикова, Л. И. Моисеенко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – № 2 (52). – С. 55–56.

27. Seasonal dynamics of polysaccharid content in raw materials Reynoutria japonica / O. G. Zorikova, A. Yu. Manyakhin, S. A. Borovaya, S. P. Railko // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – P. 33–39.

28. Vrchotová, N. HPLC and CE analysis of catechins, stilbens and quercetin in flowers and stems of Polygonum cuspidatum, P. sachalinense and P. × bohemicum / N. Vrchotová, B. Šerá, E. Dadáková // Journal of the Indian Chemical Society. – 2010. – Vol. 87. – № 10. – P. 1267–1272.

29. Chemical variability of the invasive neophytes Polygonum cuspidatum Sieb. and Zucc. and Polygonum sachalinensis F. Schmidt ex Maxim / P. Fan, A.-E. Hay, A. Marston [et al.] // Biochemical Systematics and Ecology. – 2009. – Vol. 37. – № 1. – P. 24–34.

30. Invasive plant Reynoutria japonica produces large amounts of phenolic compounds and reduces the biomass but not activity of soil microbial communities / A. M. Stefanowicz, P. Kapusta, M. Stanek [et al.] // Science of the Total Environment. – 2021. – Vol. 767. – P. 145439.

31. Analysis of Phenolic Compounds of Reynoutria sachalinensis and Reynoutria japonica Growing in the Russian Far East / A. R. Suprun, K. V. Kiselev, O. A. Aleynova [et al.] // Plants. – 2024. – Vol. 13. – № 23. – P. 3330.

32. Vrchotová, N. The stilbene and catechin content of the spring sprouts of Reynoutria species / N. Vrchotová, B. Šerá, J. Tříska // Acta Chromatographica. – 2007. – Vol. 19. – P. 21–28.

33. Isolation and Determination of Phenolic Glycosides and Anthraquinones from Rhizomes of Various Reynoutria Species / I. Nawrot-Hadzik, S. Granica, K. Domaradzki [et al.] // Planta Medica. – 2018. – Vol. 84. – № 15. – P. 1118–1126

34. Phytochemical Diversity in Rhizomes of Three Reynoutria Species and their Antioxidant Activity Correlations Elucidated by LC-ESI-MS/MS Analysis / I. Nawrot-Hadzik, S. Ślusarczyk, S. Granica [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – № 6. – P. 1136.

35. Identification of B-type procyanidins in Fallopia spp. involved in biological denitrification inhibition / C. Bardon, F. Piola, F. Z. Haichar [et al.] // Environmental Microbiology. – 2016. – Vol. 18. – № 2. – P. 644–655.

36. Evidence for biological denitrification inhibition (BDI) by plant secondary metabolites / C. Bardon, F. Piola, F. Bellvert [et al.] // New Phytologist. – 2014. – Vol. 204. – № 3. – P. 620–630.

37. Fan, P. Allelochemicals of the invasive neophyte Polygonum cuspidatum Sieb. & Zucc. (Polygonaceae) / P. Fan, K. Hostettmann, H. Lou // Chemoecology. – 2010. – Vol. 20. – № 3. – P. 223–227.

38. Yi, T. Analysis of Rhizoma Polygoni Cuspidati by HPLC and HPLC-ESI/MS / T. Yi, H. Zhang, Z. Cai // Phytochemical Analysis. – 2007. – Vol. 18. – № 5. – P. 387–392.

39. Preliminary Identification and Quantification of Individual Polyphenols in Fallopia japonica Plants and Honey and Their Influence on Antimicrobial and Antibiofilm Activities / A.-A. Cucu, A. C. Urcan, O. Bobiș [et al.] // Plants. – 2024. – Vol. 13. – № 13. – P. 1883.

40. Lachowicz, S. Profile of bioactive compounds in the morphological parts of wild Fallopia japonica (Houtt.) and Fallopia sachalinensis (F. Schmidt) and their antioxidative activity / S. Lachowicz, J. Oszmianski // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – № 7. – P. 1436.

41. Multiomics analyses of Reynoutria japonica unveil genomic landscape and biosynthesis of emodin anthraquinone in Polygonaceae / L. Chen, L. Sen, A. Deng [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2025. – Vol. 236. – P. 122097.

42. Olszowy-Tomczyk, M. A Comparative Evaluation of the Antioxidant Ability of Polygonum cuspidatum Extracts with That of Resveratrol Itself / M. Olszowy-Tomczyk, D. Wianowska // Processes. – 2024. – Vol. 13. – № 1. – P. 9.

43. Neuroprotective compounds from Reynoutria sachalinensis / M. R. Eom, J. B. Weon, Y. S. Jung [et al.] // Archives of Pharmacal Research. – 2017. – Vol. 40. – № 6. – P. 704–712.

44. Antioxidant Activity of Anthraquinones and Flavonoids from Flower of Reynoutria sachalinensis / X. Zhang, P. T. Thuong, W. Jin [et al.] // Archives of Pharmacal Research. – 2005. – Vol. 28. – № 1. – P. 22–27.

45. Куклина, А. Г. Биологически активные метаболиты в растительном сырье Reynoutria sachalinensis (F. Schmidt) Nakai и R. × bohemica Chrtek & Chrtkova (Polygonaceae) / А. Г. Куклина, Н. С. Цыбулько // Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства : материалы II Международной научной конференции. – 2019. – С. 118–122.

46. Agitated and temporary immersion bioreactor cultures of Reynoutria japonica Houtt. as a rich source of phenolic compounds / W. Makowski, A. Królicka, J. Sroka [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2024. – Vol. 158. – № 3. – P. 45.

47. Reynoutria japonica Houtt. Transformed Hairy Root Cultures as an Effective Platform for Producing Phenolic Compounds with Strong Bactericidal Properties / W. Makowski, A. Królicka, K. Hinc [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – № 1. – P. 362.

48. Иванов, В. В. Фармакогностическое изучение травы горца сахалинского (рейнутрии) : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Иванов Владимир Владимирович ; Волгоградский государственный медицинский университет. – Пятигорск, 2016. – 160 с.

49. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток / Е. Е. Дубинина. – Санкт-Петербург : Медицинская пресса, 2006. – 396 с.

50. Буеверов, А. О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени / А. О. Буеверов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2002. – № 4. – С. 21–25.

51. Romero, J. C. Role of Angiotensin and Oxidative Stress in Essential Hypertension / J. C. Romero, J. F. Reckelhoff // Hypertension. – 1999. – Vol. 34. – № 4. – P. 943–949.

52. Superoxide Excess in Hypertension and Aging / C. A. Hamilton, M. J. Brosnan, M. McIntyre [et al.] // Hypertension. – 2001. – Vol. 37. – № 2. – P. 529–534.

53. In vitro comparison of the bioactivities of Japanese and Bohemian knotweed ethanol extracts / L. Pogačnik, T. Bergant, M. Skrt [et al.] // Foods. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 544.

54. Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis / Y. Wei, J. Jia, X. Jin [et al.] // Molecular Medicine Reports. – 2018. – Vol. 17. – № 1. – P. 1493–1500.

55. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study / M. Samsami-kor, N. Ebrahimi Daryani, P. Rezanejad Asl, A. Hekmatdoost // Archives of Medical Research. – 2015. – Vol. 46. – № 4. – P. 280–285.

56. Polydatin retards the progression of osteoarthritis by maintaining bone metabolic balance and inhibiting macrophage polarization / Q. Sun, X.-Y. Nan, H. Wang [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2025. – Vol. 12. – P. 1514483.

57. Polydatin Protects Against Articular Cartilage Degeneration by Regulating Autophagy Mediated by AMPK/mTOR Signaling Pathway / Z. Ye, C. He, P. Yu [et al.] // Histology and Histopathology. – 2024. – Vol. 39. – № 11. – P. 1505–1515.

58. Emodin accelerates diabetic wound healing by promoting anti-inflammatory macrophage polarization / C. Chen, Z. Lin, W. Liu [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2022. – Vol. 936. – P. 175329.

59. Cheng, L. Emodin promotes the recovery of rheumatoid arthritis by regulating the crosstalk between macrophage subsets and synovial fibroblast subsets / L. Cheng, X. Rong // Animal Models and Experimental Medicine. – 2025. – Vol. 8. – № 1. – P. 44–56.

60. Emodin induces ferroptosis in colorectal cancer through NCOA4-mediated ferritinophagy and NF-κB pathway inactivation / Z. Shen, L. Zhao, S.-A. Yoo [et al.] // Apoptosis. – 2024. – Vol. 29. – № 9-10. – P. 1810–1823.

61. Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs / L. Zhang, A. S. Ravipati, S. R. Koyyalamudi [et al.] // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. – 2013. – Vol. 6. – № 9. – P. 673–681.

62. Antibacterial properties of Polygonum cuspidatum roots and their major bioactive constituents / B. Shan, Y.-Z. Cai, J. D. Brooks, H. Corke // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 109. – № 3. – P. 530–537.

63. Antibacterial Activity of Stilbenes Isolated From Reynoutria japonica Against Vancomycin-resistant Enterococci: An In Vitro and In Silico Approach / K. Ahmed, K. A. Khan, S. M. Büyüker [et al.] // Natural Product Sciences. – 2025. – Vol. 31. – № 4. – P. 299–308.

64. Shuanghu Qinggan Keli [Гранулы Shuanghu Qinggan] // База данных Китайской фармакопеи, стандартов лекарственных средств и нормативных актов : электронный документ. – URL: https://db2.ouryao.com/yd2015/view.php?id=1020 (дата обращения: 01.05.2023).

65. Huganning Jiaonang [Капсулы Huganning] // База данных Китайской фармакопеи, стандартов лекарственных средств и нормативных актов : электронный документ. – URL: https://db2.ouryao.com/yd2015/view.php?id=1282 (дата обращения: 01.05.2023).

66. Shufeng Jiedu Jiaonang [Инструкция по применению и производитель капсул Shufeng Jiedu] // Yaoyuanwang : сайт. – URL: https://m.yaopinnet.com/shuomingshu1/zy82662l2h.htm (дата обращения: 01.05.2026).

67. Патент № CN1772079A Китайская Народная Республика, МПК A61K 36/00 (2006.01). Лекарственное средство для лечения инфекций верхних дыхательных путей и способ его приготовления : № CN200510117119.8A : заявл. 01.11.2005 : опубл. 17.05.2006 / Zhang Junbing, Wang Ping, Wu Huibin // Google Patents : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/CN1772079A/zh (дата обращения: 01.05.2023).

68. Патент № CN101385783A Китайская Народная Республика, МПК A61K 36/00 (2006.01). Huganning tablets for treating chronic and urgent liver disease and preparation method thereof : № CNA2008100738034A : заявл. 17.09.2008 : опубл. 18.03.2009 / Li Langhui // Google Patents : official website. – URL: https://patents.google.com/patent/CN101385783A/en (дата обращения: 01.05.2023).

69. Патент № CN101019971B Китайская Народная Республика, МПК A61K 36/00 (2006.01). Комбинированный препарат традиционной китайской медицины для лечения гепатита B и способ его приготовления : № CN2007100029955A : заявл. 01.02.2007 : опубл. 13.10.2010 / Chen Lihua // Google Patents : официальный сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/CN101019971B/zh (дата обращения: 01.05.2023).

70. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание : официальный сайт / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2023. – URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ (дата обращения: 01.05.2023).

71. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines / I. Kolouchová-Hanzlíková, K. Melzoch, V. Filip, J. Šmidrkal // Food Chemistry. – 2004. – Vol. 87. – № 1. – P. 151–158.

72. Preliminary study on inducing incompact callus of Polygonum cuspidatum using the medium with perlite / X. L. Li, D. D. Wang, J. Gao [et al.] // Advanced Materials Research. – 2012. – Vol. 365. – P. 140–144.

73. Исследование флавоноидов гомеопатического лекарственного растительного сырья подснежника Воронова (Galanthus woronowii Losinsk.) и подснежника белоснежного (Galanthus nivalis L.) методом УЭЖХ/ФДМ/МС / Боков Д. О., Самылина И. А. // Химия растительного сырья. – 2016. – № 4. – С. 131-142.

74. Сравнительное исследование элементного состава клевера лугового (Trifolium pratense L.) и клевера среднего (Trifolium medium L.) / А. В. Никулин, Ф. В. Радус, Ю. А. Ефимова [и др.] // Фармация. – 2024. – № 4. – С. 18–23.

75. Сравнительное изучение аминокислотного состава представителей рядов Persicariaeformes Kom. и Lapathiiformes Worosch. / А. С. Чистякова, А. А. Гудкова, А. А. Сорокина, А. И. Сливкин // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 157–162.

76. О биологической активности стабилизированных арабиногалактаном наночастиц серебра в отношении кресс-салата Lepidium sativum L. Curled и фитопатогенного микромицета Fusarium sambucinum / Гудкова О.И., Бобкова Н.В.,

Фельдман Н.Б. [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 3. – с. 500-510.

77. Гудкова, А. А. Фармакогностическое изучение представителей рода горец (Persicaria mill.) как перспективного источника получения лекарственных препаратов : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Гудкова Алевтина Алексеевна; Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2020. – 450 с.

78. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях рейнутрии богемской (Reynoutria × bohemica Chrtek et Chrtkova) и изучение их антиоксидантной активности / В. А. Савина, Т. Ю. Ковалева, А. К. Орехова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2026. – Т. 29. – № 5. – С. 76–86.

79. Биологически активные вещества листьев и водных извлечений рейнутрии богемской (Reynoutria × bohemica Chrtek et Chrtkova) / В. А. Савина, Т. Ю. Ковалева, А. А. Павленко [и др.] // Фармация. – 2026. – № 2. – С. 10–15.

80. Highly invasive alien plant Reynoutria japonica Houtt. represents a novel source for pharmaceutical industry – Evidence from phenolic profile and biological activity / B. Božin, M. Gavrilović, N. Kladar [et al.] // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2017. – Vol. 82. – № 7-8. – P. 803–813.

81. Comparative Study of Antioxidant Activity and Content of Biologically Active Substances in Garden Cress Herb (Lepidium sativum L.) of Different Varieties and Cultivation Methods / V. A. Savina, E. S. Kovaleva, E. V. Sergunova [et al.] // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2026. – Vol. 19. – № 4. – P. 1718.

82. Assessment of antioxidant and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized from root extract of Reynoutria japonica Houtt. / F. Khuda, M. Jamil, A. A. K. Khalil [et al.] // Arabian Journal of Chemistry. – 2022. – Vol. 15. – № 12. – P. 104327.

83. Xia, Y. Plasmons: Why Should We Care? / Y. Xia, D. J. Campbell // Journal of Chemical Education. – 2007. – Vol. 84. – № 1. – P. 91.

Приложение А. Проект фармакопейной статьи

ПРОЕКТ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ

Рейнутрии богемской листья ФС.

Reynoutria* × *bohemica folia

Собранные осенью во время цветения, высушенные листья многолетнего травянистого растения рейнутрии богемской – *Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova, семейства гречишные – *Polygonaceae*.

Содержит:

- не менее 1,0 % суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом сырье (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»);

- не менее 0,1 % полидатина в пересчёте на сухое сырьё (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»);

- не менее 3 % дубильных веществ в пересчете на танин (ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов»);

- не менее 15 % экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в пересчете на сухое сырьё.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Листья».

Цельное сырье. Листья простые, с верхней стороны голые, снизу по жилкам с острыми коническими волосками, до 25 см в длину и до 15 см в ширину, кожистые, яйцевидные или широкоэллиптические в очертании, с цельным краем, заострённой верхушкой, основание ширококлиновидное, усечённое или закруглённое. Черешок около 2 см длиной. Цвет зеленый с верхней (адаксиальной) стороны и бледно-зеленый с нижней (абаксиальной) стороны. Запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Измельчённое сырье. Кусочки листьев различной формы и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев различной формы, цвет кусочков с одной стороны зеленый, а с другой стороны – бледно-зеленый, запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Порошок. Кусочки листьев и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) видны кусочки листьев различной формы; кусочки черешков. Цвет кусочков с одной стороны зеленый, а с другой стороны – бледно-зеленый, запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения».

Цельное сырье, измельчённое сырье. При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности визуализируются небольшие клетки округлой или слегка угловатой (5-7-угольной) формы, прямостенные на адаксиальной (верхней) и извилистые на абаксиальной (нижней) стороне листа. Устьичный комплекс аномоцитного (3-5 околоустьичных клеток) типа присутствует только с нижней стороны листа. На нижней стороне листа имеются многоклеточные (от 4 до 8 клеток) железки с окрашенным содержимым. Над жилками клетки эпидермиса более вытянутые, практически прямостенные, прямоугольные, длина примерно в 3 раза больше ширины. По крупным жилкам с нижней стороны листа установлено наличие папиллозных волосков, одноклеточных и многоклеточных. Имеются друзы оксалата кальция. По краю листа клетки эпидермиса имеют сосочковидные выросты.

Клетки эпидермиса черешка более вытянутые, содержат антоцианы. Устьиц меньше, чем на листовой пластинке. Проводящая система черешка пучкового типа. Пучки коллатеральные, закрытого типа, представлены одним крупным вентральным пучком и десятью более мелкими дорсальными пучками.

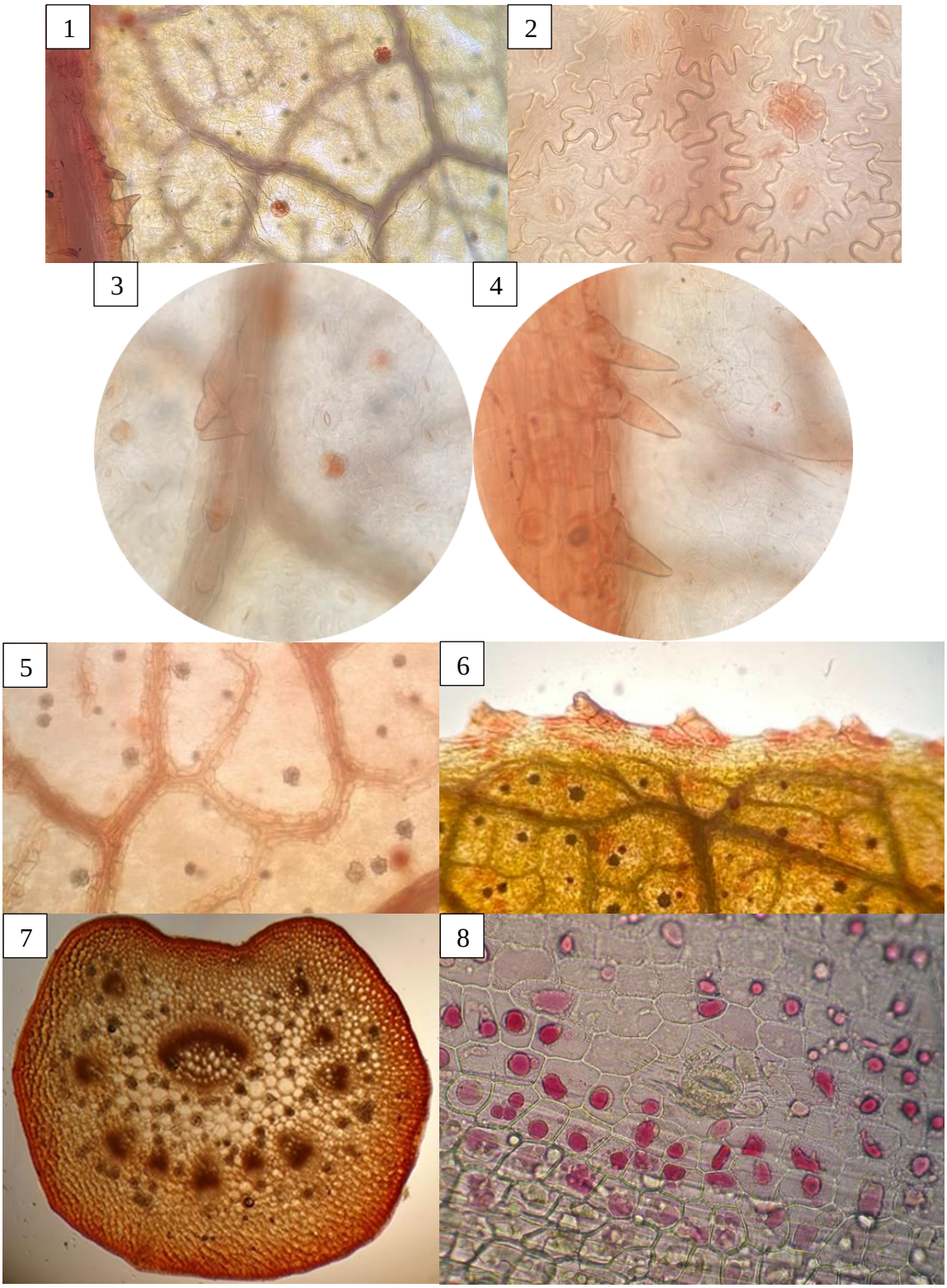


Рисунок А.1 – Рейнутрии богемской листья

1 – фрагмент нижнего эпидермиса листа (100×); 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с устьицами (аномоцитный тип) и железкой (400×); 3 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки с одноклеточными сосочковидными волосками и железками (400×); 4 – фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки с многоклеточными сосочковидными волосками (400×); 5 – фрагмент мезофилла листа с кристаллами оксалата кальция в виде друз (400×); 6 – край листа (100×); 7 – поперечный срез черешка (100×); 8 – фрагмент эпидермиса черешка (400×)

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография. Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Пластинка. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подвижная фаза (ПФ). вода – кислота муравьиная – этилацетат (5:5:40).

Испытуемый раствор. Спиртовое извлечение, полученное для количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

Раствор рутина. Растворяют 0,05 г рутина в 100 мл спирта 70 % при нагревании на водяной бане.

Раствор полидатина. Растворяют 0,05 г полидатина в 50 мл спирта 96 %.

Реактив для детектирования. Раствор железа (III) хлорида 5%.

На линию старта пластинки наносят 60 мкл испытуемого раствора, 10 мкл раствора рутина и 10 мкл раствора полидатина. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин ПФ, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку опрыскивают реактивом для детектирования, выдерживают при температуре 100–110°С в течение 3-10 мин и просматривают при дневном свете и в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм.

Результат. На хроматограмме раствора рутина должна обнаруживаться зона адсорбции желто-зеленого цвета. На хроматограмме раствора полидатина должна обнаруживаться зона адсорбции желто-коричневого цвета

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции желто-зеленого цвета на уровне или чуть ниже зоны адсорбции рутина и желто-коричневого цвета на уровне или чуть ниже зоны адсорбции полидатина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Не более 10,0 % (ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

Зола общая. Не более 11,0 % (ОФС «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 0,5 % (ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

Измельчённость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 2 %.

Измельчённое сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Порошок: частиц, не проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Допустимые примеси. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Сырьё, изменившее окраску (листья, потемневшие с обеих сторон). Цельное сырье, измельчённое сырье – не более 5 %.

Другие части растения (цветки и кусочки стеблей). Цельное сырье, измельчённое сырье – не более 5 %.

Органическая примесь. Цельное сырье, измельчённое сырье – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельчённое сырье – не более 0,5 %.

Тяжёлые металлы и мышьяк. В соответствии с ОФС «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

1. Сумма флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 1,0%.

Аналитическую пробу сырья измельчили до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл спирта 70 %. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°С в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляли 30 мл спирта 70 %. Экстракцию повторяли еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводили спиртом 70 % до метки и перемешивали (раствор А испытуемого раствора).

3,0 мл раствора А испытуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 96 %, доводили объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивали (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряли через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 3 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Расчет количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье листьев рейнутрии богемской проводился по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A} \times m_{\mathrm{co}} \times V_{\mathrm{aco}} \times 25 \times 100 \times 100 \times 100 \times \mathrm{P}}{\mathrm{A}_0 \times m \times V_{ax} \times 25 \times 100 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{\mathrm{A} \times m_{\mathrm{co}} \times 100 \times \mathrm{P}}{\mathrm{A}_0 \times m \times (100 - W)}$$

где

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;

m – навеска сырья, г;

m_{co} – навеска СО рутина, г;

V_{ax} – объем аликвоты испытуемого раствора, мл;

V_{aco} – объем аликвоты СО рутина, мл;

P – содержание основного вещества в СО рутина, %;

W – влажность сырья, %.

2. Полидатин - не менее 0,1%. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза (ПФ). Раствор трифторуксусной кислоты 0,1% (Элюент А) и ацетонитрил (Элюент Б). Условия градиентного элюирования приведены в таблице А.1.

Таблица А.1 - Условия градиентного элюирования

Время, мин	Элюент А, %	Элюент Б, %
0	85	15
2	80	20
6	72	28
10	60	40
13	30	70
15	30	70
16	85	15

Испытуемый раствор. Аналитическую пробу сырья измельчили до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл спирта 70 %. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°С в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляли 30 мл спирта 70 %. Экстракцию повторяли еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводили спиртом 70 % до метки и перемешивали.

Раствор стандартного образца полидатина. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 г (точная навеска) стандартного образца полидатина, прибавляют 30 мл ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Хроматографические условия

Колонка	150 × 4.6 мм, силикагель октадецилсилильный, для хроматографии, 5 мкм;
Температура колонки	30 °С;
Скорость потока	0,8 мл/мин;
Детектор	спектрофотометрический, 306 нм;
Объём пробы	20 мкл.

Хроматографируют раствор стандартного образца полидатина и испытуемый раствор.

Содержание полидатина в пересчёте на сухое сырьё в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times m_{\text{со}} \times 100 \times 100 \times \text{P}}{S_{\text{со}} \times m \times 100 \times (100 - W)}$$

где

S_1 – площадь пика полидатина на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{со}$ – площадь пика полидатина на хроматограмме раствора стандартного образца полидатина;

m – навеска сырья, г;

$m_{со}$ – навеска стандартного образца полидатина, г;

P – содержание полидатина в стандартном образце полидатина, %;

W – влажность сырья, %.

3. Дубильных веществ в пересчете на танин - не менее 3 %. Определение проводят в соответствии с ОФС.1.5.3.0008 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов» ГФ XV издания методом 1 (перманганатометрическое титрование).

4. Экстрактивные вещества, извлекаемые водой - не менее 15 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (экстрагент – вода).

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

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

Приложение Б. Инструкция по заготовке

Инструкция по сбору и сушке листьев рейнутрии богемской

Рейнутрия богемская – *Reynoutria* × *bohemica* Chrtek et Chrtkova, многолетнее травянистое растение семейства гречишные – *Polygonaceae*, высотой 2,5-4 м. Побеги гладкие, маловетвистые, с утолщенными узлами, зеленого или красноватого оттенка. Стебли прямостоячие, толстые, полые (напоминают бамбук), светло-зеленые, с красноватыми или бурыми пятнами. Листья с усеченным, реже сердцевидным или ширококлиновидным основанием, длиной 12-25 см, расположены очередно. Листья снизу по жилкам с острыми коническими 1-3-клеточными волосками. Цветки мелкие, белые или бледно-зеленые, собранны в метельчатые соцветия, расположенные в пазухах листьев. Цветет с сентября по октябрь, плоды не созревают.

Распространена в средней полосе России. Встречается как в парках, лесах, так и на пустырях, ж/д насыпях, сорных местах. Часто произрастает вдоль рек и дорог. Иногда высаживается как декоративное растение. Размножается вегетативно в основном подземными частями (мощным корневищем).

Кроме рейнутрии богемской могут встречаться рейнутрия сахалинская и рейнутрия японская (таблица Б.1).

Таблица Б.1 - Основные отличительные признаки рейнутрии богемской от возможных примесей

Признак	Рейнутрия богемская (*R.* × *bohemica* Chrtek & Chrtková)	Рейнутрия сахалинская (*R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai)	Рейнутрия японская (*R. japonica* Houtt)
Жизненная форма	Травянистое растение высотой 2,5-4 м	Травянистое растение высотой до 4 м	*var. japonica* - травянистое растение высотой 1,5-3 м; var. compacta (Hook. f.) Moldenke - травянистое растение высотой до 1 м
Листья	Листья с усеченным, реже сердцевидным	Листья очень крупные, длиной 20-45 см, с	*var. japonica* - листовая пластинка яйцевидная или овальная с оттянутой

Продолжение Таблицы Б.1

	или широко-клиновидным основанием, длиной 12-25 см. Листья снизу хотя бы по жилкам с густыми острыми коническими 1-3-клеточными волосками	глубоко сердцевидным основанием, нижняя сторона листовой пластинки с длинными (часто более 2 мм) многоклеточным и волосками	треугольной верхушкой, снизу голая или по жилкам папиллозная, основание усеченное или широко клиновидное, часто несколько неравнобокое, листья длиной до 20 см; *var. compacta* (Hook. f.) Moldenke - листья довольно мелкие, длина самых крупных из них не превышает 10 см

Листья собирают, когда они полностью сформировались, с начала сентября, во время цветения, так как рейнутрия цветет поздно. Для сборки выбирают развитые нижние и средние листья, их обрывают или срезают с черешком. Допустимо срезать побег целиком, с последующим удалением стебля и соцветий. При заготовке не следует собирать листья, изменившиеся по цвету, поврежденные вредителями или плесенью. После сборки с помощью решета или грохота удаляют минеральные примеси.

Сушат листья рейнутрии разложив тонким слоем на бумаге или ткани, в тени под навесами или в сушилках с искусственным обогревом при температуре не выше 50-60 °С. Во избежание самосогревания сырье перелопачивают. После сушки сырье приводят в стандартное состояние, путем удаления побуревших листьев, посторонних частей растения, органической и минеральной примеси. Выход сухого сырья составляет 10-15%.

Внешний вид сырья. Готовое сырье представляет собой простые листья, с верхней стороны голые, снизу по жилкам с острыми коническими волосками, до 25 см в длину и до 15 см в ширину, кожистые, яйцевидные или широкоэллиптические в очертании, с цельным краем, заострённой верхушкой, основание ширококлиновидное, усечённое или закруглённое. Черешок около 2 см длиной. Цвет зеленый с верхней (адаксиальной) стороны и бледно-зеленый с нижней (абаксиальной) стороны. Запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Числовые показатели: суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,0 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 15 %; дубильных веществ в пересчете на танин, не менее 3 %; полидатина, не менее 0,1 %; влажность не более 10,0 %; золы общей не более 11,0 %; листьев, потемневшие с обеих сторон не более 5 %; цветков и кусочков стеблей не более 5 %; органической примеси не более 0,5 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

Упаковка. Высушенные листья упаковывают в кипы (не более 200 кг).

Хранение. Хранят в сухом, проветриваемом помещении.

Срок годности 3 года.

Приложение В. Акт внедрения в учебный процесс

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе ФГАОУ ВО
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет)

_____ Литвинова Т.М.

_____ 2026г.

14 МАЙ 2026

АКТ 960

о внедрении результатов диссертации Савиной Валерии Александровны в учебный процесс Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Савиной Валерии Александровны

на тему «Изучение метаболома сырья растений рода рейнутрия (Reynoutria)»
внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания и кафедры биотехнологии Института Фармации им. А.П. Нелюбина

при изучении дисциплин «Фармакогнозия», «Ботаника», «Основы биотехнологии и нанотехнологии», «Современные методы биотехнологии», читаемых студентам по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация, 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика, 19.04.01. Биотехнология, 06.04.01. Биология.

Директор Института Фармации им. А.П. Нелюбина	_____ (Подпись)	Раменская Г.В.
Заведующий учебной частью кафедры фармацевтического естествознания	_____ (Подпись)	Бобкова Н.В.
Заведующий учебной частью кафедры биотехнологии	_____ (Подпись)	Фельдман Н.Б.
Начальник Учебного управления	_____ (Подпись)	Юдина Л.Ю.

Приложение Г. Акт внедрения

Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс»
ОГРН 1237700156099, ИНН 9728089480, КПП 772701001
Юр. адрес: 117149, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/2

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «СК»
_____ А.М. Полуянов
«15» _____ 2026

Исх. № 21-26 «15» мая 2026 г.

АКТ
внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс» (ООО «СК») Полуянов Андрей Михайлович, заведующий аналитической лабораторией ООО «СК» Медведев Юрий Владимирович удостоверяем факт внедрения методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом спектрофотометрии в растительном сырье - листья рейнутрии богемской. Данная методика была разработана в ходе выполнения диссертационного исследования на тему «Изучение метаболома сырья растений рода рейнутрия (Reynoutria)» аспирантом кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Савиной Валерией Александровной.

Данная методика используется для оценки качества сырья лекарственных растений в ООО «СК».

Заведующий аналитической
лабораторией ООО «СК»,
к.фарм.н., Медведев Ю. В.

_____ / Медведев Ю.В.

Приложение Д. Акт внедрения

Акционерное общество
«Институт фармацевтических технологий»
Юридический адрес: 121353, г. Москва, Сколковское шоссе, д.21, офис 1
ИНН 7731578255 КПП 773101001 ОГРН 1077761680182 info@ipt.ru.com

Исх. № 20 / 26 от «02» июня 2026г.

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор Акционерного общества «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ») Кедик Станислав Анатольевич и заместитель директора по качеству АО «ИФТ» Карпова Анастасия Сергеевна удостоверяем факт внедрения методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом спектрофотометрии в растительном сырье – листья рейнутрии богемской.

Данная методика была разработана в ходе выполнения диссертационного исследования на тему «Изучение метаболома сырья растений рода рейнутрия (Reynoutria)» аспирантом кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Савиной Валерией Александровной. Данная методика используется для оценки качества сырья лекарственных растений в АО «ИФТ».

Заместитель директора
по качеству АО «ИФТ», к.фарм.н. / А.С. Карпова

Генеральный директор АО «ИФТ»
д.т.н. / С.А. Кедик

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО * "Институт фармацевтических технологий" "Institute of Pharmaceutical Technology" * МОСКВА * 1077761680182

Приложение Е. Патент



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2854889

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ РЕЙНУТРИИ БОГЕМСКОЙ

Патентообладатель: *ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) (RU)*

Авторы: *Савина Валерия Александровна (RU), Фельдман Наталия Борисовна (RU), Луценко Сергей Викторович (RU)*

Заявка № **2024132499**

Приоритет изобретения **29 октября 2024 г.**

Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **21 января 2026 г.**

Срок действия исключительного права на изобретение истекает **29 октября 2044 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов