

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Никифоров Леонид Анатольевич

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
ПОДСЕМЕЙСТВА РЯСКОВЫЕ (*LEMNOIDEAE*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
М.В. Белоусов

Томск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Обзор литературы: эколого-систематическая характеристика, химический состав, биологическая активность и перспективы использования видов подсемейства Lemnaceae	
1.1. Систематическая и эколого-географическая характеристика видов семейства рясковые.....	13
1.2. Степень изученности химического состава видов подсемейства рясковые.....	18
1.3. Сведения об использовании в народной медицине, экспериментальных фармакологических свойствах видов подсемейства рясковые.....	30
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	41
Глава 2. Объекты и методы исследования	
2.1. Объекты исследования.....	42
2.2. Методы фармакогностического исследования.....	42
2.2.1. Методы анатомо-морфологического исследования.....	42
2.2.2. Методы исследования химического состава.....	43
2.2.2.1. Получение суммарных комплексов и их фракций.....	43
2.2.2.2. Методики обнаружения и анализа основных групп БАВ.....	45
2.2.3. Методы стандартизации сырья.....	55
2.3. Методы оценки фармакологической активности.....	55
2.3.1. Оценка острой токсичности.....	55
2.3.2. Исследование влияния на функциональную активность клеток иммунной системы.....	55
2.4. Статистическая обработка результатов.....	59
Глава 3. Исследование химического состава <i>L. minor</i> L., <i>L. trisulca</i> L. и <i>Spirodella polyrrhiza</i> Schleid (<i>L. polyrrhiza</i> L.)	
3.1. Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ.....	60
3.2. Исследование комплекса фенольных соединений растений рода ряска.....	62
3.2.1. Качественный и количественный анализ кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов.....	63
3.2.2. Качественный и количественный анализ фенолокислот.....	75

3.3.	Сравнительное исследование веществ первичного обмена.....	82
3.3.1.	Исследование аминокислотного состава.....	82
3.3.2.	Исследование свободных и связанных моносахаридов.....	84
3.3.3.	Исследование полисахаридного комплекса.....	87
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	93
	Глава 4. Исследование биологической активности БАС <i>L. minor</i> L., <i>L. trisulca</i> L. и <i>Spirodella polyrrhiza</i> Schleid (<i>L. polyrrhiza</i> L.)	
4.1.	Исследование острой токсичности.....	95
4.2.	Влияние различных концентраций БАС рясок на пролиферацию иммунокомпетентных клеток.....	95
4.3.	Влияние различных концентраций БАС (ПФ и ПС) рясок на НО-стимулирующую активность антигенпрезентирующих клеток.....	97
4.4.	Влияние полимиксина В на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами в присутствии ПС и ПФ рясок.....	99
4.5.	Влияние ПС, выделенных из межвидовых смесей растений рода рясок, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей.....	101
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	103
	Глава 5. Разработка критериев качества для стандартизации сырья	
5.1.	Исследование внешних (макроскопических) и микроскопических признаков <i>Lemna minor</i> , <i>Lemna trisulca</i> , <i>Spirodella polyrrhiza</i>	104
5.2.	Стандартизация сырья по показателю «Количественное определение».....	116
5.3.	Разработка товароведческих показателей качества сырья.....	123
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	126
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	127
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	129
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	145
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	152
	ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	161

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения

НМС – низкомолекулярные соединения

ПС– полисахариды

ПСК– полисахаридный комплекс

ВРПС– водорастворимые полисахариды

УК– уроновые кислоты

ММР – молекулярно-массовое распределение

Мм – молекулярная масса

ВУ– время удерживания

ЭТС– эмбриональная телячья сыворотка

Мф – макрофаги

ЛПС – липополисахариды

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ-МС – газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние годы популярность фитотерапии, несмотря на большие успехи в создании синтетических лекарств, возрастает. Интерес к природным веществам и препаратам, создаваемым на их основе, увеличивается благодаря как общеизвестным уникальным свойствам фитопрепаратов, так и стремительно развивающимся технологиям исследований в биологии, медицине и производстве лекарственных препаратов, позволяющим эффективно решать вопросы поиска, оценки, стандартизации и внедрения перспективных объектов (Самбукова Т. В., 2017). Конкурентными преимуществами фитопрепаратов являются их высокий терапевтический индекс, широкий спектр терапевтического действия, комплексный протекторный эффект, что актуализирует их использование в превентивной и регенеративной медицине, в комплексной терапии хронических заболеваний, в педиатрии и гериатрии.

Перспективными объектами для изучения, благодаря обеспеченной и быстро возобновляемой сырьевой базе, доступности и возможности заготовки значительных объемов сырья, как в дикорастущем виде, так и в аквакультуре, а так же данным успешного применения в традиционной медицине, являются произрастающие на территории России отдельные представители подсемейства рясковые – ряска малая (*Lemna minor* L.), ряска тройчатая (*Lemna trisulca* L.), многокоренник обыкновенный (*Spirodella polyrrhiza* Schleid (*Lemna polyrrhiza* L.)) (Власова Н. В., 1987, Петрова Н.В., 2014).

Степень разработанности темы. Обращение к крупнейшей в мире базе данных рефератов и цитирования Scopus, по ключевым словам, «*Lemnaceae*», «*Lemna*» показывает более 400 и 3800 публикаций, соответственно, из разных областей знаний, что говорит о большом интересе зарубежных и отечественных ученых к рассматриваемым объектам. Из 410 ссылок по ключевому слову «*Lemnaceae*» в базе Scopus 289 относятся к области сельского хозяйства, 96 - к наукам об окружающей среде, 119 – к биохимии,

генетике и молекулярной биологии, в то же время, на химические науки и фармакологию приходится всего 20 и 15 публикаций соответственно.

Анализ содержания публикаций, представленных, как в базе данных Scopus, так и других информационно-поисковых системах показал, что наиболее часто модельными объектами исследований зарубежных и отечественных ученых являются *L. Minor* ($\approx 60-65\%$ исследований), *Spirodella spp.* ($\approx 20-25\%$), на остальные виды *L. gibba*, *L. minuta*, *L. aequinoctalis*, *L. japonica*, *Wolffia spp.* приходится $\approx 15-20\%$. Большая часть публикаций, относящихся к разным базам данных в области знаний «химия», посвящена влиянию воздействия металлов, в том числе тяжелых металлов, наночастиц металлов на уровни их накопления в растениях, внутривидовую вариабельность, экологические риски, устойчивость к «металлическому» стрессу (Hartt, D.A. et al., 1970, Popov, S.V. et al., 2006, Anawar, H.M. et al., 2008, Fikirdeşici-Ergen, Ş. et al., 2018, Minogiannis, P. et al., 2019, Lalau, C. M. et al., 2020). Кроме того, изучаются различные аспекты культивирования рясок, влияния солевого стресса на биохимические и физиологические аспекты, влияния гербицидов на ряски, на их способность дезактивировать в воде токсиканты ароматического ряда (Buikema Jr., A.L. et al., 1979, Chung, I.-M. et al., 2007, Kuznetsova, T. et al., 2019, Mariani, F. et al., 2020.).

Информация о составе и содержании БАВ разных видов рясковых, по отдельным представителям и группам, носит фрагментарный характер, а для некоторых представителей подсемейства отсутствует. Наиболее изученным является состав amino- и жирных кислот и общее содержание белка у отдельных видов рода *Lemna* (*Lemna minor*, *Lemna trisulca*) и рода *Spirodella* (*Spirodela polyrhiza*).

Данные литературы, указывают на широкий спектр биологической активности некоторых видов подсемейства рясковые, проявляющих противовоспалительное, гастропротективное, желчегонное, антимуtagenное, антиоксидантное, антирадикальное, цитотоксическое, антикоагулянтное, антимикробное, антиадипогенезное, крипротекторное, противоопухолевое

действие, адсорбирующую активность, а также обладающих корректирующим действием на синтетическую функцию щитовидной железы и показатели углеводного обмена (Cho, H.R. et al., 2003, Ефимов, С. Н. и др., 2004, Замощина, Т.А. и др., 2011, Кононенко, А. Г. и др, 2016, Al-Snafi, A. E., 2019).

В то же время, несмотря на широкий спектр фармакологической активности, официально зарегистрированных лекарственных препаратов из видов подсемейства рясковые в России и за рубежом нет. Представленный на фармацевтическом рынке России ассортимент продукции на основе видов данного подсемейства крайне невелик и включает только БАДы и продукты функционального питания на основе *Lemna minor*.

Таким образом, анализ сведений по распространению, химическому составу, опыта народной медицины и результатов экспериментальной фармакологической активности показывает, что возможность использования видов подсемейства рясковые в качестве потенциальных сырьевых источников лекарственных кандидатов не реализованы, несмотря на высокий ожидаемый потенциал.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационного исследования является сравнительное фармакогностическое изучение травы *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*Lemna polyrrhiza* L.) и разработка нормативной документации на новый вид растительного лекарственного сырья с иммуностропной активностью.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. На основании анализа литературных данных обосновать выбор репрезентативных объектов и дизайн их исследования.
2. Исследовать химический состав *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).
3. Изучить влияние БАС *L. Minor* L., *L. trisulca*L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.) на функциональную активность клеток иммунной системы.

4. Провести сравнительное морфолого-анатомическое исследование *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).
5. Разработать параметры качества и проект фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье.

Научная новизна.

Впервые проведен сравнительный общий фитохимический анализ трех видов рясок. Установлено, что все исследуемые виды в большей степени накапливают фенольные соединения (кумарины, гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты, флавоноиды и изофлавоноиды), аминокислоты (19, в том числе 8 незаменимых), и углеводы (преимущественно связанные сахара и водорастворимые полисахариды). Впервые методом ВЭЖХ определен компонентный состав полифенольного комплекса, методом ГХ-МС установлен мономерный состав, методом эксклюзионной ВЭЖХ проведен анализ молекулярно-массового распределения полисахаридов трех видов рясок.

Впервые проведено изучение влияния суммарных полифенольных комплексов и водорастворимых полисахаридов, выделенных из ряски малой (*L. minor*), ряски трёхдольной (*L. trisulca*), ряски многокоренной (*L. polyrrhiza*) на пролиферацию иммунокомпетентных клеток (спленоцитов), на НО-стимулирующую активность антигенпрезентирующих клеток (перитонеальных макрофагов), в том числе независимую от эндотоксина (с полимиксином), а так же влияние полисахаридов, выделенных из межвидовых смесей растений рода рясок, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей. Установлено, что водорастворимые полисахариды рясок поляризуют антигенпрезентирующие клетки по классическому пути, усиливая Th-1 тип иммунного ответа.

В результате сравнительного изучения внешних и микроскопических признаков *L. minor*, *L. trisulca*, *L. polyrrhiza* установлены общие для всех видов признаки: наличие жилок, волосовидно-нитевидных корней, карманов, аэренхимы, рафид, друз и определены отличительные признаки для каждого

вида, заключающиеся в особенностях окраски, формы и размеров листочков, количества корней, карманов, жилок и их расположения, формы и степени извилистости клеток эпидермиса, степени развития аэренхимы, наличия (отсутствия) устьиц и пигментов.

Теоретическая и практическая значимость.

Сравнительное комплексное морфолого-анатомическое, химическое и биологическое исследование трёх видов рясок расширило сведения о распространенных в Сибири представителях таксона Рясковые семейства Ароидные. Полученные экспериментальные данные позволили обосновать использование травы трёх видов рясок подсемейства *Lemnaceae* в качестве сырьевого источника водорастворимых полисахаридов с иммуностропной активностью. На основании проведенного исследования разработан проект фармакопейной статьи «Ряски трава». Для целей стандартизации обоснован выбор методик количественного определения целевых групп БАВ в сырье: полисахаридов и фенолоксилов.

Методология и методы исследования.

Методология диссертационной работы базируется на изучении и систематизации литературных данных в области фармакогностического и химико-фармакологического исследования видов подсемейства *Lemnaceae*, выбора репрезентативных объектов, постановка цели и определение дизайна исследования. Объектами исследования служили три вида растений семейства *Lemnaceae* (*Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L., *Spirodella polyrrhiza* Schleid, *син. Lemna polyrrhiza* L.), собранные в естественных местах обитания. Морфолого-анатомические исследования проводили с использованием световой микроскопии, цифровой фотографии и гистохимических реакций. Для анализа химического состава БАВ в исследуемых объектах использовали различные качественные реакции, спектральные, хроматографические и другие общепринятые методы анализа. Исследование биологической активности проводили на моделях *in vivo* и *in vitro* согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов, А. Н., 2012) и

стандартным методикам. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с Государственной фармакопеей 14 издания (Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018). Для расчета использовали программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни. При проявлении эффекта с уровнем значимости $p < 0,05$ результаты эксперимента считали достоверными.

Связь задач исследования с планами научных работ. Работа выполнена в соответствии планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Изыскание и изучение новых лекарственных средств. Вопросы фармации» (№ гос. регистрации темы 01.02.00. 101708) и комплексной программой «Инновационные технологии новых фармацевтических продуктов на основе природных биологически активных комплексов» (регистрационный номер: АААА-А16-116021010208-2 от 10.02.2016 г).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования химического состава *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).
2. Результаты изучения влияния БАС *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.) на функциональную активность клеток иммунной системы.
3. Результаты морфолого-анатомического исследования *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).
4. Результаты разработки параметров качества лекарственного растительного сырья и проект фармакопейной статьи «Ряски трава».

Степень достоверности. Достоверность диссертационной работы подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием световой микроскопии, цифровой фотографии, гистохимических и качественных реакций, спектральных, хроматографических и других общепринятых фармакогностических,

аналитических и биологических методов исследования, что иллюстрируется соответствующим количеством фотографий, хроматограмм, спектров, таблиц, схем и рисунков. Все методики количественного определения валидированы, полученные данные подвергнуты статистической обработке в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIV издания. Для расчета использованы программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы представлены и обсуждены на Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете (Россия, Томск, 2010); восьмой международной научно-практической конференции «Scientific Research in XXI Century» (Canada, Ottawa, 2021); восьмой международной научно-практической конференции «Challenges in science of nowadays» (USA, Washington, 2021).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 12 работ, в том числе: 8 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из них 6 работ, входящих в базы цитирования SCOPUS и WoS и 3 тезиса докладов на международных и всероссийских конференциях.

Внедрение в практику. Результаты диссертационной работы применяются в научном и учебном процессе кафедры фармацевтического анализа ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (в курсах ботаники, экологии, фармакогнозии, основах фитотерапии и программах дополнительного профессионального образования).

Разработанная спектрофотометрическая методика количественного определения фенолкарбоновых кислот, включенная в проект ФС «Ряски трава» используется в научно-исследовательских и опытно-конструкторских работах лаборатории инновационных фармацевтических технологий и центра внедрения технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании и осуществлении всех этапов диссертационной работы: лично

проводил экспериментальные исследования, выполнял сбор, анализ и статистическую обработку данных. Автором подготовлены доклады, тезисы, рукописи статей, а также диссертация и автореферат, представленные к защите.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует научной специальности 3.4.2. – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки). Области исследований - «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе»;

«Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»;

«Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»;

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, выводов, списка литературы и 3 приложений. Работа иллюстрирована 24 таблицей и 48 рисунками. Библиографический указатель включает 143 источника литературы, из них 89 – зарубежных.

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнены на базе кафедры фармацевтического анализа и центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ, а также в сотрудничестве с лабораторией экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ РАН (г. Томск), АО международного научно-производственного холдинга «Фитохимия» Республики Казахстан (г. Караганда). Выражаем искреннюю благодарность руководителям и сотрудникам данных учреждений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:
ЭКОЛОГО-СИСТЕМАТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА,
ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ,
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВИДОВ ПОДСЕМЕЙСТВА
LEMNACEAE

1.1. Систематическая и эколого-географическая характеристика видов семейства рясковые

Семейство Рясковые (*Lemnaceae* S. F. Gray) относится к однодольным цветковым растениям. Согласно таксономической классификации цветковых растений APG II (2003) и APG III (2009) этот таксон теперь уже в ранге подсемейства Рясковые (*Lemnoideae*) относится к семейству Ароидные [62-63].

За последние 70-80 лет систематики относили к семейству рясковые (*Lemnaceae* S.F.Gray) до 6 родов, включающих до 30-40 видов растений. Однако в последние 50 лет в научной литературе, наиболее часто к этому семейству относят только 4 рода - ряска (*Lemna* L.), многокоренник (*Spirodela* Schleiden), вольфиелла (*Wolffiella* Hegelm.) и вольфия (*Wolffia* Horkel ex Schleid) [9, 39, 93, 95, 102].

Первые два рода широко представлены в Северной и Южной Америке, Европе, Южной Азии, Южной и Центральной Африке, юге Австралии, всей территории России; два других – *Wolffia* и *Wolffiella* встречаются реже и имеют более ограниченный ареал, например, виды рода вольфия (*Wolffia* Horkel ex Schleid) произрастают в тропической и субтропической Азии, и как занесенные в теплых регионах Северной и Южной Америки; виды рода вольфиелла (*Wolffiella* Hegelm.) – в субтропических, тропических районах и регионах с теплым климатом Америки и Южной Африки [46, 81, 139].

В роду вольфиелла (*Wolffiella* Hegelm.) выделяют три секции, к которым относятся 10 видов травянистых растений: *Wolffiella hyaline* Monod, *Wolffiella repanda*, *Wolffiella rotunda* Landolt, *Wolffiella caudate* Landolt, *Wolffiella denticulate* Hegelm., *Wolffiella gladiate* Hegelm., *Wolffiella lingulata* Hegelm.,

Wolffiella neotropica Landolt, *Wolffiella oblonga* Hegelm., *Wolffiella welwitschii* Hegelm.

Род вольфия (*Wolffia* Horkel ex Schleid) считается наиболее развитым из всего подсемейства рясковые, и поразным данным в него входят 4 секции, которые насчитывают 10-11 видов: *Wolffia angusta* Landolt; *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm.; *Wolffia australiana* (Benth.) Hartog & Plas; *Wolffia borealis* (Engelm. ex Hegelm.) Landolt; *Wolffia brasiliensis* Wedd.; *Wolffia columbiana* H. Karst.; *Wolffia cylindracea* Hegelm.; *Wolffia elongate* Landolt; *Wolffia globosa* (Roxb.) Hartog & Plas; *Wolffia microscopic* (Griff.) Kurz; *Wolffia neglecta* Landolt. К видам этого рода относится самое маленькое цветковое растение на Земле – вольфия шаровидная [95].

В мировой флоре к роду многокоренник (*Spirodela* Schleiden) относят 2 секции, в которые по данным разных систематиков входят 3-4 вида, только один из которых многокоренник обыкновенный (*Spirodela polyrrhiza*) произрастает на территории России [6, 39, 95].

Из подсемейства рясковые род ряска (*Lemna* L.) считается самым примитивным. По данным «Растительных ресурсов России» на 2014 г. в России встречаются три вида рясок – *Lemna gibba* (ряска горбатая), *Lemna minor* (ряска маленькая) и *Lemna trisulca* (ряска тройчатая). *Ряска горбатая* распространена в Европейской части России – Карело-Мурманском, Калининградском, Ладожско-Ильменском, Верхне-Волжском, Волжско-Камском, Волжско-Донском, Заволжском, Нижне-Донском, Нижне-Волжском ботанико-географических районах, на Кавказе; *ряска маленькая* в Европейской Арктике, Европейской части России, Кавказе, во всех районах Западной и Восточной Сибири, Дальнего Востока, кроме Курильского и Охотского ботанико-географических районов; *ряска тройчатая* встречается в Европейской Арктике, Европейской части России, Кавказе, во всех районах Западной и Восточной Сибири, Дальнего Востока, кроме Охотского ботанико-географического района [39].

Следует отметить, что в определителях и флорах сибирского региона разных лет, например, во Флоре Западной Сибири (1929) и Флоре Сибири (1987) приведены идентичные данные о распространении двух видов рясок – *ряски маленькой* и *ряски тройчатой*. На территории Сибири *ряска маленькая* встречается в Западной Сибири в Тюменской области (Ханты-Мансийском, Тобольском флористических районах), Омской, Томской, Новосибирской, Кемеровской областях, Алтайском крае (Барнаульский флористический район); в Средней Сибири – в Красноярском крае (Хакасской автономной области, Верхнеенисейском, Тунгусском флористических районах); в Восточной Сибири в Иркутской области (Ангаро-Саянском и Приленско-Катангском флористических районах), Республике Бурятия (Северобайкальском и Южно-байкальском флористических районах), Читинской области (Шилко-Аргуньском флористическом районе), республике Саха (Якутия) в Вилюйско-Верхнеленском флористическом районе. *Ряска тройчатая* распространена в Западной Сибири в Тюменской области (Тобольском флористическом районе), Курганской, Омской, Томской, Новосибирской, Кемеровской областях, Алтайском крае (Барнаульский флористический район); в Средней Сибири – в Красноярском крае (Хакасской автономной области, Путоранском, Верхнеенисейском, Тунгусском флористических районах), республике Тыва; в Восточной Сибири в Иркутской области (Ангаро-Саянском и Приленско-Катангском флористических районах), Республике Бурятия (Северобайкальском и Южно-байкальском флористических районах), Читинской области (Шилко-Аргуньском флористическом районе), республике Саха (Якутия) в Арктическом и Вилюйско-Верхнеленском флористических районах [6, 25].

В Сибири, как и в России в целом, из рода многокоренник встречается только один вид – многокоренник обыкновенный (*Spirodela polyrrhiza*), ареал которого часто накладывается с ряской маленькой и ряской тройчатой. На территории Сибири многокоренник обыкновенный встречается в Западной Сибири в Тюменской области (Тобольский флористический район),

Курганской, Томской, Новосибирской, Кемеровской областях, Алтайском крае (Барнаульский флористический район,); в Средней Сибири – в Красноярском крае (Верхнеенисейском, Тунгусском флористических районах); в Восточной Сибири в Иркутской области (Ангара-Саянском и Приленско-Катангском флористических районах), Республике Бурятия (Северобайкальском и Южно-байкальском флористических районах), республике Саха (Якутия) в Вилюйско-Верхнеленском флористическом районе [6, 25].

Рясковые относятся к водным цветковым травянистым многолетним растениям-гидрофитам, подавляющее большинство которых свободно плавают на поверхности или у самой поверхности воды (ряска тройчатая) и являются самыми маленькими растениями в мире, длина которых не превышает 1 см. Представители подсемейства рясковые часто образуют большие скопления (сплавины) и являются типичными обитателями мелких прудов, канав, запруд, болот, луж, других хорошо прогреваемых водоемов с пресной стоячей или медленно текущей, богатой органическими веществами водой. Водная среда обитания у рясковых, как и у других растений водной флоры, эволюционно привела к утрате или сильному упрощению большинства органов. Так, например, у вольфии (*Wolffia*) нет корней, у ряски (*Lemna*) с нижней поверхности листовой пластинки развивается один корень, а у многокоренника (*Spirodela*) их целый пучок. Рясковые имеют побеги, которые нечетко расчленены на стебель и небольшие удлинённые, округлые, эллиптические или почковидные листовые пластинки (листецы), которые часто соединены между собою в большие группы, за счет того, что по бокам листеца развиваются в двух особых углублениях («кармашках») новые боковые побеги. Корни рясковых выполняют несколько функций, с одной стороны они являются якорем, предотвращая переворачивание растений, с другой стороны корни переплетаясь между собой, облегчают расселение растений и увеличивают устойчивость их колоний, что особенно важно в условиях текучих водоемов.

Соцветие рясовых сильно упрощено до 1–2 мужских и одного женского цветков. Околоцветник отсутствует. Мужские цветки состоят из 1–2 тычинок, пыльники 2-х гнездные, раскрывающиеся поперечно. Женский цветок редко превышает 1 мм, завязь яйцевидная, одногнездная, с 1–6 семязачатками, столбик короткий и тонкий, рыльце расширено в форме неглубокой воронки или чаши с неровными краями. Цветение рясовых – чрезвычайно редкое явление, так в Финляндии с 1895 по 1947 гг. отмечено всего 33 случая цветения рясок; а в Польше с 1679 по 1959 гг. зафиксировано только дважды. В России за период с 1814 по 1967 гг. ученые сообщили только о 25 случаях цветения рясок. В литературе такие редкие случаи цветения рясовых связывают с их миниатюрными размерами. Цветут рясовые в июне–августе, реже в сентябре. Каждый листец производит только одно соцветие, которое у рясок развивается в одном из боковых кармашков, чаще всего в левом. Зимуют эти растения в виде семян или листцов, которые к осени утолщаются, заполняются крахмалом и оседают на дно. Плоды рясок в отличие от цветков хорошо видны невооруженным глазом, нескрывающиеся, мешочкообразные, содержат от 1 до 7 семян, снабжены зелеными крыловидными выростами по бокам и килем на нижней стороне плода, облегчающим его плавание, которое может продолжаться около 1–2 суток. Часть семян прорастают в новое растение, другая часть погружается на дно, и прорастает затем в мае следующего года. Размножение рясовых происходит главным образом вегетативно с июня по август с помощью почек, которые производят новые листцы по типу розеток всегда в одном направлении. Удваивание массы растений происходит за 1–6 дней, а удвоение количества листцов за 2–3 дня. Такое значительное увеличение биомассы за столь короткое время объясняет приводимые в литературе данные о заготовке за сезон от 350 кг до 80 т дикорастущего сырья с 1 га. При культивировании, возможна заготовка сырья в гораздо больших объемах, так, например, исследователям из Узбекистана удалось вырастить и заготовить 276 т ряски малой с 1 га всего за 8 месяцев [1, 36, 46, 49].

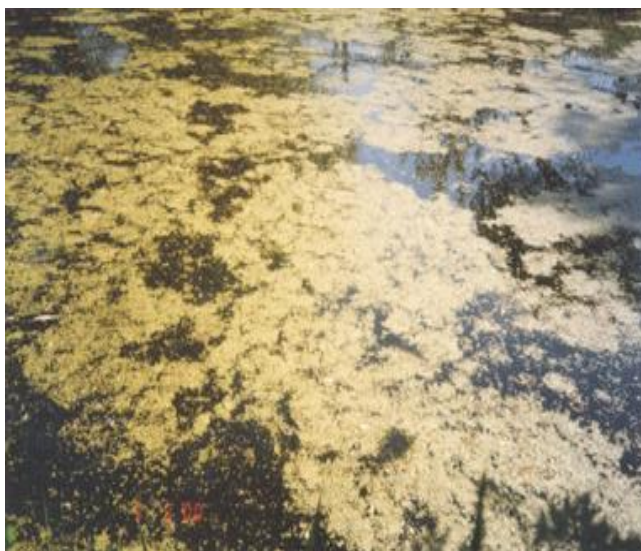


Рисунок 1 – Заросли ряски малой в окрестностях пос. Межениновка Томской области.

Таким образом, отдельные представители подсемейства рясковые – ряска малая, ряска тройчатая, многокоренник обыкновенный, произрастающие на территории России являются перспективными объектами для дальнейшего изучения благодаря обеспеченной сырьевой базе, доступности и возможности заготовки значительных объемов сырья, как в дикорастущем виде, так и в аквакультуре.

1.2. Степень изученности химического состава видов подсемейства рясковые

Обращение к крупнейшей в мире базе данных рефератов и цитирования Scopus, по ключевым словам, «*Lemnaceae*», «*Lemna*» показывает более 400 и 3800 публикаций соответственно из разных областей знаний, что говорит о большом интересе зарубежных и отечественных ученых к рассматриваемым объектам. Из 410 ссылок по ключевому слову «*Lemnaceae*» в базе Scopus 289 относятся к области сельского хозяйства, 96 - к наукам об окружающей среде, 119 – к биохимии, генетике и молекулярной биологии, на химические науки и фармакологию приходится 20 и 15 публикаций соответственно. По ключевому слову «*Lemna*» выпадает более 3800 ссылок, из которых большинство работ относятся к области сельского хозяйства (более 1700 публикаций), наукам об

окружающей среде (более 1600), к биохимии, генетики и молекулярной биологии (более 1000). Работ, относящихся к области знаний «химия» около 300, к области «фармакология», «токсикология и фармация» 287.

Анализ содержания публикаций, представленных как в базе данных Scopus, так и других информационно-поисковых системах показал, что наиболее часто модельными объектами исследований зарубежных и отечественных ученых являются *L. minor* ($\approx 60-65\%$ исследований), *Spirodella* spp. ($\approx 20-25\%$), на остальные виды *L. gibba*, *L. minuta*, *L. aequinoctalis*, *L. japonica*, *Wolffia* spp. приходится $\approx 15-20\%$. Большая часть публикаций, относящихся к разным базам данных в области знаний «химия», посвящена влиянию воздействия металлов, в том числе тяжелых металлов, наночастиц металлов на уровни их накопления в растениях, и их устойчивость к «металлическому» стрессу [58, 74, 92, 131]. Также присутствуют публикации, характеризующие внутривидовую вариабельность растений и экологические риски [105, 116, 123, 125, 129].

Кроме того, изучаются различные аспекты культивирования рясок, влияния солевого стресса на биохимические и физиологические аспекты, влияния гербицидов на ряски, на их способность детоксицировать фенол и др. [64, 68, 91, 101, 114, 135, 143].

Одна из наиболее ранних работ по изучению химического состава рясковых посвящена изучению полисахаридов *L. minor* и *Wolffia arrhiza*. В 1965 и 1967 гг. английскими учеными в гидролизатах этих видов была обнаружена апиоза – моносахарид с разветвленной цепью, при этом содержание апиозной фракции, полученной из ряски малой, составило около 4% в голоцеллюлозе, и часть ее, как было установлено сохраняется в α -целлюлозе. Несколько позднее американскими учеными из *Lemna minor* также была выделена апиоза, и получены прямые доказательства пути биосинтеза апиозы, включающие метаболизм глюкуроновой кислоты [73, 116, 123].

В 1968 году исследователями из Оксфорда в *Spirodela intermedia* были идентифицированы антоцианы (хризантемин), флавонолы (гликозиды кемпферола и кверцитина), гликофлавоны (витексин, ориентин) [103].

В 70-80-х годах прошлого века внимание исследователей было привлечено к разным видам подсемейства рясковые - *L. minor*, *L. gibba*, *L. obscura*, *L. trisulca*, *Spirodella spp.* В этот период были изучены такие группы БАВ, как полисахариды, белки, аминокислоты, жирные кислоты, фенольный комплекс.

Так, в 1970 году из клеточной стенки *L. minor* был выделен апиогалактуронан [82]. В 1972 году голландские ученые методом газожидкостной хроматографии изучили содержание свободных аминокислот *Spirodela polyrhiza* в период ингибирования роста. Было установлено, что наиболее заметные изменения содержания свободных аминокислот происходит, когда рост остановлен, также было показано, что валин ингибирует синтез изолейцина путем блокирования синтетазы ацетогидроксикислоты, изолейцин ингибирует синтез лейцина, и лейцин ингибирует общую ферментативную стадию пути валин-изолейцин [61].

J. Veen в 1975 году, изучая *Lemna gibba* и *Lemna minor* нашел множество промежуточных форм между этими видами, идентификация которых по морфологическим признакам очень сложна. Поэтому им был разработан способ их достоверной идентификации методом ТСХ, базируясь на различиях во флавоноидном паттерне по содержанию изосапонарина, лютонарина, виценина и 2 неидентифицированных соединений (в промежуточных формах) [138].

В этом же 1975 году McClure опубликовал исследование, в котором показал возможность использования данных о полифенольных соединениях для решения проблем систематики в пределах семейства *Lemnaceae*. Так, по данным McClure в *L. minor* представлено все многообразие моногликозидов (витексин, изосапонарин, сапонаретин, ориентин, гомоориентин, изоориентин), в *L. gibba* встречаются витексин, сапонаретин, ориентин,

гомоорентин, в *L. obscura* только гомоорентин. Дигликозиды в основном встречаются в *L. obscura* (виценин, ацилированный виценин, луценин, ацилированный луценин), в *L. minor* найдены только два из них – виценин и луценин, в *L. gibba* дигликозиды не обнаружены. Флавоон-О-гликозиды (лютеолин-О-гликозид) найден только в *L. minor*. Представители антоцианов найдены только в двух видах ряски - цианидин-3-гликозид в *L. gibba* и *L. minor*, петунидин-3,5-дигликозид только в *L. Minor* [104].

Польскими учеными в *Lemna minor* было определено общее содержание белка (16% сух. веса), состава аминокислот (треонин, серин, пролин, глутаминовая кислота, глицин, аланин, цистин, валин, метиолнин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, аргинин, триптофан) [98].

В другом исследовании также было изучен состав белка, его общее содержание, профиль незаменимых аминокислот. Установлено наличие лизина 4,0; метионина 0,9; изолейцина 3,6; лейцина 6,7; фенилаланина 4,2; треонина 3,1; и валина 0,9 (средние значения г/100 г белка). Авторы сделали вывод о возможности использования белкового концентрата рясок как эффективное дополнение к низкобелковой диете [124].

Американскими учеными изучено содержание общего белка в *Lemna trisulca*, собранной в заболоченном районе прерий Южной Дакоты. Авторы установили, что содержание белка варьирует от 7,1 до 17,0% в зависимости от периода отбора проб [105].

Учеными из Италии в *Lemna trisulca* были обнаружены жирные кислоты в триацилглицерольной фракции, из кислотной фракции были выделены гидроксигексадекатриеновая и простагландинподобная жирные кислоты вместе с несколькими другими неидентифицированными жирными кислотами [108, 119].

Теми же авторами в 1987 году из *L. minor* выделено и идентифицировано по физико-химическим характеристикам два новых соединения, относящихся к жирным кислотам [120].

В последующие годы интерес ученых к представителям подсемейства рясковые существенно возрос, и с начала 2000-х годов эти исследования приобрели разнонаправленный характер.

Отечественными и японскими исследователями были изучены вещества, индуцирующие цветение *Lemna paucicostata* и показано, что выделяющаяся под действием стресса жирная кислота (FIF), инкубированная с (-) - норэпинефрином (NE), сильно индуцирует образование цветков у *Lemna paucicostata*. Также было установлено, что увеличение цветоиндуцирующей активности коррелирует с уменьшением концентрации FIF в инкубационной смеси, а реакция протекает быстрее при более высоком значении pH [90, 141].

В 2000 году отечественные ученые из г. Сыктывкара: Оводов Ю. С., Головченко В. В., Оводова Р. Г. разработали и запатентовали способ получения D-апиозы из полисахарида *L. minor*, включающий обработку сырья раствором трифторуксусной кислоты определенной концентрации и температуры в течение 1-4 ч, осаждение 96% этанолом, последующим центрифугированием, концентрированием и окончательным осаждением р-ром этилового спирта [37].

Этим же коллективом авторов из свежесобранного сырья *L. minor* был выделен пектиновый полисахарид лемнан, сахарная цепь которого в основном состоит из остатков D-галактуроновой кислоты (64%), галактозы, арабинозы, ксилозы и D-апиозы. Высокое содержание D-апиозы (25%) указывает на то, что лемнан представляет собой пектин типа апиогалактуронана. Также было показано, что лемнан проявляет иммуномодулирующий эффект, активируя систему фагоцитоза [115].

В 2003 году Головченко В.В. впервые была получена полная информация по ЯМР-спектроскопии апиозы и апиобиозы. Установлено, что в лемнан, кроме галактуронана и апиогалактуронана, входит фрагмент гетерогликаногалактуронана [8].

Американскими исследователями James A. Day и F. Michael Saunders с использованием LC-MS анализа показана способность *L. minor*

метаболизировать хлорфеноловые гербициды в виде хлорфенилгликозидов. Идентификация конъюгатов позволила авторам предположить, что хлорфенолы включены в вакуоли и клеточные стенки *L. minor*, а также то, что ряска способна к поглощению и трансформации ксенобиотиков [70].

Отечественные ученые из Института физиологии Республики Коми выделили две фракции полисахаридов из каллусной культуры *L. minor*. В состав фракций входили кислый арабиногалактан и пектин, остатки галактозы и арабинозы в соотношении 2,0-2,5:1 были основными составляющими кислотного арабиногалактана, фракция пектина содержала в основном остатки гликуроновой кислоты, галактозы и арабинозы. При этом выход полисахаридных фракций не зависел от способа их выделения [78].

Несколько позднее в 2009 году этим же коллективом авторов лемнан, арабиногалактан также был выделен из каллусной культуры *L. minor*, выращенной на среде, содержащей различные концентрации β -галактозидазы [79].

В экстрактах *Lemna minor* с использованием жидкостной хроматографии (LC) был определен растительный гормон из класса жасмонатов - жасмоновой кислоты (JA). В дальнейшем авторы изучили влияние жасмоновой кислоты на цветение ряски малой в условиях ее культивирования. При этом исследователями было установлено, что в течение вегетационного периода, и особенно на трех стадиях роста уровень кислоты существенно меняется. Экспериментальные результаты показывают, что жасмоновая кислота способствует цветочной индукции и дифференциации цветков [86, 89].

В Институте биологических проблем Севера СО РАН (г. Якутск) была изучена роль каротиноидов в регуляции устойчивости *Spirodella polyrrhiza*, культивируемой в лабораторных условиях на примере кратковременного холодового шока. При этом было установлено, что на фоне не изменяющегося содержания суммы каротиноидов, увеличивается пул лютеолин + эсаксантин с одновременным уменьшением содержания виолаксантина. Таким образом, полученные авторами результаты показывают, что пигменты

виолаксантинового цикла могут участвовать в реализации транзиторных аварийных систем защиты ФСА путем увеличения доли тепловой диссипации энергии поглощенных квантов света и предотвращения образования синглетного кислорода [47].

Американскими исследователями успешно использована трансгенная ряска малая для производства нескольких биотерапевтических белков, в частности, моноклональных антител растительного происхождения [60].

Изучение метанольных экстрактов 15 партий коммерческих образцов растительного сырья *Spirodela polyrrhiza* методом ВЭЖХ-ESI-MS показало присутствие 18 флавоноидов, 14 из которых обнаружены впервые. При этом количественный анализ показал присутствие пяти основных флавоноидов (лютеолин-8-С-глюкозида, апигенин-8-С-глюкозида, лютеолин-7-О-глюкозида, апигенин-7-О-глюкозида, лютеолина) в диапазоне концентраций от 4,28 до 19,87 мг/г [121].

В другом исследовании, отечественными авторами был впервые изучен химический состав низкомолекулярных вторичных метаболитов *Spirodela polyrrhiza*, заготовленной в середине вегетационного периода в одном из прудов в Северо-Западной части России. Использование метода ГХ-МС позволило установить, что в середине вегетационного периода (в июле) эфирное масло *S. polyrrhiza* содержит 89 летучих органических соединений, 83 из которых были идентифицированы. К числу основных низкомолекулярных метаболитов были отнесены манол (25,11%), биформен (12,83%) и фитол (8,05%), которые ценны с практической точки зрения и могут играть очень важную роль в водных экосистемах [90].

Коллективом авторов из Харькова были изучены биологически активные вещества *Lemna minor*, заготовленной в Харьковской области в 2010-2011 гг. Титриметрически установлено содержание йода (0,029%), спектрофотометрически – содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид (0,38%), атомно-эмиссионным методом – 14 элементов (Ca, K, Na, Mg, Fe, P, Al, Mn, Ni, Cu, Pb, Mo, Zn), методом ВЭЖХ – жирные кислоты и их

производные (этилпальмитат), насыщенные карбоновые кислоты и их производные (этилкапронат, капроновая кислота), альдегиды и кетоны (гексаналь, транс-2-гептеналь, нонаналь, транс-2-октеналь, гексагидроксифарнезилацетон), многоатомные спирты (2,6-диметилциклогексанол, этилгептаноат), производные гетероциклических соединений (пиррол-2,5-дион), алканы (пентадекан, тетрадекан, гептадекан), ароматические спирты (ментол), алифатические кислоты и их эфиры (этилтетрадеканоат), монотерпеновые лактоны (лолиолид), олефины (дигидроактинидиолид, цис-неофитадиен), дитерпеновые спирты (фитол), насыщенные углеводороды (пентакозан, гептакозан, хенейкозан, трикозан), сложные эфиры (этилпентадеканоат), фитостерины (стигмастерол, кемпестерол, спинатсерон, ситостерол, ситостерон), методом ГХМС установлено количественное содержание 32 групп БАВ, среди которых в мажорных количествах накапливаются – жирные кислоты 11,1 мк/кг; фитостерины 52,8 мк/кг; альдегиды и кетоны 20,2 мк/кг; насыщенные углеводороды 23,1 мк/кг [5].

Учеными из Великобритании определен состав полисахаридов клеточной стенки *Lemna minor*, для которого, по данным авторов, характерным является высокая пропорция гемицеллюлозы (3,5%), представленной ксилогликаном и ксиланом, крахмала, пектина (20,3%), представленного галактуронаном, ксилогалактуронаном, рамногалактуронаном, и низкое содержание лигнина. В этом же исследовании были обнаружены эссенциальные жирные кислоты (0,6% α -линолевой кислоты), п-кумаровая кислота (0,015%) [142].

Проведенное нами в 2007 году методом плазменной атомно-эмиссионной спектроскопии изучение состава макро- и микроэлементов ряски малой и ряски тройчатой, собранной в водоемах Томской области показало наличие 18 элементов: Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Cr, B, Si, Ni, V, Zr, Ti, Al, Pb, Cd, Be. Количественное содержание элементов в ряске малой составило, мг/г: Ca – 200; Si – 54; Ni – 2,8; Fe – 2; Mg – 2; Mn – 1,3; B – 0,24; Al – 0,57; Cr – 0,06; Zn – 0,04;

Ti-0,05; Be-0,01; Pb-0,008; Co-0,03; V и Zr- 0,003; Cu-0,002; Cd-0,00035. Количественное содержание элементов в ряске тройчатой, мг/г: Ca-300; Si-25; Mg-3; Ni-1,6; Al-0,72; B-0,45; Mn-0,3; Fe-0,57; Cr-0,15; Zn-0,021; Pb-0,006; Co-0,003; Cu-0,001; Zr-0,001; Ti-0,05; Cd-0,00009; V-0,008; Be-0,008. Установленные различия в содержании макро-и микроэлементов свидетельствуют о более эффективном накоплении элементов *Lemna minor*. Так, например, ряска малая превосходит ряску тройчатую по содержанию Co в 10 раз, Mn более чем в 4 раза, Fe более чем в 3 раза, Zn, Cu и Si более чем в 2 раза, Ni более чем в 1,5раза [33].

Позже в других наших исследованиях был изучен качественный состав и содержание веществ первичного обмена в нескольких видах подсемейства рясковые - *Lemna minor*, *Lemna trisulca* и *Spirodella polyrrhiza*, собранных в период вегетации в 2010–2011 гг. в малопроточных и стоячих водоемах Кожевниковского и Томского районов Томской области. Установлено, что наименьшее количество аминокислот содержится в водном извлечении *Lemna trisulca* – 59,70 мг, что в два раза меньше, чем в извлечениях из *Lemna minor* и *Spirodella polyrrhiza* (127,9 и 131,55 мг соответственно). Минимальное содержание свободных и связанных моносахаридов определено в *Lemna minor* – 10,54%, в то время как в *Lemna trisulca* и *Spirodella polyrrhiza* их содержание составляет 14,30 и 15,35% соответственно. Показано качественное и количественное видовое отличие свободных и связанных моносахаров и аминокислотного состава. Исследование качественного и количественного аминокислотного состава *Lemna minor* с использованием метода ВЭЖХ показало наличие 18 протеиногенных аминокислот, из которых 8 незаменимых, представленных моноаминомонокарбоновыми и диаминомонокарбоновыми. Сумма заменяемых аминокислот представлена моноаминокарбоновой, моноаминодикарбоновой, диаминомонокарбоновой и гетероциклической кислотами.

Методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии изучен качественный состав и содержание полифенольного

комплекса. Установлено наибольшее содержание фенолокислот (10,8%), суммы флавоноидов, изофлавоноидов и кумаринов (14,7%) в *Spirodella polyrrhiza*, содержание хлорогеновой и 3,5-дигидроксibenзойной кислот также в этом виде было в 2–9 раз больше, чем в других видах. В этом же исследовании на мышах линий C57BL/6 и BALB/C изучена иммуномодулирующая активность экстрактов трех видов рясковых. Пролиферацию клеток оценивали с помощью колориметра, определение антителообразующих клеток проводили методом локального гемолиза, титр антител оценивали в реакции гемагглютинации. *Lemna minor* и *Lemna trisulca* в концентрации 5 мкг/мл, *Spirodella polyrrhiza* в диапазоне концентраций 0,50–160 мкг/мл не обладали токсическим воздействием на антигенпрезентирующие клетки. Инкубация с *Lemna trisulca* (20 мкг/мл) пролиферация макрофагов снижается в 1,2 раза, а при инкубации с *Lemna minor* и *Lemna trisulca* (80 мкг/мл) в 1,2 и 1,8 раза соответственно. Полифенольный комплекс *Spirodella polyrrhiza* таким действием не обладает. Курсовое введение *Lemna trisulca* и *Spirodella polyrrhiza* приводило к достоверному снижению числа антителообразующих клеток в 1,5 и 2,3 раза и уменьшению величины локальной реакции гиперчувствительности в 1,9 и 1,5 раза соответственно [2, 34–35].

Из *Lemna japonica* были выделены и идентифицированы кроме семи известных, три ранее неописанных флавоновых гликозида: лютеолин-6-С- (2''-О-транс-каффеоил-Д-малат)-β-глюкозид, апигенин 6-С- (2''-О-транс-каффеоил-Д-малат)-β-глюкозид и лютеолин 6-С-(2''-О-транс-кумароил-Д-малат) - β глюкозид. Впервые выделенные из ряски японской вещества проявили слабую цитотоксичность в отношении клеточных линий HepG-2, SW-620 и A-549 со значениями IC₅₀ между 42,5 и 19,2 мкг/мл, и умеренную антиоксидантную активность. Лютеолин 6-С-(2''-О-транс-кумароил-Д-малат)-β-глюкозид проявил умеренную нематоцидную активность со значением EC₅₀ 1,56 мг/мл [59].

Корейскими исследователями изучено содержание общих фенолов, флавоноидов и антиоксидантная активность водных и этанольных экстрактов *Spirodela polyrhiza in vitro*. В ходе данного исследования установлено, что общее содержание фенолов в водном и этанольном экстрактах составляет 52,75-293,4 и 60,12-398,4 мг/г соответственно; общее содержание флавоноидов в этанольном экстракте (38,25-159,4 мг/г) выше, чем в водном экстракте (38,25-67,75 мг/г). Водные и этанольные экстракты обладают дозозависимым антирадикальным действием в диапазоне концентраций 100–2500 мкг/мл. Антирадикальная активность (DPPH) этанольного экстракта (2,87% -59,5%) выше, чем водного (4,12% -81,52%). IC₅₀ DPPH водного и этанольного экстрактов составляли 2100 и 1034 мкг/мл соответственно. IC₅₀ ABTS водного и этанольного экстрактов составляли 798,7 и 457,1 мкг/мл соответственно. Активность по удалению радикалов соевой липоксигеназы (SLO) водными и этанольными экстрактами составляла 157,7-168,0% и 148,0-1616,4% соответственно. Эти результаты показывают, что водные и этанольные экстракты могут быть использованы в качестве потенциальных антиоксидантов [128].

В исследовании ученых из Китая из *Spirodela polyrhiza* были выделены семь флавоноидов методом высоко-высокоскоростной противоточной хроматографии (HSCCC). Выделенные соединения были идентифицированы с помощью УФ-спектров и масс-спектрометрии (ориентин, витексин, лютеолин 7-О-глюкозид, апигенин 7-О-глюкозид, лютеолин 8-ферулоил-глюкозид, апигенин 8-ферулоил-глюкозид, лютеолин) [122].

В опубликованном в 2019 году обзоре традиционного использования, химического состава и фармакологических свойств *Lemna minor*, Ali Esmail Al-Snafi обобщил имеющиеся в литературе по данному объекту сведения. Автор приводит данные о содержании в ряске малой протеина - 16-45%, жира - 4,0-4,4 %, п-кумаровой кислоты - 0,015 %, золы - 4-5 %, каротиноидов 37-42 мг %, йода - 0,0294 %, флавоноидов - 0,38 %, кальция - 4990 мг/100 г, кремния - 2495 мг/100 г, натрия - 1870 мг/100 г, магния - 155 мг/100 г, железа - 934

мг/100 г, фосфора - 515 мг/100 г, алюминия - 0,93 мг/100 г, марганца - 935 мг/100 г, никеля - 0,93 мг/100 г, меди - 0,78 мг/100 г, свинца - 0,03 мг/100 г, молибдена - 0,02 мг/100 г, цинка - 0,01 мг/100 г, незаменимых аминокислот - 48,67 %, глутаминовой кислоты - 13,53-25,87 % от общего количества незаменимых аминокислот; аспарагиновой кислоты - 9,89 %, треонина - 5,08 %, серина - 4,05 %, пролина - 4,88 %, глицина - 7,36 %, аланина - 7,88 %, метионина - 0,39 %, изолейцина - 5,89 %, лейцина - 10,27 %, тирозина - 2,76 %, фенилаланина - 6,28 %, лизина - 6,20 %, гистидина - 2,32 %, аргинина - 4,67 %, триптофана - 0,85 %; α -линоленовой кислоты от 41 до 47 %, линолевой кислоты - 17-18 %; общее содержание жирных кислот - 10,6 %, триацилглицерина - 0,03 % сух. веса [56].

Таким образом, вышеприведенная информация показывает большой интерес отечественных и зарубежных ученых к различным видам подсемейства рясковые. Однако, несмотря на значительное количество информации о составе и содержании БАВ разных видов рясковых, по отдельным представителям и группам БАВ она носит фрагментарный характер, фитохимическая характеристика многих видов не полная, а у некоторых представителей подсемейства отсутствует.

Следует отметить, что наиболее изученным является состав аминокислот, жирных кислот отдельных видов рода *Lemna* (*Lemna minor*, *Lemna trisulca*), рода *Spirodella* (*Spirodela polyrhiza*), общее содержание белка. Достаточно фрагментарно изучены полисахаридный состав видов, широко распространенных на территории России и Сибири - *Lemna minor*, *Lemna trisulca*, *Spirodela polyrhiza*, фенольный, минеральный комплекс, состав жирных кислот *Lemna trisulca*, *Spirodela polyrhiza*.

1.3. Сведения об использовании в народной медицине, экспериментальных фармакологических свойствах видов подсемейства рясковые

Несмотря на достаточно широкое распространение в мире растений подсемейства рясковые, в народной медицине разных стран имеется в основном упоминание только об использовании *Lemna minor*.

Так, например, в китайской и русской народной медицине ряску малую в виде отвара применяли внутрь при аллергических заболеваниях, крапивнице, ангионевротических отеках и витилиго, в качестве наружного средства при карбункулах, опухолях, рожистом воспалении, укусах змей и конъюнктивитах. В арабской медицине, медицине стран Европы отвары и настои ряски малой рекомендуют внутрь в качестве кровоостанавливающего, общеукрепляющего, вяжущего, желчегонного, противогриппозного, противогриппозного, антимикробного средства при бронхиальной астме, полипах, ринитах, ларингитах, фарингитах, бронхитах, диспепсии, для обмываний и смачивания ран, язв и фурункулов; в форме припарок в качестве болеутоляющего рекомендуется при ломоте в суставах, ревматизме, подагре, как смягчительное при кашле и геморрое. При потере обоняния, воспалении ушей, долго не заживающих ранах, трещинах и ссадинах готовят мазь из ряски малой и домашнего коровьего молока в соотношении 9:1 и растворы для марлевых турунд [26, 43, 54].

Немецкая народная медицина рекомендует применять спиртовую настойку ряски малой в виде капель при воспалении слизистой оболочки верхних дыхательных путей, хроническом упорном насморке, ларингите, фарингите, желтухе и ревматизме. В дерматологии внутрь и наружно ряску назначают при аллергических заболеваниях кожи (крапивнице, экземе, нейродермите, отеке Квинке, почесухах и др.), поседении волос, облысении, псориазе, витилиго и других заболеваниях кожи. Наружно настойкой смазывают места укусов мошек и комаров для снятия зуда и отечности [26, 43, 32].

Часто в литературе приводятся сведения об использовании ряски малой для лечения витилиго, профилактики бронхиальной астмы, частых простудных заболеваний и разных видов аллергий. С этой целью сухую траву ряски смешивают с медом в соотношении 1:1, выкатывают шарики величиной с горошину, высушивают в течение 5-6 часов при температуре 50-60°C и в таком виде принимают внутрь по 1-3 шарика 3-4 раза в день [26, 43, 54].

Несмотря на то, что в народной медицине нашла применение только ряска малая, объектами экспериментального исследования биологической активности стали и другие виды подсемейства рясковые. Систематизация имеющихся в литературе сведений об исследовании биологической активности видов подсемейства рясковые, проводимых учеными разных стран, позволяет говорить о результатах изучения разных видов активности суммарных водных, спиртовых экстрактов, отдельных полисахаридов и флавоноидов *Lemna minor*, *Lemna trisulca* и *Spirodela polyrhiza*.

В одном из наиболее ранних исследований биологической активности выше указанных видов, была показана противоопухолевая активность индивидуальных флавоноидов *Spirodela polyrhiza* [24]. Наиболее изученной на сегодняшний день является антибактериальная и антигрибковая активность *Lemna minor* и *Spirodela polyrhiza*.

В нескольких исследованиях ученых из разных стран различными методами *in vitro* были изучены антиоксидантная, антибактериальная, антигрибковая активность водных и водно-этанольных экстрактов ряски малой. Как отмечают авторы, водный, водно-этанольный экстракты проявляют антиоксидантные свойства, оказывают выраженное антибактериальное действие против *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sicca*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, и *Streptococcus pneumoniae*, антигрибковое действие в отношении *Candida parapsilosis* и *Candida glabrata* [77, 129].

В исследовании антигрибковой и антибактериальной активности ряски малой по отношению к *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* и *Candida albicans*, выполненном отечественными учеными было выявлено, что этанольный экстракт ингибирует рост штаммов *Candida albicans* в концентрации 191-193 мкг/мл. Сравнение активности экстрактов, показало, что тест-отклик патогенных культур был более выражен в экспериментах с экстрактами, полученными после предварительного измельчения ряски. Также было установлено, что все экстракты не проявляют активности по отношению к возбудителям сальмонеллеза и дифтерии [3].

Исследование противогрибковых свойств суммарных комплексов, выделенных из травы ряски малой, показало, что они проявляют выраженную активность в концентрации 1,9 -15,6 мкг/мл в отношении возбудителей микозов стоп (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*) и не проявляют активности в концентрации 1000 мкг/мл в отношении *Candida albicans* и *Aspergillus niger*. Из исследуемых фракций по способности ингибировать рост поверхностных дерматофитов, выделяются фенольный и полисахаридный комплексы [13].

В обзоре Ali Esmail Al-Snafi приводятся сведения об антимикробной активности метанольного экстракта *Lemna minor*, которое было изучено в отношении *Bacillus subtilis* (NCIM-2063), *Escherichi coli* (NCIM-2065), *Pseudomonas aeruginosa* (NCIM-2200), *Staphylococcus aureus* (NCIM-2079), *Micrococcus luteus* (NCIM-2103), *Shigella flexneri* (NCIM-2012), *Bacillus megaterium* (NCIM-2256) и *Salmonella typhi* (NCIM-2501). Метанольные экстракты показали хорошую антибактериальную активность против *Shigella flexneri*, в то время как они обладали умеренной активностью против *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Micrococcus luteus*, а в отношении *Escherichi coli*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhi* экстракты показали слабый ответ. Наименьшие значения минимальных ингибирующих концентраций для метанольных экстрактов были 12, 40, 60, 90 и 170 мкг / мл соответственно

против *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Антибактериальное действие метанольного экстракта *Lemna minor* изучали в отношении *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae Bengal*, *Vibrio cholerae El-Tor*, *Vibrio cholerae Non*, *Vibrio alginolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalococacus agalus*, изоляты стрептококковых бактерий (штамм *Strattococactus*), кишечные бактерии (*Streptococacus*), среди протестированных бактерий не было чувствительных к экстракту. Бактериальные изоляты показали ответ на метанольные экстракты, при этом ингибирование роста происходило в концентрации 1,8-2,0 мг/мл для всех протестированных бактерий.

Антимикробную активность водного экстракта *Lemna minor* подвергали скринингу против *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* использованием метода дисков. Экстракт был активен против *Staphylococcus aureus* со средней зоной подавления 25 мм.

Изучена антимикробная активность лиофилизированного водного экстракта и этанольного экстракта ряски малой в отношении *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sicca*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, а также изучал антикандицидный эффект против *Candida parapsilosis* и *Candida glabrata*. Большинство грамположительных и грамотрицательных бактерий и видов *Candida* были ингибированы обоими экстрактами [56].

Коллективом авторов методом диффузии дисков изучена антимикробная активность этанольного экстракта, фракций этанольного экстракта *Spirodela polyrhiza* против штаммов грамотрицательных бактерий *Aeromonas hydrophila* (АН1), *Pseudomonas putida* (АТСС 49128), *P. aeruginosa* (АТСС 25072), *P. fluorescens* (ПФ1), *Vibriopara haemolyticus* (АТСС 17802), *V. alginolyticus* (АТСС 17749), *Escherichia coli* (ЕС1) и штаммов грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* (АТСС

6538), грибковых микроорганизмов *Candida albicans* и *Saprolegnia parasitica*. Было установлено, что экстракт обладает широким спектром активности против тестируемых организмов с диаметром зон ингибирования от 16 до 90 мм. №85 [67].

Также к числу изученных видов активности *Lemna minor* следует отнести противовоспалительную. Отечественные исследователи изучили действие лемнана–пектина ряски малой на воспалительную реакцию на овальбумин. Было установлено, что лемнан в дозе 1-2 мг усиливает отек лапки у контрольных животных на 50-60% на фоне перорального введения овальбумина. Было показано, что апиогалактуронановый фрагмент (LMP), образующийся после расщепления лемнана LM пектиназой, увеличивает ответ на подушечку лап у контрольных мышей и мышей, получавших овальбумин. Фрагмент LMPH, лишенный некоторых концевых остатков апиозы в результате частичного кислотного гидролиза, не оказывал влияния на воспалительный ответ. Таким образом, полученные данные показывают усиление воспалительного ответа лемнаном [118].

Нами также была изучена противовоспалительная активность этанольного экстракта *Lemna minor* в дозах 100 и 200 мг/кг на мышах на моделях каррагенинового и воспаления, вызванного иммобилизационным стрессом. Пероральное введение экспериментальным животным экстракта *Lemna minor* в течение 5 дней в 1,5 раза снижало величину карагенинового отека, по сравнению с контрольными животными. Изучение противовоспалительного действия на модели иммобилизационного стресса показало, что экстракт *Lemna minor* не подавляет деструктивный воспалительный процесс в стенке желудка, вызванный острым пептическим повреждением [17].

Наличие противовоспалительных свойств другого представителя подсемейства рясковые было показано китайскими учеными. Ими установлено, что этанольный экстракт *Spirodela polyrhiza* ингибирует LPS-индуцированное воспаление в клетках RAW264.7 [85].

Исследование гастропротективных свойств лемнана, выделенного из *Lemna minor* на крысах самцах показало, что лемнан обладает гастропротекторным эффектом, который сопровождается уменьшением количества и размеров деструктивных областей в желудочно-кишечном тракте при язвенном поражении, снижением дефицита АТФ и гликогена, уменьшением избытка лактат и нормализация энергетического баланса. По противоязвенной активности лемнан может быть рекомендован к применению при профилактике и лечении заболеваний желудка вместе с базовой терапией [84].

Этим же коллективом авторов были изучены криопротекторные свойства лемнана из *L. minor*. Авторы показали, что лемнан может служить эффективным криопротективным средством, предотвращающим разрушение оболочек ядросодержащих клеток в крови, подвергшейся охлаждению (до -10°C) и последующему прогреванию [134].

Сотрудниками кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, совместно с кафедрой биологии и генетики СибГМУ была изучена антимуtagenная активность водного экстракта *Lemna minor*. В экспериментах на мышах показано, что исследуемый экстракт обладает перспективным антимуtagenным действием, что позволяет рассматривать ряску малую как перспективный объект для создания эффективных и безвредных препаратов или биологически активных добавок - корректоров мутагенеза [16].

Украинскими учеными проведено экспериментальное изучение оценки эффективности влияния водного экстракта *Lemna minor* на показатели углеводного обмена у крыс в условиях гипотиреоза, который вызывали введением 1% раствора перхлората натрия вместо питьевой воды в течение 20 дней. Через 20 дней экспериментальным животным с гипотиреозом вводили водный экстракт *Lemna minor* в дозе 0,5 мл/100 г и препарат сравнения Йодомарин в дозе 12 мкг йода/кг. Установлено выраженное корректирующее действие водного экстракта *Lemna minor* на синтетическую функцию щитовидной железы и показатели углеводного обмена в условиях гипотиреоза,

которое проявлялось в нормализации уровня тиреоидных гормонов, повышении содержания глюкозы в сыворотке крови и снижении содержания гликогена в гомогенате печени, восстановлении элементного баланса (повышении содержания натрия, хлора, фосфора, магния, цинка, железа и снижении содержания меди и кальция) в сыворотке крови. Таким образом, водный экстракт *Lemna minor* может быть отнесен к регуляторам гипофункции щитовидной железы и углеводного обмена [19].

В конце 60-х начале 70-х годов прошлого века была изучена желчегонная активность *Lemna minor*, *Lemna trisulca*. В эксперименте на крысах показано наличие желчегонной активности водного экстракта *Lemna minor*, и индивидуальных флавоноидов *Lemna minor* и *Lemna trisulca* [24, 38, 50].

Корейские ученые исследовали эффект ингибирования адипогенеза на накопление липидов, клетки 3T3-L1 после обработки бутанольной фракцией и индивидуальными флавоноидами *Spirodela polyrhiza*. Бутанольная фракция проявляла сильную антиадипогенезную активность и снижала уровень экспрессии белка C/EBP α и PPAR γ в клетках 3T3-L1 без значительной цитотоксичности. Исследования по эффекту ингибирования адипогенеза и внутриклеточного накопления триглицеридов показали, что флавоноиды витексин и ориентин обладают наибольшей активностью и снижают уровень экспрессии белка C/EBP α и PPAR γ в клетках 3T3-L1. Эти результаты показывают, что флавоноиды витексин и ориентин, выделенные из бутанольной фракции, особенно способствуют ингибирующей активности *S. polyrhiza* в клетках 3T3-L1. Сопоставимый эффект суммарной фракции предполагает, что и другие соединения могут также оказывать ингибирующее влияние на адипогенез SPB. В целом авторы отмечают, что полученные ими результаты указывают на то, что флавоноиды и другие, еще не идентифицированные соединения *S. polyrhiza* могут быть полезны для дальнейших исследований их возможной роли в профилактике ожирения [85].

Фибринолитическая протеаза, выделенная из *Spirodela polyrhiza* гидролизует не только фибрин, но и фибриноген. Фермент имел антикоагулянтную активность, измеренную по активированному частичному времени тромбопластина, времени тромбина и времени протромбина в плазме крыс. Он удваивается в три раза при 69, 29 и 221 нМ соответственно. Белок обладал антикоагулянтной активностью при приеме внутрь и перорально. Максимальная задержка в активированном частичном времени тромбопластина была при дозе 0,52 и 4,2 мг Вг кг для внутривенного и перорального введения, соответственно. Авторы делают вывод о том, что этот белок может быть полезен для клинического применения с целью антикоагуляции [67]. Антиоксидантная и антирадикальная активность лиофилизированных водных и этанольных экстрактов *Lemna minor* изучена на различных моделях *in vitro*. Леофилизированный водный и этанольный экстракт в концентрациях 45 мкг/мл показали ингибирование перекисного окисления липидов эмульсии линолевой кислоты 100% и 94,2% соответственно, при этом ВНА, ВНТ, α -токоферол и тролокс ингибировали 92,2%, 99,6%, 84,6% и 95,6% соответственно. Поглощающая активность H_2O_2 , хелатирующая активность ионов железа и супероксидсодержащая активность для воды и этанольного экстракта *Lemna minor* составляли $92,3 \pm 2,8$ и $85,7 \pm 1,1$, $63,0 \pm 6,9$ и $61,0 \pm 6,0$, $38,8 \pm 3,1$ и $23,0 \pm 2,4$ % соответственно. Таким образом, водные и этанольные экстракты *Lemna minor* обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью.

Метанольные экстракты *Lemna minor* показали цитотоксическую активность в отношении креветок в концентрации 140,64 мкг / мл, приводя к их 50% смертности [56].

В 2009 году нами была проведена оценка адсорбционных свойств *Lemna minor* и *Lemna trisulca* по методике ГОСТ 4453-74, которая показала, что *Lemna minor* и *Lemna trisulca* проявляют адсорбирующую активность 284,6-291,3 мг/г, сравнимую с препаратом сравнения - активированным углем (295,5 мг/г) [18].

Таким образом, приведенные данные, указывают на большой спектр биологической активности некоторых видов подсемейства рясковые, проявляющих противовоспалительное, гастропротективное, желчегонное, антимуtagenное, антиоксидантное, антирадикальное, цитотоксическое, антикоагулянтное, антимикробное, антиадипогенезное, криопротекторное, противоопухолевое действие, адсорбирующую активность, а также обладающих корректирующим действием на синтетическую функцию щитовидной железы и показатели углеводного обмена.

Однако, несмотря на достаточно широкий спектр фармакологической активности, официально зарегистрированных лекарственных препаратов из видов подсемейства рясковые в России и за рубежом нет. Представленный на фармацевтическом рынке России ассортимент продукции на основе видов данного подсемейства крайне невелик и включает только чайные напитки и пилюли на основе *Lemna minor*, выпускаемые несколькими производителями: ООО Лекрасэт, ООО «Старослав», фитолаборатория Мариславна, ООО Хорст, ООО Алфит, ООО Беловодье, ООО Азбука трав (рисунок 2). При этом все производители позиционируют настои, припарки и пилюли на основе *Lemna minor* как средства с мочегонным, желчегонным, жаропонижающим, антимикробным, вяжущим, спазмолитическим, кровоостанавливающим, обезболивающим, противоопухолевым, десенсибилизирующим, противоглистным действием. Отдельные производители (фитолаборатория Мариславна и Азбука трав) рекомендуют *Lemna minor* еще при витилиго, аллергии, псориазе, нейродермите, сахарном диабете, полипах, импотенции, как дополнительный источник брома, йода, кальция, железа.

Один из продуктов (Алфит-4) Алтайского краевого фитоцентра «Алфит» рекомендован для лечения и профилактики заболеваний щитовидной железы; другой (Алфит-16) - для снижения веса; *Lemna minor* входит в состав сбора Фитол-2 для профилактики остеохондроза и заболеваний суставов.



Рисунок 2 – Ассортимент продукции отечественных производителей на основе *Lemna minor*.

Зарубежный рынок представлен гомеопатическими препаратами и БАДами на основе *Lemna minor* и видов рода *Wolffia*. Так, из *Lemna minor* получают гомеопатический раствор, рекомендуемый для лечения заложенности в носу, ринитов, головной боли, диареи, болях в кишечнике при повышенном газообразовании. *Lemna minor* и виды рода *Wolffia* используют для получения веганского протеинового порошка, который позиционируется производителями как «не химический, минимально обработанный в процессе получения, высокопитательный, хорошо усвояемый продукт, с большим содержанием омега-3 кислот» (рис.3).

О возможности использования одного из видов ряски в качестве продуктов функционального питания сообщается в одной из публикаций латиноамериканских авторов. Исследователи изучили питательную ценность, состав биологически активных соединений мексиканских видов *Lemna gibba* и *Ulva lactuca* для оценки возможного использования в рецептурах функциональных пищевых продуктов. По мнению авторов исследования, *L. gibba* является прекрасным источником белка, а *U. lactuca* - источником энергии благодаря высокому содержанию восьми незаменимых аминокислот,

прежде всего, лизина и метионина, существенному количеству инулина, ксантофиллу, β -каротину, лютеину, ликопину, неоксантину, полиненасыщенной жирной кислоте (α -линоленовая кислота). На основании полученных результатов оба изученных водных растения признаны пригодными для производства продуктов функционального питания [55].

Интересным является опыт совместной работы немецких и чешских фармакологов по разработке и созданию БАДов для лечения витилиго на основе ряски малой. Линейка БАДов, выпускаемых уже более десяти лет фармацевтическим заводом Purus Meda SRO в г.Брно (Чехия) включает таблетированные формы, гели («Vitilemna», «Vitilem +», «VitiStel», «Stop Vitiligo»), содержащие экстракт *Lemna minor*, и смолу экстракта *Lemna minor* (рисунок 3).



Рисунок 3 – Ассортимент продукции зарубежных производителей на основе *Lemna minor* и видов рода *Wolffia*.

Таким образом, анализ номенклатуры продукции отечественного и зарубежного производства, опыта народной медицины, экспериментальной фармакологической активности показывает, что возможности использования видов подсемейства рясковые при разработке лекарственных средств и парафармацевтической продукции до сих пор недостаточно изучены и могут быть гораздо шире.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Растения подсемейства рясковые имеют обширный ареал обитания: произрастают в Америке, Европе, Африке, Австралии, на всей территории России, в том числе и Западной Сибири. Рясковые отличаются высокой ресурсообеспеченностью за счет удвоения биомассы в течение 1-6 дней вегетационного периода. Это позволяет заготавливать до 80 тонн растительного сырья с 1 гектара. Культивирование ряски по данным литературы, позволяет увеличить заготавливаемую массу сырья до 276 тонн с 1 гектара.

2. Растения подсемейства рясковые обладают широким спектром фармакологических свойств (противовоспалительное, антимикробное, гастропротективное, антиоксидантное, противогрибковое), однако эти свойства не реализованы в современной медицине, в России на данный момент, ряска не является лекарственным растительным сырьем.

3. Представители подсемейства рясковые имеют богатый химический состав: пектиновые полисахариды, флавоновые гликозиды, антоцианы, аминокислоты, жирные кислоты, макро- и микроэлементы. Вместе с тем сведения о химическом составе ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.), многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* Schleid), являются фрагментарными. Таким образом, представляет интерес более углубленное фитохимическое исследование данных растений.

4. Приведённые сведения свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения и использования некоторых видов подсемейства рясковых для разработки лекарственных средств, парафармацевтических и других продуктов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служила трава трех видов растений семейства *Lemnaceae*, собранных в естественных местах обитания на территории Томской, Кемеровской и Новосибирской областей в 2011-2019 годах: ряска малая (*Lemna minor* L.) – *LM*, ряска тройчатая (*Lemna trisulca* L.) – *LT*, многокоренник обыкновенный (*Spirodella polyrrhiza* Schleid, син. ряска многокорневая – *Lemna polyrrhiza* L.) – *SP*.

Указанные виды были отобраны на основании анализа данных литературы, как наиболее распространенные на территории Западной Сибири [6, 24, 38]. Собранное ручным способом сырье высушивали до воздушно-сухого состояния в хорошо проветриваемом месте под навесом, при температуре 15-25 °С, в течение 3-10 суток до содержания влаги 5-6%. Определение влажности сырья проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья» [11]. Исследуемые образцы упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации [10-11].

Для исследования химического состава и биологической активности использовали сухие экстракты (на воде очищенной и 70% этаноле) и фракции, полученные с использованием в качестве экстрагентов хлороформа, этилацетата и н-бутанола.

2.2. Методы фармакогностического исследования

2.2.1. Методы анатомо-морфологического исследования

Определение подлинности объектов исследования проводили на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники экологии Сибирского государственного медицинского университета.

Внешние признаки листецов (травы) трех видов рясок изучали невооруженным глазом, с помощью ручной лупы и под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (увеличения от 8x1 до 32x4) по методикам ОФС «Травы» ГФ XIV издания.

Приготовление и анализ микропрепаратов травы рясок проводили в соответствии с рекомендациями ОФС «Травы» и ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов» ГФ XIV издания [11].

Микропрепараты изучали под световым микроскопом Carl Zeiss, фотографии получали с помощью цифрового фотоаппарата «Canon» 500Di обрабатывали на компьютере в программе «Adobe Photoshop CS». Для получения объективных данных анализировали не менее пяти препаратов.

2.2.2. Методы исследования химического состава

Для анализа химического состава БАВ в исследуемых объектах использовали различные качественные реакции, спектральные, хроматографические и другие общепринятые методы анализа [4, 7, 12, 15, 21, 22, 23, 27, 28, 40, 41, 45, 53].

2.2.2.1. Получение суммарных комплексов и их фракций

Сухие экстракты для изучения химического состава и биологической активности получали методом дробной мацерации при нагревании на воде очищенной и 70% этаноле. С этой целью навеску сырья заливали соответствующим растворителем (1:10) и нагревали на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения растворителя в течение 30 минут. Экстракцию в указанных условиях проводили еще дважды. Полученные извлечения отделяли от обработанного сырья процеживанием, растворитель удаляли под вакуумом, остаток высушивали с помощью лиофильной (вакуум-сублимационной) и конвективной (термовентилятор) сушки, высушенные экстракты измельчали. Для разделения сложных смесей веществ водно-спиртового экстракта, применяли методы избирательной экстракции, используя в качестве экстрагентов хлороформ, этилацетат и н-бутанол. Подробная схема получения водно-спиртового экстракта и его фракций показана на рисунке 4.

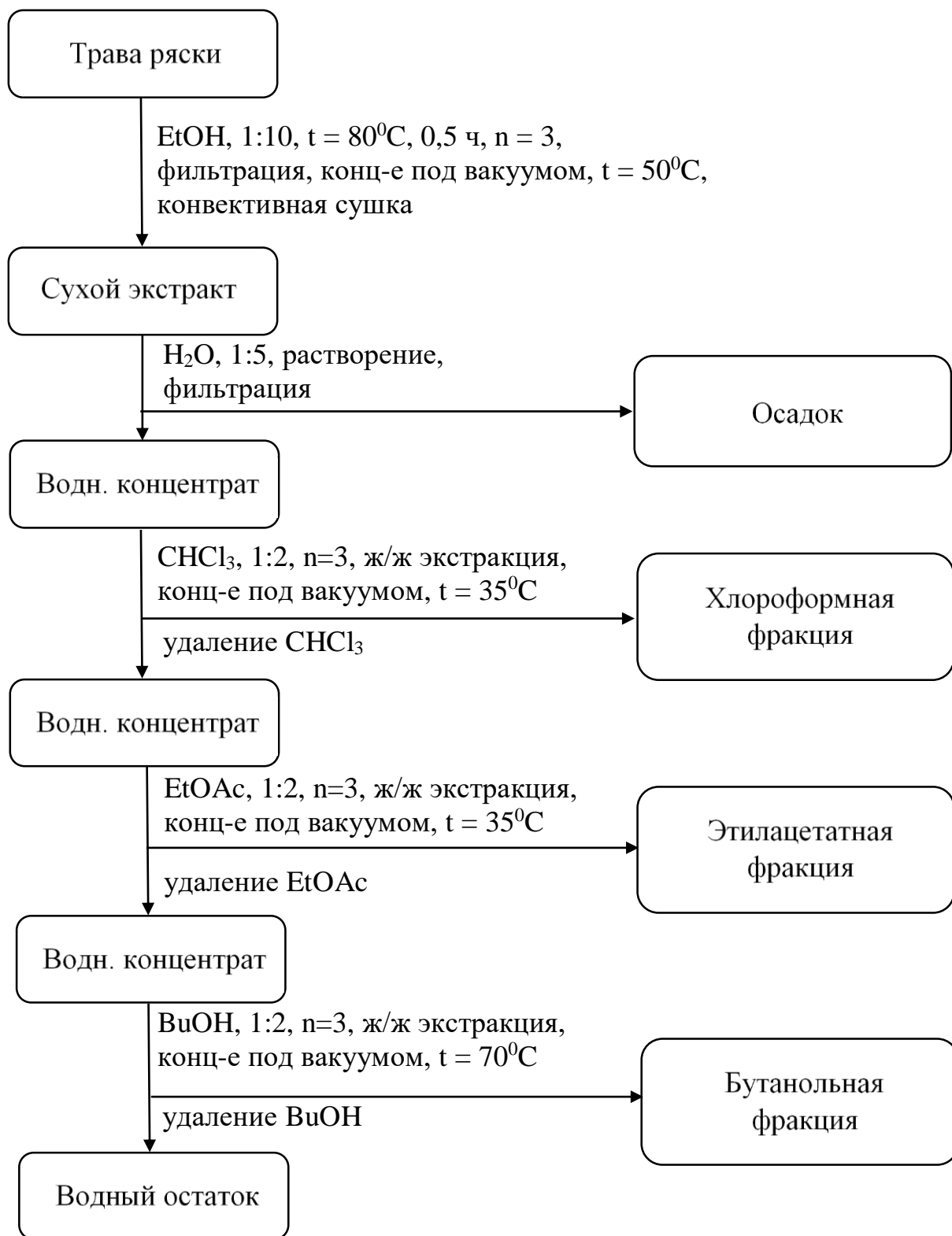


Рисунок 4 – Схема получения водно-спиртового экстракта и его фракций.

2.2.2.2. Методики обнаружения и анализа основных групп БАВ

Обнаружение сапонинов

Приготовление извлечения: готовили водный настой 1:10, нагревая измельченное сырье на водяной бане в течение 10 минут. Настой после охлаждения фильтровали и проводили с ним качественные реакции.

а) *Реакция пенообразования.* Брали две пробирки, в одну приливали 5 мл 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты, а в другую – 5 мл 0,1 моль/л гидроксида натрия. Затем в обе пробирки добавляли по 2-3 капли извлечения и сильно встряхивали. По образованию в пробирках стойкой пены судили о присутствии в сырье сапонинов, а по высоте пенного столба – о природе сапонинов.

б) *Реакция с ацетатом свинца.* К 2 мл настоя в пробирке прибавляли несколько капель раствора ацетата свинца. О наличии сапонинов судили по образованию осадка.

Для обнаружения алкалоидов готовили кислое и щелочное извлечение. Для получения кислого извлечения 20,0 г измельченного сырья помещали в колбу, прибавляли воду (гидромодуль 1:10), и хлороводородную кислоту до pH 2, далее однократно настаивали в течение 12 часов при комнатной температуре. Извлечение отфильтровывали через воронку Бюхнера с бумажным фильтром, к фильтрату прибавляли аммония гидроксид до pH 9, далее проводили жидкофазную экстракцию алкалоидов трихлорметаном. Из трихлорметанового извлечения проводили реэкстракцию алкалоидов водой с pH 2 (HCl), таким образом освобождая аналит от балластных веществ и пигментов. Для получения щелочного извлечения 20,0 г измельченного сырья заливали водой (гидромодуль 1:10), подщелоченной гидроксидом аммония до pH 10 и настаивали в течение суток при 25 С°. Извлечение отфильтровывали, далее проводили жидкофазную экстракцию трихлорметаном. Из трихлорметанового извлечения реэкстрагировали алкалоиды водой с pH 10 (NH₄OH). В кислом и щелочном реэкстрактах определяли алкалоиды с помощью общеалкалоидных реактивов.

Обнаружение антраценпроизводных проводили по следующей методике:

0,5 г измельченного сырья кипятили с 10 мл 10 % раствора щелочи. При этом должен происходить щелочной гидролиз антрагликозидов, окисление восстановленных форм и взаимодействие агликонов со щелочью с образованием красного окрашивания (антрахиноляты). В случае присутствия в сырье дубильных веществ, флавоноидов и пигментов извлечение может быть не красным, а бурым.

Обнаружение дубильных веществ проводили в водном экстракте с помощью реактивов: 1%-го раствора желатина в 10%-м растворе хлорида натрия; 40%-го раствора формальдегида и концентрированной хлороводородной кислоты); 1%-го раствора железоаммонийных квасцов.

Для определения кумаринов готовили извлечение на 96% этаноле (1:10, 0,5 ч, 75 °С). Извлечение фильтровали, далее проводили качественные реакции с 5% спиртовым раствором гидроксида натрия, диазотированной сульфаниловой кислотой, а также при помощи лактонной пробы.

Определение флавоноидов проводили в этанольном извлечении (70% EtOH, 1:10, 0,5 ч, 70 °С) с помощью известных фитохимических реакций: цианидиновой пробы в модификации Брианта (конц. хлороводородная кислота, металлический магний, октанол); с 5% раствором хлорида алюминия (III); борно-лимонной реакции.

Качественный и количественный анализ кумаринов, изофлавоноидов и флавоноидов растений рода ряска методом ВЭЖХ.

Объекты исследования: 70 %-ные этанольные экстракты трех видов ряски, а также фракции из данных экстрактов, полученные жидкофазной экстракцией хлороформом, этилацетатом, бутанолом и водные остатки после экстракции органическими растворителями.

Качественный и количественный анализ исследуемых образцов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом ZorbaxSB-C₁₈, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол – 5% уксусная кислота 40:60;
- детектирование при длине волны 254 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили за счет программного обеспечения ChemStation.

Идентификацию компонентов проводили путём сравнения времён удерживания на хроматограммах испытуемых растворов и стандартных образцов:

- 1) *кумаринов*: кумарин, эскулин, эскулитин, хаплоперозид А, изопсорален, фраксетин, капенсин, обтусинин, скиммин;
- 2) *флавоноидов*: рутин, мирицетин, кверцетин, лютеолин;
- 3) *изофлавоноидов*: ононин, 4,5,7-тригидроксиизофлавоон (генистеин), биоханин, формонетин.

Для подтверждения достоверности идентификации анализируемых веществ использовали метод добавок.

Количественное содержание кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов в исследуемых образцах определяли методом сравнения с внешним стандартом.

Содержание кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов (X) в исследуемых образцах, в процентах, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 100} = \frac{S \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m};$$

где S_1 – среднее значение площадей пиков определяемого вещества, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков определяемого вещества, вычисленное из хроматограмм раствора определяемого вещества;

m_0 – масса навески определяемого вещества, в граммах;

m – масса навески исследуемого образца, в граммах;

P – чистота определяемого вещества, в процентах.

Для определения фенолоксилов 0,5 г измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, приливали 25 мл 70 % этанола, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 минут. Колбу с содержимым охлаждали, извлечение перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр («синяя лента») и использовали для проведения качественной реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой. После чего проводили спектрофотометрическое определение, для этого 1 мл извлечения вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора водой до метки. Спектр полученного раствора снимали на спектрофотометре СФ-2000 в УФ области, при длине волны 325 ± 5 нм.

Качественный и количественный анализ фенолоксилов растений рода ряска методом ВЭЖХ

Объекты исследования: 70%-ные этанольные экстракты трех видов ряски и этилацетатные фракции.

Качественный и количественный анализ исследуемых образцов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: ацетонитрил – 5% раствор уксусной кислоты в соотношении 20:80;
- детектирование при длине волны 254 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Идентификацию компонентов проводили путём сравнения времён удерживания на хроматограммах испытуемых растворов и стандартных образцов ванильной кислоты, хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты, м-кумаровой кислоты, 2,3-дигидроксibenзойной кислоты, 2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусной кислоты, бензойной кислоты, хинной кислоты, феруловой кислоты, 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, 3,5-дигидроксibenзойной кислоты, 2,6-дигидроксibenзойной кислоты, о-кумаровой кислоты, коричной кислоты. Для подтверждения достоверности идентификации анализируемых веществ использован метод добавок.

Количественное содержание фенолокислот в исследуемых образцах определяли методом сравнения с внешним стандартом.

Содержание фенолокислот (X) исследуемых образцах, в процентах, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 100} = \frac{S \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m}; \text{ где}$$

S_1 – среднее значение площадей пиков определяемого вещества, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков определяемого вещества, вычисленное из хроматограмм раствора определяемого вещества;

m_0 – масса навески определяемого вещества, в граммах;

m – масса навески исследуемого образца, в граммах;

P – чистота определяемого вещества, в процентах.

Качественный и количественный анализ аминокислот Навеску измельченного сырья массой 10 г заливали 80% раствором этанола и в течении 1 часа проводили экстракцию на водяной бане при 70°C, так как более высокая температура приводит к разрушению некоторых аминокислот. Полученное извлечение фильтровали, промывали сырье 80% раствором этанола, упаривали и обрабатывали несколько раз хлороформом. Водный слой, содержащий аминокислоты, отделяли и упаривали в вакууме до небольшого

объема. При проведении нингидриновой реакции с частью водного извлечения рясок, наблюдали появление красно – фиолетового окрашивания, которое свидетельствовало о наличии аминокислот. Для получения данных о качественном составе и количественном содержании аминокислот в рясках использован аминокислотный анализатор «Hitachi» 835 (Япония) на колонке $0,26 \times 15$ см.

Калибровку прибора проводили с использованием стандартной смеси, содержащей по 3 нМ каждой аминокислоты. Анализ проводили на колонке с сульфированным сополимером стирола в смеси с 8% дивинилбензола при постоянной во время эксперимента температуре 53°C . Для элюирования аминокислот использовали ступенчатый градиент из буферных растворов с разными значениями рН (от 3,3 до 4,9). Последовательность элюирования аминокислот зависела от заряда молекул аминокислот в кислой среде буфера, степени гидратации, молекулярной массы и гидрофобности. Детектирование осуществляли после взаимодействия элюатов с нингидриновым реагентом фотометрически при длине волны 570 нм для всех аминокислот, количественное содержание определяли при детектировании на длине волны 440 нм. Количественная оценка содержания аминокислот велась автоматически с измерением площади пиков идентифицированного компонента. Расчет каждого из них проводили в наномолях в аликвоте, непосредственно использованной для анализа, и в дальнейшем пересчитывали на процентное содержание.

Качественный и количественный анализ свободных моносахаридов методом прямофазной ВЭЖХ

Навеску измельченного сырья ряски массой 100 мг заливали 1 мл воды очищенной в пробирке с завинчивающейся пробкой, нагревали до 90°C до набухания сырья и затем экстрагировали углеводы на протяжении 1 часа при температуре 25°C при встряхивании. Полученное извлечение центрифугировали 10 минут при 14000 об./мин. После этого добавляли активированный уголь, встряхивали и снова центрифугировали 10 минут при

14000 об./мин. Аликвоту 20 мкл супернатанта анализировали на колонке LunaNH24,6X 250 мм, подвижная фаза ацетонитрил – вода в соотношении 70:30, скорость потока 1мл/мин при комнатной температуре с рефрактометрическим детектированием. Сбор и обработку данных осуществляли при помощи программы «Экохром», отнесение пиков и расчет концентраций углеводов проводили по внешнему стандарту, содержащему смесь анализируемых углеводов (фруктозы, глюкозы) и глицерина в концентрации 10 г/л. Формулы расчетов приведены ниже.

$$W_{\text{глицерина}}(\%) = \frac{S_{\text{глицерина}} \times 100}{S_{0,\text{глицерина}} \times 3}$$

где S глицерина и S₀ глицерина – площадь пиков глицерина в анализируемом образце и внешнем стандарте соответственно.

$$W_{\text{фруктозы}}(\%) = \frac{S_{\text{фруктозы}} \times 100}{S_{0,\text{фруктозы}} \times 3}$$

где S фруктозы и S₀ фруктозы – площадь пиков фруктозы в анализируемом образце и внешнем стандарте соответственно.

$$W_{\text{глюкозы}}(\%) = \frac{S_{\text{глюкозы}} \times 100}{S_{0,\text{глюкозы}} \times 3}$$

где S глюкозы и S₀ глюкозы – площадь пиков глюкозы в анализируемом образце и внешнем стандарте соответственно.

Качественный и количественный анализ связанных моносахаридов методом капиллярного электрофореза

Водное извлечение ряски малой гидролизовали 1М раствором кислоты хлористоводородной при 100°С в течении 2,5 часов. После гидролиза центрифугировали при 100°С 10 минут при 14000 об./мин. К 0,8 мл супернатанта добавляли 7,2 мл воды. 5 мл полученного раствора пропускали через поверхностный концентрирующий патрон (Диасорб С₁₆). При этом первые 3 мл отбрасывали и собирали следующий 1мл. К 20 мкл смеси стандартов и исследуемого раствора добавляли 20 мкл раствора внутреннего

стандарта (раствор глюкозамина) и упаривали на вакуумированном центрифужном испарителе типа Speevad с подогревом в полипропиленовой пробирке. К высушенной пробе добавляли 20 мкл 0,5 мкл раствора 1-фенил-3-метил-5-пиразолона (PMP) в метаноле (1:1) и 20 мкл раствора натрия гидроксида, тщательно встряхивали на Vortex и термостатировали при 70°С на протяжении 2 часов. Пробу нейтрализовали 20 мкл 0,3М раствором кислоты хлористоводородной и дважды экстрагировали избыток реагента PMP 50 мкл бензола. Остаток упаривали на Speevad с подогревом и растворяли в 500мкл смеси ацетонитрил – вода в соотношении 1:9.

Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273Т (Термофишер, ЛТД, США). Обработку электрофореграмм осуществляли с помощью той же программы, что и свободных сахаров. Отношение и расчет концентрации углеводов проводили по внутреннему (глюкозамин) и внешнему стандарту, содержащему смесь 4 анализированных углеводов в концентрации 1 мг/мл. Формулы расчетов приведены ниже.

$$W_{\text{арабинозы}}(\%) = \frac{S_{\text{арабинозы}} \times S_{0,\text{глюкозамина}} \times 100}{S_{0,\text{арабинозы}} \times S_{\text{глюкозамина}} \times 3}$$

где $S_{\text{арабинозы}}$ и $S_{0,\text{арабинозы}}$ – площади пиков арабинозы, а $S_{\text{глюкозамина}}$ и $S_{0,\text{глюкозамина}}$ – площади пиков глюкозамина в анализируемом образце и во внешнем стандарте соответственно.

$$W_{\text{глюкозы}}(\%) = \frac{S_{\text{глюкозы}} \times S_{0,\text{глюкозамина}} \times 100}{S_{0,\text{глюкозы}} \times S_{\text{глюкозамина}} \times 3}$$

где $S_{\text{глюкозы}}$ и $S_{0,\text{глюкозы}}$ – площади пиков глюкозы, а $S_{\text{глюкозамина}}$ и $S_{0,\text{глюкозамина}}$ – площади пиков глюкозамина в анализируемом образце и во внешнем стандарте соответственно.

$$W_{\text{галактозы}}(\%) = \frac{S_{\text{галактозы}} \times S_{0,\text{глюкозамина}} \times 100}{S_{0,\text{галактозы}} \times S_{\text{глюкозамина}} \times 3}$$

где S галактозы и S_0 галактозы – площади пиков галактозы, а S глюкозамина и S_0 глюкозамина – площади пиков глюкозамина в анализируемом образце и во внешнем стандарте соответственно.

$$W_{\text{ксилозы}}(\%) = \frac{100 \times S_{0,\text{глюкозамина}} \times S_{\text{ксилозы}}}{3 \times S_{\text{глюкозамина}} \times S_{0,\text{ксилозы}}}$$

где S ксилозы и S_0 ксилозы – площади пиков ксилозы, а S глюкозамина и S_0 глюкозамина – площади пиков глюкозамина в анализируемом образце и во внешнем стандарте соответственно.

Методы исследования полисахаридов

Для обнаружения полисахаридов 10,0 г воздушно-сухого сырья, помещали колбу, и экстрагировали водой очищенной (гидромодуль 1:10) на водяной бане при температуре 80 °С, в течение 30 минут. Полученное извлечение фильтровали и из части извлечения (10 мл) осаждали полисахариды четырехкратным объемом 96% этилового спирта.

С частью полученного извлечения провели реакцию с тимолом и концентрированной кислотой серной: к 1 мл водного извлечения добавляли 4 капли 2% раствора тимола, 2 капли концентрированной кислоты серной и нагревали.

Выделение полисахаридов (ПС) из растительного сырья проводили по следующей методике: 20,0 г сырья экстрагировали водой очищенной, подкисленной концентрированной HCl (рН до 4,0), при нагревании на кипящей водяной бане и периодическом перемешивании в течение 3 ч. (соотношение сырье: экстрагент 1:20). После отделения частиц сырья путем фильтрования через многослойный тканевый фильтр фильтрат упаривали на роторном испарителе при температуре 50 °С до 1/5 от исходного объема. К полученному раствору добавляли трехкратный объем 96 % этанола и отстаивали 24 ч при температуре 2–4 °С, затем осадок отфильтровывали через бумажный фильтр и растворяли в 100 мл воды очищенной при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 ч при комнатной температуре. Не

растворившийся остаток, представляющий собой мельчайшие частицы сырья и денатурированный белок, отделяли центрифугированием (4000 об/мин, в течение 30 мин). Надосадок диализировали в полупроницаемой мембране с диаметром пор 15 кДа (Cellu-Sep, США) в течение 48 ч в 50-кратном объеме очищенной воды при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке, меняя воду через 24 ч. После диализа раствор замораживали и лиофильно высушивали. Полученные образцы ПС были стандартизованы по содержанию углеводов, уроновых кислот, белка и нуклеиновых кислот. Содержание углеводов определяли по методу Смита [72], уроновых кислот по реакции с карбазолом после полного гидролиза [20], содержание белка – методом Лоури [96] и нуклеиновых кислот по методу Спирина [48].

Мономерный состав ПС определяли методом газовой хроматографии. Полный кислотный гидролиз проводили, помещая точную навеску ПС (20 мг) в ампулу объемом 10 мл, добавляли 5 мл 4 М трифторуксусной кислоты (ТФК). Ампулу запаивали и выдерживали 6 часов в сушильном шкафу при температуре 85 °С. После охлаждения содержимое ампулы для освобождения от остатков ТФК упаривали на роторном испарителе, добавляя трижды 0,5 мл метанол. Сухой остаток растворяли в 96 % (об.) этаноле, фильтровали, раствор высушивали до постоянной массы при температуре не более 50 °С.

Стандартные образцы (Carbohydrates Kit) силилировали по той же методике.

Для получения триметилсилильных производных к остатку моносахаридов, полученному после гидролиза образца, добавляли 100 мкл безводного пиридина и 30 мкл N-триметилсилилимидазола, помещали на 25 минут в плотно закупоренном флаконе в сушильный шкаф (75 °С), охлаждали, добавляли 1 мл гексана, перемешивали, верхний слой отбирали на анализ [71].

Разделение силилированных образцов проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A (США) на колонке HP-1MS (30 м×0,25 мм×0,25 мкм), скорость потока газа-носителя (He) 1 мл/мин, в градиенте температур: 70 °С – 2 минуты, далее 10 °С/мин (до 300 °С.), температура инжектора 280

°С, детектирование велось на масс-спектрометре Agilent 5975S (США) ионизация электронным ударом, сканирование m/z 33-600, температура ионного источника 120 °С.

Анализ молекулярно-массового распределения проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Германия, «Dionex»). Условия хроматографирования: колонка TSK GMPWXL, 300×78 мм, 13 мкм, подвижная фаза – вода, скорость потока 1 мл/мин. Детектирование рефрактометрическое, температура ячейки детектора 40 °С. Калибровочная прямая построена по растворам декстранов ($c = 1$ мг/мл) молекулярной массой 1, 17, 40, 250, 500, 1200 кДа при тех же условиях хроматографирования.

2.2.3. Методы стандартизации сырья

Определение показателей качества: измельченности, потери в массе при высушивании, золы общей, содержания примесей проводили в соответствии с ОФС 1.5.1.0001.15 - Лекарственное растительное сырье, а также ОФС 1.5.3.0004.15 - Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [11].

2.3. Методы оценки фармакологической активности

2.3.1. Оценка острой токсичности

Острую токсичность оценивали на беспородных мышах обоего пола по общепринятой методике согласно требованиям, к доклиническим испытаниям новых лекарственных средств [30].

2.3.2. Исследование влияния на функциональную активность

клеток иммунной системы

Животные. В экспериментах использовали 70 мышей линии C57BL/6, в возрасте 8-10 недель (1 категории согласно сертификату), полученных из отдела экспериментальных биологических моделей структурного подразделения Томский НИЦ НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Животные

содержались в неполной барьерной системе (воздухообмен составлял 10-12 крат/ч, температура – $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, влажность – $55\pm 10\%$, световой режим – 12:12 ч). Животные размещались в клетках (VELAZ) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила, имели постоянный доступ к пище (стерилизованный гранулированный корм) и воде, очищенной в системе обратного осмоса. Эксперименты проводили в осенне-зимний период.

Условия культивирования клеток. Клетки культивировали в среде следующего состава: RPMI 1640 («Sigma», США) с добавлением 10% ЭТС («Nuclo»», Великобритания), 20 мМ HEPES («Sigma», США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина (РУП «Борисовский завод медицинских препаратов», Россия) и 2 мМ L-глутамина («Sigma», США). Культивирование проводили при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 и абсолютной влажности.

Выделение макрофагов. Животных забивали дислокацией шейного отдела позвоночника в утренние часы, брюшную полость промывали 6 мл ледяного изотонического раствора хлорида натрия (ФР), клетки осаждали, ресуспендировали в культуральной среде и оценивали их жизнеспособность в тесте с 0,1% трипановым синим. Клетки помещали по $1,5\text{-}2,0\times 10^6/\text{мл}$ в пластиковые чашки Петри, культивировали 2 ч (при 37°C в атмосфере 5% CO_2 и абсолютной влажности) в среде, содержащей 20% ЭТС, после чего собирали только прилипшую к пластику фракцию клеток.

Выделение спленоцитов. Спленоциты получали из гомогената селезенки мышей в ледяном изотоническом растворе хлорида натрия (ФР). Суспензию фильтровали через 4-слойный капрон, промывали дважды холодным ФР, ресуспендировали в культуральной среде и оценивали их жизнеспособность. В экспериментах использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток.

Подсчёт числа клеток и определение их жизнеспособности. Для определения числа клеток в суспензии и их жизнеспособности использовали 0,1% раствор трипанового синего. Число клеток определяли в камере Горяева

при помощи светового микроскопа. Для постановки экспериментов использовали суспензии клеток, жизнеспособность которых превышала 90%.

Влияние исследуемых веществ на функциональную активность макрофагов. Полученные после прилипания макрофаги ($2,5-3,0 \times 10^6$ клеток/мл) культивировали в указанных выше условиях в плоскодонных 96-луночных планшетах в присутствии полисахаридов и полифенолов в различных концентрациях и митогена ЛПС 1 мкг/мл. Через 48 ч от начала культивирования в надосадке измеряли количество нитритов.

Исследование полисахаридов на наличие примесей эндотоксина. Для изучения возможной примеси эндотоксина в исследуемых образцах полисахаридов в 96-луночный плоскодонный планшет помещали исследуемые образцы полисахаридов или ЛПС (в качестве контроля метода) и полимиксин В («InvivoGen», США) в концентрации 10 мкг/мл, инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности в течение 1 ч. Затем в лунки добавляли перитонеальные макрофаги ($2,5-3,0 \times 10^6$ клеток/мл), культивировали 48 ч в указанных выше условиях, собирали из лунок надосадок и определяли концентрацию в нём нитритов.

Определение продукции оксида азота. Продукцию NO оценивали по содержанию нитритов в супернатантах при помощи реактива Грейса [76]. Реактив 0,1 мл смешивали с эквивалентным объёмом надосадка, абсорбцию измеряли с использованием многоканального спектрофотометра Titertek Multiskan® MCC («Labsystems», Финляндия) при длине волны 540 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия.

Оценка пролиферации колориметрическим методом [111]. Спленоциты культивировали 48 ч в круглодонных 96-луночных планшетах ($2,0 \times 10^6$ клеток/лунку) в указанных выше условиях. За 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили раствор МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, («Sigma», США)), конечная концентрация которого в лунках составляла 200 мкг/мл. Затем из лунок удаляли надосадок,

а осадок растворяли диметилсульфоксидом («Sigma», США). Абсорбцию полученных растворов измеряли при помощи спектрофотометра при длине волны 540 нм.

В экспериментах использовали 200 мышей линий C57BL/6 и BALB/C в возрасте 8-12 недель, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Перитонеальные макрофаги (МФ) получали прилипанием к пластику клеток перитонеального экссудата. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности (100%) в среде следующего состава: RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС (Hyclone США), 20 mM HEPES (Sigma), 0,05 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma) и 2 mM L-глутамина (Sigma). Функциональную активность клеток оценивали при культивировании клеток в 96-луночных планшетах в присутствии полифенольных комплексов в различных концентрациях; липополисахарида (ЛПС) E.coli (серотип O111:B4, Sigma); конконавалин А (Кон А, Sigma).

Производство оксида азота (NO) оценивали по содержанию нитритов в супернатантах при помощи реактива Грейса через 48 ч инкубации [111].

Активность аргиназы определяли по методике [29] в авторской модификации. Для этого в клеточном лизате измеряли концентрацию мочевины с помощью тест-системы «Мочевина-450» («Био-ЛА-Тест», Чехия) согласно приложенному к тест-системе протоколу с использованием спектрофотометра (длина волны 540 нм). За 1 единицу активности фермента принимали количество аргиназы, катализирующей образование 1 мкМ мочевины в минуту.

Пролиферацию клеток оценивали колориметрическим методом, для чего за 4 ч до окончания культивирования спленоцитов в лунки с клетками вносили раствор МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma), в конечной концентрации 200 мкг/мл. Осадок растворяли

диметилсульфоксидом (Sigma). Абсорбцию полученных растворов измеряли при помощи многоканального спектрофотометра при длине волны 540 нм.

Определение антителообразующих клеток (АОК) в селезенке проводили методом локального гемолиза. Титр антител в сыворотке крови оценивали в реакции гемагглютинации и выражали в логарифмической шкале с основанием 2 (\log_2) [14]. Локальную реакцию гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) оценивали по методике [94] в авторской модификации. На 7-е сутки после третьей иммунизации подкожной инъекцией овалбумина (OVA) (Sigma) и гидроксида алюминия (Sigma) в подушечку задней лапы вводили OVA – опытная лапа, в контрлатеральную лапу (контрольную) – физиологический раствор (ФР). Местную воспалительную реакцию оценивали через 4 ч. Величину реакции оценивали, как разницу массы между контрольной и опытной лапой и выражали в миллиграммах.

2.4. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС 1.1.0013.15 (Государственная фармакопея 14 издания) [11]. Для расчета использовали пакет прикладных программ «Stat Soft Statistica v 6.0». Для всех выборок проверена гипотеза нормальности распределения по величине коэффициента асимметрии и коэффициента эксцесса. Для количественных показателей вычисляли среднее значение (\bar{X}) и стандартную ошибку среднего (m). Для качественных признаков определяли частоту (%). Достоверность различий между показателями оценивали с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Результаты эксперимента считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

**ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА
L. MINOR L., *L. TRISULCA* L. и *SPIRODELLA POLYRRHIZA*
SCHLEID (*L. POLYRRHIZA* L.)**

3.1. Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ

Сапонины

При выполнении реакции пенообразования с извлечением *LM* наблюдали пену, которая была устойчива в течение 15 мин. К извлечению прибавляли раствор свинца ацетата, наблюдали выпадение осадка светло-коричневого цвета. Тесты с извлечениями из травы *LT* и *SP* были отрицательными.

Алкалоиды

Как в кислых, так и в щелочных извлечениях всех исследуемых видов с реактивами Бушарда, Драгендорфа, Несслера и Зонненштейна не наблюдалось положительной реакции, что может указывать на отсутствие алкалоидов.

Дубильные вещества

При добавлении к водному извлечению исследуемых видов 1% раствора желатина наблюдали появление мути. После подкисления раствором 10% уксусной кислоты и прибавления 10% раствора свинца ацетата наблюдали выпадение рыхлого осадка, постепенно окрашивающегося в серо-синий цвет (гидролизуемые вещества – таннины пирогалловой кислоты). При добавлении после этого к раствору нескольких капель 1% раствора железоммонийных квасцов отмечали появление черно-зеленого окрашивания (конденсированные вещества – пирокатехины).

Из полученных данных следует, что в сырье присутствуют как конденсированные, так и гидролизуемые дубильные вещества.

Антраценпроизводные

При кипячении сырья с 10 мл 10 % раствора щелочи во всех образцах наблюдали красно-бурое окрашивание.

Кумарины

После действия 5% раствора NaOH на спиртовое извлечение, наблюдали интенсивную желтую окраску, а после прибавления диазореактива – красное окрашивание. При проведении лактонной пробы наблюдали образование суспензии белого цвета, не растворимой в воде, что свидетельствует о наличие в сырье кумаринов.

Флавоноиды

При выполнении цианидиновой пробы в модификации Брианта наблюдали появление красной окраски, при добавлении октилового спирта появилось розовое окрашивание органического и водного слоя, что свидетельствует о присутствии в сырье как агликонов, так и гликозидов флавоноидов. При выполнении реакции с раствором алюминия хлорида, наблюдали образование светло-желтого раствора. При проведении борно-лимонной реакции с исследуемым раствором, появлялось ярко-желтое окрашивание.

Фенолкарбоновые кислоты

Методом спектрофотометрии в УФ области, при длине волны 325 ± 5 нм установлено присутствие фенолкарбоновых кислот в спиртовых извлечениях всех трёх видов.

Аминокислоты

При проведении нингидриновой реакции с водным извлечением рясок, наблюдали появление красно – фиолетового окрашивания, которое свидетельствовало о наличии аминокислот.

Полисахариды

При прибавлении 96% этанола к водному извлечению (1:4), наблюдали выпадение светлого осадка в виде хлопьев. После нагревания извлечения с тимолом и концентрированной кислотой серной наблюдали коричнево-желтое окрашивание. Так, установлено, что в сырье присутствуют полисахариды.

Таким образом, в результате проведённого общего фитохимического анализа, доказано присутствие во всех образцах (таблица 1) таких групп БАВ как дубильные вещества, антраценпроизводные, флавоноиды, кумарины,

фенолкарбоновые кислоты, аминокислоты и полисахариды. Во всех образцах не обнаружены алкалоиды. В траве ряски малой обнаружены сапонины, которые отсутствуют в двух других видах.

Таблица 1 – Результаты общего фитохимического анализа исследуемых видов ряски

Группа БАВ	Вид ряски		
	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>
Сапонины	++	—	—
Алкалоиды	—	—	—
Дубильные вещества	++	++	++
Антраценпроизводные	++	++	++
Кумарины	++	++	++
Флавоноиды	++	++	++
Фенолкарбоновые кислоты	++	++	++
Аминокислоты	++	++	++
Полисахариды	++	++	++

Примечание: ++ - реакция положительная; — - реакция отрицательная

Таким образом, результаты собственного общего фитохимического и фармакологического исследований трех видов ряски, а также имеющиеся в литературе сведения, позволили выбрать группы БАВ для дальнейших более глубоких исследований.

В частности, учитывая общеизвестные факты о биологической роли фенольных соединений, аминокислот и полисахаридов, нами было проведено более детальное сравнительное исследование комплекса фенольных соединений (кумаринов, флавоноидов, изофлавоноидов и фенолокислот), аминокислотного и углеводного состава трех видов ряски.

3.2. Исследование комплекса фенольных соединений растений рода ряска

Для выделения веществ фенольной природы воздушно сухое сырьё экстрагировали 70% этанолом, растворитель удаляли под вакуумом. Полученный экстракт подвергали лиофильной (вакуум-сублимационной) сушке, растворяли в воде очищенной при нагревании и фракционировали с

использованием растворителей с увеличивающейся полярностью: хлороформ – этилацетат – н-бутанол (гл.2).

Технологический выход экстрактивных веществ (ЭВ), извлекаемых 70% этанолом и соответствующих фракций представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Технологические выходы экстракта на 70%-м этаноле и его фракций

Объект	Выход, % в пересчете на воздушно-сухое сырьё		
	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>
70% экстракт	4,7±0,4	3,3±0,3	6,4±0,3
ХФ	0,25±0,02	1,02±0,03	0,85±0,02
ЭАФ	0,11±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01
БФ	0,27±0,02	0,39±0,02	0,38±0,02
ВО	4,02±0,02	1,71±0,02	4,96±0,02

Примечание: **ХФ** – хлороформная фракция; **ЭАФ** – этилацетатная фракция; **БФ** – бутанольная фракция; **ВО** – водный остаток.

Качественный и количественный анализ исследуемых образцов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме.

Идентификацию компонентов проводили путём сравнения времён удерживания компонентов испытуемого образца и стандартных образцов. Для подтверждения достоверности идентификации анализируемых веществ использован метод добавок.

Количественное содержание компонентов в исследуемых образцах определяли методом сравнения с внешним стандартом (гл. 2).

3.2.1. Качественный и количественный анализ кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов

В результате исследования в 70 %-ном этанольном экстракте *LM* (рисунок 5) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,53$ мин) с

содержанием **1,70 %**, эскулина ($t_R=4,23$ мин) с содержанием **1,31 %**, эскулетина ($t_R=5,17$ мин) – **0,46 %**, фраксетина ($t_R=5,52$ мин) – **0,21 %**, обтусинина ($t_R=10,89$ мин) – **0,008 %**, кумарина ($t_R=13,07$ мин) – **0,034 %**.

В 70 %-ном этанольном экстракте *LT* (рисунок 6) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,55$ мин) с содержанием **0,27 %**, эскулина ($t_R=4,10$ мин) с содержанием **1,58 %**, эскулетина ($t_R=5,29$ мин) – **0,27 %**, фраксетина ($t_R=5,58$ мин) – **0,13 %**, кумарина ($t_R=13,03$ мин) – **0,033 %**; флавоноидов: рутина ($t_R=9,99$ мин) – **0,031 %**, мирицетина ($t_R=13,78$ мин) – **0,011 %**; изофлавоноидов: ононина ($t_R=15,49$ мин) – **0,002 %**.

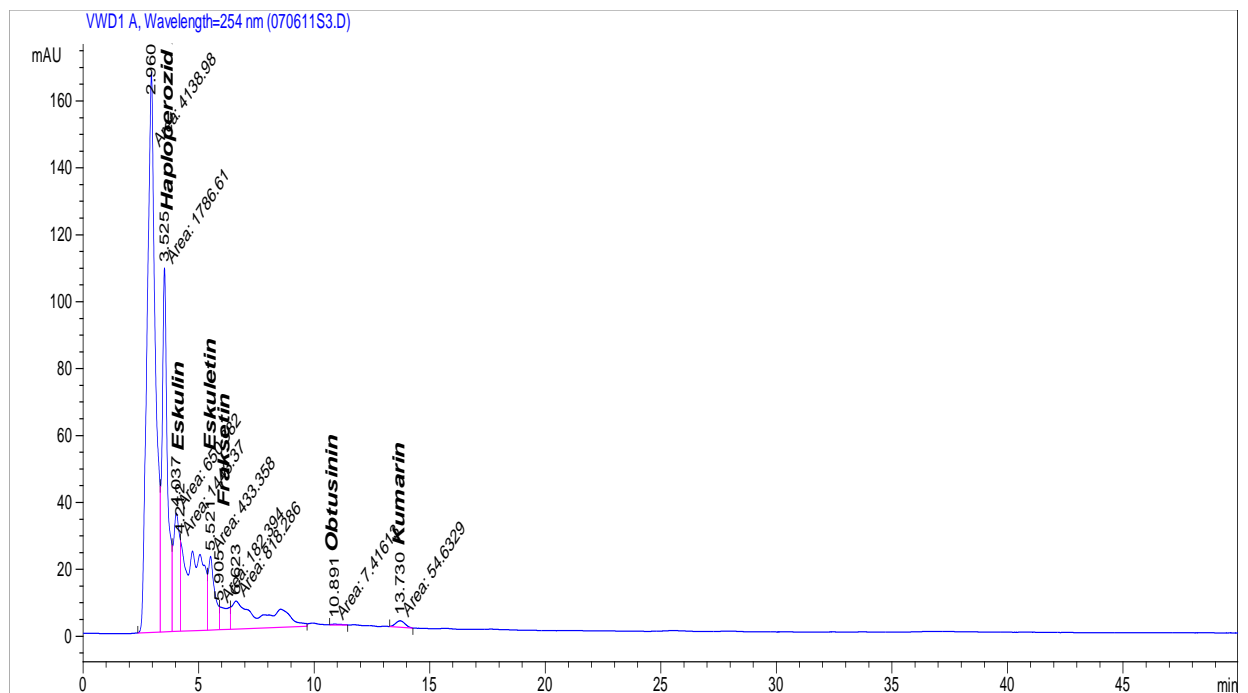


Рисунок 5 – Хроматограмма 70 %-ного этанольного экстракта *LM*.

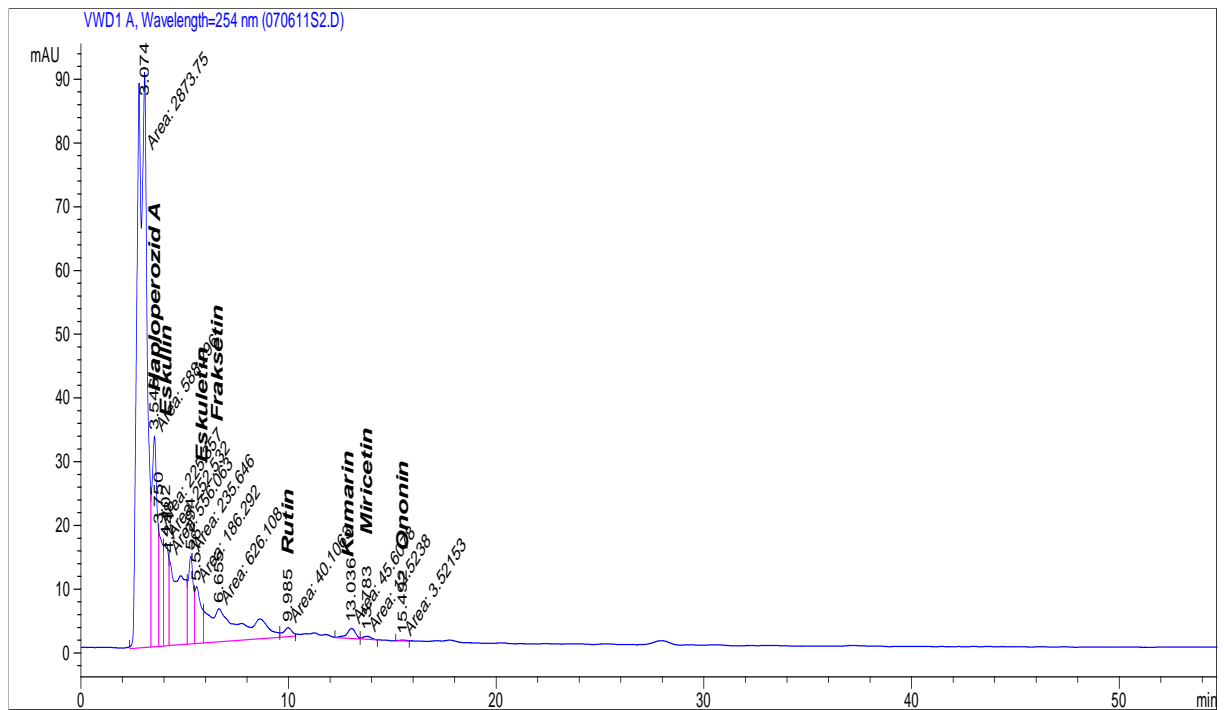


Рисунок 6 – Хроматограмма 70 %-ного этанольного экстракта *LT*.

В 70 %-ном этанольном экстракте образца *SP* (рисунок 7) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,42$ мин) с содержанием **0,80 %**, эскулина ($t_R=3,80$ мин) – **2,40 %**, эскулетина ($t_R=4,11$ мин) – **0,70 %**, фраксетина ($t_R=5,46$ мин) – **9,9 %**, кумарина ($t_R=12,87$ мин) – **0,80 %**; изофлавоноидов: ононина ($t_R=16,36$ мин) – **0,1 %**.

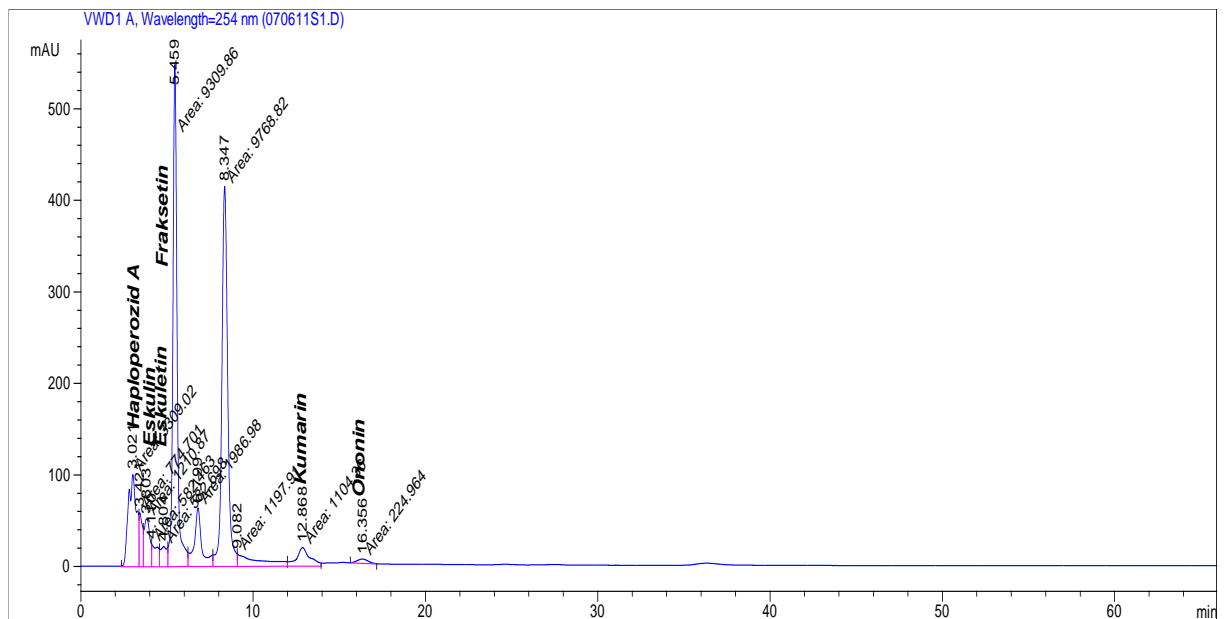


Рисунок 7 – Хроматограмма 70 %-ного этанольного экстракта *SP*.

В хлороформной фракции *LM* (рисунок 8) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,55$ мин) с содержанием 0,20 %, эскулина ($t_R=4,38$ мин) – 0,20 %, эскулетина ($t_R=5,42$ мин) – 0,30 %, фраксетина ($t_R=5,75$ мин) – 0,20 %, обтусинина ($t_R=10,39$ мин) – 0,20 %, кумарина ($t_R=12,94$ мин) – 0,07 %; флавоноидов: мирицетина ($t_R=14,62$ мин) – 0,20 %; изофлавоноидов: ононина ($t_R=16,17$ мин) – 0,04 %.

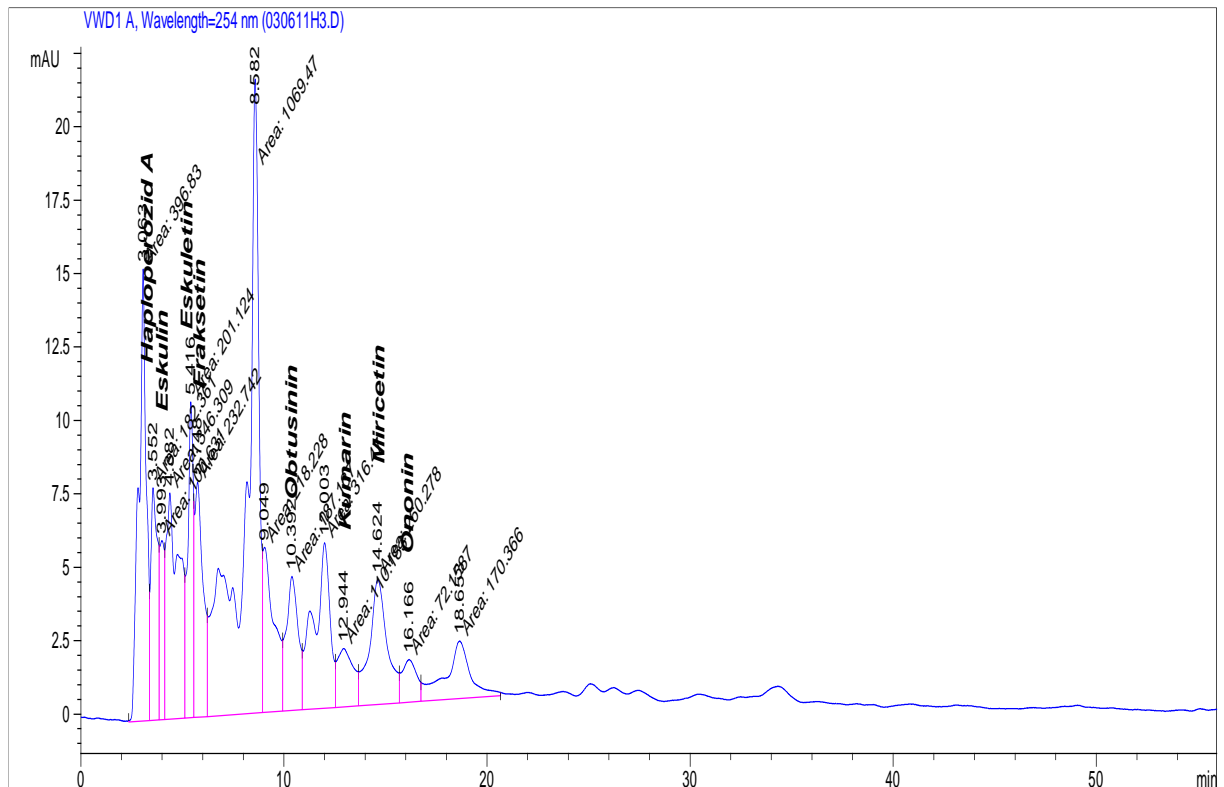


Рисунок 8 – Хроматограмма хлороформной фракции *LM*.

В хлороформной фракции *LT* (рисунок 9) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,57$ мин) с содержанием 0,08 %, эскулина ($t_R=4,05$ мин) – 0,20 %, эскулетина ($t_R=5,56$ мин) – 0,10 %, фраксетина ($t_R=5,76$ мин) – 0,06 %, обтусинина ($t_R=10,42$ мин) – 0,05 %, кумарина ($t_R=13,07$ мин) – 0,002 %, изопсоралена ($t_R=31,66$ мин) – 0,003 %; флавоноидов: мирицетина ($t_R=14,99$ мин) – 0,02 %, кверцетина ($t_R=29,03$ мин) – 0,001 %; изофлавоноидов: ононина ($t_R=16,27$ мин) – 0,002 %, биоханина ($t_R=38,28$ мин) – 0,01 %.

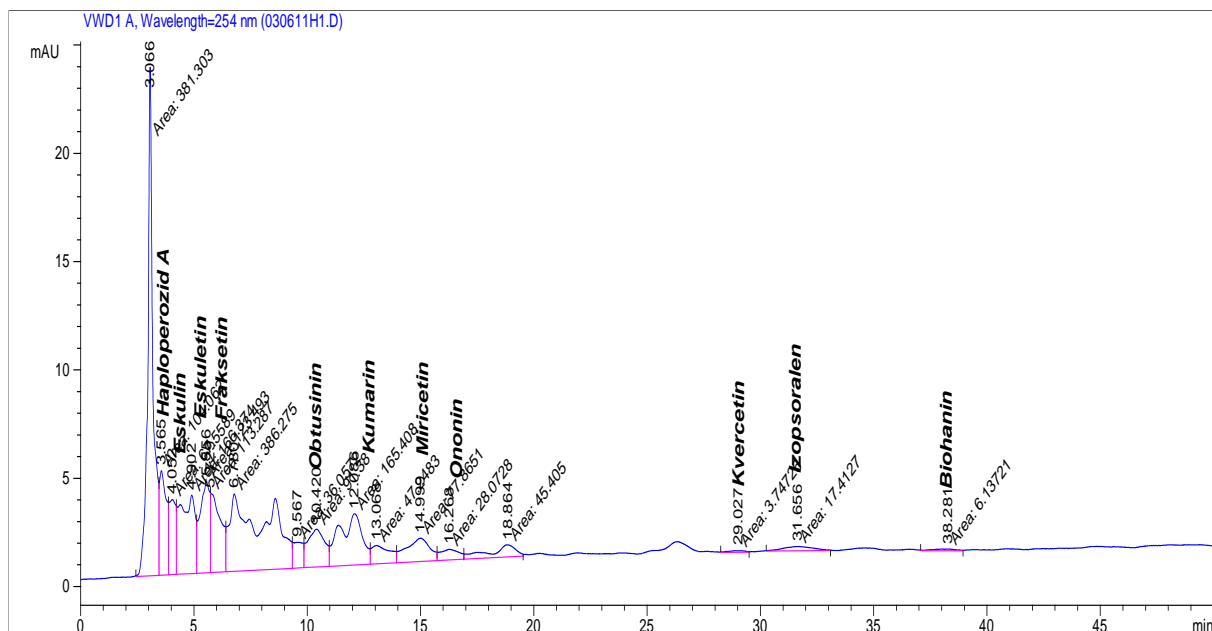


Рисунок 9 – Хроматограмма хлороформной фракции *LT*.

В хлороформной фракции *SP* (рисунок 10) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,54$ мин) с содержанием **0,70 %**, эскулина ($t_R=4,16$ мин) – **2,40 %**, эскулетина ($t_R=5,04$ мин) – **0,60 %**, фраксетина ($t_R=5,78$ мин) – **14,9 %**, кумарина ($t_R=12,96$ мин) – **0,07 %**; флавоноидов: рутина ($t_R=10,13$ мин) – **0,30 %**, мирицетина ($t_R=14,17$ мин) – **0,07 %**.

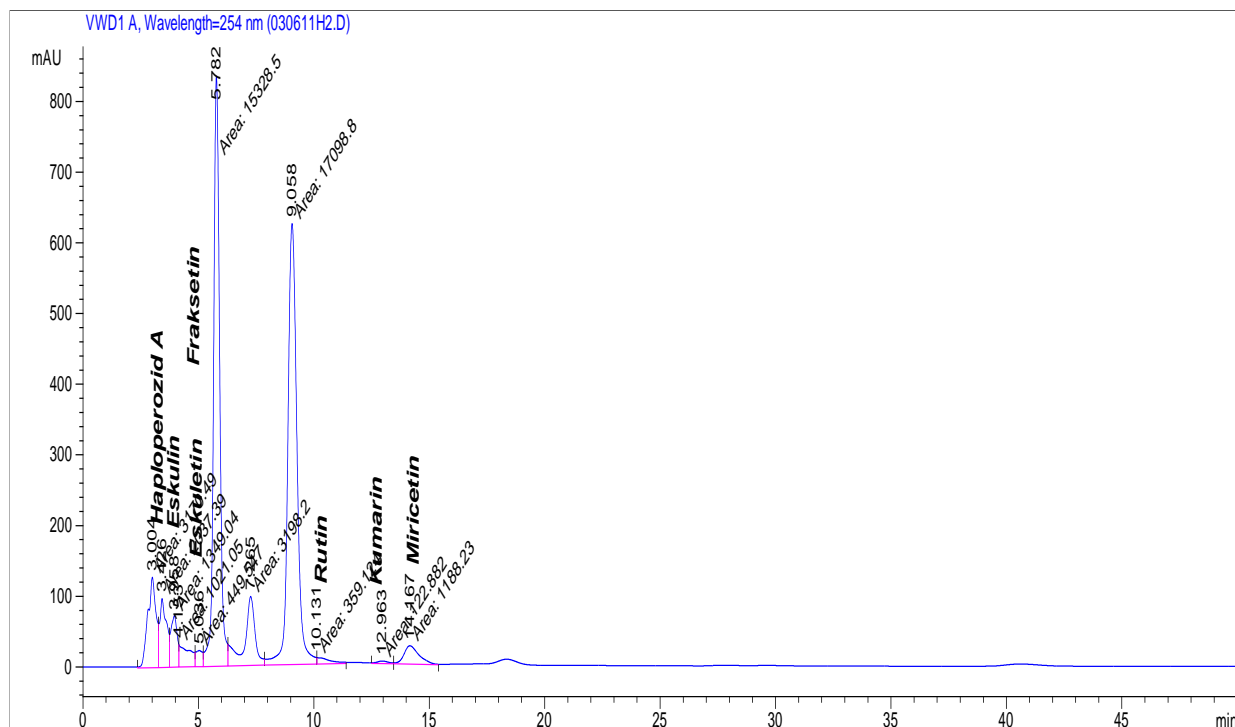


Рисунок 10 – Хроматограмма хлороформной фракции *SP*.

В этилацетатной фракции *LM* (рисунок 11) установлено наличие кумаринов: эскулина ($t_R=4,42$ мин) с содержанием **0,21 %**, эскулетина ($t_R=5,45$ мин) – **0,50 %**, фраксетина ($t_R=5,75$ мин) – **0,30 %**, обтусинина ($t_R=10,45$ мин) – **0,20 %**, кумарина ($t_R=13,03$ мин) – **0,04 %**, изопсоралена ($t_R=30,61$ мин) – **0,002 %**; флавоноидов: мирицетина ($t_R=14,67$ мин) – **0,50 %**, кверцетина ($t_R=29,59$ мин) – **0,001 %**; изофлавоноидов: ононина ($t_R=16,16$ мин) – **0,05 %**.

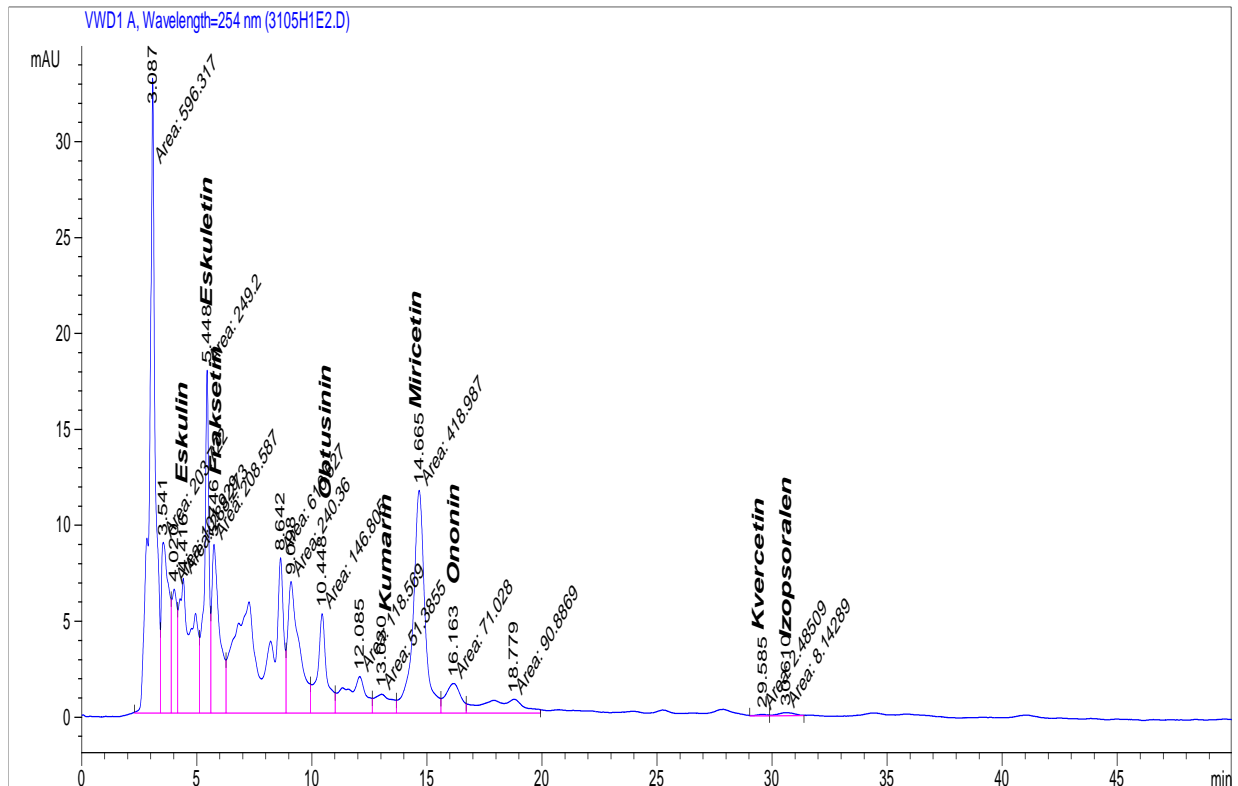


Рисунок 11 – Хроматограмма этилацетатной фракции *LM*.

В этилацетатной фракции *LT* (рисунок 12) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,59$ мин) с содержанием **0,20 %**, эскулина ($t_R=4,28$ мин) – **0,30 %**, эскулетина ($t_R=5,48$ мин) – **0,50 %**, фраксетина ($t_R=5,69$ мин) – **0,10 %**, обтусинина ($t_R=10,57$ мин) – **0,30 %**; флавоноидов: мирицетина ($t_R=14,50$ мин) – **0,02 %**, кверцетина ($t_R=29,86$ мин) – **0,002 %**.

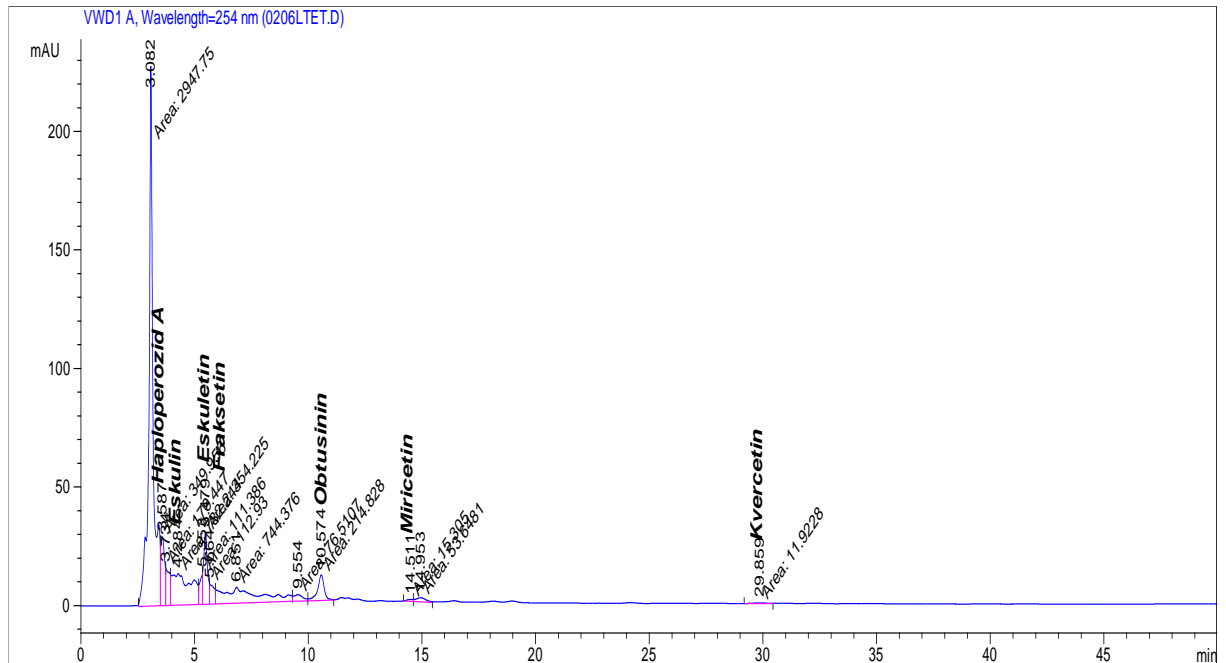


Рисунок 12 – Хроматограмма этилацетатной фракции *LT*.

В этилацетатной фракции *SP* (рисунок 13) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,47$ мин) с содержанием 0,30 %, эскулина ($t_R=4,00$ мин) с содержанием 6,60 %, эскулетина ($t_R=5,44$ мин) – 1,20 %, фраксетина ($t_R=5,77$ мин) – 18,20 %, кумарина ($t_R=12,97$ мин) – 0,60 %; флавоноидов: рутина ($t_R=10,34$ мин) – 0,40 %, мирицетина ($t_R=14,52$ мин) – 2,10 %, кверцетина ($t_R=29,27$ мин) – 0,04 %; изофлавоноидов: оонина ($t_R=16,08$ мин) – 0,10 %.

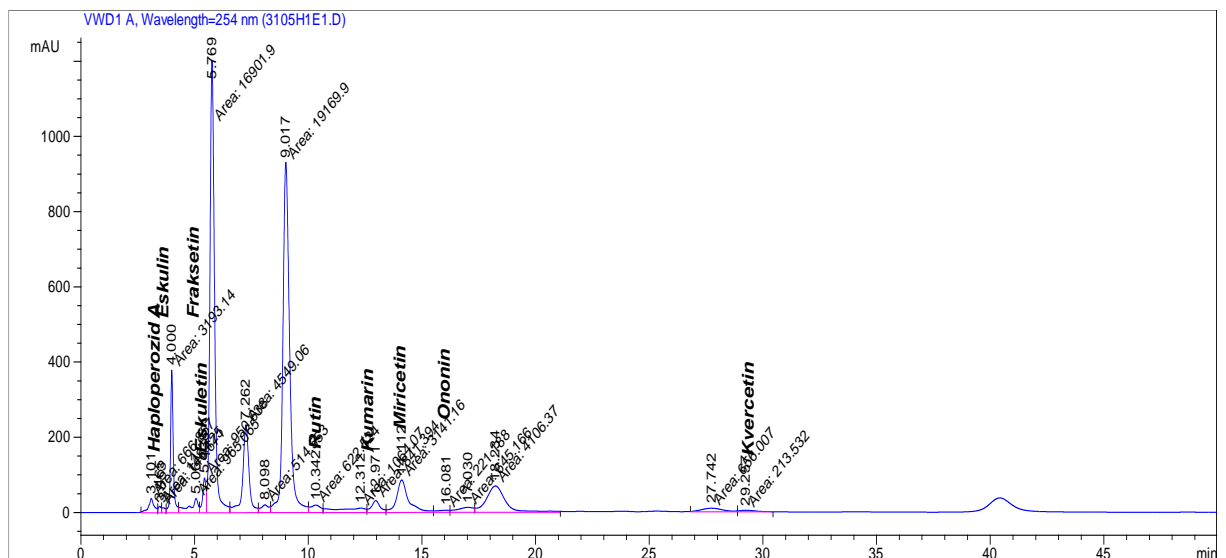


Рисунок 13 – Хроматограмма этилацетатной фракции *SP*.

В бутанольной фракции *LM* (рисунок 14) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,56$ мин) с содержанием **0,53 %**, эскулетина ($t_R=5,46$ мин) – **0,66 %**, фраксетина ($t_R=5,74$ мин) – **0,28 %**, обтусинина ($t_R=10,59$ мин) – **0,21 %**, кумарина ($t_R=13,23$ мин) – **0,04 %**, изопсоралена ($t_R=31,43$ мин) – **0,02 %**; изофлавоноидов: ононина ($t_R=15,00$ мин) – **0,20 %**, генистеина ($t_R=37,41$ мин) – **0,002 %**.

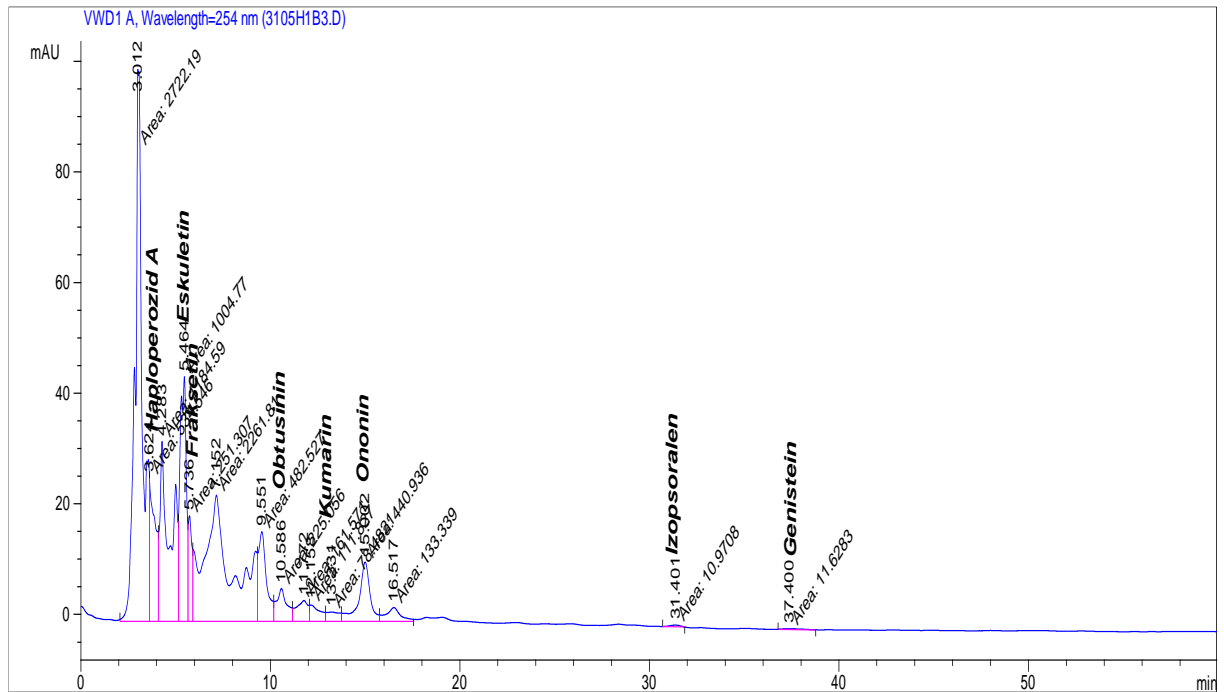


Рисунок 14 – Хроматограмма бутанольной фракции *LM*.

В бутанольной фракции образца *LT* (рисунок 15) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,58$ мин) с содержанием **0,28 %**, эскулина ($t_R=4,25$ мин) с содержанием **2,97 %**, эскулетина ($t_R=5,43$ мин) – **1,0 %**, фраксетина ($t_R=5,69$ мин) – **0,17 %**, изопсоралена ($t_R=32,14$ мин) – **0,007 %**; флавоноидов: мирицетина ($t_R=14,36$ мин) – **0,03 %**, кверцетина ($t_R=29,73$ мин) – **0,01 %**; изофлавоноидов: ононина ($t_R=16,29$ мин) – **0,013 %**.

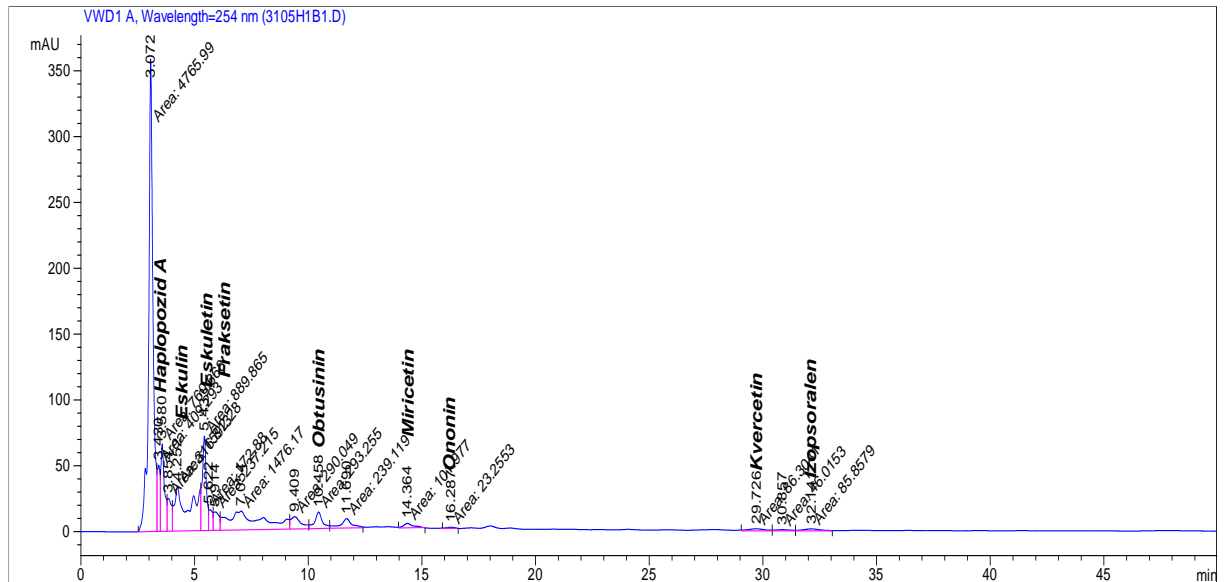


Рисунок 15 – Хроматограмма бутанольной фракции *LT*.

В бутанольной фракции *SP* (рисунок 16) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,44$ мин) с содержанием **1,01 %**, эскулина ($t_R=3,99$ мин) – **4,30 %**, эскулетина ($t_R=5,48$ мин) – **0,91 %**, фраксетина ($t_R=5,73$ мин) – **10,28 %**, кумарина ($t_R=12,96$ мин) – **0,034 %**; флавоноидов: рутина ($t_R=10,28$ мин) – **0,47 %**, мирицетина ($t_R=14,45$ мин) – **0,52 %**.

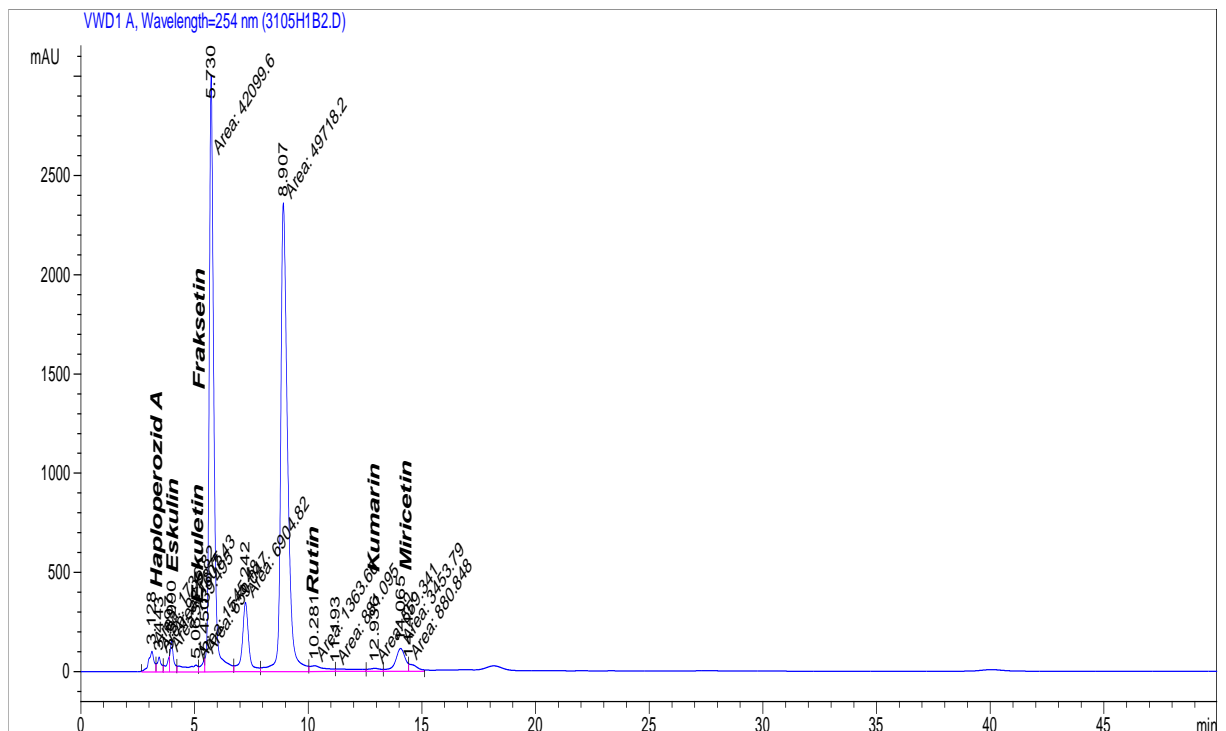


Рисунок 16 – Хроматограмма бутанольной фракции *SP*.

В водной фракции *LM* (рисунок 17) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,53$ мин) с содержанием **1,21 %**, эскулетина ($t_R=5,41$ мин) – **0,25 %**, фраксетина ($t_R=5,61$ мин) – **0,38 %**, обтусинина ($t_R=10,37$ мин) – **0,09 %**; флавоноидов: мирицетина ($t_R=14,58$ мин) – **0,069 %**; изофлавоноидов: ононина ($t_R=16,26$ мин) – **0,003 %**.

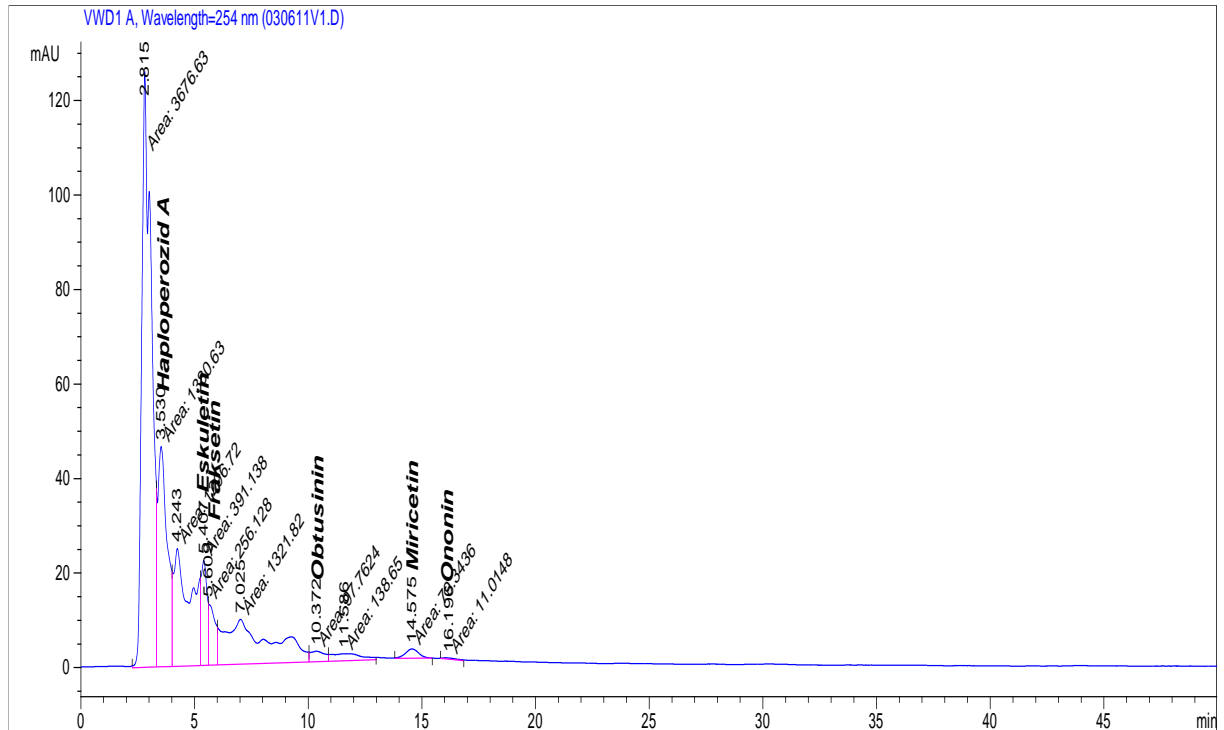


Рисунок 17 – Хроматограмма водной фракции *LM*.

В водной фракции образца *LT* (рисунок 18) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,56$ мин) с содержанием **0,07 %**, эскулетина ($t_R=4,23$ мин) с содержанием **0,07 %**, эскулетина ($t_R=5,42$ мин) – **0,01 %**, фраксетина ($t_R=5,66$ мин) – **0,01 %**, обтусинина ($t_R=10,69$ мин) – **0,01 %**; флавоноидов: рутина ($t_R=10,38$ мин) – **0,01 %**, мирицетина ($t_R=14,23$ мин) – **0,01 %**.

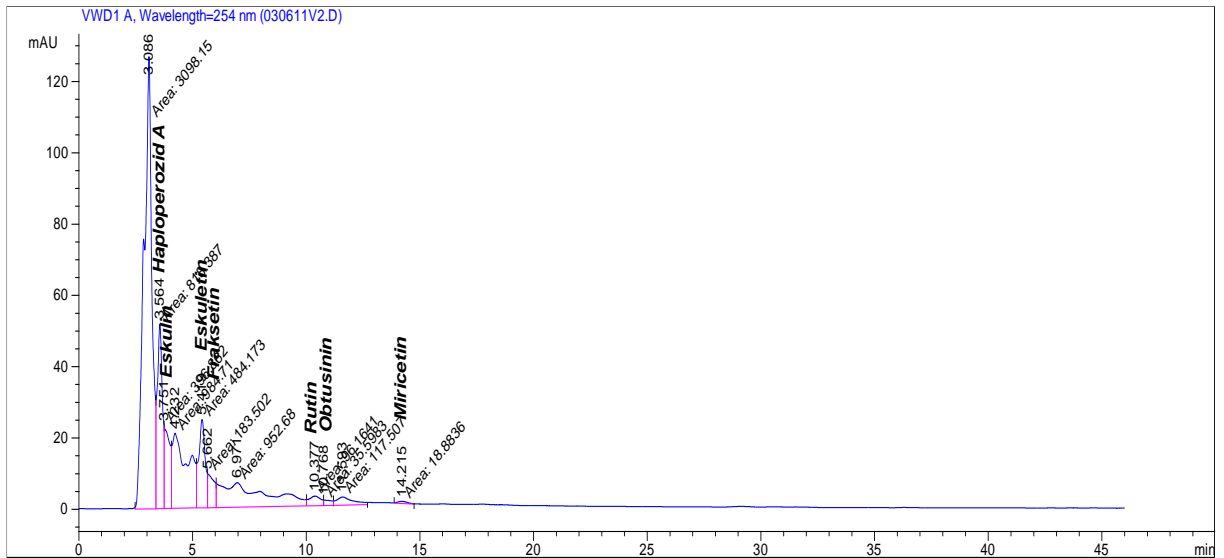


Рисунок 18 – Хроматограмма водной фракции *LT*.

В водной фракции *SP* (рисунок 19) установлено наличие кумаринов: хаплоперозида А ($t_R=3,44$ мин) с содержанием **1,90 %**, эскулина ($t_R=3,95$ мин) – **2,71 %**, эскулетина ($t_R=4,92$ мин) – **0,70 %**, фраксетины ($t_R=5,76$ мин) – **13,55 %**; флавоноидов: рутина ($t_R=9,91$ мин) – **0,24 %**, мирицетина ($t_R=14,04$ мин) – **0,62 %**.

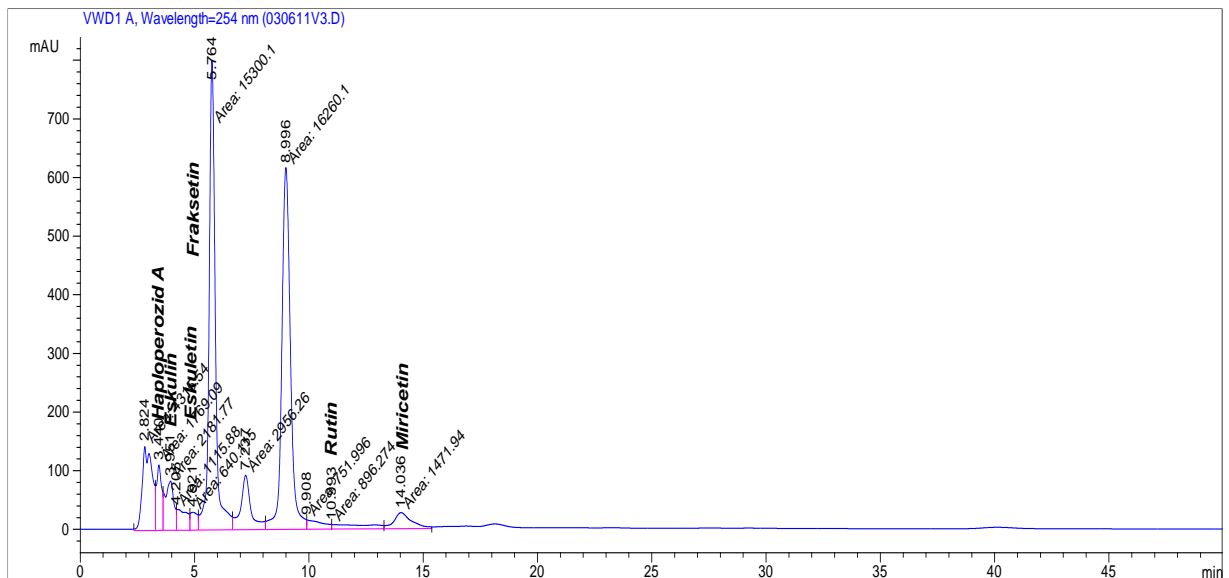


Рисунок 19 – Хроматограмма водной фракции *SP*.

Обобщенные результаты качественного и количественного анализа фракций и экстрактов трех видов растений рода ряски представлены в таблице 3.

Таблица 3– Результаты качественного и количественного анализа кумаринов, флавоноидов и изофлавоноидов растений рода ряска

Вид ряски	Образец	Кумарины							Флавоноиды			Изофлавоноиды		
		хаплоперозид А	эскулин	эскулетин	фраксетин	обтусинин	кумарин	изопсорален	рутин	мирицетин	кверцетин	ононин	генистеин	биоханин
		Содержание %, в пересчете на массу фракции или экстракта												
<i>LM</i>	70% экстракт	1,70	1,31	0,46	0,21	+	0,04	-	-	-	-	-	-	-
	ХФ	0,20	0,20	0,30	0,20	0,20	0,07	-	-	0,20	-	0,04	-	-
	ЭАФ	-	0,21	0,50	0,30	0,20	0,04	+	-	0,50	+	0,05	-	-
	БФ	0,53	-	0,66	0,28	0,21	0,04	0,02	-	-	-	0,20	+	-
	ВО	1,21	-	0,25	0,38	0,09	-	-	-	0,07	-	+	-	-
<i>LT</i>	70% экстракт	0,27	1,58	0,27	0,13	-	0,03	-	0,03	+	-	+	-	-
	ХФ	0,08	0,20	0,10	0,06	0,05	+	+	-	0,02	+	+	-	-
	ЭАФ	0,20	0,30	0,50	0,10	0,30	-	-	-	0,02	+	-	-	-
	БФ	0,28	2,97	1,00	0,17	-	-	+	-	0,03	+	0,02	-	-
	ВО	0,07	0,07	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>SP</i>	70% экстракт	0,80	2,40	0,70	9,90	-	0,80	-	-	-	-	0,10	-	-
	ХФ	0,70	2,40	0,60	14,9	-	0,07	-	0,30	0,07	-	-	-	-
	ЭАФ	0,30	6,60	1,20	18,20	-	0,60	-	0,40	2,10	0,04	0,10	-	-
	БФ	1,01	4,30	0,91	10,28	-	0,04	-	0,47	0,52	-	-	-	-
	ВО	1,90	2,71	0,70	13,55	-	-	-	0,24	0,62	-	-	-	-

Примечание:«-» - отсутствие компонента; «+» - содержание $\leq 0,01\%$

Как следует из полученных данных, все исследуемые виды ряски в большей степени накапливают кумарины, причем к мажорным компонентам *LM* относятся хаплоперозид А и эскулин, *LT* – эскулин и эскулетин, *SP* – эскулин и фраксетин.

Все виды характеризуются накоплением флавоноида мирицетина и изофлавоноида ононина. Для *SP*, в отличие *LM* и *LT* установлено наличие кверцетина и его гликозида – рутина.

3.2.2. Качественный и количественный анализ фенолокислот

Для анализа использовали 70%-ные этанольные экстракты и этилацетатные фракции.

В 70%-ном этанольном экстракте *LM* (рисунок 20) установлено наличие следующих фенолокислот: 2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусной кислоты ($t_R=3,41$ мин) с содержанием **3,51 %**, хлорогеновой кислоты ($t_R=3,62$ мин) с содержанием **0,327 %**, 3,5-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=3,92$ мин) с содержанием **0,13 %**, кофейной кислоты ($t_R=5,51$ мин) с содержанием **0,03 %**, ванильной кислоты ($t_R=5,92$ мин) с содержанием **0,03 %**, 2,3-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=7,03$ мин) с содержанием **0,008 %**, м-кумаровой кислоты ($t_R=10,86$ мин) с содержанием **0,0009 %**, о-кумаровой кислоты ($t_R=14,96$ мин) с содержанием **0,005 %**, бензойной кислоты ($t_R=15,99$ мин) с содержанием **0,02 %**, коричной кислоты ($t_R=37,77$ мин) с содержанием **0,002 %**.

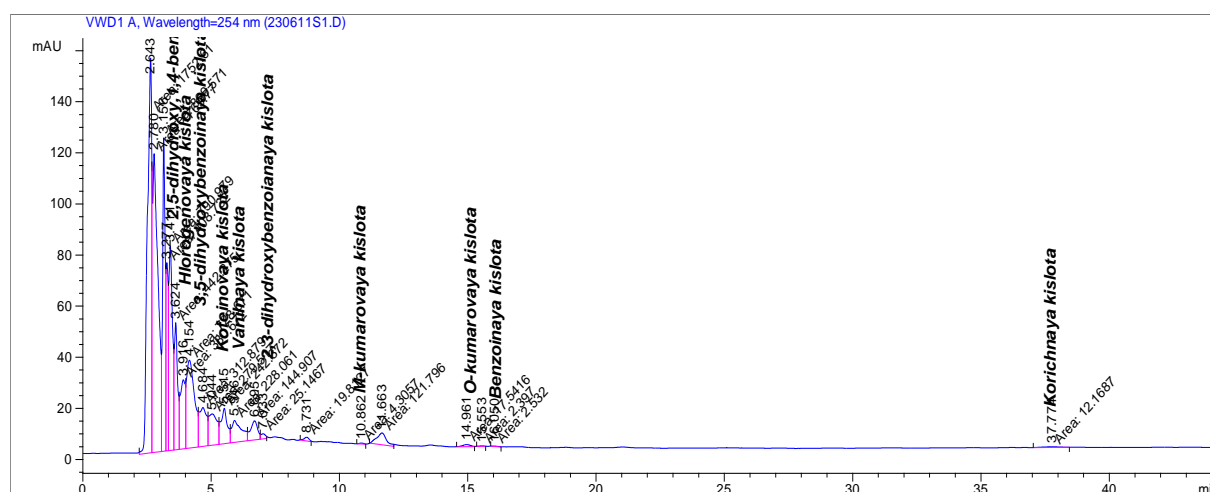


Рисунок 20 – Хроматограмма 70%-ного этанольного экстракта *LM*.

В 70%-ном этанольном экстракте *LT* (рисунок 21) установлено наличие фенолокислот: 2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусной кислоты ($t_R=3,42$ мин) с содержанием **4,81 %**, хлорогеновой кислоты ($t_R=3,55$ мин) с содержанием **0,24 %**, 3,5-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=3,93$ мин) с содержанием **0,12 %**, кофейной кислоты ($t_R=5,52$ мин) с содержанием **0,04 %**, ванильной кислоты ($t_R=5,90$ мин) с содержанием **0,01 %**, 2,6-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=6,09$ мин) с содержанием **0,02 %**, 2,3-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=7,06$ мин) с содержанием **0,002 %** феруловой кислоты ($t_R=9,61$ мин) с содержанием **0,001 %**, м-кумаровой кислоты ($t_R=10,43$ мин) с содержанием **0,0007 %**, о-кумаровой кислоты ($t_R=14,98$ мин) с содержанием **0,005 %**, бензойной кислоты ($t_R=16,00$ мин) с содержанием **0,02 %**, коричной кислоты ($t_R=37,60$ мин) с содержанием **0,03 %**.

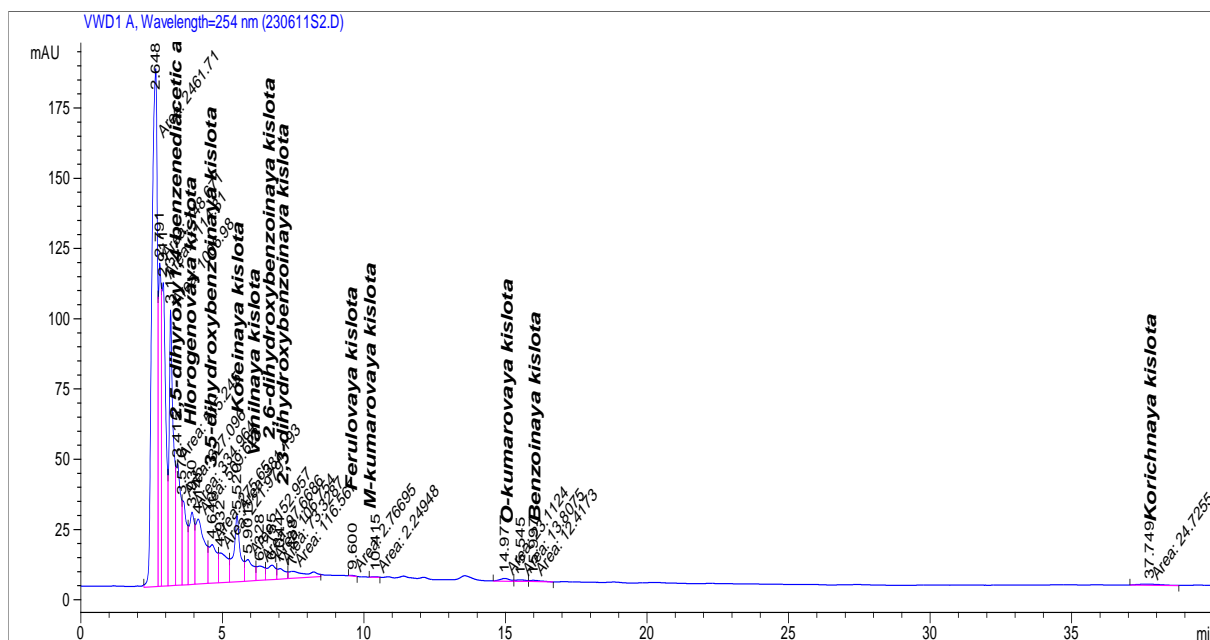


Рисунок 21 – Хроматограмма 70%-ного этанольного экстракта *LT*.

В 70%-ном этанольном экстракте *SP* (рисунок 22) установлено наличие следующих фенолокислот: 2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусной кислоты ($t_R=3,39$ мин) с содержанием **4,76 %**, хлорогеновой кислоты ($t_R=3,63$ мин) с содержанием **0,61 %**, 3,5-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=3,87$ мин) с содержанием **0,30 %**, кофейной кислоты ($t_R=5,48$ мин) с содержанием **0,09 %**, 2,5-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=5,86$ мин) с содержанием **1,28%**, 2,6-

дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=6,03$ мин) с содержанием **0,89 %**, 2,3-дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=7,20$ мин) с содержанием **0,03 %** феруловой кислоты ($t_R=9,58$ мин) с содержанием **0,006 %**, м-кумаровой кислоты ($t_R=10,54$ мин) с содержанием **0,19 %**, бензойной кислоты ($t_R=15,77$ мин) с содержанием **0,06 %**.

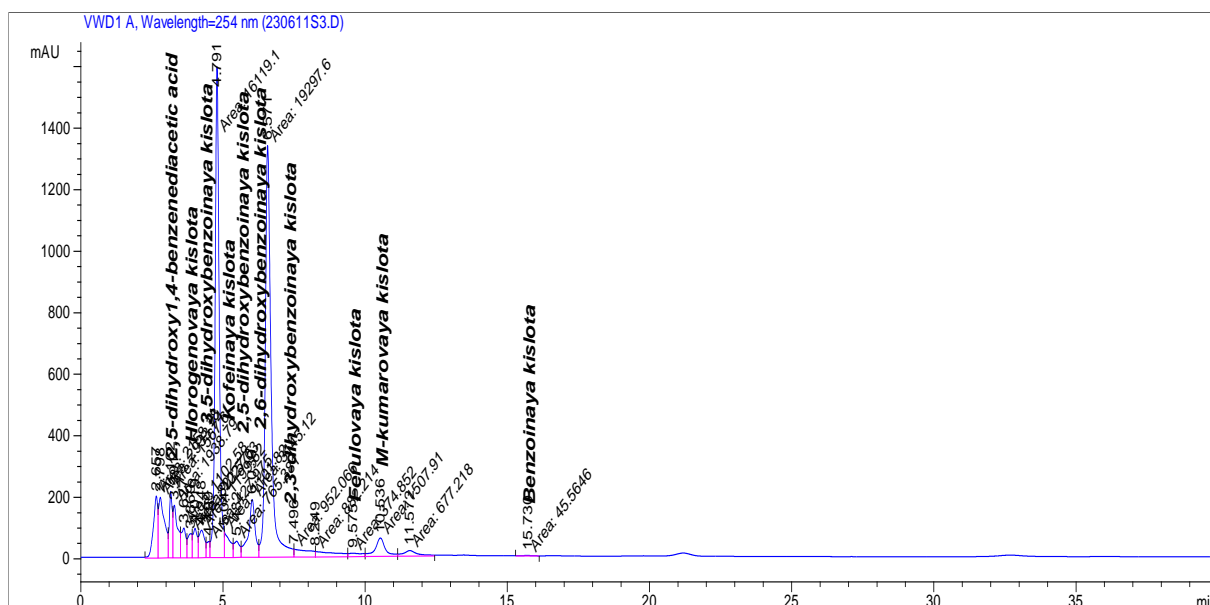


Рисунок 22 – Хроматограмма 70%-ного этанольного экстракта *SP*.

В этилацетатной фракции *LM* (рисунок 23) установлено наличие фенолокислот: 2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусной кислоты ($t_R=3,42$ мин) с содержанием **8,72 %**, хлорогеновой кислоты ($t_R=3,65$ мин) с содержанием **0,17 %**, 3,5-дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=3,93$ мин) с содержанием **0,13 %**, кофейной кислоты ($t_R=5,51$ мин) с содержанием **0,08 %**, ванильной кислоты ($t_R=5,93$ мин) с содержанием **0,03 %**, 2,6-дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=6,07$ мин) с содержанием **0,17 %**, 2,3-дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=6,98$ мин) с содержанием **0,06 %** феруловой кислоты ($t_R=9,64$ мин) с содержанием **0,07 %**, м-кумаровой кислоты ($t_R=10,85$ мин) с содержанием **0,04 %**, о-кумаровой кислоты ($t_R=15,03$ мин) с содержанием **0,02 %**, коричной кислоты ($t_R=37,76$ мин) с содержанием **0,006 %**.

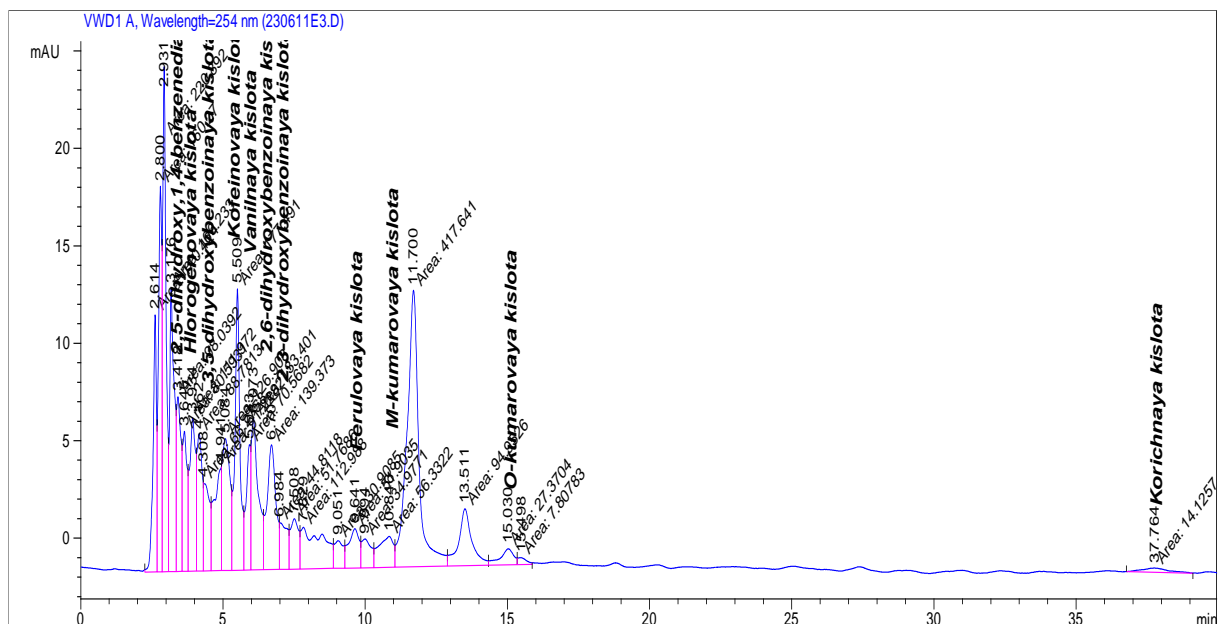


Рисунок 23 – Хроматограмма этилацетатной фракции *LM*.

В этилацетатной фракции *LT* (рисунок 24) установлено наличие фенолокислот: 2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусной кислоты ($t_R=3,42$ мин) с содержанием **6,26 %**, хлорогеновой кислоты ($t_R=3,65$ мин) с содержанием **0,32 %**, 3,5-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=3,94$ мин) с содержанием **0,16 %**, кофейной кислоты ($t_R=5,52$ мин) с содержанием **0,11 %**, ванильной кислоты ($t_R=5,91$ мин) с содержанием **0,02 %**, 2,6-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=6,01$ мин) с содержанием **0,05 %**, 2,3-дигидроксибензойной кислоты ($t_R=6,95$ мин) с содержанием **0,05 %**, феруловой кислоты ($t_R=9,55$ мин) с содержанием **0,008 %**, м-кумаровой кислоты ($t_R=10,83$ мин) с содержанием **0,01 %**, о-кумаровой кислоты ($t_R=14,99$ мин) с содержанием **0,006 %**, бензойной кислоты ($t_R=15,97$ мин) с содержанием **0,09 %**, коричной кислоты ($t_R=37,62$ мин) с содержанием **0,04 %**.

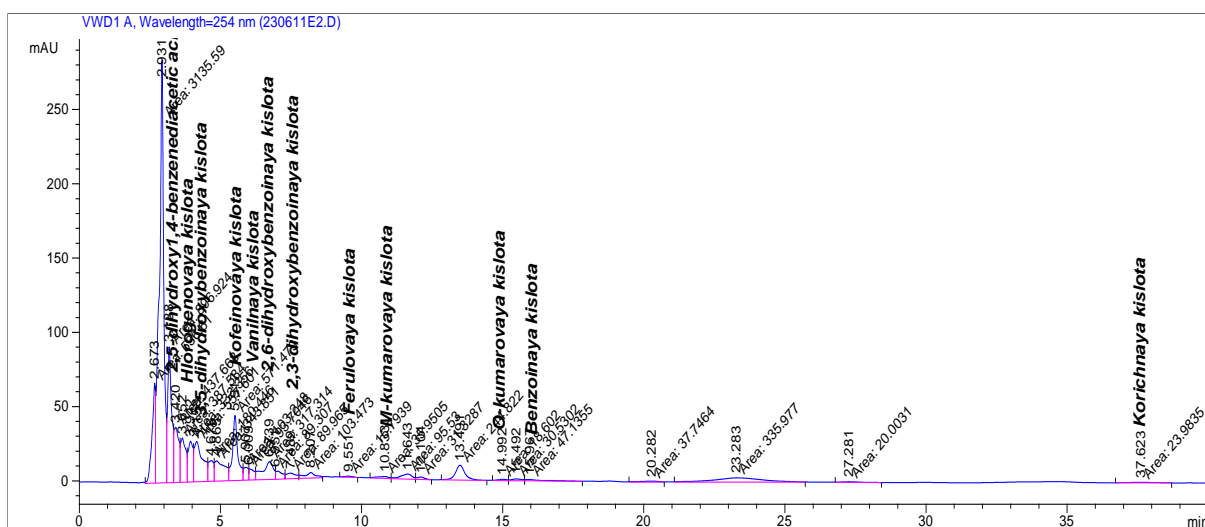


Рисунок 24 – Хроматограмма этилацетатной фракции *LT*.

В этилацетатной фракции *SP* (рисунок 25) установлено наличие фенолокислот: 2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусной кислоты ($t_R=3,30$ мин) с содержанием **7,3 %**, хлорогеновой кислоты ($t_R=3,63$ мин) с содержанием **0,15 %**, 3,5-дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=4,03$ мин) с содержанием **1,54 %**, кофейной кислоты ($t_R=5,51$ мин) с содержанием **0,26 %**, 2,6-дигидроксibenзойной кислоты ($t_R=6,07$ мин) с содержанием **2,02 %**, феруловой кислоты ($t_R=9,64$ мин) с содержанием **0,07 %**, м-кумаровой кислоты ($t_R=10,62$ мин) с содержанием **0,61 %**, бензойной кислоты ($t_R=15,61$ мин) с содержанием **0,12 %**.

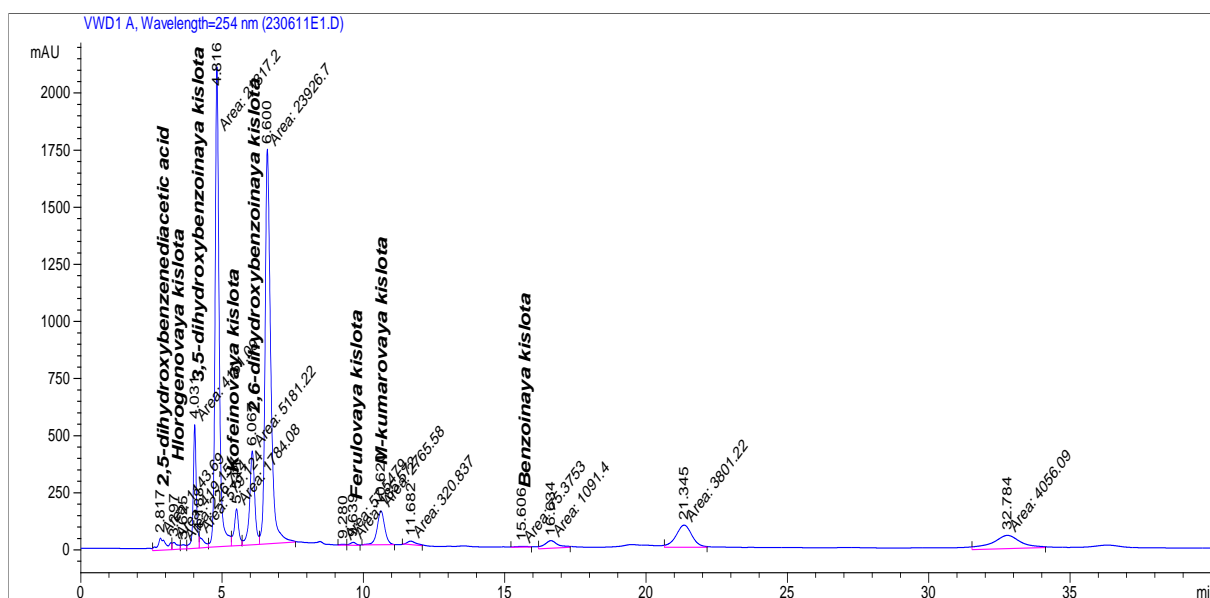


Рисунок 25 – Хроматограмма этилацетатной фракции *SP*.

Обобщенные результаты качественного и количественного анализа экстрактов и фракций трех видов растений рода ряска представлены в таблице 4.

Анализ полученных результатов показывает, что во всех трёх видах ряски в основном накапливаются *гидроксibenзойные* кислоты. Причём основным компонентом фенолкарбоновой природы является *2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная кислота* с наибольшим содержанием в *LM*. *SP* отличается от двух других видов ряски содержанием ряда гидроксibenзойных кислот: *2,5-дигидроксибензойная* (отсутствует в *LM* и *LT*); *2,6-дигидроксибензойная* (*LM* – 0,17%; *LT* – 0,05%; *SP* – **2,02%**); *3,5-дигидроксикарбоновая кислота* (в 9,5 раз больше, чем других видах ряски). Кроме гидроксibenзойных кислот, для всех исследуемых видов рясок характерно накопление значительного количества таких гидроксикоричных кислот как *хлорогеновая* (0,15-0,61%) и *кофейная* (0,03-0,26%). *SP* отличается от *LM* и *LT* накоплением *м-кумаровой кислоты* (*LM*, *LT* – следовые количества) и отсутствием *коричной, о-кумаровой и ванильной кислот*.

Таблица 4–Результаты качественного и количественного анализа фенолокислот во фракциях и экстрактах трех видов растений ряска.

Вид ряски	Образец	2,5-дигидрокси - 1,4-бензолдиуксусная	3,5-дигидроксибензойная	2,5-дигидроксибензойная	2,6-дигидроксибензойная	2,3-дигидроксибензойная	Бензойная кислота	Ванильная кислота	Коричная кислота	Феруловая кислота	Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	м-кумаровая кислота	о-кумаровая кислота
		Содержание %, в пересчете на массу фракции или экстракта												
<i>LM</i>	70% экстракт	3,51	0,13	-	+	+	0,02	0,03	+	+	0,33	0,03	+	+
	ЭАФ	8,72	0,13	-	0,17	0,06	-	0,03	+	0,07	0,17	0,08	0,04	0,02
<i>LT</i>	70% экстракт	4,81	0,15	-	0,02	+	0,02	+	0,03	+	0,24	0,04	+	+
	ЭАФ	6,26	0,16	-	0,05	0,05	0,09	0,02	0,04	+	0,32	0,11	+	+
<i>SP</i>	70% экстракт	4,76	0,3	1,28	0,89	0,03	0,06	-	-	+	0,61	0,09	0,19	-
	ЭАФ	7,3	1,54	-	2,02	-	0,12	-	-	0,07	0,15	0,26	0,61	-

Примечание: «-» - отсутствие компонента; «+» - содержание $\leq 0,01\%$

3.3. Сравнительное исследование веществ первичного обмена

Обзор литературы по теме исследования показывает большой интерес отечественных и зарубежных ученых к различным видам подсемейства рясковые, как продуцентам ценных эссенциальных нутриентов, в частности, протеиногенных аминокислот, углеводов и микроэлементов. Следует отметить, что наиболее изученным в этой области является ряска малая. Однако, другие виды рясок, такие как, ряска тройчатая и многокоренник обыкновенный, часто образующие, смешанные с ряской малой заросли, обладают значительной высокопродуктивной сырьевой базой и так же являются перспективными объектами для изучения. Учитывая вышеизложенное, мы сочли целесообразным провести сравнительное исследование наиболее значимых групп БАВ первичного обмена *LM*, *LT SP*.

3.3.1. Исследование аминокислотного состава

Для получения данных о качественном составе и количественном содержании аминокислот в рясках использован аминокислотный анализатор «Hitachi» 835 (Япония). Репрезентативная хроматограмма качественного и количественного определения аминокислот представлена на рисунке 26.

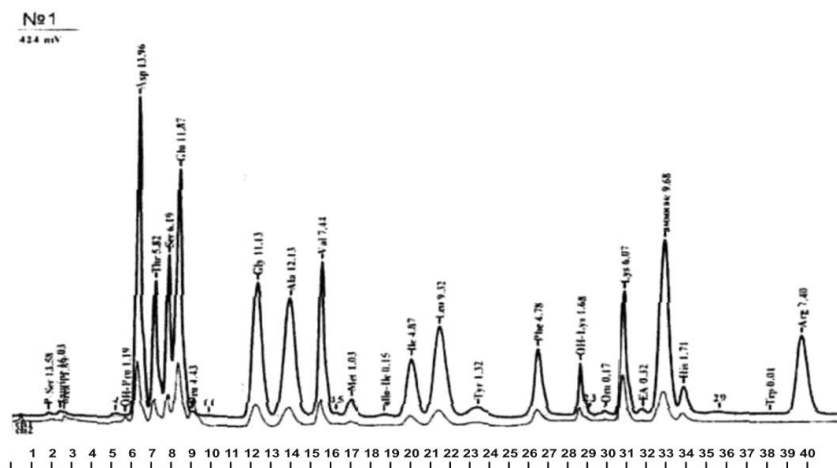


Рисунок 26 – Репрезентативная хроматограмма при определении аминокислот.

Результаты сравнительного анализа аминокислот приведены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Содержание заменимых аминокислот в рясах, мг в 1 г сухого порошка.

Аминокислота	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>			
Ala	9,7±0,5	4,64±0,23	8,9±4
Gly	7,6±0,4	4,0±0,2	6,9±0,3
Ser	5,9±0,3	2,13±0,11	4,3±0,2
Tyr	2,15±0,11	1,24	3,38±0,17
Cys	-	0,21±0,03	0,22±0,03
<i>Моноаминодикарбоновые</i>			
Asp	16,7±0,8	7,0±0,4	18,4±0,7
Glu	15,7±0,7	7,8±0,3	14,4±0,5
<i>Диаминомонокарбоновые</i>			
Arg	11,6±0,6	3,8±0,2	7,8±0,4
<i>Гетероциклические</i>			
His	2,4±0,1	1,04±0,05	2,4±0,1
OH-Pro	1,40±0,07	1,10±0,06	1,00±0,05
Pro	4,6±0,2	3,4±0,2	8,3±0,4
Заменимых аминокислот	77,75	36,44	76,83

Таблица 6 –Содержание незаменимых аминокислот в рясах, мг аминокислоты в 1г сухого порошка.

Аминокислота	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>
<i>Моноаминомонокарбоновые</i>			
Val	8,1±0,4	4,0±0,1	8,9±0,4
Ile	5,8±0,2	3,3±0,1	7,0±0,4
Leu	11,0±0,5	6,1±0,3	13,5±0,6
Met	1,49±0,09	0,64±0,03	1,69±0,08
Thr	6,2±0,3	2,8±0,1	5,20±0,26
Phe	7,1±0,4	3,4±0,2	7,2±0,3
<i>Диаминомонокарбоновые</i>			
Lys	7,9±0,4	3,10±0,16	8,0±0,3
OH-Lys	2,5±0,1	0,090±0,004	3,3±0,2
Незаменимых кислот	50,15	23,26	54,72
Общая сумма	127,90	59,70	131,55

В исследуемых видах ряски было установлено наличие 19 аминокислот, в том числе 8 незаменимых. Среди заменимых аминокислот преобладают аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин, аланин и глицин.

Мажорными компонентами незаменимых аминокислот для всех видов являются лейцин, валин, лизин, фенилаланин, треонин и изолейцин.

Помимо этого, полученные данные свидетельствуют о том, что в траве *LT* содержится меньшее количество как заменимых, так и незаменимых аминокислот (59,7 мг на 1 г сырья) по сравнению с *LM* и *SP* (127,90 и 131,55 мг на 1 г сырья, соответственно).

Таким образом, проведённые исследования свидетельствуют о том, что все три исследуемых вида ряски имеют одинаковый качественный состав аминокислот, что позволяет рассматривать их как равноценные источники заменимых и незаменимых аминокислот.

3.3.2. Исследование свободных и связанных моносахаридов

Определение свободных моносахаридов проводили методом прямофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии из водного экстракта. Сбор и обработку данных осуществляли при помощи программы «Экохром», отнесение пиков и расчет концентраций углеводов проводили по внешнему стандарту, содержащему смесь анализируемых углеводов (фруктозы, глюкозы) и глицерина в концентрации 10 мг/мл (гл.2).

Репрезентативная хроматограмма стандартного раствора сахаров представлена на рисунке 27, а результаты расчета содержания отражены в таблице 7.

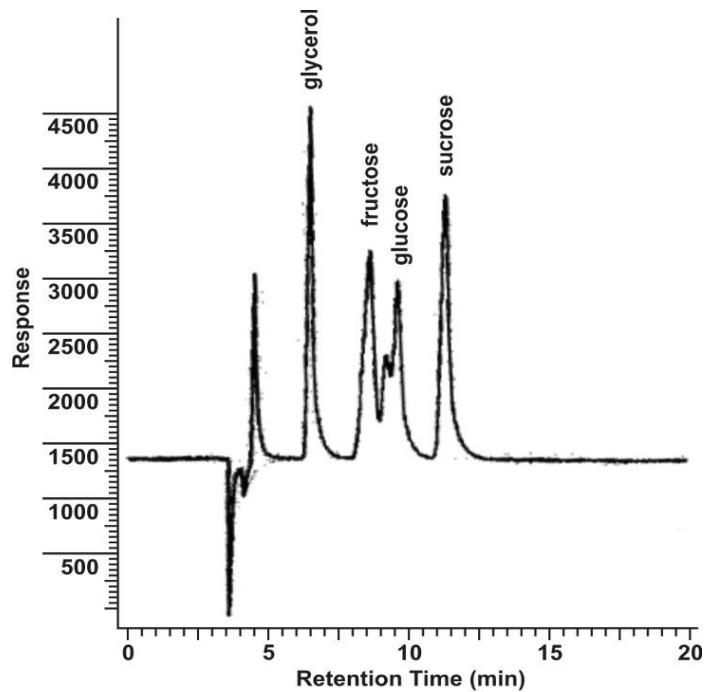


Рисунок 27– Хроматограмма раствора стандартных образцов свободных сахаров

Таблица 7 – Содержание свободных углеводов в рясках

Вид ряски	Содержание, %		
	Фруктоза	Глюкоза	Сумма
<i>LM</i>	2,34±0,12	1,29±0,05	3,67
<i>LT</i>	ниже ПКО	ниже ПКО	-
<i>SP</i>	0,51±0,03	ниже ПКО	0,51

В исследуемых образцах обнаружены и количественно определены в свободном виде два моносахарида – глюкоза и фруктоза. В образцах *LM* определено содержание обоих моносахаридов (2,34±0,12 и 1,29±0,05 %, соответственно). В образцах *SP* содержание фруктозы, а в *LT* содержание обоих моносахаров ниже предела количественного определения (ПКО) метода.

Для анализа связанных сахаров водное извлечение ряски малой гидролизовали 1 М раствором кислоты хлористоводородной. Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273Т. Отношение и расчет концентрации

углеводов проводили по внутреннему (глюкозамин) и внешнему стандарту, содержащему смесь 4 анализированных углеводов в концентрации 1 мг/мл (гл.2).

Репрезентативная электрофореграмма стандартного раствора РМР-производных сахаров представлена на рисунке 28. Результаты определения обобщены в таблице 8.

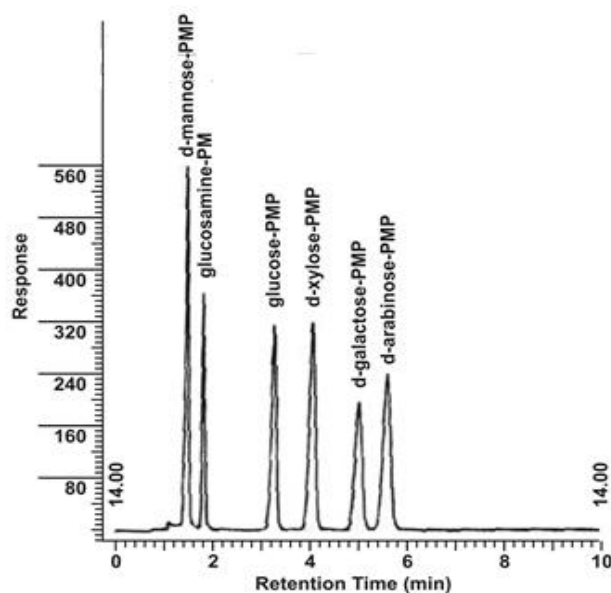


Рисунок 28 – Электрофореграмма раствора стандартных образцов сахаров.

Таблица 8 – Содержание связанных углеводов в рясах

Вид ряски	Содержание, %			
	Пентозы		Гексозы	
	Арабиноза	Ксилоза	Галактоза	Глюкоза
<i>LM</i>	0,38±0,02	1,24±0,06	1,05±0,06	4,20±0,21
	Сумма			
	1,62		5,25	
<i>LT</i>	0,73±0,04	6,1±0,3	1,17±0,06	6,3±0,3
	Сумма			
	6,83		7,47	
<i>SP</i>	0,90±0,04	1,82±0,09	1,42±0,07	10,7±0,5
	Сумма			
	2,72		12,12	

В результате было установлено, что связанные моносахара *LM* и *SP* в большей степени представлены гексозами (5,3% и 12,1% относительно 1,6% и 2,7% пентоз), в то время как *LT* содержит гексозы и пентозы приблизительно

в одинаковых количествах (7,5 % и 6,8% соответственно). Кроме этого, было установлено, что наименьшее содержание связанных сахаров в *LM* (6,9%), максимальное в *LT* и *SP* (14,3% и 14,8 % соответственно).

Таким образом, проведённые исследования свидетельствуют о том, что все три исследуемых вида ряски содержат преимущественно связанные сахара: содержание связанных сахаров *LM* в 2 раза превышает количество свободных, а *LT* и *SP* – в 14 и 7,5 раза соответственно.

Полученные данные и данные литературы о содержании в рясках отдельных групп БАВ и их биологической активности, послужили основанием для более детального исследования полисахаридного комплекса изучаемых видов.

3.3.3. Исследование полисахаридного комплекса

Для изучения водорастворимых полисахаридов (ВРПС) проводили выделение из воздушно-сухого сырья, собранного в фазе цветения в местах естественного произрастания, путём экстракции, подкисленной водой очищенной и последующей очисткой (гл.2). Выход водорастворимых ПС из различных видов рясок приблизительно одинаков и составляет 2,6-2,78 % от массы воздушно-сухого сырья (таблица 9).

Таблица 9 – Выходы водорастворимых полисахаридов

Вид ряски	Выход ПС, % в пересчёте на воздушно-сухое сырьё
<i>LM</i>	2,71±0,17
<i>LT</i>	2,6±0,3
<i>SP</i>	2,78±0,21

Несмотря на несколько стадий очистки при выделении ВРПС из растительного сырья, в составе могут присутствовать вещества, обладающие схожими физико-химическими свойствами с полисахаридами (белки, нуклеиновые кислоты). Наличие этих примесей в образце может оказывать существенное влияние на биологическую активность и, в свою очередь, вызвать нежелательные побочные эффекты. Также известно, что наличие остатков урсоловых кислот в структуре ВРПС может обуславливать их высокую биологическую активность (противоопухолевую, иммуномодулирующую и т.д.) [31]. Поэтому количественное содержание

примесей белка и нуклеиновых кислот, а также уроновых кислот является важной характеристикой ВРПС.

Для расчета количественного содержания белка строили калибровочный график, с использованием стандартных растворов сывороточного альбумина (рисунок 29 А).

Для расчета содержания уроновых кислот строили калибровочный график, с использованием стандартных растворов галактуроновой кислоты (рисунок 29 Б).

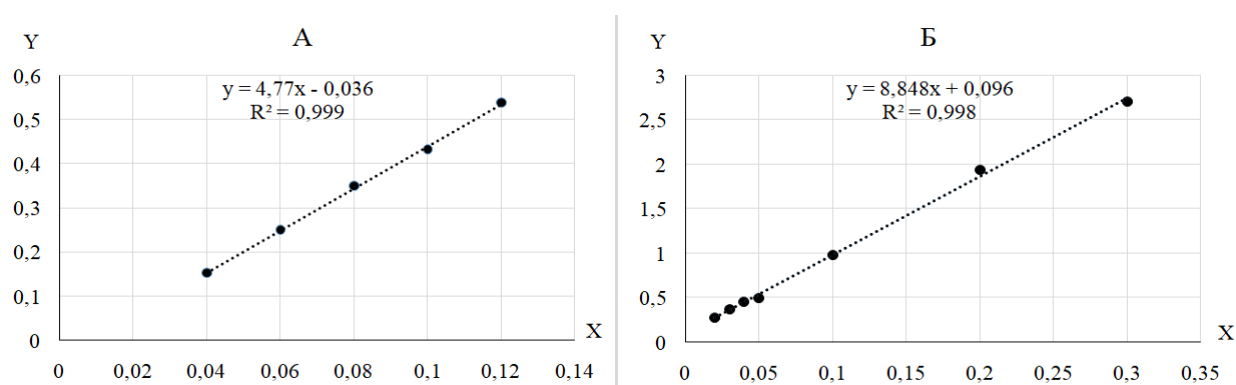


Рисунок 29 – Калибровочные графики: А – по сывороточному альбумину; Б – по галактуроновой кислоте.

Данные по содержанию общих углеводов, белка, уроновых и нуклеиновых кислот в исследуемых ВРПС представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика образцов ВРПС *LM*, *LT* и *SP* (n=3)

ПС	Содержание в образце, %			
	<i>углеводы</i>	<i>белок</i>	<i>нуклеиновые кислоты</i>	<i>уроновые кислоты</i>
<i>LM</i>	96,9±1,8	0,14±0,03	0,0010±0,0001	41,77±0,03
<i>LT</i>	97,9±0.9	0,38±0,07	0,0043±0,0002	18,45±0,03
<i>SP</i>	98,4±2,0	0,27±0,06	0,0055±0,0004	30,28±0,03

Моносахаридный состав ПС определяли методом газовой хроматографии после полного кислотного гидролиза и получения триметилсилильных производных (гл.2).

Определение моносахаридного состава проводили по сопоставлению времен удерживания пиков на хроматограммах стандартов силилированных

моносахаридов с временами удерживания пиков на хроматограмме силилированного гидролизата ВРПС, а также по совпадению масс-спектров с библиотечными (см. приложение 1): арабиноза ($R_t = 12,354; 12,419; 12,735$), глюкоза ($R_t = 15,429$), ксилоза ($R_t = 13,443; 14,031$), манноза ($R_t = 14,614$), галактоза ($R_t = 14,708; 15,146; 15,566$), рамноза ($16,170$).

При этом установлено, что полисахариды всех видов ряски, характеризуются низким содержанием примесей – белка и нуклеиновых кислот.

Из данных ГХ-МС анализа следует, что полученные полисахариды отличаются по моносахаридному составу (таблица 11). В образцах *LM* и *SP* преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в образце *LM* обнаружена ксилоза, а в *SP* арабиноза. Полисахариды, полученные из *LT*, значительно отличаются по мономерному составу: в отличие от *LM* и *SP*, мажорным мономером является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

Таблица 11 – Моносахаридный состав полисахаридов

Вид ряски	Содержание, %					
	<i>Глюкоза</i>	<i>Галактоза</i>	<i>Ксилоза</i>	<i>Арабиноза</i>	<i>Манноза</i>	<i>Фруктоза</i>
<i>LM</i>	35.07	10.56	12.60	-	-	-
<i>LT</i>	15.51	40.37	-	-	18.57	7.10
<i>SP</i>	41.33	10.43	-	12.88	-	5.08

Одной из основных характеристик в изучении полисахаридов является их молекулярная масса (ММ), так как она определяет величину молекулы полимера и может косвенно характеризовать ее длину и степень разветвленности. Известно также, что от молекулярной массы полисахаридов зависит их иммуномодулирующее действие. Способностью снижать иммунную реактивность обладают пектины и галактуронаны с молекулярной массой свыше 300 кДа, а иммуностимулирующее действие пектинов вызывается макромолекулами с молекулярной массой 20-100 кДа [42].

Показатели молекулярно-массового распределения (ММР) ВРПС, выделенных из трех видов ряски, определяли методом ВЭЖХ (глава 2).

Для определения ММР была построена логарифмическая калибровочная прямая по растворам декстранов молекулярной массой 1000, 17000, 40000, 250000, 500000, 1200000 Да при тех же условиях хроматографирования (рисунок 30).

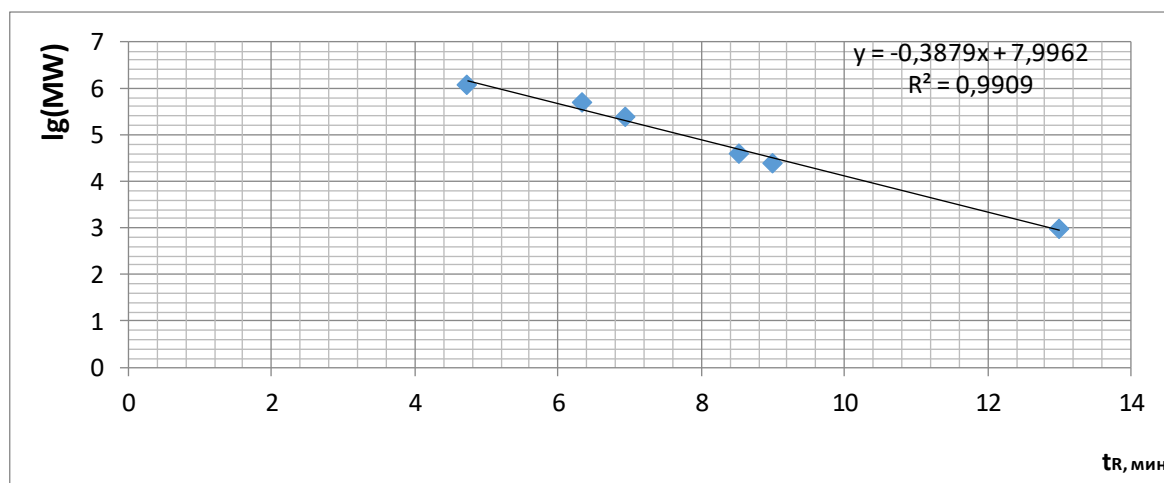


Рисунок 30 – Калибровочная прямая эксклюзионной хроматографии полисахаридов

Полученные хроматограммы полисахаридов всех видов рясок (рисунок 31, таблица 12) имеют схожий вид: наблюдается три пика с различными молекулярными массами, что свидетельствует о высокой степени полидисперсности.

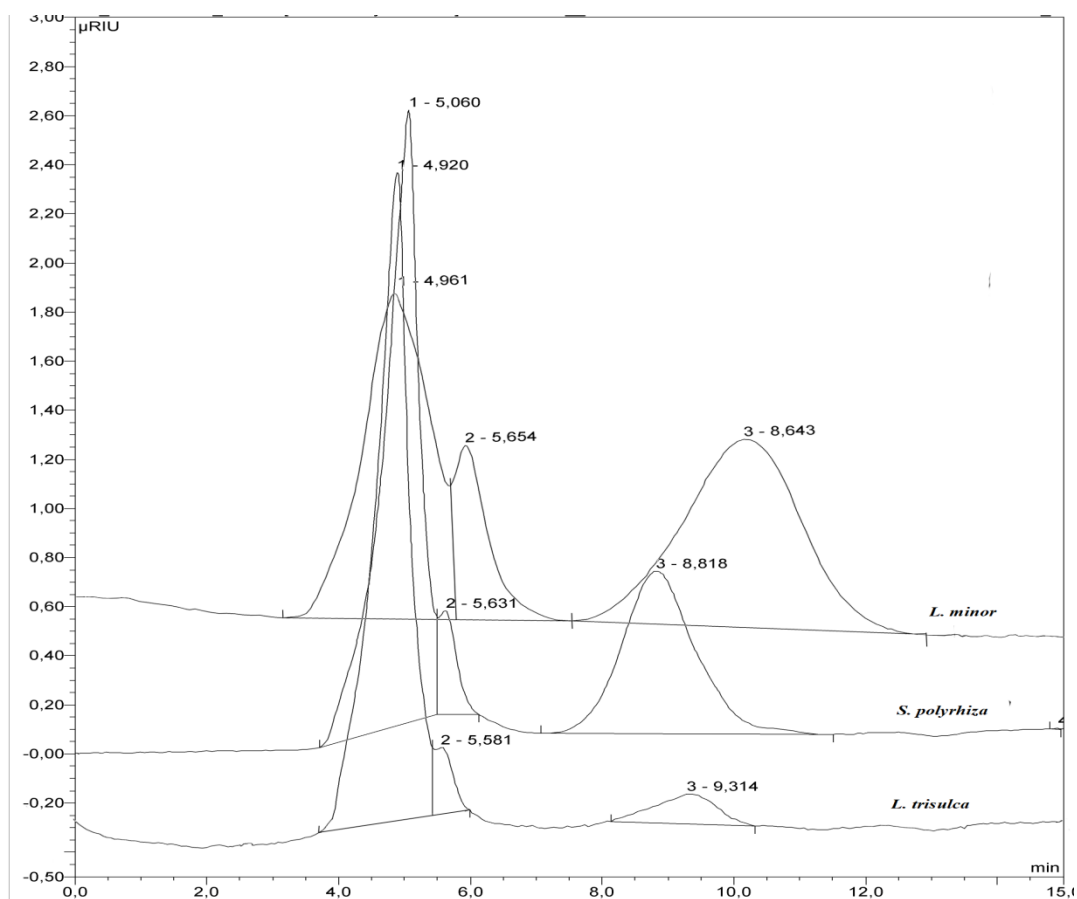


Рисунок 31– Хроматограмма полисахаридных комплексов

Таблица 12– Результаты молекулярно-массового анализа ПС, выделенных из *LM*, *LT* и *SP*

Вид ряски	№ пика	t_R , мин	ММ, кДа	W, %
<i>LM</i>	1	4,961	1151.7	44.11
	2	5,654	615.3	11.37
	3	8,643	41.6	44.52
<i>LT</i>	1	4,92	1195.4	88.18
	2	5,581	657.6	4.95
	3	9,314	22.4	6.87
<i>SP</i>	1	5,06	1053.0	61.24
	2	5,631	628.3	5.37
	3	8,818	35.2	33.39

Примечание: t_R – время удерживания, W, % - массовая доля (методом простой нормировки)

Из полученных данных ВЭЖХ видно, что полисахаридный комплекс *LM* состоит из трех полисахаридов с молекулярными массами 1151 кДа, 615 кДа и 41 кДа с относительным содержанием 44,11; 11,37 и 44,52%

соответственно. Из данных ГХ-МС анализа можно сделать вывод, что полисахаридный комплекс *LM* является глюкоуронаном с небольшим содержанием галактозы и ксилозы.

Полисахаридный комплекс *LT* состоит из трех полисахаридов с молекулярными массами 1195 кДа, 657 кДа и 22 кДа с относительным содержанием 88,18; 4,95; и 6,87%, соответственно. Из данных ГХ-МС анализа можно сделать вывод, что полисахаридный комплекс *LT* является галактаном с включениями уроновой кислоты (18,45%), маннозы, глюкозы и фруктозы.

Полисахаридный комплекс *SP* состоит из трех полисахаридов с молекулярными массами 1053 кДа, 628 кДа и 35 кДа с относительным содержанием 61,24; 5,37; и 33,39%, соответственно. Из данных ГХ-МС анализа можно сделать вывод, что полисахаридный комплекс *SP* является глюкоуронаном с небольшим содержанием арабинозы, галактозы и фруктозы.

Таким образом, качественные характеристики ММР полисахаридов *LM*, *LT* и *SP* отличаются незначительно, чего нельзя сказать о мономерном составе: ПС, полученные из *LM* и *SP*, можно отнести к **кислым полисахаридам** (содержание глюкуроновой кислоты около 41,77 и 30,28%), в то время как ПСК *LT* содержит 18,45% глюкуроновой кислоты. Так же есть различия в наличии в каждом ПСК «своего» отличительного сахара: *LM* - ксилоза, *LT* - манноза, *SP* – арабиноза.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В результате проведённого общего фитохимического анализа, доказано присутствие во всех исследуемых видах ряски таких групп БАВ как дубильные вещества, антраценпроизводные, флавоноиды, кумарины, фенолкарбоновые кислоты, аминокислоты и полисахариды. Во всех образцах не обнаружены алкалоиды. В траве ряски малой обнаружены сапонины, которые отсутствуют в двух других видах.

2. Все исследуемые виды ряски в большей степени накапливают кумарины: мажорными компонентами *LM* являются хаплоперозид *A* и эскулин, *LT* – эскулин и эскулетин, *SP* – эскулин и фраксетин. Все виды характеризуются накоплением флавоноида мирицетина и изофлавоноида ононина.

3. Во всех трёх видах ряски в основном накапливаются *гидроксibenзойные* кислоты. Основным компонентом фенолкарбоновой природы является *2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная кислота* с наибольшим содержанием в *LM*). *SP* отличается от двух других видов ряски содержанием ряда гидроксibenзойных кислот: *2,5-дигидроксибензойная* (отсутствует в *LM* и *LT*); *2,6-дигидроксибензойная* (*LM* – 0,17%; *LT* – 0,05%; *SP* – 2,02%); *3,5-дигидроксикарбоновая кислота* (в 9,5 раз больше, чем других видах ряски). Для всех исследуемых видов рясок характерно накопление значительного количества таких гидроксикоричных кислот как *хлорогеновая* (0,15-0,61%) и *кофейная* (0,03-0,26%). *SP* отличается от *LM* и *LT* накоплением *м-кумаровой кислоты* (*LM*, *LT* – следовые количества) и отсутствием *коричной, о-кумаровой и ванильной кислот*.

4. В исследуемых видах ряски было установлено наличие 19 аминокислот, в том числе 8 незаменимых. Среди заменимых аминокислот преобладают аспарагиновая и глютаминовая кислоты, аргинин, аланин и глицин. Мажорными компонентами незаменимых аминокислот для всех видов являются лейцин, валин, лизин, фенилаланин, треонин и изолейцин. В траве

LT содержится меньшее количество как заменимых, так и незаменимых аминокислот (59,7 мг на 1 г сырья) по сравнению с *LM* и *SP* (127,90 и 131,55 мг на 1 г сырья, соответственно).

5. Исследуемые виды ряски содержат преимущественно связанные сахара: содержание связанных сахаров *LM* в 2 раза превышает количество свободных, *LT* и *SP* – в 14 и 7,5 раза соответственно.

6. Полисахариды, выделенные из растений рода *Lemna*, характеризуются низким содержанием примесей (белок и нуклеиновые кислоты) и высокой степенью полидисперсности. Изучаемые полисахариды значительно различаются по составу: *LM* и *SP* преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в *LM* обнаружена ксилоза, а в *SP* - арабиноза. В ПС, полученных из *LT* мажорным мономером, является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАС *L. MINOR* L., *L. TRISULCA* L. И *SPIRODELLA POLYRRHIZA* *SCHLEID (L. POLYRRHIZA L.)*

По данным литературы полисахариды и фенольные соединения растений способны влиять на функции макрофагов: повышают активность фагоцитов, синтез активных форм кислорода и монооксида азота (NO), который, регулирует функции различных систем организма, участвует в процессах клеточного иммунитета, снижает развитие патогенной бактериальной флоры, является инициатором апоптоза и пролиферации, в том числе макрофагов, Т-лимфоцитов, тучных клеток, нейтрофилов и лимфоцитов [87, 126, 132, 140]. Эта информация, а также данные о химическом составе рясок послужили основанием для исследования иммуотропной активности полифенолов (ПФ) и полисахаридов (ПС) изучаемых видов и первичного исследования безопасности экстрактивных комплексов БАС.

4.1. Исследование острой токсичности

Исследованные экстракты в дозах 2000, 5000 и 10000 мг/кг, не вызывали гибели экспериментальных животных на протяжении двух недель наблюдения после внутрижелудочного введения. Не наблюдали существенных изменений в поведении животных или появления патологических форм поведения. Это позволяет отнести исследуемые экстракты к малотоксичным веществам по классификации Ходжа и Стернера. Согласно существующей классификации (ГОСТ 12.1.007 – 76), исследуемые экстракты соответствуют IV классу «Вещества малоопасные».

4.2. Влияние различных концентраций БАС рясок на пролиферацию иммунокомпетентных клеток

Для определения оптимальных рабочих концентраций и оценки возможного токсического действия изучаемых веществ на клетки системы иммунитета было изучено влияние полифенолов (ПФ) и полисахаридов (ПС) из *LM*, *LT* и *SP* на пролиферацию спленоцитов интактных мышей линии C57/BL6 *in vitro*. В качестве контроля использовали спленоциты,

инкубированные со средой (контроль 1) и спленоциты, культивированные с конканавалином А (КонаА) (контроль 2).

В результате проведённых исследований было обнаружено, что ПС, выделенные из вышеперечисленных растений, не оказывали токсического действия на спленоциты и не снижали уровень пролиферации по сравнению с интактным контролем 1 (таблица 13). Уровень пролиферации при инкубации с ПС *LM* не отличался от интактного контроля, но был достоверно в 1,2 и 1,4 раза ниже митогенстимулированного уровня при применении концентраций 20 и 80 мкг/мл, соответственно. Добавление ПС *LT* и *SP* приводило к дозозависимому увеличению показателя относительно контроля 1. Более того культивирование с ПС *LT* в концентрациях 20 и 80 мкг/мл приводило к усилению пролиферации на уровне митогена, а при использовании ПС *SP* только в максимальной концентрации.

Таблица 13 – Влияние различных концентраций полифенолов и водорастворимых полисахаридов рясок на пролиферацию спленоцитов интактных мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Пролиферация, у.е. оптической плотности
Среда (контроль 1)	-	155±14
КонаА (контроль 2)	4	266±15*
ПС <i>LM</i>	5	147±7▲
	20	185±15▲
	80	199±19▲
ПС <i>LT</i>	5	214±8*▲
	20	233±16*
	80	289±15*
ПС <i>SP</i>	5	186±5*▲
	20	193±3*▲
	80	228±9*
ПФ <i>LM</i>	0,5	166±9▲
	5	159±5▲
	10	188±34▲
	20	167±9▲
	80	143±7▲

	160	171±43 [▲]
ПФ <i>LT</i>	0,5	141±5 [▲]
	5	137±7 [▲]
	10	161±2 [▲]
	20	185±12 [▲]
	80	174±7 [▲]
	160	152±4 [▲]
ПФ <i>SP</i>	0,5	179±18 [▲]
	5	169±11 [▲]
	10	157±12 [▲]
	20	133±4 [▲]
	80	122±4 [▲]
	160	132±6 [▲]

Примечание: *– различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0,05$; ▲– различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0,05$.

При инкубации спленоцитов с ПФ *LM*, ПФ *LT* и ПФ *SP* значения показателя были соизмеримы с интактным контролем, но достоверно ниже относительно стимуляции спленоцитов специфическим Т-клеточным митогеном Кон А (контроль 2): в 1,4-1,9 раза (ПФ *LM*), в 1,4-1,9 раз (ПФ *LT*), в 1,5-2,2 раза (ПФ *SP*) в зависимости от исследуемых концентраций.

Таким образом, ПС и ПФ не оказывают токсического действия на лимфоцитарное звено иммунной системы. ПС *LT* и ПС *SP* в большой концентрации активируют пролиферацию спленоцитов.

4.3. Влияние различных концентраций БАС (ПФ и ПС) рясок на NO-стимулирующую активность антигенпрезентирующих клеток

В литературе имеются сведения о том, что полисахариды микроорганизмов, грибов и высших растений благодаря способности изменять функциональное состояние антиген-презентирующих клеток (макрофаги и дендритные клетки) обладают иммуномодулирующими свойствами [66, 110, 130, 136]. Известно, что различные полисахариды могут связываться практически со всеми рецепторами АПК [126]. Поэтому дальнейшие исследования проводились на модели перитонеальных макрофагов.

Влияние ПС и ПФ *LM*, *LT* и *SP* на антиген-презентирующие клетки оценивали по их способности стимулировать продукцию NO перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6 *in vitro* при культивировании 48 часов. В качестве контроля использовали макрофаги (Мф), инкубированные в культуральной среде (контроль 1), и макрофаги, культивированные с ЛПС (стандартный активатор макрофагальных клеток микробного происхождения; контроль 2).

В ходе проведённых экспериментов было выявлено (таблица 14), что все изученные ПС вызывали усиление продукции оксида азота. Так, ПС *LM* вызывали увеличение концентрации нитритов в 2,2 раза в концентрации 5 мкг/мл, в 1,9 раза – 20 мкг/мл и в 1,7 раза – 80 мкг/мл с $2,7 \pm 0,40$ мкМ в контроле до $6,1 \pm 0,33$, $5,0 \pm 0,18$ и $4,7 \pm 0,47$ мкМ соответственно. При инкубации с ПС *LT* концентрация NO увеличивалась в 5,8 раза (5 мкг/мл), в 6,5 раза (20 мкг/мл) и в 5,1 раза (80 мкг/мл). ПС *SP* усиливали продукцию оксида азота в 4,9 раза (5 мкг/мл), в 4,6 раза (20 мкг/мл) и в 3,5 раза (80 мкг/мл). Концентрация нитритов при культивировании с ЛПС увеличивалась в 8,7 раза с $2,7 \pm 0,40$ мкМ до $23,5 \pm 0,87$ мкМ, что значительно превышало значения показателя при активации ПС.

Таблица 14 – Влияние различных концентраций полифенолов и водорастворимых полисахаридов на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$).

Исследуемое вещество	Концентрация (мкг/мл)	Концентрация нитритов (мкМ)
Среда (контроль 1)	-	$2,74 \pm 0,40$
ЛПС (контроль 2)	4	$23,49 \pm 0,87^*$
ПС <i>LM</i>	5	$6,10 \pm 0,33^{*•}$
	20	$5,00 \pm 0,18^{*•}$
	80	$4,69 \pm 0,47^{*•}$
ПС <i>LT</i>	5	$15,81 \pm 1,07^{*•}$
	20	$17,49 \pm 1,07^{*•}$
	80	$13,93 \pm 0,52^{*•}$
ПС <i>SP</i>	5	$13,13 \pm 1,02^{*•}$
	20	$12,38 \pm 0,62^{*•}$
	80	$9,39 \pm 0,8^{*•}$

ПФ <i>LM</i>	5	3,16±0,13•
	20	3,62±0,22•
	80	0,81±0,03*•
ПФ <i>LT</i>	5	9,17±0,24*•
	20	3,62±0,13•
	80	2,08±0,03•
ПФ <i>SP</i>	5	3,32±0,10•
	20	3,23±0,16•
	80	1,26±0,23*•

Примечание: *– различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0,05$; • – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0,05$.

ПФ *LM* в концентрациях 5 и 20 мкг/мл не оказывали значительного влияния на продукцию оксида азота, а в концентрации 80 мкг/мл выявлено снижение продукции нитритов в 3,4 раза по сравнению с контролем 1 ($0,8 \pm 0,03$ мкМ от $2,7 \pm 0,40$ мкМ) и в 29,3 раз по сравнению с митогенстимулированным контролем 2 (от $23,5 \pm 0,87$ мкМ). При инкубации Мф с ПФ *LT* в концентрации 5 мкг/мл продукция нитритов увеличивалась в 3,4 раза с $2,7 \pm 0,40$ мкМ до $9,2 \pm 0,24$ мкМ, но не изменялась в концентрациях 20 и 80 мкг/мл. Культивирование Мф с ПФ *SP* в концентрации 5 и 20 мкг/мл не изменяли активность NO-синтазы, а в концентрации 80 мкг/мл снижали продукцию оксида азота в 2,1 раза по сравнению с контролем 1 (с $2,7 \pm 0,40$ до $1,3 \pm 0,23$ мкМ).

Таким образом, ПС *LM*, *LT*, *SP* в разной степени стимулируют продукцию оксида азота, а ПФ изучаемых растений в высоких концентрациях снижают концентрацию нитритов в культуре клеток.

4.4. Влияние полимиксина В на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами в присутствии ПС и ПФ рясок

Известно, что экстракты, выделенные из растений, могут содержать примесь эндотоксина (липополисахарида), который проявляет NO-стимулирующую активность [126]. Для того чтобы убедиться, что повышение продукции оксида азота перитонеальными макрофагами мышей в присутствии ПС и ПФ, выделенных из ряски малой, ряски трёхдольной, многокоренника обыкновенного не связано с эндотоксином, были проведены эксперименты с

использованием полимиксина В, связывающего ЛПС. В лунки 96-луночного планшета вносили исследуемые образцы ПС (20 мкг/мл) или ПФ (5 мкг/мл) и полимиксин В, после часовой инкубации в лунки добавляли перитонеальные макрофаги и через 48 ч оценивали концентрацию нитритов в супернатантах клеток. В предварительных экспериментах с использованием разных концентраций ЛПС была подобрана концентрации полимиксина В – 10 мкг/мл.

Из таблицы 15 видно, что полимиксин В не влиял на спонтанный уровень продукции оксида азота макрофагами (1,53 мкМ и 2,08 мкМ, соответственно). При культивировании с ЛПС концентрация нитритов увеличивалась в 34 раза с $2,08 \pm 0,10$ мкМ в контроле до $71,12 \pm 1,72$ мкМ в опыте. Добавлении полимиксина В в культуру с макрофагами и ЛПС снижало показатель в 24 раза (до $2,93 \pm 0,20$ мкМ) практически до спонтанного уровня.

Таблица 15 – Влияние полимиксина В на стимулированную полисахаридами и полифенолами продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$)

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов (мкМ)	
		без полимиксина В (контроль 2)	с полимиксином В
Среда (контроль 1)	-	$2,08 \pm 0,10$	$1,53 \pm 0,11$
ЛПС	1	$71,12 \pm 1,72^*$	$2,93 \pm 0,20^\bullet$
ПС <i>LM</i>	20	$26,65 \pm 0,31^*$	$43,97 \pm 0,23^* \bullet$
ПС <i>LT</i>	20	$52,76 \pm 0,17^*$	$57,73 \pm 0,71^* \bullet$
ПС <i>SP</i>	20	$41,74 \pm 1,38^*$	$51,38 \pm 0,36^* \bullet$
ПФ <i>LM</i>	5	$2,0 \pm 0,03$	$2,01 \pm 0,07$
ПФ <i>LT</i>	5	$9,79 \pm 0,38^*$	$2,81 \pm 0,12^* \bullet$
ПФ <i>SP</i>	5	$1,68 \pm 0,12$	$1,98 \pm 0,11$

Примечание: * – различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0,05$;

• – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0,05$.

Все исследуемые полисахариды стимулировали продукцию NO: ПС *LM* – в 12,8 раз (до $26,65 \pm 0,31$ мкМ), ПС *LT* – в 25,4 раз (до $52,76 \pm 0,17$ мкМ), ПС *SP* – в 20,1 раз (до $41,74 \pm 1,38$ мкМ). При добавлении полимиксина В в культуры, содержащие изученные образцы растительных полисахаридов,

уровень продукции оксида азота не снижался и даже несколько увеличивался: в 1,6 раза в культуре с ПС *LM* (до $43,97 \pm 0,23$ мкМ), в 1,1 раза в культуре с ПС *LT* (до $57,73 \pm 0,71$ мкМ), в 1,2 раза в культуре с ПС *SP* (до $51,38 \pm 0,36$ мкМ).

ПФ *LM* и *SP* не обладали способностью стимулировать продукцию оксида азота ($2,0 \pm 0,03$ и $1,68 \pm 0,12$ мкМ, соответственно). Инкубация данных образцов с полимиксином В не влияла на выработку нитритов. При культивировании с ПФ *LT* концентрация нитритов увеличивалась в 4,7 раза (до $9,79 \pm 0,38$ мкМ), но при добавлении к данному полифенолу полимиксина показатель снижался в 3,5 раза с 9,79 мкМ до $2,81 \pm 0,12$ мкМ.

Полученные результаты доказывают отсутствие примесей эндотоксина в образцах всех ПС, выделенных из изучаемых растений. Усиление продукции оксида азота перитонеальными макрофагами, обусловлено непосредственно полисахаридными комплексами, выделенными из растений. Снижение концентрации нитритов в культуре клеток с ПФ *LT* и полимиксином В свидетельствует о наличии примеси эндотоксина в составе изучаемого образца и выявленная активация является следствием этой примеси.

4.5. Влияние ПС, выделенных из межвидовых смесей растений рода рясок, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей

Заготовка сырья растений рода рясок осложнена трудоёмкой сортировкой его по видовому составу. Ботанический анализ показал, что в природе чаще всего встречается межвидовая смесь разных видов растений рода рясок *Lemna* – ряски малой (*Lemna minor*), ряски трёхдольной (*Lemna trisulca*) и ряски многокоренной (*Lemna polyrrhiza*) в соотношениях 80:10:10 или 80:0:20, соответственно.

Из таблицы 16 видно, что все индивидуальные образцы ПС рясок, обладают значительным NO-активирующим действием на макрофаги, а ПС *LT* и *SP* достоверно превышают эффекты ПС *LM*. Выявленные стимулирующие свойства ПС *SP* в 1,2 раза превышают митоген-активированный контроль. При этом концентрация нитритов при культивировании клеток со смесями ПС

LM:LT:SP в соотношениях 80:10:10, 80:0:20 и 50:25:25 сохранялась на уровне ПС ряски малой и ЛПС-стимулированного контроля, эффективность смесей 80:10:10 и 80:0:20 была незначительно ниже *NO*-активирующего действия ПС ряски трёхдольной *LT* и *SP*.

Таким образом, полисахариды, выделенные из межвидовых смесей растений рода рясок, не теряют своих *NO*-стимулирующих свойств.

Таблица 16 – Влияние ПС, выделенных из межвидовых смесей растений рода рясок, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$)

<i>Исследуемое вещество</i>	<i>Концентрация, мкг/мл</i>	<i>Концентрация нитритов, мкМ</i>
Среда (контроль 1)	–	2,16±0,09
ЛПС	1	34,53±0,32*
ПС LM	20	33,59±0,38*▲◆
ПС LT	20	39,06±0,79*■
ПС SP	20	42,70±0,57*●■
ПС LM:LT:SP (80:10:10)	20	33,20±0,37*▲◆
ПС LM:LT:SP (80:0:20)	20	33,23±0,23*▲◆
ПС LM:LT:SP (50:25:25)	20	36,97±0,85*

Примечание: * – различия показателя со средой достоверны, ● – различия показателя со средой с ЛПС достоверны, ■ – различия показателя по сравнению с ПС LM достоверны, ▲ – различия показателя с ПС LT достоверны, ◆ – различия показателя с ПС LP достоверны; $p < 0,05$.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. ПС и ПФ, выделенные из травы *LM*, *LT*, *SP*, не оказывают токсического действия на иммунокомпетентные клетки мышей, а полисахариды в большой концентрации активируют пролиферацию спленоцитов.
2. ПС, выделенные из *LM*, *LT*, *SP*, а также межвидовых смесей этих растений, эндотоксин-независимо стимулируют продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных животных. ПФ, выделенные из ряски малой, ряски тройчатой и ряски многокорневой в высоких концентрациях снижают пролиферативные свойства клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Выявленная цитотоксичность обуславливает снижение продукции нитритов антигенпрезентирующими клетками.
3. ПС, выделенные из *LM*, *LT*, *SP*, поляризуют антигенпрезентирующие клетки по классическому пути, усиливая Th-1 тип иммунного ответа.
4. ПС, выделенные из межвидовых смесей растений рода рясок в различных соотношениях, сохраняют иммунотропную активность на уровне ПС из отдельных видов рясок.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ КАЧЕСТВА ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ

5.1. Исследование внешних (макроскопических) и микроскопических признаков *Lemna minor*, *Lemna trisulca*, *Spirodela polyrrhiza*

Как уже было отмечено в обзоре литературы, на территории Сибири и в России в целом, ареалы ряски маленькой, ряски тройчатой и многокоренника обыкновенного часто накладываются друг с другом. Это подтверждают и результаты нашего исследования. При заготовке исследуемого сырья на территориях Томской, Новосибирской, Кемеровской областей, в большинстве случаев нами выявлены водоемы со смешанными зарослями (рисунок 32) в соотношениях, указанных в таблице 17.

Таблица 17 – Структура зарослей в водоемах района исследований

Расположение водоема	Наименование вида			Соотношение видов в составе заросли, %
	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>	
Томская область, Томский район, Коларовский тракт, озеро	-	-	+	0/0/100
Томская область, Кожевниковский район, озеро	+	+	-	50/50/0
Томская область, Томский район, п. Просторный, озеро	+	+	+	85/10/5
Томская область, Шегарский район, озеро	+	+	+	80/10/10
Томская область, Томский район, оз. Песчаное	+	+	-	20/80/0
Томская область, Томский район, окр.д. Березоречка, оз.Кирек	+	-	-	100/0/0
Томская область, окр. г. Стрежевой, озеро	+	+	+	85/10/5
Кемеровская область, река Иня	+	+	-	50/50/0

Расположение водоема	Наименование вида			Соотношение видов в составе заросли, %
	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>	
Кемеровская область, Степногутовский район, оз.Танай	+	+	+	40/30/30
Новосибирская область, г. Новосибирск, Первомайский район, ул.Радиостанция, озеро	+	-	+	50/0/50
Новосибирская область, г. Новосибирск, Первомайский район, ул.Ласточкина, озеро	+	-	+	50/0/50
Новосибирская область на границе с Томской областью, оз.Щучье	+	+	-	50/50/0
Новосибирская область, Тогучинский район, Степногутовское поселение, пруд	+	-	-	100/0/0

Учитывая, что все три систематически близких вида часто образуют совместные заросли, а также вклад полисахаридного комплекса всех видов в иммуностропную активность, к заготовке и применению в медицинской практике предлагается растительное сырье с наименованием «Ряски трава», представляющее собой смесь ряски малой (*Lemna minor*), ряски тройчатой (*Lemna trisulca*) и многокоренника обыкновенного (ряски многокорневой) (*Spirodela polyrrhiza*).

Внешние (макроскопические) и микроскопические (анатомические) признаки сырья определяли и описывали по методикам соответствующих ОФС ГФ РФ (1.5.1.0002.15 Травы, 1.5.3.0003.15 Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов) [10, 11].



Рисунок 32 – Фрагмент смешанной заросли. 1 - ряска малая (*Lemna minor*), 2 - ряска тройчатая (*Lemna trisulca*), 3 - многокоренник обыкновенный (ряска многокорневая) (*Spirodela polyrrhiza*).

Внешние признаки.

L. minor. Листецы непрозрачные (рисунок 33) от обратнойцевидной до эллиптической и округлой формы (2-3 мм длиной, 1-2,5 мм шириной), цельнокрайние, с тупой верхушкой и округло-клиновидным, реже округлым основанием, с 2-3 радиально расположенными жилками. Верхняя сторона листеца слегка выпуклая светло-зеленого или зеленого цвета, нижняя сторона листеца зеленая плоская. Листецы *L. minor* одиночные или образующие группы из 2-4 особей. Карман, из которого развивается дочернее растение обычно один (0,6-1,7 мм длиной), располагается сбоку. Корни волосовидные одиночные, отрастают от места соединения жилок, от бледно-зеленого до темно-коричневого цвета, длиной 11-18 мм.

L. trisulca. Листецы полупрозрачные (рисунок 34), плоские, продолговатые (2-6 мм длиной, 1-2 мм шириной) с зубчато-волнистым краем, тупой или выямчато-усеченной верхушкой и клиновидно-округлым основанием, суженным в длинную ножку (3-10 мм длиной). Цвет листецов от светло-зеленого до болотно-зеленого. Листецы *L. trisulca* образуют группы из 10-20 особей, образующихся в результате роста дочерних особей из двух супротивно расположенных карманов (1-3 мм длиной). На плоскостном препарате хорошо просматриваются три радиально расположенные жилки. Корни волосовидные одиночные, отрастают от места соединения жилок от зеленого до зеленовато-коричневого цвета, длиной 10-16 мм.

S. polyrhyza. Листецы непрозрачные (рисунок 35), от округло-грушевидной до эллиптической или округлой формы (2-6 мм длиной, 2-4 мм шириной), цельнокрайние, с тупой, реже заостренной верхушкой и округлым основанием. Жилкование дуговидное, жилки в количестве 6-8 реже 10. Верхняя сторона листеца слегка выпуклая, как и у *L. minor*, светло-зеленого цвета, на некоторых листецах над карманом имеется малиново-фиолетовое пятно, нижняя сторона листеца плоская, малиново-фиолетового цвета. Листецы *S. polyrhyza* обычно образуют группы из 2-3 особей, реже одиночные. Карман всегда один (0,5-2 мм длиной), расположен симметрично. Корни нитевидно-волосовидные от светло-коричневого до фиолетового цвета длиной до 8-13 мм, расположены эксцентрично, пучками из 8-10 корней, отрастающих от верхушки кармана.

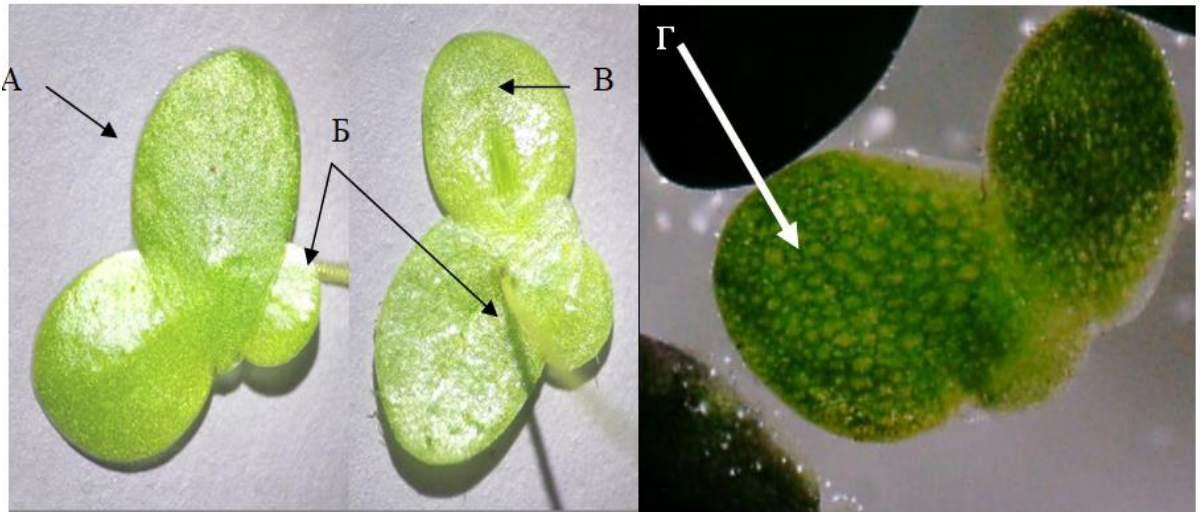


Рисунок 33 – Ряска малая: А – листец верхняя сторона, Б – одиночные корни, В – листец нижняя сторона, Г – аэренхима с воздухоносными полостями на нижней стороне.

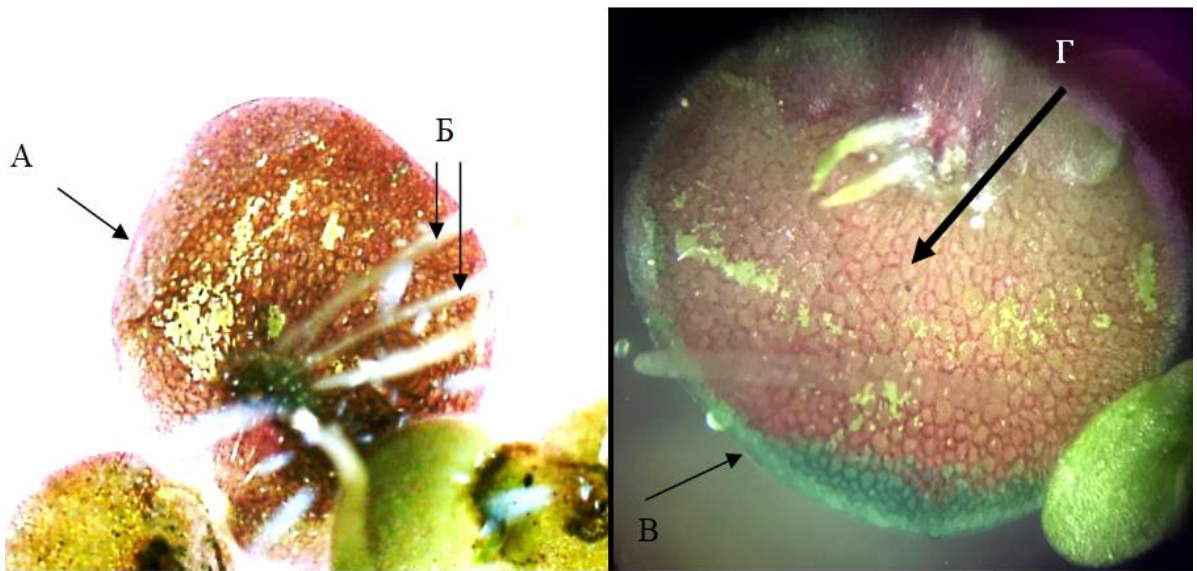


Рисунок 34 – Многокоренник обыкновенный (ряска многокорневая): А – листец нижняя сторона, Б – корни, собранные в пучок из 8-10, В – листец нижняя сторона, Г – аэренхима с воздухоносными полостями.

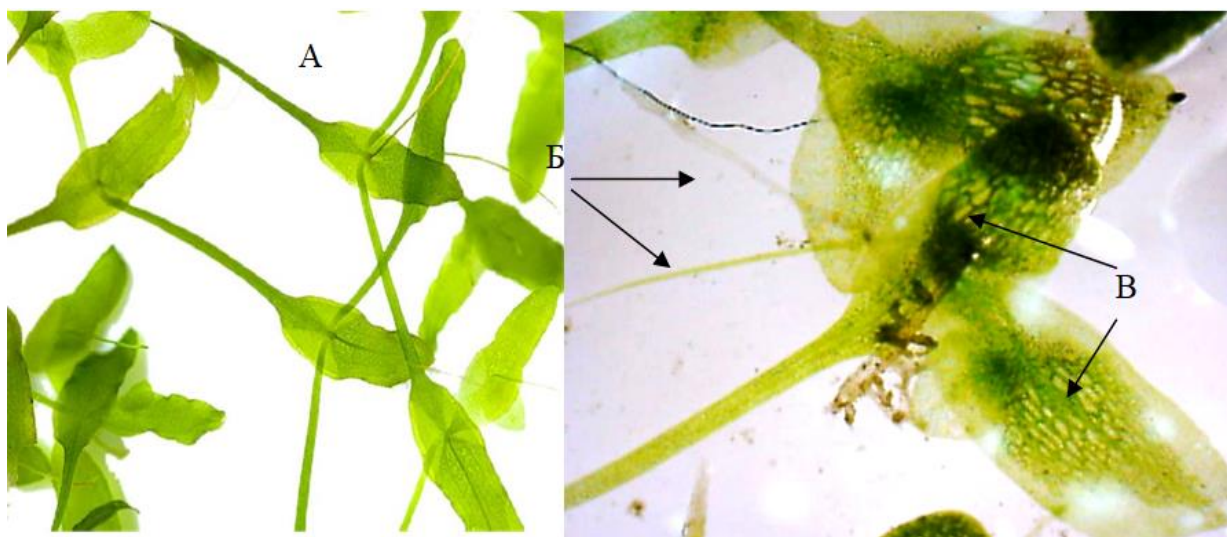


Рисунок 35 – Ряска тройчатая: А – полупрозрачные плоские листецы, Б – одиночные корни, В – аэренхима с воздухоносными полостями на нижней стороне.

Микроскопические признаки

Изучение особенностей микроскопического (анатомического) строения *L. minor* показало наличие на нижней стороне клеток эпидермиса со слабоизвилистыми и сильноизвилистыми продольно вытянутыми стенками (длиннее в 1,5-2 раза клеток верхнего эпидермиса) (рисунок 36), многочисленных аномоцитных устьиц с 5-8 побочными клетками (рисунок 37), направленными вдоль листеца, листецы эпистоматического типа. Клетки верхнего эпидермиса разнонаправленные, слабоизвилистые, многоугольные. Между верхним и нижним эпидермисом хорошо развита аэренхима (рисунок 38), хорошо различимая как в стереомикроскоп, так и в световой микроскоп, аэренхима доходит почти до края листеца и занимает не менее 2/3 его объема. Межклетники округло-эллиптические, их диаметр в 6-12 раз больше диаметра клеток аэренхимы и в 5-6 раз больше клеток верхнего эпидермиса. Клетки-идиобласты с рафидами (на молодых и старых листецах), обычно равны клеткам верхнего эпидермиса, располагаются по всей поверхности листеца и в корне и друзами (на старых листецах), обычно располагающиеся в районе центральной жилки. Клетки мезофилла содержат пластиды. Клетки корня

прямоугольные, прямостенные, вытянутые по длине, на верхушке многоугольные (рисунок 39).

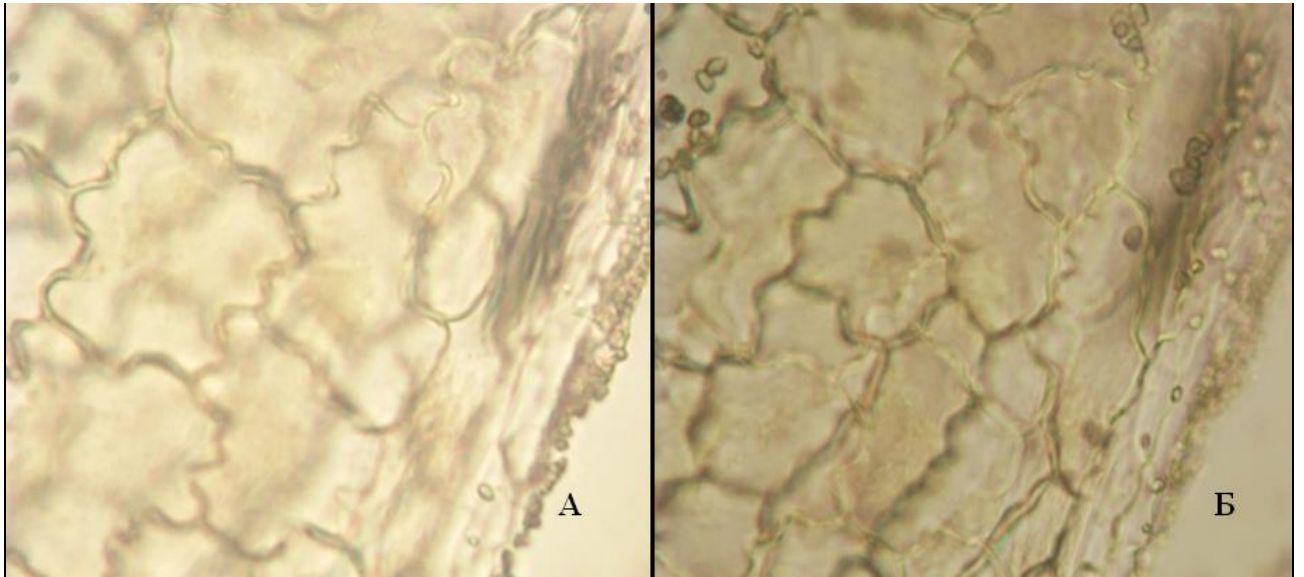


Рисунок 36 – Плоскостной препарат листеца *Lemna minor*: А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис.

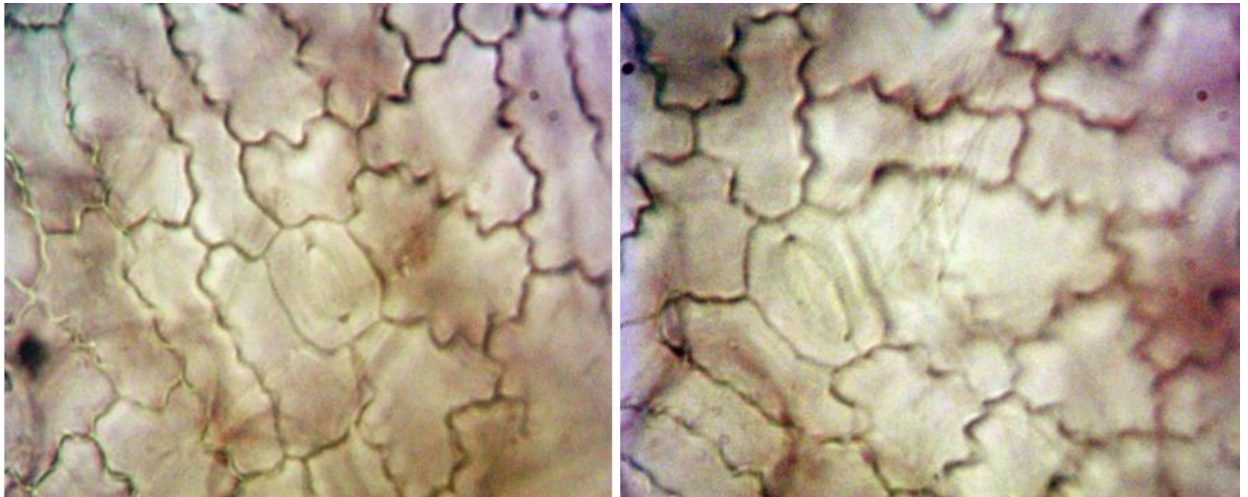


Рисунок 37 – Плоскостной препарат листеца *Lemna minor*:
устьица на нижнем эпидермисе.

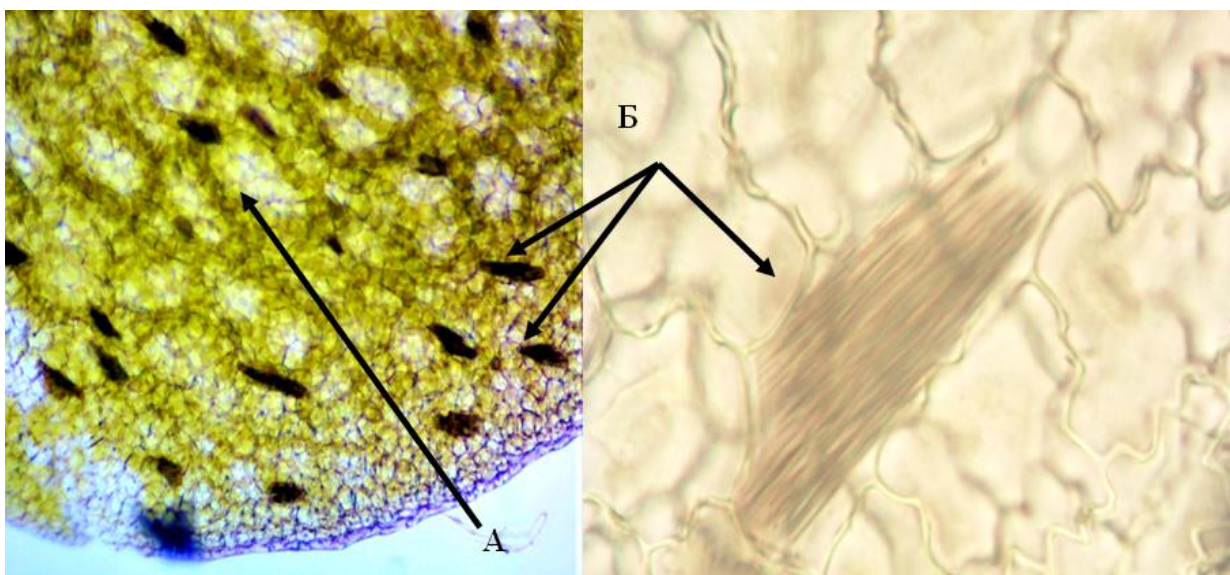


Рисунок 38 – Плоскостной препарат листеца *Lemna minor*:

А - аэренхима, Б – рафиды.

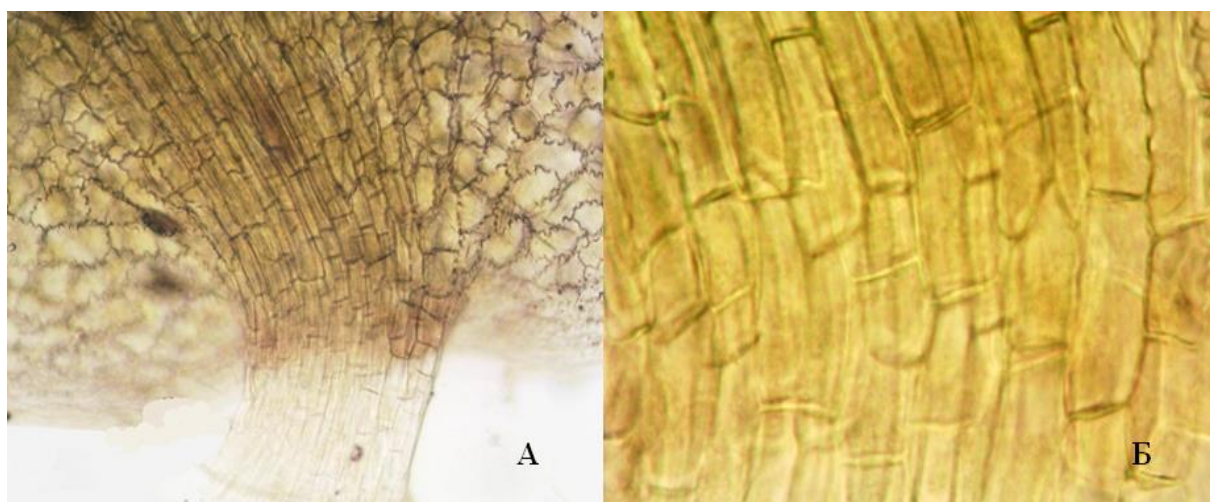


Рисунок 39 – Плоскостной препарат *Lemna minor*: А – основание листеца с корнем, Б - прямостенные клетки эпидермиса корня.

Исследование анатомо-диагностических особенностей *L. trisulca* показало отсутствие устьиц, как с верхней, так и с нижней стороны листеца, что связано с тем, что растение полностью погружено в воду (рисунок 40). Клетки верхнего и нижнего эпидермиса примерно одинаковой длины с разной степенью извилистости. Клетки верхнего эпидермиса разнонаправленные, округло-многоугольные, слабо извилистые; клетки нижнего эпидермиса состоят из комбинированных клеток с волнистыми стенками, которые обычно

расположены в одном направлении (рисунок 40). Клетки-идиобласты с рафидами, редко встречающимися по всей поверхности листеца и друзами, в основном располагающимися по краю (рисунок 41). Аэренхима хорошо заметна в стереомикроскоп, и в плоскостном препарате при рассматривании в световой микроскоп, располагается в центральной части листеца и занимает примерно $1/6-1/7$ ее часть, межклетники имеют овальную форму, их длина в 7-10, а ширина в 4-5 раз больше диаметра клеток аэренхимы и 2-3 раза больше клеток верхнего эпидермиса (рисунки 35 В, 40 В, 41 В).

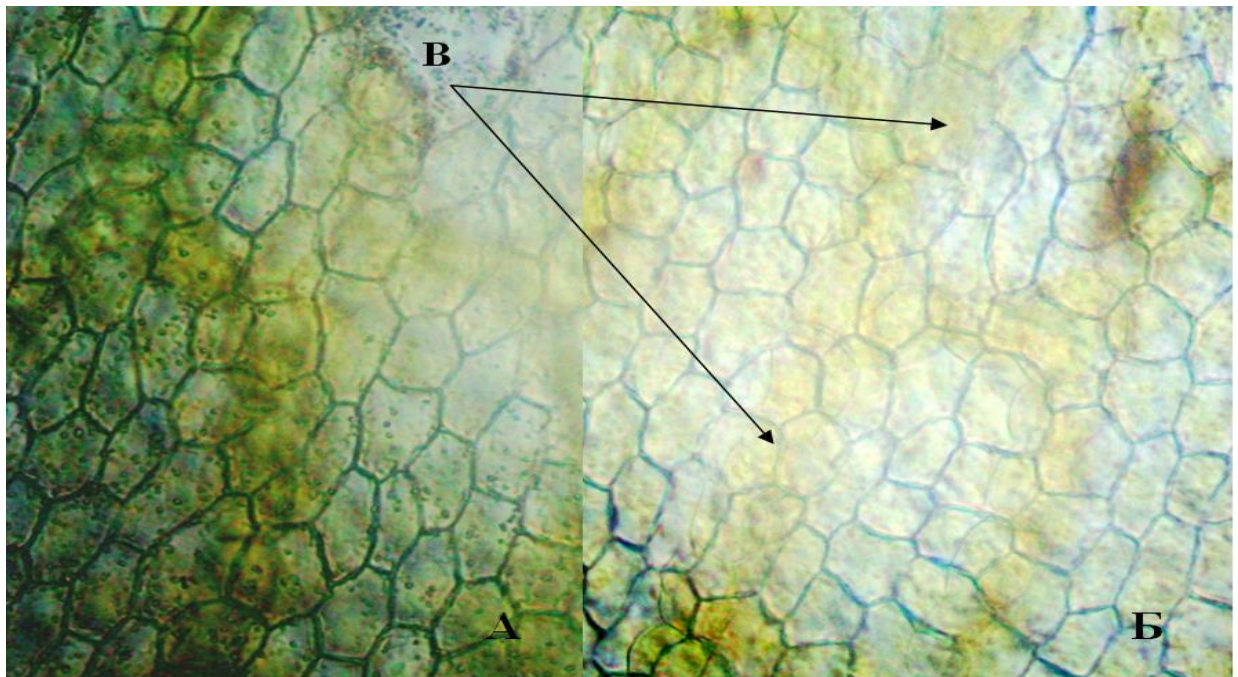


Рисунок 40 – Плоскостной препарат листеца *Lemna trisulca*:
 А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис, В - аэренхима

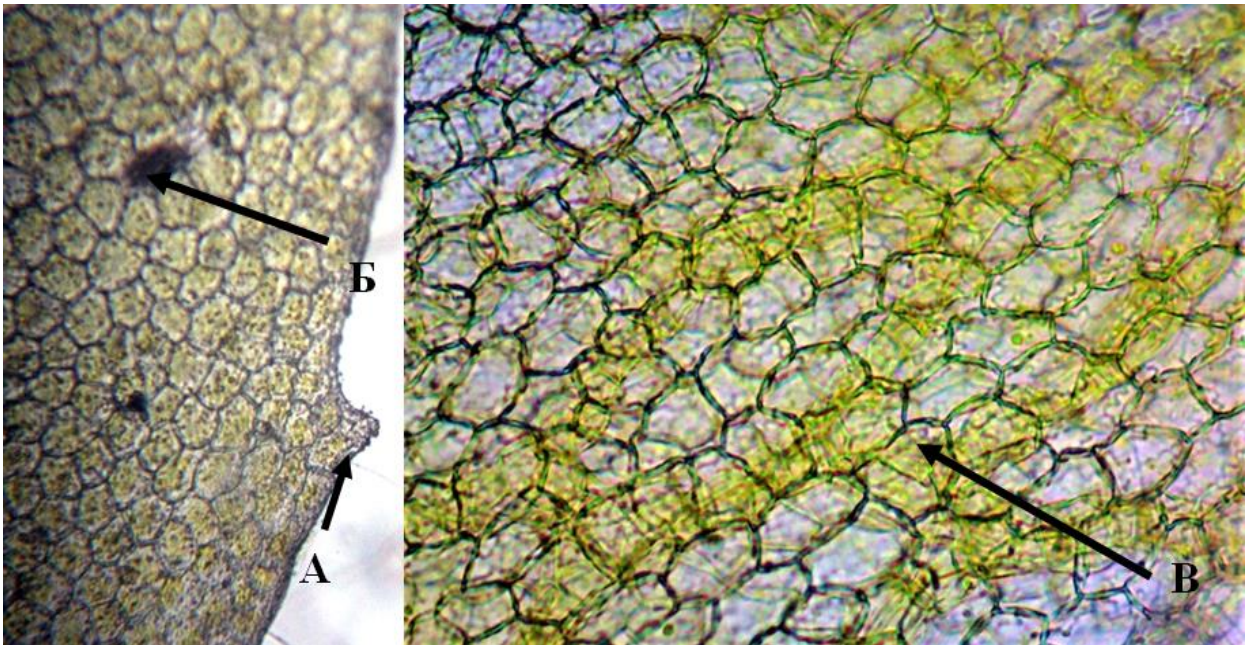


Рисунок 41 – Плоскостной препарат листеца *Lemna trisulca*:

А – выемчатый край листеца, Б – рафиды, В - аэренхима.

Клетки корня более прямостенные, в клетках корнях встречаются редкие рафиды (рисунок 42).

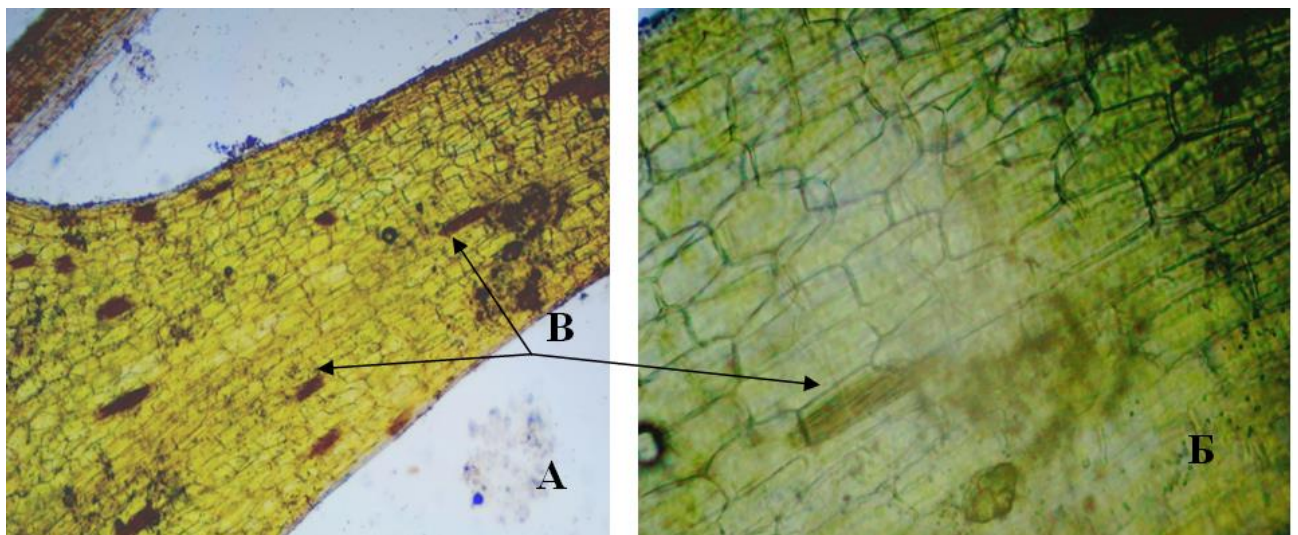


Рисунок 42 – Плоскостной препарат листеца *Lemna trisulca*: А – основание листеца и корень, Б - прямостенные клетки эпидермиса корня, В – рафиды

Рассмотрение микропрепаратов *S. polyrrhiza* показало наличие устьиц на верхней стороне листа (эпистоматический тип). Устьица многочисленные аномоцитного типа, направленные вдоль листеца, побочных клеток обычно 5-

б, редко 4, 7-8 (рисунок 43). Клетки верхнего эпидермиса разно направленные, комбинированной формы со слабоизвилистыми, редко почти прямостенными стенками. Клетки нижнего эпидермиса квадратно-многоугольные, почти прямостенные или слабоизвилистые, пигментированные. Аэренхима хорошо развита, она также как у *L. minor* доходит почти до края листеца и занимает не менее 2/3 его объема, диаметр межклетника в 8-9 раз больше диаметра клеток аэренхимы, и в 2-3 раза больше диаметра клеток верхнего эпидермиса. На плоскостном препарате хорошо просматриваются многочисленные клетки-идиобласты с рафидами и друзами, расположенными по всей поверхности листеца (рисунок 44, 45). Специфическим отличием этого вида от ряски малой и ряски тройчатой является наличие в субэпидермальном слое листецов пигментных клеток с оранжевым, красновато-оранжевым, оранжево-коричневым содержимым (рисунок 44). Клетки корня прямостенные или слегка волнистые, вытянутые по длине, ксилема в корнях редуцирована до одного кольчатого сосуда.

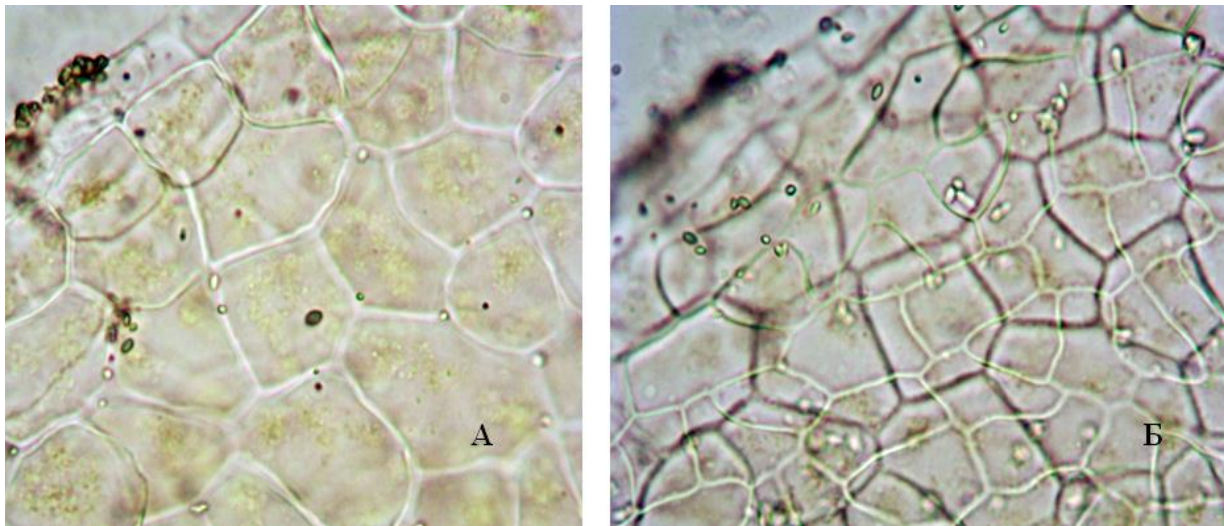


Рисунок 43 – Плоскостной препарат листеца *S. polyrrhiza*: А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис.

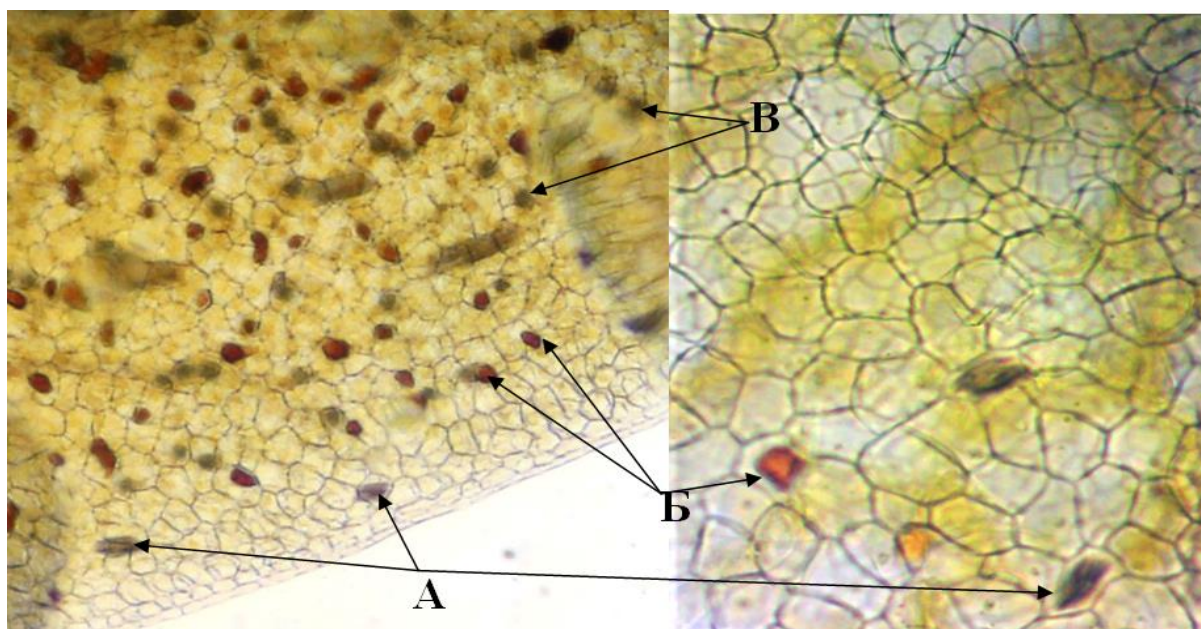


Рисунок 44 – Плоскостной препарат листеца *Spirodela polyrrhiza*: А - рафиды, Б- клетки-идиобласты с пигментированным содержимым, В – друзы.

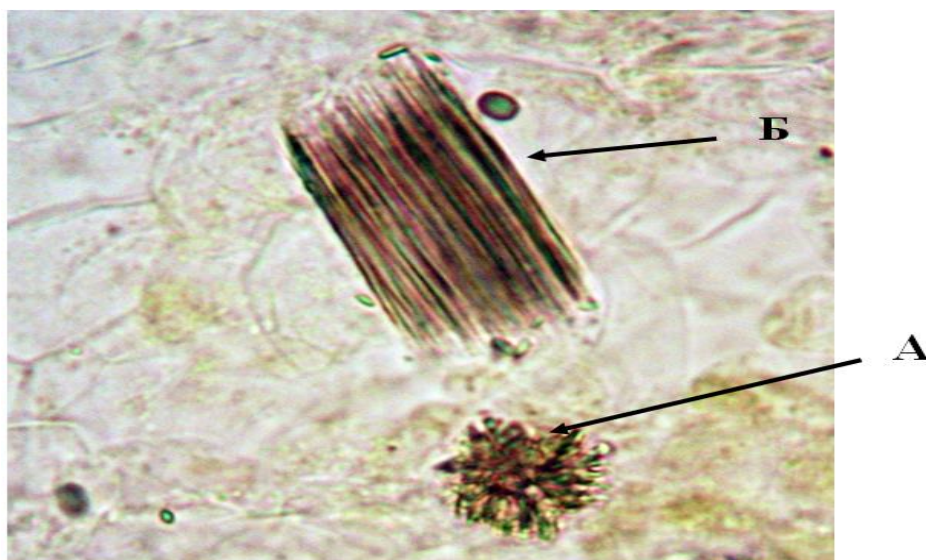


Рисунок 45 – Плоскостной препарат листеца *Spirodela polyrrhiza*:

А - рафиды, Б - друзы

Таким образом, на основании изучения внешних (макроскопических) и микроскопических (анатомических) особенностей были определены общие и отличительные диагностические признаки, позволяющие достоверно идентифицировать исследуемые виды. Полученные нами данные использованы в соответствующих разделах проекта фармакопейной статьи, представленной в Приложении 2.

5.2. Стандартизация сырья по показателю

«Количественное определение»

Полисахариды

Для определения содержания полисахаридов в сырье ряски была использована стандартная методика [10, 11].

Методика количественного определения полисахаридов в сырье ряски.

Навеску 10,0 г (точная навеска) сырья ряски помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагревают на кипящей водяной бане и экстрагируют в течение 1 часа. После извлечения фильтруют через тканевой фильтр и экстракцию повторяют ещё 1 раз. Извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) под вакуумом. Фильтрат упаривают на роторном испарителе до 1/5 исходного объема, после чего прибавляют трехкратный объем 96 % этилового спирта и выдерживают в течение 12 часов в холодильнике для полного осаждения полисахаридного комплекса. Затем осадок отфильтровывают через предварительно доведенный до постоянной массы бумажный фильтр, осадок на фильтре промывают горячим 96 % этиловым спиртом, затем ацетоном. Фильтр с осадком высушивают до постоянной массы и взвешивают.

Поскольку гравиметрический метод количественного определения полисахаридов в растительном сырье является прямым методом измерения количества вещества, и ГФ РФ не требует подтверждения соответствия получаемых результатов с помощью подобных методик, поэтому валидацию не проводили.

Фенолкарбоновые кислоты

Установлено, что преобладающей группой фенольных соединений в сырье ряски являются фенолкарбоновые кислоты, для количественного определения которых предложили использовать распространенную методику прямой спектрофотометрии [51], успешно применяемую для стандартизации ряда растительных объектов, но с модификацией подготовки пробы.

Результаты исследования содержания фенолокислот в извлечениях, полученных с помощью 70 %-ого этилового спирта и этилацетата, показывают, что использование этилового спирта приводит к более исчерпывающему извлечению фенолкарбоновых кислот из растительного сырья более чем в 2 раза. В 70%-ном этанольном извлечении методом ВЭЖХ установили [2] наличие следующих фенолкарбоновых кислот: хлорогеновой, 3,5-дигидроксibenзойной, кофеиновой, ванильной, 2,3-дигидроксibenзойной, *m*-кумаровой, *o*-кумаровой, бензойной и коричной кислот. На основании чего, предложили в качестве экстрагента методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье использовать 70 %-ый этиловый спирт.

Для определения рабочего времени экстракции провели серию извлечений сырья ряски в диапазоне 20-50 минут при температуре кипения экстрагента. В результате, установили, что при 30 и более минутах экстракции не наблюдается достоверного увеличения оптической плотности извлечения (рисунок 46). Поэтому в методике количественного определения фенолкарбоновых кислот время экстракции – 30 минут.

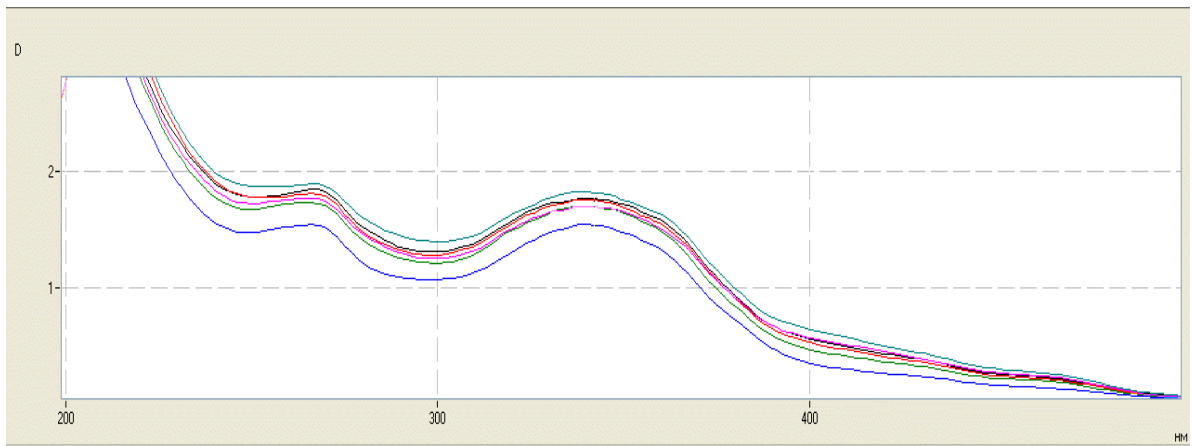


Рисунок 46 – УФ-спектры этанольных извлечений (20, 30, 40, 50 минут экстракции).

Однако, большой вклад в поглощение вносят липофильные вещества, не относящиеся к фенолкарбоновым кислотам, поэтому в методику подготовки

проб внесена стадия жидкость-жидкостной экстракции гексаном в соотношении 1:5 (рисунок 47).

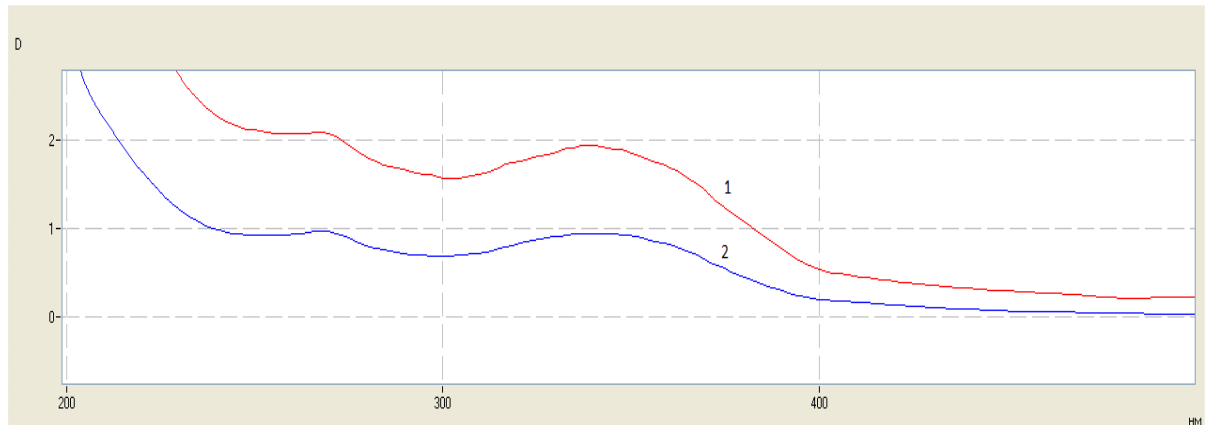


Рисунок 47 – УФ-спектр исходного этанольного извлечения из ряски малой (1) и обработанного гексаном в соотношении 1:5 (2).

С учетом полученного УФ-спектра извлечения из сырья ряски, в качестве стандарта предложено использовать хлорогеновую кислоту ($\lambda_{\text{MAX}} = 327 \text{ нм}$).

Таким образом, разработали рабочие условия методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье ряски.

Методика количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье ряски.

Навеску 10,0 г (точная навеска) сырья ряски помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 мл, приливают 200 мл 70 % этилового спирта и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут с обратным холодильником. После извлечения фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) в мерную колбу вместимостью 250 мл, промывая трижды шрот на фильтре 70 % этиловым спиртом порциями по 5 мл. После чего доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора до метки 70 % спиртом этиловым. 4 мл полученного раствора помещают в делительную воронку и добавляют 20 мл гексана, интенсивно взбалтывают несколько раз. После расслоения отбирают 2 мл нижнего слоя в пробирку и

удаляют растворитель в токе азота. Сухой остаток растворяют в 2 мл 70 % этилового спирта.

Стандартный раствор хлорогеновой кислоты готовили из навески 0,1000 г (т.н.) рабочего стандартного образца хлорогеновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 50 мл 70 % этилового спирта и перемешивают до полного растворения. После чего доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 0,8 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем.

Фотометрируют стандартный раствор хлорогеновой кислоты и испытуемый раствор, используя 70 %-ый этиловый спирт в качестве раствора сравнения, после чего содержание фенолкарбоновых кислот рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{A_{\text{исп}} \times m_0 \times 200}{A_{\text{стд}} \times m_{\text{навеска}}},$$

где $A_{\text{исп}}$ – оптическая плотность испытуемого раствора; $A_{\text{стд}}$ – оптическая плотность стандартного раствора; m_0 – масса хлорогеновой кислоты, взятая для приготовления стандартного раствора, г; $m_{\text{навеска}}$ – масса навески сырья, г.

В разработанных условиях определены основные валидационные характеристики методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье ряски. Уровни содержания целевой группы веществ при валидации варьировали изменением массы навески экстрагируемого сырья. Линейность методики показана в диапазоне концентраций хлорогеновой кислоты от 0,1 до 10 мкг/мл с коэффициентом корреляции (R) 0,9999 (рисунок 48).

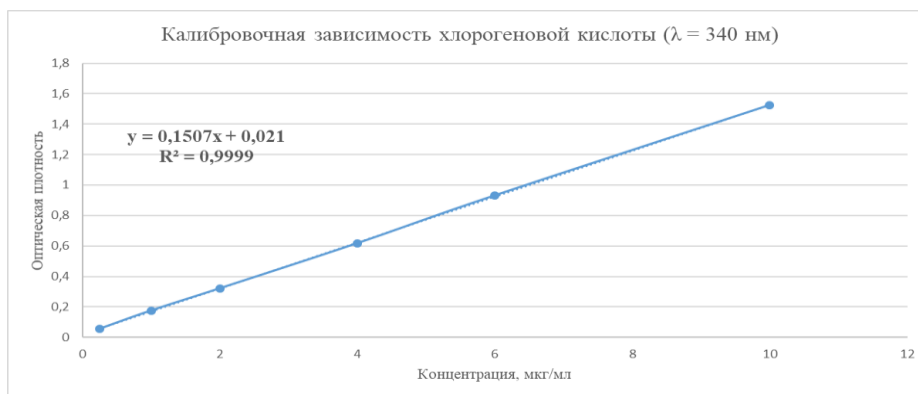


Рисунок 48 – Калибровочная зависимость хлорогеновой кислоты в диапазоне от 0,1 до 10 мкг/мл ($\lambda=340$ нм).

Для исследуемого диапазона определили показатели сходимости результатов – повторяемость и внутрिलाбораторная прецизионность (таблицы 18-19) и правильности (таблица 20).

Таблица 18 – Оценка повторяемости методики определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в сырье ряски

Уровень	m_n , г	Abs, mAU	$c_{ФКК}$, мкг/мл	$m_{ФКК}$, г	W_i , %	W_{cp} , %	RSD_r , %
80	8,027	0,6170	3,96	0,2472	3,08	3,16	2,7
	8,113	0,6363	4,08	0,2552	3,15		
	8,073	0,6190	3,97	0,248	3,07		
	8,047	0,6441	4,13	0,2584	3,21		
	8,018	0,6286	4,03	0,252	3,14		
	7,937	0,6518	4,19	0,2616	3,30		
100	10,038	0,7685	4,96	0,31	3,09	3,13	1,4
	10,037	0,7661	4,94	0,309	3,08		
	9,989	0,7878	5,09	0,318	3,18		
	9,916	0,7757	5,01	0,313	3,16		
	10,053	0,7878	5,09	0,318	3,16		
	9,947	0,7636	4,93	0,308	3,10		
120	11,946	0,9585	6,22	0,3888	3,25	3,21	1,1
	12,087	0,9469	6,14	0,384	3,18		
	12,028	0,9440	6,12	0,3828	3,18		
	11,972	0,9382	6,09	0,3804	3,18		
	12,017	0,9469	6,14	0,384	3,20		
	12,036	0,9643	6,26	0,3912	3,25		

Примечание: m_n , г – масса навески сырья ряски, взятая для определения; Abs – оптическая плотность испытуемого раствора; $c_{ФКК}$, мкг/мл – найденная концентрация фенолкарбоновых кислот; $m_{ФКК}$, г – найденная масса фенолкарбоновых кислот в навеске; W – массовая доля фенолкарбоновых кислот в образце; RSD_r , % - относительное стандартное отклонение в условиях повторяемости.

Таблица 19 – Оценка воспроизводимости методики определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту

Уровень	m _н , г	Abs, mAU	c _{ФКК} , мкг/мл	m _{ФКК} , г	W, %	RSD _r , %	S _{x,j}	F	S _{xR}	W _{ср.} , %	RSD _R , %
80	8,027	0,6178	3,96	0,2475	3,08	2,67	0,0345	1,40	0,072	3,17	2,26
	8,113	0,6359	4,08	0,2550	3,14						
	8,073	0,6193	3,97	0,2481	3,07						
	8,047	0,6434	4,13	0,2581	3,21						
	8,018	0,6283	4,03	0,2519	3,14						
	7,937	0,6524	4,19	0,2619	3,30						
	8,011	0,6253	4,01	0,2506	3,13	1,89					
	8,057	0,6359	4,08	0,2550	3,16						
	7,974	0,6524	4,19	0,2619	3,28						
	7,947	0,6313	4,05	0,2531	3,19						
	7,937	0,6404	4,11	0,2569	3,24						
	8,027	0,6283	4,03	0,2519	3,14						
100	10,038	0,7685	4,96	0,3100	3,09	1,47	0,0188	1,38	0,055	3,12	1,76
	10,037	0,7655	4,94	0,3088	3,08						
	9,989	0,7881	5,09	0,3181	3,18						
	9,916	0,7760	5,01	0,3131	3,16						
	10,053	0,7881	5,09	0,3181	3,16						
	9,947	0,7640	4,93	0,3081	3,10						
	10,173	0,7670	4,95	0,3094	3,04	2,06					
	10,038	0,7579	4,89	0,3056	3,04						
	10,0383	0,7715	4,98	0,3113	3,10						
	9,9390	0,7866	5,08	0,3175	3,19						
	10,079	0,7670	4,95	0,3094	3,07						
	9,958	0,7805	5,04	0,3150	3,16						
120	11,946	0,9584	6,22	0,3888	3,25	1,15	0,0151	1,34	0,033	3,20	1,03
	12,087	0,9463	6,14	0,3838	3,17						
	12,028	0,9433	6,12	0,3825	3,18						
	11,972	0,9388	6,09	0,3806	3,18						
	12,017	0,9463	6,14	0,3838	3,19						
	12,036	0,9644	6,26	0,3913	3,25						
	11,9880	0,9538	6,19	0,3869	3,23	0,87					
	12,0850	0,9373	6,08	0,3800	3,14						
	11,8958	0,9312	6,04	0,3775	3,17						
	11,9730	0,9433	6,12	0,3825	3,19						
	12,0480	0,9493	6,16	0,3850	3,20						
	11,9780	0,9388	6,09	0,3806	3,18						

Таблица 20 – Оценка правильности методики определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту (ХК)

Уровень содержания, %	Введено ХК, мг/мл	Найдено, мг/мл	δ
80	0,025	0,0651	99,83
100		0,0759	100,91
120		0,0885	98,47

С помощью предложенных методик проанализированы образцы сырья ряски, заготовленные в различных областях произрастания (таблица 21), для обоснования значения показателей предельного содержания действующего вещества в сырье.

Таблица 21 – Содержание БАВ в сырье ряски(n=3)

Место и год сбора	Содержание фенолкарбоновых кислот, %	Содержание полисахаридов, %
Томская область, Томский район, Коларовский тракт, озеро	5,19 ± 0,13	6,19 ± 0,18
Томская область, Кожевниковский район, озеро	4,31 ± 0,08	5,48 ± 0,16
Томская область, Томский район, п. Просторный, озеро	4,45 ± 0,08	6,92 ± 0,19
Томская область, Шегарский район, озеро	4,81 ± 0,09	7,22 ± 0,20
Томская область, Томский район, оз. Песчаное	4,42 ± 0,08	5,70 ± 0,14
Томская область, Томский район, окр.д. Березоречка, оз.Кирек	4,75 ± 0,10	7,05 ± 0,19
Томская область, окр.г. Стрежевой, озеро	3,79 ± 0,05	4,37 ± 0,11
Кемеровская область, река Иня	4,47 ± 0,07	4,71 ± 0,11
Кемеровская область, Степногутовский район, оз. Танай	4,92 ± 0,12	4,22 ± 0,10
Новосибирская область, г. Новосибирск, Первомайский район, ул.Радиостанция, озеро	5,01 ± 0,12	8,51 ± 0,23
Новосибирская область, г. Новосибирск, Первомайский район, ул. Ласточкина, озеро	4,36 ± 0,07	5,47 ± 0,12
Новосибирская область на границе с Томской областью, оз. Щучье	4,88 ± 0,09	5,02 ± 0,13
Новосибирская область, Тогучинский район, Степногутовское поселение, пруд	5,45 ± 0,07	5,34 ± 0,14

Таким образом, определили нормативы качества сырья ряски по содержанию фенолкарбоновых кислот – должно быть не менее 3,5 % и полисахаридов – должно быть не менее 4,0 %.

5.3. Разработка товароведческих показателей качества сырья

Для определения измельченности сырья использовали метод ситового анализа (таблица 22). Предлагаемая норма по измельченности для цельного сырья: частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм не более 37%, частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм не более 22%. Для измельченного сырья: частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 4 мм – не более 45 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 8%.

Таблица 22 – Результаты ситового анализа измельченности сырья, n= 3.

Место и год сбора	Количество частиц, не проходящих, сквозь отверстия диаметром: 7 мм (1), 6 мм (2), 5 мм (3), 4 мм (4), 3 мм (5), 1 мм (6), 0,5 мм (7), 0,25 мм (8), проходящих сквозь отверстия диаметром 0,25 мм (9), %								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Томская область, Томский район, Коларовский тракт, озеро	-	43,02 ± 0,42	1,42 ± 0,19	32,23 ± 0,17	4,96 ± 0,21	9,12 ± 0,16	1,28 ± 0,12	1,72 ± 0,18	1,26 ± 0,15
Томская область, Кожевниковский район, озеро	1,85 ± 0,11	31,02 ± 0,19	15,95 ± 0,15	26,05 ± 0,17	4,89 ± 0,28	9,62 ± 0,21	1,07 ± 0,09	2,17 ± 0,27	1,15 ± 0,23
Томская область, Томский район, п. Просторный, озеро	0,44 ± 0,08	-	5,18 ± 0,11	26,52 ± 0,29	6,53 ± 0,17	33,15 ± 0,27	3,92 ± 0,15	12,03 ± 0,23	5,14 ± 0,15
Томская область, Шегарский район, озеро	0,57 ± 0,06	38,63 ± 0,42	2,76 ± 0,09	18,17 ± 0,38	9,02 ± 0,21	12,21 ± 0,22	4,78 ± 0,19	6,43 ± 0,21	4,92 ± 0,19
Томская область, Томский район	1,89 ± 0,15	35,24 ± 0,17	6,11 ± 0,11	22,59 ± 0,29	6,75 ± 0,19	15,25 ± 0,28	2,11 ± 0,14	4,85 ± 0,17	1,94 ± 0,12

район, оз. Песчаное									
Томская область, Томский район, окр.д. Березоречка, оз.Кирек	1,83 ± 0,12	34,65 ± 0,42	14,34 ± 0,21	19,23 ± 0,14	7,01 ± 0,15	12,15 ± 0,29	1,78 ± 0,11	4,27 ± 0,09	1,83 ± 0,16
Томская область, окр. г. Стрежевой, озеро	2,24 ± 0,21	31,85 ± 0,25	3,79 ± 0,19	12,78 ± 0,22	7,27 ± 0,24	17,34 ± 0,33	4,76 ± 0,15	3,65 ± 0,31	0,87 ± 0,07

Определение количества примесей – побуревших и почерневших листочков, других фрагментов сырья - корней, частей других неядовитых растений, песка проводили в 3 повторных испытаниях. Результаты исследования приведены в таблице 23.

Таблица 23 – Содержание примесей в сырье, n = 3.

Место и год сбора	Примеси: побуревших частей растения (1), органическая (2), минеральная (3), %		
	1	2	3
Томская область, Томский район, Коларовский тракт, озеро	2,89 ± 0,05	0,75 ± 0,04	0,40 ± 0,03
Томская область, Кожевниковский район, озеро	1,95 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,29 ± 0,05
Томская область, Томский район, п. Просторный, озеро	2,92 ± 0,07	0,47 ± 0,08	0,19 ± 0,03
Томская область, Шегарский район, озеро	0,95 ± 0,18	0,44 ± 0,05	0,00
Томская область, Томский район, оз. Песчаное	2,72 ± 0,09	1,72 ± 0,16	0,28 ± 0,07
Томская область, Томский район, окр.д. Березоречка, оз.Кирек	2,89 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,18 ± 0,05
Томская область, окр. г. Стрежевой, озеро	3,29 ± 0,18	1,27 ± 0,12	0,27 ± 0,09

Предел содержания органических и минеральных примесей, побуревших и почерневших частей, в сырье составил 0,4 - 0,18 %, 1,72 - 0,44 % и 3,29 - 0,95 % соответственно. Диапазон значений для показателей: потеря

в массе при высушивании составил 8,22 - 5,17%, общая зола и зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте – 6,12 - 4,856 % и 0,13 - 0,04 соответственно (таблица 24).

Таблица 24 – Результаты определения влажности и зольности сырья, n = 3.

Место и год сбора	Потеря в массе при высушивании, %	Зола общая, %	Зола, не растворимая в конц. HCl, %
Томская область, Томский район, Коларовский тракт, озеро	6,96 ± 0,24	5,62 ± 0,59	0,095 ± 0,004
Томская область, Кожевниковский район, озеро	7,22 ± 0,32	6,12 ± 0,55	0,050 ± 0,002
Томская область, Томский район, п. Просторный, озеро	5,94 ± 0,26	4,86 ± 0,72	0,082 ± 0,003
Томская область, Шегарский район, озеро	5,17 ± 0,29	5,35 ± 0,43	0,040 ± 0,002
Томская область, Томский район, оз. Песчаное	6,82 ± 0,21	5,42 ± 0,53	0,130 ± 0,006
Томская область, Томский район, окр.д. Березоречка, оз.Кирек	8,22 ± 0,29	5,31 ± 0,61	0,130 ± 0,005
Томская область, окр. г. Стрежевой, озеро	5,92 ± 0,28	4,96 ± 0,51	0,095 ± 0,007

В проект ФС предлагаем следующие значения: содержание органических примесей - не более 2%; минеральных примесей – не более 0,5%; побуревших и почерневших – не более 4%; потеря в массе при высушивании не более 9%; общая зола – не более 7%; зола нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте – не более 1%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. В результате сравнительного изучения внешних и микроскопических признаков *Lemna minor*, *L. trisulca*, *Spirodela polyrrhiza* установлены общие для всех видов признаки: наличие жилок, волосовидно-нитевидных корней, карманов, аэренхимы, рафид, друз.

2. Установлены отличительные признаки для каждого вида, заключающиеся в особенностях окраски, формы и размеров листецов, количества корней, карманов, жилок и их расположения, формы и степени извилистости клеток эпидермиса, степени развития аэренхимы, наличия (отсутствия) устьиц и пигментов.

3. Предложены методики количественного определения полисахаридов и фенолкарбоновых кислот в траве ряски малой.

4. Методика спектрофотометрического определения фенолкарбоновых кислот валидирована по показателям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность и правильность

5. Проведена апробация методик количественного определения основных групп БАВ в сырье на 7 образцах из Западно-Сибирского региона и установлен диапазон содержания полисахаридов 4,34-8,12 %, для фенолкарбоновых кислот – 3,87-5,47 % (в пересчете на хлорогеновую кислоту). Установлены показатели качества по содержанию фенолкарбоновых кислот: не менее 3,5%, по содержанию полисахаридов: не менее 4,0%.

6. В результате фармакогностического исследования 7 образцов сырья определены нормы качества для его стандартизации и разработки проекта ФС на сырье.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

Проведенное сравнительное фармакогностическое исследование произрастающих на территории Сибири отдельных представителей подсемейства рясковые – ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* Schleid (*Lemna polyrrhiza* L.)) и выделенных из них комплексов БАС позволило сформулировать следующие выводы:

1. Все исследуемые виды накапливают фенольные соединения: *кумарины* (мажорным компонентом *LM* являются хаплоперозид А и эскулин, *LM* – эскулин и эскулетин, *SP* – эскулин и фраксетин); *флавоноиды* (мирицетин) и *изофлавоноиды* (ононин); *фенолкарбоновые кислоты* (2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная, 2,6-дигидроксибензойная, 3,5-дигидроксикарбоновая); *гидроксикоричные кислоты* (хлорогеновая – 0,15-0,61%, кофейная – 0,03-0,26%). *SP* отличается от *LM* и *LT* накоплением *м-кумаровой кислоты* и отсутствием коричной, *о-кумаровой* и *ванильной кислот*.

2. Во всех видах установлено наличие 19 аминокислот, в том числе 8 незаменимых. Среди заменимых аминокислот преобладают аспарагиновая и глютаминовая кислоты, аргинин, аланин и глицин. Мажорными компонентами незаменимых аминокислот для всех видов являются лейцин, валин, лизин, фенилаланин, треонин и изолейцин.

3. Все объекты содержат преимущественно связанные сахара: содержание связанных сахаров *LT* в 2 раза превышает количество свободных, *LT* и *SP* – в 14 и 7,5 раза соответственно. Полисахариды, выделенные из исследуемых растений, характеризуются низким содержанием органических примесей (белка и нуклеиновых кислот) и высокой степенью полидисперсности. Изученные полисахариды отличаются по мономерному составу, как нейтральных, так и кислых сахаров: в ПС *LM* и *SP* преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в *LM* обнаружена ксилоза, а в *SP* – арабиноза; в ПС, полученных из *LT* мажорным мономером, является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

4. ПС и ПФ всех исследованных видов не оказывают токсического действия на иммуннокомпетентные клетки мышей, а ПС в большой концентрации, напротив, активируют пролиферацию спленоцитов. ПС, выделенные как из отдельных видов, так и из межвидовых смесей этих растений эндотоксин-независимо стимулируют продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных животных. ПС, выделенные из *LM*, *LT*, *SP* поляризуют антигенпрезентирующие клетки по классическому пути, усиливая Th-1 тип иммунного ответа. ПС, выделенные из межвидовых смесей растений рода рясок в различных соотношениях, сохраняют иммуностропную активность на уровне ПС из отдельных видов рясок. Результаты сравнительного исследования иммуностропной активности БАВ *LM*, *LT*, *SP*, обосновывают возможность заготовки смешанных зарослей данных растений.

5. Общими макро- и микроскопическими признаками *LM*, *LT*, *SP* являются: наличие жилок, волосовидно-нитевидных корней, карманов, аэренхимы, рафид, друз. Установлены отличительные признаки для каждого вида, заключающиеся в особенностях окраски, формы и размеров листочков, количества корней, карманов, жилок и их расположения, формы и степени извилистости клеток эпидермиса, степени развития аэренхимы, наличия (отсутствия) устьиц и пигментов.

6. Разработаны параметры качества и проект ФС на лекарственное растительное сырье «Ряски трава». Предложены методики количественного определения полисахаридов и фенолокислот в сырье. Методика спектрофотометрического определения фенолокислот валидирована по показателям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность и правильность. Установлен диапазон содержания в сырье для полисахаридов (4,34-8,12 %) и фенолокислот (3,87-5,47 %).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты диссертационного исследования имеют научно-прикладное значение для фармацевтической химии и фармакогнозии, в частности для дальнейшей разработки активных фармацевтических субстанций на основе полифенолов и водорастворимых полисахаридов представителей подсемейства рясковые, обладающих иммуностропной активностью.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абдиев, М. Ряски водоемов Узбекистана и опыт их массового культивирования.: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.00 / М. Абдиев. – Ташкент, 1970. – 194 с.
2. Адекенов, С.М. Фенольные соединения б́утанольных извлечений *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Lemna polyrrhiza* L. Schleid. и их иммуномодулирующая активность / С. М. Адекенов, М. Г. Данилец, С. А. Ивасенко, Л. А. Никифоров, С. В. Кривошеков, А. А. Лигачева, Е.С. Трофимова, Е. Ю. Шерстобоев, В. В. Жданов, М. В. Белоусов // Бюллетень сибирской медицины.– 2017. –№3.– С. 5–15.
3. Арефьева, О. А. Исследование чувствительности патогенных культур и грибов к спиртовым экстрактам ряски: «Энерго-и ресурсосберегающие экологически чистые химико-технологические процессызащиты окружающей среды» сборник докладов II Международной научно-технической конференции / О. А. Арефьева, А. А. Дубков. – Белгород, 2016. – С. 253–256.
4. Березовская, Т. П. Методы микроскопического анализа ботанических объектов / Т. П. Березовская, Н. В. Дощинская, Е. А. Серых. – Томск: Красное знамя, 1978. – 139 с.
5. Владимирова, И. Н. Биологически активные вещества *Lemna minor* S. F. Gray / И. Н. Владимирова, В. А. Георгиянц // Химико-фармацевтический журнал. – 2013.– Т.47. – №11. – С. 29–31.
6. Власова, Н. В. Флора Сибири. Т.4: *Araceae-Orchidaceae* / Н. В. Власова, В. М. Доронькин, Н. И. Золотухин, Н. К. Ковтонюк, Л. И. Малышев, Е. В. Иванова, Н. В. Фризен. – Новосибирск: Наука, 1987. –247 с.
7. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.
8. Головченко В. В. Строение лемнана - пектинового полисахарида из ряски малой *Lemna minor* L.: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.10 / В. В. Головченко. – Уфа, 2003. – 25 с.

9. Губанов, И. А. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И. А. Губанов, К. В. Киселёва, В. С. Новиков, В. Н. Тихомиров. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002. – Т. 1. – 666 с.
10. Государственная фармакопея СССР XI издание / Министерство здравоохранения СССР. М: Медицина, 1989. – Т.2. – 400 с.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2018. – Т.2. – 1814 с.
12. Гринкевич, Н. И. Химический анализ лекарственных растений / Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
13. Дмитрук, С. Е. Грибковые заболевания и альтернативные возможности фитотерапии / С. Е. Дмитрук, Н. Э. Коломиец, В. С. Дмитрук, О. А. Мальцева // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2001. – Т. 21. – № 3. – С. 9–14.
14. Емельяненко, И. Н. Характеристика общей анафилаксии / И. Н. Емельяненко, В. А. Душкин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1971. – № 10. – С. 69–71.
15. Ермаков, А. И. Методы биохимического исследования растений. / А.И. Ермаков, В. В. Арасимович, М. И. Смирнова-Иконникова, Н. П. Ярош, Г. А. Луковникова. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
16. Ефимов, С. Н. Исследование атимутагенных свойств растений семейств Equisetaceae и Lemnaceae микроядерным анализом / С. Н. Ефимов, Н. Э. Коломиец, О. А. Мальцева // Объединенный медицинский журнал. – 2004. – № 1. – С. 97–99.
17. Замощина, Т. А. Биологическая активность спиртовых извлечений из ряски малой (*Lemna minor* L.) в отношении процесса воспаления / Т. А. Замощина, Л. Н. Никифоров, Е. Ю. Просекина, Т. А. Томова // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – №2. – С.73–80.
18. Келус, Н. В. Адсорбционная активность сырья водно-болотных растений Западной Сибири / Н. В. Келус, Л. Г. Бабешина, С. Е. Дмитрук, Л. Н. Никифоров // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – №4. – С.37–41.

19. Кононенко, А. Г. Вивчення впливу водного екстракту листеця ряски малої на елементний статус при експериментальному гіпотиреозі у щурівм гипотиреозе / А. Г. Кононенко, В. М. Кравченко, В. Н. Кравченко // Український біофармацевтичний журнал. –2016. – № 5.–С. 12–15.
20. Корж, А. П. Определение содержания урсоловых кислот в полисахаридах мать-и-мачехи, клевера, девясила / А. П. Корж, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов, М.С. Юсубов // Химия растительного сырья. – 2011. – №4. – С. 259–264.
21. Корулькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина, Г. А. Толстиков. – Новосибирск: Гео, 2007. – 232 с.
22. Кочетков, Н. К. Химия углеводов / Н. К. Кочетков, А. Ф. Бочков, Б. А. Дмитриев, А. И. Усов, О. С. Чижов, В. Н. Шибяев. – М.: Химия, 1967. – 674 с.
23. Краснов, Е. А. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е. А. Краснов, Т. П. Березовская, Н. В. Алексеюк, Н. И. Белоусова, Л. А. Демиденко, В. В. Дудко, С. Е. Дмитрук, Г. И. Калинин, Г. А. Романова. – Томск: Изд-во Томского университета, 1987. – 184 с.
24. Кривенчук, П. Е. Флавоноиды астрагалов, ряски и качимов: труды первого Всесоюзного съезда фармацевтов / П. Е.Кривенчук, В. И. Литвиненко, А. Ф. Прокопчук, Л. И. Дерюгина, А. И. Тихонов. – Москва, 1970. – С. 238–245.
25. Крылов П. Н. Флора Западной Сибири: руководство к определению западно сибирских растений. Вып. 3 Сурегасеае-Orchidасеае / П. Н. Крылов, Б. К. Шишкина, Л. П. Сергиевская, Л. Ф. Ревердатто, Е. И. Штейнберг. – Томск: Изд-во Томского отд. Рус. бот. общ-ва, 1929. – 567с.
26. Крылов, Г. В. Растения здоровья / Г. В. Крылов, Н. Ф. Козакова, А. А. Лагеръ. – Новосибирск: Книжное издательство, 1989.– 303 с.
27. Лазурьевский, Г. В. Практические работы по химии природных соединений / Г. В. Лазурьевский, И. В. Терентьева, А. А. Шамшурич. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.
28. Максютин, Н. П. Растительные лекарственные средства / Н. П. Максютин, Н. Ф. Комиссаренко, А. П. Прокопенко. – К.: Здоров`я, 1985. – 280 с.

29. Махлаюк, В. П. Лекарственные растения в народной медицине / В. П. Махлаюк. – Саратов: Приволжское книжное издательство, 1991. – 544 с.
30. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
31. Моисеева, Г. Ф. Иммуностимулирующие полисахариды высших растений / Г. Ф. Моисеева, В. Г. Беликов // Фармация. – 1992. – №3. – С. 79–84.
32. Муравьев, И. А. Технология лекарств: Т. 2 / И. А. Муравьев. – М.: Медицина, 1980. – 704 с.
33. Никифоров, Л. А. Изучение биоэлементного состава *Lemna minor* и *Lemna trisulca* / Л. А. Никифоров, С. Е. Дмитрук // Микроэлементы в медицине. – 2008. – Т.9. – №1-2. – С.23а–24.
34. Никифоров, Л. А. Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor* L.) / Л. А. Никифоров, М. В. Белоусов, Н. С. Фурса // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т.10. – №5. – С. 74–77.
35. Никифоров, Л. А. Сравнительное исследование веществ первичного обмена ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.) / Л. А. Никифоров, Н. С. Фурса, С. В. Кривошеков, В. А. Куркин, М. В. Белоусов // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16. – №1. – С. 59–64.
36. Нестеровская, А. Ю. Растения-целители вашей звезды / А. Ю. Нестеровская, Т. Д. Рендюк, Л. Я. Спешилов. – М.: Армада, 1998. – 508 с.
37. Пат. Российская Федерация, № 2190666, 07.11.2000. Способ получения Д-апиозы из полисахарида ряски малой / Ю. С. Оводов – № 2190666, 2002.
38. Пасечник, И. Х. Материалы по фармакодинамике и эффективности некоторых лекарственных средств при остром гепатите: автореф. дисс. ... докт. мед. наук:14.00.25 / И. Х. Пасечник. – Харьков, 1969. – 32с.
39. Петрова, Н. В. Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 6. Семейства *Vitomaseae*-*Turphaceae* / Н. В. Петрова, Н. С. Бобылева, Т. Ю.

- Данчул, Н. В. Битюкова, Л. И. Шагова, Д. Г. Мельников, М. Н. Пovyдыш. – Санкт-Петербург: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 390 с.
40. ПНД Ф 16.1:2.3:3.11-98. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений содержания металлов в твердых объектах методом спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. М., 1998. 31 с.
41. ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011 Количественный химический анализ почв. Методика измерения массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения спектральными методами. М., 2011. 38 с.
42. Попов, С. В. Иммуномодулирующее действие пектиновых полисахаридов: автореф. дис. ... докт. фарм. наук: 03.01.04 / С. В. Попов. – Сыктывкар, 2010. – 39 с.
43. Решетникова, А.В. Лечение растениями / А. В. Решетникова, Е. И. Семчинская. – Киев: Феникс, 1993. – 352с.
44. Самбукова, Т. В. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии / Т. В. Самбукова, Б. В. Овчинников, В. П. Ганапольский, А. Н. Ятманов, П. Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 56–63.
45. Симонян, А. В. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: методические рекомендации / А. В. Симонян, А. А. Саламатов, Ю. С. Покровская, А. А. Аванесян. – Волгоград, 2007. – 106 с.
46. Синяков, А. Ф. Рецепты народной медицины / А. Ф. Синяков. – М.: Физкультура и спорт, 1994. – 448 с.
47. Софронова, В. Е. Роль каротиноидов в регуляции устойчивости *Spirodella polyrhiza* (L.) Schleid к холодovому шоку / В. Е. Софронова, В. А. Чепалов, К. А. Петров // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2006. – Т. 2. – №1. – С.16–20.

48. Спири́н, А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спири́н // Биохимия. –1958. –Т. 23. –№ 5. –С. 656–662.
49. Суховерхов, Ф. М. Ряска – дешевый и питательный корм / Ф. М. Суховерхов // Рыбоводство и рыболовство. – 1964. – № 2. – С.18–20.
50. Тихонов, А. И. Некоторые водно-болотные растения и перспективы их применения в медицине: матер. 2-го Всесоюз. съезда фармацевтов / А. И. Тихонов, В. И. Литвиненко, П. Е. Кривенчук, И. Х. Пасечник, В. У. Оконенко, Е.П. Таку. – Рига, 1974. – С.219–220.
51. Томашевская, О. Ю. Изучение качественного состава и определение содержания фенольных соединений в корневищах иглицы шиповатой (*Ruscus aculeatus* L.) / О. Ю. Томашевская, Т. Д. Даргаева, Т. А. Сокольская // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2009. –№2. – С. 42–44.
52. Тотолян, А. А. Клетки иммунной системы / А. А.Тотолян, И. С. Фрейдлин. – Санкт-Петербург: Наука, 2000. – 231 с.
53. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: часть 1 / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – Москва: Мир, 1980.– 295 с.
54. Ягодка, В. С. Лекарственные растения в дерматологии и косметологии / В. С. Ягодка. – Киев: Наукова думка,1992.– 272 с.
55. Aguilera-Morales, M. E. Nutrients and bioactive compounds of the *Lemna gibba* and *Ulva lactuca* as possible ingredients to functional foods/ M. E. Aguilera-Morales, M. M. Canales-Martínez, E. Ávila-González, C. M. Flores-Ortíz // Latin american journal of aquatic research. – 2018. – Vol. 46. – P. 709–716.
56. Al-Snafi, A. E. *Lemna minor*: Traditional uses, chemical constituents and pharmacological effects -A review / A. E. Al-Snafi //IOSR Journal of Pharmacy. – 2019. – Vol. 9. – №. 8. – P. 6–11.

57. Alzona, M. IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30+ T-cells / M. Alzona, H. M. Jack, R. I. Fisher, T. M. Ellis // *J. Immunol.* – 1995.– Vol. 154.– P. 9–16.
58. Anawar, H. M. Phytofiltration of water polluted with arsenic and heavy metals / H. M. Anawar, A. Garcia-Sanchez, M. Tari Kul Alam, M. Majibur Rahman// *International Journal of Environment and Pollution.* – 2008.– Vol. 33.–P. 292–312.
59. Bai, H. H. Hydroxycinnamoylmalated flavone C-glycosides from *Lemna japonica* / H. H. Bai, N. N. Wang, J. Mi, T. Yang, D. M. Fang, L. W. Wu, H. Zhao, G. Y. Li // *Fitoterapia.* – 2018. – Vol. 124. – P. 211–216.
60. Barros, G. O. F. Phenolics removal from transgenic *Lemna minor* extracts expressing mAb and impact on mAb production cost/ G. O. F. Barros, S. L. Woodard, Z. L. Nikolov // *Biotechnology progress.* – 2011. – Vol. 27. – № 2. – P. 410–418.
61. Borstlap, A. C. Changes in the free amino acids of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden during growth inhibition by L-valine, L-isoleucine, or L-leucine. A gas chromatographic study / A. C. Borstlap // *Acta Botanica Neerlandica.* –1972.–Vol. 21.– P. 404–416.
62. Bremer, B. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III / B. Bremer, K. Bremer, M. W. Chase, M. F. Fay, J. L. Reveal, L. H. Bailey, D. E. Soltis, P. S. Soltis, P. F. Stevens // *Botanical Journal of the Linnean Society.* – 2009. – Vol. 161. – № 2. – P. 105–121.
63. Bremer, B. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II / B. Bremer, K. Bremer, M. W. Chase, J. L. Reveal // *Botanical Journal of the Linnean Society.* – 2003. – Vol. 141. – № 4. – P. 399–436.
64. Buikema Jr., A. L. Phenolics in aquatic ecosystems: A selected review of recent literature / A. L. Buikema Jr., M. J. McGinniss, Jr. J. Cairns // *Marine Environmental Research.* – 1979.– Vol. 2.– № 2.–P. 87–181.

65. Cheng, A. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fish/ A. Cheng, F. Wan, J. Wang, Z. Jin, X. Xu // *Int. Immunopharmacol.*–2008.–Vol. 8.–№ 1.– P. 43–50.
66. Chiapello, L. S. Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*/ L. S. Chiapello, M. P. Aoki, H. R. Rubinstein, D. T. Masih // *Med. Mycol.*– 2003.– Vol. 41.– P. 347–352.
67. Cho, H. R. Effects of anticoagulant from *Spirodela polyrrhiza* in rats/ H. R. Cho, H. S. Choi // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* – 2003. – Vol. 67. – №. 4. – P. 881–883.
68. Chung, I.-M. Steroidal constituents of rice (*Oryza sativa*) hulls with algicidal and herbicidal activity against blue-green algae and duckweed / I.-M. Chung, M. Ali, A. Ahmad, S.C. Chun, J.-T. Kim, S. Sultana, J.-S. Kim, S.-K. Min, B.-R. Seo// *Phytochemical Analysis.* – 2007.– Vol. 18.–P. 133–145.
69. Das, B. K., Das D. P., Pradhan J., Priyadarshinee B., Sahu I., Roy P., Mishra B. K. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical screening of ethanolic extract of greater duckweed, *Spirodela polyrrhiza* /B. K. Das, D. P. Das, J. Pradhan, B. Priyadarshinee, I. Sahu, P. Roy, B. K. Mishra // *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* – 2012. – Vol. 3. – P. 822–833.
70. Day, J. A. Glycosidation of chlorphenols by *Lemna minor* / J. A. Day, F. M. Saunders // *Environmental Toxicology and Chemistry.* – 2004. – Vol. 23.–№ 3. –P. 613–620.
71. Doco, T., Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives/ T. Doco, M. A. O'Neill, P. Pellerin // *Carbohydrate Polymers.* – 2001. – Vol. 46.–P. 249–259.
72. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances/ M. Dubois, K. A.Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith // *Anal. Chem.*– 1956.–Vol. 28.–P. 350–356.

73. Duff, R.B. The Occurrence of Apiose in Lemna (Duckweed) and other Angiosperms / R.B. Duff // *Biochem. J.* – 1965.– Vol. 94.– P. 768–772.
74. Fikirdeşici-Ergen, Ş. Bioremediation of heavy metal contaminated medium using Lemna minor, Daphnia magna and their consortium / Ş. Fikirdeşici-Ergen, E. Üçüncü-Tunca, M. Kaya, E. Tunca // *Chemistry and Ecology.* – 2018.– Vol.34.–P. 43–55.
75. Gordon, S. Alternative activation of macrophages /S. Gordon // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003.– Vol. 3.– P. 23–35.
76. Green, L.C. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum // *Analytical Biochemistry.* –1982.– Vol.126.– P. 131–138.
77. Gulcin, I. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (Lemna minor L. Lemnaceae) / I. Gulcin, E. Kirecci, E. Akkemik, F. Topal, O. Hisar // *Turk. J. Biol.*–2010.– Vol.34.– P. 175–188.
78. Günter, E. A. Isolation of Polysaccharides from the Callus Culture of Lemna minor L. / E. A. Günter, O. V. Popeiko, Yu. S. Ovodov // *Applied Biochemistry and Microbiology.* –2004.–Vol. 40.–№ 1.– P. 80–83.
79. Günter, E. A. Action of b-galactosidase in medium on the Lemna minor (L.) callus polysaccharides / E. A. Günter, O. V. Popeyko, Yu. S. Ovodov // *Carbohydrate Research.* –2009.– Vol.344.–P.2602–2605.
80. Gutcher, I. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation / I. Gutcher, B. Becher // *J. of Clin. Invest.* – 2007.– Vol. 117.– № 5.– P. 1119–1127.
81. Hartog, C.D. A synopsis of the Lemnaceae / C. D. Hartog, F. V. D. Plas // *Blumea.* –1970.–Vol.18.–№2.–P. 355–368.
82. Hartt, D. A. A Novel Reaction Involved in the Degradation of Apiogalacturonans from Lemna minor and the Isolation of Apibiose As a Product / D. A. Hartt, P. K. Kindel // *Biochemistry.* –1970.– Vol.9.–№10. P.2190–2196.

83. John, R. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. / R. John, P. Ahmad, K. Gadgil, S. Sharma // *Plant, Soil and Environment*. –2008.– Vol. 54. –P. 262–270.
84. Khasina, E. I. Gastroprotective effect of lemnan, a pectic polysaccharide from *Lemna minor* L. / E. I. Khasina, M. N. Sgrebneva, R. G. Ovodova, V. V. Golovchenko, Y. S. Ovodov // *Dokl. Biol. Sci.*–2003.– Vol.390.– P.204–206.
85. Kim, J. Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells / J. Kim, I. Lee, J. Seo, M. Jung, Y. Kim, N. Yim, K. Bae // *Phytotherapy Research*. –2010.– Vol. 24.–P. 1543–1548.
86. Krajnčič, L. B. Possible role of jasmonic acid in the regulation of floral induction, evocation and floral differentiation in *Lemna minor* / L. B. Krajnčič, J. Kristl, I. Janžekovič // *Plant Physiology and Biochemistry*. –2006. – Vol. 44.– P. 752–758.
87. Kraus, J. Immunomodulating effects of polysaccharides from medicinal plants / J. Kraus, G. Franz // *Chem. Pharm. Bull.* – 1992. – Vol.40.– P.314–317.
88. Kreider, T. Alternatively activated macrophages in helminth infections / T. Kreider, R. M. Anthony, J. F. Jr. Urban, W. C. Gause // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007.– Vol. 19.– P. 448–453.
89. Kristl, J. Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* L. by liquid chromatography with fluorescence detection / J. Kristl, M. Veber, B. Krajnčič, K. Orešnik, M. Slekovec // *Anal. Bioanal. Chem.*– 2005. – Vol. 383.– P. 886–893.
90. Kurashov, E. A. Low-molecular weight metabolites in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Scheiden from Northwest Russia in the middle of the growing season / E. A. Kurashov, G. G. Mitrukova, J. V. Krylova, D. G. Aleshina, Y. V. Bataeva, O. V. Astafyeva // *Ponte*. – 2016.– Vol. 72.– P. 10–22.
91. Kuznetsova, T. *Lemna minor* cultivation in the climatic conditions of Saint Petersburg: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science / T. Kuznetsova, N. Politaeva, A. R. Ivanova, E. I. Lezhnev, V. A. Polyanskii, B. G. Matisov, L. R. Mukhametova, E. V. Karmazina. – Saint-Petersburg, 2019.– P. 012078.

92. Lalau, C. M. Toxicological effects of AgNPs on duckweed (*Landoltia punctate*) / C. M. Lalau, C. Simioni, D. S. Vicentini, R. C. Puerari, W. G. Matias, // *Science of the Total Environment*. – 2020.–Vol. 710.–P.136318.
93. Landolt, E. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae). Vol. 2. The family of Lemnaceae - A monographic study. Part 1 of the monograph: Morphology; karyology; ecology; geographic distribution; systematic position; nomenclature; descriptions /E. Landolt. – Zurich: Veröff. Geobot. Inst., Stiftung Rübel, ETH., 2012.– 411p.
94. Laria, A. The macrophages in rheumatic diseases / A. Laria, A. Lurati, M. Marrazza, D. Mazzocchi, K. A. Re, M. Scarpellini // *J. Inflamm. Res.*– 2016.–Vol. 9.– P. 1–11.
95. Les, D. H. Systematics of the Lemnaceae (duckweeds): inferences from micromolecular and morphological data / D. H. Les, E. Landolt, D. J. Crawford // *Plant Systematics and Evolution*. – 1997.–Vol.204.– P.161–177.
96. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin Phenolreagents/ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
97. Macatonia, S. E. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells / S. E. Macatonia, N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, A. O'Garra // *J. Immunol.*– 1995.– Vol. 154.– № 10.– P. 5071–5079.
98. Maciejewska-Potapczyk, W. Protein in *Lemna minor* / W. Maciejewska-Potapczyk, L. Konopska, K. Olechnowicz // *Biochem. Physiol. Pflazen.*–1975.–Vol. 167.– P.105–108.
99. Mantovani, A. Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas / A. Mantovani // *Blood*. – 2006.– Vol. 108.– № 2.– P. 408–409.
100. Mantovani, A. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization / A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati // *Trends Immunol.*– 2004.– Vol. 25.– P. 677–686.
101. Mariani, F. Experimental evidence of the consumption of the invasive alien duckweed *Lemna minuta* by herbivorous larvae of the moth *Cataclysta lemnata* in

- Italy / F. Mariani, A. Di Giulio, S. Fattorini, S. Ceschin // *Aquatic Botany*. – 2020.– Vol. 161.–P.103172.
102. McClure, J. A chemosystematic study of Lemnaceae / J. McClure, R. E. Alston // *American Journal of Botany*. – 1966.– Vol. 53.–P.849–860.
103. McClure, J. W. Photocontrol of *Spirodela intermedia* flavonoids / J. W. McClure // *Plant Physiol.*–1968.– Vol. 43.–P.193–200.
104. McClure, J. W. The applicability of polyphenolic data to systematic problems in the Lemnaceae / J. W. McClure // *Aquatic Botany*. –1975.– Vol.1. – P. 395–405.
105. Meyers, L. J. Composition, Biomass, and Protein Content of a *Lemna trisulca* L., Invertebrate Community in a Prairie Wetland / L. J. Meyers // *Theses and Dissertations.*– 1982.– Vol.183.– P.1–40.
106. Mills, C. D. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm / C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, A. M. Hill // *J. Immunol.*– 2000.– Vol. 164.– № 12.– P. 6166–6173.
107. Minogiannis, P. Toxicity of pure silver nanoparticles produced by spark ablation on the aquatic plant *Lemna minor* / P. Minogiannis, M. Valenti, V. Kati, O.-I. Kalantzi, G. Biskos // *Journal of Aerosol Science.*–2019.– Vol.128.–P. 17–21.
108. Monaco P. Oxygenated fatty acids from *Lemna trisulca* / P. Monaco, L. Previtera // *Phytochemistry*. – 1987.– Vol.26.–P.745–747.
109. Monari, C. Modulation of C5aR expression on human neutrophils by encapsulated and acapsular *Cryptococcus neoformans* / C. Monari, T. R. Kozel, F. Bistoni, A. Vecchiarelli // *Infect. Immunol.* – 2002.– Vol. 70.– P. 3363–3371.
110. Monari, C. Differences in outcome of the interaction between *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan and human monocytes and neutrophils / C. Monari, C. Retini, A. Casadevall, D. Netski, F. Bistoni, T. R. Kozel, A. Vecchiarelli // *Eur. J. Immunol.* – 2003.– Vol. 33.– P. 1041–1047.
111. Mosmann, T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. R. Mosmann // *J. Immunol. Methods*. – 1983.– Vol. 5.– P. 55–63.

112. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation / D. M. Mosser // *J. Leuk. Biol.*– 2003.– Vol. 73.– P. 209–212.
113. Munder, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype / M. Munder, K. Eichmann, M. Modolell // *J. Immunol.* –1998.– Vol. 160.– № 11.– P. 5347–5354.
114. Oron, G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production / G. Oron // *Agricultural Water Management.* – 1994.– Vol. 26. –P. 27–40.
115. Ovodova, R. G. Structural Studies and Physiological Activity of Lemnan, a Pectin from *Lemna minor* L. / R. G. Ovodova, V. V. Golovchenko, A. S. Shashkov, S. V. Popov, Yu. S. Ovodov // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* –2000. – Vol.26.–№10.–P. 669–676.
116. Picken J. M. The Biosynthesis of D-Apiose in *Lemna minor* / J. M. Picken, J. Mendino // *The Journal of biological chemistry.* – 1967.– Vol. 242.– № 7. –P. 1629–1634.
117. Pontes, M. S. In vitro and in vivo impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms / M. S. Pontes, D. E. Graciano, D. R. Antunes, A. R. L. Caires, E. F. Santiago // *Journal of Hazardous Materials.* – 2020.– Vol. 396. – P. 122484.
118. Popov, S. V. Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor* and its fragments on inflammatory reaction / S. V. Popov, R. G. Ovodova, Y. S. Ovodov // *Phytother Res.*– 2006.–Vol. 20.–P. 403–407.
119. Previtera, L. Fatty acid composition in *Lemna minor* – characterization of a novel hydroxyl C16 acid / L. Previtera, P. Monaco // *Phytochemistry.* –1983.– Vol.6.– P.1445–1446.
120. Previtera, L. Further oxygenated fatty acids from *Lemna minor* / L. Previtera, P. Monaco // *Journal of Natural Products.* – 1987.– Vol. 50.–№ 5.–P.807–810.
121. Qiao, X. Qualitative and quantitative analyses of flavonoids in *Spirodela polyrrhiza* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry / X.

- Qiao, W. N. He, C. Xiang, J. Han, L. J. Wu, D. A. Guo, M. Ye, // *Phytochemical analysis*. – 2011.– Vol. 22. – P. 475–483.
122. Ren, D. Computation-aided separation of seven components from *Spirodela polyrrhiza* (L.) via counter-current chromatography / D. Ren, B. Han, Z. Xin, W. Liu, S. Ma, Y. Liang, L. Yi // *Separation and Purification Technology*. –2016.–Vol. 165. – P. 160–165.
123. Roberts, R. M. Inositol metabolism in plants. IV. Biosynthesis of apiose in *Lemna* and *Petroselinum* / R. M. Roberts, R. H. Shah, F. Loewus // *Plants Physiol.*– 1967.– Vol. 42.–P. 659–666.
124. Rusoff, L.L. Duckweeds (Lemnaceae Family): A Potential Source of Protein and Amino Acids / L. L. Rusoff, Jr. E. W. Blakeney, Jr. D. Culley, D. J. Agric // *Food Chem.*– 1980.– Vol. 28. P. 848–850.
125. Saleh, H. A., El-Shahat, R. M. Accumulation of chromium in *lemna minor* under the effect of pH and EDTA variation and assessment of the treatment impact on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) / H. A. Saleh, R. M. El-Shahat // *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. – 2020.– Vol. 24.–P. 177–194.
126. Schepetkin I. A. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. / I. A. Schepetkin, M. T. Quinn // *Int. Immunopharmacol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 317–333.
127. Sha, S. Toxic effects of Pb on *Spirodela polyrhiza* (L.): Subcellular distribution, chemical forms, morphological and physiological disorders / S. Sha, M. Cheng, K. Hu, Y. Yang, Q. Xu // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2019.– Vol. 181.– P. 146–154.
128. Song W. Y. Total phenols, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Spirodela polyrhiza* extracts / W. Y. Song, J. H. Choi // *Journal of Life Science*. – 2017. – Vol. 27. – № 2. – P. 180–186.
129. Stangenberg, M. Bacteriostatic effects of some algae-and *Lemna minor* extracts / M. Stangenberg // *Hydrobiologia*. – 1968. – Vol. 32. – № 1. – P. 88–96.
130. Stinglele, F. Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells with no preferential V β usage and promote anergy, resulting in protection against experimental

- abscess formation / F. Stingle, B. Corthesy, N. Kusy, S. A. Porcelli, D. L Kasper, A. O. Tzianabos // *J. Immunol.*– 2004.– Vol. 172.– P. 1483–1490.
131. Subbotin, M. A. The effect of nanoparticles of biogenic ferrihydrite on the *Lemna minor* L. growth. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science /M. A. Subbotin, E. Y. Muchkina, I. I. Tskhay, T. A. Krayanova. – Krasnoyarsk, 2020.– Vol. 421.– P. 052006.
132. Sun, H. Activation of RAW 264. 7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms / H. Sun, J. Zhang, F. Chen, X. Chen, Z. Zhou, H. Wang // *Carbohydrate Polymers.* – 2015.– Vol. 121.–P. 388–402.
133. Sun, Y. Feasible Green Strategy for the Quantitative Bioaccumulation of Heavy Metals by *Lemna minor*: Application of the Self-Thinning Law / Y. Sun, P. Gao, N. Ding, T. Chen, H. Ruan // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* – 2020.–Vol.104.–P. 282–287.
134. Svedentsov, E. P. Cryoprotective action of lemnan, a pectin from the duckweed *Lemna minor* / E. P. Svedentsov, T. V. Tumanova, R. G. Ovodova, V. V. Golovchenko, O. O. Zaitseva, O. N. Solomina, S. Stepanova, Y. S. Ovodov // *Dokl. Biol. Sci.*–Vol. 421.–№ 1. – P. 233–234.
135. Topal, M. Removal of tetracycline antibiotic by *Lemna gibba* L. from aqueous solutions / M. Topal, E. Öbek, G. Uslu, E.I. A. Topal // *Water and Environment Journal.* – 2020.–Vol. 34. – P. 37–44.
136. Vecchiarelli, A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans* / A. Vecchiarelli // *Med. Mycol.*– 2000.– Vol. 38.– P. 407–411.
137. Vecchiarelli, A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation / A. Vecchiarelli, D. Pietrella, P. Lupo, B. Francesco, C. D. McFadden, A. Casadevall // *J. Leuk. Biol.*– 2003.– Vol. 74.– P. 370–374.
138. Veen, J. Preliminary studies of the flavonoid pattern of *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. / J. Veen // *Aquatic Botany.* –1975.– Vol. 1.– P. 417–421.

139. World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens, Kew. 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://wcsp.science.kew.org>. – Загл. с экрана.
140. Yahfoufi, N. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols / N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar // *Nutrients*. – 2018. – Vol.10. – P. 1–23.
141. Yamaguchi, S. Identification of a Component that Induces Flowering of Lemna among the Reaction Products of α -Ketol Linolenic Acid (FIF) and Norepinephrine / S. Yamaguchi, M. Yokoyama, T. Iida, M. Okai, O. Tanaka, A. Takimoto // *Plant Cell Physiol*. – 2001. – Vol. 42. – P. 1201–1209.
142. Zhao, X. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*) / X. Zhao, G. K. Moates, N. Wellner, S. R. A. Collins, M. J. Coleman, K. W. Waldron // *Carbohydrate polymers*. – 2014. – Vol. 111. – P. 410–418.
143. Zhou, J. Toxicity of the herbicide flurochloridone to the aquatic plants *Ceratophyllum demersum* and *Lemna minor* / J. Zhou, Z. Wu, D. Yu, L. Yang // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – Vol. 27. – №4. – P. 3923–3932.

Данные по определению моносахаридного состава ПС ряски

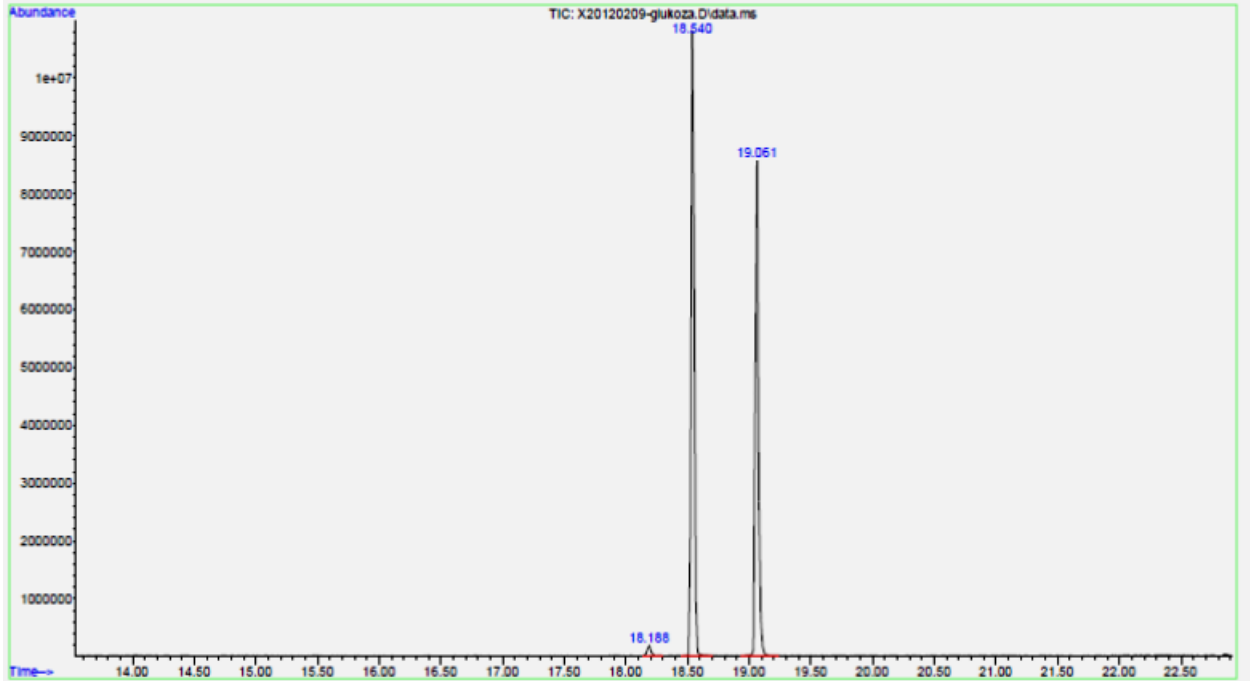


Рисунок 1. Хроматограмма глюкозы

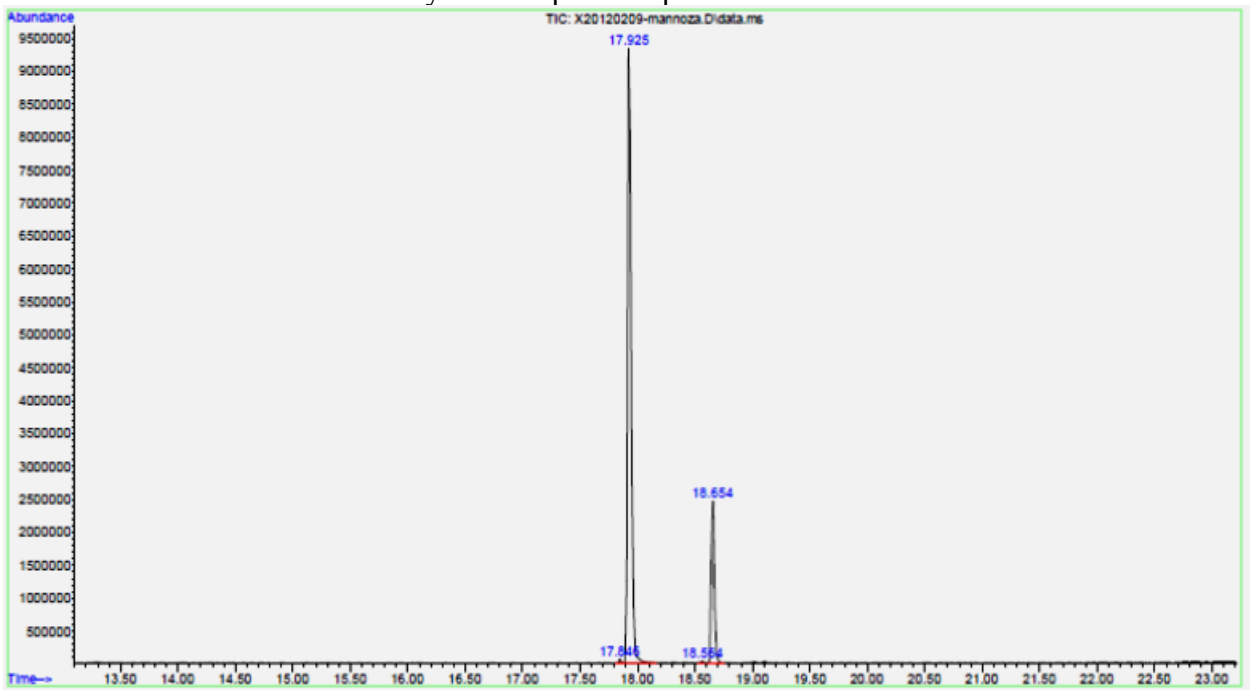


Рисунок 2. Хроматограмма маннозы

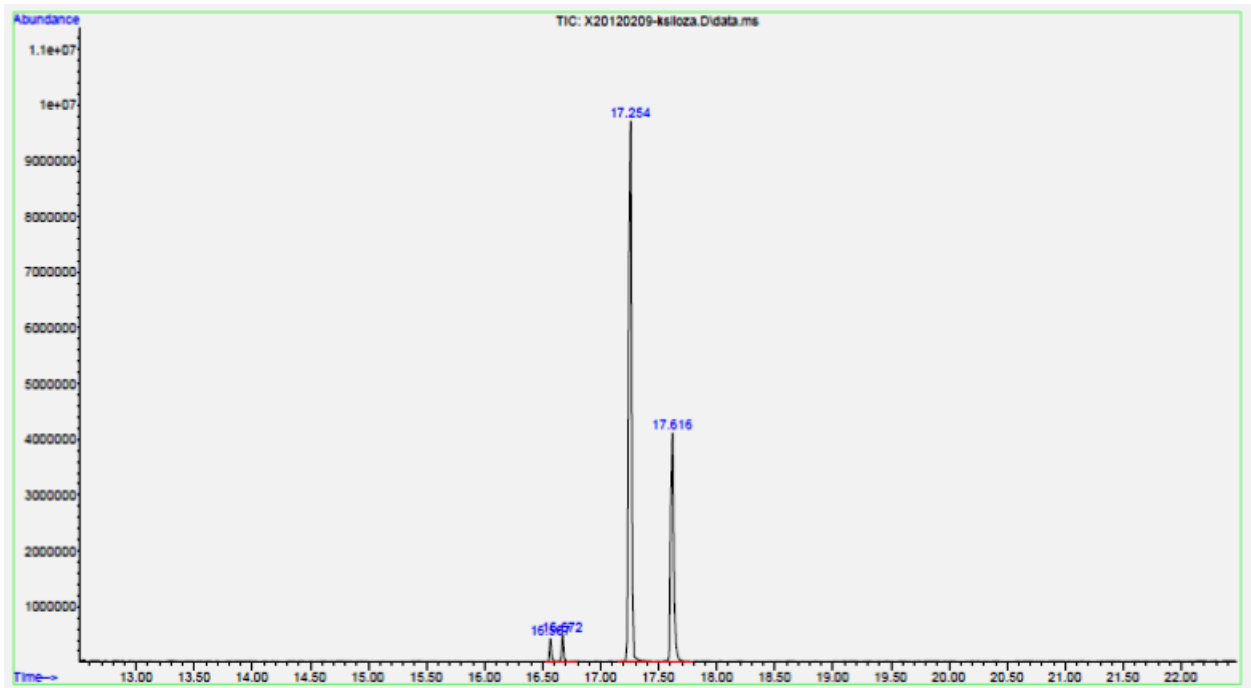


Рисунок 3. Хроматограмма ксилозы

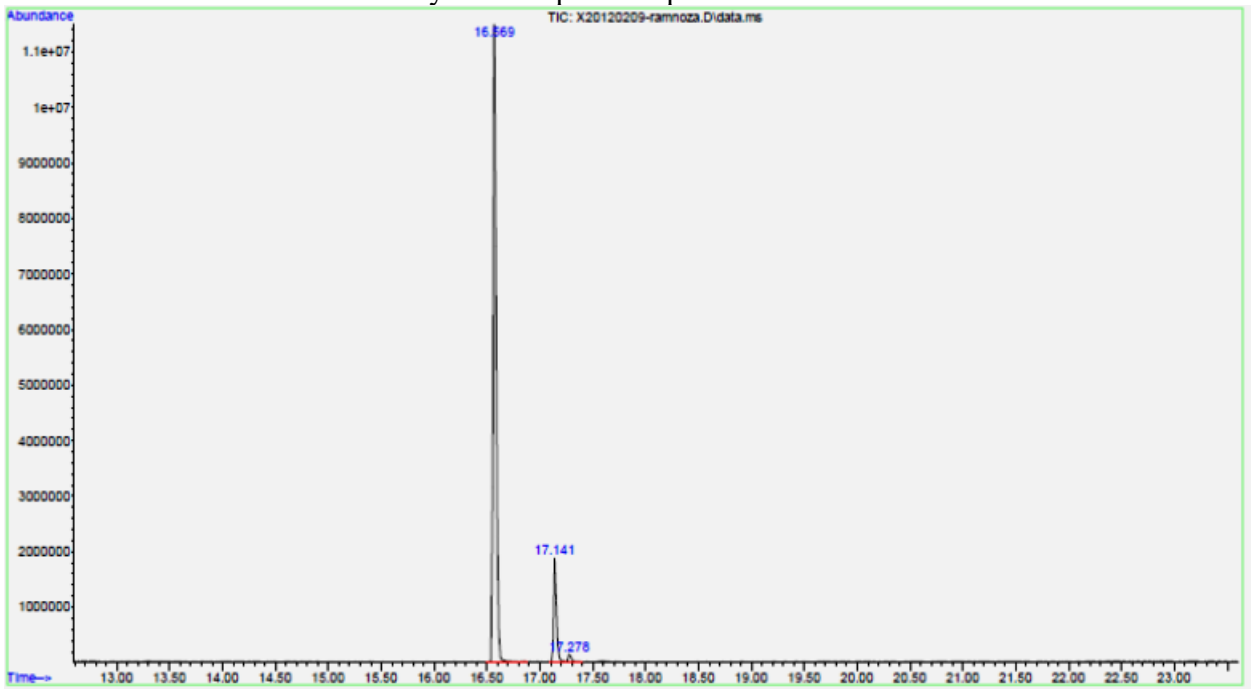


Рисунок 4. Хроматограмма рамнозы

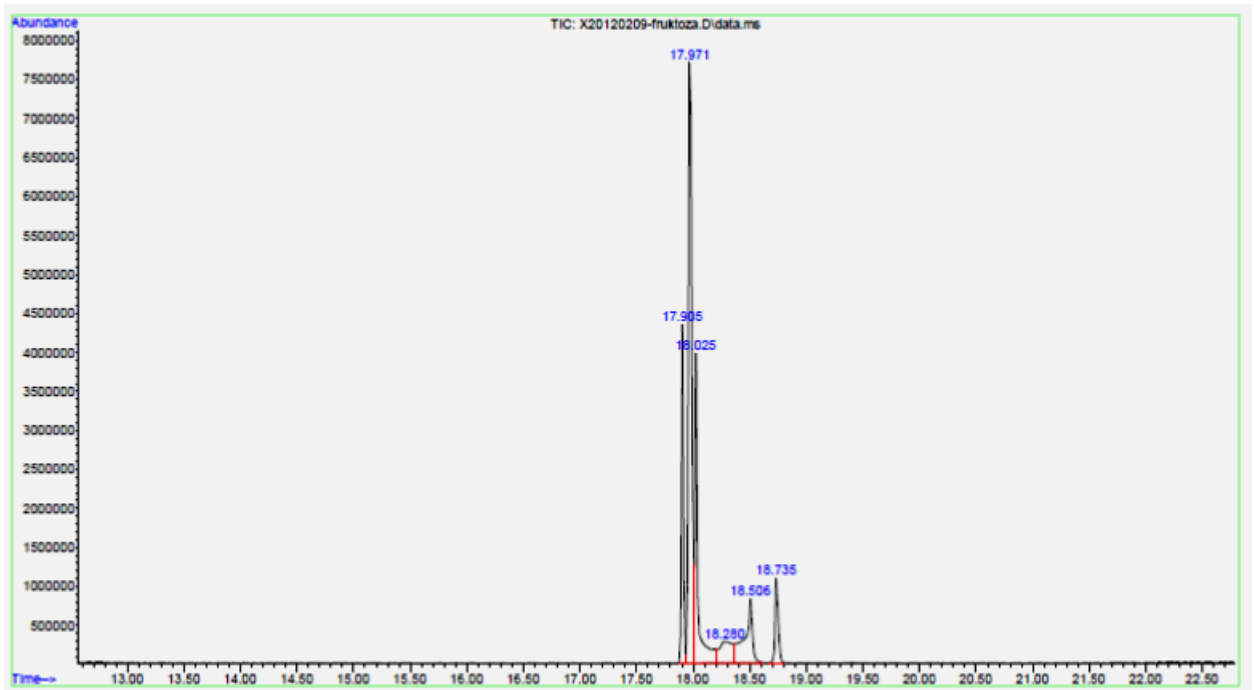


Рисунок 5. Хроматограмма фруктозы

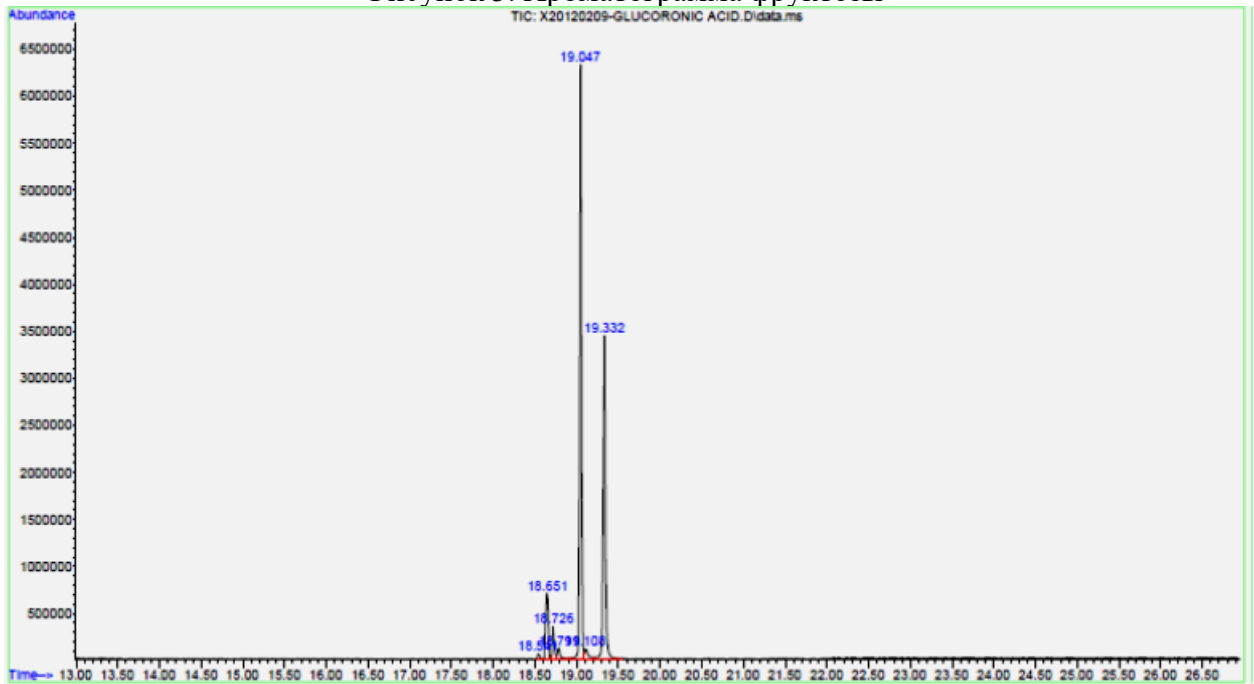


Рисунок 6. Хроматограмма глюкуроновой кислоты

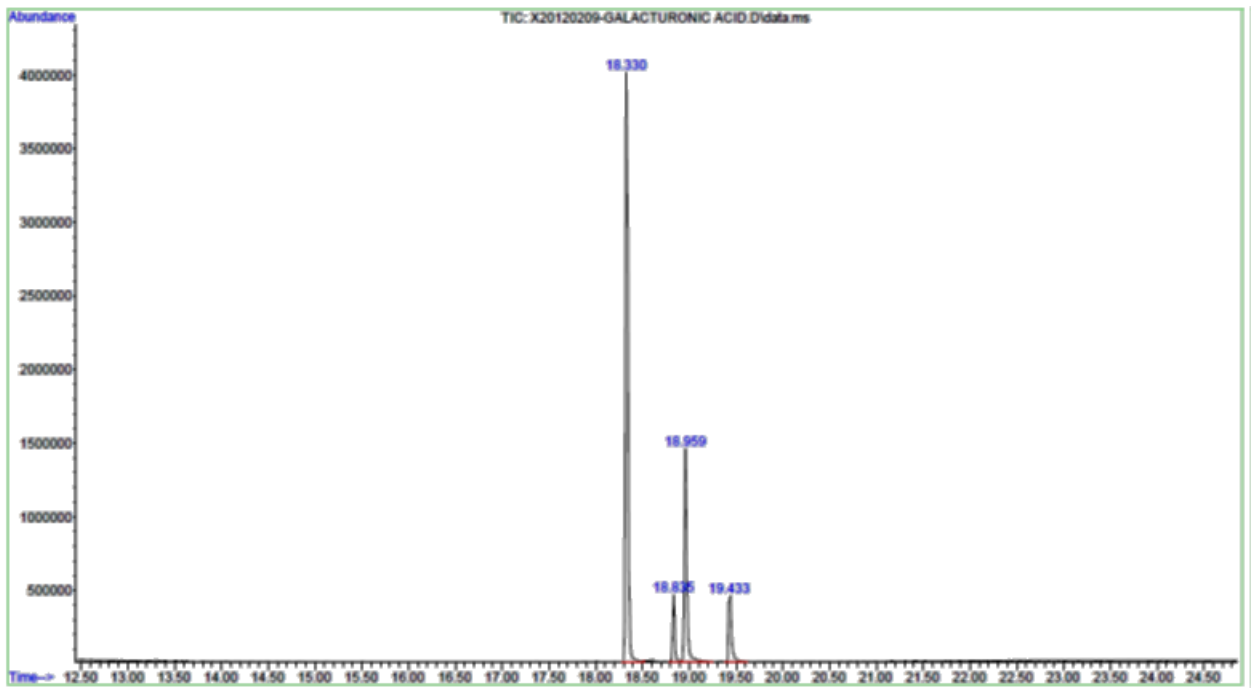


Рисунок 7. Хроматограмма галактурановой кислоты

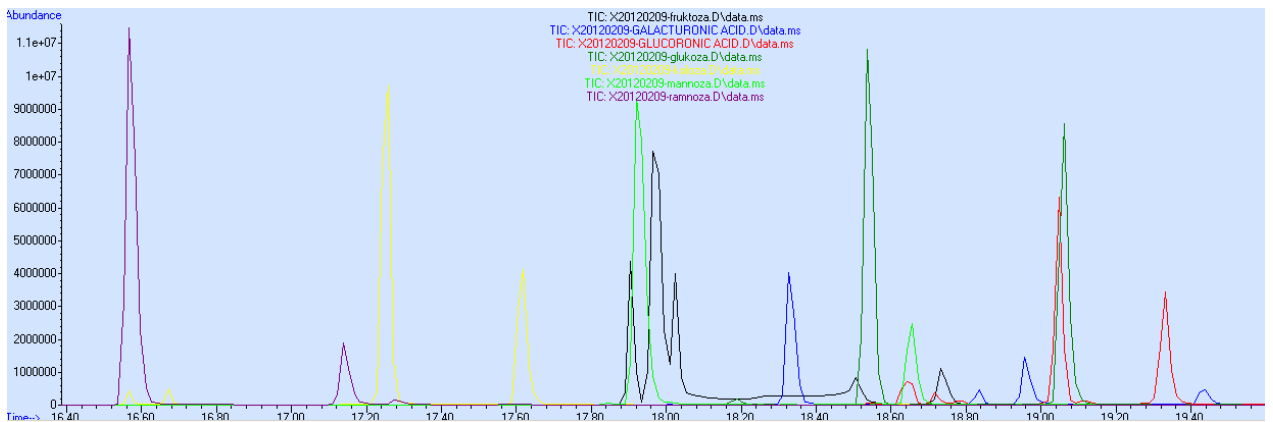
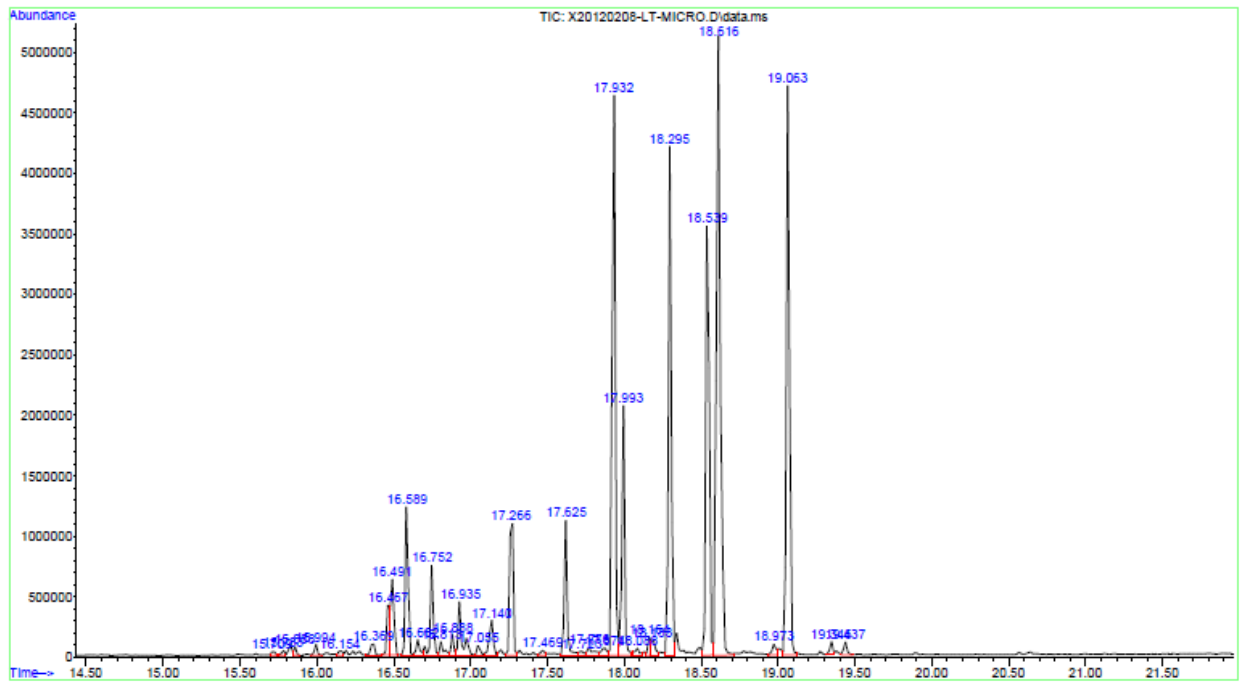
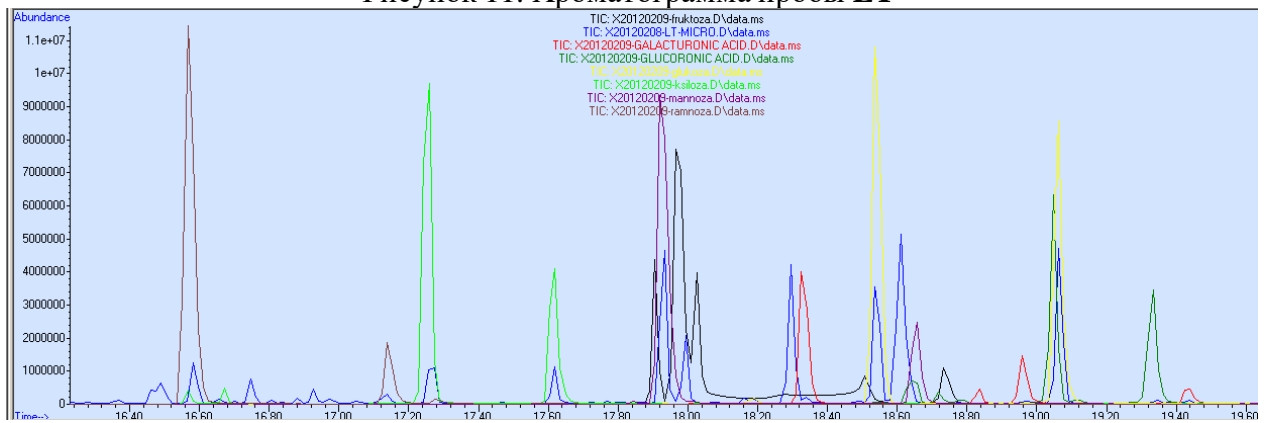


Рисунок 8. Наложение хроматограмм стандартов

Рисунок 11. Хроматограмма пробы **ЛТ**Рисунок 12. Наложение хроматограмм пробы **ЛТ** и стандартов

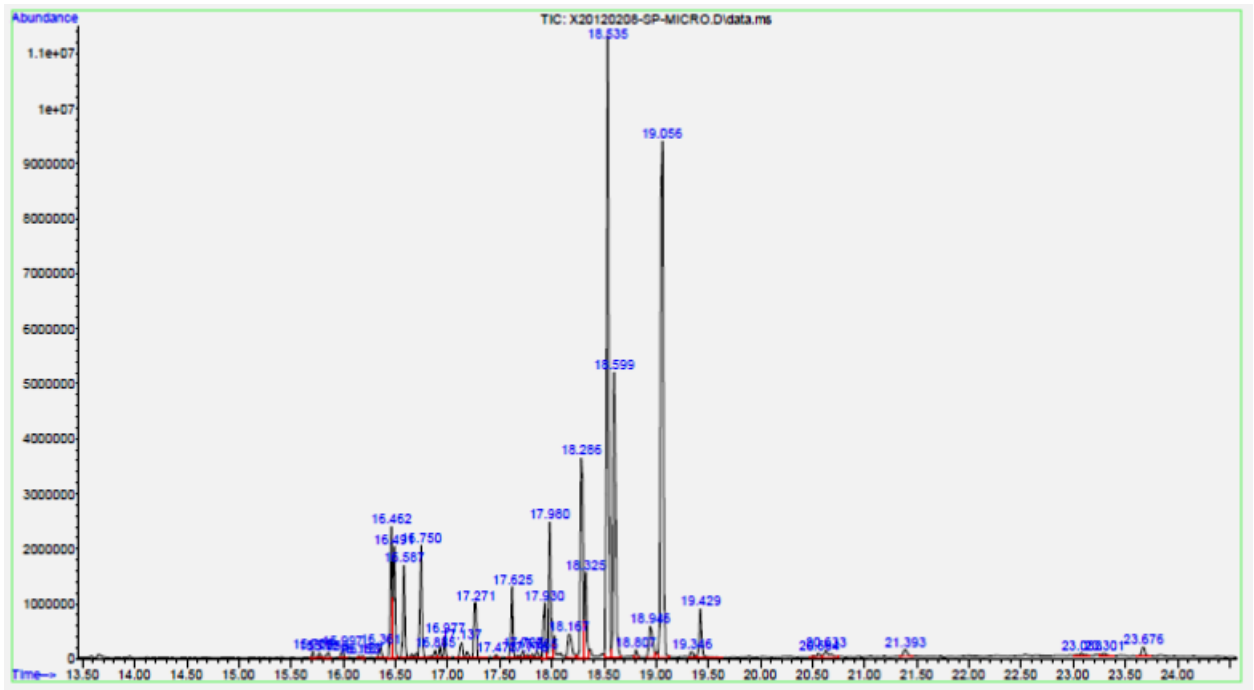


Рисунок 13. Хроматограмма пробы LP

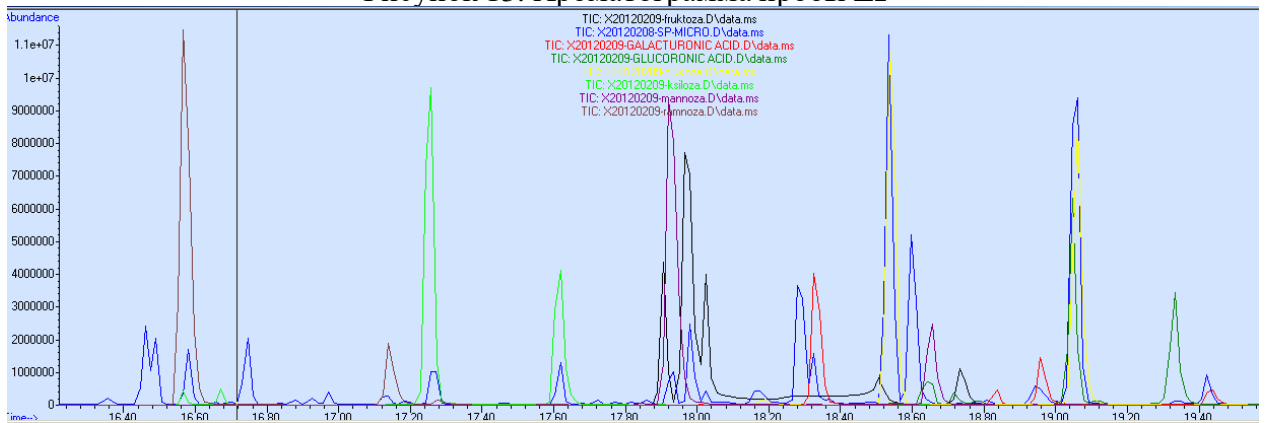


Рисунок 14. Наложение хроматограмм пробы LP и стандартов

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ряски трава

ФС

Lemnae herba

Вводится впервые

Собранные в период вегетации и высушенные листецы с корнями дикорастущих видов многолетнего травянистого растения ряски малой – *Lemna minor* L., ряски тройчатой - *Lemna trisulca* L., многокоренника обыкновенного (ряска многокоренник) – *Spirodela polyrrhiza* (L.) SCHLEID., сем. Ароидных – *Araceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных непрозрачных и полупрозрачных листецов одиночных или образующих группы из 2-20 экземпляров. Корни одиночные или перепутанные в пучки нитевидно-волосовидные от бледно-зеленого до темно-коричневого цвета и светло фиолетового цвета, длиной 8-18 мм. Листецы с верхней стороны слегка выпуклые и плоские зеленого, светло-зеленого, зеленовато-коричневого цвета, на некоторых листьях имеются малиново-фиолетовые пятнышки, с нижней стороны плоские, зеленого, светло-зеленого, малиново-фиолетового цвета. Листецы обратнойцевидные или эллиптические, реже округлые (2-3 мм длиной, 1-2,5 мм шириной), цельнокрайние, с тупой верхушкой и округло-клиновидным, реже округлым основанием; продолговатые (2-6 мм длиной, 1-2 мм шириной), с зубчато-волнистый краем и тупой или выямчато-усеченной верхушкой, клиновидно-округлым основанием, суженным в длинную ножку (3-10 мм длиной); округло-грушевидные, реже эллиптические или округлые (2-6 мм длиной, 2-4 мм шириной), цельнокрайние, с тупой, редко заостренной верхушкой и

округлым основанием, на всех типах листьев при рассматривании их в стереомикроскоп хорошо заметна аэренхима с воздухоносными полостями.

Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листочков и корней, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет от светло-зеленого до темно-коричневого и светло фиолетового. Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Микроскопические признаки

Цельное и измельченное сырьё. При рассмотрении листочков с поверхности видно на нижней стороне клетки эпидермиса со слабоизвилистыми, сильноизвилистыми продольно вытянутыми, квадратно-многоугольные, почти прямостенные. Клетки верхнего эпидермиса разнонаправленные, слабоизвилистые, многоугольные, округло-многоугольные, почти прямостенные. Между верхним и нижним слоем клеток эпидермиса хорошо заметна развитая аэренхима, которая может занимать от 1/6 до 3/4 объема листочка, межклетники округло-эллиптические, овальные, диаметр межклетника в 6-12 раз больше диаметра клеток аэренхимы, и в 2-6 раз больше диаметра клеток верхнего эпидермиса. На некоторых листочках на верхней стороне эпидермиса имеются многочисленные аномоцитные устьица с 5-8 побочными клетками, направленными вдоль листочка, также встречаются листочки на которых отсутствуют устьица, как с верхней, так и с нижней стороны. На листочках хорошо заметны клетки-идиобласты с рафидами, иногда с рафидами и друзами, в субэпидермальном слое некоторых листочков хорошо заметны пигментные клетки с оранжевым, красновато-оранжевым, оранжево-коричневым содержимым. Клетки корней листочков прямостенные или слегка волнистые, вытянутые по длине, ксилема в корнях редуцирована до одного кольчатого сосуда.

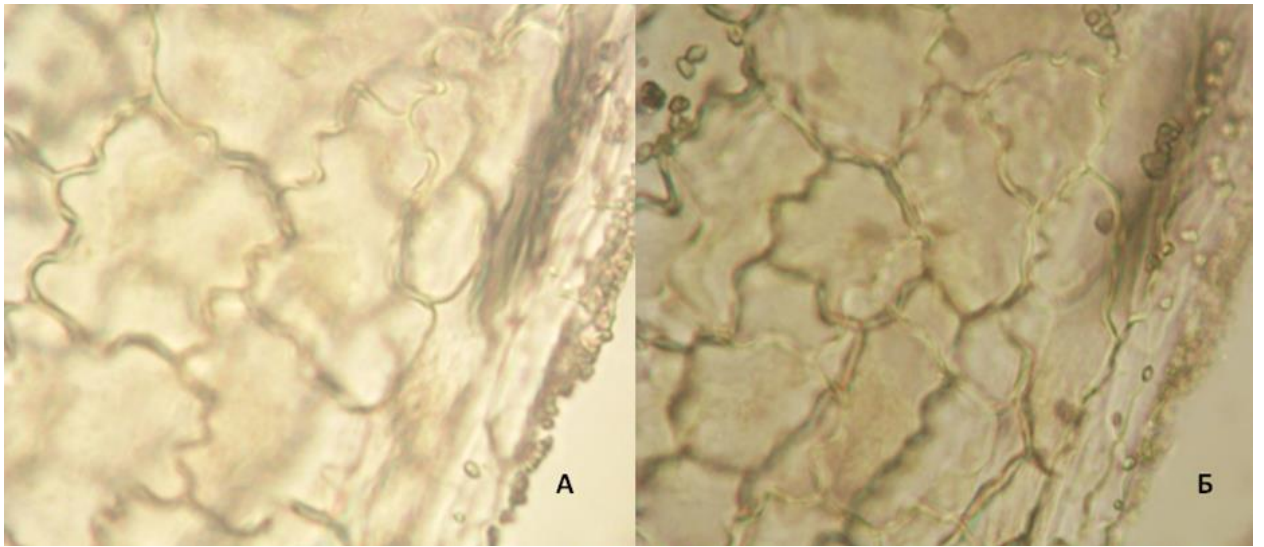


Рисунок 1. Плоскостной препарат листеца *Lemna minor*. А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис.

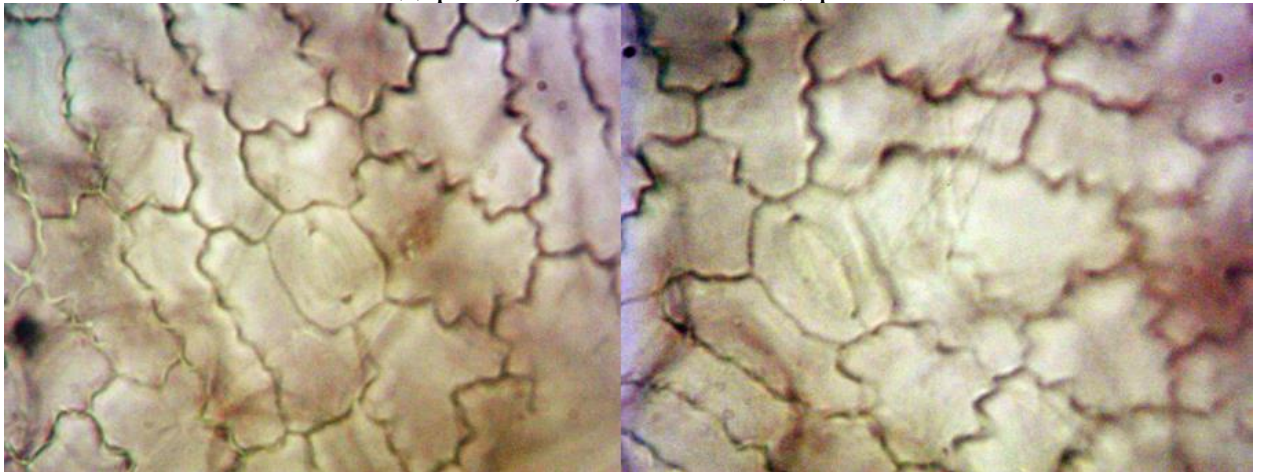


Рисунок 2. Плоскостной препарат листеца *Lemna minor*. Устьица на нижнем эпидермисе.

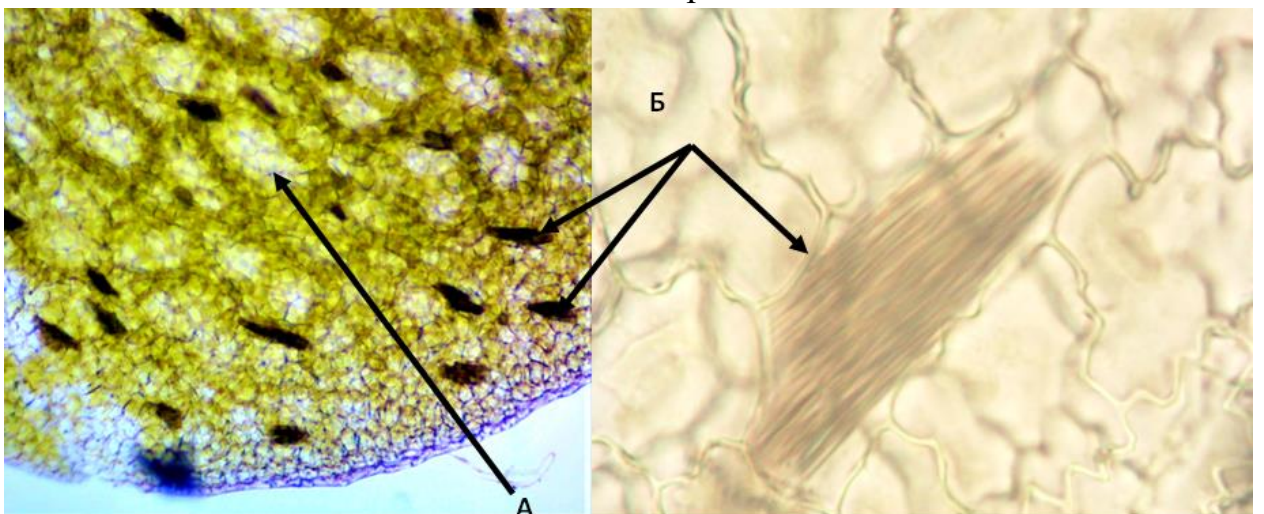


Рисунок 3. Плоскостной препарат листеца *Lemna minor*. А - аэренхима, Б – рафиды.

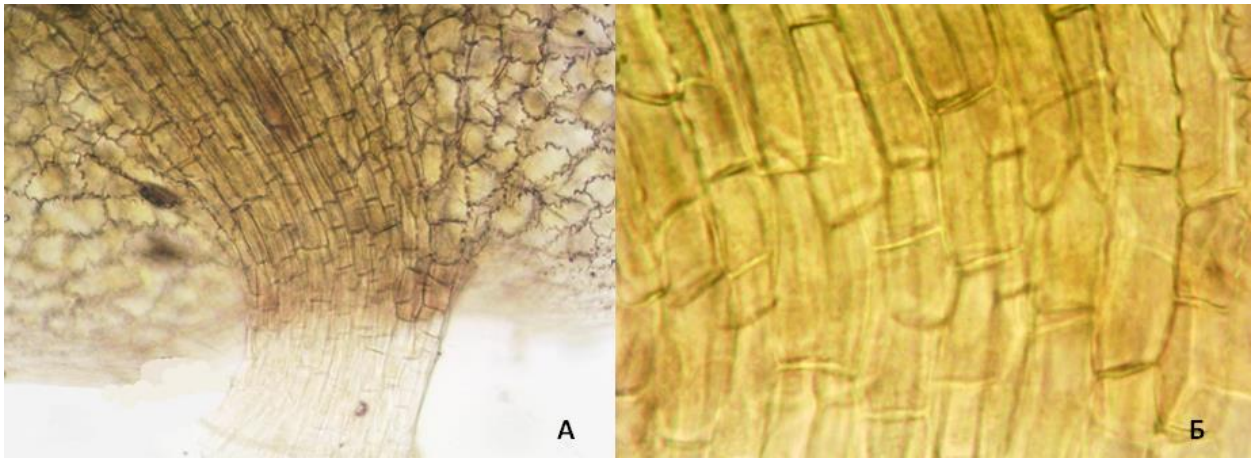


Рисунок 4. Плоскостной препарат *Lemna minor*. А – основание листеца с корнем, Б - прямостенные клетки эпидермиса корня.

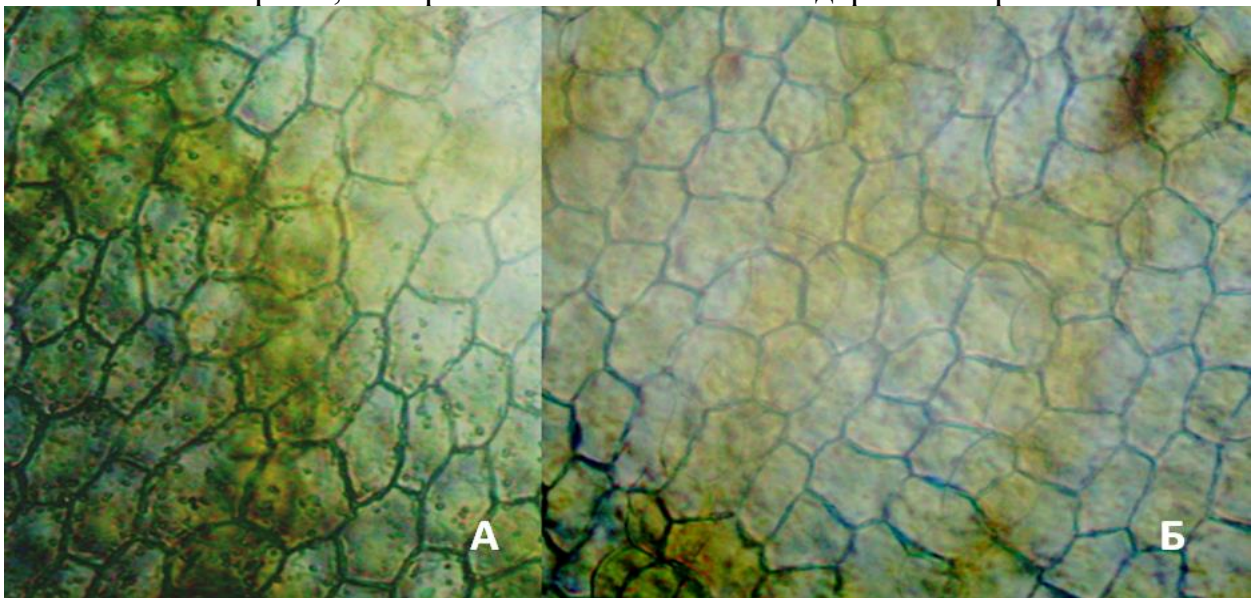


Рисунок 5. Плоскостной препарат листеца *Lemna trisulca*. А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис.

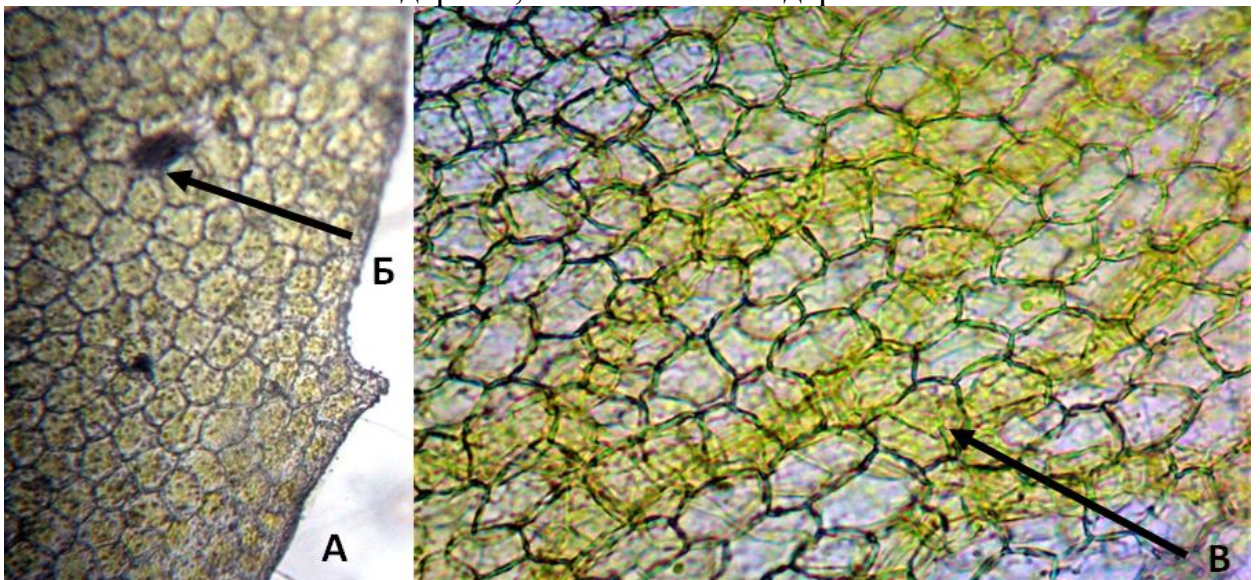


Рисунок 6. Плоскостной препарат листеца *Lemna trisulca*. А – выемчатый край листеца, Б – рафиды, В - аэренхима.

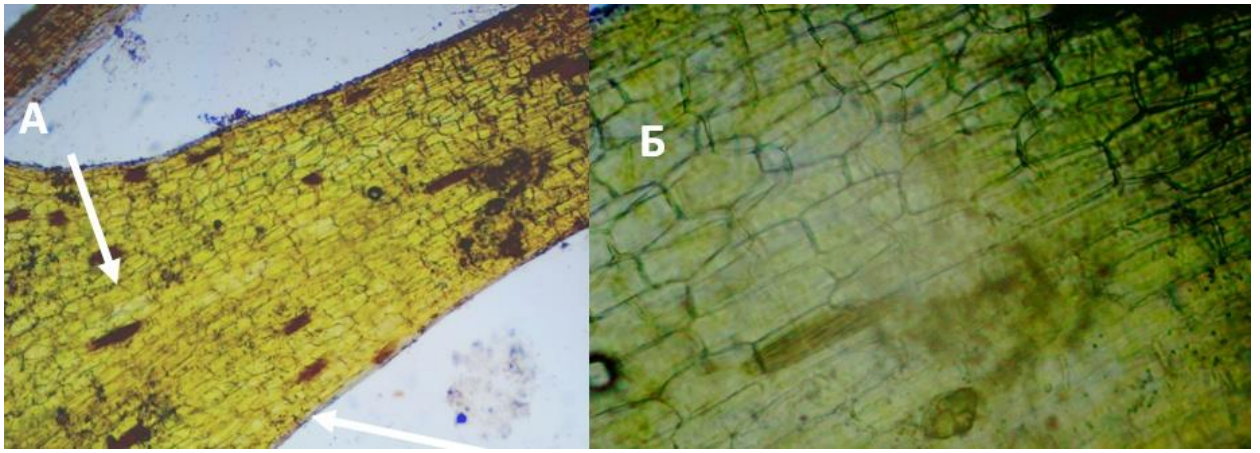


Рисунок 7. Плоскостной препарат листеца *Lemna trisulca*: А – основание листеца и корень, Б - прямоугольные клетки эпидермиса корня, В – рафиды

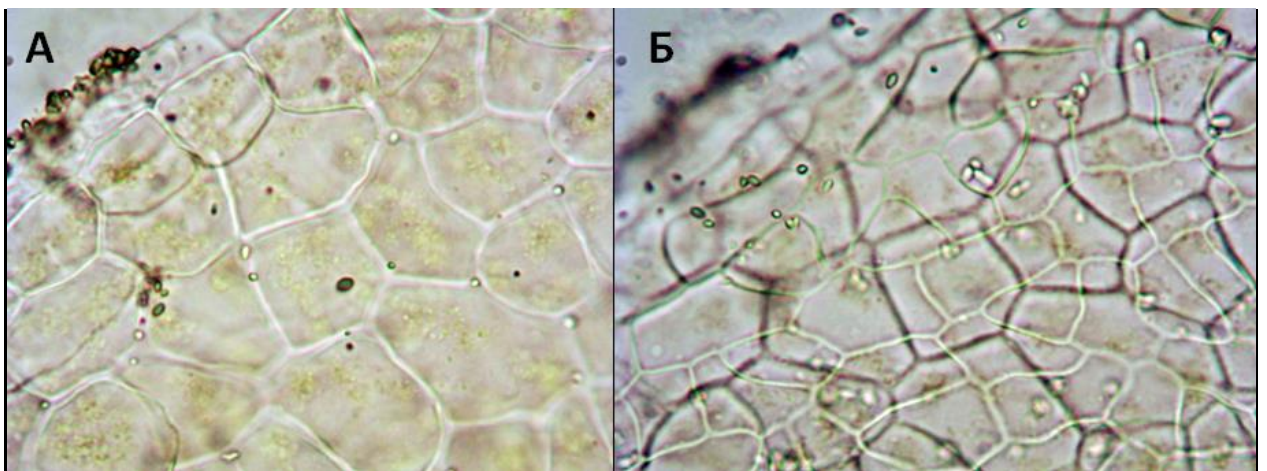


Рисунок 8. Плоскостной препарат листеца *S. polyrrhiza*. А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис.

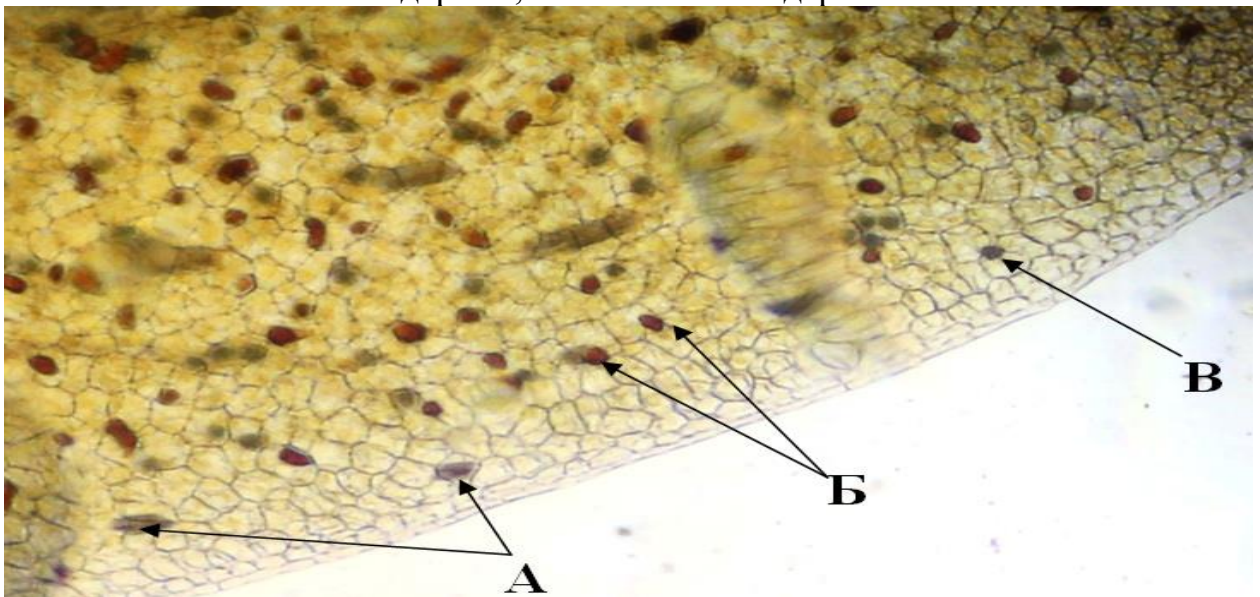


Рисунок 9. Плоскостной препарат листеца *Spirodela polyrrhiza*. А - рафиды, Б- клетки-идиобласты с пигментированным содержимым, В – друзы.

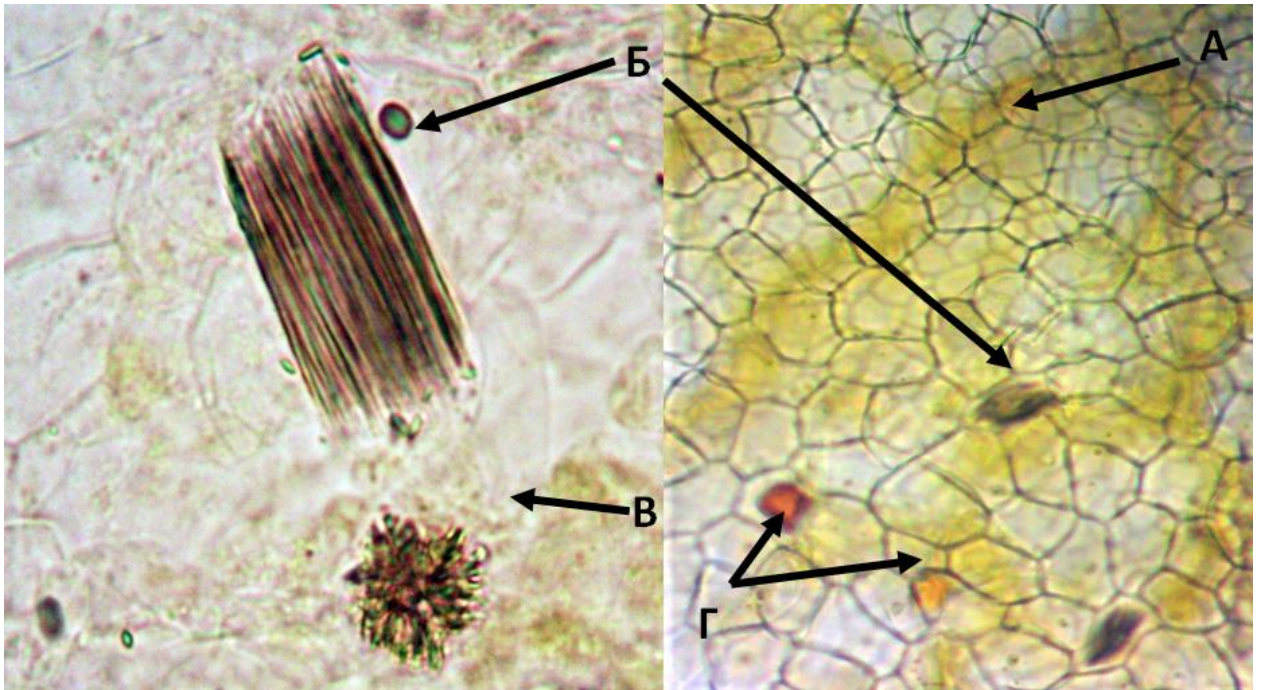


Рисунок 10. Плоскостной препарат листеца *Spirodela polyrrhiza*. А - аэренхима, Б – рафиды, В - друзы, Г – клетки-идиобласты с антоцианами.

Определение основных групп биологически активных веществ

УФ-спектрофотометрия. Регистрируют спектр 2 мл профильтрованного испытуемого раствора (методика количественного определения фенолкарбоновых кислот) с помощью спектрофотометра в интервале длин волн от 240 до 360 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. УФ-спектр полученного раствора должен иметь максимум при длине волны 325 ± 5 нм (фенолкарбоновые кислоты).

ИСПЫТАНИЯ

Потеря в массе при высушивании. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 9 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 7 %.

Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* измельченных частиц проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм, не более 37%; частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм не более 22%. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями

размером 4 мм, – не более 45%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 8%.

Посторонние примеси.

Побуревших и почерневших. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 4,0%.

Органическая примесь. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 2,0%.

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

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

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

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

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

Количественное определение. *Цельное сырьё, измельченное сырье, порошок:*

Методика количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье ряски.

Навеску 10,0 г (точная навеска) сырья ряски помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 мл, приливают 200 мл 70 % этилового спирта и нагревают на водяной бане при температуре 80 °С, в течение 30 минут с обратным холодильником. После извлечения фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) в мерную колбу вместимостью 250 мл, промывая трижды шрот на фильтре 70 % этиловым спиртом порциями по 5 мл. После чего

доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора до метки 70 % спиртом этиловым. 4 мл полученного раствора помещают в делительную воронку и добавляют 20 мл гексана, интенсивно взбалтывают несколько раз. После расслоения отбирают 2 мл нижнего слоя в пробирку и удаляют растворитель в токе азота. Сухой остаток растворяют в 2 мл 70 % этилового спирта.

Стандартный раствор хлорогеновой кислоты готовили из навески 0,1000 г (т.н.) рабочего стандартного образца хлорогеновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 50 мл 70 % этилового спирта и перемешивают до полного растворения. После чего доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 0,8 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем.

Фотометрируют стандартный раствор хлорогеновой кислоты и испытуемый раствор, используя 70 %-ый этиловый спирт в качестве раствора сравнения, после чего содержание фенолкарбоновых кислот рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{A_{\text{исп}} \times m_0 \times 200}{A_{\text{стд}} \times m_{\text{навеска}}},$$

где $A_{\text{исп}}$ – оптическая плотность испытуемого раствора; $A_{\text{стд}}$ – оптическая плотность стандартного раствора; m_0 – масса хлорогеновой кислоты, взятая для приготовления стандартного раствора, г; $m_{\text{навеска}}$ – масса навески сырья, г.

Содержание фенолкарбоновых кислот, в пересчете на хлорогеновую кислоту должно быть не менее 3,5 %

Методика количественного определения полисахаридов в сырье ряски.

Навеску 10,0 г (точная навеска) сырья ряски помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагревают на кипящей водяной бане и экстрагируют в течение 1 часа. После извлечение

фильтруют через тканевой фильтр и экстракцию повторяют ещё 1 раз. Извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) под вакуумом. Фильтрат упаривают на роторном испарителе до 1/5 исходного объема, после чего прибавляют трехкратный объем 96 % этилового спирта и выдерживают в течение 12 часов в холодильнике для полного осаждения полисахаридного комплекса. Затем осадок отфильтровывают через предварительно доведенный до постоянной массы бумажный фильтр, осадок на фильтре промывают горячим 96 % этиловым спиртом, затем ацетоном. Фильтр с осадком высушивают до постоянной массы и взвешивают.

Содержание полисахаридов должно быть не менее 4,0 %.

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

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

Приложение 3
Акты внедрения результатов диссертационной работы

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
http://www.ssmu.ru
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001



"УТВЕРЖДАЮ"
Проректор по научной работе и
последипломной подготовке
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

О.С. Федорова

18.04.2021 г. май 2021 год

№ _____
На № _____ от _____

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в научно-исследовательский процесс лаборатории контроля качества центра внедрения технологий центральной научно-исследовательской лаборатории федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации результатов диссертационной работы лаборанта центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России Никифорова Леонида Анатольевича на тему «Сравнительная фармакогностическая характеристика представителей подсемейства рясковые (*Lemnoideae*)», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Разработанная автором научно обоснованная спектрофотометрическая методика стандартизации сырья по суммарному содержанию фенолкарбоновых кислот в пересчете на мажорный компонент представляет большой интерес с точки зрения контроля качества растительного сырья, применяемого в качестве источника фенолкарбоновых кислот и внедрена в научно-исследовательский процесс лаборатории контроля качества.

Председатель:
Руководитель ЦВТ ЦНИЛ СибГМУ

А.М. Гурьев

Члены комиссии
Заведующий лабораторией контроля качества ЦВТ

С.В. Кривошеков

Младший научный сотрудник ЦНИЛ

С.С. Власов

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО БГМУ

Минздрава России,

член-корр. РАН, профессор

В.Н. Павлов

« ___ » _____ 2021 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов диссертационной работы Никифорова Леонида Анатольевича
**«Сравнительная фармакогностическая характеристика представителей
 подсемейства Рясковые (*Lemnoideae*)»**,
 представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук
14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Комиссия в составе: председатель - заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н., профессор Кудашкина Н.В.

члены комиссии: профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н Пупыкина К.А., профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н. Хасанова С.Р.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Никифорова Леонида Анатольевича «Сравнительная фармакогностическая характеристика представителей подсемейства Рясковые (*Lemnoideae*)», внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. (450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3) и применяются при изучении вопросов качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья, содержащего полисахариды, фенолкарбоновые кислоты и при разработке методов стандартизации лекарственного растительного сырья и средств растительного происхождения.

Подпись		
Председатель комиссии		Н.В. Кудашкина
Заверяю		К.А. Пупыкина
Члены комиссии		С.Р. Хасанова
секретарь ФГБОУ ВО БГМУ		
Минздрава России		

