

НАО «Казахский национальный медицинский университет
имени С.Д. Асфендиярова»

УДК 615.1+613.29:635.65

На правах рукописи

КЕЛЕКЕ АНЕЛЬ САТЖАНКЫЗЫ

**Фармакогностическое изучение копеечника Семенова
(*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) как источника биологически
активных веществ**

8D10102 – «Фармация»

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Ибрагимова Л.Н., к.фарм.н., асс.проф.
Зарубежные научные консультанты:
İlkay Erdoğan Orhan, Dr., Professor
Lokman Hekim University (Türkiye)
Agnieszka Ludwiczuk, Dr. hab.,
Assoc. Professor
Medical University of Lublin (Poland)

Республика Казахстан
Алматы 2026

СОДЕРЖАНИЕ

	НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
	ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
	ВВЕДЕНИЕ.....	8
1	СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ И БОТАНИКО-ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА КОПЕЕЧНИК (<i>HEDYSARUM</i> L.).....	13
1.1	Таксономия и ботаническая характеристика растений рода копеечник (<i>Hedysarum</i> L.).....	13
1.2	Ареал распространения и среда обитания растений рода копеечник (<i>Hedysarum</i> L.).....	16
1.3	Химический состав растений рода копеечник (<i>Hedysarum</i> L.).....	17
1.4	Фармакологическая активность растений рода копеечник (<i>Hedysarum</i> L.) и их применение в практике.....	22
1.5	Копеечник Семенова (<i>Hedysarum semenowii</i> Regel & Herder) как объект исследования.....	26
	Выводы по первой главе.....	28
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
2.1	Материалы исследования.....	30
2.2	Методы исследования.....	31
2.2.1	Фармакогностические и ресурсоведческие методы.....	32
2.2.2	Химические и физико-химические методы.....	32
2.2.3	Комплексные методы стандартизации и исследования стабильности... ..	36
2.2.4	Биологические методы.....	38
2.2.5	Фармацевтико-технологические и статистические методы.....	41
3	МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФИТОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (<i>HEDYSARUM SEMENOWII</i> REBEL & HERDER).....	43
3.1	Макроскопическое исследование травы и корней копеечника Семенова.....	43
3.2	Микроскопические исследования травы и корней копеечника Семенова.....	48
3.3	Фитохимический анализ копеечника Семенова.....	54
3.4	Количественное определение мангиферина в траве копеечника Семенова.....	64
3.5	Изучение аминокислотного состава копеечника Семенова.....	65
3.6	Изучение жирнокислотного состава копеечника Семенова.....	67
3.7	Определение витаминного состава копеечника Семенова.....	69
3.8	Определение минерального состава копеечника Семенова.....	70
	Выводы по третьей главе.....	72
4	СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (<i>HEDYSARUM SEMENOWII</i>	

	REGEL & HERDER) И УСТАНОВЛЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ПРИЕМЛЕМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА.....	74
4.1	Разработка спецификации качества на траву копеечника Семенова.....	74
4.2	Разработка спецификации качества корней копеечника Семенова.....	80
4.3	Изучение стабильности и установление срока хранения растительного сырья копеечника Семенова.....	82
	Выводы по четвертой главе.....	84
5	СКРИНИНГ БЕЗОПАСНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (<i>HEDYSARUM SEMENOWII</i> REGEL & HERDER)....	85
5.1	Исследования токсичности копеечника Семенова.....	85
5.1.1	Исследование острой токсичности.....	85
5.1.2	Исследование подострой токсичности.....	85
5.1.3	Изучение местно-раздражающего действия.....	90
5.1.4	Изучение аллергизирующего действия.....	90
5.2	Скрининг биологической активности копеечника Семенова.....	91
5.2.1	Исследование антимикробной активности.....	91
5.2.2	Исследование антиоксидантной активности.....	94
	Выводы по пятой главе.....	96
6	РАЗРАБОТКА КОНЦЕПЦИИ ФИТОИНТРОДУКЦИИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ СУБСТАНЦИИ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (<i>HEDYSARUM SEMENOWII</i> REGEL & HERDER).....	98
6.1	Изучение природных запасов копеечника Семенова.....	98
6.2	Заготовка лекарственного растительного сырья копеечника Семенова.....	100
6.3	Разработка концепции фитоинтродукции копеечника Семенова.....	107
6.4	Разработка технологии получения фармацевтической субстанции травы копеечника Семенова.....	112
	Выводы по шестой главе.....	118
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	124
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	134

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативные документы:

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Решение Комиссии таможенного союза от 9 декабря 2011 года № 880 «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 декабря 2021 года № 169 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственных растительных препаратов».

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 года № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза».

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07 сентября 2018 года № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 12 февраля 2019 года № 6 «О Руководстве по выбору тестов и критериев приемлемости для составления спецификаций на лекарственное растительное сырье, растительные фармацевтические субстанции (препараты на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственные растительные препараты».

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 года № 6 «О Руководстве по качеству лекарственных растительных препаратов».

Указ Президента Республики Казахстан от 30 июля 2024 года № 611 «Об утверждении Национального плана развития Республики Казахстан до 2029 года и признании утратившими силу некоторых указов Президента Республики Казахстан».

Постановление Правительства Республики Казахстан от 24 ноября 2022 года № 945 «Об утверждении Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2029 года».

Распоряжение Премьер-Министра Республики Казахстан от 6 октября 2020 года № 132-р «Об утверждении Комплексного плана по развитию фармацевтической и медицинской промышленности на 2020-2025 годы».

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств».

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил проведения

производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств».

ГОСТ 7.32-2017 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

ГОСТ 13496.4-2019 «Методы определения содержания азота и сырого протеина».

ГОСТ 24556-89 «Методы определения витамина С».

ГОСТ 30349-96 «Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов».

ГОСТ 31483-2012 «Определение содержания витаминов: В₁ (тиаминахлорида), В₂ (рибофлавина), В₃ (пантотеновой кислоты), В₅ (никотиновой кислоты и никотинамида), В₆ (пиридоксина), В_с (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза».

ГОСТ 32343-2013 (ISO 6869:2000) «Определение содержания кальция, меди, железа, магния, марганца, калия, натрия и цинка методом атомно-абсорбционной спектроскопии».

ГОСТ Р 54634-2011 «Метод определения витамина Е».

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей диссертации использованы следующие обозначения и сокращения:

AAI	– индекс антиоксидантной активности
ATCC	– Американская коллекция типовых культур
DAD	– диодно-матричный детектор
DoE	– планирование экспериментов (Design of Experiments)
dp	– Диаметр частиц сорбента
DPPH	– 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
DSp	– проектное поле (Design Space)
ESI	– ионизация электрораспылением
EC ₅₀	– эффективная концентрация, вызывающая 50% эффекта
GACP	– Надлежащая практика выращивания и сбора лекарственного растительного сырья (Good Agricultural and Collection Practices)
GMP	– Надлежащая производственная практика (Good Manufacturing Practices)
HPS	– полисахарид <i>Hedysarum polybotrys</i>
HMDB	– База данных метаболома человека (Human Metabolome Database)
ICH	– Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для медицинского применения (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)
LC	– жидкостная хроматография
LD ₅₀	– доза, вызывающая летальный исход 50% объектов
LOD	– потеря в массе при высушивании
MS	– масс-спектрометрия
m/z	– отношение массы иона к его заряду
NOAEL	– уровень не наблюдаемого неблагоприятного эффекта
OECD	– Организация экономического сотрудничества и развития (Organisation for Economic Co-operation and Development)
p-value	– уровень статистической значимости
PGDH	– ген, кодирующий фермент 6-фосфоглюконатдегидрогеназу
Ph.Eur.	– Европейская фармакопея
PSIG	– манометрическое давление в фунтах на кв. дюйм
QbD	– качество через проектирование (Quality by Design)
QToF	– квадрупольно-времяпролётная масс-спектрометрия
RP-LC	– обращённо-фазовая жидкостная хроматография
RF Peak	– высокочастотное пиковое напряжение на октополе
RSD	– относительное стандартное отклонение
SD	– стандартное отклонение
SEM	– стандартная ошибка среднего
TAMC	– общее число аэробных микроорганизмов
t _R	– время удерживания

ТУМС	– общее количество дрожжевых и плесневых грибов
БАВ	– биологически активные вещества
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЗТ	– гиперчувствительность замедленного типа
ГФ РК	– Государственная фармакопея Республики Казахстан
ДДТ	– дихлордифенилтрихлорэтан
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕЭК	– Евразийская экономическая комиссия
ЕАЭС	– Евразийского экономического союза
КазНМУ	– НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова»
КОЕ	– колониеобразующие единицы
КОКСНВО	– Комитет по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования
КТС	– Комиссия таможенного союза
ЛРС	– лекарственное растительное сырье
МЭЖК	– метиловые эфиры жирных кислот
МИК	– минимальная ингибирующая концентрация
МБК	– минимальная бактерицидная концентрация
МС	– масс-спектрометрия
МФК	– минимальная фунгицидная концентрация
МЗ	– Министерство здравоохранения
ООН	– Организация объединенных наций
ОФС	– общая фармакопейная статья
РГП на ПХВ	– Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения
РК	– Республика Казахстан
СОП	– Стандартная операционная процедура
США	– Соединённые Штаты Америки
ТСХ	– Тонкослойная хроматография
ТР ТС	– Технический регламент Таможенного союза
УФ	– Ультрафиолетовый спектр
ФЕАЭС	– Фармакопея Евразийского экономического союза
ЦУР	– Цели устойчивого развития
ЧФС	– Частная фармакопейная статья

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Стратегические приоритеты Республики Казахстан в области здравоохранения и развития фармацевтического сектора в рамках раздела «Здравоохранение» Национального плана развития и Концепции развития здравоохранения до 2029 года направлены на укрепление здоровья населения и профилактики заболеваемости, а также отражают приверженность государства целям устойчивого развития Организации Объединенных наций [1]. Важным шагом на пути к достижению этих целей является реализация Комплексного плана развития фармацевтической и медицинской промышленности на 2020-2025 годы, одним из приоритетов которого выступает создание конкурентоспособных лекарственных средств и биологически активных добавок на основе отечественных растительных ресурсов. В этой связи уникальная флора Казахстана представляет собой ценную, требующую глубокого изучения базу для поиска новых источников биологически активных веществ. Проведение фармакогностических исследований перспективных видов растений позволит создать фундамент для расширения ресурсной базы нового фармакопейного сырья и его внедрения в фармацевтическую разработку [2,3].

Одним из родов, представляющих интерес является копеечник (*Hedysarum* L.), семейства *Fabaceae*, насчитывающий более 200 видов однолетних и многолетних травянистых растений. Копеечники преимущественно встречаются в умеренных климатических зонах северного полушария, охватывая азиатский, европейский, северно-африканский и северно-американский континенты. На просторах Казахстана произрастает 28 видов, более половины которых остаются малоизученными [4,5]. В традиционной медицине данные растения активно используют на протяжении сотен лет. Многие виды рода *Hedysarum*, такие как *H. polybotrys*, *H. alpinum*, *H. vicioides* и другие применяют для укрепления иммунной системы, повышения энергетических запасов тела, увеличения мочеиспускания и регенерации тканей [6,7]. Согласно литературным источникам, биологические активные вещества, входящие в состав растений, обладают выраженным противовирусным, антиоксидантным, противоопухолевым и антидиабетическим действием [4,8,9].

В качестве объекта исследования выбран – копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), являющийся эндемиком Центрального Тянь-Шань и известный в качестве кормовой культуры [10,11]. Несмотря на хемотаксономическую близость *H. semenowii* к фармакопейному *H. polybotrys*, комплексные фармакогностические исследования, определение профиля безопасности и биологической активности вида не проводились. Фармакогностическое изучение может способствовать расширению спектра применения *H. semenowii*, включению в список фармакопейного сырья и культивированию для дальнейшего получения растительных фармацевтических субстанций.

Цель исследования: фармакогностическое изучение копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), стандартизации растительного

сырья и установление перспектив его фармацевтического применения.

Задачи исследования:

- установить морфолого-анатомические диагностические признаки растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder);
- изучить комплексный химический состав и макро-, микроэлементный профиль растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder);
- провести стандартизацию растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) с установлением числовых показателей качества и определением срока годности;
- исследовать профиль безопасности и биологической активности извлечений из растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder);
- провести ресурсоведческую оценку копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), обосновать концепцию фитоинтродукции и технологии получения фармацевтической субстанции.

Методы исследования: фармакопейные и нефармакопейные методы (физические, физико-химические, фармацевтико-технологические, микробиологические), фармакологические, ресурсоведческие и статистические методы.

Объект исследования: копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), рода копеечник (*Hedysarum* L.) семейства Бобовые (*Fabaceae*), его лекарственное растительное сырье (трава и корни) и экстракты.

Предмет исследования: фармакогностические (морфолого-анатомические) признаки, фитохимический профиль, ресурсоведческие характеристики, показатели стандартизации сырья копеечника Семенова, а также технология получения, биологическая активность и профиль безопасности фармацевтических субстанций на его основе.

Научная новизна

Впервые:

- определены фармакопейные морфолого-анатомические идентификационные признаки травы и корней *Hedysarum semenowii* Regel & Herder (Объект авторского права № 67778 от 20.02.2026 г. «Макроскопическая и микроскопическая характеристика растений копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), Приложение А);
- установлен профиль вторичных метаболитов травы и корней копеечника Семенова из 53 идентифицированных соединений. Доказано, что ксантон мангиферин накапливается не только в надземной, но и в подземной части копеечника Семенова, а также обосновано использование медикарпина и его 3-О-глюкозида в качестве специфических хемотаксономических маркеров корней (Объект авторского права № 44765 от 17.04.2024 г. «Определение мангиферина в сырье копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), Приложение Б);

– проведено комплексное профилирование состава первичных метаболитов, витаминов, а также макро- и микроэлементов копеечника Семенова: установлено наличие 11 аминокислот в траве и 13 аминокислот в корнях; охарактеризован спектр жирных кислот в надземной (9 соединений) и подземной частях (16 соединений); установлено наличие витаминов С (аскорбиновая кислота), Е (токоферол) и группы В (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В_с); определено содержание 10 макро- и микроэлементов (Fe, Cu, Zn, Na, Mg, Ca, K, P, Se, N) (Объект авторского права № 77564 от 19.08.2026 г. «Химический состав копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), Приложение В);

– научно обоснован профиль безопасности и биологической активности экстрактов травы и корней *Hedysarum semenowii*: установлена низкая острая токсичность (LD₅₀ > 5000 мг/кг) и отсутствие клинически значимого местно-раздражающего и аллергизирующего потенциала. По результатам оценки подострой токсичности впервые определен уровень не наблюдаемого неблагоприятного эффекта (NOAEL < 500 мг/кг). Доказано наличие выраженного антиоксидантного действия и умеренной антибактериальной активности экстрактов травы против патогенных штаммов *Staphylococcus* и *Pseudomonas aeruginosa*;

– проведена ресурсоведческая оценка природных сырьевых запасов копеечника Семенова в ущельях хребта Кунгей Алатау, по результатам которой определен их ограниченный объем и разработана концепция фитоинтродукции в культуру. Для оптимизации технологии заготовки сырья копеечника Семенова впервые применена фармацевтическая парадигма «Quality by Design» (Объект авторского права № 38239 от 03.08.2023 г. «Методика сбора и обработки частей растения копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder, Приложение Г);

– разработана технология получения фармацевтической субстанции в виде сухого экстракта травы копеечника Семенова с применением градиентной трехэтапной экстракции, позволяющий максимально и селективно извлекать комплекс биологически активных веществ, при помощи инструментов математического планирования экспериментов. Новизна разработанного способа подтверждена патентом на полезную модель № 9815 «Способ получения растительного экстракта из травы копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)» (Приложение Д).

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

– Результаты фармакогностического исследования лекарственного растительного сырья *Hedysarum semenowii* Regel & Herder, объединяющего установленный комплекс диагностических морфолого-анатомических признаков, химического состава, показателей качества для стандартизации и сроков годности.

– Результаты экспериментального обоснования профиля безопасности экстрактов *Hedysarum semenowii* Regel & Herder и определения их антиоксидантной и антимикробной активности.

– Результаты ресурсоведческого исследования и разработки концепции фитоинтродукции *Hedysarum semenowii* Regel & Herder, обеспечивающие сохранение природных популяций и выступающие фундаментом для разработки технологии получения фармацевтической субстанции.

Практическая значимость исследования

Разработаны и внедрены технология сбора и заготовки растительного сырья копеечника Семенова на фармацевтическом предприятии ТОО «ФитОлеум», г. Есик, Казахстан (Объект авторского права № 38239 от 03.08.2023 г., Акт внедрения от 09.10.2023 г., СОП «Сбор, сушка и хранение копеечника Семенова», Приложения Г, Е, Ж).

Разработаны спецификации качества на лекарственное растительное сырье *Hedysarum semenowii* Regel & Herder, на основании которых составлены проекты нормативных документов по качеству «Копеечника Семенова трава» (Приложение И) и «Копеечника Семенова корни» (Приложение К).

Результаты ресурсоведческого обследования природных популяций копеечника Семенова на хребте Кунгей Алатау внедрены в Республиканском государственном учреждении «Государственный национальный природный парк «Көлсай көлдері»» (Акт внедрения, Приложение Л).

Разработан и внедрен способ получения фармацевтической субстанции в виде сухого экстракта из лекарственного растительного сырья *Hedysarum semenowii* Regel & Herder на фармацевтическом предприятии ТОО «ФитОлеум», г. Есик, Казахстан (Патент на полезную модель № 9815 и Акт внедрения от 08.04.2024 г., Приложения Д и М).

Результаты исследования включены в учебный процесс на кафедре фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова» (Акт внедрения от 27.10.2023 г., Приложение Н), кафедре фармацевтической микробиологии Люблинского медицинского университета (Акт внедрения, Приложение П), научно-исследовательском центре фармации и кафедре технологии лекарств и фармакогнозии АО «Южно-Казахстанская медицинская академия» (Акт внедрения от 07.08.2026 г., Приложение Р), кафедре фармакогнозии университета Локман Хеким (Турция, Акт внедрения, Приложение С), а также в учебник по курсу фармакогнозии в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Коммунальное государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Высший медицинский колледж» Управления общественного здравоохранения г. Алматы и ТОО «Высший медико-стоматологический колледж профессора Рузуддинова» (Акты внедрения, Приложения Т-Ф).

Личный вклад докторанта

Представленные результаты являются итогом самостоятельной работы автора, которая включала: анализ научной литературы (Web of Science, Scopus, PubMed) и разработку дизайна исследования; проведение полевых ресурсоведческих изысканий; комплексный фармакогностический анализ сырья

(макро- и микроскопия, профилирование метаболитов физико-химическими методами); оценку антимикробной, антиоксидантной активности и токсичности; статистическую обработку данных (Microsoft Excel, GraphPad Prism, Minitab), а также подготовку публикаций. Полученные результаты сопоставимы с данными ведущих мировых исследований рода копеечник.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: VIII международная научная конференция «Research Retrieval and Academic Letters» (г. Варшава, Польша, 2025 г.); XIII Международная научно-практическая конференция «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (г. Алматы, Казахстан, 2024 г.); Второй международный форум «Asfen.Forum, новое поколение – 2024» (г. Алматы, Казахстан, 2024 г.); XIV Всероссийская научная конференция с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2024 г.); XII международная научно-практическая конференция «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» посвященная 70-летию профессора Омаровой Р.А. (г. Алматы, Казахстан, 2023 г.); V международная научно-практическая конференция, посвященная памяти профессора Р. Дильбарханова «Формирование и перспективы развития научной школы фармации: преемственность поколений» (г. Алматы, Казахстан, 2023 г.); I международный форум «Asfen.Forum, новое поколение – 2023» (г. Алматы, Казахстан, 2023 г.); XVIII международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов ГОУ ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Наука и инновации в медицине – 2023» (г. Душанбе, Таджикистан, 2023 г.); XI международная научно-практическая конференция «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (г. Алматы, Казахстан, 2022 г.).

Сведения о публикациях

По результатам проведенных исследований опубликованы следующие научные работы: 2 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus (Приложение X); 2 статьи в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных КОКШВО МНВО РК; 9 статей и тезисов в материалах международных научно-практических конференциях (Казахстан, Таджикистан, Россия, Польша); 1 патент на полезную модель Республики Казахстан; 4 свидетельства на объекты, охраняемые авторским правом.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 168 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 29 таблиц, 38 рисунков, 146 источников литературы и 25 приложений. Структура работы состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, четыре главы экспериментальных исследований, выводов по главам и заключения.

1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ И БОТАНИКО-ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА КОПЕЕЧНИК (*HEDYSARUM* L.)

1.1 Таксономия и ботаническая характеристика растений рода копеечник (*Hedysarum* L.)

Род копеечник (*Hedysarum* L.) семейства бобовые (*Fabaceae* Lindl.) представляет собой крупнейшую группу в трибе копеечниковые (*Hedysareae*), который включает около 200 видов [12–14]. С развитием современных методов идентификации видов таксономия рода *Hedysarum* претерпела значительную переработку [9]. Ранние классификации проводились на основе морфологических признаков растений. Так, согласно предложенной Линнеем классификации, в XVIII веке род разделялся на четыре секции по форме листьев, тогда как Кандоль и Буассье классифицировали виды по форме растения и наличию щетинок на члениках стручков [9,15]. Наиболее распространенной и традиционной стала классификация Федченко, в соответствии с которой виды объединены в семь секций по жизненным формам и морфологии вегетативных и генеративных органов: *Crinifera*, *Fruticosa*, *Membranacea*, *Multicaulia*, *Obscura*, *Spinosissima* и *Subacaulia* [15,16]. Однако, недавние молекулярные исследования с использованием ядерного (ITS, PGDH, ETS и др.) и пластидного (*matK*, *trnL-F* и др.) секвенирования ДНК дополнительно уточнили таксономию, что привело к системе, признающей три основные секции рода копеечник, отличающихся основным числом хромосом: *Hedysarum*, *Multicaulia* и *Stracheya*. В ходе пересмотра таксономии рода некоторые секции были перенесены в состав таких родов, как *Sulla*, *Corethroedendron* и *Taverniera* [9,15].

«Флора Казахстана» (1961) выделила 38 видов рода копеечник, произрастающих на территории Казахстана [17]. Однако, в связи с вышеупомянутой недавней реклассификацией рода на основе филогенетических исследований, при сравнительном анализе номенклатуры казахстанских видов копеечников с международными флористическими базами данных (World Flora Online и Plantarium) список сократился до 28 признанных научных видов, включая 10 эндемичных: *Hedysarum pallidiflorum*, *H. karataviense*, *H. mindshilkense*, *H. dmitrievae*, *H. pavlovii*, *H. bectauatavicum*, *H. krylovii*, *H. acutifolium*, *H. chantavicum*, *H. kasteki* [12,18,19] (Рисунок 1). Сокращение числа видов было обусловлено объединением синонимов и переносом видов в другие роды. Так, несколько видов, ранее считавшихся отдельными в «Флоре Казахстана», были объединены под общепринятыми: *H. flavum* объединен с *H. semenowii*, *H. austrosibiricum* с *H. neglectum*, *H. subglabrum* и *H. montanum* с *H. songaricum*, *H. ulconburulicum* с *H. pavlovii*, *H. aculeatum* и *H. linczevskyi* с *H. krylovii*, *H. kandyktassicum* с *H. iliense*, а *H. fedtschenkoanum* и *H. dshambulicum* с *H. plumosum*. В свою очередь, вид *H. scoparium* был перенесен в род *Corethroedendron* как *Corethroedendron scoparium* (Fisch. & C.A.Mey.) Fisch. & Basiner [19].

<i>Hedysarum semenowii</i> Regel & Herder <i>Hedysarum flavum</i> Rupr.	→	<i>Hedysarum semenowii</i> Regel & Herder
<i>Hedysarum flavescens</i> Regel & Schmalh.	→	<i>Hedysarum flavescens</i> Regel & Schmalh.
<i>Hedysarum neglectum</i> Ledeb. <i>Hedysarum austrosibiricum</i> B.Fedtsch.	→	<i>Hedysarum neglectum</i> Ledeb.
<i>Hedysarum kirghisorum</i> B.Fedtsch.	→	<i>Hedysarum kirghisorum</i> B.Fedtsch.
<i>Hedysarum alpinum</i> L.	→	<i>Hedysarum alpinum</i> L.
<i>Hedysarum pallidiflorum</i> Pavlov	→	<i>Hedysarum pallidiflorum</i> Pavlov
<i>Hedysarum karataviense</i> B.Fedtsch.	→	<i>Hedysarum karataviense</i> B.Fedtsch.
<i>Hedysarum severzovii</i> Bunge	→	<i>Hedysarum severzovii</i> Bunge
<i>Hedysarum mindshilkense</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum mindshilkense</i> Bajtenov
<i>Hedysarum taschkenticum</i> Popov	→	<i>Hedysarum taschkenticum</i> Popov
<i>Hedysarum songaricum</i> Bong. <i>Hedysarum subglabrum</i> (Kar. & Kir.) B.Fedtsch. <i>Hedysarum montanum</i> (B.Fedtsch.) B.Fedtsch. (<i>Hedysarum issykkulense</i> Nikitina)	→	<i>Hedysarum songaricum</i> Bong.
<i>Hedysarum dmitrievae</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum dmitrievae</i> Bajtenov
<i>Hedysarum pskemense</i> Popov ex B.Fedtsch.	→	<i>Hedysarum pskemense</i> Popov ex B.Fedtsch.
<i>Hedysarum pavlovii</i> Bajtenov <i>Hedysarum ulconburulicum</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum pavlovii</i> Bajtenov
<i>Hedysarum gmelini</i> Ledeb.	→	<i>Hedysarum gmelini</i> Ledeb.
<i>Hedysarum Razoumovianum</i> Fisch. Et Helm. in DC	→	<i>Hedysarum razoumowianum</i> Helm & Fisch. ex DC.
<i>Hedysarum ferganense</i> Korsh.	→	<i>Hedysarum ferganense</i> Korsh.
<i>Hedysarum bectauatavicum</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum bectauatavicum</i> Bajtenov
<i>Hedysarum cephalotes</i> Franch.	→	<i>Hedysarum minjanense</i> Rech.f.
<i>Hedysarum krylovii</i> Sumnev. <i>Hedysarum aculeatum</i> Golosk. <i>Hedysarum lincevskyi</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum krylovii</i> Sumnev.
<i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall.	→	<i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall.
<i>Hedysarum splendens</i> Fisch. ex DC.	→	<i>Hedysarum splendens</i> Fisch. ex DC.
<i>Hedysarum jaxarticum</i> Popov	→	<i>Hedysarum jaxarticum</i> Popov
<i>Hedysarum acutifolium</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum acutifolium</i> Bajtenov
<i>Hedysarum iliense</i> B.Fedtsch. ex Popov <i>Hedysarum kandyktassicum</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum iliense</i> B.Fedtsch. ex Popov
<i>Hedysarum chantavicum</i> Popov ex Bajtenov	→	<i>Hedysarum chantavicum</i> Popov ex Bajtenov
<i>Hedysarum fedtschenkoanum</i> Regel <i>Hedysarum dshambulicum</i> Pavlov	→	<i>Hedysarum plumosum</i> Boiss. & Hausskn.
<i>Hedysarum kasteki</i> Bajtenov	→	<i>Hedysarum kasteki</i> Bajtenov
<i>Hedysarum scoparium</i> Fisch. & C.A.Mey.	→	<i>Corethrodedron scoparium</i> (Fisch. & C.A.Mey.) Fisch. & Basiner

Рисунок 1 – Казахстанские виды рода копеечник (*Hedysarum* L.)

Морфология рода копеечник характеризуется высокой степенью variability, которая отражает адаптацию видов к разнообразным экологическим зонам, от альпийских лугов до засушливых степей [15,17]. Преимущественно род состоит из многолетних трав, редко включает полукустарники [9], что отличает его от кустарниковых родов *Corethrodedron* и *Taverniera*, а также от преимущественно однолетнего рода *Sulla* [14]. По

структуре побегов растения рода *Hedysarum* встречаются от травянистых многолетников с длинными побегами (например, *H. semenowii*, *H. alpinum*, *H. flavescens*) до розеточных или полурозеточных форм (например, *H. tubericum*, *H. setigerum*) [14,20]. Кроме того, у растений рода часто образуется «каудекс» – древесное стойкое основание стебля. Копеечники, произрастающие на стабильных почвах, как правило обладают коротким и многоголовым каудексом, образующим «первобытный куст» [20]. Тогда как, виды, адаптированные к подвижным субстратам, таким как песчаные дюны и осыпи, имеют удлиненные подземные побеги, образующие ризомоподобные структуры (*H. fruticosum*, *H. theinum*) [20,21]. Корневая система у большинства копеечников представлена в виде сильного, одревесневшего стержневого корня [20,22]. Тем не менее, такие виды как *H. mackenzii* и *H. alpinum*, образуют способные к азотификации клубни [22,23].

Наличие сросшихся нижних прилистников вокруг стебля – один из важных диагностических признаков, отличающих род копеечник от рода сулла [14,24]. Верхние прилистники копеечников могут быть раздвоенными или свободными в отличие от нижних, однако у растений рода сулла, прилистники полностью свободные и приросшие к основанию черешка [14].

Растения рода *Hedysarum* обычно имеют непарноперистые листья, с супротивными листочками, что отличает их от растений *Sulla* с часто поочередно расположенными нижними листочками [14]. Текстура и жилкование листочков копеечников различаются среди разных секций. Виды секции *Hedysarum* чаще обладают перепончатыми листочками с заметными боковыми жилками, тогда как у секции *Multicaulia* они кожистые с менее выраженными боковыми жилками, адаптированными к засушливым условиям [14]. Опушение поверхности листьев варьируется в зависимости от вида и среды произрастания от гладкой до густо опушенной [25].

Соцветия копеечников часто представляются в виде удлиненных пазушных многоцветковых кистей с венчиком, опадающим после цветения [14,17]. Однако, в засушливых регионах встречаются виды как *H. alamutense*, венчик которых может сохраняться после увядания [24]. У зрелых цветков копеечника боковые стороны флага отогнуты назад, что является одной из ключевых особенностей, отличающая род *Hedysarum* от *Corethroedendron* и *Taverniera*, у которых он остается прямым. Крылья видов рода *Hedysarum* обычно узкопродолговатые, с «кормашком» в середине, который соединяется с лодочкой [14].

Плоды копеечника представляют собой бобы, отделенные на односемянные членики, которые не раскрываются и не разделяются при созревании [14]. Бобы растений секции *Hedysarum* (*H. alpinum*, *H. semenowii*) обычно гладкие, с сетчатым жилкованием и волнистыми краями, тогда как у *Multicaulia* и *Stracheya* стручки часто покрыты щетинками и шипами [14,17,24]. Семена рода *Hedysarum* имеют почкообразный вид с выступающей областью кончика корня, тогда как у рода *Sulla* она сильно заостренная [14]. Окраска оболочки семян иногда позволяет различать близкородственные виды растения [26].

1.2 Ареал распространения и среда обитания растений рода копеечник (*Hedysarum* L.)

Копеечники имеют широкий экологический диапазон среди местностей их обитания, большая часть которых расположена в умеренных и бореальных регионах Северного полушария: в Азии, Европе, Северной Африке и Северной Америке [4,15,19]. Растения адаптированы к условиям окружающей среды, варьирующейся от альпийских лугов и арктической тундры до каменистых степей, пустынь и подвижных песчаных дюн [9,14].

Недавние филогенетические и хемотаксономические исследования показывают, что внутривидовая классификация рода *Hedysarum* тесно связана с эколого-географическими различиями, разделяя род на мезофильные, ксерофильные и психрические (холодолюбивые) секции [5,13,14]. Таким образом, растения секции *Hedysarum* относятся к мезофильной группе, характеризующейся основным числом хромосом $x=7$ [9,14]. Данная секция включает такие виды, как *H. alpinum*, *H. neglectum* и *H. theinum*, которые преимущественно обитают в умеренных горных лесах, влажных субальпийских лугах и арктических регионах Евразии и Северной Америки [9,13,14]. В свою очередь, *H. flavescens* и другие желтоцветковые виды этой секции считаются первичной мезофильной группой, распространенной в высокогорьях Памир-Алайских и Тянь-Шаньских гор [9]. Кроме того, виды секции *Hedysarum* часто демонстрируют вертикальное разделение среды произрастания. В условиях Южной Сибири *H. theinum* позиционируется как высокогорный эндемик, фитоценотически адаптированный к субальпийскому и альпийскому поясам. Его произрастание зафиксировано на альпийских лугах, каменистых субстратах и полянах кедрово-широколиственных лесов в диапазоне высот от 1300 до 2000 м над уровнем моря [9,27]. Напротив, филогенетически близкий вид *H. neglectum* растет близко к лесным ассоциациям, занимая более низкие гипсометрические уровни (500–1500 м) [9]. Для *H. alpinum* характерно произрастание в избыточно увлажненных экотопах, таких как пойменные луга, прибрежные зоны рек и озер, лесные массивы, где он зачастую выступает в роли опушечного растения [17,22]. Тогда как, *H. caucasicum* является высокогорным видом, распространенным только в Кавказском регионе на высотах 1500–3000 м [9].

Секция *Multicaulia* считается ксерической группой, характеризующейся основным числом хромосом $x=8$: *H. gmelinii*, *H. varium*, *H. formosum* и другие [9,14]. Эти растения приспособлены к открытым засушливым и полувасушливым землям, степям и скалистым склонам Центральной и Западной Азии, Средиземноморья и западной части Северной Америки [5,14]. Некоторые виды секции выработали специфические жизненные формы для выживания на подвижной почве. Так, *H. fruticosum* демонстрирует фенотипическую пластичность, и на неподвижной почве растет как кустарник со стержневым корнем, но на перемещающихся песках пазушные почки, развиваются в корневища, образуя «длиннокорневищную» жизненную форму [20,28]. Аналогично, *H. laeve* использует клональную интеграцию через корневища для обмена ресурсами между побегами, повышая выживаемость в бедных питательными веществами песчаных средах [21,28].

Виды секции *Multicaulia*, так же, приспособлены к определенным типам горных пород. *H. zundukii* – эндемик западного побережья озера Байкал, образующий «подушкообразные» формы жизни на карбонатных склонах, чтобы противостоять суровым условиям местности [20]. *H. neyshaboricum* в Иране встречается только на известняковых и каменисто-глинистых субстратах сухих горных зон [29]. В свою очередь, *H. alamutense* является эндемиком Западных гор Альборз в Иране и произрастает на почвах из красного мергеля в сопровождении однолетних злаковых растений [24]. *H. orumiehense* произрастает на каменистых глинах и сухом степном субстрате [29]. В Северной Америке *H. sulphurescens* встречается на осыпях, лавинных склонах и в открытых лесах [30].

К психрической группе относится секция *Stracheya*, одним из представителей которой является вид *H. tibeticum*, приспособленный к высокогорным, холодным и засушливым условиям Тибетского плато и Гималаев [9,13,14].

Казахстанские виды рода *Hedysarum* распространены, преимущественно, в горных районах юга и юго-востока, демонстрируя адаптированность к разнообразным экологическим условиям – от альпийских лугов до меловых холмов. Основными центрами произрастания копеечников в Казахстане являются горные хребты, в частности Джунгарский Алатау, Заилийский Алатау, Кунгейский Алатау и Каратау [17,19]. Наибольшим видовым разнообразием копеечников известен Западный Тянь-Шань, где произрастает множество видов, включая *H. flavescens*, *H. dmitrievae* и *H. ferganense* [19,31]. Ареалы других видов простираются до Алтайских и Тарбагатайских гор на востоке (*H. gmelinii*, *H. splendens*), а также до северных и центральных регионов Казахстана (например, *H. alpinum* встречается в Акмолинской области, *H. bectauatavicum* – в горах Бектау-Ата) [17,19].

1.3 Химический состав растений рода копеечник (*Hedysarum* L.)

Химический состав растений рода копеечник имеет широкое разнообразие. На сегодняшний день, в различных видах рода обнаружено более 150 идентифицированных соединений (Таблица 1) [4]. Данные компоненты представляют собой, преимущественно, вторичные метаболиты, включая богатый набор флавоноидов, тритерпенов и полисахаридов, которые ответственны за фармакологическую активность растительных препаратов на основе представителей рода копеечник (например, антиоксидантную, иммунорегуляторную и противовирусную) [4,32].

Таблица 1 – Идентифицированные соединения в растениях рода копеечник (*Hedysarum* L.) согласно литературным данным

№	Наименование вида	Часть растения	Химические соединения	Ссылки
1	2	3	4	5
1.	<i>H. alpinum</i>	Листья, стебли, корни	Мангиферин, изомангиферин, гиперозид, кверцетин, кверцетин 3- α -L-арабинофуранозид, полистахозид (кверцетин 3- β -L-арабинофуранозид), ройфолин, кверцитрин	[4,9,15,19]
2.	<i>H. caucasicum</i>	Надземная часть	Мангиферин, гиперозид, кверцетин, кемпферол, сиссотрин или прунетин-4'-О-глюкозид, медикарпин-3-О-глюкозид, изокверцитрин	[33]
3.	<i>H. denticulatum</i>	Надземная часть	Мангиферин, изомангиферин, 3-гидрокси-9-метоксиптерокарпан	[4]
4.	<i>H. flavescens</i>	Надземная часть	Мангиферин, изомангиферин, глюкомангиферин, глюкоизомангиферин	[4,9,19,34]
5.	<i>H. gmelinii</i>	Корни, трава	Кверцетин 3- α -L-рамнофуранозид, кверцетин 3- α -L-арабинофуранозид, гедисарумин А, гедисарумин В, паратокарпин Е 3-гидрокси-9-метоксиптерокарпан, лупеол, соясапогенол, 3,9-дигидроксикуместан, β -ситостерол, пальмитиновая кислота, гексадекановая кислота, 2,3-дигидроксипропиловый эфир	[4]
6.	<i>H. inundatum</i>	Надземная часть	Мангиферин, изомангиферин, гиперозид, кверцетин, кверцетин 3- α -L-арабинофуранозид, полистахозид (кверцетин 3- β -L-арабинофуранозид), ройфолин, кверцитрин	[4]
7.	<i>H. kirghisorum</i>	Корни, листья, стебли	Кверцетин, кемпферол, сиссотрин или прунетин-4'-О-глюкозид, медикарпин-3-О-глюкозид, формонетин, изокверцитрин, 6"-О-ацетилононин ононин, 5,7-дигидрокси-4'-метокси-изофлавоон, сиссотрин, афрормозин, (-)-эпикатехин, (-)-эпигаллокатехин, плюмбокатехин	[4,35,36]
8.	<i>H. neglectum</i>	Корни, листья	Мангиферин, гиперозид, полистахозид, кверцетин, формонетин, кверцетин 3- α -L-рамнофуранозид, ройфолин, ононин, аспарагиновая кислота, даукостерол, β -ситостерол, сахараза	[4,9,15,19]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
9.	<i>H. polybotrys</i>	Корни	Каликозин, нарингенин, нарингин, формонетин, 4'-метокси-7-гидроксифлавоон, ононин-6''-О-малонат, ононин, формонетин, 7-О-β-D-(6''-О-малонил)-глюкопиранозид, изоликвиритигенин, (-)-медикарпин, гедисаримптерокарпен В, 3-гидрокси-9-метоксиптерокарпан, гедисаримптерокарпен С, лупеол, бетулиновая кислота, соясапонин II, метиловый эфир, соясапонин I, дегидросоясапонин I, полибосапонин А, 3,9-дигидроксикуместан, триптофан, гипафорин, даукостерол, β-ситостерол, рамноза, арабиноза, ксилоза, галактоза, глюкоза, сахароза, η-гексаксозановая кислота (цериновая кислота), η-тетракозановая кислота, триолеиновый глицерид, 5-гидрокси-2-(2-гидрокси-4-метоксифенил)-6-метоксибензофуран, 6-гидрокси-2-(2-гидрокси-4-метоксифенил)-бензофуран, цетилферулат, полиботрин, гедисалигнан А, (Е)-3-(4-гидрокси-2-метоксифенил)-пропеновая кислота, 4-гидрокси-3-метоксифениловый эфир	[4,15,19, 32,37–39]
10.	<i>H. sachalinense</i>	–	Гиперозид, полистахозид (кверцетин-3-β-L-арабинофуранозид), ройфолин	[4]
11.	<i>H. semenowii</i>	–	Ононин, формонетин, каликозин, афромозин-7-О-β-D-глюкопиранозид, каликозин-7-О-β-D-глюкопиранозид, афромозин, (-)-медикарпин, гедисаримптерокарпен В, бетулиновая кислота, гуанозин, стигмастерол, урсоловая кислота, даукостерол	[4,19]
12.	<i>H. setigerum</i>	Надземная часть, корни	Мангиферин, изорамнетин, авикулярин, небудоффицид, ройфолин, кверцетин, 3-О-метилкемпферол, кверцитрин, кемпферол-3-О-α-L-арабинофуранозид, рутин, линарин, диосмин, изорамнетин, (+)-изоларицирезинил-9'-О-β-D-глюкопиранозид, берберин, п-гидроксибензойная кислота, протокатеховая кислота	[4,40–42]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
13.	<i>H. sikkimense</i>	–	3-[4-гидроксифентил-6,7-диметокси-4Н-1-бензопиран-4-он], изоформононетин, лупеол, урсоловая кислота, докозаноовая кислота-2,3-дигидроксипропиловый эфир, β -ситостерол, сахараза, η -тетракозановая кислота	[4]
14.	<i>H. taipeicum</i>	–	Кверцетин, кемпферол, сиссотрин, медикарпин-3-О-глюкозид, изокверцитрин, β -ситостерол, сахараза, η -гексакозановая кислота (цериновая кислота), η -тетракозановая кислота, гексакозилацетат	[4]
15.	<i>H. theinum</i>	Корни	(-)-медикарпин, формонетин, 6"-О-ацетилоноин 4',6-диметокси-7-гидроксиизофлавоин, 8-гидроксидаидзеин, (-)-катехин, (-)-эпикатехин, (-)-веститол, (-)-медикарпин, протокатеховая кислота, η -тетракозановая кислота, бегеновая кислота, пальмитиновая кислота, линолевая кислота, олеиновая кислота, малиновый кетон, рододендрол	[4,15,20, 27]
16.	<i>H. vicioides</i>	–	Мангиферин, гиперозид, полистахозид (кверцетин-3- β -L-арабинофуранозид)	[4]

Флавоноиды

Наибольшую и наиболее распространенную группу вторичных метаболитов в роде *Hedysarum* составляют флавоноиды, насчитывающие около 80 различных идентифицированных соединений [4]. Они распределены по нескольким подклассам и имеют значительную хемотаксономическую ценность.

Ксантоны имеют важное хемотаксономическое диагностическое значение для секции *Hedysarum* (ранее *Obscura*) рода [4,43]. Основным соединением является мангиферин, наряду с его производными в виде изомангиферина, глюкомангиферина и глюкоизомангиферина [4]. Данные соединения идентифицированы в составе таких видов, как *H. alpinum*, *H. flavescens* и *H. neglectum* [4,9]. Необходимо отметить, что *H. alpinum* и *H. flavescens* являются основными источниками производного мангиферина – тетрагидрокси-глюкопиранозилксантена (2-С- β -D-(глюкопиранозид)-1,3,6,7-тетраоксиксанта) [43,44], действующего вещества противовирусного препарата «Алпизарин» [45,46]. Стоит отметить, что растения секции *Multicaulia*, напротив, отличаются отсутствием мангиферина в их составе [9].

Изофлавоноиды повсеместно распространены и более 30 соединений этой группы идентифицированы в растениях рода [4,47]. Ключевые соединения включают ононин, формонетин, и их гликозиды (например, формонетин-7-О- β -D-глюкозид-6"-О-малонат) (*H. polybotrys*, *H. austrosibiricum*, *H. theinum*,

H. multijugum, *H. kirghisorum* и *H. semenowii* [4,38,48]. Другие идентифицированные изофлавоны включают афрормозин, каликозин и сиссотрин, обнаруженные в составе у таких видов, как *H. multijugum*, *H. kirghisorum* и *H. semenowii* [4,36,48].

Халконы считаются характерными соединениями для копеечников секции *Multicaulia*, таких как *H. gmelinii* [4,10]. К числу выделенных халконов из представителей секции относятся изоликвиритигенин, гедисарумин А, гедисарумин В и паратокарпин Е [4,49].

Птерокарпаны – распространенные компоненты рода, встречаясь во всех трех секциях [10]. (-)-Медикарпин является основным представителем, обнаруженным в растениях рода, таких как *H. polybotrys*, *H. theinum* и *H. semenowii* [4,27]. Кроме того, (-)-веститол был выделен из *H. theinum* [27], тогда как деметилгедисаримптерокарпен А, гедисаримптерокарпен А, гедисаримптерокарпен В и гедисаримптерокарпен С идентифицированы в составе *H. multijugum* [4,50].

В составе растений рода копеечник, также, встречаются более 20 видов флавонов и флавононов. Эта группа включает кверцетин, кемпферол, рутин, гиперозид, изокверцитрин, апигенин, лютеолин, нарциссин, кверцитрин и нарингин [4,42]. Наиболее широко распространены кверцетин (*H. alpinum*, *H. austrosibiricum*, *H. caucasicum*, *H. aericeum*, *H. setigerum* и *H. connatum*), гиперозид (*H. alpinum*, *H. caucasicum*, *H. aericeum*, *H. connatum*, *H. komarovii*, *H. sachalinense*, *H. neglectum*) и полистахозид (*H. alpinum*, *H. connatum*, *H. komarovii*, *H. sachalinense*, *H. neglectum*) [4,42,44].

Тритерпены и сапонины

Тритерпеноиды и их гликозиды (сапонины) являются важными компонентами в составе копеечников, особенно как хемотаксономические маркеры *H. polybotrys* [4,38]. К идентифицированным сапонидам данного вида относятся соясапонин I, соясапонин II и дегидросоясапонин I [38]. Такие соединения, как лупеол, бетулиновая кислота, урсоловая кислота и соясапогенол, были выделены из различных видов, включая *H. polybotrys*, *H. multijugum* и *H. scorarium* [4].

Кумарины и бензофураны

Данные соединения в основном встречаются в кустарниковых видах рода *Hedysarum*. К примеру, гедисаримкуместан А-Н, ауреол, гедисаримбензофуран А, гедисаримбензофуран В и эбенфуран II идентифицированы в составе *H. multijugum*, 5-гидрокси-2-(2-гидрокси-4-метоксифенил)-6-метоксибензофуран и 6-гидрокси-2-(2-гидрокси-4-метоксифенил)-бензофуран – в составе *H. polybotrys*, а 3,9-дигидроксикуместан – в составе *H. gmelinii* [4,10].

Полисахариды

Полисахариды являются основными биологически активными компонентами корней растений рода копеечник. Эта группа соединений ответственна за противодиабетическое и иммуномодулирующее действие фармакопейного вида *H. polybotrys* [4,7,32,51]. Среди полисахаридов выделенных из *H. polybotrys* охарактеризовано несколько гетерополисахаридов, таких как различные фракции *Hedysarum Polysaccharide 1*, *Hedysarum*

Polysaccharide 2, *Hedysarum* Polysaccharide 3, *Hedysarum* Polysaccharide 4, состоящий из рамнозы, арабинозы, глюкозы, галактозы и ксилозы [32].

Азотистые соединения

В составе корней *H. polybotrys* идентифицирована непротеиновая аминокислота γ -аминомасляная кислота (ГАМК), с которой связана гипотензивная активность средства восточной медицины «ōgi» [39]. Алколоиды в копеечниках обнаружены только в следовых количествах [52]. В ряде видов обнаружено наличие алкалоидов, таких как берберин (*H. setigerum*), гипафорин (*H. polybotrys*), а из аминокислот – триптофан (*H. polybotrys*) и аспарагиновая кислота (*H. austrosibiricum*) [4,41].

Фенолы и простые ароматические соединения

Из корней *H. theinum* были выделены малиновый кетон (4-(4-гидроксифенил)-бутан-2-он) и рододендрол [4,27]. Кроме того, из корней *H. neglectum* выделены фенольные соединения, включающие галловую кислоту, протокатеховую кислоту, хлорогеновую кислоту и кофейную кислоту [53].

Жирные кислоты и стеролы

Корни *H. theinum* содержат жирные кислоты, такие как пальмитиновая, линолевая, олеиновая, бегеновая и лигноцериновая кислоты [27], тогда как *H. polybotrys* содержит цериновую и тетракозановую кислоты [4]. Из ряда стеролов, в составе *H. polybotrys* встречаются β -ситостерол и даукостерол, а в *H. scorarium* – 7α -гидроксиситостерол, 7β -гидроксиситостерол, даукостерол, β -ситостерол [4,40].

Прочие соединения

Лигнаны сирингарезинол и изоларицирезинил-9'-О- β -D-глюкопиранозид были идентифицированы в *H. polybotrys* и *H. setigerum*, соответственно [4]. Из *H. polybotrys* было выделено новое полигидроксильное соединение, названное полиботрин [37]. Кроме того, с растений рода выделены ряд углеводов: моносахариды – глюкоза, галактоза, рамноза, арабиноза и ксилоза, а также дисахарид – сахароза (*H. polybotrys*, *H. sikkimense*, *H. austrosibiricum*, *H. taipeicum*) [4].

1.4 Фармакологическая активность растений рода копеечник (*Hedysarum* L.) и их применение в практике

Представители рода *Hedysarum* обладают значительным терапевтическим потенциалом, являясь источниками исходного сырья для производства лекарственных средств [4,54]. Биологическая активность растений рода в значительной степени обусловлена фитохимическим составом, включающим флавоноиды, ксантоны, птерокарпаны и полисахариды [4,32].

Традиционная медицина

Род *Hedysarum* L. (*Fabaceae*) представляет собой группу богатую на виды лекарственных растений с долгой историей применения в традиционной китайской медицине (ТКМ) и сибирской народной медицине [4,10].

Высушенные корни *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz., также известные как «Хунцзи» (Hongqi) (*Radix Hedysari*), являются одними из основных тонизирующих средств в ТКМ. Он часто рассматривается как заменитель или

даже превосходящий по действию корень астрагала – *Astragalus membranaceus* (хуанцзи (Huangqi)) по некоторым данным [4,10]. Он включен в Китайскую и Японскую фармакопеи и используется для укрепления жизненной энергии – «Ци», стимуляции регенерации тканей, увеличению диуреза и содействия послеродовому восстановлению [4,55]. Хотя *Radix Hedysari* часто считают примесью астрагала, он особенно известен своими свойствами рассеивать отеки при наружном применении на Тайване [56]. Другие виды копеечника, такие как *H. limprichtii*, *H. vicioides* var. *taipeicum* и *H. smithianum*, также используются в ТКМ для восполнения энергии [4]. В монгольской традиционной медицине представители вида *H. sikkimense* находят применение в качестве противоотечного средства при патологиях различного генеза [57].

Hedysarum theinum Krasnob. и *Hedysarum neglectum* Ledeb. широко известны в Алтайском регионе как «красный корень» или «медвежий корень» [19,27]. Представители данных таксонов обладают доказанным стимулирующим действием, в связи с чем они востребованы в лечении урогенитальных расстройств, восстановлении мужской репродуктивной функции и терапии сосудистых патологий [19,27]. Кроме того, их отвары характеризуются общеукрепляющими и противовоспалительными свойствами, демонстрируя эффективность при поражениях респираторной системы и пищеварительного тракта [27].

Противовирусное действие

Одним из наиболее значимых применений растений рода *Hedysarum* в официальной медицине является разработка противовирусных препаратов на основе их ксантонов. Виды секции *Hedysarum*, в частности *H. alpinum* и *H. flavescens*, накапливают высокие концентрации мангиферина [19,33]. Мангиферин, извлеченный из этих видов, является активным веществом в российском фармацевтическом препарате «Алпизарин» [19]. Этот препарат демонстрирует высокую эффективность против ДНК-содержащих вирусов, включая вирус простого герпеса, вирус ветряной оспы и цитомегаловирус [33]. Кроме того, экстракты *H. alpinum* демонстрируют избирательное ингибирование подтипов вируса гриппа человека H3N2 и птичьего гриппа H5N1 [19].

Антибактериальное действие

Антибактериальные свойства копеечников часто коррелируют с содержанием флавоноидов и ксантонов. Водные экстракты корневищ *H. grandiflorum* продемонстрировали ингибирующую активность против роста *Escherichia coli* и *Bacillus cereus*, хотя общий эффект описывается как слабый [19,58]. Экстракты из корней *H. neglectum* проявляют антагонистическую активность против патогенных и условно патогенных бактериальных штаммов [15]. Известно, что препарат «Алпизарин», получаемый из мангиферина, оказывает бактериостатическое действие как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии, а также на *Mycobacterium tuberculosis* [4].

Иммуномодулирующее действие

Полисахариды, выделенные из *H. polybotrys* (HPS), оказывают значительное иммунорегуляторное действие, сравнимое с полисахаридами астрагала. Они усиливают фагоцитоз макрофагов, корректируют

иммуносупрессию, вызванную циклофосфамидом, и способствуют трансформации лимфоцитов [4,32]. Экстракты *H. neglectum* демонстрируют значительную иммуностимулирующую активность, увеличивая общий уровень иммуноглобулина Y (IgY) в четыре раза в экспериментах на животных, превосходя по этому показателю мумие и гинкго билоба [19].

Антипролиферативное действие

Флавоноиды, выделенные из *H. polybotrys*, время- и дозозависимо ингибируют пролиферацию клеток человеческой эритролейкемии (K562). Возможный механизм заключается в снижении экспрессии онкогена $p21^{Ras}$ и пролиферирующего клеточного ядерного антигена (PCNA) [55]. В свою очередь, полисахариды (HPS1) из *H. polybotrys* ингибируют пролиферацию клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HEP-G2) и рака желудка (MGC-803) [4,32]. Кроме того, пренилированные халконы из *H. gmelinii* демонстрируют умеренную антипролиферативную активность против различных линий клеток рака человека [19,59].

Метаболическая регуляция

Полисахариды *H. polybotrys* (в частности, фракция HPS3) проявляют мощный гипогликемический эффект, который, как сообщается, превосходит действие метформина в моделях диабетических мышей. HPS3 улучшает резистентность к инсулину, способствует усвоению глюкозы и подавляет глюконеогенез [4].

Кверцетин, выделенный из культур волосистых корней *H. neglectum*, продемонстрировал антиатеросклеротический потенциал в моделях *Caenorhabditis elegans*. Он увеличил экспрессию гена СОД-3 (супероксиддисмутаза) в 12,5 раз, тем самым повышая устойчивость к окислительному стрессу и уменьшая накопление липидных включений [53].

В свою очередь, имеются более ранние исследования, которые выявили, что ГАМК является основным компонентом корней *H. polybotrys*, ответственным за гипотензивное (снижающее артериальное давление) действие [39].

Антиоксидантное действие

Виды рода *Hedysarum* богаты полифенолами, которые нейтрализуют свободные радикалы. Экстракты *H. austrosibiricum* снижают содержание малонового диальдегида (МДА) и повышают активность СОД у стареющих мышей [4]. Экстракты корня *H. neglectum* обладают геронтопротекторным потенциалом, сравнимым с женьшенем (*Panax ginseng*) [60]. Полисахариды *H. polybotrys* эффективно удаляют супероксидные анионы и гидроксильные радикалы [4,32]. Обладая способностью деактивировать гидроксильные радикалы и повышать активность глутатионпероксидазы и СОД, данные полисахариды обеспечивают выраженную резистентность к окислительному стрессу как *in vivo*, так и в *in vitro* исследованиях [4,32].

Нейропротективное действие

Согласно исследованиям, полисахариды *H. polybotrys* показали активность, способствующую регенерации периферических нервов. В моделях на крысах с пережатыми седалищными нервами введение HPS улучшило

скорость проведения нервных импульсов и количество миелинизированных нервных волокон [4]. Нейропротекторный потенциал HPS связан с их способностью блокировать апоптотические пути, запускаемые амилоидными пептидами. В частности, на клеточных моделях нейробластомы человека линии SH-SY5Y было подтверждено, что HPS и их селенированные производные (Se-HPS3) защищают нейроны от окислительной деструкции [32,61].

Практическое применение растений рода копеечник

Виды рода *Hedysarum* имеют широкий спектр практического применения в медицине, косметологии и пищевой промышленности. Различные виды копеечников и извлеченные из них соединения применяются для лечения и контроля различных заболеваний: снижение уровня сахара в крови, когнитивных функций и болезнь Альцгеймера, вирусные заболевания, снижение иммунитета [4,19,32].

Известно, что полисахариды, извлеченные из *Hedysarum*, доказанно снижают уровень сахара в крови и используются в составе фитокомпозиций для лечения диабета [32,62,63]. Полисахариды из корней *H. polybotrys* используются в фармацевтических препаратах для улучшения когнитивных функций и лечения болезни Альцгеймера. Они действуют как нейропротекторы, повышая выживаемость определенных клеток и увеличивая уровень моноаминовых нейромедиаторов головного мозга, таких как серотонин, дофамин и норадреналин [32,64]. Модифицированные полисахариды *Hedysarum* используются в лекарственных препаратах для обеспечения антиоксидантного и геропротекторного действия, повышения иммунитета и защиты от остеопороза, фиброза печени и язвы желудка [62]. Листья и трава *H. alpinum* и *H. flavescens* являются источниками мангиферина, биологически активного соединения, обладающего выраженными противовирусными свойствами [19,33,65] и используемого в производстве лекарственного препарата «Алпизарин» [19]. Экстракты из корней *H. neglectum* и *H. theinum* используются для создания лекарственных фитопрепаратов с оптимизированной общеукрепляющей и противовоспалительной активностью [66].

В косметологии *Hedysarum* используется в косметике и средствах для местного применения для осветления и увлажнения кожи. Так, экстракт корня *H. austrosibiricus* является ключевым активным ингредиентом в отбеливающих лосьонах [67]. Данный экстракт показал антиоксидантное и ингибирующее тирозиназу свойства, эффективно предотвращая появление шероховатости кожи и морщин, а также придавая ей блеск [4,67].

При употреблении в составе диетотерапевтического питания *H. polybotrys* известен своей способностью стимулировать выработку телесных жидкостей и «украшать» кожу. *H. polybotrys* сочетается с другими травами (такими как *Anoectochilus* и *Angelica sinensis*) для создания средств, направленных на регуляцию женской физиологии. Этот продукт помогает охлаждать кровь, успокаивать печень, выводить влагу, детоксицировать и регулировать эндокринную систему. Модифицированные полисахариды *Hedysarum* используются в различных форматах продуктов для здоровья, включая сиропы, гранулы, порошки, таблетки и лечебные вина, предназначенные для улучшения

общего состояния здоровья, замедления старения и укрепления иммунитета.

H. polybotrys широко известен в восточной диетотерапии как средство, способствующее поддержанию водного баланса и регенерации дермы. Комбинированные препараты на его основе с добавлением *Anoectochilus* и *Angelica sinensis*, традиционно назначаются для коррекции физиологического статуса у женщин. Терапевтический эффект растения связывают с его антиоксидантными и гепатопротекторными свойствами [32,68]. Экстрагированные полисахариды копеечника служат основой для широкого спектра оздоровительных продуктов – от порошков и таблеток до традиционных настоек, направленных на замедление процессов старения и активацию иммунного ответа [32,68,69].

1.5 Копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) как объект исследования

Hedysarum semenowii Regel & Herder является эндемиком Центрального Тянь-Шань [19], таксономически относится к секции *Hedysarum*, которая представляет собой мезофильную линию рода [13,14]. Вид имеет ряд синонимов в связи с таксономической ревизией рода, согласно которой объединяет следующие наименования: *Hedysarum brotherusi* Freyn, *Hedysarum cymbostegium* Freyn, *Hedysarum flavum* Rupr., *Hedysarum junatovii* Yakovlev, *Hedysarum kungeicum* Bajtenov, Muchtub. [12].

H. semenowii – многолетнее травянистое растение, достигающее высоты до одного метра. Имеет утолщенные корни и прямостоячие стебли с листьями в количестве достигающим десяти, состоящими из округлых листочков. Морфологически отличается от многих родственных видов желтыми венчиками, обычно ассоциируемые с ксерофитной секцией *Multicaulia* [17,19].

В основном *H. semenowii* распространен в центральных районах гор Тянь-Шань, расположенных на территории Казахстана, Киргизии и Китая (Рисунок 2) [12]. В Казахстане встречается на травянистых склонах и в еловых лесных поясах Джунгарского Алатау, Заилийского Алатау и Кунгейского Алатау [17].

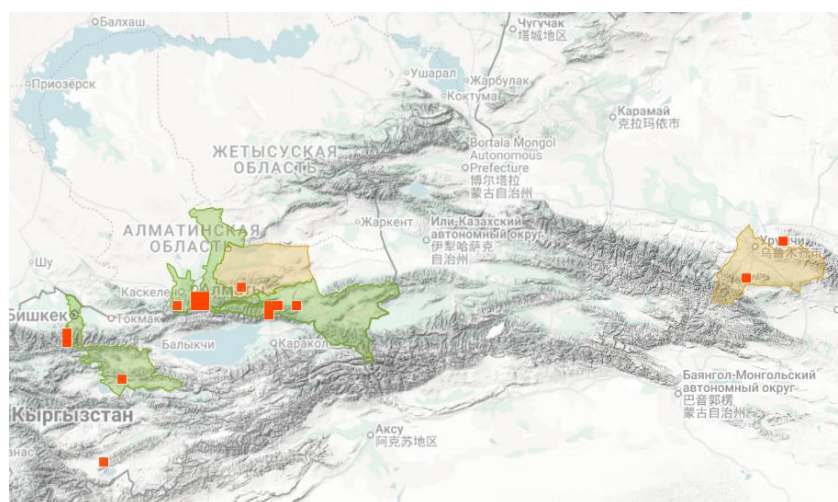


Рисунок 2 – Ареал распространения *Hedysarum semenowii* Regel & Herder

Важным открытием в литературе является тесная генетическая и химическая связь между *H. semenowii* и *H. polybotrys* (фармакопейный вид в Китайской и Японской фармакопеях) [5,19]. Молекулярный анализ, основанный на ядерных и пластидных последовательностях, определяет *H. semenowii* и *H. polybotrys* как сестринские таксоны в рамках подсекции (группа В) секции *Hedysarum*. Эта тесная эволюционная связь предполагает высокую вероятность общих метаболических путей и профилей биологической активности [5,13].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) показывает, что *H. semenowii* имеет те же первичные и вторичные метаболиты, что и *H. polybotrys*. Ключевые идентифицированные соединения включают: изофлавоноиды – ононин, формонетин, каликозин и афрормозин; птерокарпаны – (-)-медикарпин и гедисаримптерокарпен В; тритерпены – бетулиновую кислоту и стигмастерол; нуклеозиды: гуанозин [4,10,19].

H. semenowii может быть альтернативным источником для фармацевтических препаратов, обычно получаемых из *H. polybotrys*, широко используемого в ТКМ для иммуномодуляции, омоложения и лечения диабета [4]. В отличие от многих редких эндемиков, *H. semenowii*, согласно литературе, имеет достаточное количество биомассы в своих естественных местообитаниях для потенциального сбора урожая или выращивания для фармацевтического применения [17,19]. Исследования в банках семян в Кыргызстане показывают, что *H. semenowii* обладает высокой всхожестью (до 97%), что делает его перспективным кандидатом для внедрения в сельскохозяйственные культуры или биотехнологические системы размножения [70].

Несмотря на многообещающие химические и филогенетические данные, существует значительный пробел в функциональной и клинической характеристике *H. semenowii*. Хотя копеечник Семенова признан потенциальным лекарственным растением, подробные фармакогностические стандарты и фармакологическая активность для данного конкретного вида остаются неустановленными в научной литературе, что является серьезным препятствием для его включения в официальные фармакопеи.

Выводы по первой главе

В первой главе представлен обзор современной научно-специализированной литературы, посвященной таксономическому статусу, географическому распространению, фитохимическому составу и фармакотерапевтическому потенциалу представителей рода *Hedysarum* L. На основании проведенного анализа сформулировано научно-теоретическое обоснование выбора копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) в качестве приоритетного объекта фармакогностического изучения.

Анализ литературных данных позволяет сделать ряд ключевых выводов, формирующих научную базу работы. В первую очередь, род *Hedysarum* характеризуется сложной таксономией и широкой экологической пластичностью, объединяя растения, адаптированные к самым разнообразным условиям от альпийских лугов до засушливых степей. Во-вторых, фитохимический профиль рода отличается высоким разнообразием вторичных метаболитов. На сегодняшний день идентифицировано более 150 соединений, среди которых доминируют флавоноиды (включая изофлавоноиды и птерокарпаны), ксантоны, тритерпены и полисахариды. Эти соединения имеют важное хемотаксономическое значение; например, наличие ксантона мангиферина является отличительным маркером секции *Hedysarum*. Кроме того, накопление данных биологически активных веществ обуславливает значительный терапевтический потенциал копеечников, которые обладают доказанным противовирусным, антибактериальным, иммуномодулирующим, антиоксидантным и антипролиферативным действием, что активно используется как в традиционной, так и в официальной медицине (например, препарат «Алпизарин»).

Основываясь на проанализированной литературе, акцент на изучении *Hedysarum semenowii* обусловлен сочетанием его нереализованного фармацевтического потенциала, генетических характеристик и пробелов в существующей доказательной базе.

Согласно молекулярно-генетическим данным (ядерное и пластидное секвенирование), *H. semenowii* и *H. polybotrys* являются сестринскими таксонами. *H. polybotrys* – это фармакопейный вид, широко применяемый в традиционной китайской и японской медицине для иммуномодуляции, лечения диабета и в качестве геропротекторного средства. Высокоэффективная жидкостная хроматография подтверждает, что копеечник Семенова синтезирует идентичные первичные и вторичные метаболиты, включая такие ключевые изофлавоноиды и птерокарпаны, как ононин, формонетин, каликозин и (-)-медикарпин. Это делает *H. semenowii* крайне перспективным альтернативным источником биологически активных веществ.

В отличие от многих редких растений, *H. semenowii*, являясь эндемиком Центрального и Китайского Тянь-Шаня, обладает значительными сырьевыми запасами биомассы в своих естественных местообитаниях согласно литературным данным. На сегодняшний день этот вид используется преимущественно как кормовая культура для крупного рогатого скота. Однако предварительные исследования семенного фонда показывают крайне высокую

всхожесть семян данного вида (до 97%), что делает его отличным кандидатом для планомерного культивирования, биотехнологического размножения и создания отечественной сырьевой базы фармацевтических субстанций без ущерба для природных популяций.

Несмотря на многообещающий химический профиль и филогенетическую близость к признанным лекарственным растениям, в современной науке отсутствуют подробные фармакогностические стандарты качества, показатели чистоты и достоверные данные о биологической активности и профиле безопасности копеечника Семенова.

Таким образом, всестороннее изучение *H. semenowii* является актуальным направлением, обладающим фундаментальной новизной и практической значимостью. Восполнение существующих пробелов в биологической и химической характеристике копеечника Семенова позволяет рассматривать его как перспективный источник для расширения номенклатуры отечественного лекарственного растительного сырья (ЛРС) фармакопейного качества и создания новых растительных фармацевтических продуктов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

Объекты комплексного фармакогностического изучения: растительное сырье и гербарные образцы надземной и подземной частей копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), собранные из естественных мест произрастания в Республике Казахстан для научно-исследовательских целей.

Сбор растительного сырья *H. semenowii* проводился в ходе экспедиционных выездов в 2023 и 2024 г. на территории хребта Кунгей Алатау (Кегенский район Алматинской области). Надземная часть была отобрана в фазу массового цветения (июль) в пределах высокогорного пояса на высоте 1748 м над уровнем моря (Рисунок 3). Сбор подземных органов осуществлялся в той же локации в осеннее время, по завершении периода плодоношения. Верификация таксономической принадлежности и ботаническая идентификация образцов были подтверждены ведущими специалистами РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» Комитет лесного хозяйства и животного мира Министерства экологии и природных ресурсов РК (Справка № 01-05/218, Приложение Ц).



Рисунок 3 – Место сбора материалов исследования *Hedysarum semenowii* Regel & Herder (географические координаты: N – 43°00'18", E – 78°22'58.6")

Реактивы и стандартные образцы

В ходе исследований были использованы следующие реактивы, растворители и стандартные образцы:

- ацетонитрил для ВЭЖХ (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Германия);
- ацетонитрил для масс-спектрометрического анализа (LC-MS grade, J.T. Baker, Германия);
- муравьиная кислота для ВЭЖХ (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Германия);
- муравьиная кислота для масс-спектрометрического анализа (LC-MS grade, J.T. Baker, Германия);
- вода для масс-спектрометрического анализа (LC-MS grade, J.T. Baker,

Германия);

- стандартный образец мангиферин (чистота >93 %, ChromaDex Inc., США);
- метанол 99,8 % (химически чистый (х.ч.), Avantor Performance Materials, Польша);
- β-циклодекстрина (х.ч., Fluka, Германия);
- стандартная смесь аминокислот LAA-21 (Sigma-Aldrich, США);
- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) (чистый для анализа, Sigma Aldrich, Германия).

2.2. Методы исследования

Получение извлечений

В целях извлечения широкого спектра вторичных метаболитов было получено восемь видов экстрактов *H. semenowii* (Таблица 2). Экстракты были получены измельчением (2-5 мм) 30 г растительного сырья и экстракции с использованием безводного метанола, 70% метанола и 50% метанола. Этот процесс включал мацерацию при комнатной температуре с тремя циклами ультразвуковой обработки при частоте 40 кГц по 30 минут каждый раз с добавлением свежей порции экстрагента в соотношении 1:10 (в/о). После чего все экстракты были концентрированы роторным испарителем при температуре не выше 50°C (не менее 70 % сухого остатка по массе) [43].

Также, были получены экстракты копеечника Семенова травы и корней с использованием 50 % этанола [52,71] мацерацией при комнатной температуре и трехкратной ультразвуковой обработкой короткими импульсами по 5 минут при частоте 45 кГц для применения в токсикологических испытаниях. Сгущение полученных жидких экстрактов проводили на роторном испарителе, отгонкой растворителя до густого экстракта. Далее полученный остаток подвергали лиофильной сушке при температуре -50 °С в течение 24 ч, до получения сухого экстракта исследуемого сырья (с сухим остатком не менее 95 %) лишенного следов этанола. Для внутрижелудочного введения экспериментальным животным в токсикологических испытаниях использовались водные растворы, приготовленные из полученного сухого лиофилизата и очищенной воды для исключения искажения данных из-за влияния спирта.

Таблица 2 – Условное обозначение экстрактов *Hedysarum semenowii*

№	Обозначение	Растительное сырье	Экстрагент
1.	Hs M99	Трава	99,8 % метанол
2.	Hs M70		70 % метанол
3.	Hs M50		50 % метанол
4.	HsR M99	Корни	99,8 % метанол
5.	HsR M70		70 % метанол
6.	HsR M50		50 % метанол
7.	Hs Et50	Трава	50 % этанол
8.	HsR Et50	Корни	50 % этанол

2.2.1 Фармакогностические и ресурсоведческие методы

Макроскопия

Макроскопическое исследование цельных травы и корней *H. semenowii* проводилось согласно требованиям одобренного проекта монографии 4 части 1 тома Фармакопеи ЕАЭС «Макроскопическое исследование лекарственного растительного сырья» [72]. Макроскопия травы (стеблей, листьев, цветков и незрелых плодов) и корней включала в себя определение размеров, формы, характеристик поверхности, строения и органолептических показателей (цвет, запах). Снимки гербарных образцов осуществлялись на микроскопе с дистанционным управлением Levenhuk DTX RC3 (Китай).

Измерения в ходе макроскопических исследований осуществляли в 15 повторениях. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи функции анализа данных программного обеспечения Microsoft Excel с расчетом средних, стандартных отклонений и стандартных ошибок.

Микроскопия

Анатомические срезы объектов исследования фиксировали в 45 % спирте. Поперечные срезы замораживали в гистологическом парафине [73] с использованием заливочных форм размером 15×15 мм. Получение серийных поперечных срезов толщиной 40 мкм осуществляли на ротационном полуавтоматическом микротоме (MEDITE M530). Микроскопический анализ подготовленных препаратов проводили при помощи микроскопа Levenhuk, Zoom&Joy (Китай). Визуализация и цифровая фотофиксация выполнялась камерой Levenhuk D740T (5.1 Мп). Последующая обработка биометрических данных в специализированном программном обеспечении LevenhukLite.

Оценка ресурсов

Ресурсное обследование запасов копеечника Семенова проводили маршрутно-рекогносцировочным способом, в соответствии с методами определения запасов лекарственных растений [74]. Экспедиционные выезды с целью установления сырьевой базы надземных органов копеечника Семенова были локализованы в трех ущельях северного макросклона Кунгей Алатау (территория Государственного национального парка «Көльсай Көлдері»), в фазе цветения. При проведении инвентаризации и описании растительных ассоциаций с участием *H. semenowii* авторы опирались на общепринятые методики классического геоботанического обследования.

2.2.2 Химические и физико-химические методы

Реакции идентификации

Первичная идентификация основных групп биологически активных веществ (БАВ) в надземных и подземных органах копеечника Семенова проводилась качественным фитохимическим скринингом согласно общепринятым фармакогностическим методикам. Качественный анализ флавоноидов проводили в спиртовых извлечениях с использованием

цианидиновой пробы (проба Шинода), где к экстракту добавляют металлический магний и концентрированную хлористоводородную кислоту. Анализ остальных групп соединений выполняли на базе водных вытяжек различной концентрации. Так, наличие сапонинов устанавливали по характерному пенообразованию при интенсивном встряхивании водного извлечения (1:10), предварительно нагретого в течение 10 минут. Из аналогичного экстракта, после его охлаждения и фильтрования, выделяли водорастворимый полисахаридный комплекс: для этого к 10 мл полученного фильтрата приливали трехкратный объем (30 мл) 95%-ного этанола. Для детекции кумаринов применяли водную вытяжку в соотношении 1:20, внося несколько капель 1%-ного спиртового раствора хлорида железа в 1 мл исследуемой пробы. В свою очередь, присутствие дубильных веществ подтверждали реакцией водного извлечения 1:100 с 1%-ным раствором сульфата железа (III)-аммония [75,76].

Методы количественного определения

Содержание флавоноидов в надземной и подземной частях копеечника Семенова определяли методом спектрофотометрии, расчетом в процентах на абсолютно сухое сырье в пересчете на рутин [77,78].

Определение содержания сапонинов проводили с использованием колориметрической методики, основанной на реакции с п-диметиламинобензальдегидом [77].

Количественное определение суммы кумаринов в сырье копеечника Семенова проводили методом УФ-спектрофотометрии [79].

Оценку содержания дубильных веществ проводили методом перманганатометрического титрования [76,77].

Содержание полисахаридов определяли гравиметрическим методом, основанным на осаждении спиртом [77].

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией высокого разрешения (RP-LC/DAD/ESI-QToF/MS/MS)

Анализ фитохимического состава *H. semenowii* проводили методом tandemной масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией на базе оборудования компании Agilent Technologies (США). Использовали хроматограф Agilent 1260 Infinity, сопряженный с времяпролетным масс-анализатором гибридного типа 6530B Accurate Mass QTOF/MS. Ионизация электрораспылением (ESI) использовалась в качестве метода мягкой ионизации в положительном и отрицательном режимах. Хроматографическое разделение компонентов экстракта проводили на узкой аналитической колонке Zorbax SB-C18 (2,1×150 мм, $d_p = 3,5$ мкм). Для разделения использовали следующую программу градиентного элюирования, состоящей из 0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (В) (об/об) и 0,1 % муравьиной кислоты в воде (А): 0/10; 13/25; 15/95; изократический режим при 95 % от 15 до 20 мин и обратно до 10 % за 25 мин/% В в А. Общее время анализа составило 70 мин. Время последующей регенерации колонки – 12 мин. Элюирование образцов проводили при постоянном расходе подвижной фазы

0,2 мл/мин, при этом объем инъекции для каждой анализируемой пробы составлял 10 мкл [43]. Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось в оптимизированном режиме со следующими инструментальными настройками: давление в небулайзере поддерживалось на уровне 35 psig при температуре осушающего газа 275 °С. Рабочие характеристики детектирования также определялись значениями напряжения на капилляре (4000 В), скиммере (65 В) и октополе (RF Peak, 750 В) при фиксированной энергии фрагментации (140 В) [71].

Детектирование осуществлялось в диапазоне сканирования 100-1000 m/z. В режиме тандемной масс-спектрометрии проводили одновременную фрагментацию двух наиболее интенсивных сигналов молекулярных ионов. Энергия диссоциации, индуцированной соударением (CID), варьировалась в значениях ± 20 и 40 эВ [43,71].

Сбор и обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения MassHunter. Идентификация соединений основывалась на совокупности следующих данных: время удерживания (t_R), характеристика УФ-спектров, анализ схем фрагментации молекулярных ионов. Полученные MS/MS-спектры сравнивали с литературными источниками и общедоступными специализированными базами данных, которые включали Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) и HMDB (<https://hmdb.ca>) [43,71,80,81].

Определение аминокислотного состава методом капиллярного электрофореза

Определение количественного содержания аминокислот в исследуемом сырье проводили методом капиллярного электрофореза на системе «Капель-105М» (Lumex, Россия). Принцип методики заключался в предварительном высвобождении аминокислот путем кислотного или щелочного гидролиза с последующим получением фенилизотиокарбамильных производных (ФТК-производных). Электрофоретическое разделение и детекцию полученных соединений осуществляли при длине волны 254 нм в УФ-диапазоне. Сбор и математическую обработку аналитических сигналов выполняли в программной среде «Эльфوران» [82].

Условия анализа включали использование кварцевого капилляра ($L_{\text{eff}}/L_{\text{total}} = 65/75$ см, $d_p = 50$ мкм) и рабочего буферного раствора на основе β -циклодекстрина (Fluka, Германия). Процесс проводили при напряжении +25 кВ и температуре +30 °С. Ввод пробы осуществлялся под давлением 50 мбар. Расчет концентраций производили методом абсолютной градуировки с использованием стандартной смеси аминокислот LAA-21 (Sigma-Aldrich, США) [82].

Этап пробоподготовки базировался на кислотном гидролизе 100 мг сухого экстракта в 10 мл разбавленного (1:1) раствора хлористоводородной кислоты. Процесс гидролиза осуществлялся в изолированных пробирках путем нагревания в сушильном шкафу (110 °С) в течение 14–16 часов. Завершающим этапом гидролиза являлось охлаждение и фильтрация реакционной среды.

Синтез фенилизотиокарбамильных производных проводили на базе 50 мкл

полученного гидролизата. Указанный объем доводили до сухого состояния под струей теплого воздуха в 10-15 мл стеклянных флаконах. Дальнейшая обработка сухого остатка включала последовательное внесение 0,15 мл 0,1 М карбоната натрия и 0,3 мл раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Обязательным условием являлось интенсивное гомогенизирование смеси до оптической прозрачности. Время выдержки герметизированных образцов составило 35 минут при комнатной температуре. После окончательного упаривания растворителей в потоке воздуха, дериваты экстрагировали 0,5 мл дистиллированной воды для передачи на анализ.

Растворы, приготовленные для анализа, помещали в пробирки Эппендорфа и центрифугировали в течение 5 минут при скорости вращения 5000 об/мин.

Капилляр прибора подготавливали и промывали ведущим электролитным раствором, состоящим из фосфатного буфера с концентрацией фосфат-ионов 30 ммоль/л и β -циклодекстрина 4 ммоль/л.

Анализ проводился в трехкратной повторности. Для каждого приготовленного раствора записывали не менее двух электрофореграмм в соответствующих условиях. По окончании анализа проверяли правильность автоматической маркировки пиков. Компоненты в образце были идентифицированы с помощью программного обеспечения Капель-105М (Lumex, Россия) [82]. Переход от измеренной концентрации аминокислот (мг/л) к массовой доле (в процентах) осуществлялся расчетным путем с учетом точной навески анализируемого сырья и конечного объема разведения пробы. Следует отметить методологическое ограничение: поскольку пробоподготовка проводилась методом стандартного кислотного гидролиза (110 °С, 14-16 часов) без предварительного окисления надмуравьиной кислотой, количественные данные по содержанию метионина могут быть несколько занижены вследствие его частичного окисления, а триптофан в данных условиях разрушается.

Определение жирнокислотного состава методом газовой хроматографии

50,0 г измельченного растительного сырья *H. semenowii* помещали в стакан объемом 250 мл. Затем добавляли 150 мл гексана, осторожно перемешивали блендером на максимальной скорости в течение 1 мин или гомогенизировали в течение 3-5 мин при частоте вращения лопастей от 2000 до 5000 мин⁻¹. Гексановый слой с растворенным в нем липидным комплексом отделяли и переносили в круглодонную колбу объемом 250 мл. Колба соединялась с роторным испарителем, и растворитель полностью отгоняли при температуре 50 °С. Выделенную липидную фракцию подвергали трансэтерификации для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Для этого образец термостатировали в сушильном шкафу при температуре 40–45 °С до достижения полного расслоения фаз. Верхний липидный слой декантировали, очищали путем фильтрования и гомогенизировали. Навеску очищенного жира массой 0,1 г растворяли в 2,0 мл гексана, после чего в реакционную смесь вводили 0,1 мл раствора метилата натрия в метаноле (2 моль/л). Полученную смесь отстаивали в течение 5 мин после интенсивного перемешивания (2 мин). Верхний

гексановый слой, содержащий целевые МЭЖК, подвергали фильтрации. Хроматографический анализ метиловых эфиров жирных кислот стандартной смеси и образца проводили в идентичных условиях с использованием газового хроматографа Кристалиюкс-4000М (Россия). С помощью микрошприца вводили от 0,1 до 2 мкл раствора метилового эфира жирной кислоты. Идентификацию компонентов проводили по времени удерживания относительно стандартной смеси. Состав метиловых эфиров жирных кислот рассчитывали методом внутренней нормализации с использованием программного обеспечения хроматографа NetChrom [83,84], результаты количественного содержания выражали в процентах от суммы площадей пиков.

Определение содержания аскорбиновой кислоты титриметрическим методом

Содержание аскорбиновой кислоты (витамина С) в составе растительного сырья определяли согласно методике титриметрического анализа, описанного в межгосударственном стандарте ГОСТ 24556-89.

Определение содержания витамина Е методом ВЭЖХ

Содержание витамина Е (токоферол) в составе сырья определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) в соответствии с методикой, которая приведена в стандарте ГОСТ Р 54634-2011.

Определение содержания витаминов группы В методом капиллярного электрофореза

Для определения витаминов группы В (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В_с) использовали методику капиллярного электрофореза, описанную в межгосударственном стандарте ГОСТ 31483-2012.

Определение минерального состава методом атомно-абсорбционной спектроскопии

Элементный состав растительного сырья исследовали методикой атомно-абсорбционной спектроскопии, которая приведена в межгосударственном стандарте ГОСТ 32343-2013 (ISO 6869:2000).

Определение азота титриметрическим методом

Содержание азота в растительном сырье копеечника Семенова проводилось методом титриметрии по Кьельдалю согласно ГОСТ 13496.4-2019.

2.2.3 Комплексные методы стандартизации и исследования стабильности

Стандартизация лекарственного растительного сырья

Определение

Методологический фундамент для подготовки раздела «Определение» составили положения Руководства по формированию частных фармакопейных статей ЕАЭС (Часть III, регламентирующая лекарственные растительные

средства), а также одобренный проект общей фармакопейной статьи (ОФС) ФЕАЭС «Лекарственное растительное сырье». Кроме того, в процессе разработки соблюдались требования действующих общих монографий ГФ РК, устанавливающих критерии качества для трав и подземных органов растений [85,86].

Идентификация

«Идентификация» ЛРС *H. semenowii* предусматривала испытания по макроскопическому, микроскопическому описанию диагностических признаков, а также тонкослойной хроматографии (ТСХ) в соответствии с положениями руководства ЕАЭС по разработке частных фармакопейных статей (ЧФС) (Часть III) [86]. Методологический алгоритм исследований базировался на требованиях актуальных стандартов ГФ РК и ФЕАЭС: одобренного проекта ОФС ФЕАЭС по макроскопии ЛРС, ГФ РК II, т. 3, 2.8.23. (микроскопический анализ) (ФЕАЭС 2.1.8.17.) и ГФ РК II, т. 1, 2.2.27. (ТСХ) (ФЕАЭС 2.1.2.26.) [72,85,87].

Испытания

Универсальные испытания лекарственного растительного сырья выполняли согласно соответствующим ОФС и межгосударственным стандартам, приведенным в таблице 3.

Таблица 3 – Методы испытаний лекарственного растительного сырья

№	Наименование испытания	Нормативный документ на метод испытания	Ссылка
1.	Посторонние примеси	ГФ РК II, т. 1, 2.8.2. (ФЕАЭС 2.1.8.2.)	[85,87]
2.	Потеря в массе при высушивании	ГФ РК II, т. 1, 2.2.32. (ФЕАЭС 2.1.2.31.)	[85,87]
3.	Тяжелые металлы и мышьяк	ГОСТ 30178-96, ГОСТ 26930-86	
4.	Общая зола	ГФ РК II, т. 1, 2.4.16. (ФЕАЭС 2.1.4.16.)	[85,87]
5.	Радионуклиды	ГОСТ 32161-2013, ГОСТ 32163-2013	
6.	Пестициды	ГОСТ 30349-96	
7.	Микробиологическая чистота	ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.13	[85]
8.	Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте	ГФ РК II, т. 1, 2.8.1. (ФЕАЭС 2.1.8.1.)	[85,87]
9.	Экстрактивные вещества	ГФ РК I, т. 1, <i>Определение экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье</i>	[88]

Количественное определение

Количественное определение мангиферина в составе травы *H. semenowii* проводили методом ВЭЖХ согласно ГФ РК II, т. 1, 2.2.29. (ФЕАЭС 2.1.2.28.), тогда как определение суммы флавоноидов для рутинных анализов осуществляли в соответствии с ГФ РК II, т. 1, 2.2.25. (ФЕАЭС 2.1.2.24.) и методике описанной в разделе 2.2.2. [85,87].

Исследования стабильности лекарственного растительного сырья

Оценку стабильности травы и корней копеечника Семенова проводили в рамках долгосрочных испытаний (температура – 25 ± 2 °C относительная влажность – 60 ± 5 %), дизайн которого гармонизирован с правилами ЕАЭС (Решения Коллегии ЕЭК № 69 и № 169). Исследование охватывало три сериях каждого вида ЛРС, «Копеечника Семенова трава» и «Копеечника Семенова корни». Началом испытаний считается третий месяц после первичной заготовки ЛРС.

Контроль показателей качества проводили в фиксированных временных точках: 0 (исходная), 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяцев. В каждой контрольной точке оценивались: органолептические показатели, физико-химические показатели, количественное содержание, как наиболее критический параметр для регрессионного анализа.

Для обоснования срока хранения применяли регрессионный анализ количественных данных содержания биологически активных веществ с использованием программного обеспечения Minitab 21.0. Для расчетов использовали специализированный модуль Stability Study программы Minitab.

2.2.4 Биологические методы

Методы исследования токсичности лекарственного растительного сырья

Исследование острой токсичности

Оценка острой токсичности проводилась в виде скринингового исследования с модифицированным дизайном с учетом рекомендаций руководства Миронова А.Н. [89] и принципами руководства OECD Test Guideline 423 [90]. Исследование выполнено на 20 беспородных мышах обоих полов (масса тела 19–37 г). Животные были разделены одну контрольную и три опытных группы по 5 особей. Фиксированные уровни доз составили 500 мг/кг, 2000 мг/кг и 5000 мг/кг (предельный тест). Исследуемое вещество (экстракты Hs_Et50 и HsR_Et50) вводили однократно внутрижелудочно (перорально) с помощью атравматичного зонда. Динамическое наблюдение за клиническим состоянием, выживаемостью и поведенческими реакциями животных осуществлялось в течение 14 суток после введения [89–92].

Исследование подострой токсичности

Экспериментальное исследование подострой (28-дневной) токсичности было спланировано и проведено в формате скрининговой оценки с модифицированным дизайном на основе методологических рекомендаций Миронова А.Н. и протоколом OECD Test Guideline 407 [89,93,94]. Объектом исследования послужили 20 взрослых беспородных белых крыс (самцов и самок) с начальными весовыми показателями 180–200 г. Для минимизации систематических ошибок при распределении особей по четырем группам был применен метод стратифицированной рандомизации, при этом численность каждой группы была зафиксирована на уровне 5 особей обоих полов. В связи с пилотным характером исследования его объем был ограничен целевым набором конечных точек. Содержание крыс осуществлялось в стандартных

полипропиленовых клетках при контролируемых параметрах микроклимата: температурный режим 22 ± 2 °С, относительная влажность воздуха 50 %, автоматизированная смена фаз «свет-тьнь» (12/12 ч). Рацион составлял полнорационный комбикорм и очищенная вода *ad libitum*. Период адаптации к условиям вивария составил 5 суток; перед началом введения исследуемого экстракта животные подвергались депривации пищи в течение ночи [94].

Испытуемые экстракты (Hs_Et50 и HsR_Et50) вводили ежедневно внутривентрально с использованием зонда в течение 28 дней. Схема исследования включала три опытных уровня доз: 500 мг/кг, 2000 мг/кг и 5000 мг/кг. Контрольная группа получала эквивалентный объем очищенной воды (1 мл / 100 г массы тела) [94].

Ежедневный клинический осмотр проводился через 2 часа после введения и в конце светового дня. Программа мониторинга включала оценку общего состояния, динамику потребления корма и воды, выявление возможных неврологических отклонений, изменений двигательной активности и аномальных секретов. По завершении 28-дневного цикла экспозиции проводилась эвтаназия методом цервикальной дислокации. Для верификации токсического действия выполнялось патоморфологическое исследование (макро- и микроскопия) печени и почек с последующей подготовкой гистологических срезов [94].

Количественные показатели, полученные в ходе исследования подострой токсичности, подвергались статистическому анализу с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 10.0, GraphPad Software, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Для оценки статистической значимости различий между опытными и контрольной группами применялся однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). С целью проведения множественных сравнений средних значений и выявления отклонений опытных групп от контроля использовался пост-хок тест Даннетта (Dunnett's test). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p \leq 0,05$ [94,95].

Исследование местно-раздражающего действия

Оценку потенциального раздражающего действия экстрактов *H. semenowii* (Hs_Et50 и HsR_Et50) на кожные покровы проводили в ходе 30-дневного эксперимента на двух группах белых крыс ($n=5$). На предварительно депилированный участок кожи спины ($2,5 \times 2,5$ см) ежедневно наносили 0,5 г испытуемого экстракта, втирая его до полного впитывания. Контрольная группа получала аппликации основы экстракта по аналогичной схеме. Макроскопическую оценку состояния кожи проводили ежедневно (через 2 часа после экспозиции и в конце светового дня). Учитывали эластичность, тургор, наличие шелушения и микротрещин. Степень раздражения (эритема и отек) ранжировалась по шкале Дрейза от 0 до 4 баллов. Результаты интерпретировали следующим образом: 0 баллов – отсутствие реакции, 1 балл – очень слабое воздействие, 2 балла – умеренно выраженное воздействие, 3 балла – сильное воздействие, 4 балла – очень сильное воздействие [94,96].

Оценка местной аллергизирующей активности (конъюнктивальная проба)

Для выявления местно-сенсibilизирующего потенциала экстрактов Hs_Et50 и HsR_Et50 на слизистые оболочки использовали метод конъюнктивальной пробы на морских свинках (n=5) в течение 28-дневного периода. В конъюнктивальный мешок правого глаза (опытная группа) вводили 1 каплю водного раствора экстракта с последующей кратковременной окклюзией слезно-носового канала. Левый глаз служил интактным контролем (введение очищенной воды). Тестирование проводили на 7, 14 и 28 сутки исследования. Учет результатов осуществляли через 15 минут (реакция немедленного типа) и в интервале 24-48 часов (гиперчувствительность замедленного типа, ГЗТ). Состояние органов зрения оценивали по модифицированной шкале Дрейза, фиксируя изменения радужной оболочки, степень гиперемии, хемоза и характер выделений (от 0 до 4 баллов) [94,97].

Этические принципы

Программа доклинических испытаний, включающая оценку параметров острой и подострой токсичности, а также изучение сенсibilизирующего (аллергизирующего) и местно-раздражающего потенциала копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), успешно прошла экспертизу в Локальной комиссии по биоэтике КазНМУ. Соответствующее разрешение было получено на заседании № 4 (140) от 03 мая 2023 года [94].

Оценка противомикробной и противогрибковой активности

Антибактериальный потенциал экстрактов *H. semenowii* изучали методом серийных микроразведений в соответствии с требованиями Европейского комитета по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам для определения минимальной ингибирующей (МИК), бактерицидной (МБК) и фунгицидной (МФЦ) концентраций [98]. Панель референтных микроорганизмов включала грамположительные и грамотрицательные бактерии (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), а также дрожжеподобные грибы (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 90030) [43].

Экстракты растворяли в ДМСО (сток-раствор 100 мг/мл), подготавливая рабочие концентрации от 0,03 до 16 мг/мл в среде Мюллера-Хинтона (с добавлением 2 % глюкозы для грибов). Инокулят готовили по стандарту Макфарланда (0,5), достигая финальной плотности $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл для бактерий и $1,5 \times 10^4$ КОЕ/мл для грибов. После инкубации (24 ч, 35 ± 2 °C) значения МИК фиксировали спектрофотометрически (Biotek Epoch Microplate (Winooski, VT, США), 600 нм). Для установления МБК/МФК проводили пересев 5 мкл содержимого лунок на плотные питательные среды. Механизм действия классифицировали как бактерицидный/фунгицидный при соотношении МБК(МФК)/МИК ≤ 4 и как статический при > 4 . Для корректного позиционирования активности экстрактов в ходе экспериментов использовали контроль растворителя (ДМСО) в рабочих концентрациях. Испытания выполняли в трех повторностях, результаты представляя в виде моды [99].

По результатам исследования провели статистический анализ для определения разницы в активности между экстрактами. Анализ проводился при помощи программного обеспечения GraphPad Prism (версия 10.0, GraphPad Software, США) с использованием непараметрического критерия Краскала-Уоллиса ($p < 0,05$), с последующим апостериорным тестом множественных сравнений Данна [43].

Определение антирадикальной активности (DPPH-тест)

Антиоксидантные свойства копеечника Семенова оценивали по способности извлечений ЛРС нейтрализовать свободный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) спектрофотометрическим методом [99]. Серию метанольных разведений экстрактов (концентрации 0,16 – 10 мг/мл в 0,05 мл) смешивали с 0,15 мл метанолового раствора DPPH (0,078 мг/мл). Полученные разведения выдерживали в течение 30 мин в защищенном от света месте при комнатной температуре. Далее проводили измерение оптической плотности спектрофотометром Biotek Epoch Microplate (Winooski, VT, США) при $\lambda_{\text{max}} = 515$ нм. При помощи 4-параметрической логистической регрессии в специализированном программном обеспечении спектрофотометра Gen5 рассчитывали концентрации, обеспечивающие 50 % ингибирование радикалов (EC_{50}) [43].

Для сравнительной оценки рассчитывали индекс антиоксидантной активности (AAI) по формуле [100]:

$$AAI = \frac{\text{конечная концентрация DPPH (мкг/мл)}}{EC_{50}(\text{мкг/мл})} \quad (1)$$

Результаты представлены как средняя со стандартным отклонением на основании трех независимых измерений [43].

2.2.5 Фармацевтико-технологические и статистические методы

Определение фармацевтико-технологических параметров

Для научного обоснования выбора метода экстракции проводили комплексное изучение фармацевтико-технологических параметров надземной части копеечника Семенова. В соответствии с общепринятыми фармакогностическими методиками определяли удельную, объемную и насыпную массы, пористость, порозность, свободный объем слоя, коэффициент поглощения экстрагента и динамика выхода суммарных экстрактивных веществ ЛРС [101].

Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка и математическое моделирование результатов исследований проводились с использованием специализированных программных пакетов Microsoft Excel, GraphPad Prism (версия 10.0), Gen5 и Minitab Statistical Software.

Для первичного анализа биометрических и фитохимических показателей

применяли методы описательной статистики с расчетом среднего арифметического, стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего. Оценку статистической значимости различий в доклинических испытаниях *in vivo* выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим пост-хок тестом Даннетта по сравнению с контрольной группой при уровне значимости $p \leq 0,05$. При анализе результатов *in vitro* антимикробной активности использовали непараметрический критерий Краскала-Уоллиса с апостериорным тестом Данна, а для расчета EC_{50} в антиоксидантных тестах – 4 - параметрическую логистическую регрессию. Обоснование сроков хранения ЛРС при изучении стабильности осуществляли путем регрессионного анализа количественных данных с применением специализированного модуля Stability Study (Minitab).

Процесс заготовки растительного сырья

Разработка и оптимизация процессов сбора и сушки ЛРС *H. semenowii* была реализована на основе современной концепции «Качество через проектирование» («Quality by Design», QbD) с использованием функциональных возможностей статистического программного пакета Minitab Statistical Software 10.0 (США). В рамках данного подхода формирование проектного поля (DSp) процесса осуществлялось путем интеграции ряда аналитических инструментов. В частности, применение алгоритмов планирования экспериментов (DOE) позволило систематизировать исследовательский процесс, обеспечив эффективное создание и последующую интерпретацию экспериментальных моделей. С целью идентификации наиболее значимых входных факторов и установления их корреляции с выходными параметрами исследования задействовался регрессионный анализ поверхности отклика с визуализацией данных на диаграммах Парето. Для детального пространственного моделирования взаимосвязей между целевыми характеристиками и двумя независимыми переменными использовались построение контурных и объемных поверхностных графиков. После чего, в целях определения наиболее эффективных комбинаций входных переменных для достижения заданных характеристик ЛРС (параметр потери в массе при высушивании), проводили оптимизацию при помощи функции оптимизатора отклика (Response Optimizer). Совокупность данных статистических методов позволила математически обосновать технологические параметры и гарантировать стабильность качества ЛРС в границах установленного проектного поля [102–105].

Процесс получения фармацевтической субстанции

Оптимизация технологических режимов экстрагирования (частота ультразвуковой обработки, продолжительность одного цикла обработки, порядок экстрагента) для получения фармацевтической субстанции (сухого экстракта) копеечника Семенова осуществлялась на базе концепции QbD с применением программного обеспечения Minitab Statistical Software, в частности функции DOE, построение диаграмм Парето и оптимизации отклика, аналогично процессу заготовки растительного сырья копеечника Семенова.

3 МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФИТОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (*HEDYSARUM SEMENOWII* REGEL & HERDER)

3.1 Макроскопическое исследование травы и корней копеечника Семенова

Hedysarum semenowii Regel & Herder является многолетним травянистым растением, обычно характеризующимся прямостоячими стеблями и высотой в достигающей от 50 до 100 см. Вегетативная система состоит из одного-трех одиночных стеблей с отчетливыми продольными бороздками. Прилистники заметно выступающие, коричневатые и сросшиеся; базальные прилистники безлистные и обхватывающие основание стебля (Рисунок 4) [17]. При сравнении морфологических особенностей *H. semenowii* с особенностями других казахских видов и близкородственных таксонов были сделаны следующие наблюдения. *H. semenowii*, достигающий высоты до 1 м, считается одним из самых высоких видов *Hedysarum*, произрастающих в Казахстане. Поверхность стебля имеет характеристики, сходные с таковыми у *H. flavescens* и *H. alpinum* [17,19].



Рисунок 4 – Копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) в естественной среде обитания (фаза цветения)

В ходе макроскопических исследований надземной части копеечника Семенова определяли следующие биометрические показатели морфологических органов: длина листочков, ширина листочков, длина цветков, длина волосков листьев, длина волосков стеблей, длина плодов, ширина плодов, длина семян, ширина семян (Таблица 4).

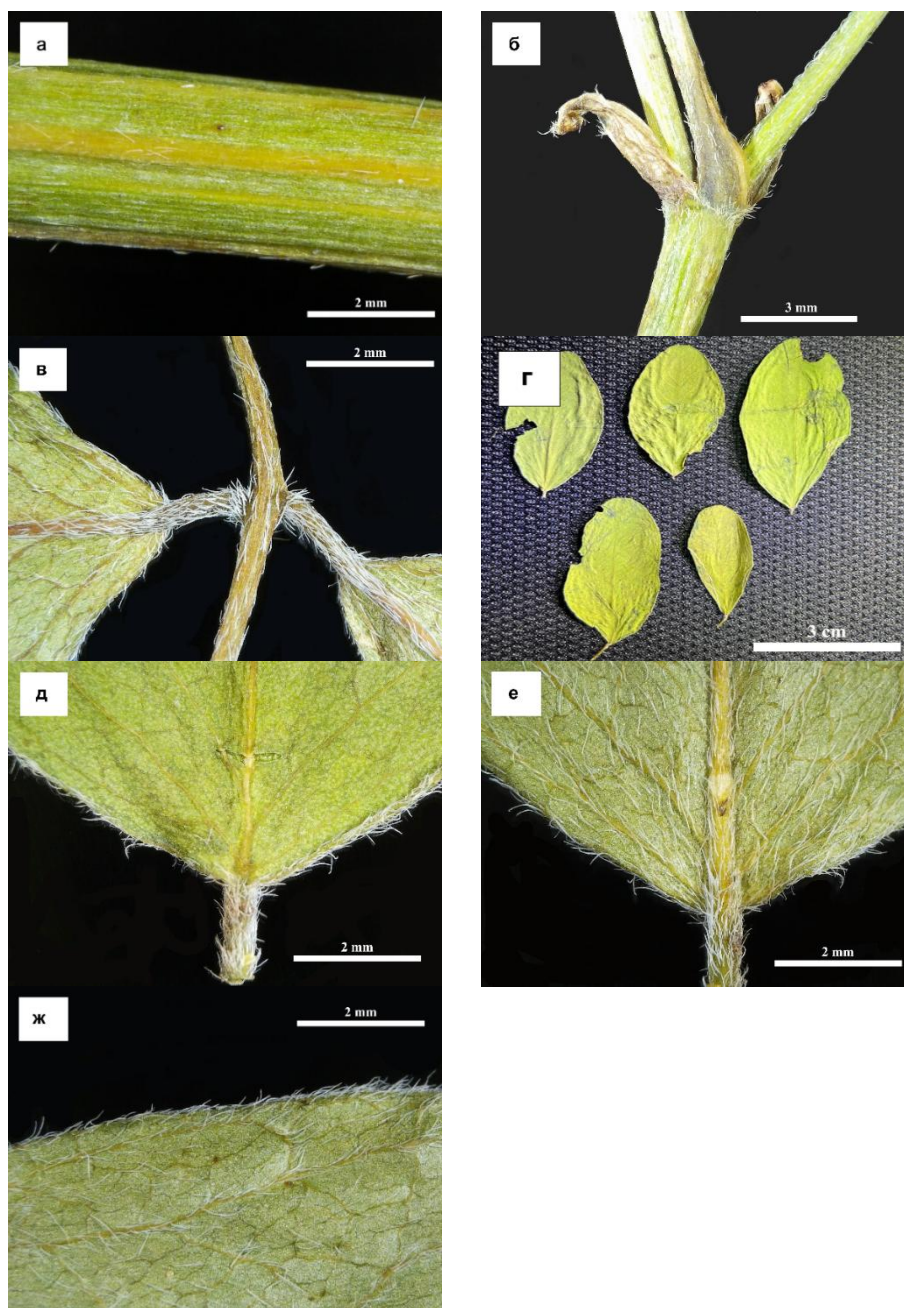
Таблица 4 – Биометрические показатели морфологических органов травы *Hedysarum semenowii*

№	Листочки, см		Волоски, мм		Цветки, мм	Плоды, мм		Семена, мм	
	L	W	L (лист)	L (стебель)	L	L	W	L	W
1.	3,03	1,83	0,74	0,37	12,48	23,20	6,22	1,45	1,87
2.	3,03	1,98	0,45	0,39	12,12	24,13	7,07	1,70	2,12
3.	3,02	1,90	0,53	0,41	11,45	24,16	7,48	1,23	2,05
4.	2,79	1,74	0,42	0,42	11,13	24,16	7,15	1,41	1,91
5.	2,84	1,93	0,66	0,28	10,75	24,05	7,53	1,56	1,99
6.	2,77	1,81	0,40	0,30	11,10	23,81	7,86	1,32	2,11
7.	3,63	1,99	0,46	0,30	10,97	23,12	8,22	1,31	2,25
8.	3,70	2,24	0,48	0,37	10,61	23,62	8,15	1,56	2,16
9.	3,64	2,06	0,31	0,51	10,23	23,92	7,91	1,64	2,04
10.	3,07	1,54	0,47	0,29	9,62	24,24	6,97	1,24	2,13
11.	3,12	1,77	0,73	0,28	13,35	24,09	7,21	1,15	2,06
12.	3,13	1,87	0,53	0,40	13,92	23,64	7,47	1,37	1,79
13.	2,38	1,25	0,49	0,39	13,55	23,75	7,21	1,83	1,62
14.	2,38	1,30	0,39	0,30	12,85	23,90	7,84	1,09	1,85
15.	2,32	1,30	0,47	0,41	12,60	24,20	7,61	1,51	1,39
$\bar{x}$	2,99	1,77	0,50	0,36	11,78	23,87	7,46	1,42	1,96
SE	0,11	0,08	0,03	0,02	0,34	0,09	0,13	0,05	0,06
SD	0,44	0,30	0,12	0,07	1,30	0,35	0,52	0,21	0,23
S ²	0,19	0,09	0,01	0,00	1,70	0,12	0,27	0,04	0,05
min	2,32	1,25	0,31	0,28	9,62	23,12	6,22	1,09	1,39
max	3,70	2,24	0,74	0,51	13,92	24,24	8,22	1,83	2,25
95 % CI	0,24	0,16	0,07	0,04	0,72	0,19	0,29	0,12	0,13

* L – длина; W – ширина; $\bar{x}$ – среднее значение; SE – стандартная ошибка; SD – стандартное отклонение; S² – дисперсия; min – минимум; max – максимум; 95 % CI – доверительный интервал.

Листовой аппарат *H. semenowii* характеризуется непарноперистым строением; сложные листья состоят из 7–10 листочков, прикрепленных к оси с помощью укороченных черешков. Диагностическим признаком является наличие густого, плотно прижатого волосяного покрова на черешках и листовой оси (рахисе). Листовая пластинка образована 4–8 парами сегментов с цельными краями, имеющих округлую или широкояйцевидную конфигурацию. Морфометрические показатели отдельных листочков варьируют в диапазоне 23–37 мм в длину и 13–22 мм в ширину [17]. Листовые пластинки обладают нежной консистенцией; при этом адаксиальная сторона листочков лишена опушения (голая), а на абаксиальной стороне фиксируется редкий полуприжатый ворс. Апикальная часть (верхушка) листочков имеет закругленный контур, тип жилкования идентифицирован как перисто-сетчатый (Рисунок 5). Важным диагностическим признаком, позволяющим дифференцировать *H. semenowii* от родственных видов *H. flavescens* и *H. alpinum*, является превалирование округлых или широкоовальных очертаний листочков, в то время как для двух последних таксонов характерны преимущественно эллиптические или

яйцевидно-эллиптические формы [17,19].

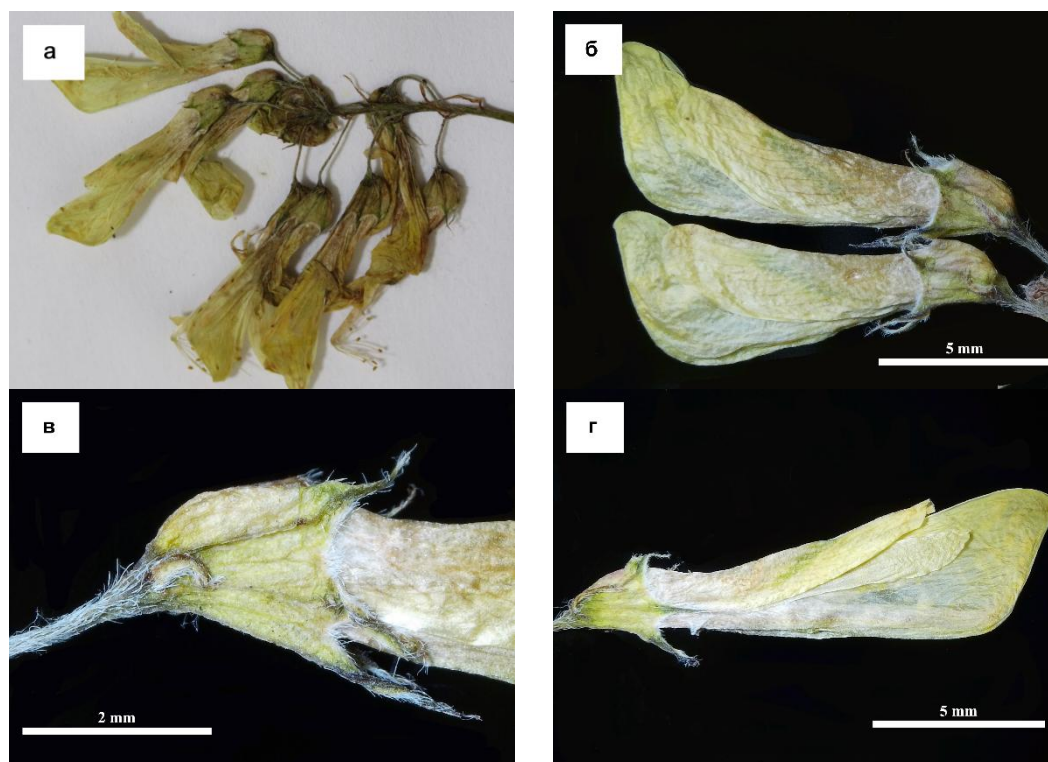


а – поверхность стебля; б – узел стебля, к которому прикрепляются листья, прилистники и боковые побеги; в – черешки и оси листьев; г – листья; д – верхняя поверхность листа; е – нижняя поверхность листа; ж – абаксиальная сторона листа с выраженной системой жилкования

Рисунок 5 – Макроскопические особенности стебля и листьев *Hedysarum semenowii*

H. semenowii характеризуются наличием пазушных цветоносов с выраженным прижатым опушением; их длина в среднем в два раза превышает таковую у вегетативных листьев. Соцветия представляют собой плотные,

многоцветковые кисти удлинено-продолговатой формы. Коричневые ланцетные прицветники достигают 4–6 мм в длину. Цветоножки по размеру сопоставимы с чашечкой и также имеют прижатый ворс. Структура чашечки ширококолокольчатая (5–6 мм), с легкой асимметрией (косая), поверхность варьирует от голой до слабоопушенной. Узколанцетные зубцы чашечки не превышают длину ее трубки. У основания каликса локализована пара линейно-ланцетных прицветничков длиной 2–3 мм. Венчик типичного желтого окраса; парус (флаг) длиной 7–10 мм уступает по длине лодочке (килю). Пластика паруса яйцевидной формы плавно переходит в расширенный ноготок. Вёсла (крылья) продолговатые, почти равны флагу; киль (10–14 мм) характеризуется остроугольным изгибом по нижнему краю (Рисунок 6) [17].



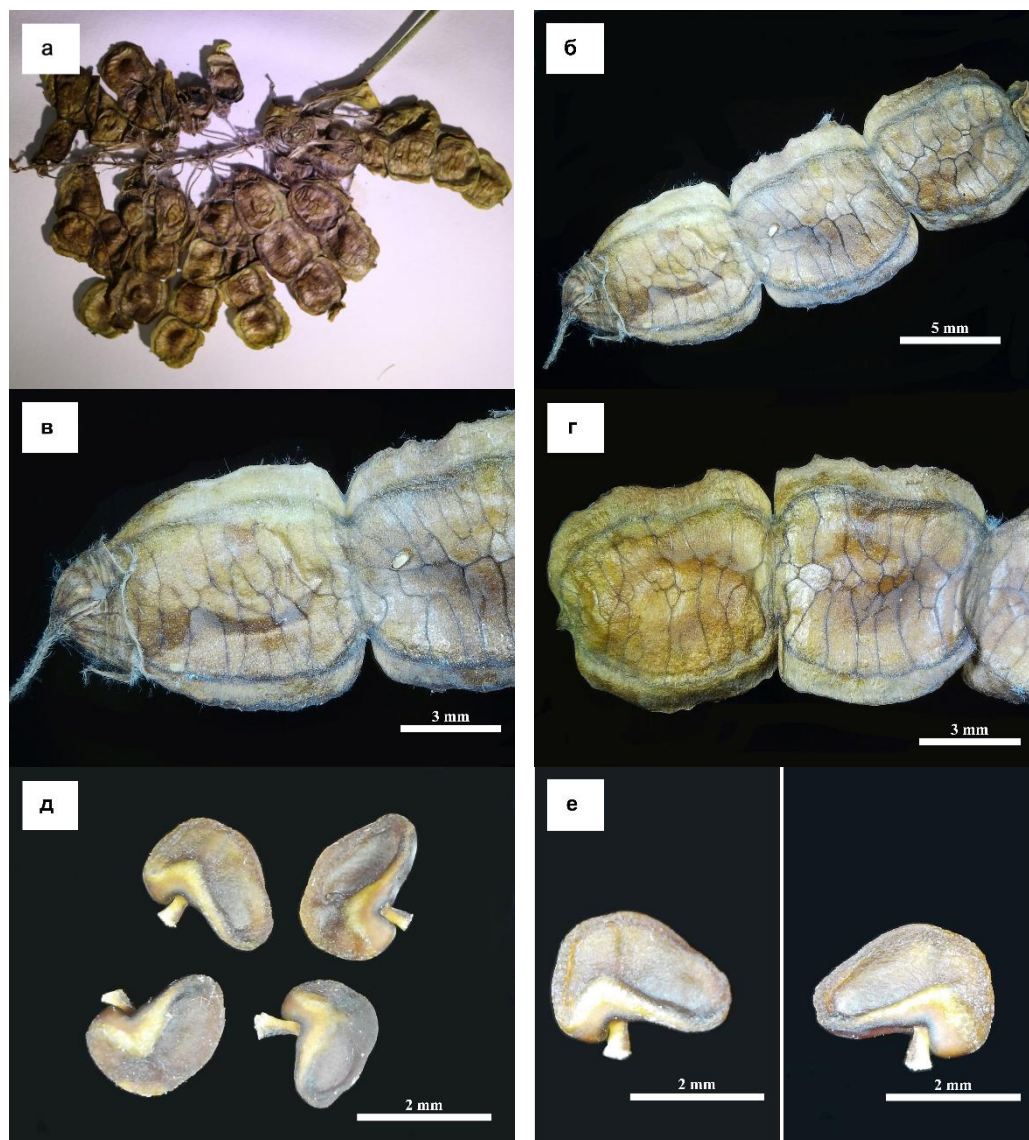
а – многоцветковая кисть; б – внешний вид цветка; в – цветонос с широкой колокольчатой чашечкой; г – венчик

Рисунок 6– Макроскопические особенности цветков *Hedysarum semenowii*

Цветоножки растений *Hedysarum* L. чаще всего верхушечные, равны или длиннее листьев и различаются по степени опушения [76,106]. Цветоножки *H. semenowii* пазушные, как у *H. flavescens* и *H. alpinum*, но отличаются наличием прижато-волосистой структуры и примерно в два раза большей длиной, чем листья. Среди казахстанских видов *Hedysarum* только *H. semenowii*, *H. flavescens* и *H. splendens* имеют желтые венчики [17,19].

Плод *H. semenowii* представляет собой членистый боб, состоящий из от 3-х до 5-ти плоских сегментов. Морфология члеников варьирует от орбикулярной и широкоэллиптической до почти квадратной; поверхность перикарпия

характеризуется выраженной мелкоячеистой (ретикулярной) фактурой. Характерным признаком вида является наличие развитой пленчатой оторочки по краям плода. Членики боба могут быть как полностью гладкими, так и обладать субтрихоматозным покровом в виде коротких щетинок; их метрические параметры составляют 7,7-8,1 × 6,2-8,2 мм. Семена характеризуются яйцевидно-почковидной конфигурацией и коричневой пигментацией поверхности, при этом их размеры варьируют в пределах 1,1-1,8 × 1,4-2,3 мм (Рисунок 7).

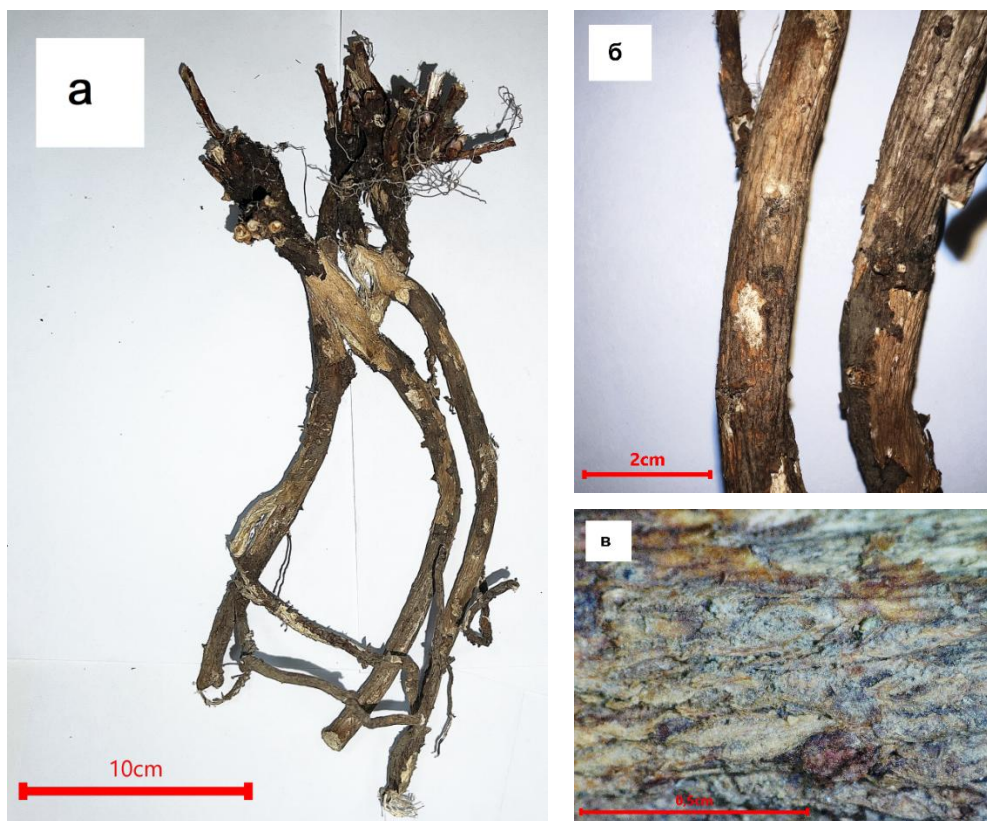


а – членики бобов; б – боб из 3 члеников; в – цветоножки с члениками боба; г – мелкоячеистые членики боба круглой или квадратной формы с зазубренными волнистыми краями; д, е – овальные семена, похожие на почки

Рисунок 7 – Плоды *Hedysarum semenowii*

Корни *H. semenowii* толстые, длиной 30-120 см, почти цилиндрической формы, диаметром 0,5-2,5 см, и имеют желто-коричневый цвет, что отличает их от более распространенных видов, таких как *H. polybotrys* и *H. neglectum*,

известных своей характерной красной окраской. Последний из них в народе называют «медвежьим корнем» или «красным корнем» [4,107]. Поверхность корня *H. semenowii* нерегулярно морщинистая в продольном направлении, часто с горизонтальными чечевичками и боковыми рубцами от корней. Перидерма корня легко отслаивается, внутренняя часть светло-желто-коричневая. Текстура корня мягкая, гибкая и трудно ломается, поверхностные трещины волокнистые (Рисунок 8).



а, б – внешний вид фрагмента корней; в – увеличенная поверхность корней

Рисунок 8 – Макроскопические снимки корней *Hedysarum semenowii*

H. semenowii можно отличить от видов *H. flavescens* и *H. splendens* по высоте растения и характеристикам бобов. Бобы *H. semenowii* имеют круглоэллиптические или круглоквадратные членики, в отличие от большинства видов рода *Hedysarum* L., у которых бобы круглые с зазубренно-волнистыми краями [17,25].

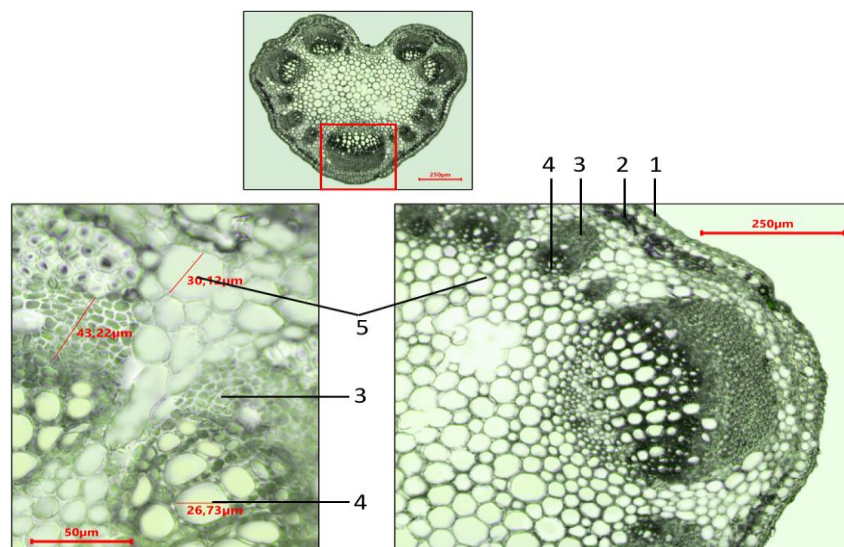
3.2 Микроскопические исследования травы и корней копеечника Семенова

Стебель

На трансверсальном срезе стебель *H. semenowii* характеризуется неправильно-эллиптическим контуром с выраженными экзогенными выступами (ребрами). Покровная ткань представлена однорядным эпидермисом, покрытым тонким слоем кутикулы. Непосредственно под эпидермальным слоем

локализована механическая ткань – склеренхима. Распределение склеренхимных волокон по периметру стебля гетерогенно: в костальных зонах (ребрах) наблюдается мощная тяжистая склеренхима толщиной в от 6-ти до 7-ми клеточных слоев, тогда как в интеркостальных участках её слой редуцирован до одного-двух рядов клеток. Паренхимные клетки между склеренхимой и сосудистыми пучками соединяются с клетками центрального цилиндра. Сосудистые пучки (флоэма и ксилема) хорошо развиты. Клетки флоэмы мелкие, образуют 8-9 слоев и окружают ксилему. Ширина формирующегося слоя клеток составляет около 43,22 мкм. Клетки ксилемы крупные, рассеянные и образуют 3-4 ряда. Клетки центрального цилиндра крупные и сферические (Рисунок 9).

Стебель *H. semenowii* имеет овальную форму с угловатыми выступами и лишен трихом, что отличает его от других видов, таких как *H. daghestanicum*, *H. caucasicum* и *H. grandiflorum*, характеризующихся округлыми, многогранными и более выраженно ребристыми стеблями соответственно [76]. Кроме того, *H. semenowii* демонстрирует более развитую флоэму и склеренхиму в ребрах (6-7 слоев), тогда как у других видов структура сосудистых пучков менее выражена, а колленхима состоит из 3-4 слоев. Еще одной отличительной особенностью анатомии стебля *H. semenowii* является состав сердцевины, которая состоит из крупных сферических клеток и лишена идиобластов, содержащих мангиферин [76,106].



1 – эпидермис, 2 – склеренхима, 3 – флоэма, 4 – ксилема, 5 – клетки центрального цилиндра

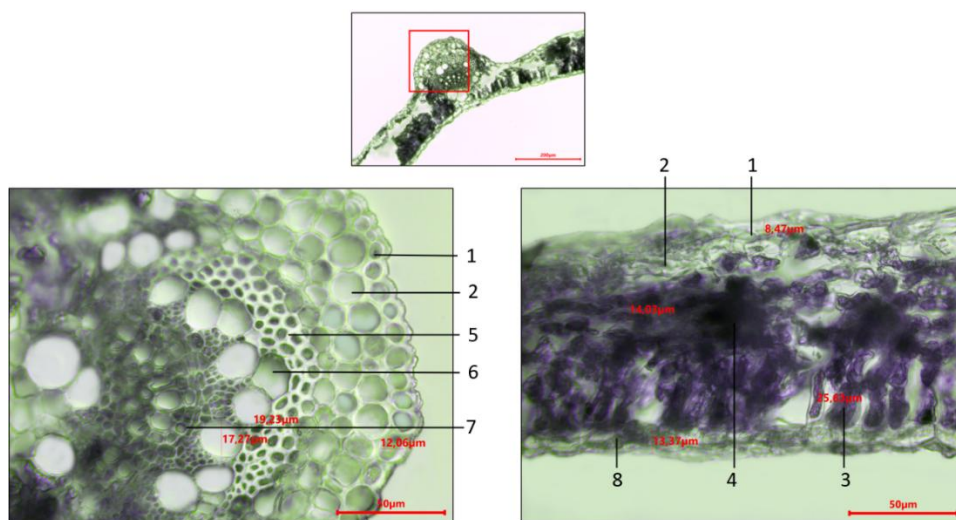
Рисунок 9 – Поперечный срез стебля *Hedysarum semenowii*

Листочек

В поперечном сечении верхний и нижний эпидермис листочков состоят из овальных, прямоугольных или изодиаметрических клеток, адаксиальной и абаксиальной кутикулы. Толщина адаксиальной кутикулы составляет 0,68–4,16 мкм, а абаксиальной — 1,86–5,90 мкм. Клетки верхнего эпидермиса немного

шире клеток нижнего эпидермиса, их параметры составляют 8,40–10,45 мкм × 10,75–22,74 мкм. Клетки нижнего эпидермиса имеют ширину 5,70–15,68 мкм и длину 5,0–16,6 мкм. Толщина мезофилла составляет 30,11–40,86 мкм. Столбчатый мезофилл имеет 1–3 слоя, а под эпидермисом — 1–2 слоя. Среди паренхиматозных клеток присутствуют 1–3-слойные губчатые мезофильные клетки с большими межклеточными пространствами (Рисунок 10).

Листовая пластинка *H. semenowii* отличается от родственных видов, таких как *H. daghestanicum*, *H. caucasicum*, *H. grandiflorum* и *H. alpinum*, более тонким и рыхлым мезофиллом и меньшим количеством слоев палисадных клеток (1-3 слоя), тогда как другие виды имеют до 2-4 слоев палисадной ткани. Кроме того, *H. semenowii* демонстрирует выраженную асимметрию толщины кутикулы: абаксиальная кутикула в 1,5-2 раза толще адаксиальной, что не наблюдается у других сравниваемых видов [46,76,107]. В целом, гладкая поверхность листа, большие межклеточные пространства в губчатой мезофилле и отсутствие склеренхимы придают листьям *H. semenowii* более мягкую и гибкую структуру, что способствует эффективному газообмену в условиях высокогорья с относительно высокой влажностью, тогда как другие виды, в частности *H. alpinum*, адаптированы к более экстремальным альпийским условиям [46,76,108].

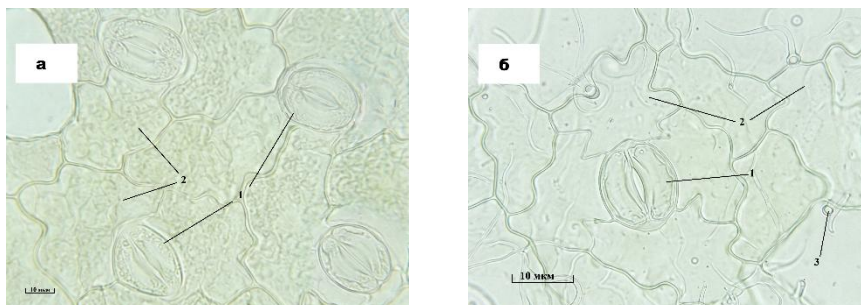


1 – эпидермис; 2 – губчатая мезофилла; 3 – столбчатая мезофилла;
4 – проводящие пучки; 5 – флоэма; 6 – ксилема; 7 – паренхима; 8 – нижний эпидермис

Рисунок 10 – Поперечный срез листочка *Hedysarum semenowii*

Верхний эпидермис поверхности листочков копеечника Семенова представлен клетками неправильной формы с тонкими извилистыми стенками и отсутствием трихом (Рисунок 11). Устьица многочисленные, широкоовальной формы, и расположены на одном уровне с основными эпидермальными клетками. Тип устьичного аппарата – аномоцитный (устьичный индекс $11,14 \pm 2,23$), с 3-4 околоустьичными клетками. На нижней стороне листа, клетки,

также, имеют сильнорезную форму с аномоцитным устьичным аппаратом (устьичный индекс $8,01 \pm 0,45$), однако отличаются наличием мест прикрепления трихом.

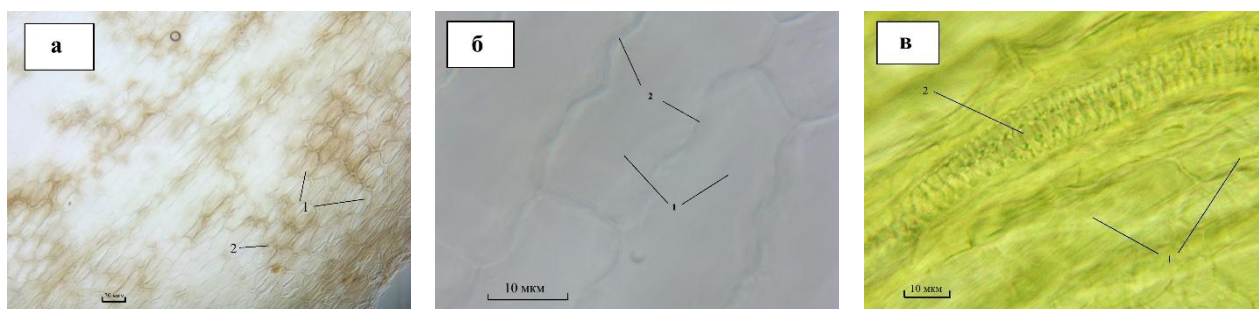


а – адаксиальный эпидермис: 1 – устьица, 2 – основные клетки эпидермиса;
б – абаксиальный эпидермис: 1 – устьица, 2 – основные клетки эпидермиса,
3 – место прикрепления трихом.

Рисунок 11 – Микроскопия листа *Hedysarum semenowii*

Цветки

Основная эпидермальная ткань венчика копеечника Семенова представлена слегка прозенхимными клетками, некоторые почти прямоугольной формы (Рисунок 12). Клеточные стенки эпидермиса толстые, имеют прямые или слегка извилистые (синуозные) контуры, что обеспечивает гибкость поверхности. Над жилками клетки мелкие, почти прямоугольной формы. Кутикула слабо выражена. Кроме того, обнаружены фрагменты проводящего пучка, представленного мелкими трахеидами со спиральным типом утолщения клеточной стенки. В ходе микроскопических исследований в поле зрения устьичные аппараты и трихомы не выявлены.



а, б – эпидермис с поверхности: 1 – основные клетки эпидермиса,
2 – утолщенные стенки эпидермиса; б – фрагмент проводящего пучка:
1 – основные клетки эпидермиса, 2 – эпидермис на жилкой листа.

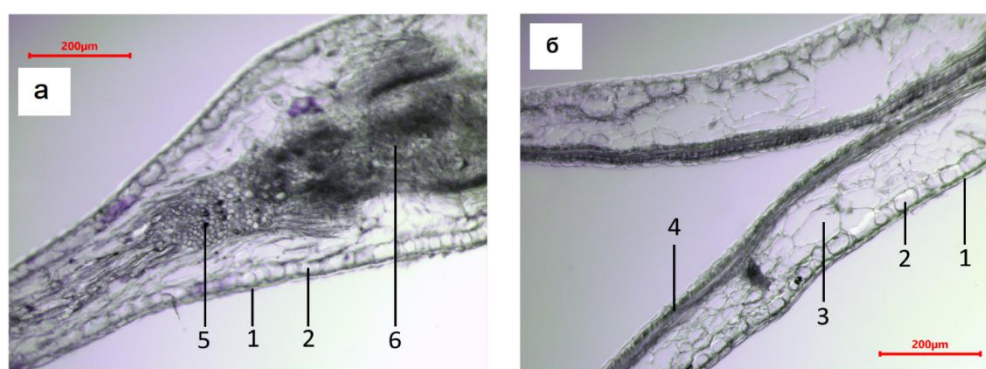
Рисунок 12 – Микроскопия венчика *Hedysarum semenowii*

Околоплодник

Анатомо-морфологический анализ препаратов околоплодника

H. semenowii позволила выделить ключевые микроскопические маркеры подлинности сырья. Типичное строение стенки плода включает экзокарпий, мезокарпий и эндокарпий. Внутренний слой, срастающийся с тестой (семенной кожурой), выполняет армирующую функцию и состоит из склерифицированных клеток с характерной четковидной морфологией утолщений. При детальном изучении фрагментов мезо- и эндокарпия обнаруживаются мелкие паренхимные клетки, идиобласты и секреторные структуры эндогенного типа. Диагностическое значение также имеет присутствие в тканях кристаллов, метаболитов (запасных веществ), а также сосудисто-волоконистых пучков и иных механических элементов (Рисунок 13).

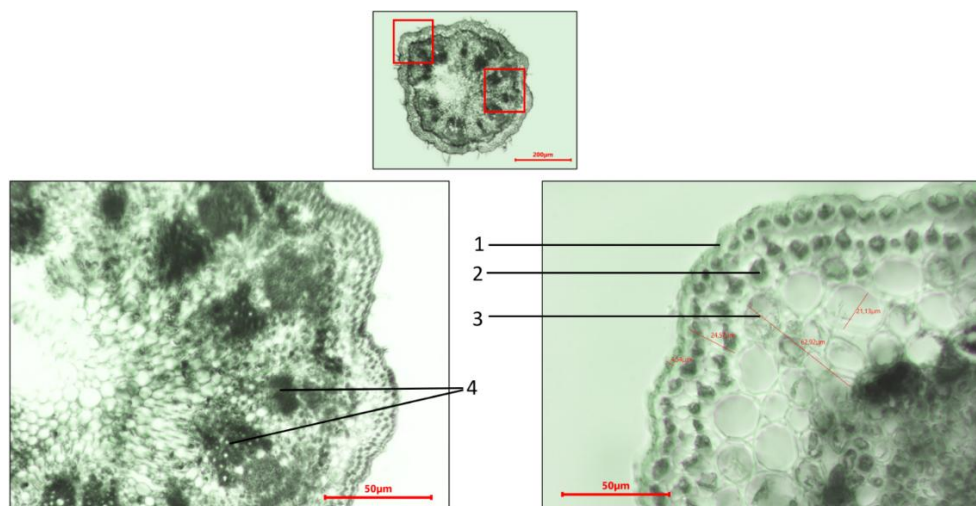
Начиная с одного края плодоножки, развивается семя, семенные клетки покрыты богатыми питательными веществами, клетками паренхимы. Клетки паренхимы крошечные, образуют несколько рядов.



1 – экзокарпий; 2 – мезокарпий; 3 – эндокарпий; 4 – склерифицированные клетки; 5 – идиобласты; 6 – клетки паренхимы.

Рисунок 13 – Анатомическое строение околоплодника *Hedysarum semenowii*

Корень в поперечном срезе схож по анатомическому строению со стеблем *H. semenowii*. Форма овальная. Наружный слой корня представлен покровной тканью — ризодермой (Рисунок 14). Под покровной тканью находится первичная кора, толщина которой составляет 3-4 слоя в ребристых углах корня. Проводящие пучки (флоэма и ксилема) расположены наиболее рассеянно. Клетки флоэмы маленькие, образуют 8-9 слоев и расположены по кругу. Клетки ксилемы крупные, рассредоточенные. Клетки центрального цилиндра относительно маленькие, сферические.



1 – эпидесмис; 2 – губчатый мезофилл; 3 – паренхима; 4 – проводящие пучки.

Рисунок 14 – Анатомическое строение корня *Hedysarum semenowii*

В целях выявления диагностических критериев, позволяющих отличить вид копеечника Семенова от наиболее широко применяемых в практике видов таких как *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. polybotrys* и *H. neglectum*, проведена сравнительная оценка их морфологических и анатомических признаков. *H. semenowii* характеризуется высокими побегами (до 100 см) и специфической формой листьев, состоящих из 7-10 пар широкояйцевидных или почти округлых листочков, в то время как у копеечника альпийского и желтеющего количество пар листочков меньше и их форма ближе в эллиптической [44]. Соцветия копеечника Семенова представлены кистями с ярко-желтым венчиком, что является ключевым отличием от розово-фиолетового копеечника забытого и альпийского [17,66]. Венчик копеечника желтеющего так же имеет желтый цвет, однако обладает более крупным размером (до 2 см). Плоды *H. semenowii* отличаются большим количеством члеников и более квадратной формой в отличии от *H. alpinum* и *H. flavescens* [17]. При микроскопическом исследовании стебля копеечника Семенова выявлено наличие мощной тяжистой склеренхимы в ребрах (до 7 слоев), что превосходит показатели копеечника альпийского. В строении листовой пластинки диагностическим признаком служит асимметрия кутикулы, меньшее количество слоев полисадной ткани (до 3 слоев). В ходе исследования определены микроскопические признаки цветков и плодов копеечника Семенова, однако в связи с отсутствием литературных данных об анатомии цветков и плодов *H. alpinum* и *H. flavescens*, провести их сравнение не представилось возможным.

Корни копеечника Семенова отличаются от *H. polybotrys* и *H. neglectum* желто-коричневой окраской и менее выраженной деревянистостью. Анатомически корень *H. semenowii* сохраняет овальную форму на срезе и не имеет столь выраженных радиальных лучей как у *H. polybotrys*. Результаты макроскопического и микроскопического исследования оформлены в составе объекта авторского права (Приложение А).

3.3 Фитохимический анализ копеечника Семенова

Для идентификации основных групп биологически активных соединений в растительном сырье копеечника Семенова (трава и корни) был проведен предварительный анализ с использованием общепринятых качественных реакций. Результаты подтвердили присутствие в траве и корнях следующих групп вторичных метаболитов, таких как: флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, кумарины и полисахариды.

Количественный анализ выявил органоспецифичность в накоплении отдельных групп метаболитов. Трава копеечника Семенова выступает основным местом локализации полифенольных соединений. Содержание флавоноидов в траве достигает $2,17 \pm 0,05$ %, что почти в 2,5 раза превышает их концентрацию в корнях ($0,88 \pm 0,03$ %). Аналогично, количество дубильных веществ в траве ($1,36 \pm 0,02$ %) более чем в 3 раза превышает показатель для корней ($0,44 \pm 0,03$ %). Содержание сапонинов также несколько выше в надземной части ($0,87 \pm 0,04$ % против $0,64 \pm 0,03$ % в корнях). В то же время кумарины распределены между органами наиболее равномерно, их концентрация в траве составляет $0,53 \pm 0,06$ %, в корнях – $0,48 \pm 0,11$ %. В отличие от метаболитов фенольной природы, корни характеризуются выраженным накоплением полисахаридов, содержание которых достигает почти 4 % ($3,73 \pm 0,22$ %), тогда как в траве – $1,6 \pm 0,07$ %. Тем не менее, поскольку проведенный скрининг и литературные данные указывают на наличие богатого полифенольного комплекса [4], в котором доминирующей группой выступают флавоноиды, следующим этапом исследования стало углубленное изучение их индивидуального компонентного состава.

С этой целью фитохимический состав *H. semenowii* анализировали при помощи метода RP-LC/DAD/ESI-QToF/MS/MS. В результате в траве было идентифицировано 36 соединений, включающих ряд флавононов, ксантонов, фенольных и других органических кислот (Таблица 6) [43]. В корнях копеечника Семенова было идентифицировано 27 соединений разных групп, преимущественно, изофлавоноидов, халконов и птерокарпанов. Вариации концентрации метанола не оказали существенного влияния на качественный состав экстрактов, в то время как использование этанола обеспечило экстракцию соединений, отсутствующих в метанольных извлечениях.

Флавонолы, флавоны и флаваноны

В надземной части *H. semenowii* флавоноиды представлены преимущественно производными кверцетина и, в меньшей степени, кемпферола. Идентификация агликонов проводилась на основании специфических максимумов поглощения и характерных фрагментов в спектрах MS/MS при m/z 301 и 285 соответственно [6]. Наиболее информативными для установления структуры флавоноидов оказались ионы, образующиеся в результате ретро-дильс-альдеровской (rDA) перегруппировки (типы $^{1,3}A^-$ и $^{1,3}B^-$). Структура кверцетина была подтверждена набором ионов $[M-H-CO]^-$, $[M-H-CO_2]^-$ и $[M-H-CO-CO_2]^-$ (m/z 273.0402, 257.0402, 229.0485), а также специфическими фрагментами rDA (m/z 178.9985, 151.0026, 121.0290, 107,0137) [43,109,110]. Для

его гликозидов ключевыми диагностическими признаками служили нейтральные потери остатков гексоз (162 Да для глюкозы и 146 Да для рамнозы) [43,109,111]. На основании этих данных, а также порядка элюирования, были идентифицированы рутозид (рутин), гиперозид и ряд других производных (в том числе, малонил- и ацетилглюкозиды) [6,43,112,113].

Также, идентифицированы кемпферол и его производные, включающие как О-гликозиды (например, никотифлорин), так и С-гликозиды, подтвержденные MS/MS фрагментами m/z 285.0667 и 151.0391 ($^{1,3}A^-$) [6,43,114]. Кроме того, в составе травы *H. semenowii* обнаружены изомеры мирицетин-О-глюкозида, изорамнетин-3-О-гексозид и нарингенин [43,115]. Однако, стоит отметить, что лютеолин был зафиксирован исключительно в этанольном экстракте надземной части *H. semenowii*.

Ксантоны

Ксантоновый профиль характеризуется наличием трех интенсивных УФ-максимумов (250–370 нм) [116]. Впервые для вида *H. semenowii* мангиферин идентифицирован как в надземной, так и в подземной частях растения. Его структура подтверждена сравнением с эталонным стандартом полученных спектроскопических и спектрометрических данных. Также отмечены его структурный изомер (изомангиферин) и производное с комбинированным типом связи – тетрагидроксиксантон-ди-О,С-гексозид (предположительно неомангиферин) [43,117].

Фенольные кислоты

Среди фенольных кислот, обнаруженных в надземной части копеечника Семенова, были идентифицированы гексозид дигидроксибензойной кислоты, изомеры гидроксибензойной кислоты-О-глюкозида, а также галловая кислота и её глюкозид, последние из которых эксклюзивны для данной части растения. В корнях обнаружена феруловая кислота [43].

Органические кислоты

В составе травы *H. semenowii*, также, идентифицированы яблочная, лимонная и хинная кислоты. При этом хинная кислота обнаружена только в надземной части. Тогда как, среди других органических кислот, присутствующих в надземной части, в корнях растения зафиксирована изоцитриновая кислота [43].

Изофлавоноиды

В корнях *H. semenowii* был подтвержден ряд характерных для рода соединений, относящихся к изофлавоноидам – метаболитам, обладающих выраженной фитоэстрогенной активностью [4,10]: формонетин, каликозин, афрормозин, а также их гликозилированные формы – ононин, каликозин-7-О-глюкозид и вистин. Анализ масс-спектров второго порядка (MS/MS) позволил детально изучить структуру агликонов. Основным механизмом фрагментации для депротонированных ионов $[M-H]^-$ являлась последовательная элиминация малых нейтральных молекул. Особую ценность для установления типа и локализации заместителей в кольцах А и В представили фрагменты ретро-Дильса-Альдера (rDA) [43]. Для О-глюкозидов изофлавонов в режиме отрицательной ионизации характерно образование аддуктов с муравьиной

кислотой $[M+HCOO]^-$. Разрыв гликозидной связи сопровождался нейтральной потерей остатка гексозы (-162 Da), приводя к появлению интенсивного пика свободного агликаона [43,71].

Среди минорных компонентов на основании точных масс и данных масс-спектрометрических баз были идентифицированы биоханин А, псевдобаптигенин и их производные – сиссотрин-4'-О-глюкозид и псевдобаптигенин-О-глюкозид. Для соединений со схожими значениями m/z дифференциация проводилась по специфическим потерям: для афрормозина характерна элиминация метильной группы (-15 Da), тогда как для ирилона – потеря 30 Da, типичная для метилendioкси-замещенных структур [43,118].

Халконы

Халконы были представлены двумя структурами: ликворитигенином и изоликворитигенином. Фрагментация депротонированного иона m/z 255.0656 ($C_{15}H_{12}O_4$) приводила к образованию диагностических ионов m/z 135.0086 и 119.0492, что согласуется с путями распада данных полифенолов [43,115,119].

Птерокарпаны

Из группы птерокарпанов основным соединением в корнях *H. semenowii* является медикарпин (m/z 269.0775, $C_{16}H_{14}O_4$). Его MS/MS-спектр характеризовался интенсивным пиком $[M-H-CH_3]^-$ (m/z 254.0598) и специфическими разрывами связей в кольцах А и D (ионы m/z 161.0279, 145.0306, 133.0288 и 132.0223). Аналогичный характер фрагментации наблюдался для медикарпин-3-О-глюкозида, где ион агликаона (m/z 269.0807) образовывался после потери гексозного фрагмента из аддукта $[M+HCOO]^-$ [43,120].

Таблица 6 – Соединения, идентифицированные в *Hedysarum semenowii*

№	Соединение, молекулярная формула	t_R (мин)	$m/z_{эксп}$	$m/z_{теор}$ (Δ , ppm)	MS/MS фрагменты	Экстракты
1	2	3	4	5	6	7
Флавонолы, флавоны и флаваноны						
1.	Кемпферол-С- глюкозид, $C_{21}H_{22}O_{10}$	12.43	433.1106	433.114 (7.88)	343.0830; 313.0667; 285.0764; 283.0667; 151.0391	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
2.	Кверцетин-О- дигексозид, $C_{27}H_{30}O_{17}$	18.89	625.1393	625.141 (2.75)	301.0338; 300.0279; 271.0217; 255.0315; 179.0028; 151.0007	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
3.	Производное кверцетина	19.17	755.1970	—	301.0225; 300.0190; 271.0142; 255.0173; 178.9828; 150.9940	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
4.	Изомер 1 мирицетин- О-глюкозида, C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	20.23	479.0836	479.0831 (-1.01)	317.0279; 316.0221 ; 287.0190; 271.0244; 178.9987; 151.0049	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
5.	Кверцетин-О- галактозид, C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	21.16	463.0897	463.0882 (-3.23)	301.0368; 300.0295; 271.0262; 255.0310; 178.9994; 151.0041	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
6.	Кверцетин-3- глюкозид-7-рамнозид, C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	21.41	609.1473	609.1461 (-1.95)	301.0282; 300.0190 ; 284.0272; 271.0198; 255.0251; 178.9949; 150.9998	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
7.	Кемпферол-О- дирамнозид-глюкозид	21.68	739.1830	—	593.1187; 284.0193 ; 285.0321; 255.0178; 227.0255; 150.9893	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
8.	Кверцетин-3-О- глюкозид, C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	22.46	463.0897	463.0882 (-3.23)	403.0546; 343.0350; 301.0266 ; 178.9930; 150.9969	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
9.	Кверцетин-3-О- арабинозид-7- глюкозид, C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	22.94	595.1278	595.1305 (4.46)	463.0855; 301.0284; 300.0226 ; 271.0184; 179.0165	Hs_Et50
10.	Рутозид, C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	23.48	609.1473	609.1461 (-1.95)	301.0316; 300.0227; 271.0230; 255.0296; 178.9974; 151.0001	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
11.	Никотифлорин, $C_{27}H_{30}O_{15}$	24.18	593.1500	593.1512 (2.01)	285.0345; 284.0272; 255.0228; 227.0324; 150.9953	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
12.	Гиперозид, $C_{21}H_{20}O_{12}$	24.66	463.0841	463.0882 (8.83)	301.0368 ; 300.0295; 271.0262; 255.0310; 178.9994; 151.0041	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
13.	Пентагидроксифлаво- н-О-пентозид (Кверцетин-О- пентозид), $C_{20}H_{18}O_{11}$	28.27	433.0862	433.0776 (4.23)	301.0271; 300.0232 ; 271.0219; 255.0246; 243.0297; 178.9921; 151.0034	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
14.	Гексагидроксифлаво- н-О-гексозид (изомер 2 мирицетин-О- гексозида), $C_{21}H_{20}O_{13}$	28.51	479.0808	479.0831 (4.82)	317.0135 ; 316.0078; 178.9947; 151.0001; 137.0207	Hs_Et50
15.	Тетрагидроксифлаво- н-3-О-гексозид (Кемпферол-О- гексозид), $C_{21}H_{20}O_{11}$	29.17	447.0933	447.0933 (-0.03)	285.0364; 284.0328 ; 255.0289; 151.00	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
16.	Тетрагидроксифлаво- н-3-О-гексозид-пентозид (Кемпферол-3-О- гексозид-пентозид) изомер 2, $C_{27}H_{30}O_{15}$	29.44	593.1474	593.1512 (6.39)	285.0345 ; 284.0272; 255.0354; 151.0004	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
17.	Изорафнетин-3-О- гексозид, $C_{22}H_{22}O_{12}$	30.07	477.1033	477.1038 (1.15)	447.0863; 315.0404 ; 314.0410; 271.0492; 151.0006	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
18.	Кверцетин-3-О- малонилаглюкозид, $C_{24}H_{22}O_{15}$	31.75	549.0917	549.0886 (-5.65)	505.0982; 463.0928; 301.0329; 300.0272; 271.0245; 255.0308; 179.0063; 151.0041	Hs_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
19.	Кверцетин-О-ацетилглюкозид, $C_{23}H_{22}O_{13}$	36.57	505.1002	505.0988 (2.84)	445.0757; 427.0680; 343.0412; 301.0327	Hs_Et50
20.	Кверцетин, $C_{15}H_{10}O_7$	42.78	301.0362	301.0354 (-2.73)	273.0402; 257.0402; 229.0485; 178.9985; 151.0026 ; 149.0323; 121.0290; 107.0137	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
21.	Лютеолин, $C_{15}H_{10}O_6$	43.11	285.0428	285.0405 (-8.17)	151.0004; 133.0224	Hs_Et50
22.	Нарингенин, $C_{15}H_{12}O_5$	45.16	271.0616	271.0612 (-1.48)	227.0837; 177.0212; 151.0034 ; 119.0478; 107.0177; 93.0314	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
Ксантоны						
23.	Тетрагидроксиксантон-ди-О,С-гексозид (неомангиферин), $C_{25}H_{28}O_{16}$	12.89	583.1284	583.1305 (3.52)	493.0971; 463.0866; 421.0732; 331.0447; 301.0347; 271.0306; 259.0215	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
24.	Мангиферин, $C_{19}H_{18}O_{11}$	14.87	421.0780	421.0776 (-0.86)	331.0394 ; 301.0287; 271.0273; 259.0161	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
25.	Изомангиферин, $C_{19}H_{18}O_{11}$	16.08	421.0744	421.0776 (7.66)	331.0471; 301.0366; 259.0259	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50
Фенольные кислоты						
26.	Галловая кислота, $C_7H_6O_5$	4.62	169.0128	169.0142 (8.51)	125.0166 ; 79.0155; 51.0226	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
27.	Изомер 1 О-глюкозида гидроксибензойной кислоты, C ₁₃ H ₁₆ O ₈	5.32	299.0783	299.0772 (-3.53)	137.0186; 93.0300	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
28.	Неизвестное соединение	7.03	231.1215	—	213.1220; 195.1123; 185.1262	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
29.	Гексозид дигидроксибензойной кислоты, C ₁₃ H ₁₆ O ₅	8.23	315.0710	315.0722 (3.66)	153.0271; 109.0274	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
30.	Изомер 2 О-глюкозида гидроксибензойной кислоты, C ₁₃ H ₁₆ O ₈	10.77	299.0745	299.0772 (9.13)	137.0129; 93.0251	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
31.	Галлоилглюкозид, C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	12.11	331.0659	331.0671 (3.52)	313.0541; 169.0096; 168.0043; 149.9948; 125.0224	Hs_Et50
32.	Феруловая кислота, C ₁₀ H ₁₀ O ₄	19.79	193.0510	193.0506 (-1.89)	179.0314; 178.0255; 149.0607; 134.0367	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
Органические кислоты						
33.	Хинная кислота, C ₇ H ₁₂ O ₆	1.98	191.0557	191.0561 (2.14)	173.0416, 127.0364, 111.0409; 85.0273	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
34.	Яблочная кислота, $C_4H_6O_5$	2.14	133.0138	133.0142 (3.33)	115.0029 ; 89.0231; 71.0136	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
35.	Лимонная кислота, $C_6H_8O_7$	2.62	191.0175	191.0197 (11.59)	111.0085 ; 87.0090; 57.0348	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
36.	Изоцитриновая кислота, $C_6H_8O_7$	4.05	191.0196	191.0197 (0.66)	155.009; 111.0075; 87.0076	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
Изофлавоны						
37.	Каликозин-7-О- глюкозид, $C_{22}H_{22}O_{10}$	20.85	491.1174	491.1195 (4.71)	283.0634; 268.0429; 211.0309; 184.0499	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
38.	Псевдобаптигенин-О- глюкозид, $C_{22}H_{20}O_{10}$	32.93	489.1021	489.1038 (3.94)	281.0468; 253.0516; 225.0576; 135.0144	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
39.	Ононин, $C_{22}H_{22}O_9$	34.40	475.1259	475.1246 (-3.06)	267.0630; 252.0438	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
40.	Афрормозин-О- глюкозид (вистин), $C_{23}H_{24}O_{10}$	36.29	505.1339	505.1351 (2.72)	297.0775; 282.0533; 267.0293; 254.0803; 239.0333; 195.0482	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
41.	Каликозин, $C_{16}H_{12}O_5$	40.62	283.0606	283.0612 (2.1)	268.0387 ; 224.0413; 211.00402; 195.0403; 184.0519; 148.0168; 135.0100; 120.0214	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
42.	Сиссотрин-4'-О- глюкозид, C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	42.84	491.1209	491.1195 (-3.14)	445.1154; 283.0598; 268.0292	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
43.	Изоформононетин, C ₁₆ H ₁₂ O ₄	43.30	267.0659	267.0663 (1.43)	252.0393; 223.0393; 208.0530; 195.0461; 135.0315; 132.0214	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
44.	Псевдобаптигенин, C ₁₆ H ₁₀ O ₅	50.06	281.0462	281.0455 (-2.32)	253.0499 ; 251.0360; 223.0396; 195.0449; 135.0093	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
45.	Формононетин, C ₁₆ H ₁₂ O ₄	50.95	267.0654	267.0663 (3.29)	252.0389 ; 223.0407; 208.0541; 195.0457; 135.0251; 132.0215	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
46.	Афрормосин, C ₁₇ H ₁₄ O ₅	51.37	297.0743	297.0768 (8.54)	282.0533; 267.0293; 254.0803; 239.0333; 195.0482	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
47.	Ирилоне, C ₁₆ H ₁₀ O ₆	52.62	297.0385	297.0405 (-6.58)	282.438; 269.0455; 267.0289; 241.0502	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
48.	Биочанин А, C ₁₆ H ₁₂ O ₅	59.06	283.0637	283.0612 (-8.81)	268.0381; 240.0419; 239.0377; 211.0410; 224.0489; 240.0419; 195.0441; 183.0440; 163.0036; 151.0054; 135.0097; 132.0208; 109.0303	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
Халконы						
49.	Ликиритигенин, $C_{15}H_{12}O_4$	38.14	255.0656	255.0663 (-2.66)	135.0086; 119.0492	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
50.	Изоликвиритигенин, $C_{15}H_{12}O_4$	52.03	255.0656	255.0663 (2.66)	135.0081 ; 119.0466; 91.0184	Hs_M99, Hs_M70, Hs_M50, Hs_Et50, HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
Птерокарпаны						
51.	Медикарпин-3-О- глюкозид, $C_{22}H_{24}O_9$	40.86	477.1411	477.1402 (-1.81)	431.1238; 269.0807; 254.0481; 161.0228; 133.0298; 132.0207	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
52.	Медикарпин, $C_{16}H_{14}O_4$	54.13	269.0790	269.0819 (10.86)	254.0598; 161.0279; 145.0306; 133.0288; 132.0223	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50
Углеводы						
53.	Сахароза, $C_{15}H_{18}O_9$	1.97	341.1076	—	179.0549; 161.0452; 149.0429; 119.0336	HsR_M99, HsR_M70, HsR_M50, HsR_Et50

* t_R – время удерживания; $m/z_{ЭКСП}$ – экспериментальное значение m/z ; $m/z_{ТЕОР}$ – теоретическое (расчетное) значение m/z ; Δ – ошибка (погрешность) массы; MS/MS фрагменты – продукты ионы (фрагментные ионы).

Ряд идентифицированных в ходе исследования соединений ранее описывался в научной литературе в составе других видов рода копеечник: галловая кислота обнаружена в *H. neglectum*, *H. alpinum*, *H. flavescens*; мангиферин – в *H. neglectum*, *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. inundatum*, *H. caucasicum*, *H. denticulatum*; изомангиферин – в *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. inundatum*, *H. denticulatum*; гиперозид – в *H. neglectum*, *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. inundatum*, *H. vicioides*, *H. sachalinense*, *H. caucasicum*; каликозин и нарингенин – в *H. polybotrys*; кверцетин – *H. setigerum*, *H. neglectum*, *H. alpinum*, *H. flavescens*, *H. inundatum*, *H. caucasicum*; формононетин – в *H. polybotrys*, *H. neglectum*, *H. theinum*, *H. kirghisorum*; ононин – в *H. polybotrys*, *H. neglectum*, *H. kirghisorum*; медикарпин – в *H. polybotrys*, *H. theinum* [4,76,107].

Согласно настоящим исследованиям, впервые для *H. semenowii* и рода

Hedysarum L. в целом обнаружено содержание яблочной, хинной, феруловой, лимонной и изоцитриновой кислот [4,43]. Данные соединения, широко распространенные в различных растениях, обладают выраженным антиоксидантными, антимикробными и противовоспалительными свойствами [43]. В то же время, несмотря на имеющиеся в литературе сведения о наличии в копеечнике Семенова таких соединений, как даукостерол, гедисаримптерокарпен В, бетулиновая кислота и гуанозин, в исследуемых образцах они идентифицированы не были. Их отсутствие может быть обусловлено рядом факторов, включающих влияние эколого-географических условий произрастания, фазу вегетации во время сбора или методы экстракции и пробоподготовки, а также содержание веществ в количестве ниже предела обнаружения.

3.4 Количественное определение мангиферина в траве копеечника Семенова

Содержание мангиферина и его производных ранее было определено только в надземных частях растений рода копеечник. Согласно настоящим исследованиям мангиферин также обнаружен в корнях *H. semenowii*, однако в значительно меньшем количестве в сравнении с травой. Мангиферин и изомангиферин известны как соединения с широким спектром фармакологической активности, в том числе антиоксидантной, противовоспалительной, антипролиферативной, противовирусной (сравнима с ацикловиром против вируса простого герпеса) активностью и умеренным антимикробным действием против штаммов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Aspergillus niger* [43].

Количественное определение мангиферина проводилось в трехкратной повторности для каждого вида экстракта, полученного из травы в расчете на 1 г сырья (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты количественного определения мангиферина в траве *Hedysarum semenowii*

Экстракт	Содержание мангиферина в экстракте, мг/г	Выход сухого экстракта из сырья, %	Расчетное содержание мангиферина в сухом сырье, %
Hs_M99	1,52 ± 0,018	14,36	0,022± 0,003
Hs_M70	1,89 ± 0,062	25,43	0,048± 0,016
Hs_M50	2,00 ± 0,005	23,13	0,046± 0,001
Hs_Et50	5,46 ± 0,014	27,40	0,150± 0,004

Установлено, что содержание мангиферина существенно варьируется в зависимости от условий экстрагирования: в экстрактах на основе 50%-го этанола его концентрация почти втрое превышала показатели других образцов. Вместе с тем, при сопоставлении проб Hs_M99, Hs_M70 и Hs_M50 значимого влияния концентрации растворителя на выход мангиферина выявлено не было.

3.5 Изучение аминокислотного состава копеечника Семенова

Результаты изучения аминокислотного состава надземной части *H. semenowii* показали, что для изучаемого объекта характерно наличие 11 аминокислот, из них 6 незаменимых аминокислот – валин, изолейцин+лейцин, лизин, метионин, треонин, фенилаланин (Рисунок 15, Таблица 8). В наибольшем количестве в сырье накапливается аргинин – $1,875 \pm 0,094$ %. В значительных количествах были обнаружены лейцин+изолейцин – $1,146 \pm 0,057$ %, пролин – $1,000 \pm 0,050$ %, валин – $0,979 \pm 0,049$ %, метионин – $0,959 \pm 0,048$ %, фенилаланин – $0,854 \pm 0,042$ %. В наименьшем количестве присутствует аминокислота серин – $0,594 \pm 0,030$ %.

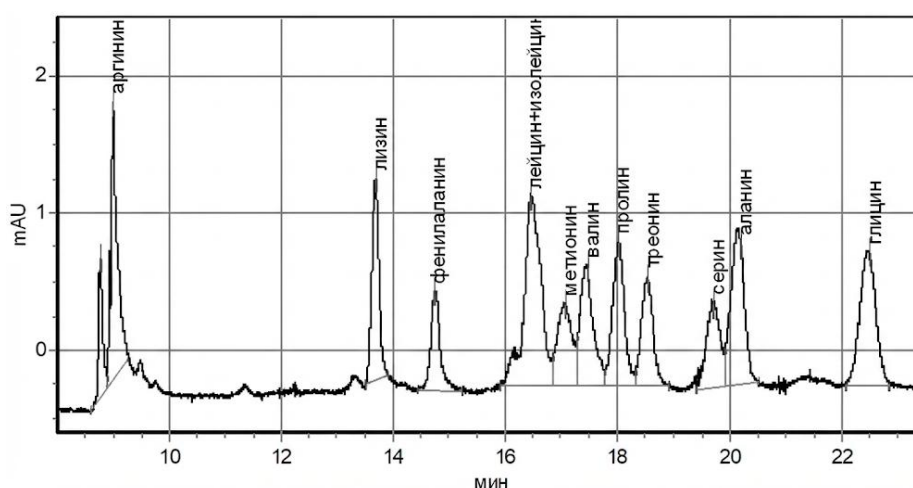


Рисунок 15 – Аминокислотный состав травы *Hedysarum semenowii*

Таблица 8 – Результаты аминокислотного анализа травы *Hedysarum semenowii*

№	Наименование компонента	Концентрация, мг/л	Массовая доля аминокислот, %
1	Аргинин	180,0	$1,875 \pm 0,094$
2	Лизин	63,0	$0,656 \pm 0,033$
3	Фенилаланин	82,0	$0,854 \pm 0,042$
4	Лейцин + Изолейцин	110,0	$1,146 \pm 0,057$
5	Метионин	92,0	$0,959 \pm 0,048$
6	Валин	94,0	$0,979 \pm 0,049$
7	Пролин	96,0	$1,000 \pm 0,050$
8	Треонин	76,0	$0,792 \pm 0,040$
9	Серин	57,0	$0,594 \pm 0,030$
10	Аланин	81,0	$0,844 \pm 0,042$
11	Глицин	67,0	$0,698 \pm 0,035$

В результате исследования в корнях *H. semenowii* было идентифицировано и количественно определено 13 аминокислот, включая 7 незаменимых для организма человека (лизин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, метионин, валин, треонин) (Рисунок 16, Таблица 9). Лидером по содержанию среди всех определенных компонентов является пролин ($1,474 \pm 0,074$ %). Высокое

содержание пролина характерно для растений семейства *Fabaceae*, особенно произрастающих в условиях аридных зон или высокогорья, что соответствует ареалу произрастания *H. semenowii* на территории Казахстана [17,19]. Второе место по содержанию занимают разветвленные аминокислоты, повышающие адаптационный потенциал растения, лейцин и изолейцин ($0,947 \pm 0,047 \%$), после которых следует валин ($0,789 \pm 0,039 \%$) [121].

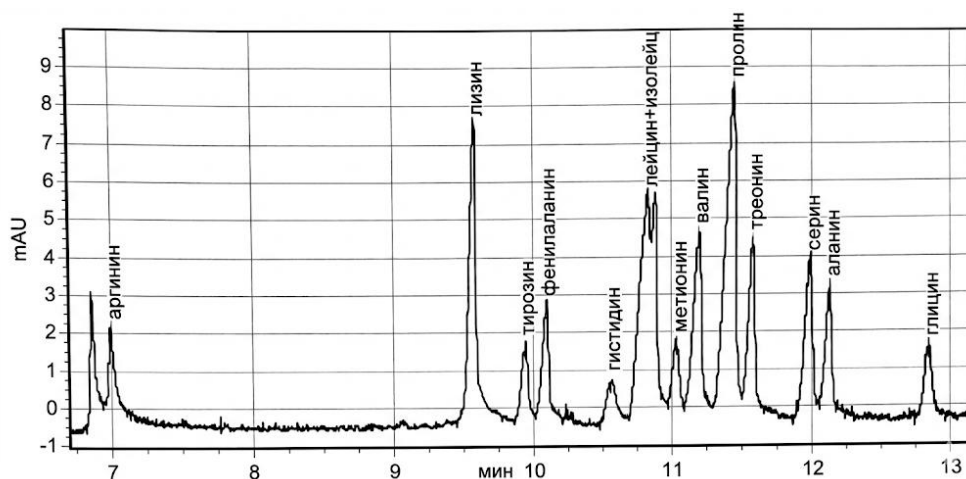


Рисунок 16 – Аминокислотный состав корней *Hedysarum semenowii*

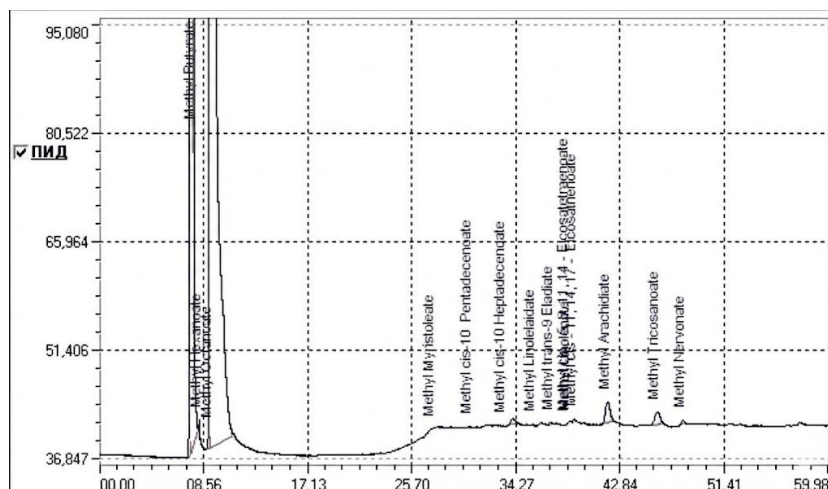
Таблица 9 – Результаты аминокислотного анализа корней *Hedysarum semenowii*

№	Наименование компонента	Концентрация, мг/л	Массовая доля аминокислот, %
1	Аргинин	92,0	$0,484 \pm 0,024$
2	Лизин	140,0	$0,737 \pm 0,037$
3	Тирозин	77,0	$0,405 \pm 0,020$
4	Фенилаланин	110,0	$0,579 \pm 0,029$
5	Гистидин	60,0	$0,316 \pm 0,016$
6	Лейцин+Изолейцин	180,0	$0,947 \pm 0,047$
7	Метионин	68,0	$0,358 \pm 0,018$
8	Валин	150,0	$0,789 \pm 0,039$
9	Пролин	280,0	$1,474 \pm 0,074$
10	Треонин	100,0	$0,526 \pm 0,026$
11	Серин	93,0	$0,489 \pm 0,024$
12	Аланин	53,0	$0,279 \pm 0,014$
13	Глицин	30,0	$0,158 \pm 0,008$

Суммарное содержание незаменимых аминокислот в исследуемых корнях свидетельствует о высокой биологической ценности сырья. Лизин и аргинин, характерны для бобовых культур [122]. Фенилаланин и тирозин являются ключевыми предшественниками в шикиматном пути биосинтеза полифенолов [121]. Высокое содержание фенилаланина коррелирует с обнаруженным богатым составом флавоноидов и ксантонов (мангиферина) в данном виде [123]. Относительно высокое стандартное отклонение обусловлено естественной

популяционной вариабельностью дикорастущего растительного сырья, собранного в природных условиях, а также матричными эффектами при проведении гидролиза.

3.6 Изучение жирнокислотного состава копеечника Семенова



Для корректного применения метода внутренней нормализации доли оставшихся идентифицированных компонентов были пересчитаны (сумма площадей принята за 100%) (Таблица 10). После пересчета установлено, что преобладающим детектируемым компонентом в траве оказалась капроновая (гексановая) кислота. Эйкозатетраеновая, эйкозатриеновая и нервоновая кислоты были обнаружены в следовых количествах.

№	Жирные кислоты	Относительное содержание (% от суммы площадей)
1	Капроновая кислота	93,77
2	Каприловая кислота	0,42
3	Пентадециловая кислота	1,45
4	Маргариновая кислота	0,70
5	Эйкозатетраеновая кислота	0,88
6	Эйкозатриеновая кислота	1,43
7	Арахидовая кислота	0,20
8	Трикозановая кислота	1,05
9	Нервоновая кислота	0,10

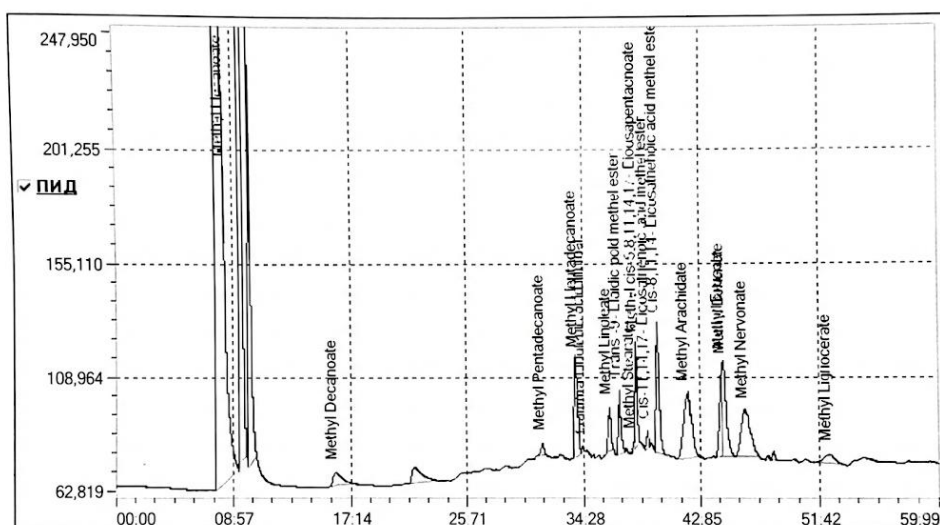


Таблица 11 – Результаты анализа жирных кислот корней *Hedysarum semenowii*

№	Жирные кислоты	Относительное содержание (% от суммы площадей)
1	Арахидовая кислота	52,21
2	Бегеновая кислота	14,36
3	Капроновая кислота	1,84
4	Каприновая кислота	1,22
5	Пентадекановая кислота	0,06
6	Гептадеценная (маргаролеиновая) кислота	6,73
7	γ-линоленовая кислота	< 0,01
8	Линолевая кислота	0,51
9	Элаидиновая кислота	0,92
10	Стеариновая кислота	0,01
11	Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК)	0,94
12	цис-11,14,17-эйкозатриеновая кислота	0,02
13	Дигомо- γ-линоленовая кислота (ДГЛК)	6,03
14	Эруковая кислота	2,58
15	Нервоновая кислота	11,28
16	Лигноцериновая кислота	1,29

После пересчета установлено, что среди идентифицированных компонентов доминируют длинноцепочечные насыщенные кислоты: арахидовая (52,21 %), бегеновая (14,36 %) и нервоновая (11,28 %). Наличие этих кислот характерно для защитных структур корня, так как они входят в состав суберина и растительных восков, обеспечивающих барьерные функции [126].

В корнях копеечника отмечено преобладание ненасыщенных жирных кислот и их качественный состав весьма разнообразен: эруковая, нервоновая и гептадеценная (редко встречающаяся в растениях) [121], линолевая, γ-линоленовая, а также эйкозапентаеновая кислоты.

Следует отметить, что в связи с отсутствием в исследуемых образцах классических доминирующих кислот (олеиновой, пальмитиновой) и идентификацией редких для наземных растений метаболитов (нервоновая кислота), для окончательного подтверждения жирнокислотного состава требуется дополнительная верификация методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

3.7 Определение витаминного состава копеечника Семенова

Количественное определение содержания витаминов в *H. semenowii* проводилось с целью установления биологической ценности сырья. Результаты анализа выявили присутствие широкого спектра витаминов группы В и витамина Е, при этом общая концентрация витаминов в надземной части значительно превышает таковое значение для корней (Таблица 12).

Таблица 12 – Витаминный состав травы и корней *Hedysarum semenowii*

№	Витамины	Количественное содержание, мг/100 г	
		Трава	Корни
1	Витамин С (аскорбиновая кислота)	0,05±0,001	-
2	Витамин Е (токоферол)	9,88±0,050	11,18±0,02
3	Витамин В ₁ (тиамин)	0,86±0,172	0,31±0,062
4	Витамин В ₂ (рибофлавин)	3,25±1,365	1,04±0,044
5	Витамин В ₃ (ниацин)	5,65±1,130	1,75±0,035
6	Витамин В ₅ (пантотеновая кислота)	1,28±0,230	0,47±0,085
7	Витамин В ₆ (пиридоксин)	0,64±0,128	0,26±0,052
8	В _с (фолиевая кислота)	0,32±0,064	0,11±0,021

Витамин Е является одним из ключевых компонентов обеих частей растения, преобладая в корнях растения. Более высокая концентрация витамина Е в корнях может быть связана с защитой мембран клеток от окислительного стресса в условиях почвенного анаэробноза или низких температур. Полученные значения сопоставимы с данными для других представителей семейства *Fabaceae*, таких как *H. theinum* [127]. Аномально низкое содержание аскорбиновой кислоты в траве (0,05 мг/100 г) обусловлено, вероятнее всего, ее деструкцией в процессе термической сушки и хранения образцов.

Согласно полученным данным, обнаружено значительное преобладание витаминов группы В в надземной части *H. semenowii*, в частности витамин В₃ (ниацин) и витамин В₂ (рибофлавин). Ниацин играет ключевую роль в окислительно-восстановительных процессах, тогда как рибофлавин является кофактором многих ферментов. Высокая концентрация в траве обусловлена интенсивностью азотистого и энергетического обмена в вегетирующих органах [128].

3.8 Определение минерального состава копеечника Семенова

В результате исследования минерального состава было установлено содержание 10 макро- и микроэлементов в траве и корнях копеечника Семенова (Таблица 13). Результаты количественного определения элементного состава выявили значительную концентрацию макро- и микроэлементов в обеих частях растения, при этом для большинства минералов характерна преимущественная аккумуляция в надземной части.

Среди макроэлементов в траве отмечено высокое содержание калия, кальция, фосфора и магния, тогда как в корнях их содержание было достоверно ниже. Наибольшая разница наблюдается в количестве кальция, которое в 3 раза выше в траве (1503,27±22,55 мг и 405,88±5,68 мг, на 100 г травы и корней, соответственно). Высокий уровень калия и кальция характерен для лекарственных растений, что подтверждается литературными данными, согласно которым данные элементы являются преобладающими макроэлементами и могут достигать нескольких тысяч мг/кг сухого сырья [129]. Содержание натрия в траве (792,15±5,87 мг/100 г) более чем в 8 раз превышает аналогичный показатель в корнях (92,75±1,86 мг/100 г), что свидетельствует о

преимущественном накоплении элемента в фотосинтетически активных тканях.

Таблица 13 – Минеральный состав травы и корней *Hedysarum semenowii*

№	Наименование элемента	Количественное содержание	
		Трава	Корни
1	Fe (Железо), мг/100 г	4,11±0,05	2,28±0,02
2	Cu (Медь), мг/100 г	0,12±0,009	0,084±0,001
3	Zn (Цинк), мг/100 г	3,54±0,06	2,48±0,03
4	Na (Натрий), мг/100 г	792,15±5,87	92,75±1,86
5	Mg (Магний), мг/100 г	161,78±2,31	103,21±2,17
6	Ca (Кальций), мг/100 г	1503,27±22,55	405,88±5,68
7	K (Калий), мг/100 г	1879,09±33,82	714,05±12,85
8	P (Фосфор), мг/100 г	1276,36±19,14	446,73±6,70
9	Se (Селен), мг/100 г	0,087±0,005	0,049±0,005
10	N (Азот), %	2,81±0,08	3,19±0,05

Содержание азота, напротив, было выше в корнях (3,19±0,05%), чем в траве (2,81±0,08%), что может быть связано с его участием в синтезе белков и ферментов корневой системы. Известно, что азот является одним из ключевых макроэлементов, определяющих интенсивность роста и метаболизма растений [130].

Содержание микроэлементов железа, цинка и меди также выше в траве. Железо, являясь важным компонентом фотосинтетического аппарата, часто аккумулируется в листьях. Медь и цинк входят в состав различных оксидоредуктаз и также необходимы для процессов фотосинтеза, что объясняет их более высокое содержание в ассимилирующих органах [131]. Содержание селена в исследуемом растении находилось на низком уровне и составляло 0,087±0,005 мг/100 г в траве и 0,049±0,005 мг/100 г в корнях, что соответствует данным других исследований, согласно которым данный элемент присутствует в лекарственных растениях в следовых количествах [129].

Копеечник Семенова характеризуется высоким содержанием биогенных макроэлементов (K, Ca, P – более 1 г на 100 г) и микроэлементов (Fe и Zn – более 3 мг на 100 г), особенно в траве, что подтверждает ее потенциальную ценность как источника минеральных веществ.

Выводы по третьей главе

Третья глава диссертационного исследования представляет собой фундаментальную базу для фармакогностической стандартизации копеечника Семенова, в которой детально проанализированы макро- и микроскопические особенности растения с его фитохимическим профилем.

Микроскопический анализ позволил установить четкие диагностические признаки, отличающие *H. semenowii* от близкородственных видов и необходимые для исключения фальсификации сырья. В частности, анатомия стебля характеризуется овальной формой с хорошо развитой склеренхимой в ребристых углах (до 6-7 слоев), полным отсутствием трихом и идиобластов, содержащих мангиферин, в паренхиме сердцевины. Листья растения обладают выраженной асимметрией кутикулы (абаксиальная сторона в 1,5–2 раза толще адаксиальной) и рыхлым мезофиллом с малым числом слоев палисадных клеток (1-3 слоя). В отличие от официальных видов (например, *H. neglectum*), корневая система *H. semenowii* имеет желто-коричневую окраску и почти цилиндрическую форму.

Результаты предварительного фитохимического скрининга свидетельствуют о том, что надземная часть исследуемого растения характеризуется более высоким содержанием полифенольных соединений в сравнении с корнями. Для установления качественного состава индивидуальных компонентов флавоноидного комплекса необходимо было проведение углубленного хроматографического профилирования с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

С использованием ВЭЖХ с tandemной масс-спектрометрией в сырье было идентифицировано 53 соединения, что существенно расширяет хемотаксономические данные о виде. Главный вывод фитохимического скрининга заключается в дифференциации вторичных метаболитов между надземными и подземными органами (в траве 36 соединений, в корнях – 27): трава характеризуется доминированием флавонолов, представленных преимущественно производными кверцетина и кемпферола; корни являются местом селективного накопления изофлавоноидов (включая формонетин, ононин, каликозин и афрормозин) и птерокарпанов. Важно отметить, что медикарпин и его 3-О-глюкозид обнаружены исключительно в корнях растения, что делает их надежными хемотаксономическими маркерами подземной части. Значимым научным открытием стало выявление ксантона – мангиферина – как в надземных, так и в подземных частях *H. semenowii*, что зафиксировано для данного вида впервые.

Анализ первичных метаболитов выявил механизмы адаптации растения к абиотическим стрессам горной среды. В траве идентифицировано 11, а в корнях 13 аминокислот. Отмечено высокое накопление пролина, а также аргинина и разветвленных аминокислот лейцина, изолейцина и валина. Эти соединения выступают в роли осмопротекторов, повышающих засухоустойчивость и адаптационный потенциал растения.

Профиль жирных кислот, полученный в ходе первичного газохроматографического скрининга, продемонстрировал преобладание

капроновой (гексановой) кислоты в траве и длинноцепочечных насыщенных кислот в корнях (доминирует арахидоновая кислота), выполняющих защитные барьерные функции. Идентификация специфических редких метаболитов (нервоновой, эйкозапентаеновой кислот) носит предварительный характер и требует верификации методом хромато-масс-спектрометрии.

Надземные органы копеечника Семенова активно концентрируют витамины группы В (ниацин, рибофлавин), макроэлементы (калий, кальций, фосфор, магний) и микроэлементы (железо, медь, цинк). Несмотря на то, что общая концентрация витаминов в надземной части превышает таковую для корней, корневая система отличается специфическим доминированием витамина Е (токоферола), защищающего клетки от окислительного стресса.

Морфологические и анатомические характеристики *H. semenowii* функционально определены его биохимическим профилем. Выявленное сочетание осмопротекторных аминокислот и богатого состава полифенолов отражает адаптацию растения к высокогорной среде. Данный комплекс признаков служит надежным диагностическим критерием для стандартизации вида копеечника Семенова и подтверждает его фармакогностический потенциал как перспективного источника биологически активных веществ с антиоксидантным действием.

4 СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (*HEDYSARUM SEMENOWII* REGEL & HERDER) И УСТАНОВЛЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ПРИЕМЛЕМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА

В рамках стандартизации лекарственного растительного сырья копеечника Семенова в виде травы и корней применялись подходы, рекомендованные нормативно-правовыми актами и фармакопейными требованиями Республики Казахстан и ЕАЭС. При разработке спецификаций качества были учтены обязательные испытания согласно руководству по разработке ЧФС для лекарственных растительных средств ФЕАЭС (Часть III) и общей монографии ГФ РК на ЛРС.

4.1 Разработка спецификации качества на траву копеечника Семенова

В ходе исследования разработана спецификация качества на лекарственное растительное сырье «Копеечника Семенова трава» (Приложение И, Ш).

Определение

Показатель «Определение» составлен с учетом таких обязательных атрибутов, как форма ЛРС, биномиальное научное название растения, период заготовки: «Собранная в фазу цветения, высушенная, цельная или измельченная трава многолетнего травянистого растения *Hedysarum semenowii* Regel & Herder».

Идентификация

Показатель качества «Идентификация» для травы копеечника Семенова составлен на основе ключевых макроскопических и микроскопических признаков, выявленных в ходе морфолого-анатомического исследования растительного сырья (описание приведено в Приложении Ш), а также качественного определения основной группы биологически активных соединений (флавоноиды) и маркерного соединения (мангиферин), при помощи качественной реакции и тонкослойной хроматографии, соответственно.

Тонкослойная хроматография

При разработке испытания на подлинность травы копеечника Семенова при помощи тонкослойной хроматографии руководствовались литературными данными по методикам определения флавоноидов и ксантонов в ЛРС. В связи с тем, что наличие мангиферина является отличительным хемотаксономическим признаком секции *Hedysarum*, он был выбран как основное маркерное соединение данного испытания [9,76].

Испытуемый раствор ЛРС готовили прибавлением 10 мл метанола к 1 г измельченной травы, смесь перемешивали в течение 10 мин, фильтровали и выпаривали растворитель при пониженном давлении. К остатку прибавляли 1 мл метанола. В качестве подвижной фазы выбрали элюент, оптимальный для хроматографирования подобных комплексов: этилацетат – метанол – муравьиная кислота – вода (8:2:1:1) [76,78]. ТСХ проводили согласно ГФ РК, т. 1, 2.2.27. восходящим способом до достижения фронтом растворителя 10 см.

После высушивания хроматограмму просматривали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. На хроматограммах испытуемого раствора четко

обнаруживались темные пятна (зоны подавления флуоресценции), соответствующие по положению стандарту мангиферина ($R_f 0,52 \pm 0,1$). Для подтверждения результатов пластинку опрыскивали 1 % спиртовым раствором алюминия хлорида и рассматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм, где пятна мангиферина приобретали характерную желтую флуоресценцию. Испытание было проведено в трех независимых повторностях.

Качественная реакция

Для идентификации флавоноидного комплекса в надземной части *H. semenowii* использовали цианидиновую пробу (пробу Шинода). К 2 мл очищенного спиртового извлечения прибавляли несколько капель концентрированной хлороводородной кислоты (HCl) и порцию металлического магния (20-30 мг). Наблюдалось интенсивное розово-красное окрашивание, подтверждающее наличие флавоноидов (флавонов и флавонолов, включая кверцетин и его производные) за счет их восстановления до соответствующих антоцианидинов.

Испытания

Содержание посторонних примесей в лекарственном растительном сырье регулируется согласно одобренному проекту ОФС ФЕАЭС на ЛРС [86].

Определение потери в массе при высушивании, общей золы и золы, нерастворимой в хлороводородной кислоте, проводили на трех сериях травы копеечника Семенова (Таблица 14). На основании полученных статистических данных были установлены нормативные критерии приемлемости.

Испытания по контролю показателя «Тяжелые металлы» проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии, а критерии приемлемости были установлены согласно требованиям общей монографии ГФ РК и Европейской фармакопеи (Ph.Eur.) «Herbal drugs» и технического регламента Таможенного союза по безопасности пищевой продукции (ТР ТС 021/2011, решение КТС № 880 от 09.12.2011 г.) (Таблица 14) [132].

Радиационная безопасность лекарственного растительного сырья регламентируется в соответствии с действующими требованиями приказа МЗ РК № ҚР ДСМ-71 от 02.08.2022 г., в части требований к содержанию радионуклидов в лекарственных растениях (травы, кора, корневище, плоды).

При установлении требований спецификации по показателю качества «Пестициды», перечень контролируемых контаминантов был оптимизирован на основе риск-ориентированного подхода и гармонизирован с требованиями безопасности пищевой продукции ТР ТС 021/2011, что обосновано природным происхождением дикорастущего сырья из экологически чистых высокогорных районов и скрининговым характером текущего этапа исследований.

Критерии приемлемости к испытанию «Микробиологическая чистота» установлены согласно требованиям ГФ РК II, т. 1, 5.1.8. с присвоением категории С [85].

Таблица 14 – Установление критериев качества для испытаний травы *Hedysarum semenowii*

№	Наименование испытания	Результаты испытания	Установленный критерий приемлемости
1	Посторонние примеси	Соответствует	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)
2	Потеря в массе при высушивании, %	7,9±0,92	не более 13,0
3	Тяжелые металлы и мышьяк: Cd (Кадмий), мг/кг Pb (Свинец), мг/кг Hg (Ртуть), мг/кг As (Мышьяк), мг/кг	0,0055±0,0005 0,2108±0,0236 Не обнаружено Не обнаружено	не более 1,0 не более 5,0 не более 0,1 не более 0,5
4	Общая зола, %	6,5±0,31	Не более 9,0
5	Радионуклиды Cs-137 (Цезий 137), Бк/кг Sr-90 (Стронций 90), Бк/кг	Не обнаружено Не обнаружено	не более 400 не более 200
6	Пестициды ГХЦГ (α, β, γ - изомеры), мг/кг ДДТ и его метаболиты, мг/кг Гептахлор, мг/кг Алдрин, мг/кг	Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено	Не более 0.1 Не более 0.1 Не допускается (<0.002) Не допускается (<0.002)
7	Микробиологическая чистота ТАМС, КОЕ в 1 г ТУМС, КОЕ в 1 г Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи, КОЕ в 1 г <i>Escherichia coli</i> Бактерии рода <i>Salmonella</i>	Соответствует Соответствует Соответствует Соответствует Соответствует	Не более 10 ⁵ Не более 10 ⁴ Не более 10 ⁴ Отсутствие в 1 г Отсутствие в 25 г
8	Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте, %	3,3±0,3	Не более 5,0

Количественное определение мангиферина

В качестве основного метода для оценки показателя «Количественное определение» была выбрана ВЭЖХ с использованием мангиферина как маркерного вещества. На основании результатов приведенных исследований обоснован критерий приемлемости для травы копеечника Семенова – содержание мангиферина в сухом сырье должно быть не менее 0,1%. Данный норматив выведен расчетным путем на основании экстрактивности и количественного содержания маркера в трех сериях исходного растительного сырья (Таблица 7). Разработанная аналитическая методика валидирована в соответствии с действующими фармакопейными требованиями ICH Q2(R2) и ФЕАЭС.

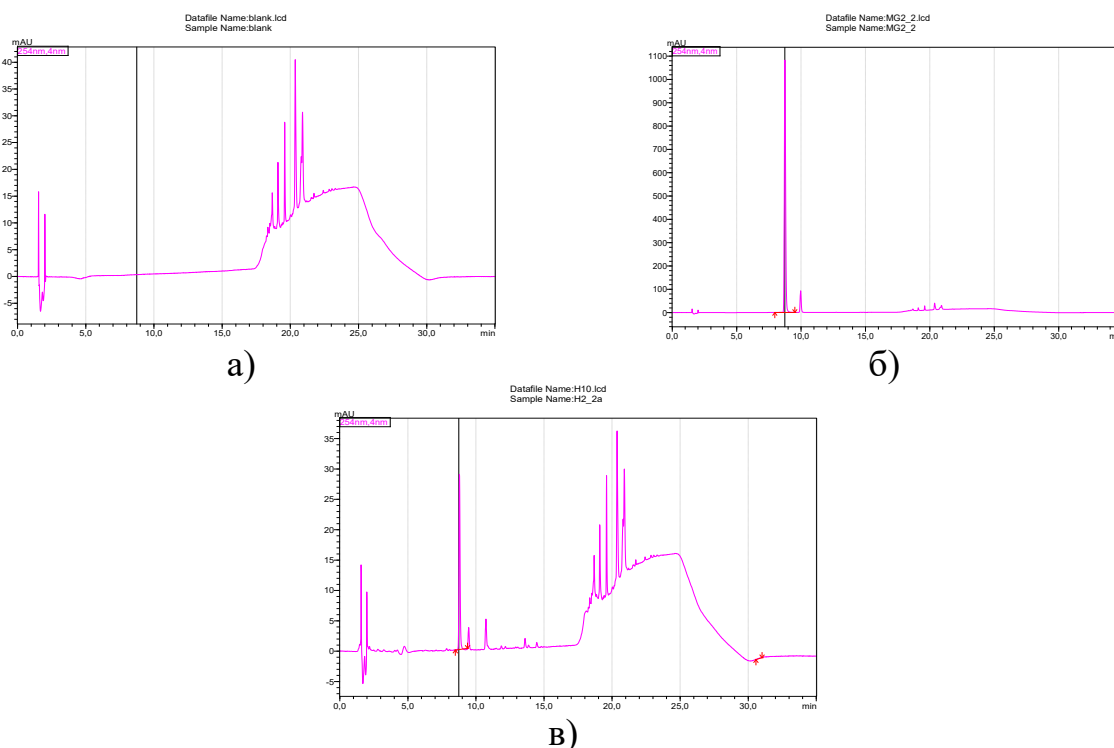
Валидация методики количественного определения мангиферина

Анализ проводился методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе

с диодно-матричным детектором (DAD) и термостатируемой колонкой. Разделение полифенолов осуществлялось на колонке Zorbaх Eclipse XDB-C18 (250 × 4,6 мм, dp = 5 мкм) при температуре 25 °С [43]. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила (В) и воды с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (А). Градиентный режим: 0/10; 13/25; 15/95; изократическое удерживание 95% В (15–20 мин) с последующим возвратом к 10% В к 25-й минуте. Скорость потока – 1 мл/мин, объем инъекции – 10 мкл. Идентификация мангиферина проводилась по временам удерживания и соответствию УФ-спектров при 254 нм [43].

Специфичность

Специфичность методики подтверждалась путем сравнения хроматограмм стандартного раствора мангиферина и исследуемых экстрактов *H. semenowii*. Идентификация целевого пика основывалась на совпадении времени удерживания (t_R) и сопоставлении УФ-спектров, полученных с помощью DAD (Рисунок 19). Чистота пика мангиферина в экстрактах проверялась путем анализа спектрального профиля в трех точках (начало, вершина и конец пика); отсутствие посторонних сигналов и коэлюирующих примесей подтвердило высокую избирательность метода.



а – контрольный образец (метанол); б – метаноловый раствор мангиферина (0,2 мг/мл; t_R = 8,754 мин); в – хроматограмма образца *H. semenowii* (t_R = 8,793 мин)

Рисунок 19 – Хроматограммы, полученные при подтверждении «Специфичности» методики определения мангиферина в траве *Hedysarum semenowii*

Линейность и диапазон

Для оценки линейности методики использовали метод внешнего стандарта. Была построена калибровочная кривая по пяти точкам в диапазоне концентраций метанольных растворов мангиферина от 0,0125 до 0,2 мг/мл. Каждый стандарт анализировали в трех повторениях. Уравнение регрессии ($y=4 \cdot 10^7 x - 128,265$), связывающее площадь пика и концентрацию, продемонстрировало высокую степень линейности: коэффициент детерминации составил $R^2 = 0,9993$ (Рисунок 20). Дополнительная оценка линейности была подтверждена методом дисперсионного анализа (ANOVA), а также проведен анализ остатков, показавший их случайное распределение. Оценка значимости свободного члена регрессии подтвердила отсутствие систематической ошибки, что доказывает приемлемость методики в выбранном диапазоне.

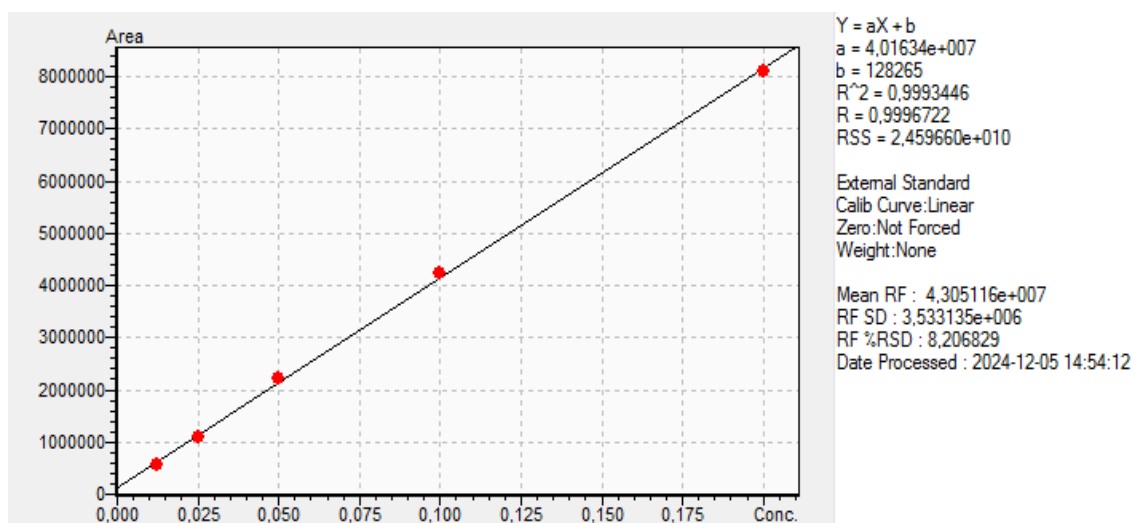


Рисунок 20 – Пятиточечная калибровочная кривая метанольных растворов эталонного стандарта мангиферина ($c = 0,0125\text{--}0,2$ мг/мл)

Правильность

Правильность аналитической методики оценивали методом стандартных добавок. К образцам сырья с известным базовым содержанием мангиферина добавляли эталонный стандарт в концентрациях, соответствующих 80 %, 100 % и 120 % от номинального уровня (в трех повторностях). Расчетный показатель степени восстановления находился в пределах 98-102 %, что удовлетворяет фармакопейным требованиям к правильности методик количественного определения для растительных субстанций.

Прецизионность

Оценка прецизионности проводилась на уровне повторяемости (сходимость) (0,89 %) и промежуточной прецизионности (внутрилабораторная точность) (1,32 %). Анализировали стандартный раствор мангиферина (0,0125 мг/мл) в трехкратной повторности. Измерения для оценки повторяемости выполнялись в течение одного рабочего дня, а промежуточная прецизионность – на протяжении трех последовательных дней. Относительное стандартное отклонение (RSD) для обоих показателей составило менее 2 %, что

свидетельствует о высокой стабильности и воспроизводимости аналитической системы.

Предел обнаружения

Чувствительность аналитической методики в отношении регистрации минимальных концентраций аналита оценивали путем серийного разбавления стандартного раствора мангиферина метанолом. Согласно общепринятым метрологическим требованиям, предел обнаружения рассчитывали на основании отношения аналитического сигнала к фоновому шуму (S/N), составляющего 3:1. Полученное значение предела обнаружения, равное 1,042 мкг/мл, подтверждает высокую чувствительность разработанной системы.

Предел количественного определения

Минимальную концентрацию мангиферина, подлежащую достоверному количественному измерению с заданной точностью, устанавливали исходя из отношения S/N на уровне 10:1. Установленный предел количественного определения составил 3,125 мкг/мл. Данный показатель свидетельствует о возможности надежного количественного анализа микроколичеств мангиферина в экстрактах копеечника Семенова, что является критически важным для обеспечения воспроизводимости результатов стандартизации (Приложение Б).

Робастность

Для подтверждения робастности методики оценивали влияние небольших изменений хроматографических условий – варьирование температуры колонки (± 2 °C) и скорости потока подвижной фазы ($\pm 0,1$ мл/мин) – на результаты испытания. В ходе анализа установлено, что указанные изменения не оказывают значимого влияния на время удерживания мангиферина, симметрию пика и эффективность колонки, подтверждая надежность методики при рутинном использовании.

Количественное определение суммы флавоноидов

В рамках рутинного анализа травы *H. semenowii*, предложен альтернативный метод количественного определения, основанный на определении суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом абсорбционной спектрофотометрии в УФ области ($\lambda_{\text{max}}=410$ нм). На основе результатов испытаний для данного показателя установлены критерии приемлемости «не менее 0,8 %» (Таблица 15).

Таблица 15 – Установление критериев качества для количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве *Hedysarum semenowii*

№	Наименование испытания	Результаты испытания	Установленный критерий приемлемости
1	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	1,76 $\pm$ 0,05	не менее 0,8

4.2 Разработка спецификации качества корней копеечника Семенова

Разработка спецификации качества корней копеечника Семенова проводилась согласно подходам, описанным для травы данного вида (Приложение К, Щ).

Определение

Показатель «Определение» выражен следующим образом: «Высушенные цельные или резанные подземные части многолетнего травянистого растения *Hedysarum semenowii* Regel & Herder».

Идентификация

Раздел спецификации «Идентификация» для корней копеечника Семенова сформирован на основе диагностических макро- и микроскопических признаков, установленных в ходе исследований, а также дополнен химической идентификацией, базирующейся на качественном определении изофлавоноидов методом ТСХ и полисахаридов с помощью соответствующей качественной реакции.

Тонкослойная хроматография

Испытание ТСХ корней копеечника Семенова проводили согласно методике, разработанной на основе литературных данных [51], адаптированной для данного вида сырья:

К 1,0 г измельченного в порошок корня прибавляли 10 мл метанола, встряхивали в течение 10 минут и фильтровали. Выпаривали фильтрат при пониженном давлении (в вакууме), к сухому остатку прибавляли 1 мл метанола и использовали полученный раствор в качестве испытуемого. 10 мкл испытуемого раствора наносили на пластину силикагеля (линию старта) для тонкослойной хроматографии. Элюирование проводили смесью гексана, 2-бутанона и муравьиной кислоты (60:40:1) до прохождения фронтом растворителя расстояния около 7 см, после чего пластинку высушивали на воздухе. Пластинку просматривали в ультрафиолетовом свете (365 нм).

В ходе трехкратных испытаний, на хроматографических пластинках стабильно регистрировали наличие сине-белых флуоресцентных пятен, характерных для изофлавоноидов, при значении R_f около 0,4 (полученные результаты: $0,4 \pm 0,09$).

Качественная реакция

Идентификацию полисахаридов в корнях копеечника Семенова проводили методом спиртового осаждения. К 10 мл предварительно полученного и охлажденного водного извлечения (1:10) прибавляли тройный объем 96 % этанола (30 мл). Наблюдаемое образование обильных хлопьевидных сгустков, оседающих при отстаивании, подтверждало наличие в сырье высокомолекулярных водорастворимых полисахаридов.

Испытания

В ходе исследований на основе практических результатов были установлены критерии приемлемости для универсальных фармакопейных испытаний ЛРС «Копеечника Семенова корни» (Таблица 16).

Вместо изолированного количественного определения полисахаридов в составе корней нами было обосновано включение испытания «экстрактивные

вещества» (извлекаемые 70 % этанолом). Это решение принято в рамках гармонизации требований к качеству с действующими фармакопейными стандартами (Китайская фармакопея) на официальные родственные виды (*H. polybotrys*) [51]. Данный показатель позволяет интегрально оценить выход комплекса биологически активных соединений (изофлавоноидов и растворимых углеводов), определяющих фармакологическую ценность сырья. Кроме того, определение экстрактивных веществ является более воспроизводимым и экономически целесообразным методом рутинного контроля качества в производственных условиях по сравнению со сложным гравиметрическим анализом полисахаридного комплекса [133].

Таблица 16 – Установление критериев качества для испытаний корней *Hedysarum semenowii*

№	Наименование испытания	Результаты испытания	Установленный критерий приемлемости
1	2	3	4
1	Посторонние примеси	Соответствует	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)
2	Потеря в массе при высушивании, %	8,4±1,78	не более 16,0
3	Тяжелые металлы и мышьяк: Cd (Кадмий), мг/кг Pb (Свинец), мг/кг Hg (Ртуть), мг/кг As (Мышьяк), мг/кг	0,0025±0,0011 0,113±0,0315 Не обнаружено Не обнаружено	не более 1,0 не более 5,0 не более 0,1 не более 0.5
4	Общая зола, %	4,5±0,2	Не более 6,0
5	Радионуклиды Cs-137 (Цезий 137), Бк/кг Sr-90 (Стронций 90), Бк/кг	Не обнаружено Не обнаружено	не более 400 не более 200
6	Пестициды ГХЦГ (α, β, γ - изомеры), мг/кг ДДТ и его метаболиты, мг/кг Гептахлор, мг/кг Алдрин, мг/кг	Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено Не обнаружено	Не более 0.1 Не более 0.1 Не допускается (<0.002) Не допускается (<0.002)
7	Микробиологическая чистота ТАМС, КОЕ в 1 г ТУМС, КОЕ в 1 г Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи, КОЕ в 1 г <i>Escherichia coli</i> Бактерии рода <i>Salmonella</i>	Соответствует Соответствует Соответствует Соответствует Соответствует	Не более 10 ⁵ Не более 10 ⁴ Не более 10 ⁴ Отсутствие в 1 г Отсутствие в 25 г
8	Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте, %	0,5±0,1	Не более 1,0
9	Экстрактивные вещества, %	25,9±0,72	Не менее 20

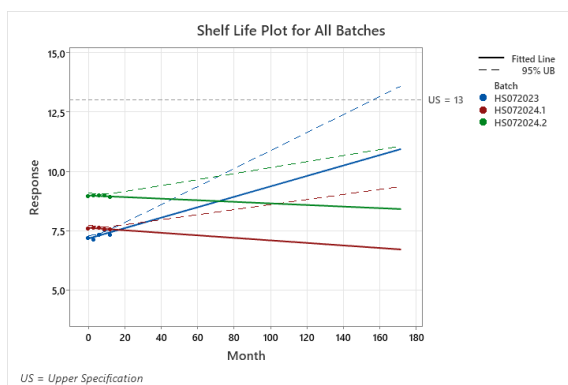
4.3 Изучение стабильности и установление срока хранения растительного сырья копеечника Семенова

Продолжающиеся долгосрочные испытания стабильности травы и корней *Hedysarum semenowii* осуществляются согласно правилам проведения исследований стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств ЕАЭС и РК, описанных в главе «Материалы и методы». Для обеспечения контроля качества на протяжении всего периода исследований была разработана спецификация стабильности, включающая перечень критических показателей и критериев приемлемости (Приложение Э).

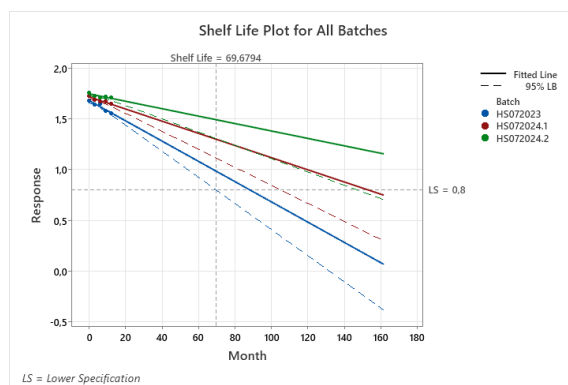
На текущем этапе получены результаты за 12 месяцев наблюдений. Анализ данных показал, по всем контролируемым параметрам ЛРС сохраняет полное соответствие установленным нормам отклонений спецификации, что подтверждает стабильность характеристик обеих морфологических групп сырья копеечника Семенова в течение первого года хранения.

В связи с тем, что исследования по ряду серий являются незавершенными, для научного обоснования предварительного срока хранения был применен метод статистического прогнозирования при помощи функции «Stability study» специализированного программного обеспечения Minitab Statistical Software. Согласно требованиям руководства ICH Q1E и гармонизированных с ним Решений ЕЭК, при наличии 12-месячных фактических данных долгосрочных испытаний допускается экстраполяция срока годности не более чем на удвоенный период. При этом обязательным условием экстраполяции является подтверждение статистической однородности серий. Проведенная в модуле Minitab проверка объелиняемости серий (тест на общность наклонов и свободных членов регрессии) подтвердила отсутствие значимой вариабельности между сериями. На основании данных требований нормативно обоснованный заявемый срок годности для травы и корней *H. semenowii* на текущем этапе устанавливается равным 24 месяцам (2 года).

Вместе с тем, результаты математического моделирования и линейной регрессии по ключевым маркерам качества (потеря в массе при высушивании для травы и корней, количественное определение суммы флавоноидов для травы копеечника Семенова, экстрактивные вещества для корней копеечника Семенова) демонстрируют, что линии деградации пересекают критерии приемлемости далеко за пределами нормативного срока (Рисунок 21, 22).



а)



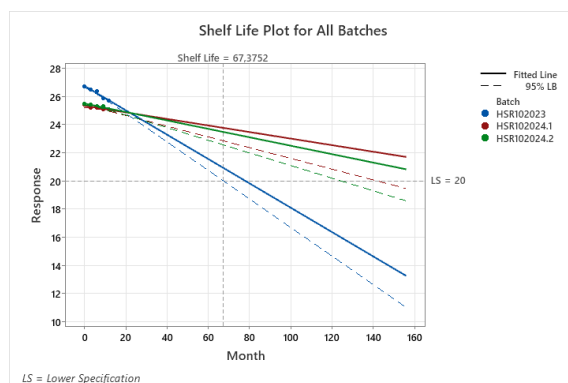
б)

а – график срока годности по показателю «потеря в массе при высушивании»,
б – график срока годности по показателю «количественное определение».

Рисунок 21– Прогнозирование срока хранения травы *Hedysarum semenowii* методом линейной регрессии



а)



б)

а – график срока годности по показателю «потеря в массе при высушивании», б
– график срока годности по показателю «экстрактивные вещества».

Рисунок 22 – Прогнозирование срока хранения корней *Hedysarum semenowii* методом линейной регрессии

Расчетный предиктивный период стабильности достигает 60-70 месяцев. Данные значения рассматриваются исключительно как долгосрочный теоретический прогноз, указывающий на высокую стабильность сырья. Окончательный срок годности будет установлен по завершении текущих долгосрочных испытаний.

Выводы по четвертой главе

В рамках четвертой главы диссертационной работы проведена стандартизация травы и корней *Hedysarum semenowii*, по итогам которой разработаны спецификации качества, базирующиеся на гармонизированных требованиях ГФ РК и ФЕАЭС, а также критериях приемлемости показателей качества родственных фармакопейных видов рода копеечник.

Разработана спецификация качества копеечника Семенова травы, в рамках которой для идентификации систематизированы данные макроскопических и микроскопических исследований сырья, внедрена цианидиновая проба на флавоноиды и оптимизирована методика ТСХ по маркерному компоненту мангиферину. Установлены критерии приемлемости в соответствии с требованиями ГФ РК и утвержденных нормативно-правовых актов в части универсальных испытаний. Для рутинного анализа показатель «количественное определение» основан на фармакопейной методике определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин с установлением предела не менее 0,8 %.

В качестве основного метода испытания «количественного определения» для травы предложено установление содержания мангиферина при помощи ВЭЖХ с обоснованным нормативным пределом не менее 0,1 % в пересчете на сухое сырье. Разработанная аналитическая методика валидирована в полном объеме: подтверждена специфичность, линейность, правильность, робастность и прецизионность (относительное стандартное отклонение менее 2 %).

Аналогично реализована разработка спецификации качества копеечника Семенова корней, идентификация которых включает определение макро- и микроскопических признаков сырья, проведение ТСХ (изофлавоноиды) и качественной реакции осаждением полисахаридов. Спецификация дополнена универсальными испытаниями ЛРС и оценкой показателя качества «экстрактивные вещества», методологически гармонизированной с фармакопейными требованиями к официальному виду *H. polybotrys*.

Важным этапом исследований явилось проведение долгосрочных испытаний стабильности травы и корней при регламентируемых климатических условиях (температура 25 ± 2 °C, относительная влажность 60 ± 5 %). Мониторинг на протяжении 12 месяцев подтвердил отсутствие статистически значимых деградационных изменений физико-химических свойств, а также стабильность количественного содержания флавоноидов и экстрактивных веществ, соответственно. На основании полученных фактических данных и требований руководства ICH Q1E срок годности сырья установлен на уровне 24 месяцев. Дополнительно примененный метод статистического прогнозирования и регрессионного анализа продемонстрировал высокий теоретический предиктивный срок стабильности, достигающий 60–70 месяцев, что требует подтверждения в ходе продолжающихся испытаний.

Обобщая результаты данного раздела, проведенные исследования позволили сформировать исчерпывающий фармакопейный профиль качества травы и корней копеечника Семенова, что создает фундамент для интеграции данного перспективного вида в качестве лекарственного растительного сырья для фармацевтической промышленности.

5 СКРИНИНГ БЕЗОПАСНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (*HEDYSARUM SEMENOWII* REGEL & HERDER)

5.1 Исследования токсичности копеечника Семенова

5.1.1 Исследование острой токсичности

Оценка острой токсичности этанольных извлечений из надземной и подземной частей *H. semenowii* при однократном внутрижелудочном введении была выполнена в рамках скринингового исследования с использованием аутбредных мышей обоих полов массой от 19 до 37 г. Животные были рандомизированы на четыре группы (одна контрольная и три экспериментальные) по 5 особей в каждой. Тестируемые образцы вводили животным однократно через зонд в фиксированных дозах 500, 2000 и 5000 мг на килограмм массы тела.

Мониторинг клинического состояния грызунов продолжался 14 дней с момента введения субстанции. Итоговая оценка физиологического статуса и поведения показала, что на протяжении всего экспериментального периода у мышей опытных групп сохранялись адекватные реакции, базовые рефлексy и нормальный уровень двигательной активности. Отсутствие видимых признаков летаргии, гипервозбудимости или иных аберрантных проявлений свидетельствует об отсутствии острого нейротоксического влияния.

Параллельно с этологическим мониторингом выполнялся регулярный контроль массы тела как интегрального показателя переносимости. В ходе оценки не было выявлено статистически значимых отклонений весовых характеристик у особей опытных групп в сопоставлении с контрольными значениями. Сохранность нормальной динамики массы тела свидетельствует о том, что применение исследуемых извлечений не вызывает острых патологических сдвигов, нарушающих пищевое поведение и развитие животных [92].

В ходе проведенного эксперимента летальных исходов не было зафиксировано ни в одной из исследуемых групп. Отсутствие гибели животных при максимальном введении (5000 мг/кг) сделало невозможным расчет точного значения полуметальной дозы (LD_{50}). На основании полученных данных установлено, что показатель LD_{50} для экстрактов *H. semenowii* при пероральном введении превышает 5000 мг/кг, что позволяет предварительно отнести их к классу малотоксичных веществ.

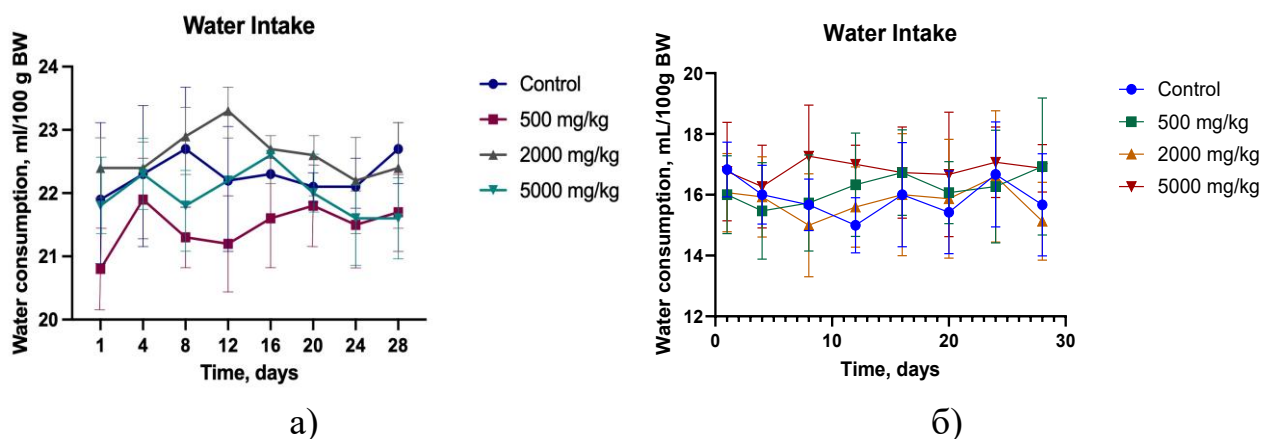
Полученные результаты подтверждают хорошую переносимость исследуемых фитоэкстрактов при однократном применении. Тем не менее, учитывая ограничения скринингового дизайна теста острой токсичности, для формирования объективной картины токсикологического профиля и верификации безопасности потребовалось проведение исследования подострой токсичности при многократном введении [92].

5.1.2 Исследование подострой токсичности

В ходе 28-дневного экспериментального скринингового исследования

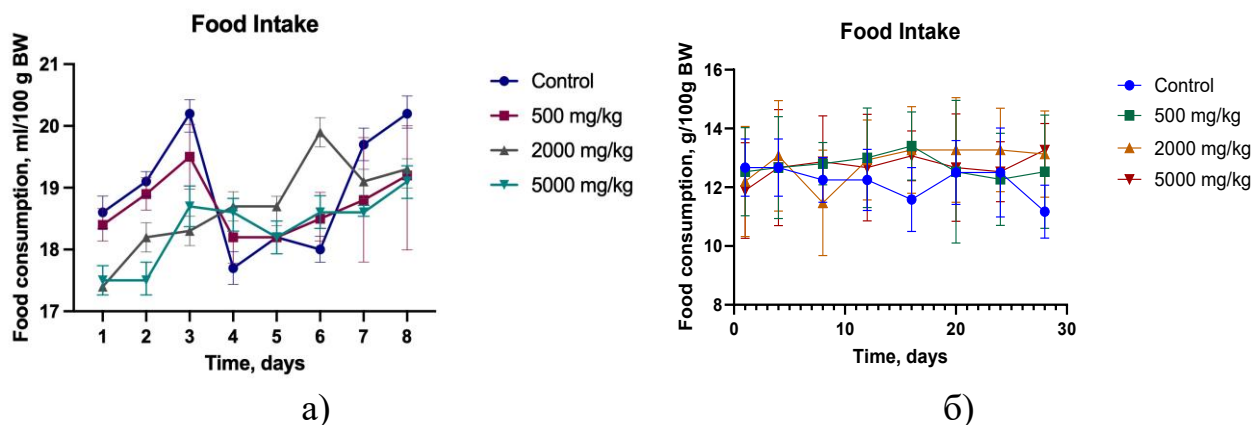
подострой токсичности экстрактов травы и корней *H. semenowii* общее физиологическое состояние подопытных животных в целом оставалось стабильным. В течение первых часов после первичной экспозиции фиксировались единичные случаи кратковременной летаргии и послабления стула, которые носили транзиторный характер и купировались самостоятельно без внешнего терапевтического вмешательства [94].

Важной составляющей оценки переносимости в рамках подострого эксперимента стал анализ трофологического статуса и динамики потребления жидкости. Статистическая верификация данных ($p > 0,05$) подтвердила отсутствие значимых интервальных различий в объемах потребления корма и воды между контрольной и опытными группами на всех этапах дозирования (Рисунки 23, 24). Кроме того, мониторинг внутригрупповой динамики показал отсутствие существенных колебаний объемов потребляемой пищи и жидкости на протяжении всего 28-дневного цикла. Совокупность данных результатов позволяет сделать вывод об отсутствии негативного влияния экстрактов *H. semenowii* на основные физиологические функции и метаболические процессы подопытных животных в условиях длительного введения [94].



а – экстракт травы; б – экстракт корней

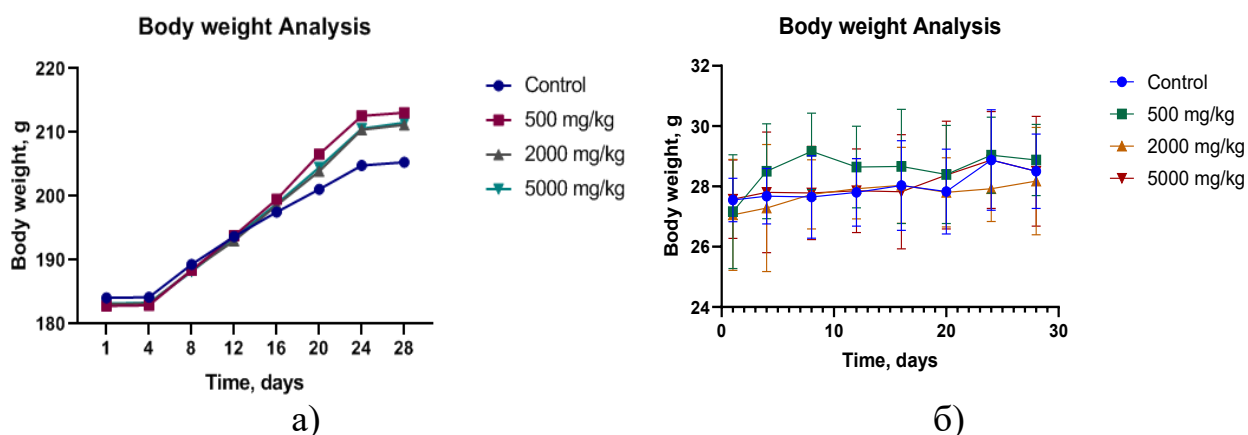
Рисунок 23 – Потребление воды на 100 г массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстрактов *Hedysarum semenowii*



а – экстракт травы; б – экстракт корней

Рисунок 24 – Потребление корма на 100 г массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстрактов *Hedysarum semenowii*

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) подтвердили отсутствие статистически значимых различий в динамике массы тела между экспериментальными группами животных и контрольной выборкой ($p > 0,05$). В течение всего 28-дневного периода наблюдений у всех особей фиксировался умеренный физиологически закономерный прирост массы тела, детальная визуализация которого отражена на рисунке 25. Систематическое внутрижелудочное введение исследуемых фитоэкстрактов не оказывало ингибирующего влияния на соматический рост животных [94].



а – экстракт травы; б – экстракт корней

Рисунок 25 – Динамика массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстрактов *Hedysarum semenowii*

На протяжении всего 28-дневного цикла исследований не было зарегистрировано ни одного случая летального исхода среди особей,

получавших экстракты, в том числе при воздействии предельной дозировки 5000 мг/кг. Отсутствие гибели животных дает основания для заключения о том, что показатель LD₅₀ при курсовом введении превышает пороговое значение в 5000 мг/кг массы тела.

Макроскопическое и микроскопическое исследование

При проведении патологоанатомического вскрытия животных экспериментальных групп, получавших экстракты *H. semenowii*, было установлено, что морфологические характеристики внутренних органов полностью соответствуют физиологическим нормам и характеризуются анатомически правильным расположением. Макроскопическая оценка сердца не выявила девиаций в его величине или конфигурации; миокард обладал типичной коричневатой пигментацией и плотной консистенцией. Визуальный анализ печени подтвердил сохранение ее стандартных габаритов и формы, при этом паренхима органа имела характерный красно-коричневый цвет и упругий тургор. Почки подопытных животных по своим метрическим и морфологическим параметрам не демонстрировали отличий от контрольных образцов: фиброзная капсула отделялась легко, а на поперечном разрезе регистрировалась отчетливая дифференциация коркового и мозгового слоев [94].

Микроскопическое исследование тканей печени и почек крыс, подвергавшихся воздействию различных концентраций экстрактов *H. semenowii* в рамках изучения подострой токсичности, позволило выявить ряд дозозависимых реактивных изменений. Результаты микроскопического исследования, представленные на рисунке 26, позволяют охарактеризовать состояние тканей печени и почек в зависимости от полученной дозировки фитоэкстракта.

В контрольной группе гистоархитектоника органов соответствует физиологической норме (Рисунок 26 а, б). Печеночные пластинки (балки) имеют типичную толщину в 1–2 клетки, при этом гепатоциты обладают характерной полигональной формой, центрально ориентированными ядрами и гранулярной эозинофильной цитоплазмой с базофильными включениями (стрелкой отмечена центральная печеночная вена). В структуре почек регистрируются интактные клубочки с тонкими капиллярными петлями и нормальной клеточностью мезангиального и эндотелиального аппарата; канальцевая система не имеет признаков повреждения (стрелкой отмечены клубочки).

При введении экстракта в дозе 500 мг/кг наблюдались начальные гемодинамические реакции. В паренхиме печени фиксируются явления умеренного межбалочного отека (красная стрелка) и полнокровия синусоидных капилляров (желтые стрелки). Со стороны почек отмечалась очаговая сосудистая гиперемия (красная стрелка) и признаки легкой гомогенизации цитоплазмы эпителиоцитов почечных канальцев (желтые стрелки) при сохранении целостности основных гистологических структур (Рисонок 26 в, г).

Увеличение дозировки до 2000 мг/кг приводило к нарастанию выраженности сосудистых расстройств. В печеночной ткани регистрировались полнокровие сосудистого русла и синусоидов (красная стрелка), а гепатоциты демонстрировали признаки паренхиматозной дистрофии (желтые стрелки). В

почечной паренхиме обнаруживались диапедезные кровоизлияния в области клубочков (желтая стрелка) и локальные очаги дистрофических изменений эпителиальный выстилки канальцев (черная стрелка) (Рисунок 26 д, е).

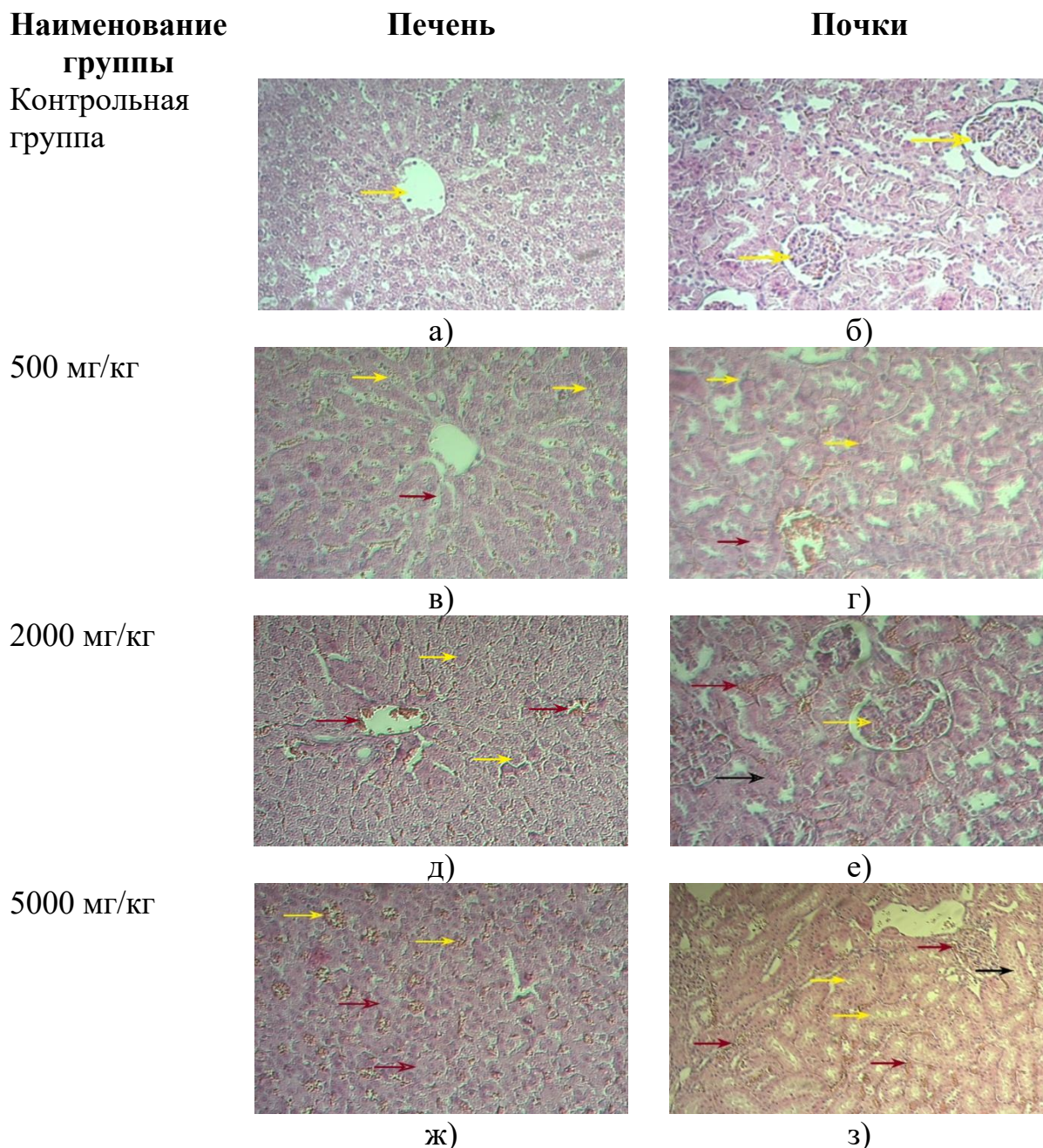


Рисунок 26 – Изображения органов (печень и почки) экспериментальных животных после исследования подострой токсичности экстракта травы *Hedysarum semanowii* (Окраска гематоксилином и эозином, 200х)

Наиболее значительные структурные изменения фиксировались при максимальной дозовой нагрузке 5000 мг/кг. Клеточный состав печени характеризовался выраженной дистрофией с крупноклеточной трансформацией, ядра клеток становились гомогенными с четко визуализируемыми ядрышками (красные стрелки). В почечной ткани патоморфологическая картина

дополнилась дистрофией эпителия канальцев (черная стрелка), нарушением структурной целостности капиллярных петель клубочков (красные стрелки) и диапедезными кровоизлияниями (желтые стрелки) (Рисунок 26 ж, з) [94].

Экспозиция исследуемых экстрактов сопровождалась развитием дозозависимых трансформаций реактивного генеза. Описанные изменения в печени и почках указывают на метаболическое напряжение экскреторных систем. Учитывая манифестацию начальных гемодинамических реакций при дозе 500 мг/кг, уровень не наблюдаемого неблагоприятного эффекта (NOAEL) для данных экстрактов, вероятно, находится ниже дозы 500 мг/кг. Таким образом, несмотря на отсутствие системной летальности, экстракты обладают потенциалом дозозависимого токсического влияния на печень и почки при высоких курсовых дозировках, что требует соблюдения терапевтического окна на последующих этапах изучения [94].

5.1.3 Изучение местно-раздражающего действия

Оценка локально-раздражающего потенциала извлечений из травы и корней *H. semenovii* проводилась на биологических моделях – аутбредных крысах (n=5 в каждой). Пролонгированные ежедневные аппликации растительных субстанций в сочетании с динамическим мониторингом (через 2 часа после экспозиции и в конце рабочего дня) не спровоцировали патологических трансформаций колористического профиля кожи, её тургора или эластичности. Отсутствовали признаки десквамации, формирования корок или появления микротрещин на протяжении всего периода экспозиции [94].

Согласно результатам формализованной оценки по стандартизированной шкале Дрейза, в опытной группе в течение всего 30-дневного цикла наблюдений интенсивность кожных реакций у подавляющего большинства животных находилась в стабильном диапазоне от 0 до 1 балла. Регистрация слабо выраженной эритемы в 2 балла по шкале Дрейза носила единичный, транзиторный характер у одной особи и купировалась самостоятельно без дополнительных вмешательств. Подобная спорадическая реакция с высокой долей вероятности могла быть обусловлена механическим фактором при аппликации экстракта или индивидуальной гиперчувствительностью животного.

В группе негативного контроля, где в качестве плацебо использовалась основа экстрактов не было выявлено признаков дермальной сенсibilизации или каких-либо девиаций от референтных значений физиологической нормы. Совокупный массив полученных эмпирических данных позволяет констатировать, что экстракты травы и корней *H. semenovii* при соблюдении регламентированных протоколов дозирования и схем аппликации не обладает системным местно-раздражающим потенциалом в отношении кожных покровов лабораторных крыс [94].

5.1.4 Изучение аллергизирующего действия

При изучении сенсibilизирующего действия экстрактов травы и корней *H. semenovii* на слизистые оболочки зрительного анализатора морских свинок в течение 28-дневного периода мониторинга у подавляющего большинства

подопытных животных признаков воспалительной реакции выявлено не было. Тем не менее, у двух особей из экспериментальной группы экстракта травы копеечника Семенова регистрировалась транзиторная гиперемия конъюнктивы легкой степени, что согласно балльной системе оценки по шкале Дрейза соответствовало 1 баллу. Указанные изменения носили кратковременный обратимый характер и полностью купировались в течение 24 часов после возникновения без развития каких-либо патологических последствий для органа зрения [94].

Остальные оцениваемые параметры, такие как наличие отека, характер выделений и морфологическое состояние радужной оболочки, на протяжении всего срока исследования оставались в пределах физиологической нормы. Реакция радужной оболочки на световой раздражитель была сохранена у всех без исключения животных [94].

Таким образом, в условиях проведения конъюнктивальной пробы экстракты *H. semenowii* не индуцировали значимых аллергических реакций. Важно отметить, что данный метод оценивает исключительно локальную гиперчувствительность слизистых оболочек; для оценки системного алергизирующего действия требуются дополнительные исследования стандартизованными методами.

Основные результаты исследования общей токсичности экстрактов копеечника Семенова оформлены в отчете о научно-исследовательской работе (Приложение Ю).

5.2 Скрининг биологической активности копеечника Семенова

5.2.1 Исследование антимикробной активности

В ходе скрининга биологической активности лекарственного растительного сырья копеечника Семенова была проведена сравнительная оценка антибактериального и фунгицидного потенциала извлечений из надземной и подземной частей растения (Таблицы 17, 18). Исследование носило характер внутреннего сравнительного скрининга, целью которого являлось определение наиболее активной морфологической части растения и оптимального экстрагента.

Антибактериальная активность

Анализ биологической активности выявил зависимость эффективности от используемой морфологической части растения. Экстракты надземных частей продемонстрировали преимущество перед экстрактами корней, что подтверждается более низкими значениями минимальной ингибирующей (МИК) и минимальной бактерицидной (МБК) концентраций в отношении ряда патогенов.

В целом, согласно общепринятым критериям оценки суммарных растительных извлечений, антимикробная активность исследуемых образцов классифицируется преимущественно как слабая и умеренная. В отношении грамположительных микроорганизмов, таких как бактерии рода *Staphylococcus*, выявлена чувствительность к экстрактам надземной части (МИК и МБК в диапазоне 0,5–4,0 мг/мл). Наибольшее ингибирующее действие зафиксировано

против штаммов *Staphylococcus epidermidis*. Кроме того, исследуемые образцы надземных органов проявили активность против *Pseudomonas aeruginosa* (грамотрицательные бактерии), где значения МИК составили 2 мг/мл, а МБК варьировались от 2 до 4 мг/мл [43].

В ходе эксперимента выявлено, что штамм *S. epidermidis* демонстрирует максимальную восприимчивость к воздействию экстрактов, полученных из подземной части *H. semenowii*, что подтверждает селективный характер их антибактериальных свойств. Количественная оценка показала, что показатель МИК для этой бактерии равняется 1–4 мг/мл, тогда как МБК фиксируется в диапазоне от 4 до 8 мг/мл. В то же время антимикробная эффективность в отношении других исследуемых тест-культур была значительно ниже: для инициации ингибирующего эффекта требовалось применение концентраций, превышающих 4 мг/мл [43].

Противогрибковая активность

При изучении фунгицидного действия в отношении грибов рода *Candida* была установлена сопоставимая эффективность экстрактов как подземных, так и надземных органов. Значения МИК и МФК для обеих групп образцов находились в идентичном диапазоне от 4 до 16 мг/мл [43].

Полученные данные позволяют дифференцировать фармакологический профиль различных частей *Hedysarum semenowii*, где надземная часть обладает превалирующим антибактериальным действием против патогенных штаммов, тогда как в отношении грибковых инфекций извлечения обеих частей растения демонстрируют эквивалентный уровень биоактивности.

Таблица 17 – Антибактериальная и противогрибковая активность экстрактов из надземных частей *Hedysarum semenowii*, мг/мл

Референтный микроорганизм	Hs_M50		Hs_M70		Hs_M99		Hs_Et50	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1	2	1	2	0,5	1	0,5	1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2	4	4	4	0,5	1	1	2
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	16	16	16	16	2	8	2	4
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	4	4	4	4	2	2	1	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	8	8	8	8	8	4	4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2	2	2	4	2	4	1	2
	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	8	8	8	4	8	4	8
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	4	8	8	16	8	16	8	8

Таблица 18 – Антибактериальная и противогрибковая активность экстрактов из корней *Hedysarum semenowii*, мг/мл

Референтный микроорганизм	HsR_M50		HsR_M70		HsR_M99		HsR_Et50	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	4	8	2	8	1	4	4	8
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	16	16	8	8	4	8	8	8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	16	>16	8	>16	16	>16	8	16
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	8	8	4	8	4	4	4	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16	16	16	16	16	16	16	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8	8	8	8	8	8	8	8
	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	8	4	8	4	8	4	8
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	8	16	8	16	8	16	8	16

Статистический анализ тестом Крускала-Уоллиса подтвердил (Таблица 19), что разные экстракты *H. semenowii* обладают разной антибактериальной эффективностью (значения МИК достоверно различаются). Это значит, что выбор растворителя или части растения (трава или корни) напрямую влияет на то, насколько хорошо препарат подавляет рост бактерий. Однако, сравнение при помощи теста Данна выявили конкретику только для двух видов бактерий. В частности, экстракты Hs_M99 и Hs_Et50 оказывают достоверно высокое действие в сравнении с экстрактом HsR_M50 на штаммы *S. aureus* и *B. cereus*, соответственно [43].

Таблица 19 – Значимость различий антибактериальной активности исследуемых экстрактов *Hedysarum semenowii*

Референтный микроорганизм	Тест Крускала-Уоллиса		Тест множественных сравнений Данна
	H (7)	p	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	18,01	0,012	Не обнаружено
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	21,63	0,003	Hs_M99 vs HsR_M50
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	20,08	0,005	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	18,27	0,011	Hs_Et50 vs HsR_M50
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20,18	0,005	Не обнаружено
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	19,68	0,006	Не обнаружено

Экстракты надземной части растения продемонстрировали превосходство в тестах на антимикробную эффективность, что объясняется высокой концентрацией фенольных соединений, в частности флавонолов [60]. Хотя в корнях *H. semenowii* был обнаружен медикарпин, обладающий антимикробным действием [134], его активность оценивается как относительно слабая в

сравнении с флавонолами, преобладающими в траве. Изофлавоноиды, птерокарпаны и халконы, составляющие основу экстракта корней, согласно литературным данным, не являются типичными антимикробными агентами [4,10,32,135].

Несмотря на то, что использованные методы скрининга являются упрощенными, они обеспечивают репрезентативную предварительную оценку сравнительной активности. Учитывая доступность сбора надземной фитомассы, она может служить основным сырьем для получения биоактивных комплексов с умеренными антимикробными свойствами. В свою очередь, изофлавоноидный комплекс корней *H. semenowii* представляет научный интерес и, с точки зрения литературных перспектив, может рассматриваться как потенциальный кандидат для дальнейшего изучения в гормональной терапии и лечении хронических воспалительных заболеваний.

5.2.2 Исследование антиоксидантной активности

В ходе исследования была проведена количественная оценка антиоксидантной способности экстрактов *H. semenowii*. Результаты эксперимента выявили выраженную гетерогенность антиоксидантного потенциала в зависимости от используемой морфологической части растения (Таблица 20) [43].

Объекты, полученные из надземных органов растения, продемонстрировали вариативную степень антиоксидантного действия, зависящую от природы экстрагента. Наиболее высокие и стабильные показатели индекса антиоксидантной активности (ААИ) зафиксированы для образцов этанольного экстракта Hs_Et50 (ААИ = 2,07), что классифицирует его как препарат с надежным антиоксидантным потенциалом. Для метанольных извлечений установлена прямая зависимость активности от концентрации растворителя. Образец Hs_M99 проявил сильную ингибирующую способность (ААИ = 1,6). В то же время экстракт Hs_M70 характеризовался умеренным уровнем активности (ААИ = 0,90), а наиболее полярная фракция Hs_M50 – слабым антиоксидантным эффектом (ААИ = 0,37) [43].

В отличие от надземной части, все исследуемые образцы, полученные из корневой системы *H. semenowii*, характеризовались стабильно низкими или следовыми значениями антиоксидантного потенциала. В связи с отсутствием клинически значимой активности числовые данные (EC₅₀ и ААИ) для корневых экстрактов не были вынесены в итоговую сравнительную таблицу. Существенных различий между вариантами экстракции корней в рамках данного показателя выявлено не было.

Таблица 20 – Антиоксидантная активность экстрактов из надземных частей *Hedysarum semenowii*

	Hs_M50	Hs_M70	Hs_M99	Hs_Et50
EC ₅₀	206,6 ± 30,4	84,6 ± 8,4	48,3 ± 6,27	36,7 ± 2,35
ААИ	0,37 ± 0,05	0,90 ± 0,09	1,6 ± 0,2	2,07 ± 0,13

Результаты исследования подчеркивают, что профиль биологически активных фенольных соединений более концентрирован в надземных органах растения, что обеспечило их лучшие показатели в антиоксидантных анализах. В отличие от листьев, подземные части характеризуются наличием специфических метаболитов, которые чаще классифицируются как фитоэстрогены и антиостеопоротические агенты, не проявляющие значительных антиоксидантных свойств [4,32]. Высокая ингибирующая способность экстрактов из надземной биомассы делает их перспективным природным источником антиоксидантов [43].

Выявленное фитохимическое сходство *H. semenowii* с такими изученными видами, как *H. polybotrys*, *H. flavescens* и *H. alpinum*, подтверждает фармакологический потенциал этого малоизученного вида [4]. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выделение индивидуальных соединений, оценку их синергического взаимодействия, а также изучение терапевтической эффективности и безопасности в экспериментах *in vivo* [43].

Выводы по пятой главе

Результаты пятой главы диссертационного исследования позволяют сформулировать выводы, характеризующие фармакологический потенциал и профиль безопасности *Hedysarum semenowii*. Исследования базировались на скрининге биологической активности (*in vitro*) и серии неклинических токсикологических испытаний (*in vivo*).

В ходе антимикробного скрининга установлено, что экстракты надземной части обладают умеренной и слабой антибактериальной активностью, проявляя наибольшую эффективность в отношении грамположительных (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*) и грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*) патогенных штаммов. Антимикробное действие травы коррелирует с ее богатым флавоноловым профилем. Корни, в отличие от травы, проявили слабую антибактериальную активность. При этом в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida* извлечения из обеих частей растения продемонстрировали эквивалентный фунгицидный потенциал.

Извлечения травы копеечника Семенова, в особенности этаноловые и высококонцентрированные метанольные, показали способность ингибировать свободные радикалы (индекс антиоксидантной активности достигал 2,07 для 50 % этанолового экстракта). В то же время все образцы, полученные из подземной части, характеризовались стабильно низкими значениями антиоксидантной активности, что объясняется накоплением в корнях преимущественно изофлавоноидов, не проявляющих выраженного антиоксидантного действия.

Скрининг активности выявил гетерогенность биологического действия, напрямую зависящую от используемой морфологической части растения. В связи с этим именно надземная часть растения выделяется как перспективное сырье для создания природных комплексов с антимикробными и антиоксидантными свойствами.

Доклинические скрининговые *in vivo* исследования на лабораторных животных показали, что экстракты травы и корней *H. semenowii* относятся к классу малотоксичных веществ при однократном приеме. При изучении острой токсичности пероральное введение экстрактов в дозах вплоть до 5000 мг/кг не привело к летальным исходам или нейротоксическим отклонениям, что позволяет классифицировать показатель LD₅₀ как превышающий 5000 мг/кг.

По результатам 28-дневного мониторинга подострой токсичности установлено, что динамика соматического статуса, включая прирост массы тела, а также показатели употребления корма и воды экспериментальными животными, сохранялись в пределах физиологической нормы ($p > 0,05$). Однако микроскопическое исследование печени и почек выявило дозозависимые морфологические трансформации реактивного генеза. Учитывая проявление начальных реакций уже при дозе 500 мг/кг, NOAEL для данных экстрактов находится ниже 500 мг/кг.

Оценка местно-раздражающего действия подтвердила хорошую дерматологическую переносимость экстрактов. Ежедневная кожная аппликация в течение 30 суток не вызывала шелушения, микротрещин или

клинически значимой эритемы (от 0 до 1 балла по шкале Дрейза). Изученная методом конъюнктивальной пробы местная аллергизирующая активность также оказалась незначительной: случаи транзиторной гиперемии легкой степени, возникшие у единичных особей, купировались самостоятельно. Для оценки системного сенсibilизирующего действия требуются дополнительные исследования.

Совокупность проведенных экспериментов создает фундамент доклинических данных. Установленная низкая острая токсичность, отсутствие смертности и хорошая местная переносимость позволяют сделать вывод, что экстракты *H. semenowii* являются перспективными для разработки фармацевтических продуктов при условии дальнейшего детального изучения их безопасности при длительном применении.

6 РАЗРАБОТКА КОНЦЕПЦИИ ФИТОИНТРОДУКЦИИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ СУБСТАНЦИИ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА (*HEDYSARUM SEMENOWII* REGEL & HERDER)

6.1 Изучение природных запасов копеечника Семенова

В рамках полноценных фармакогностических исследований вида, а также учитывая растущий спрос фармацевтической промышленности на новое растительное сырье и часто ограниченные возможности его заготовки из дикорастущих популяций, возникает необходимость в тщательной оценке ресурсов таких малоизученных видов. Таким образом, проведение ресурсоведческого исследования *H. semenowii* является актуальной научной задачей, результаты которой позволят определить его потенциал для устойчивого практического использования и разработать стратегию сохранения и эксплуатации.

Целью настоящей работы являлась комплексная ресурсоведческая оценка природных популяций *Hedysarum semenowii* Regel & Herder в ущельях хребта Кунгей Алатау для определения сырьевых запасов дикорастущего сырья и оценки его потенциала для использования в фармацевтической практике.

Объектом исследования является дикорастущий вид *H. semenowii* в природных сообществах. Ресурсное обследование проводилось маршрутно-рекогносцировочным способом и в соответствии с методикой определения запасов лекарственных растений. Определение ресурсной базы надземной части копеечника Семенова проводились на северном макросклоне хребта Кунгей Алатау, в пределах территории Государственного национального парка «Көлсай Көлдери» в трех разных ущельях. При описании растительных сообществ с участием копеечника Семенова использовались традиционные геоботанические методы.

Ресурсоведческое обследование трех локалитетов произрастания *H. semenowii* – ущелье Саты, ущелье Ак Марал, правобережье реки Шелек в ущелье Уш текше – позволило установить основные параметры популяций (Таблица 21). Площадь выявленных популяций варьирует от 2.5 до 4.5 га. Плотность генеративных особей низкая и составляет от 4-5 до 8-18 особей на 100 м². Количество побегов на одну генеративную особь невелико (от 2-5 до 3-15).

H. semenowii произрастает на склонах различных экспозиций с уклоном 20–50°, в составе можжевельново-кустарниковых и елово-кустарниковых сообществ, состоящих из: *Picea schrenkiana* Fisch. ex C.A. Mey, *Ephedra distachia* L., *Juniperus sabina* L., *Cotoneaster melanocarpus* Fisch. ex Blytt, *Rosa laxa* Retz., *Ribes meyeri* Maxim., *Lonicera stenantha* Pojark., и других видов. Копеечник Семенова характеризуется рассеянным типом распределения, встречаясь отдельными куртинами в травостое или под пологом кустарников. Его доля участия в растительном покрове невысока и составляет от 8% до 15%.

Расчеты показали, что даже в наиболее продуктивной популяции в ущелье Саты (с долей участия 15%) объем возможных ежегодных заготовок воздушно-сухого сырья незначителен и составляет лишь 34,7 кг. Различие в соотношении

эксплуатационного запаса и возможного объема ежегодной заготовки между локалитетами обусловлено разным расчетным периодом восстановления зарослей. Для наиболее плотной популяции в ущелье Саты период оборота заготовки принят равным 2 годам (коэффициент ~2,2), тогда как для уязвимых популяций с минимальной плотностью, в ущелье Ак Марал и пойме реки Шелек, установлен более длительный щадящий период восстановления в 4 года (коэффициент ~4).

Суммарный объем возможных ежегодных заготовок воздушно-сухого сырья по всем исследованным ущельям составляет всего 46,2 кг. Основными ограничивающими факторами для сбора являются: малая площадь популяций, низкая плотность произрастания, труднодоступность местообитаний (крутые склоны) и трудоемкость процесса сбора из-за рассеянного распределения особей. Поэтому наилучшим способом получения лекарственного сырья является выращивание этого вида в условиях культуры в регионе с экологическими условиями, близкими к его естественному произрастанию.

Таблица 21 – Запасы сырья *Hedysarum semenowii* в некоторых ущельях хребта Кунгей Алатау

Местонахождение	Площадь, га		Урожайность воздушно-сухого сырья, кг/га	Эксплуатационный запас воздушно-сухого сырья, кг	Возможный запас ежегодной заготовки, кг
	Общая	Занимаемая видом			
Ущелье Саты Н 1748 м над ур. м. N 43° 00' 18.3", E 078° 22' 58.6"	2,5	1,8	138,6	77,7±3,8	34,7
Ущелье Ак Марал Н 1527 м N 42° 59. 562', E 078° 19.126'	3,0	0,9	253	22,7±1,3	5,7
Пойма реки Шелек, ущелье Уш текше. Н 2020 м N 43° 01' 598", E 78° 14' 739"	4,5	1,2	195	23,4±2,1	5,8
Всего	10	3,9	—	123,8±4,5	46,2

Таким образом, проведенные ресурсоведческие исследования *H. semenowii* позволили установить, что природные сырьевые ресурсы на обследованной территории Государственного национального парка «Көльсай Көлдері» ограничены и составляют менее 50 кг в год (Приложение Л). Для устойчивого использования вида в фармацевтической промышленности необходима разработка научных основ его интродукции и введения в промышленную культуру, которая позволит не только сохранить природные генофонды вида, но

и организовать плановое производство сырья с гарантированным содержанием биологически активных веществ.

6.2 Заготовка лекарственного растительного сырья копеечника Семенова

Создание проектного поля требует определения целевого профиля качества продукта (quality target product profile, QTPP) в отношении качества, потенциальных критических показателей качества (critical quality attributes, CQA), стратегии контроля и выбор подходящего производственного процесса. В целях установления вышеперечисленных критериев проведен обзор доступных литературных данных. Целевым профилем качества ЛРС копеечника Семенова было установлено соответствие фармакопейным требованиям для травы и корней. В свою очередь, основным критическим показателем качества ЛРС выступил показатель «потеря в массе при высушивании» (LOD): не более 13,0% – для травы *H. semenowii*, не более 16,0% – для корней *H. semenowii*.

В рамках определения подходящего способа производства и стратегии контроля проведены исследования с применением планирования экспериментов (DoE) для оценки взаимосвязи критического показателя качества с переменными факторами, влияющими на сушку, а также установления их оптимальных значений.

Процесс получения лекарственного растительного сырья *H. semenowii* состоит из сбора, первичной обработки свежесобранного растительного сырья (очистка от посторонних примесей, таких как выцветшие, заплесневелые или поврежденные части, остатки почвы и других), конвективной сушки, специальной обработки (удаление посторонних примесей, при необходимости измельчение), упаковки в мешки из крафт-бумаги и маркировки (Рисунок 27). Критическими технологическими параметрами (critical process parameters, CPP) для процесса сушки растительного сырья являются температура и время сушки.

Операция планирования экспериментов методом центрально-композиционного плана требует установления основного факторного пространства для критических параметров. В соответствии с литературными источниками растения рода копеечник чаще всего подвергают естественной сушке в тени или тепловой обработке при температуре 70-80 °С. В свою очередь имеются данные о том, что растительное сырье, содержащее флавоноиды принято подвергать быстрой сушке при температуре не более 60 °С. В этой связи, в качестве кубических точек для проектирования экспериментов процесса сушки травы *H. semenowii* выбраны: температура сушки – 40 °С и 80 °С, время сушки – 5 часов и 9 часов (Таблица 22). Для оценки кривизны поверхности отклика матрица планирования была расширена аксиальными точками: 30 °С и 90 °С, 4 ч и 10 ч.

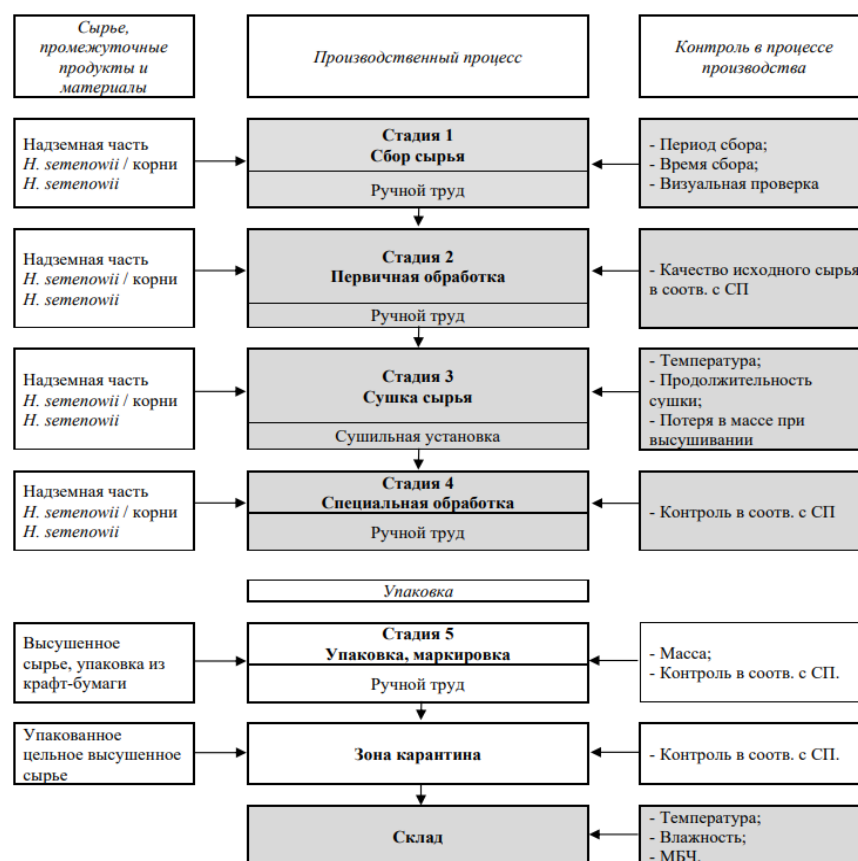


Рисунок 27 – Технологическая схема процесса получения растительного сырья *Hedysarum semenowii*

Таблица 22 – Факторное пространство критических технологических параметров процесса сушки травы *Hedysarum semenowii*

Технологические параметры	Нижний уровень фактора (-1)	Верхний уровень фактора (+1)
	40 °C	80 °C
Время сушки	5 ч	9 ч

На основе установленных значений CPP с применением DoE смоделированы 13 экспериментов, которые помогли определить взаимосвязь между входными данными и CQA в виде показателя «потеря в массе при высушивании». Предложенные функцией DoE эксперименты осуществлены на траве *H. semenowii*, результаты которых представлены далее в таблице 23.

Благодаря проведенным смоделированным экспериментам, установлена взаимосвязь между технологическими параметрами и потерей в массе при высушивании при помощи функции Response Surface Regression. Согласно построенной диаграмме Парето можно увидеть, что оба рассматриваемых фактора значительно влияют на показатель качества, однако наиболее большую важность имеет температура сушки (Рисунок 28).

Таблица 23 – Результаты исследования модели DoE по показателю LOD для процесса сушки травы *Hedysarum semenowii*

№	Тип точки	Температура, °C	Время, ч	LOD, %
1	1	40	5	15,6
2	0	60	7	7,6
3	0	60	7	7,4
4	-1	90	7	2,4
5	0	60	7	7,1
6	0	60	7	7,3
7	-1	30	7	14,6
8	1	80	9	3,1
9	-1	60	4	14,2
10	1	40	9	6,9
11	1	80	5	7,1
12	-1	60	10	11,7
13	0	60	7	7,4

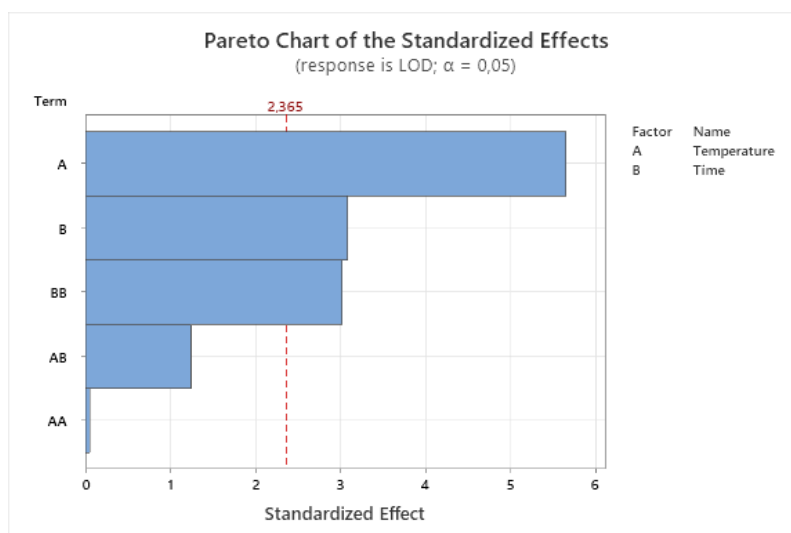


Рисунок 28 – Диаграмма Парето для взаимосвязи CPP и LOD травы *Hedysarum semenowii*

По результатам установления взаимосвязи технологических параметров и показателя качества «потеря в массе при высушивании», на основании модели DoE построен поверхностный график для отображения трехмерного представления связи точек отклика (потеря в массе при высушивании) и непрерывных переменных параметров (температура и время) (Рисунок 29).

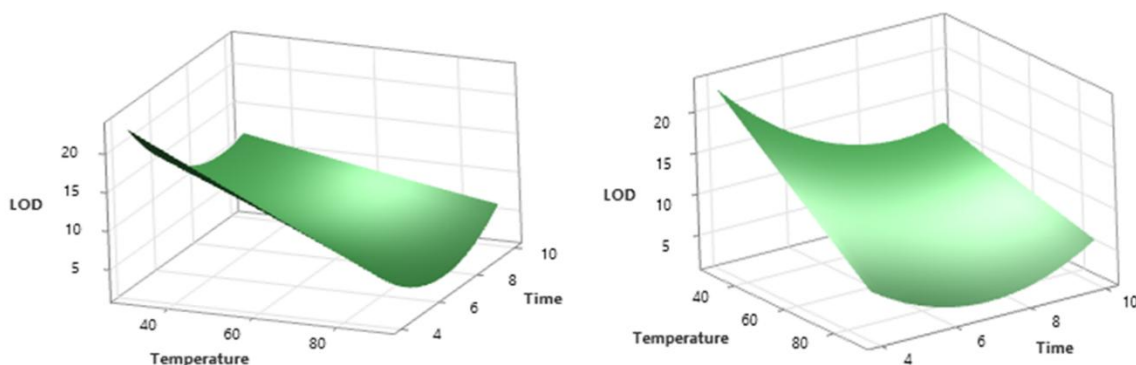


Рисунок 29 – Поверхностный график для взаимосвязи температуры и времени сушки с LOD травы *Hedysarum semenowii*

Для получения более детальных данных по оптимизации технологического процесса сушки травы *H. semenowii*, также применена функция Response Optimizator. Согласно оптимизатору отклика оптимальными значениями рассматриваемых технологических параметров сушки в отношении получения растительной субстанции надлежащего качества (LOD ~ 7,4%) являются следующие: температура сушки – 60 °C, время сушки – 5 часов (Рисунок 30). Выбор падающего температурного оптимума теоретически способствует максимальному сохранению термолабильных маркерных соединений, однако стоит учитывать то, что в качестве отклика модели DoE оценивалась исключительно остаточная влажность сырья.

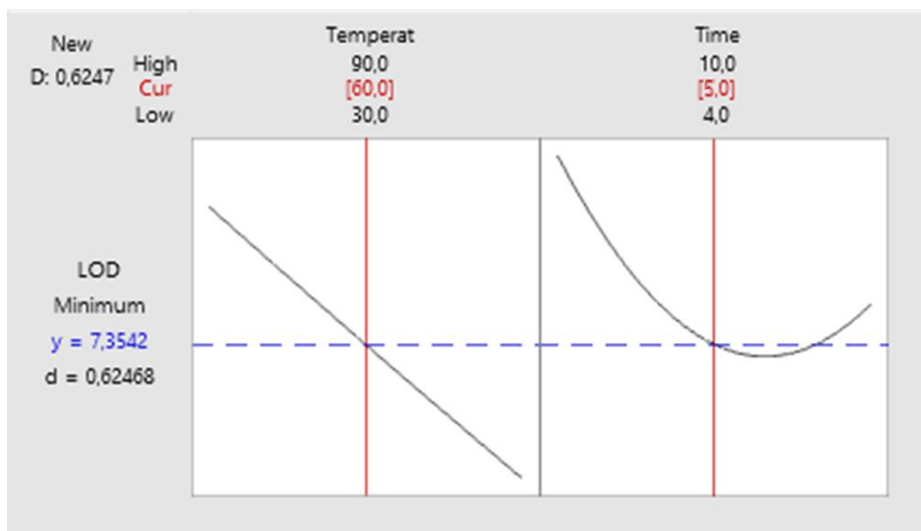


Рисунок 30 – Оптимизация отклика для технологических параметров сушки травы *Hedysarum semenowii*

Аналогичным способом проведено исследование взаимосвязи критических технологических параметров процесса сушки корней *H. semenowii* и показателя качества потеря в массе при высушивании. Для факторного пространства установлены следующие значения: температура сушки – 40 °C и

80 °С , время сушки – 8 ч и 16 ч (Таблица 24). Аксиальные точки: для температуры – 30 °С и 30 °С, для времени – 6,5 ч и 17,5 ч.

Таблица 24 – Факторное пространство критических технологических параметров процесса сушки корней *Hedysarum semenowii*

Технологические параметры	Нижний уровень фактора (-1)	Верхний уровень фактора (+1)
Температура	40 °С	80 °С
Время сушки	8 ч	16 ч

Функцией планирования экспериментов программного обеспечения Minitab сконструированы 13 схем испытаний в соответствии со стандартным дизайном, результаты которых продемонстрированы в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты исследования модели DoE по показателю LOD для процесса сушки корней *Hedysarum semenowii*

№	Тип точки	Температура, °С	Время, ч	LOD, %
1	0	60	12,0	6,4
2	1	80	8,0	5,7
3	0	60	12,0	6,3
4	0	60	12,0	5,9
5	-1	90	12,0	3,4
6	0	60	12,0	6,4
7	1	40	8,0	15,8
8	1	80	16,0	1,2
9	0	60	12,0	6,4
10	-1	30	12,0	16,1
11	1	40	16,0	7,1
12	-1	60	17,5	4,3
13	-1	60	6,5	12,7

Диаграммой Парето выявлена более тесная связь между факторами и откликом по сравнению с процессом, построенным для травы *H. semenowii* (Рисунок 31). Наблюдается, что и температура, и время сушки почти в одинаковой степени влияют на значение потери в массе при высушивании корней *H. semenowii*.

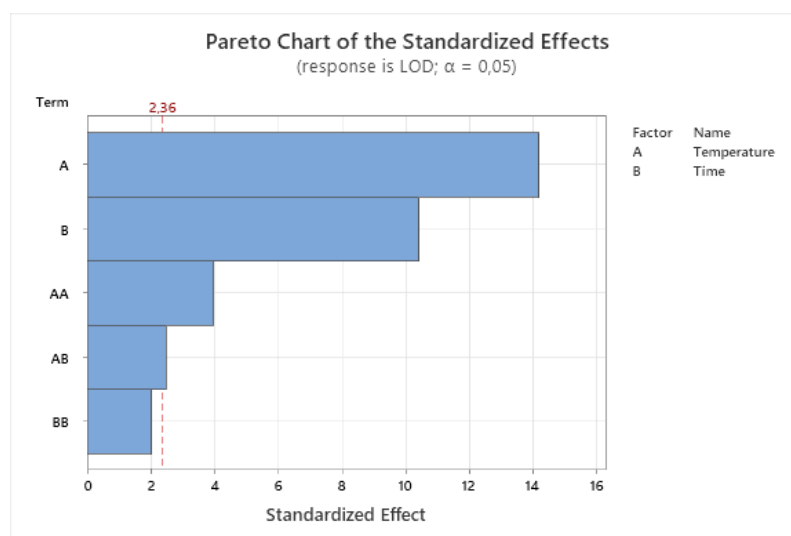


Рисунок 31 – Диаграмма Парето для взаимосвязи CPP и LOD корней *Hedysarum semenowii*

Поверхностным графиком иллюстрирована взаимосвязь параметров и ключевого показателя качества, на которых зона с наиболее приемлемыми значениями потери в массе при высушивании расположены в зоне 10-15 % (зеленая зона) (Рисунок 32).

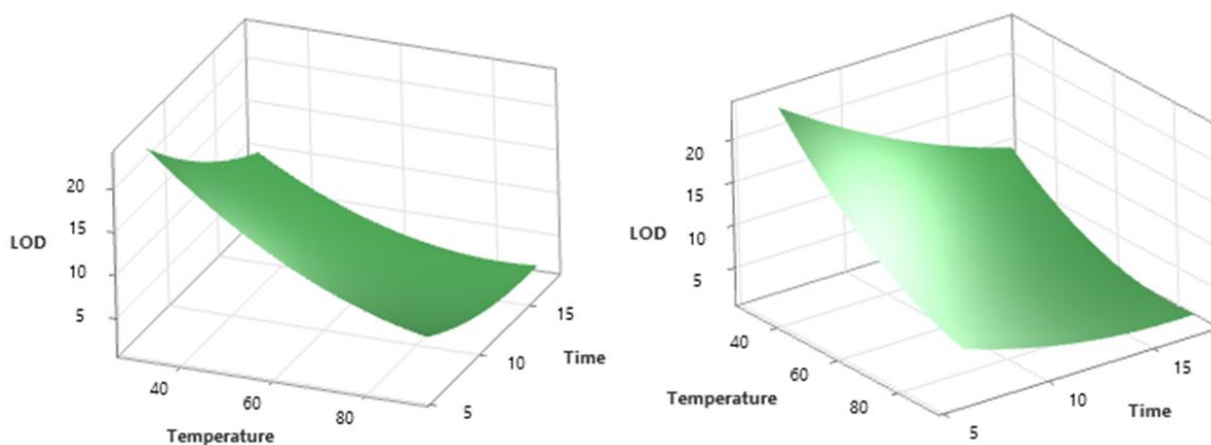


Рисунок 32 – Поверхностный график для взаимосвязи температуры и времени сушки с потерей в массе при высушивании корней *H.semenowii*

Оптимизатором отклика Minitab определены наиболее подходящие значения при сушке корней *H. semenowii*: температуре 60 °C в течение 12 часов (Рисунок 33). Данный режим обеспечивает достижение значений LOD с запасом удовлетворяющих установленные нормы спецификации.

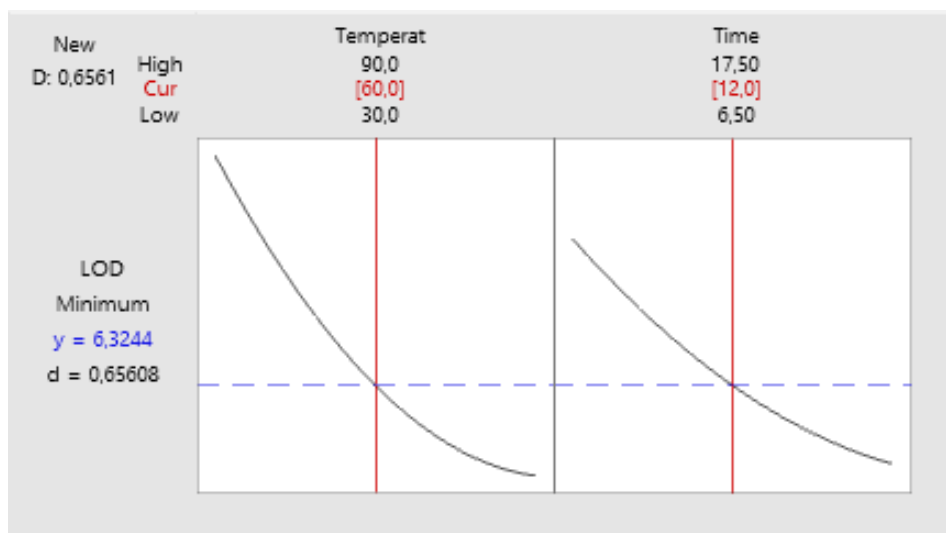


Рисунок 33 – Оптимизация отклика для технологических параметров сушки корней *H. semenowii*

Применением основных принципов QbD и статистического программного обеспечения определен подходящий способ процесса сушки копеечника Семенова, и установлен диапазон параметров, оптимальных для получения лекарственного растительного сырья фармакопейного качества. Благодаря подробному анализу модели планирования экспериментов возможно выделить стратегию контроля процесса сушки с меньшим количеством контролируемых точек, ограниченных зонами оптимальных значений рассмотренных технологических параметров.

Применение концепции «Quality by Design» в разработке технологии сбора и сушки лекарственного растительного сырья *Hedysarum semenowii* Regel & Herder позволило определить оптимальные технологические параметры и стратегию контроля, сводя к минимуму необходимость проведения обширных экспериментов и обеспечивая при этом всестороннее понимание процесса. Использование принципов QbD и функции планирования экспериментов привело к успешному определению проектного поля для процесса сушки травы *H. semenowii* и корней *H. semenowii*. Целевой профиль качества продукта соответствовал фармакопейным требованиям, при этом «потеря в массе при высушивании» определена как целевой показатель качества.

Благодаря тщательному моделированию DoE установлена взаимосвязь между критическими технологическими параметрами: температурой и временем сушки и LOD. Температура сушки оказалась преобладающим фактором, как показано на диаграмме Парето.

Визуальные представления, в том числе поверхностные графики, позволили выявить зоны с оптимальными значениями технологических параметров, обеспечивающих получение фармакопейного высушенного растительного сырья. Оптимизатор отклика Minitab определил наиболее теоретически подходящие значения температуры и времени сушки: 60 °C в течение 5 часов для травы и 60 °C в течение 12 часов для корней.

Исследование представляет собой значительный прогресс в разработке надежного и воспроизводимого процесса получения лекарственного растительного сырья из *Hedysarum semenowii* фармакопейного качества, демонстрируя практическое применение принципов QbD для оптимизации процесса сушки [105].

6.3 Разработка концепции фитоинтродукции копеечника Семенова

Развитие современной фармацевтической индустрии Республики Казахстан диктует необходимость перехода от экстенсивного использования дикорастущих ресурсов к созданию устойчивой, высокотехнологичной базы ЛРС [136]. В центре данной стратегии стоит процесс фитоинтродукции – научно обоснованного введения в культуру дикорастущих видов, обладающих подтвержденным терапевтическим потенциалом. Копеечник Семенова, являясь эндемичным и фармакологически перспективным представителем флоры Центрального Тянь-Шаня, представляет собой релевантный объект для реализации комплексной модели интродукции, сочетающей в себе принципы экологической устойчивости, агроменеджмента и строгого соблюдения международных стандартов качества [19,136]. Настоящая концепция формулирует научно-практические подходы к освоению данного вида, интегрируя глобальные Цели устойчивого развития (ЦУР 12 и 15) ООН [1] и современные требования Надлежащей практики культивирования и сбора (GACP) и Надлежащей производственной практики (GMP) в единый технологический цикл [137,138].

В результате проведенных исследований была предложена научно обоснованная концепция интродукции *Hedysarum semenowii* на базе производственных плантаций отечественного фармацевтического предприятия ТОО «ФитОлеум», которая включает в себя ботаническую аутентификацию, прецизионную подготовку почвы, контролируемый посев, регулируемый гидротермический режим и этичный сбор урожая (Рисунок 34).

Согласно основополагающим принципам GACP, первой и неотъемлемой стадией фитоинтродукции является научно обоснованный выбор вида растения, базирующийся на его химическом профиле и потенциальной медицинской ценности [138].

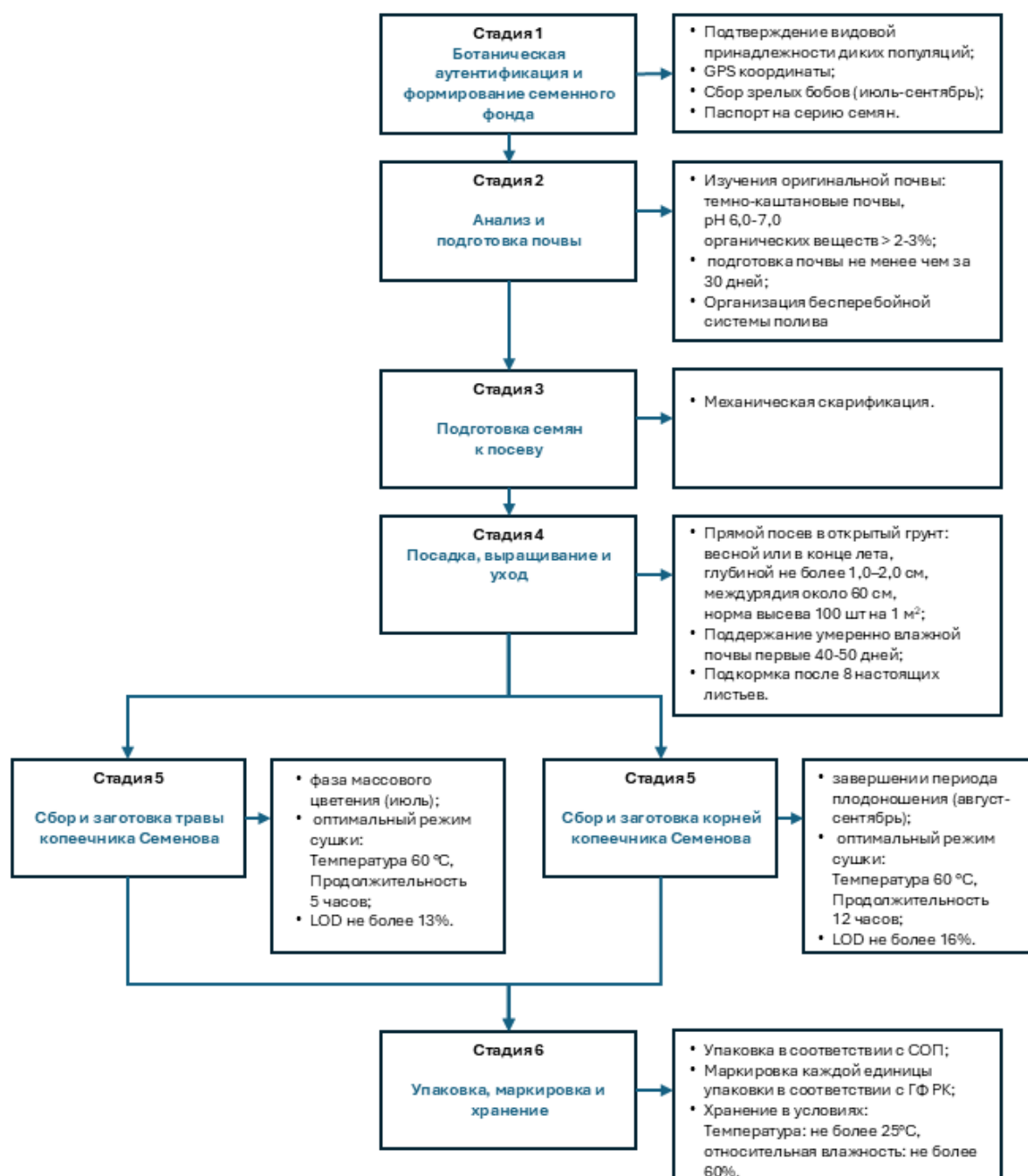


Рисунок 34 – Концепция интродукции *Hedysarum semenowii* в культуру

Выбор *Hedysarum semenowii* для фитоинтродукции обоснован в рамках, проведенных исследований по химическому составу и фармакологическому потенциалу, которые приведены в настоящей работе [43,94]. Разработка подходов к возделыванию копеечника Семенова позволит в перспективе получать стандартизированное сырье сразу двух типов (трава и корни), обладающих различным, но взаимодополняющим терапевтическим профилем [43].

Ботаническая аутентификация и формирование семенного фонда

После теоретического обоснования выбора вида, важнейшим этапом, регламентированным Директивой ГАСР, является достоверное подтверждение

ботанической идентичности исходного материала [137]. Сбор исходного генетического материала копеечника Семенова осуществляется в его естественных ареалах – на каменистых, щебнистых склонах и в кустарниковых зарослях среднего и верхнего горных поясов Заилийского Алатау [139]. Ключевым требованием стандарта ЕМЕА/НМРС/246816/2005 Rev. 1 является наличие у сборщиков глубоких знаний о морфологических характеристиках, фенотипической изменчивости и экологических требованиях целевого вида [137].

Для исключения рисков фальсификации идентификация и аутентификация собранных образцов (как вегетативных частей для гербария, так и семян) должна проводиться квалифицированными сотрудниками местных авторитетных учреждений, таких как РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ РК. Собранные экземпляры подвергаются строгому сопоставлению с подлинными гербарными эталонами, хранящимися в фондах института [105].

Семена растений с подтвержденной аутентичностью собирают после полного окончания периода цветения и наступления фазы массового плодоношения. В условиях Заилийского Алатау фенофаза бутонизации и цветения копеечника начинается в третьей декаде июня (или в начале июня при ранней весне) и длится в среднем 2-4 недели. Первые плоды завязываются в конце июня, а массовое плодоношение наступает в начале июля и продолжается около 14-29 дней, вплоть до августа-сентября [140]. Сбор бобов осуществляется вручную, когда они приобретают характерный буро-коричневый цвет, что свидетельствует о полной зрелости семян.

В соответствии с требованиями документации GACP, на каждую партию собранного семенного материала заводится исчерпывающий паспорт (Batch Documentation). Этот документ включает: точное ботаническое название, подробную информацию об источнике материала (точные GPS-координаты места сбора, высота над уровнем моря, описание биотопа), данные о качестве (процент чистоты, отсутствие примесей семян сорняков), историю размножения и методы первоначальной обработки.

Анализ и подготовка почвы

При введении в культуру дикорастущего вида существует необходимость тщательного изучения оригинальной почвы произрастания для учета этих данных при подготовке участков культивирования. Успех выращивания *H. semenowii* требует понимания того, как локальная среда обитания управляет эффективностью популяций узкоареальных таксонов в микромозаиках Центральной Азии [139].

Несмотря на то, что целные образцы сырья для фармакогностического исследования в данной работе собирались на хребте Кунгей Алатау, в качестве экологической модели для проектирования агрофона использованы фундаментальные данные почвенного покрова родственных популяций Заилийского Алатау – Кимасар, Большое Алматинское и Каскелен – соответствующих предлагаемой площадке интродукции. Перенос данных обоснован высокой степенью сходства почвенно-климатических условий Северного Тянь-Шаня: популяции формируются преимущественно на горно-

луговых темно-каштановых, горно-луговых дерново-каштановых и горно-термоксерофильных темно-каштановых почвах [141].

Физико-химический анализ этих оригинальных почв выявляет критические характеристики, описанные в таблице 26. Производственные плантации ТОО «ФитОлеум», расположенные в Тургенском сельском округе Алматинской области в предгорной зоне хребта Заилийского Алатау, соответствуют по локализации и возвышенности естественному ареалу вида.

Таблица 26 – Характеристика почвы в естественном ареале *H. semenowii*

Показатель	Характеристика в естественном ареале	Рекомендации по подготовке почвы для культивирования
Механический состав	Преимущественно легкосуглинистые (24,69 %-28,52 %) и супесчаные (7,32 %)	Посадка должна производиться в рыхлой, хорошо аэрируемой и дренированной суглинистой почве, предотвращающей застой влаги
рН	От слабокислой до нейтральной	Оптимальное значение рН 6.0 - 7.0
Органическое вещество	3,44 % - 8,54 %	Для повышения гумусности может вноситься разложенные органические удобрения (перегной, компост)
Азот	100,8 - 547,6 мг/кг	Азот вносится дозированно, чтобы не подавлять развитие клубеньковых бактерий
Фосфор	28 - 46 мг/кг	Возможно внесение диаммонийфосфата
Калий	170 - 450 мг/кг	Рекомендуется внесение сульфата калия
Засоленность	Содержание солей ниже 0,025%	Строгий контроль поливной воды и почвы для исключения накопления легкорастворимых солей

Подготовка местности и почвы на плантационном участке должна производиться заблаговременно – не менее чем за 30 дней до предполагаемой даты посева семян. Участок очищается от растительных остатков предыдущих культур и сорняков, проводится глубокая механизированная вспашка (на глубину не менее 25-30 см, учитывая формирование длинного стержневого корня копеечника) и последующее боронование для создания мелкокомковатой рыхлой структуры.

Для обогащения субстрата и приближения агрохимического фона к богатым горным луговым почвам могут использоваться смешанные комплексные удобрения, сульфат калия, диаммонийфосфат или полностью разложенные органические удобрения. Оптимальным признано дробное внесение азотных удобрений в критические фазы развития растения (начало активного вегетативного роста и бутонизация), что позволяет избежать избыточного накопления нитратов в будущем лекарственном сырье [142].

Система полива на участке организовывается таким образом, чтобы обеспечить бесперебойное поддержание определенной влажности почвы. Предпочтительным является использование систем капельного орошения.

Категорически недопустимо допускать как чрезмерного пересыхания почвы, так и её подтопления, которое неминуемо провоцирует развитие анаэробных процессов, асфиксию корневой системы и вспышки оомицетных корневых гнилей [143].

Подготовка семян к посеву

Семена подавляющего большинства дикорастущих видов семейства Бобовые (*Fabaceae*) и рода *Hedysarum*, в частности, характеризуются глубоким физическим покоем, обусловленным наличием твердой, водонепроницаемой семенной оболочки [144]. Высев таких туговсхожих семян без предварительной обработки приводит к крайне низкой, неравномерной и растянутой на несколько лет грунтовой всхожести, что неприемлемо для аграрного производства.

Для преодоления физического покоя семена копеечника Семенова подвергаются скарификации. Скарификация может быть механической, термической или химической. Для определения оптимального способа проведен тест лабораторной всхожести согласно общепринятым методикам (ГОСТ 12038-84) с адаптацией для дикорастущих видов в рассадных кассетах в трехкратной повторности. Наиболее высокая всхожесть семян копеечника Семенова была достигнута после механической скарификации, составив более 75% ($78,3 \pm 2,9$ %) (Рисунок 35). В промышленных масштабах механическая скарификация является наиболее эффективной и экологически безопасной [70,144].

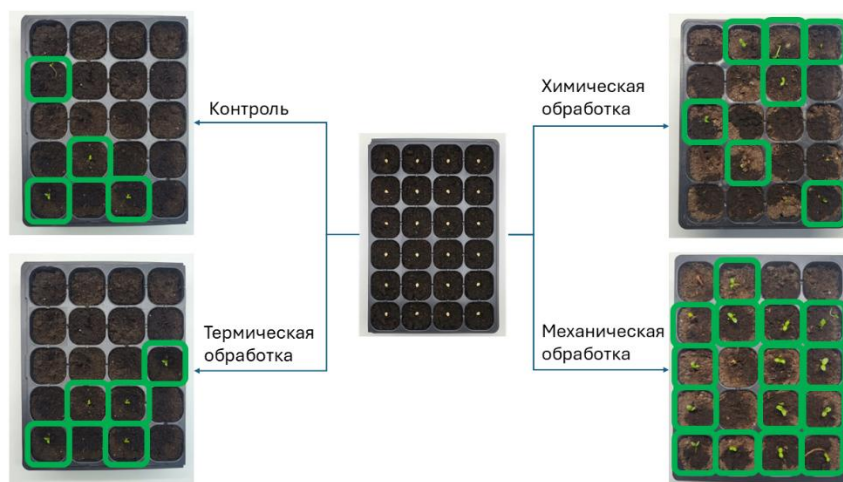


Рисунок 35 – Проверка всхожести семян копеечника Семенова различными методами скарификации

Метод посадки, климатические условия и онтогенез

Выбор метода закладки плантации является критическим фактором, определяющим архитектуру корневой системы. Для копеечника Семенова метод пересадки рассады признан биологически нецелесообразным и технологически рискованным. Виды рода *Hedysarum* формируют стержневую корневую систему с мощным, глубоко проникающим в почву главным корнем. Любое физическое вмешательство при выкопке и пересадке рассады неминуемо приводит к деформации главного корня [70]. В связи с этим, введения в культуру

H. semenowii необходимо производить прямым посевом семян непосредственно в открытый грунт.

Посадка скарифицированных семян проводится весной или в конце лета. Семена высевают рядовым способом в неглубокие бороздки с глубиной заделки 1 – 2 см. Для обеспечения оптимальной площади питания и возможности последующей механизированной обработки ширина междурядий должна составлять около 60 см, при норме высева порядка 100 штук всхожих семян на один квадратный метр.

Управление микроклиматом на этапе появления всходов требует особого внимания. В течение первых 30 - 40 дней после появления всходов ночная температура не должна опускаться ниже отметки в 6 °С, а дневная температура должна стабильно превышать 16 °С. Оптимальная продолжительность светового дня в период активного роста должна составлять в среднем не менее 16 часов [145]. В течение периода укоренения – 40 - 50 дней с момента прямого посева – почва поддерживается в умеренно влажном состоянии. При достижении сеянцами фазы 8 настоящих листьев, корневая система становится достаточно развитой для активного поглощения нутриентов, и для содействия интенсивному вегетативному росту надземной биомассы могут применяться стимулирующие подкормки.

Борьба с сорной растительностью предпочтительно осуществлять экологически безопасными механическими способами. Прополку в междурядьях целесообразно начинать после появления у всходов 6 настоящих листьев. Применение химических гербицидов на плантациях лекарственных культур сопряжено с рисками контаминации будущего сырья остаточными количествами пестицидов и допускается лишь в исключительных случаях, при строгом соблюдении регламентов и принципов GACP [138].

Сбор и заготовка лекарственного растительного сырья

В рамках предлагаемой концепции фитоинтродукции *H. semenowii*, разработан процесс сбора и сушки сырья с применением фармацевтической парадигмы QbD [105], которая описана в разделе 6.2 и внедрена на ТОО «ФитОлеум» (Приложение Е). На основе математического моделирования и оптимизатора отклика были определены единые окончательные режимы конвективной сушки, обеспечивающие достижение заданного LOD: для травы – при температуре 60 °С в течение 5 часов, для корней – 60 °С в течение 12 часов.

После завершения сушки сырье подвергается немедленной упаковке, маркировке и помещается на хранение при строго регламентируемых условиях [146]. Маркировка каждой тарной единицы должна содержать полную информацию о ботаническом виде, дате сбора, номере партии и сроке годности, обеспечивая прослеживаемость продукта.

6.4 Разработка технологии получения фармацевтической субстанции травы копеечника Семенова

С практической точки зрения, приоритет экстракции из надземной части копеечника Семенова имеет приоритетное значение для потенциального фармацевтического применения. Биологические активные соединения,

обнаруженные в этой части растения, демонстрируют высокий потенциал фармакологической активности, что делает ее ценным кандидатом для разработки лекарственных субстанций или создания растительных продуктов. Целенаправленный подход к экстракции не только оптимизирует процесс, но и соответствует конкретному химическому составу надземной части, обеспечивая соответствие полученных экстрактов фармакопейным стандартам. Кроме того, упор на получение экстрактов из надземной части соответствует принципам экологической устойчивости. Сосредоточение внимания на возобновляемых частях растения снижает необходимость массового сбора корней, способствуя ресурсосберегающему и экологичному процессу эксплуатации растительных популяций.

В целях разработки оптимальной технологии экстракции ЛРС в виде травы копеечника Семенова определены технологические параметры разных фракций измельчения, результаты которых представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Результаты определения технологических параметров травы *Hedysarum semenowii*

Технологические параметры	Размер измельчения сырья, мм		
	1-3	3-5	5-7
Удельная масса, г/см ³	1,47±0,05	1,51±0,10	1,45±0,05
Объемная масса, г/см ³	0,4±0,07	0,45±0,03	0,47±0,01
Насыпная масса, г/см ³	0,14 ±0,02	0,16±0,01	0,20±0,02
Пористость	0,81±0,20	0,92±0,25	0,97±0,28
Порозность	0,65±0,30	0,66±0,02	0,72±0,02
Свободный объем слоя сырья	0,93±0,04	0,95±0,6	0,97±0,19

Фракция 3-5 мм травы копеечника Семенова обладает оптимальной порозностью (0,66), хорошей насыпной массой для загрузки реактора и предсказуемым свободным объемом слоя (0,95), что обеспечит равномерную экстракцию без образования непроницаемых зон. Определение экстрактивных веществ (Таблица 28) показало, что растворы этанол с концентрацией 50% (27,66±0,62 %) и 70% (31,91±0,51 %) обеспечивает наибольший выход среди исследованных видов экстрагентов.

Таблица 28 – Результаты определения выхода экстрактивных веществ и коэффициента поглощения экстрагента

Экстрагент	Коэффициент поглощения экстрагента	Экстрактивных веществ
Вода очищенная	2,45±0,21	21,28±0,54
Спирт этиловый 30%	2,90±0,02	25,53±0,83
Спирт этиловый 50%	2,73±0,07	27,66±0,62
Спирт этиловый 70%	2,25±0,05	31,91±0,34
Спирт этиловый 96,6%	2,92±0,11	24,28±0,91

В целях исчерпывающего извлечения комплекса биологически активных веществ из надземной части *H. semenowii* был обоснован при помощи DOE и применен метод градиентной трехэтапной экстракции с последовательным снижением концентрации экстрагента. Данный подход обусловлен гетерогенностью полярности целевых маркеров. Несмотря на то, что максимальное извлечение мангиферина достигается при использовании 50 % этанола, применение безводного спирта на первом этапе является строгой технологической необходимостью. Это обеспечивает предварительную селективную экстракцию липофильных соединений (агликонов, хлорофилла) и предотвращает преждевременное коагулирование и переход в вытяжку водорастворимых балластных полисахаридов, которые затрудняют последующую фильтрацию.

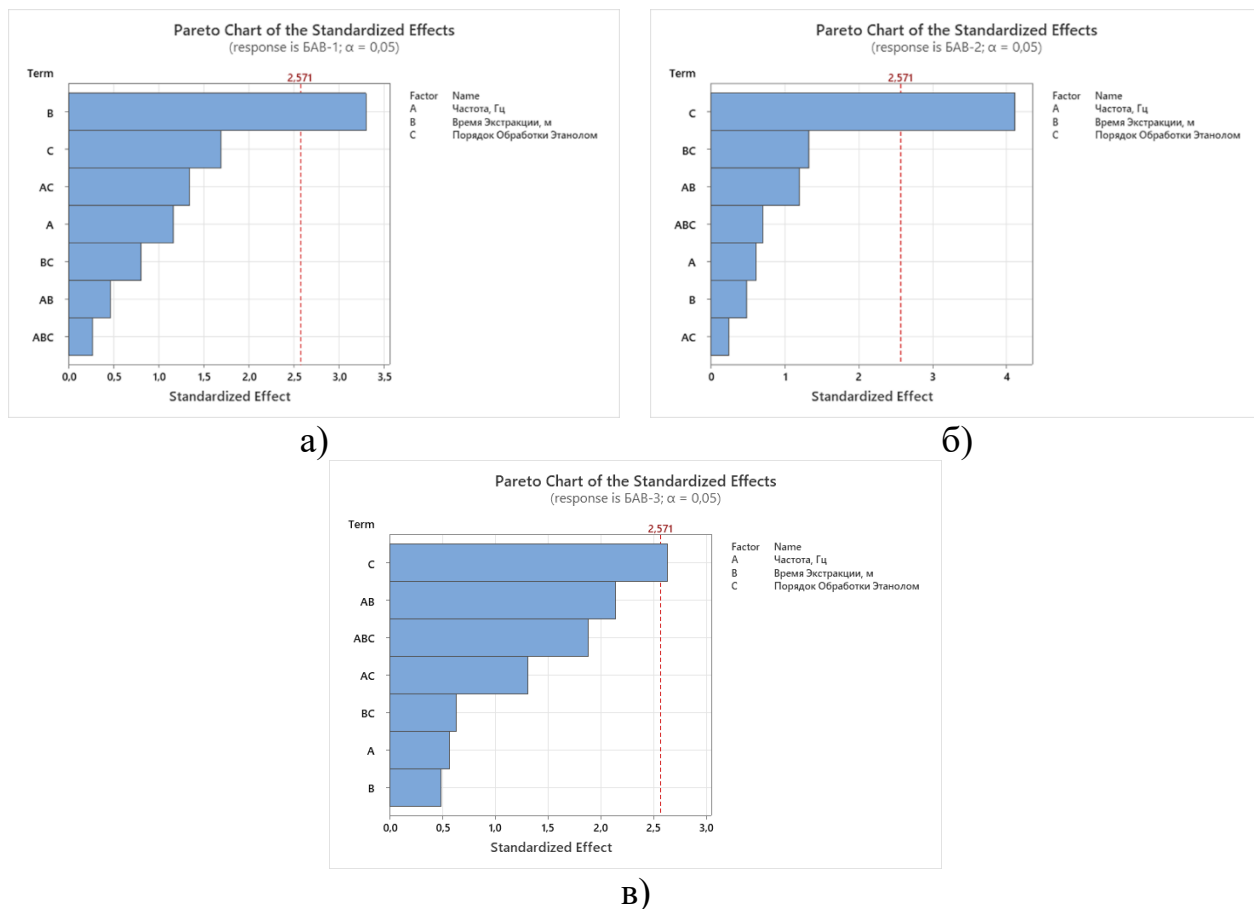
Последующее использование 70 % и 50 % растворов на втором и третьем этапах позволяет эффективно десорбировать гидрофильные гликозидные комплексы, включая мангиферин. Объединение вытяжек разной полярности гарантирует получение субстанции с максимальной фармакологической активностью при сохранении оптимальных реологических свойств для последующей каскадной микрофильтрации и лиофилизации. Полная матрица планирования экспериментов DoE с указанием исследованных уровней факторов и соответствующих значений откликов приведена в отдельной таблице 29.

Таблица 29 – Матрица планирования экспериментов и результаты оценки процесса экстракции травы *Hedysarum semenowii*

№	Частота ультразвука, кГц	Время экстракции (на один цикл), мин	Порядок экстрагента (концентрация этанола, %)	БАВ-1, %	БАВ-2, %	БАВ-3, %
1	25	10	50 → 70 → 99	25,64	1,80	2,97
2	45	10	50 → 70 → 99	27,31	1,80	3,41
3	25	60	50 → 70 → 99	33,09	1,40	3,15
4	45	60	50 → 70 → 99	33,46	1,40	3,03
5	25	10	99 → 70 → 50	33,52	3,10	5,14
6	45	10	99 → 70 → 50	34,56	3,40	5,46
7	25	60	99 → 70 → 50	34,65	2,60	4,23
8	45	60	99 → 70 → 50	36,12	2,30	3,89
9	25	35	50 → 70 → 99	30,53	2,30	3,23
10	45	35	50 → 70 → 99	31,26	1,70	4,01
11	25	35	99 → 70 → 50	37,51	3,60	5,12
12	45	35	99 → 70 → 50	38,23	3,40	4,89

В процессе планирования экспериментов (DoE) были определены основные параметры, влияющие на выход таких критических показателей, как экстрактивные вещества (БАВ-1), сумма флавоноидов в пересчете на рутин (БАВ-2) и количественное содержание мангиферина (БАВ-3) (Рисунок 36). Если на сумму экстрактивных веществ большее влияние оказывает время экстракции,

то выход флавоноидов и мангиферина сильнее коррелирует с типом экстрагента и его концентрацией.



а – экстрактивные вещества; б – сумма флавоноидов в пересчете на рутин;
в – количественное содержание мангиферина

Рисунок 36 – Диаграммы Парето для взаимосвязи СРР экстракции и выхода БАВ травы *Hedysarum semenowii*

Согласно оптимизатору отклика Minitab, установлены окончательные оптимальные параметры экстракции травы копеечника Семенова, позволяющие достичь максимального выхода целевых фракций: частота ультразвуковой обработки 45 кГц, продолжительность одного цикла экстракции – 20 минут (Рисунок 37).

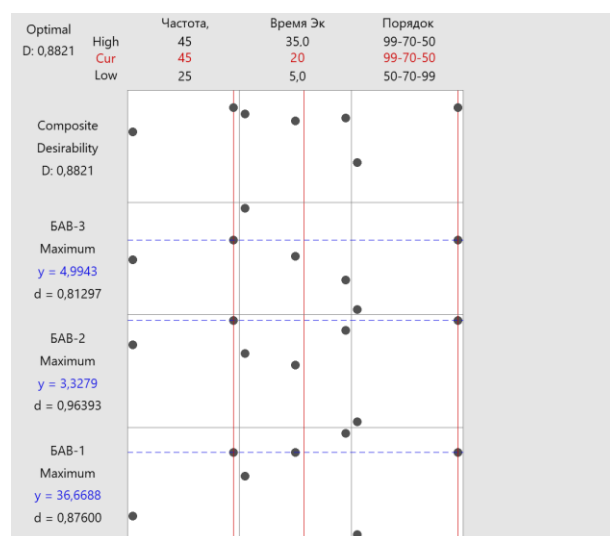


Рисунок 37 – Оптимизация отклика для технологических параметров экстракции травы *H. semenowii*

Таким образом, способ получения экстракта из надземной части копеечника Семенова состоит из нескольких технологических стадий, разработанных для сохранения нативных биологически активных веществ (в частности, флавоноидов) и обеспечения их высокого выхода. Разработанная технология экстрагирования является объектом интеллектуальной собственности (Приложение Д), воспроизводимость которой подтверждена результатами анализа трех экспериментальных партий сырья.

Процесс включает следующие этапы (Рисунок 38): подготовка растительного сырья; намачивание безводным этанолом в течение 4-6 часов (в соотношении 1:5); трехэтапная экстракция (первое извлечение с использованием безводного этанола (1:10) и ультразвуковой обработки (частота 25-45 кГц, три цикла по 15-20 минуты с интервалом в 1 час), второе извлечение с новой порцией 70 % этанола (1:10), третье извлечение с 50 % этанолом), после чего все три вытяжки объединяют; очистка экстракта (отстаивают в течение 72 ч при температуре от 5 до 10°C и проводят трехступенчатую фильтрацию под давлением); сгущение извлечения производят методом дистилляции на роторном испарителе (остаточное давление 2–3 мБар) при 40-50 °C и 90-120 об/мин в течение 2-4 ч; далее, для получения сухого экстракта подвергают лиофилизации в течение 24-30 ч при температуре ниже -50 °C и давлении не выше 0,02 мБар.

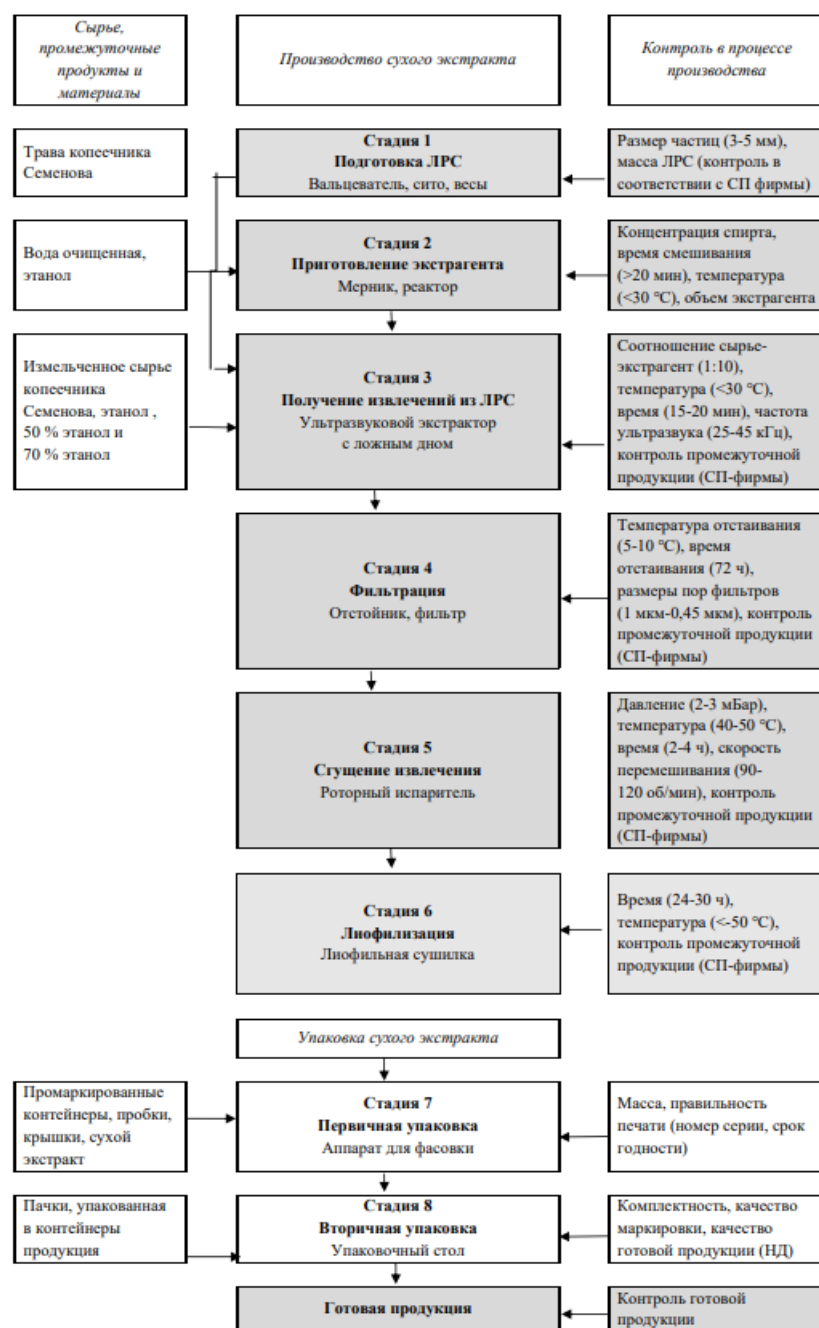


Рисунок 38 – Технологическая схема получения сухого экстракта *H. semenowii*

Качество полученной субстанции соответствует требованиям ГФ РК, на основе которых разработан проект спецификации качества «Копеечника Семенова экстракт сухой» (Приложение Я). Разработку спецификации качества полученной фармацевтической субстанции проводили в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, *Экстракты* [88]. Образцы экстракта заложены на долгосрочные исследования стабильности.

Выводы по шестой главе

Комплексное ресурсоведческое и технологическое исследование, проведенное в шестой главе, позволяет сформулировать ряд фундаментальных выводов, касающихся оценки природного потенциала *Hedysarum semenowii* и стратегии его внедрения в фармацевтическую практику.

Изучение природных ценопопуляций *H. semenowii* на территории хребта Кунгей Алатау показало низкий эксплуатационный запас сырья, не превышающий 46,2 кг воздушно-сухой массы в год. Главными лимитирующими факторами выступают малая площадь популяций (от 2,5 до 4,5 га), рассеянный характер распределения особей, низкая плотность произрастания генеративных побегов, а также сложная логистика сбора на крутых горных склонах. Эти данные научно обосновывают нерентабельность заготовки дикоросов и необходимость перевода вида в культуру.

Для разработки надежной технологии первичной обработки сырья копеечника Семенова впервые была успешно применена методология QbD в сочетании с инструментами планирования экспериментов (DoE). В качестве основного критического показателя качества (CQA) был выделен параметр потери в массе при высушивании (LOD), верхние пределы которого регламентированы: не более 13,0 % для травы и не более 16,0 % для корней. Построение графиков Парето доказало, что температурный режим является наиболее значимым фактором, достижение заданного уровня влажности. С помощью программного оптимизатора отклика были математически выверены окончательные технологические параметры конвективной сушки: для травы – при температуре 60 °С в течение 5 часов, для корней – при 60 °С в течение 12 часов. Выбор данного щадящего температурного оптимума теоретически способствует максимальному сохранению термолабильных метаболитов, однако прямое аналитическое подтверждение данного факта является задачей дальнейших исследований.

На основе анализа биоэкологических характеристик вида сформирована научно обоснованная концепция введения *H. semenowii* в культуру на базе производственных плантаций ТОО «ФитОлеум», которая гармонизирована с ЦУР ООН и требованиями GACP. В рамках стратегии устойчивого ресурсопользования фундаментальным принципом признан приоритетный сбор именно надземной биомассы, поскольку она концентрирует ценный ксантон мангиферин и богатый комплекс флавоноидов.

Для надлежащего извлечения комплекса биологически активных веществ травы копеечника Семенова концептуально разработан и оптимизирован способ получения фармацевтической субстанции. Применен метод градиентной трехэтапной экстракции с последовательным снижением концентрации экстрагента и ультразвуковой обработкой. Последующая очистка, вакуум-выпарное концентрирование при щадящих температурах (40–50°С) и лиофилизация обеспечивают максимальное извлечение и сохранение нативных соединений. Учитывая, что первичный фармакологический скрининг проводился на отдельных фракциях, изучение специфической активности и безопасности полученной конечной комплексной субстанции подлежит

верификации на последующих этапах исследований.

В конечном итоге, реализация предложенной модели плантационного культивирования позволит не только защитить уязвимые горные экосистемы Казахстана от антропогенного пресса, но и обеспечит отечественную фармацевтическую промышленность возобновляемой и высококачественной сырьевой базой для создания фитопрепаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена комплексному фармакогностическому изучению, стандартизации лекарственного растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), а также разработке научно обоснованной концепции его фитоинтродукции и технологии получения растительной фармацевтической субстанции. Настоящая исследовательская работа выполнена на базах НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова» (г. Алматы, Республика Казахстан), Люблинского медицинского университета (г. Люблин, Польша) и ТОО «ФитОлеум» (г. Есик, Республика Казахстан). Апробация, валидация методик контроля качества и внедрение технологии сбора, заготовки сырья, а также способа получения сухого растительного экстракта проведены на отечественном фармацевтическом предприятии ТОО «ФитОлеум». Работа решает актуальную для медицины и фармации задачу расширения номенклатуры отечественного лекарственного растительного сырья и предлагает научно обоснованные алгоритмы его внедрения в производство.

Впервые систематизированы макро- и микроскопические признаки травы и корней, необходимые для достоверной видовой идентификации копеечника Семенова. Травя растения отличается овальной формой стебля на поперечном срезе с угловатыми выступами и полным отсутствием опушения, развитой мощной склеренхимой из 6-7 слоев, сердцевинной из крупных сферических клеток без идиобластов, округлой формой листьев с выраженной асимметрией кутикулы, а также длиной желтого венчика, достигающего 14 мм. Корни копеечника Семенова имеют цилиндрическую форму и специфический желто-коричневый цвет наружной коры, что позволяет дифференцировать их от красноватой окраски корневых систем других официальных видов секции, таких как *H. polybotrys* и *H. neglectum* (Объект авторского права № 67778 от 20.02.2026 г.).

С применением современных высокочувствительных методов инструментального анализа, в частности высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения (RP-LC/DAD/ESI-QToF/MS/MS), проведено глубокое профилирование вторичных метаболитов. Суммарно идентифицировано 53 соединения, что существенно расширяет фундаментальные представления о хемотаксономии изучаемого вида. Доказана выраженная фитохимическая гетерогенность морфологических частей: в составе травы копеечника Семенова обнаружено 36 соединений, а в корнях – 27 соединений. Надземная часть отличается превалированием флавонолов, фенольных кислот и ксантонов, тогда как в подземной части идентифицирован специфический ряд изофлавоноидов, халконов и птерокарпанов, определяющих вектор ее потенциальной биологической активности.

Важным научным открытием, меняющим устоявшиеся хемотаксономические представления о распределении метаболитов в растениях рода *Hedysarum*, стало выявление ксантона мангиферина как в надземной, так и в подземной частях растения, что зафиксировано для данного эндемичного вида

впервые. Также впервые обосновано использование птерокарпана медикарпина и его 3-О-глюкозида в качестве высокоспецифичных и надежных хемотаксономических маркеров подземной части *H. semenowii* (Объект авторского права № 77564 от 19.08.2026 г.).

Доказана высокая потенциальная биологическая ценность сырья благодаря комплексному определению широкого спектра первичных метаболитов, выступающих базисом для нормальной физиологии растения и обладающих нутрицевтическим потенциалом. Идентифицирован профиль аминокислот (11 соединений в траве, 13 – в корнях), макро- и микроэлементов (преобладают кальций, калий и фосфор), а также витаминов. Выявленное превалирование в составе растения аргинина и пролина по сравнению с другими родственными видами, наряду с накоплением метионина, серина, лейцина и валина, имеет прямую корреляцию с механизмами биохимической адаптации растения к абиотическим стрессовым факторам высокогорья. Профиль жирных кислот, изученный методом качественного газохроматографического скрининга, выявил доминирование капроновой кислоты в траве и специфических длинноцепочечных кислот в корнях (арахиновая кислота), выполняющих мембраностабилизирующие и барьерные функции.

На основе строгих требований Государственной Фармакопеи Республики Казахстан (ГФ РК) и Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАЭС) были разработаны проекты спецификаций качества для травы и корней *H. semenowii*. Определены обоснованные числовые критерии приемлемости для ключевых параметров качества: потеря в массе при высушивании, общая зольность, пределы содержания тяжелых металлов, остаточных количеств пестицидов и микробиологическая чистота. В качестве прецизионного метода количественного определения маркерного компонента для травы предложена и валидирована аналитическая методика ВЭЖХ с научно обоснованным нормативным пределом содержания мангиферина не менее 0,1 % в пересчете на сухое сырье (Объект авторского права № 44765 от 17.04.2024 г.). Методика успешно прошла процедуру валидации по показателям специфичности, линейности, правильности, прецизионности и робастности, что гарантирует воспроизводимость результатов в условиях промышленных лабораторий. Разработанная аналитическая документация составила основу проектов нормативных документов «Копеечника Семенова трава» и «Копеечника Семенова корни», утвержденных на предприятии ТОО «ФитОлеум».

Доказана физико-химическая и микробиологическая стабильность сырья на основе данных текущих долгосрочных исследований на протяжении 12 месяцев согласно утвержденным национальным требованиям. В строгом соответствии с положениями международного руководства ICH Q1E нормативно заявляемый срок годности травы и корней на текущем этапе исследований установлен на уровне 24 месяцев. Дополнительно, путем применения регрессионного анализа ключевых показателей качества с использованием модуля Stability Study специализированного программного обеспечения Minitab, обоснован высокий теоретический предиктивный ресурс стабильности сырья, достигающий 60–70 месяцев (травя – 70 месяцев, корни – 67 месяцев), что

открывает перспективы для дальнейшего увеличения нормативного срока хранения.

В ходе доклинических испытаний *in vivo* доказано, что экстракты *H. semenowii* относятся к классу малотоксичных веществ. Установлено, что показатель острой токсичности (LD₅₀) при пероральном введении превышает 5000 мг/кг; экстракты не обладают клинически значимым местно-раздражающим (по шкале Дрейза) и местным аллергизирующим потенциалом. При оценке подострой (28-дневной) токсичности системной летальности не зафиксировано, физиологические показатели животных сохранялись в пределах нормы. Однако детальное гистоморфологическое исследование выявило дозозависимые реактивные изменения в экскреторных органах при высоких дозовых нагрузках. На основании этих данных впервые установлен уровень не наблюдаемого неблагоприятного эффекта (NOAEL) ниже 500 мг/кг, что является критически важным параметром для безопасного расчета терапевтического окна и эквивалентных доз при планировании будущих клинических исследований.

Скрининг *in vitro* выявил выраженную антиоксидантную и умеренную антибактериальную активность экстрактов надземной части копеечника Семенова. Наибольшая эффективность зафиксирована в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенных штаммов (*Staphylococcus* и *Pseudomonas aeruginosa*), что обусловлено высоким содержанием флавоноловых комплексов. В свою очередь, экстракты, полученные из корней копеечника Семенова, стабильно демонстрировали слабую антимикробную и следовую антиоксидантную активность, что закономерно объясняется их отличным фитохимическим профилем, преимущественно представленным изофлавоноидами.

Полевые исследования показали, что природные запасы эндемика недостаточны для промышленного применения (ежегодный эксплуатационный запас составляет около 46 кг), что делает эксплуатацию дикорастущих популяций экологически и экономически нецелесообразной. Для решения данной проблемы предложена научно обоснованная концепция фитоинтродукции копеечника Семенова на базе производственных плантаций ТОО «ФитОлеум». Концепция базируется на принципах точного земледелия (Индустрия 4.0) и международных стандартах GACP и GMP. Структурированная концепция состоит из следующих стадий: ботаническая аутентификация и формирование семенного фонда, анализ и подготовка почвы, подготовка семян к посеву, посадка и уход, сбор и заготовка растительного сырья, упаковка, маркировка и хранение. В рамках разработки концепции, проведена предварительная оценка всхожести семян копеечника Семенова с применением различных способов скарификации, в результате которого установлено преимущество механической обработки семян.

Для оптимизации послеуборочной обработки успешно применена современная фармацевтическая парадигма «Quality by Design» (QbD) и математическое планирование экспериментов (DoE). На их основе жестко зафиксированы оптимальные условия конвективной сушки сырья, обеспечивающие достижение заданных параметров потери в массе при

высушивании: для травы – при температуре 60 °С в течение 5 часов, для корней – при температуре 60 °С в течение 12 часов (Объект авторского права № 38239 от 03.08.2023 г.).

Финальным этапом технологических изысканий стала концептуальная разработка и оптимизация способа получения фармацевтической субстанции в виде сухого экстракта из надземной части копеечника Семенова, предназначенного для исчерпывающего извлечения комплекса биологически активных веществ. Использование градиентной трехэтапной экстракции с последовательным снижением концентрации экстрагента (безводный этанол, 70% и 50% этанол) в комбинации с импульсным применением ультразвуковой обработки позволяет селективно изолировать гидрофобные и гидрофильные фракции (включая мангиферин), предотвращая коагуляцию балластных полисахаридов. Новизна способа подтверждена патентом на полезную модель № 9815 «Способ получения растительного экстракта из травы копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)».

Таким образом, реализованный в диссертационной работе комплекс исследований, от ресурсоведческой оценки и фитохимического профилирования до испытаний *in vivo* и разработки научно обоснованной концепции фитоинтродукции и технологии получения растительной субстанции с применением концепции Quality by Design, обеспечил выполнение всех поставленных задач. Полученные результаты формируют полноценный научно-практический и нормативный фундамент для сохранения природного генофонда копеечника Семенова и создания на его основе возобновляемой, стандартизированной сырьевой базы для фармации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sachs, J.D., Lafortune, G., Fuller, G. The SDGs and the UN Summit of the Future. Sustainable Development Report 2024. – Paris: SDSN, Dublin: Dublin University Press, 2024. – 512 p.
2. Woo C. S. J., Lau J. S. H., El-Nezami H. Herbal Medicine. Toxicity and Recent Trends in Assessing Their Potential Toxic Effects // *Advances in Botanical Research*. – 2012. – Vol. 62. – P. 365–384.
3. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety // *Front. Pharmacol.* – 2014. – № 4. – P. 177.
4. Dong Y. et al. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* // *Chem. Cent. J.* – 2013. – Vol. 7. – № 1. – P. 124.
5. Liu P.-L. et al. *Hedysarum* L. (*Fabaceae: Hedysareae*) Is Not Monophyletic – Evidence from Phylogenetic Analyses Based on Five Nuclear and Five Plastid Sequences // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. e0170596.
6. Tava A. et al. Chemical Identification of Specialized Metabolites from *Sulla* (*Hedysarum coronarium* L.) Collected in Southern Italy // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 15. – P. 4606.
7. National Pharmacopoeia Commission. *Hedysari Radix* // *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* 2020. – Beijing: China Medical Science Press, 2020. – Vol. I. – P. 159–159.
8. Nechepurenko I. V. et al. Low-molecular-weight phenolic compounds from *Hedysarum theinum* roots // *Chem. Nat. Compd.* – 2008. – Vol. 44. – № 1. – P. 31–34.
9. Yurkevich O. Yu. et al. Molecular Cytogenetics of Eurasian Species of the Genus *Hedysarum* L. (*Fabaceae*) // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 89.
10. Liu Y. et al. Chemotaxonomy studies on the genus *Hedysarum* // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 103902.
11. Мухтубаева С. К. и др. Редкие растения ущелий Саты и Кольсай хребта Кунгей Алатау // *Проблемы ботаники южной Сибири и Монголии*. – 2016. – № 15. – С. 249–256.
12. WFO: *Hedysarum semenowii* Regel & Herder. [Электронный ресурс] – 2024. – URL: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000198851> (дата обращения: 10.10.2024).
13. Duan L. et al. Phylogeny of *Hedysarum* and tribe *Hedysareae* (*Leguminosae: Papilionoideae*) inferred from sequence data of ITS, matK, trnL-F and psbA-trnH // *Taxon*. – 2015. – Vol. 64. – № 1. – P. 49–64.
14. Choi B.-H., Ohashi H. Generic Criteria and an Infrageneric System for *Hedysarum* and Related Genera (*Papilionoideae*-*Leguminosae*) // *Taxon. International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*. – 2003. – Vol. 52. – № 3. – P. 567–576.
15. Yurkevich O. Yu. et al. Species of the Sections *Hedysarum* and *Multicaulia* of the Genus *Hedysarum* (*Fabaceae*): Taxonomy, Distribution,

Chromosomes, Genomes, and Phylogeny // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25. – № 15. – P. 8489.

16. Малышев Л. И. и др. Конспект флоры Азиатской России: сосудистые растения / под ред. Байков К. С. – Новосибирск: Издательство Сибирского отделения Российской академии наук, 2012. – 630 с.

17. Байтенов М. С. и др. Флора Казахстана / под ред. Павлов Н. В. – Алма-Ата: Издательство академии наук Казахской ССР, 1961. – С. 218–230.

18. Рыжова А. Плонтариум (2024): Копеечники КР Флористический список [Электронный ресурс] – 2024. – URL: <https://www.plantarium.ru/page/flora/id/1054.html> (дата обращения: 10.10.2024).

19. Keleke A. S. et al. Kazakh plant species of the genus *Hedysarum* L.: distribution, botanical description and profile of pharmacological activity // Farmaciã Kazahstana. – 2023. – № 3. – P. 297–306.

20. Karnaukhova N. A. Ontogenesis and life forms of *Hedysarum* L. (Fabaceae) in South Siberia // Contemp. Probl. Ecol. – 2015. – Vol. 8. – № 5. – P. 614–623.

21. Yu F.-H. et al. Effects of clonal integration on species composition and biomass of sand dune communities // J. Arid Environ. – 2010. – Vol. 74. – № 6. – P. 632–637.

22. Bassendowski K. A., Howarth R. E., Smith J. D. The potential value of *Hedysarum alpinum* var. *americanum* as a forage legume for the Northern Canadian Prairies // Canadian Journal of Plant Science. – 1989. – Vol. 69. – № 3. – P. 815–822.

23. Johnson D. A. et al. Morphological and Physiological Variation among Ecotypes of Sweetvetch (*Hedysarum boreale* Nutt.) // Journal of Range Management. – 1989. – Vol. 42. – № 6. – P. 496–501.

24. Nafisi H. et al. *Hedysarum alamutense* (Fabaceae-Hedysareae), a new species from Iran, and its phylogenetic position based on molecular data // Turk. J. Botany. – 2019. – Vol. 43. – № 3. – P. 386–394.

25. Dural H., Citak B. Y. Morphology and anatomy of *Hedysarum pannosum* (Boiss.) Boiss. (Fabaceae) // Acta Bot. Croat. – 2015. – Vol. 74. – № 1. – P. 19–29.

26. Zvyagina N. S., Dorogina O. V., Catalan P. Genetic relatedness and taxonomy in closely related species of *Hedysarum* (Fabaceae) // Biochem. Syst. Ecol. – 2016. – Vol. 69. – P. 176–187.

27. Nechepurenko I. V. et al. Components of the ethylacetate extract of *Hedysarum theinum* roots // Chem. Nat. Compd. – 2007. – Vol. 43. – № 1. – P. 5–9.

28. He W. M., Xi W. M., Anten N. P. R. Chronic wind and plant communities in dunes: Total biomass, inter-specific competition, and species abundance // J. Arid Environ. – 2013. – Vol. 90. – P. 69–76.

29. Ranjbar M. Two New Species of *Hedysarum* (Fabaceae) from Iran // Novon (St. Louis). – 2010. – Vol. 20. – № 3. – P. 329–333.

30. Holcroft A. C., Herrero S. Grizzly bear digging sites for *Hedysarum sulphurescens* roots in southwestern Alberta // Can. J. Zool. – 1984. – Vol. 62. – № 12. – P. 2571–2575.

31. Sitpayeva G. T. et al. Crop wild relatives of Kazakhstani Tien Shan: Flora, vegetation, resources // Plant Divers. – 2020. – Vol. 42. – № 1. – P. 19–32.

32. Gao X. et al. Pharmacological action of *Hedysarum* polysaccharides: a review // *Front. Pharmacol.* – 2023. – Vol. 14.
33. Imachuyeva D. R., Serebryanaya F. K., Zilfikarov I. N. Quantitative determination of xanthone sum in terms of mangiferin in aërian organs of species of genus *Hedysarum* L. by UV spectrophotometry // *Chemistry of plant raw material.* – 2020. – № 3. – P. 179–186.
34. Умралина А. Р., Конурбаева Р. У. Фитохимические и биологические исследования растений Кыргызстана рода *Hedysarum* // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* – 2021. – № 10. – С. 36–41.
35. Иманбердиева Н. А. Эндемы и редкие виды флоры долины Ат-Баши внутреннего Тянь-Шаня Кыргызстана // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета.* – 2017. – № 4(150). – С. 73–77.
36. Liu Y. et al. Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum* // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2005. – Vol. 33. – № 8. – P. 809–812.
37. Zou K., Komatsu K., Zhu S. A novel compound from *Hedysarum polybotrys* // *J. Asian Nat. Prod. Res.* – 2007. – Vol. 9. – № 8. – P. 699–703.
38. Liu Y. et al. Saponins from the roots of *Hedysarum polybotrys* // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2007. – Vol. 35. – № 6. – P. 389–391.
39. Hikino H., Funayama S., Endo K. Hypotensive principle of *Astragalus* and *Hedysarum* roots // *Planta Med.* – 1976. – Vol. 30. – № 08. – P. 297–302.
40. Owen N. et al. Secondary metabolites from *Hedysarum setigerum* // *Chem. Nat. Compd.* Kluwer Academic Publishers. – 2004. – Vol. 40. – № 1. – P. 91–92.
41. Neretina O. V. et al. Isolariciresinol glucoside, berberine, and phenolic acids from the aerial part of *Hedysarum setigerum* // *Chem. Nat. Compd.* – 2004. – Vol. 40. – № 6. – P. 609–610.
42. Neretina O. V. et al. Flavonoids of *Hedysarum setigerum* // *Chem. Nat. Compd.* – 2002. – Vol. 38. – № 2. – P. 194–195.
43. Keleke A. et al. Phytochemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Hedysarum semenowii* (Fabaceae) // *Molecules.* – 2025. – Vol. 30. – № 23. – P. 4503.
44. Kotsupiy O. V., Lobanova I. E. Phenolic Compounds in Leaves and Inflorescences of *Hedysarum alpinum* L. and *H. flavescens* Regel et Schmalh., Introduced into the Forest-Steppe Zone of Western Siberia // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2023. – Vol. 49. № 7. С. 1667–1676.
45. Mar‘In A. A., Kolomiets N. E. Medicinal plants and biologically active substances with antifungal properties // *Fundamental and Clinical Medicine.* – 2017. – Vol. 2. – № 4. – P. 45–55.
46. Lobanova I. E. et al. Comparative evaluation of the antiviral activity of extracts of some higher plants against influenza A virus *in vitro* // *Chemistry for Sustainable Development.* – 2021. – Vol. 29. – № 6. – P. 657–664.
47. Liu Y. et al. Chemical analysis of the principal flavonoids of *Radix Hedysari* by HPLC. // *Nat. Prod. Commun.* – 2010. – Vol. 5. – № 4. – P. 541–544.

48. Liu Y. et al. Isoflavonoids from *Hedysarum semenovii* // The Chinese Pharmaceutical Journal. – 2009. – № 44. – P. 1533–1535.
49. Liu Y. et al. Two new isoprenyl chalcones from *Hedysarum gmelinii* // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2005. – Vol. 7. – № 5. – P. 723–727.
50. Yang M. et al. Characterization of phenolic compounds in the crude extract of *Hedysarum multijugum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2007. – Vol. 21. – № 23. – P. 3833–3841.
51. Hedysarum root // The Japanese Pharmacopoeia (JP XVIII). 18th Ed. – Tokyo: Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA), 2021. – P. 2031.
52. Кукушкина Т. А. и др. Содержание ксантонов в надземной части растений *Hedysarum theinum* Krasnob. и *H. alpinum* L. (Fabaceae) при выращивании в Сибирском ботаническом саду (г. Томск) // Химия растительного сырья. – 2011. – № 3. – С. 113–116.
53. Vesnina A. et al. Evaluation of the In Vivo Anti-Atherosclerotic Activity of Quercetin Isolated from the Hairy Roots of *Hedysarum neglectum* Ledeb // Life (Basel, Switzerland). – 2023. – Vol. 13. – № 8. – P. 1706.
54. Liu D. et al. Syringe Paper-Based Analytical Device for Thiamazole Detection by Hedysarum Polysaccharides-Mediated Silver Nanoparticles // Micromachines (Basel). – 2023. – Vol. 14. – № 2. – P. 350.
55. Wang Y. et al. The influence of the total flavonoids of *Hedysarum polybotrys* on the proliferation, cell cycle, and expressions of p21Ras and proliferating cell nuclear antigen gene in erythroleukemia cell line K562 // Chin. J. Integr. Med. – 2012. – Vol. 18. – № 5. – P. 385–390.
56. Lu K.-T. et al. Discriminating Astragali Radix from Hedysarum Radix in Chinese medicine preparations using nested PCR and DNA sequencing methods // J. Food Drug Anal. – 2020. – Vol. 17. – № 5. – Article 2.
57. Dao R. et al. Exploration of the Characteristics of Intestinal Microbiota and Metabolomics in Different Rat Models of Mongolian Medicine. // Evid. Based. Complement. Alternat. Med. – 2021. – Vol. 2021. – P. 5532069.
58. Лаврентьев М. В. Антибактериальная Активность Водных Экстрактов *Hedysarum Grandiflorum* Pall. // Бюллетень Медицинских Интернет-Конференций. – 2013. – Т. 3. – № 2. – С. 379.
59. Liu Y. et al. Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated chalcones from *Hedysarum gmelinii* // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2018. – Vol. 20. – № 11. – P. 1009–1018.
60. Dyshlyuk L. S. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of Panax ginseng and *Hedysarum neglectum* root crop extracts // Brazilian Journal of Biology. – 2024. – Vol. 84. – e256944.
61. Wei D. et al. Synthesis, characterization, antioxidant activity and neuroprotective effects of selenium polysaccharide from Radix hedysari // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 125. – P. 161–168.
62. Modifying Hedysarum polysaccharide useful for e.g. lowering blood sugar and preventing osteoporosis, by degreasing *Hedysarum*, performing enzymatic

hydrolysis with complex enzyme, ultrasonically treating and precipitating with ethanol [Текст]: пат. CN108892733-A China: 2018.

63. Extraction separation of *Hedysarum* polysaccharide used for lowering blood sugar by extracting *Hedysarum* medicinal material, adding ethanol, and filtering to obtain three deposits, and respectively drying and purifying the deposits: пат. CN101323872-A China: Univ Lanzhou, 2008.

64. Use of radix *Hedysari*, *Hedysarum polybotrys* saccharide, or pharmaceutical composition containing radix *Hedysari* or *Hedysarum polybotrys* saccharide for improving cognitive dysfunction and/or treating Alzheimer's disease: пат. CN102018747-A China: 2011.

65. Method of obtaining mangiferin by ethanol extn. of *Hedysarum alpinum* L., *H. flavescens* Regel et Schmalh, or mango tree leaves: пат. RU2032413-C1 Russia: 1995.

66. Method for preparing phytopreparation of plants of genus *Hedysarum* (*Hedysarum theinum*, *Hedysarum neglectum*): пат. RU2490022-C1 Russia: 2013.

67. Cosmetics for skin whitening and moisturizing, comprises extract of *Hedysarum austrosibiricus* root, as the active ingredient: пат. JP2001253814-A Japan: 2002.

68. Dietotherapy stewing product useful for e.g. female physiological regulation, comprises *Anoectochilus*, *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys*: пат. CN105477352-A China: 2016.

69. Method for preparing dry *Hedysarum* extract nanocapsules in guar gum: пат. RU2674012-C1 Russia: 2018.

70. Конурбаева Р. У., Алдаярбек кызы Г., Умралина А. Р. Введение в культуру и сохранение в коллекции *in vitro* копеечников Кыргызстана // Известия Вузов. – 2015. – № 2. – С. 126–131.

71. Maciejewska-Turska M., Zgórk G. In-depth phytochemical and biological studies on potential AChE inhibitors in red and zigzag clover dry extracts using reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) coupled with photodiode array (PDA) and electron spray ionization-quadrupole/time of flight-mass spectrometric (ESI-QToF/MS-MS) detection and thin-layer chromatography-bioautography // Food Chem. – 2022. – Vol. 375. – P. 131846.

72. Макроскопическое исследование лекарственного растительного сырья // Фармакопея Евразийского экономического союза. – Москва: Евразийская экономическая комиссия, 2025. – Т. 1. – С. 5.

73. Sundrarajoo P. et al. Morphological and Anatomical Studies on *Glycosmis perakensis* V.Naray (Rutaceae) // Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences. – 2022. – Vol. 18. – № 4. – P. 473–482.

74. Sidjimova B., Nikolova M. Distribution and Resource Evaluation of *Tribulus Terrestris* L. in North Bulgaria // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2010. – Vol. 24. – № 1. – P. 71–77.

75. Кудашкина Н. В., Хасанова С. Р., Мещерякова С. А. Фитохимический анализ: учеб. Пособие по фармакогнозии для студентов. – Уфа: Издательство ГОУ ВПО БГМУ РосЗДРАВа, 2007. – 281 с.

76. Имачуева Д. Р. Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых видов рода копеечник (*Hedysarum* L.), произрастающих на территории Северного Кавказа. – Пятигорск: Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ФГБОУВО «Волгоградский государственный медицинский университет», 2021. – 203 с.
77. Кадырбаева Г. М. Фармакогностическое изучение видов рода *Allium* флоры Казахстана и перспективы их использования. – Алматы: НАО «Казахский Национальный Медицинский Университет имени С.Д. Асфендиярова», 2022. – 184 с.
78. Высочина Г. И., Кукушкина Т. А. Биологически активные вещества некоторых видов рода *Hedysarum* L. // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – С. 251–258.
79. Ладыгина Е. Я., Сафронич Л. Н., Отряшенкова В. Э. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов / под ред. Гринкевич Н. А., Сафронич Л. Н. – Москва: Высшая Школа, 1983. – 176 с.
80. The Scripps Research Institute. METLIN: Metabolite and Chemical Entity Database [Электронный ресурс] – 2024. – URL: <https://metlin.scripps.edu> (дата обращения: 19.02.2024).
81. The Human Metabolome Database Team. HMDB: The Human Metabolome Database [Электронный ресурс] – 2024. – URL: <https://hmdb.ca> (дата обращения: 19.02.2024).
82. Kubczak M. et al. *Hippophae rhamnoides* L. leaf and twig extracts as rich sources of nutrients and bioactive compounds with antioxidant activity // Sci. Rep. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 1095.
83. Nabiyeva Z. P. et al. Lipid composition during the germination of Kazakhstan maize hybrid // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2013. – № 19. – P. 780–784.
84. Yan J. et al. Evaluation of food-grade vegetable oils using ultrasonic velocity measurement and fatty acid composition // 2019 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). – IEEE, 2019. – P. 2435–2438.
85. Государственная фармакопея Республики Казахстан. 2-е изд. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2015. – Т. 1. – 720 с.
86. Лекарственное растительное сырье // Фармакопея Евразийского экономического союза. – Москва: Евразийская экономическая комиссия, 2025. – Т. 1. – С. 3.
87. Фармакопея Евразийского экономического союза. – Москва: Евразийская экономическая комиссия, 2020. – Т. I, часть 1. – 586 с.
88. Государственная Фармакопея Республики Казахстан. 1-е изд. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. – Т. 1. – 592 с.
89. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. Миронова А. Н. – Москва: Гриф и К, 2012. – Т. 1. – 944 с.
90. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. – OECD, 2002. – 14 с.

91. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. / под ред. Хабриев Р. У. – Москва: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
92. Келеке А. С. и др. Исследование острой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii* Reger & Herder // Сборник материалов XIV Всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 430–431.
93. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. – OECD Publishing, 2025. – 15 с.
94. Keleke A. S. et al. Subacute toxicity, local irritant, and allergenic effects of *Hedysarum semenowii* extract // Drug development & registration. – 2025. – Vol. 14. – № 4. – P. 208–220.
95. Nguenang G. S., Ntyam A. S. M., Kuete V. Acute and Subacute Toxicity Profiles of the Methanol Extract of *Lycopersicon esculentum* L. Leaves (Tomato), a Botanical with Promising *In Vitro* Anticancer Potential // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2020. – № 1. – P. 8935897.
96. Chandra S. A. et al. Dermal Toxicity Studies // Toxicol. Pathol. – 2015. – Vol. 43. – № 4. – P. 474–481.
97. Mochizuki H. et al. Optimization of a histamine-induced allergic conjunctivitis model in Guinea pigs // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. – 2022. – Vol. 113. – P. 107133.
98. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution // Clinical Microbiology and Infection. – 2003. – Vol. 9. – № 8. – P. 1-7.
99. Zhumakanova B. S. et al. Phytochemical Fingerprinting and In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Aerial Parts of *Thymus marschallianus* Willd. and *Thymus seravschanicus* Klovov Growing Widely in Southern Kazakhstan // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 11. – P. 3193.
100. Scherer R., Godoy H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method // Food Chem. – 2009. – Vol. 112. – № 3. – P. 654–658.
101. Gani G. et al. Determination of pharmaceutical-technological parameters of the plant raw material *Euphorbia humifusa* Willd. // Actual Problems of Theoretical and Clinical Medicine. – 2025. – Vol. 49. – № 3. – P. 127-138.
102. Lee S.-H. et al. Quality by Design (QbD) application for the pharmaceutical development process // J. Pharm. Investig. – 2022. – Vol. 52. – № 6. – P. 649–682.
103. Beg S. et al. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications // Pharmaceutical Quality by Design. – Elsevier, 2019. – P. 1–17.
104. Yu L. X. et al. Understanding Pharmaceutical Quality by Design // AAPS J. – 2014. – Vol. 16. – № 4. – P. 771–783.

105. Keleke A. S. et al. Development of technology for collecting and drying herbal materials of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder in the «Quality by Design» concept // Farmaciâ Kazahstana. – 2024. – № 4. – P. 219–228.
106. Imachuyeva D. R., Serebryanaya F. K. The current state of study of plants of *Hedysarum* L. floras of the Caucasus // Pharmacy & Pharmacology. – 2016. – Vol. 4. – № 6. – P. 4–32.
107. Федорова Ю. С. и др. Сравнительный анализ биологически активных веществ *Hedysarum alpinum* L. и *Hedysarum theinum* Krasnob. Методом тонкослойной хроматографии // Вестник науки и образования. – 2018. – № 16(52). – С. 79–84.
108. Chaffey N. Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: their Structure, Function, and Development. 3rd edn. // Ann. Bot. – 2006. – Vol. 99. – № 4. – P. 785–786.
109. Zheleva-Dimitrova D. et al. Metabolite profiling and bioactivity of *Cicerbita alpina* (L.) Wallr. (*Asteraceae*, *Cichorieae*) // Plants. – 2023. – Vol. 12. – № 5. – P. 1009.
110. Pilařová V. et al. Carbon dioxide expanded liquid: an effective solvent for the extraction of quercetin from South African medicinal plants // Plant Methods. – 2022. – Vol. 18. – № 1. – P. 87.
111. Song X.-C. et al. Discovery and Characterization of Phenolic Compounds in Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) Leaves Using Liquid Chromatography–Ion Mobility–High-Resolution Mass Spectrometry // J. Agric. Food Chem. – 2021. – Vol. 69. – № 37. – P. 10856–10868.
112. Boso S. et al. Polyphenols in the Waste Water Produced during the Hydrodistillation of 'Narcea Roses' Cultivated in the Cibeia River Valley (Northern Spain) // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8. – № 5. – P. 376.
113. Murai Y., Nakamura K. Phenolic Compounds from *Hedysarum vicioides* (Fabaceae) in Japan // Bulletin of the National Museum of Nature and Science. – 2022. – Vol. 48. – № 3. – P. 95–100.
114. Allamberganova Z. et al. Phytochemical Profile and Biological Activity of the Ethanolic Extract from the Aerial Part of *Crocus alata* Regel & Semen Growing Wildly in Southern Kazakhstan // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – № 11. – P. 3468.
115. Chiriac E. R. et al. Comparison of the Polyphenolic Profile of *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L. Sprouts in Different Germination Stages Using the UHPLC-Q Exactive Hybrid Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 10. – P. 2321.
116. Andrade J. et al. Chemical analysis, antioxidant, antichemotactic and monoamine oxidase inhibition effects of some pteridophytes from Brazil // Pharmacogn. Mag. – 2014. – Vol. 10. – № 37. – P. 100.
117. Shan L. et al. Rapid Screening of Chemical Constituents in *Rhizoma Anemarrhenae* by UPLC-Q-TOF/MS Combined with Data Postprocessing Techniques // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2017. – Vol. 2017. – № 1. – P. 4032820.

118. Polasek J., Queiroz E. F., Hostettmann K. On-line identification of phenolic compounds of *Trifolium* species using HPLC-UV-MS and post-column UV-derivatisation // *Phytochemical Analysis*. – 2007. – Vol. 18. – № 1. – P. 13–23.
119. Okińczyc P. et al. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* L. and *Trigona* sp. propolis from Nepal and its phytochemical analysis // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 129. – P. 110435.
120. Wang H.-Y. et al. Metabolites of Medicarpin and Their Distributions in Rats // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 10. – P. 1966.
121. Trovato M. et al. Editorial: Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense // *Front. Plant Sci.* – 2021. – Vol. 12. – P. 772810.
122. Menzel W. I. et al. Qualitative and Quantitative Screening of Amino Acids in Plant Tissues // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2012. – P. 165–178.
123. Kalariya K. A., Mevada R. R., Das M. Characterization of phenylalanine ammonia lyase and revealing flavonoid biosynthesis in *Gymnema sylvestre* R. Br through transcriptomic approach // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 100344.
124. Тринеева О. В., Синкеевич А. В., Сливкин А. И. Исследование аминокислотного состава извлечений из растительных объектов // *Химия растительного сырья*. – 2015. – № 2. – С. 141–148.
125. Winter G. et al. Physiological implications of arginine metabolism in plants // *Front. Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – P. 534.
126. Kehelpannala C. et al. An Arabidopsis lipid map reveals differences between tissues and dynamic changes throughout development // *The Plant Journal*. – 2021. – Vol. 107. – № 1. – P. 287–302.
127. Кусмангазинов А. Б. и др. Оценка фитохимического состава корней двух видов рода *Hedysarum* L. Казахстанского Алтая // *Farmacîa Kazahstana*. – 2023. – № 4. – С. 247–253.
128. Asensi-Fabado M. A., Munné-Bosch S. Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function // *Trends Plant Sci.* – 2010. – Vol. 15. – № 10. – P. 582–592.
129. Ekin İ. Mineral and heavy metal concentration of nutritionally and therapeutically valued wild plants: Insights into health effects // *İstanbul Journal of Pharmacy*. – 2022. – Vol. 52. – № 2. – P. 179–186.
130. Aleksandrov V. Identification of nutrient deficiency in bean plants by prompt chlorophyll fluorescence measurements and Artificial Neural Networks // *Cornell University*. – 2019. – arXiv: 1906.03312.
131. Georgieva S. K. et al. Trace elements in commonly used medicinal plants from Varna region, Bulgaria // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – Vol. 28. – № 42. – P. 59277–59283.
132. Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia. 11th Edition. Monograph: Herbal drugs // *EDQM*. – Strasbourg, France, 2022. – С. 927–928.

133. Kakhramanova S. D., Bokov D. O., Samylina I. A. Quantification of polysaccharides in medicinal plant raw materials // *Farmaciya (Pharmacy)*. – 2020. – Vol. 69. – № 8. – P. 5–12.
134. Martínez-Sotres C. et al. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. – 2012. – Vol. 69. – P. 38–40.
135. Deng M. et al. Calycosin: a Review of its Pharmacological Effects and Application Prospects // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2021. – Vol. 19. – № 7. – P. 911–925.
136. Mykhailenko O. et al. Climate change and the sustainable use of medicinal plants: a call for «new» research strategies. // *Front. Pharmacol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1496792.
137. EMA/HMPC/246816/2005. Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for starting materials of herbal origin – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/good-agricultural-collection-practice-starting-materials-herbal-origin-scientific-guideline> (дата обращения: 04.09.2025).
138. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. – Geneva: World Health Organization, 2003. – P. 80.
139. Serbayeva A. et al. Ecological and edaphic evaluation of *Erysimum croceum* populations in the Zailiyskiy Alatau: implications for conservation // *Brazilian Journal of Biology*. – 2025. – Vol. 85. – P. e299803.
140. Juramurodov I. et al. The genus *Hedysarum* (Fabaceae; *Hedysareae*) in Uzbekistan // *Plant Diversity of Central Asia*. – 2024. – Vol. 3. – № 1. – P. 90.
141. Balkybek Y. et al. Study of soil cover of *Veronica spuria* L. populations in Ile Alatau mountains, Kazakhstan // *International Journal of Environmental Quality*. – 2025. – Vol. 66. – P. 99–106.
142. Ramazanova S. et al. Nitrogen fertilizers role in grain crops productivity in South-East Kazakhstan // *Sabrao J. Breed. Genet.* – 2023. – Vol. 55. – № 5. – P. 1812–1820.
143. Parthasarathy S. et al. Pests and Diseases in Flower, Medicinal and Aromatic Crops. – London: CRC Press, 2025. – 238 p.
144. Свиридова Т. П., Зиннер Н. С. Способ выращивания *ex situ* высокогорного растения *Hedysarum theinum* krasnob.: пат. RU2446670C1 Российская Федерация: 2010.
145. Liu P. et al. *Hedysarum langranii* sp. nov. (Fabaceae, Hedysareae), a new species from china, and supplementary descriptions of *H. smithianum* and *H. dentatoalatum* // *Ecol. Evol.* – 2026. – Vol. 16. – № 1. – P. e72950.
146. Marcelino S. et al. Sustainable agricultural practices for the production of medicinal and aromatic plants: evidence and recommendations // *Sustainability*. – 2023. – Vol. 15. – № 19. – P. 14095.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты,
охраняемые авторским правом № 67778 от 20.02.2026 г. «Макроскопическая и
микроскопическая характеристика растений копеечника Семенова (*Hedysarum
semenowii* Regel & Herder)»



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 44765 от 17.04.2024 г. «Определение мангиферина в сырье копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)»

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 44765 от «17» апреля 2024 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
СӘБИТОВА АЙСҰЛУ ҒАБИТҚЫЗЫ, Келеке Анель Сатжанқызы, Сакипова Зуриядда Бектемировна

Вид объекта авторского права: произведение литературы

Название объекта: Определение мангиферина в сырье копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)

Дата создания объекта: 03.04.2024

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АРНАУЛЫҚ БІЛІМ АЛҒАШҚЫ АҚПАРАТТЫҚ ТЕХНОЛОГИЯЛАР МЕНШІК МЕНДІГІ

Құжат түпнұсқалығын <http://www.kazpatent.kz/mc> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>
Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

А. Артыкова

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 77564 от 19.08.2026 г. «Химический состав копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)»

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК

2026 жылғы «19» тамыз № 77564

Автордың (лардың) жөні, аты, өкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
КЕЛЕКЕ АНЕЛЬ САТЖАНКЫЗЫ

Авторлық құқық объектісі: **адеби туынды**

Объектінің атауы: **Химический состав копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)**

Объектінің жасаған күні: **01.10.2025**

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АРНАУЛЫҚ АҚПАРАТ АЛМАНЫСТЫРУ АГЕНТТІГІ

Қысқартылған атауы: <http://www.kazpatent.kz/mz/samimnec>
"Авторлық құқық" бөлімінде тіркелгенге байланысты: <http://copyright.kazpatent.kz>

Полнота документа возможно проверить на сайте: <http://copyright.kazpatent.kz>
в разделе «Авторское право» <http://copyright.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойылды

С. Ахметов

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты,
охраняемые авторским правом № 38239 от 03.08.2023 г. «Методика сбора и
обработки частей растения копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel &
Herder)»



ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Патент на полезную модель №9815 «Способ получения растительного экстракта из травы копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)»

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 9815

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2024/0646.2

(22) 14.05.2024

(45) 22.11.2024

(54) Семенов тынтағы (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) шөбінен өсімдік сығындысын алу тәсілі
Способ получения растительного экстракта из травы копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)
Method for obtaining a plant extract from the grass of the Semenov's kopeck (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)

(73) «С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова» (KZ)
«S.J. Asfendiyarov Kazakh National Medical University» Non-profit joint stock company (KZ)

(72) Келеке Анель Сатжанкызы (KZ) Keleke Anel Satzhankyzy (KZ)
Сакипова Зурияда Бектемировна (KZ) Sakipova Zuriyadda Bektemirovna (KZ)
Ибрагимова Лилия Николаевна (KZ) Ibragimova Liliya Nikolayevna (KZ)
Туруспаева Жанель Жасланкызы (KZ) Turuspaeva Zhanel Zhaslankyzy (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. Ахметов
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РПТ «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of RSE «National institute of intellectual property»

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Акт внедрения технологии сбора, заготовки и хранения лекарственного растительного сырья копеечника Семенова, ТОО «ФитОлеум»

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

г. Есик

«09» 10 2023 г.

результатов PhD диссертационного исследования Келеке А.С.

1. **Наименование:** внедрение технологии сбора, заготовки и хранения лекарственного растительного сырья *Hedysarum semenowii* Regel & Herder
2. **Название организации:** ТОО «ФитОлеум», г. Есик. ул. М.Маметова. 25.
3. **Область применения:** фармацевтическое производство.
4. **Основное содержание внедрения,** разработанного в рамках PhD диссертационной работы: технология сбора и сушки лекарственного растительного сырья *Hedysarum semenowii* Regel & Herder, разработанная с применением концепции «Quality by Design» и соблюдением требований GACP. Процесс получения лекарственного растительного сырья *H. semenowii* состоит из сбора, первичной обработки свежесобранного растительного сырья (очистка от посторонних примесей, таких как выпавшие, заплесневелые или поврежденные части, остатки почвы и других), конвективной сушки, специальной обработки (удаление посторонних примесей, при необходимости измельчение), упаковки в мешки из крафт-бумаги и маркировки. Критическими технологическими параметрами (CPP) для процесса сушки растительного сырья являются – температура и время сушки.
Применённая методика соответствует требованиям надлежащей практики культивирования и сбора лекарственных растений (GACP) и обеспечивает получение растительного сырья стабильного качества. Проведённый контроль подтвердил соответствие полученного сырья нормативам по содержанию тяжёлых металлов, радионуклидов и пестицидов, установленным Государственной Фармакопеей Республики Казахстан и уполномоченными органами.
5. **Формы и методы внедрения:** на основании проведенного моделирования установлены оптимальные условия сбора и заготовки лекарственного растительного сырья *Hedysarum semenowii* Regel & Herder (60 °C в течение 5 часов для травы и 60 °C в течение 12 часов для корней).
6. **Эффективность внедрения:** внедрение технологии сбора, заготовки и хранения в рамках международных надлежащих практик GACP и GMP, обеспечивает получение растительного сырья фармакопейного качества, способствует расширению ассортимента продукции, повышению её конкурентоспособности, а также соответствию требованиям международных рынков.

Директор

Руководитель отдела фитоинтродукции



О. В. Сермухамедова

В. А. Тышкевич

Протокол № 1 от «09» 10 2023 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

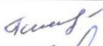
Стандартная операционная процедура на «Сбор, сушку и хранение копеечника Семенова», ТОО «ФитОлеум»

	СБОР, СУШКА И ХРАНЕНИЕ КОПЕЕЧНИКА СЕМЕНОВА	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА		
ФСК – СМК – СОП – КЛР – НИОКР – КСТ – 0030	Версия 01	Страница 1 из 15

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ТОО «ФитОлеум»
Сермухамедова О.В.
«05» октября 2023 г.



**СБОР, СУШКА И ХРАНЕНИЕ КОПЕЕЧНИКА
СЕМЕНОВА**

	Фамилия И.О., должность	Дата	Подпись
СОГЛАСОВАНО с 1-11 стр.	Тышкевич В.А. Руководитель ОФИ	« <u>05</u> » <u>октября</u> 20 <u>23</u> г.	
РАЗРАБОТАНО с 1-11 стр.	Келеке А.С. Руководитель ОНР	« <u>03</u> » <u>октября</u> 20 <u>23</u> г.	

Введение в действие: «09» октября 2023 г.

Дата пересмотра: «09» октября 2024 г.

Фармацевтическая компания ТОО «ФитОлеум», Казахстан
КОНФИДЕНЦИАЛЬНО

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Проект нормативного документа по качеству на копеечника Семенова траву,
ТОО «ФитОлеум»



УТВЕРЖДЕН
ТОО «ФитОлеум»

Директор

Сермухамедова О.В.

20 24 г.

СОГЛАСОВАН

РГП на ПХВ «Национальный центр
экспертизы лекарственных средств и
медицинских изделий» КМФК МЗ РК

«__» _____ 20__ г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного растительного сырья:

Hedysarum semenowii herba

Семенов тиынтагының шөбі

Копеечника Семенова трава

Название производящего растения:

Hedysarum semenowii

Семенов тиынтагы

Копеечник Семенова

Наименование семейства:

Fabaceae

Бұршақ тұқымдасы

Бобовые

Время сбора или фаза вегетации: в фазу бутонизации или цветения

Форма: цельное сырье

Состав: не применимо

Наименование и страна организации-производителя: ТОО «ФитОлеум»,
Республика Казахстан

Наименование и страна держателя регистрационного удостоверения:
ТОО «ФитОлеум», Республика Казахстан

Наименование и страна организации-упаковщика: ТОО «ФитОлеум»,
Республика Казахстан

Область применения: в качестве антиоксидантного и
противовоспалительного средства

Номер нормативного документа: _____

Срок введения установлен с

Вводится впервые «__» _____ 20__ г.

Срок действия до «__» _____ 20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА НЕ РАЗРЕШАЕТСЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Проект нормативного документа по качеству на копеечника Семенова корни,
ТОО «ФитОлеум»

УТВЕРЖДЕН
ТОО «ФитОлеум»
Директор
Сермухамедова О.В.
« 04 » 20 24 г.



СОГЛАСОВАН
РГП на ПХВ «Национальный центр
экспертизы лекарственных средств и
медицинских изделий» КМФК МЗ РК
« ____ » ____ 20 ____ г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного растительного сырья:

Hedysarum semenowii radices

Семенов тиынтагының тамыры

Копеечника Семенова корни

Название производящего растения:

Hedysarum semenowii

Семенов тиынтагы

Копеечник Семенова

Наименование семейства:

Fabaceae

Бұршақ тұқымдасы

Бобовые

Время сбора или фаза вегетации: после окончания фазы плодоношения и
отмирания надземной части

Форма: цельное сырье

Состав: не применимо

Наименование и страна организации-производителя: ТОО «ФитОлеум»,
Республика Казахстан

Наименование и страна держателя регистрационного удостоверения:
ТОО «ФитОлеум», Республика Казахстан

Наименование и страна организации-упаковщика: ТОО «ФитОлеум»,
Республика Казахстан

Область применения: в качестве иммуномодулирующего и адаптогенного
средства

Номер нормативного документа: _____

Срок введения установлен с

Вводится впервые « ____ » ____ 20 ____ г.

Срок действия до « ____ » ____ 20 ____ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА НЕ РАЗРЕШАЕТСЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Акт внедрения результатов ресурсоведческого обследования природных популяций копеечника Семенова, РГУ «Государственный национальный природный парк «Көлсай көлдері»»

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по науке
РГУ «Государственный национальный
природный парк «Көлсай көлдері»
А. Шантаев
«18» сентябрь 2026 г.

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

1. Наименование работы: Результаты ресурсоведческого обследования природных популяций копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) на северном макросклоне хребта Кунгей Алатау.

2. Место внедрения: РГУ «Государственный национальный природный парк «Көлсай көлдері» (исследованные локалитеты: ущелье Саты, ущелье Ак Марал, правобережье реки Шелек – ущелье Уш текше).

3. Авторы внедрения: Отрадных И.Г. – старший научный сотрудник РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции»; Сакипова З.Б. – д.фарм.н., профессора НАО «КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова»; Келеке А.С. – PhD-докторант НАО «КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова».

4. Краткая аннотация и основное содержание: в ходе полевых выездов на территорию национального парка были проведены маршрутно-рекогносцировочные обследования с применением геоботанических методов. Установлены следующие ключевые популяционные параметры вида *Hedysarum semenowii*: площадь выявленных популяций варьирует от 2,5 до 4,5 га; плотность генеративных особей оценивается как низкая (от 4–5 до 8–18 особей на 100 м²); вид встречается отдельными куртинами в травостое или под пологом кустарников; доля участия в растительном покрове составляет 8–15%; вычислен общий объем возможных ежегодных заготовок воздушно-сухого сырья в исследованных ущельях, который является крайне малым и составляет 46,2 кг.

5. Эффект от внедрения: полученные ресурсоведческие данные имеют высокую научную и природоохранную ценность для РГУ «ГНПП «Көлсай көлдері». На основании результатов исследования научно обоснована нецелесообразность эксплуатации природных ресурсов копеечника Семенова на территории парка ввиду критически малых площадей популяций, труднодоступности местообитаний (уклон 20–50°) и низких запасов (менее 50 кг). Внедрение данных результатов служит научной базой для принятия административных и управленческих решений, направленных на строгое сохранение природного генофонда данного вида на территории РГУ «ГНПП «Көлсай көлдері», а также подтверждает необходимость разработки подходов его интродукции в культуру.

Заместитель директора по науке



А. Шантаев

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Акт внедрения способа получения экстракта из растительного сырья копеечника Семенова, ТОО «ФитОлеум»

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

г. Есик

« 08 » 04 2024 г.

результатов PhD диссертационного исследования Келеке А.С.

1. **Наименование:** способ получения экстракта из растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)

2. **Название организации:** ТОО «ФитОлеум», г. Есик, ул. М.Маметова, 25.

3. **Область применения:** фармацевтическое производство.

4. **Основное содержание внедрения,** разработанного в рамках PhD диссертационной работы: способ получения экстракта из растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), сырье измельчают до размера частиц не более 5 мм, сырье намачивают в течение 5-10 ч в безводном этаноле или безводном метаноле в соотношении сырье-экстрагент 1:10, затем экстрагируют методом мацерации с ультразвуковой обработкой (температура от 20 до 30°C, частота ультразвука от 25 до 45 кГц, трехкратная ультразвуковая обработка по 15-20 мин с периодичностью 1 ч) безводным этанолом или безводным метанолом в соотношении 1:10, первое извлечение сливают в приемник. Сырье заливают новой порцией экстрагента 70% этанолом (об/об) или 70% метанолом (об/об) в соотношении 1:10, второе извлечение объединяют с первым в приемнике. Сырье истощают третьей порцией экстрагента с концентрацией 50%, третье извлечение объединяют с предыдущими в приемнике. Объединенные извлечения отстаивают при температуре от 5 до 10°C в течение 72 ч, декантируют надосадочную жидкость отделяя от балластных веществ. Далее экстракт очищают под давлением, используя трехступенчатую фильтрацию через фильтры с размером пор: 1,0 мкм; 0,5 мкм; 0,65/0,45 мкм. Проводят удаление экстрагента при помощи роторного вакуум-выпарного испарителя (при следующих параметрах: число оборотов – от 90 до 120 об/мин, температура – от 40°C до 50°C, рабочее давление воздуха от 2-3 мБар в течение от 2 до 6 ч) до густого экстракта (с сухим остатком не менее 70%). Для получения сухого экстракта (с сухим остатком не менее 95%) сушат в лиофильной сушилке при следующих параметрах: давление не выше 0,02 мБар, в течение от 24 до 30 ч, при температуре ниже - 50 °C.

5. **Формы и методы внедрения:** разработан способ получения экстракта густого или сухого из копеечника Семенова, способствующий высокому выходу биологически активных веществ.

6. **Эффективность внедрения:** предлагаемая технология получения экстракта травы копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) фармакопейного качества, способствует повышению выхода биологически активных веществ и расширению ассортимента экстрактов из отечественного растительного сырья.

Директор

Руководитель отдела контроля качества






О. В. Сермухамедова

С. А. Балагазиева

Протокол № 1 от « 08 » 04 2024 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Акт внедрения результатов макроскопических и микроскопических исследований ЛРС копеечника Семенова, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники

«Утверждаю»
Декан Школы фармации
НАО «КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова»
Сакипова З.Б.
«27» 10 2023 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

г. Алматы

«27» 10 2023 г.

результатов диссертационной работы Келеке Анель Сатжанкызы
«Фармакогностическое изучение копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) как источника биологически активных веществ»

- 1. Наименование:** «Макроскопические и микроскопические признаки лекарственного растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)»
- 2. Название кафедры:** кафедра фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники НАО «КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова»
- 3. Область применения:** учебный процесс для подготовки специалистов в области фармации и технологии фармацевтического производства.
- 4. Основное содержание внедрения.** В рамках изучения микроскопических и макроскопических признаков лекарственного растительного сырья были проведены исследования морфолого-анатомических характеристик травы и корней растения *Hedysarum semenowii* (копеечник Семёнова). Полученные результаты включают описание диагностических признаков, характерных для данного вида, которые могут быть использованы в целях аутентификации сырья, оценки его качества и стандартизации. Материал внедрён в содержание учебных дисциплин по фармакогнозии и ботанике, как пример системного подхода к морфолого-анатомической идентификации лекарственного растительного сырья, а также в качестве базы для выполнения учебных и исследовательских заданий студентами.
- 5. Формы и методы внедрения:** включение иллюстративных материалов *Hedysarum semenowii* в практические занятия по фармакогнозии; использование результатов при разработке методических указаний, в учебных презентациях и наглядных материалах; формирование кейс-заданий для студентов по распознаванию лекарственного сырья на основании микроскопических признаков.
- 6. Эффективность внедрения:** внедрение результатов исследования способствует формированию у студентов практических навыков по идентификации и стандартизации лекарственного растительного сырья, повышает уровень освоения дисциплин ботанического и фармакогностического профиля, а также подготавливает студентов к профессиональной деятельности в области фармацевтической разработки и контроля качества. Полученные знания применимы при разработке фармакопейных статей и проведении фармакогностических исследований.

Члены комиссии:
Зав. кафедрой фармацевтической и
токсикологической химии,
фармакогнозии и ботаники

 Ахелова А.Л.

ПРИЛОЖЕНИЕ П

Акт внедрения результатов изучения антимикробной активности экстрактов копеечника Семенова, Кафедра фармацевтической микробиологии Люблинского медицинского университета

АКТ

on the implementation of the results of Anel Keleke's dissertation work
"Pharmacognostic study of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder as a source
of biologically active substances", presented for the degree of Doctor of
Philosophy (PhD) in specialty 8D10102 - "Pharmacy"
at the Department of Pharmaceutical Microbiology,
Medical University of Lublin (Poland)

1. Title of the scientific development for implementation: "Study of the antimicrobial activity of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder extracts" as part of a dissertation project aimed at pharmacognostic study of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder.

2. Name and address of the organization in which the implementation was carried out: Department of Pharmaceutical Microbiology, Medical University of Lublin, 1 Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

3. The area of application: the results of the antimicrobial activity study of *Hedysarum semenowii* extracts were implemented into the educational process of the Department of Pharmaceutical Microbiology. The data is used in practical classes, seminars, and laboratory work dedicated to natural product microbiology, phytotherapy, and screening of plant-derived antimicrobials. These results provide a real-world example for students studying the biological evaluation of plant extracts and their potential use as alternatives or adjuvants to conventional antimicrobial agents.

4. Efficiency of implementation: the implementation contributes to enhancing students' understanding of natural compounds with antimicrobial potential and strengthens the interdisciplinary approach to microbiological and pharmacognostic research. The study provides a scientific basis for further investigation of *Hedysarum* species as a source of bioactive agents, encouraging student-led research initiatives and participation in international scientific discussions.

The results of the study are prepared for publication in a peer-reviewed journal and are also used in the preparation of research projects.

Professor, Head of Department of Pharmaceutical
Microbiology, Medical University of Lublin

Anna Malm

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel / fax R1 448-71-00

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej

prof. dr hab. n. farm. Anna Malm

ПРИЛОЖЕНИЕ Р

Акт внедрения результатов фармакогностического изучения лекарственного растительного сырья копеечника Семенова, Научно-исследовательский центр фармации и кафедра технологии лекарств и фармакогнозии Южно-Казахстанской медицинской академии

ONTUSTIK KAZAKHSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ

SKMA SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»

СВЕРЖДАЮ
Проректор по науке и
стратегическому развитию ЮКМА,
к.м.н., профессор
Ахметов А.Г.
2026г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. **Предмет внедрения:** результаты фармакогностического изучения лекарственного растительного сырья копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder); морфолого-анатомические диагностические признаки, химический состав лекарственного растительного сырья.
2. **Авторы внедрения:** Келеке А.С., PhD-докторант, НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова», г. Алматы, Республика Казахстан.
3. **Научные руководители:** Ибрагимова Л.Н., PhD, к.фарм.н., асс. профессор, руководитель Центра фармации и фармакологии, НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова», г. Алматы, Республика Казахстан; Илькай Эрдоган Орхан, д.фарм.н., профессор, декан фармацевтического факультета, Университет Локман Хеким, г. Анкара, Турция; Агнешка Людвигук, Dr.hab., асс. профессор, заведующая кафедры фармакогнозии с садом лекарственных растений, Медицинский университет Люблина, г. Люблин, Польша.
4. **Ответственный за внедрения:** Келеке А.С., PhD-докторант, НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова», г. Алматы, Республика Казахстан.
5. **Цель внедрения:** совершенствование образовательной программы за счет внедрения актуальных научных данных о макро- и микроскопических признаках и химическом профиле растений отечественной флоры для обеспечения соответствия преподаваемого материала современному уровню фармацевтической науки и углубления освоения обучающимися методов оценки качества лекарственного растительного сырья.
6. **Результаты внедрения:** результаты комплексного исследования копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii*) перспективного представителя отечественной флоры из семейства Бобовые (*Fabaceae*). Материалы включают детализированную морфолого-анатомическую характеристику (макро- и микроскопические диагностические признаки травы и корней) и данные о фитохимическом профиле растения. В рамках учебной программы данный вид успешно используется в качестве наглядного эталонного примера местного растительного сырья при изучении гистологического строения и особенностей накопления биологически активных веществ.
7. **Эффект от внедрения:** расширение перечня лекарственного растительного сырья региональной флоры семейства Бобовые, способствующее дополнению знаний

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Р

ONTUSTIK KAZAKHSTAN MEDISINA AKADEMIASY «Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы» АҚ  SOUTH KAZAKHSTAN MEDICAL ACADEMY АО «Южно-Казахстанская медицинская академия»		
студентов, магистрантов, докторантов о ресурсном потенциале отечественных лекарственных растений.		
8. Место внедрения: Научно-исследовательский центр фармации и кафедра технологии лекарств и фармакогнозии АО Южно-Казахстанской медицинской академии. Результаты работы внедрены в деятельность Научно-исследовательского центра фармации и кафедры технологии лекарств и фармакогнозии и используются при проведении научно-исследовательских работ в области фармации, фармакогнозии и технологии фармацевтического производства.		
9. Форма внедрения: использование результатов исследования <i>Hedysarum semenovii</i> при проведении научно-исследовательских работ в Научно-исследовательском центре фармации, а также при подготовке научно-методических и информационно-аналитических материалов центра.		
Срок внедрения: 7 августа 2026г.		
Члены комиссии: Руководитель научно-исследовательского Центра фармации, к.фарм.н., профессор КАДРЛЫҚ ҚЫЗМЕТ Орынбасарова К.К. ҚҰЖАТТАРДЫҢ ҚОЛДАРЫН АЙҚЫНДАУ АРНАЛЫ ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН МЕДИЦИНА АКАДЕМИЯСЫНЫҢ КАДРЛЫҚ ҚЫЗМЕТ БӨЛІМІ		

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Акт внедрения результатов макроскопических и микроскопических исследований и химического состава копеечника Семенова,
Кафедра фармакогнозии, университет Локман Хеким

АКТ

on the implementation of the results of Anel Keleke's dissertation work
"Pharmacognostic study of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder as a source
of biologically active substances", presented for the degree of Doctor of
Philosophy (PhD) in specialty 8D10102 - "Pharmacy"
at the Faculty of Pharmacy,
Lokman Hekim University (Türkiye)

1. Title of the scientific development for implementation: "Morpho-anatomical and biochemical characteristics of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder as a potential medicinal resource" as part of a dissertation project aimed at pharmacognostic study of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder.

2. Name and address of the organization in which the implementation was carried out: Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lokman Hekim University (Ankara, Türkiye).

3. Object of implementation: the comprehensive data regarding the macroscopic and microscopic diagnostic features, as well as the detailed chemical composition of the plant raw material *Hedysarum semenowii* Regel & Herder.

4. Forms and methods of implementation: the results of the macro- and microscopic studies and chemical composition analysis of *Hedysarum semenowii* were implemented into the educational process of the Faculty of Pharmacy. The data is used in practical classes, seminars, and laboratory work dedicated to pharmacognosy, pharmaceutical botany, and the phytochemical screening of medicinal plant materials. These results provide a real-world example for students studying the morpho-anatomical identification, authentication, and phytochemical evaluation of plant raw materials.

4. Efficiency of implementation: the implementation contributes to enhancing students' understanding of diagnostic morphological features and the chemical profiling of natural compounds, and it strengthens the interdisciplinary approach to botanical and pharmacognostic research. The study provides a scientific basis for further investigation of *Hedysarum* species as a source of bioactive agents, encouraging student-led research initiatives and their participation in international scientific discussions.

The results of the study are prepared for publication in a peer-reviewed journal and are also used in the preparation of research projects.

Prof. Dr. Alkay Erdogan Orhan
Dean & Professor of Pharmacognosy,
Faculty of Pharmacy,
Lokman Hekim University,
06510 Ankara, Türkiye

ПРИЛОЖЕНИЕ Т

Акт внедрения учебника «Фармакогнозия» в учебный процесс, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

ул. Ленина, 3, г. Уфа, Республика Башкортостан, Российская Федерация, 450008
тел. (347) 272-41-73, факс 272-37-51

<http://www.bashgmu.ru>, E-mail: rectorat@bashgmu.ru

ОКПО 01963597, ОГРН 1020202561136,
ИНН 0274023088, КПП 027401001

14.05.2026 № 2143-01
На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава
России, к.м.н., доцент

В.Е. Изосимова
«14» _____ 2026 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование внедрения: Фармакогнозия: учебник / Г.М. Латыпова, З.Б. Сакипова, В.С. Ан, М.О. Отаргалиева, А.С. Келеке. – Алматы: Дарын, 2026. – 411 с.

Авторы внедрения: З. Б. Сакипова, В.С. Ан, М.О. Отаргалиева, А.С. Келеке

Организация внедрения: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

Когда внедрено: май 2026 г.

Эффективность внедрения: внедрение материалов учебника позволило расширить информационную базу дисциплины за счет включения дополнительных актуальных данных по основам фармакогностического, фитохимического, ресурсоведческого анализа, правилам заготовки лекарственного растительного сырья, современных подходов к оценке качества лекарственного растительного сырья, фармацевтических субстанций растительного происхождения, лекарственных растительных препаратов согласно актуальным регуляторным требованиям ЕАЭС и GACP. Использование издания способствует освоению профессиональных компетенций студентов, ординаторов, слушателей ДПО при освоении дисциплины «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», магистрантов по программе магистратуры «Контроль качества лекарственных средств в промышленной фармации».

Заведующий кафедрой фармации
д.фарм.н., профессор

В.А. Катаев

ПРИЛОЖЕНИЕ У

Акт внедрения учебника «Фармакогнозия» в учебный процесс, КГП на ПХВ «Высший медицинский колледж» Управления общественного здравоохранения г. Алматы

Утверждаю
Директор
КГП на ПХВ «Высший медицинский колледж»
УОЗ г. Алматы
Ж.М. Молдакулов
«05» июля 2026 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Наименование: Учебник «Фармакогнозия» (Г.М. Латыпова, З.Б. Сакипова, В.С. Ан, М.О. Отаргалиева, А.С. Келеке. – Алматы: Дарын, 2026. – 411 с.).

2. Краткая аннотация: Учебник охватывает все ключевые разделы фармакогнозии, информацию по современным исследованиям и нормативно-правовым актам. Структура учебника включает введение и пять фундаментальных разделов: первый раздел посвящен основам фармакогнозии, классификации растений и процессам заготовки; второй раздел детально описывает стандартизацию и нормативные документы, регламентируя основные методы испытания качества растительного сырья; раздел, содержащий исчерпывающую характеристику основных групп биологически активных веществ и примеров источников лекарственного растительного сырья, в том числе флоры Казахстана (Впервые в учебном издании представлены данные по растениям копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii*), кизильник многоцветковый (*Cotoneaster multiflorus*), кизильник черноплодный (*Cotoneaster melanocarpus*), аяния кустарниковая (*Ajania fruticulosa*), и др. на основе научных исследований); разделы, в которых рассматриваются лекарственное сырье животного происхождения, основы ресурсоведения и актуальные национальные законодательные основы сохранения биоразнообразия и управления природными ресурсами.

3. Эффект от внедрения: Внедрение учебника обеспечит комплексную реализацию требований Типовой учебной программы по специальности «Фармация» и качественную модернизацию цикла базовых и профилирующих дисциплин со следующими ожидаемыми результатами:

- формирование ключевых профессиональных компетенций (Компетенция 1): обучающиеся овладеют алгоритмами стандартизации, что позволит им на высоком уровне осуществлять контроль качества лекарственного растительного сырья и обеспечит знания для их надлежащего применения в медицинской практике;
- освоение самостоятельных практических навыков: учебно-методическая база учебника способствует подготовке студентов к самостоятельному проведению фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья и выполнению процедур контроля качества;
- развитие исследовательского потенциала (Компетенция 6): изучение фитохимических профилей и методов ресурсоведения создаст прочный фундамент для вовлечения студентов в научно-практическую деятельность,

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ У

включая поиск, исследование и разработку новых источников лекарственных средств растительного происхождения отечественной флоры.

4. Место внедрения: Коммунальное государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Высший медицинский колледж» Управления общественного здравоохранения г. Алматы.

5. Форма внедрения: включение разделов учебника в учебно-методические комплексы дисциплин в качестве основной/дополнительной литературы; применение иллюстративных и справочных материалов издания для подготовки к практическим и лабораторным занятиям; отработка обязательного практического навыка «Фармакогностический анализ лекарственного сырья».

Заместитель директора
по учебно-воспитательной
деятельности



Л.Д. Алибекова

Руководитель научно-
методического отдела



Г.А. Амрина

Заведующая Цикловой
методической комиссии №4
«Специальные дисциплины»



Т.В. Клемина

ПРИЛОЖЕНИЕ Ф

Акт внедрения учебника «Фармакогнозия» в учебный процесс, ТОО «Высший медико-стоматологический колледж профессора Рузуддинова»

«Профессор Рузуддиновтың
Жоғары Медициналық
Стоматологиялық колледжі»
Жауапкершілігі
шектелуі серіктестігі



Товарищество с ограниченной
ответственностью
«Высший Медико-
Стоматологический колледж
профессора Рузуддинова»

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Высшего Медико-стоматологического
колледжа профессора Рузуддинова
Рузуддинов Н.С.



«30» апреля 2026 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

г. Алматы

«30» апреля 2026 г.

1. Объект внедрения: Учебник «Фармакогнозия» (авторы: Латыпова Г.М., Сакипова З.Б., Ан В.С., Отаргалиева М.О., Келеке А.С.). – Алматы: Дарын, 2026. – 412 с.

2. Место внедрения: Высший медико-стоматологический колледж профессора Рузуддинова, Республика Казахстан, г. Алматы, Алмалинский район, Богенбай батыра улица, 263а, 050008/A05B9F3.

3. Область применения: учебный процесс по специальности 09160100 «Фармация» для изучения дисциплины «Фармакогнозия». Материалы учебника предназначены для обучения студентов теоретическим и практическим навыкам для изучения дисциплины «Фармакогнозия».

4. Основное содержание внедрения: в учебную базу дисциплины интегрированы: алгоритмы ресурсоведения и правила заготовки сырья с учетом актуальных стандартов GACP и требований ЕАЭС, пошаговые руководства для проведения макро- и микроскопического фармакогностического анализа, современные методики идентификации и количественного определения биологически активных веществ, обновленная база данных по характеристикам лекарственных растений и критериям их качества.

5. Эффективность внедрения: внедрение учебника существенно расширило учебно-методический комплекс дисциплины. Четкая структура и практическая направленность издания помогают обучающимся осваивать методы оценки качества лекарственного растительного сырья, которое повышает уровень подготовки будущих специалистов к работе с растительными препаратами.

ВМСКПР
Председатель ЦМК,

(подпись)

Стамкулова Г.Т.

ПРИЛОЖЕНИЕ X

Справка с Национального центра государственной научно-технической экспертизы о наличии публикаций в международных научных изданиях

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҒЫЛЫМ
ЖӘНЕ ЖОҒАРЫ БІЛІМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ
«ҰЛТТЫҚ МЕМЛЕКЕТТІК ҒЫЛЫМИ-
ТЕХНИКАЛЫҚ САРАПТАМА ОРТАЛЫҒЫ»
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГОСУДАРСТВЕННОЙ
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

050026, Қазақстан Республикасы
Алматы қаласы, Бөгенбай батыр көшесі, 221
Тел.: +7 (727) 344-11-10
E-mail: info@ncste.kz <http://www.ncste.kz>

050026, Республика Казахстан
город Алматы, улица Бөгенбай батыра, 221
Тел.: +7 (727) 344-11-10
E-mail: info@ncste.kz <http://www.ncste.kz>

№ 1754/15-03-02 от 07.04.2026

Келеке Анель Сатжанкызы

АО «НЦГНТЭ» предоставляет информацию о наличии публикаций Келеке Анель Сатжанкызы в научных изданиях, входящих в международные информационные ресурсы Web of Science (Clarivate Analytics) и Scopus (Elsevier).

1. «Molecules» (Switzerland), E-ISSN 1420-3049, годы охвата в Web of Science Core Collection с 1997, в Scopus с 1996 года по настоящее время. Предметная область – химия: органическая химия, аналитическая химия, физическая и теоретическая химия, химия (разное); фармакология, токсикология и фармацевтика: лекарствоведение, поиск новых лекарств; биохимия, генетика и молекулярная биология: молекулярная медицина; биохимия и молекулярная биология; химия.

2. «Drug Development and Registration» (Russian Federation), ISSN 2305-2066, годы охвата в Scopus с 2019 по 2025 год. Предметная область – профессии в сфере здоровья: фармация; фармакология, токсикология и фармацевтика: лекарствоведение, поиск новых лекарств.

Статьи Келеке А.С.:

1. Keleke Anel, Maciejewska-Turska Magdalena, Kasela Martyna, Baj Tomasz, Ibragimova Liliya, Sakipova Zuriyadda, Sermukhamedova Olga, Ludwiczuk Agnieszka. Phytochemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Hedysarum semenowii* (Fabaceae) // *Molecules*. – 2025. – Vol. 30, Iss. 23. – Article number 4503.

Статья выявлена в базах данных Web of Science Core Collection и Scopus. В момент ее опубликования в 2025 году, и на момент защиты диссертации в 2026 году журнал «Molecules» имеет Impact Factor за 2024 год равный 4,6 и квартиль по биохимии и молекулярной биологии – Q2; квартиль по химии, междисциплинарным трудам – Q2. Имеет CiteScore за 2024 год равный 8,6 и процентиль по органической химии – 87; процентиль по лекарствоведению – 83; процентиль по аналитической химии – 83; процентиль по физической и теоретической химии – 82; процентиль по поиску новых лекарств – 81; процентиль по химии (разное) – 81; процентиль по молекулярной медицине – 78.

2. Keleke Anel S., Ibragimova Liliya N., Sakipova Zuriyadda B., Kulmanbetov Ruslan I., Nurgozhin Talgat S., Suleimenov Marat K., Ibadullayeva Galiya S., Akhelova Aiman L., Grishina Anna Yu. Subacute toxicity, local irritant, and allergenic effects of *Hedysarum semenowii* extract [Подострая токсичность, местнораздражающее и аллергизирующее действие экстракта копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii*)]

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ X

2

Regel & Herder)] // Drug Development and Registration. – 2025. – Vol. 14, Iss. 4. – P. 208-220.

Статья выявлена в базе данных Scopus. В момент ее опубликования в 2025 году, и на момент защиты диссертации в 2026 году журнал «Drug Development and Registration» имеет CiteScore за 2024 год равный 1,2 и процентиль по фармации – 45; процентиль по лекарствоведению – 32; процентиль по поиску новых лекарств – 11.

**Заместитель Председателя Правления
АО «НЦГНТЭ»**

Р. Манатбаев

*Исп.: Жандаулетова Ж.Р.
Тел.: 222-11-10 (406)*

Согласовано

06.04.2026 16:32 Мамытбаева Шолпанай Галкиевна

06.04.2026 16:48 Елеукенова Камарсулу Агимедуллиневна

06.04.2026 17:55 Михалёва Светлана Михайловна

Подписано

06.04.2026 18:05 Манатбаев Рустем Кусаингазыевич



ПРИЛОЖЕНИЕ Ц

Справка об идентификации образцов копеечника Семенова,
РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭПР РК

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ
ЭКОЛОГИЯ, ГЕОЛОГИЯ ЖӘНЕ ТАБИҒИ
РЕСУРСТАР МИНИСТРЛІГІ
Қазақстан Республикасының Экология,
геология және табиғи ресурстар министрлігі
Орман шаруашылығы және жауарлар
дүниесі комитетінің «Ботаника және
фитоинтродукция институты» шарушылық
жүргізу қрмытындағы республикалық
мемлекеттік қазынасы



МИНИСТЕРСТВО ЭКОЛОГИИ,
ГЕОЛОГИИ И ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Республиканское государственное
предприятие на праве хозяйственного
ведения «Институт ботаники и
фитоинтродукции» Комитета лесного
хозяйства и животного мира Министерства
экологии, геологии и природных ресурсов
Республики Казахстан

050040, Алматы қ., Тимирязев к., 36 «Д»,
тел. 8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

№ 01-05/218

050040, г. Алматы, ул. Тимирязева 36 «Д»,
тел. 8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

« 26 » май 2023 г.

Декану школы фармации Сакиповой З.Б.

Уважаемая Сакипова Зурияда Бектемировна!

В ответ на Ваше письмо об оказании содействия в идентификации дикорастущего вида растения рода *Hedysarum* для научных исследований в области фармакогностического анализа вышеуказанного образца сообщаем, что в результате идентификации выявлено, что предоставленный образец соответствует виду: *Hedysarum semenowii* Regel & Herder.

Генеральный директор, д.б.н.

Ответственный исполнитель
снс. Отрядных И.Г.



Ситпаева Г.Т.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ш

Спецификация качества на «Копеечника Семенова трава»

Показатели качества	Регламентируемые нормы	Ссылки на методы испытаний
Определение	Собранная в фазу цветения, высушенная, цельная или измельченная трава многолетнего травянистого растения <i>Hedysarum semenowii</i> Regel & Herder	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>
Идентификация: А. Макроскопическое описание	Стеблей цилиндрические, продольно борозчатые, редко опушенные; листья непарноперистые, с 4-8 парами листочков; листочки округло-яйцевидные, длиной до 40 мм, с перисто-сетчатым типом жилкования, верхняя поверхность голая, нижняя с рассеянным опушением; прилистники бурые, сросшиеся; соцветия представлены плотными пазушными кистями, локализованными на удлинённых цветоносах; цветки мотылькового типа; венчик желтый, лодочка (10-14 мм) длиннее флага (7-10 мм) и обладает выраженным остроугольным изгибом по нижнему краю; плоды – членистые бобы, из 3-5 индивидуальных мелкоячеистых сегментов длиной до 8 мм, с широкой перепончатой каймой; членики орбиккулярно-эллиптические или субквадратные, плоскосжатые или умеренно выпуклые, со специфическими короткими щетинками или гладкие.	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>
В. Микроскопическое описание	Порошок желтовато-зеленого цвета. При рассмотрении порошка под микроскопом с использованием раствора <i>хлоралгидрата Р</i> наблюдаются следующие диагностические элементы: клетки верхнего и нижнего эпидермиса листа овальные или прямоугольные с извилистыми стенками; устьица многочисленные, ананоцитного типа; на нижней стороне листочков по главной жилке видны простые волоски с округлой базальной клеткой, клетки верхнего эпидермиса несколько крупнее клеток нижнего эпидермиса; мезофилл листа имеет тонкую и рыхлую структуру без включений склеренхимы, клетки цветка почти прямоугольной формы с толстыми, прямыми или слегка извилистыми стенками; жилки цветков с мелкими,	ГФ РК I, т. 3, 2.8.23.

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Ш

С. Тонкослойная хроматография D. Качественные реакции - флавоноиды	почти прямоугольными клетками, фрагменты проводящего пучка из мелких трахеид со спиральным типом утолщения клеточной стенки. На хроматограмме испытуемого раствора должно наблюдаться флуоресцирующее пятно голубого цвета (R_f около 0,5). При добавлении к спиртовому извлечению из сырья нескольких капель кислоты хлороводородной и 20-30 мг порошка магния <i>P</i> появляется красное-розовое окрашивание	ГФ РК II, т. 1, 2.2.27. СП-фирмы
Посторонние примеси	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.
Потеря в массе при высушивании	не более 13,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.2.32.
Тяжелые металлы и мышьяк: Cd (Кадмий) Pb (Свинец) Hg (Ртуть) As (Мышьяк)	не более 1,0 мг/кг не более 5,0 мг/кг не более 0,1 мг/кг не более 0,5 мг/кг	ГОСТ 30178-96, ГОСТ 26930-86
Общая зола	Не более 9,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.4.16.
Радионуклиды: Cs-137 (Цезий 137) Sr-90 (Стронций 90)	не более 400 Бк/кг не более 200 Бк/кг	ГОСТ 32161-2013, ГОСТ 32163-2013
Пестициды: ГХЦГ (α , β , γ - изомеры) ДДТ и его метаболиты Гептахлор Алдрин	Не более 0,1 мг/кг Не более 0,1 мг/кг Не допускается (<0,002) Не допускается (<0,002)	ГОСТ 30349-96
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10^5 КОЕ/г; - ТУМС – не более 10^4 КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10^4 КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.31
Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте	Не более 5,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.
Количественное определение: - мангиферин - сумма флавоноидов в пересчете на рутин	Не менее 0,1 % Не менее 0,8 %	ГФ РК II, т. 1, 2.2.29. ГФ РК II, т. 1, 2.2.25.

ПРИЛОЖЕНИЕ Щ

Спецификация качества на «Копеечника Семенова корни»

Показатели качества	Регламентируемые нормы	Ссылки на методы испытаний
Определение	Высушенные цельные или резанные подземные части многолетнего травянистого растения <i>Hedysarum semenowii</i> Regel & Herder	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>
Идентификация: А. Макроскопическое описание	Корни почти цилиндрической формой, в длину 30-120 см при диаметре 0,5-2,5 см; продольно морщинистые, желто-коричневой окраски; перидерма легко отслаивается; внутри от светло-желтой до светло-коричневого цвета; мягкие по текстуре, гибкие и трудно ломаются; поверхность излома волокнистая; в поперечном срезе кора желто-белая, коричневая вокруг камбия, светло-коричневая в ксилеме; с отчетливо видимыми лучами.	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>
В. Микроскопическое описание	На поперечном срезе корень имеет выраженную овальную форму; эпидермис из однослойных клеток, которые снаружи покрыты тонкой кутикулой; в выступающих ребристых углах корня имеются структурные утолщения паренхимных клеток толщины в 3–4 слоя; флоэма образована из мелких клеток, формирующих кольцевую структуру из 8–9 слоев, расположенных строго по кругу; ксилема имеет крупные сосудистые рассредоточенные клетки; сердцевина корня состоит из относительно маленьких паренхимных клеток правильной сферической формы.	ГФ РК I, т. 3, 2.8.23.
С. Тонкослойная хроматография	На хроматограмме испытуемого раствора должно наблюдаться сине-белое флуоресцентных пятно при значении Rf около 0,4	ГФ РК II, т. 1, 2.2.27.
Д. Качественные реакции - полисахариды	При прибавлении 30 мл 96% этанола Р, после перемешивания появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок	СП-фирмы
Посторонние примеси	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.
Потеря в массе при высушивании	не более 16,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.2.32.

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Ш

Тяжелые металлы и мышьяк: Cd (Кадмий) Pb (Свинец) Hg (Ртуть) As (Мышьяк)	не более 1,0 мг/кг не более 5,0 мг/кг не более 0,1 мг/кг не более 0,5 мкг/кг	ГОСТ 30178-96, ГОСТ 26930-86
Общая зола	Не более 6,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.4.16.
Радионуклиды: Cs-137 (Цезий 137) Sr-90 (Стронций 90)	не более 400 Бк/кг не более 200 Бк/кг	ГОСТ 32161-2013, ГОСТ 32163-2013
Пестициды: ГХЦГ (α , β , γ - изомеры) ДДТ и его метаболиты Гептахлор Алдрин	Не более 0,1 мкг/кг Не более 0,1 мкг/кг Не допускается (<0,002) Не допускается (<0,002)	ГОСТ 30349-96
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10^5 КОЕ/г; - ТУМС – не более 10^4 КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10^4 КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.31
Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте	Не более 1,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.
Экстрактивные вещества	Не менее 20,0 %	ГФ РК I, т. 1, <i>Определение экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье</i>

ПРИЛОЖЕНИЕ Э

Результаты исследований стабильности копеечника Семенова травы, серия HS072023

Наименование: **копеечника Семенова трава**
 лекарственная форма: **лекарственное растительное сырье**
 таро-упорочная система: **крафт-мешок**
 номер серии: HS072023
 Дата начала испытания: 07.2023 г.
 Дата окончания испытания: 10.2025 г.

Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация: нормы отклонения	Периоды контроля, мес.						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура: 25°C ± 2°C, относительная влажность: 60%± 5%	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>	Соответствует спецификации	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Идентификация		СП-фирмы	Соответствует спецификации	Соответствует	—	—	—	—	—	Соответствует
Посторонние примеси		ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	Соответствует	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК II, т. 1, 2.2.32	Не более 13,0 %	7,2	7,11	7,33	7,53	7,32	7,32	7,2
Общая зола		ГФ РК II, т. 1, 2.4.16	Не более 9,0 %	6,8	6,78	6,76	6,76	6,76	6,75	6,72
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной		ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.	Не более 5,0 %	3,48	3,38	3,41	3,40	3,40	3,40	3,37
Количественное определение: - сумма флавоноидов в пересчете на рутин		ГФ РК II, т. 1, 2.2.25	не менее 0,8 %	1,68	1,64	1,65	1,58	1,56	1,56	1,54
Микробиологическая чистота		ГФ РК II, т. 1, 2.6.12 2.6.31	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10 ⁵ КОЕ/г; - ТУМС – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	Соответствует	—	—	—	—	—	Соответствует

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Э

Результаты исследований стабильности копеечника Семенова травы, серия HS072024.1

Наименование: **копеечника Семенова трава**
 лекарственная форма: **лекарственное растительное сырье**
 таро-упаковочная система: **крафт-мешок**
 номер серии: HS072024.1
 Дата начала испытания: 07.2024 г.
 Дата окончания испытания: 10.2026 г.

Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация: нормы отклонения	Периоды контроля, мес.					
				0	3	6	9	12	18 24
Описание	Температура: 25°C ± 2°C, относительная влажность: 60%± 5%	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>	Соответствует спецификации	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Исследования стабильности продолжаются
Идентификация		СП-фирмы	Соответствует спецификации						
Посторонние примеси		ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	Соответствует	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК II, т. 1, 2.2.32	Не более 13,0 %	7,6	7,62	7,63	7,56	7,55	
Общая зола		ГФ РК II, т. 1, 2.4.16	Не более 9,0 %.	6,2	6,23	6,33	6,21	6,35	
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной		ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.	Не более 5,0 %	2,98	2,98	2,71	2,70	2,70	
Количественное определение: - сумма флавоноидов в пересчете на рутин		ГФ РК II, т. 1, 2.2.25	не менее 0,8 %	1,73	1,69	1,67	1,67	1,65	
Микробиологическая чистота		ГФ РК II, т. 1, 2.6.12 2.6.31	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10 ⁵ КОЕ/г; - ТУМС – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	Соответствует	–	–	–	–	

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Э

Результаты исследований стабильности копеечника Семенова травы, серия HS072024.2

Наименование: **копеечника Семенова трава**
 лекарственная форма: **лекарственное растительное сырье**
 таро-упупорочная система: **крафт-мешок**
 номер серии: HS072024.2
 Дата начала испытания: 07.2024 г.
 Дата окончания испытания: 10.2026 г.

Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация: нормы отклонения	Периоды контроля, мес.					
				0	3	6	9	12	18 24
Описание	Температура: 25°C ± 2°C, относительная влажность: 60%± 5%	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>	Соответствует спецификации	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Исследования стабильности продолжаются
Идентификация		СП-фирмы	Соответствует спецификации	Соответствует	—	—	—	—	
Посторонние примеси		ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	Соответствует	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК II, т. 1, 2.2.32	Не более 13,0 %	8,96	8,98	8,98	8,98	8,91	
Общая зола		ГФ РК II, т. 1, 2.4.16	Не более 9,0 %.	6,63	6,62	6,61	6,62	6,59	
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной		ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.	Не более 5,0 %	3,51	3,52	3,53	3,52	3,50	
Количественное определение: - сумма флавоноидов в пересчете на рутин		ГФ РК II, т. 1, 2.2.25	не менее 0,8 %	1,76	1,73	1,71	1,72	1,71	
Микробиологическая чистота		ГФ РК II, т. 1, 2.6.12 2.6.31	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10 ⁵ КОЕ/г; - ТУМС – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	Соответствует	—	—	—	—	

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Э

Результаты исследований стабильности копеечника Семенова корней, серия HSR102023

Наименование: **копеечника Семенова корни**
 лекарственная форма: **лекарственное растительное сырье**
 таро-упорочная система: **крафт-мешок**
 номер серии: HSR102023
 Дата начала испытания: 10.2023 г.
 Дата окончания испытания: 01.2026 г.

Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация: нормы отклонения	Периоды контроля, мес.						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура: 25°C ± 2°C, относительная влажность: 60%± 5%	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>	Соответствует спецификации	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Идентификация		СП-фирмы	Соответствует спецификации	Соответствует	—	—	—	—	—	Соответствует
Посторонние примеси		ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	Соответствует	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК II, т. 1, 2.2.32.	Не более 16,0 %	6,4	6,42	6,43	6,46	6,55	6,62	6,69
Общая зола		ГФ РК II, т. 1, 2.4.16.	Не более 6,0 %.	4,32	4,29	4,26	4,25	4,24	4,25	4,22
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной		ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.	Не более 1,0 %	0,57	0,58	0,61	0,50	0,50	0,50	0,47
Экстрактивные вещества		ГФ РК I, т. 1, <i>Определение экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье</i>	не менее 20,0 %	26,7	26,5	26,4	25,9	25,7	25,8	25,7
Микробиологическая чистота		ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.31	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10 ⁵ КОЕ/г; - ТУМС – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	Соответствует	—	—	—	—	—	Соответствует

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Э

Результаты исследований стабильности копеечника Семенова корней, серия HSR102024.1

Наименование: **копеечника Семенова корни**
 лекарственная форма: **лекарственное растительное сырье**
 таро-упупорочная система: **крафт-мешок**
 номер серии: HSR102024.1
 Дата начала испытания: 10.2024 г.
 Дата окончания испытания: 01.2027 г.

Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация: нормы отклонения	Периоды контроля, мес.					
				0	3	6	9	12	18 24
Описание	Температура: 25°C ± 2°C, относительная влажность: 60%± 5%	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>	Соответствует спецификации	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Исследования стабильности продолжаются
Идентификация		СП-фирмы	Соответствует спецификации	Соответствует	—	—	—	—	
Посторонние примеси		ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	Соответствует	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК II, т. 1, 2.2.32.	Не более 16,0 %	9,82	9,82	9,83	9,96	9,95	
Общая зола		ГФ РК II, т. 1, 2.4.16.	Не более 6,0 %.	4,68	4,68	4,66	4,65	4,64	
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной		ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.	Не более 1,0 %	0,37	0,38	0,41	0,40	0,40	
Экстрактивные вещества		ГФ РК I, т. 1, <i>Определение экстрактивных веществ лекарственном растительном сырье</i>	не менее 20,0 %	25,4	25,2	25,2	25,1	25,1	
Микробиологическая чистота		ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.3	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10 ⁵ КОЕ/г; - ТУМС – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	Соответствует	—	—	—	—	

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ Э

Результаты исследований стабильности копеечника Семенова корней, серия HSR102024.2

Наименование: **копеечника Семенова корни**
 лекарственная форма: **лекарственное растительное сырье**
 таро-упупорочная система: **крафт-мешок**
 номер серии: HSR102024.2
 Дата начала испытания: 10.2024 г.
 Дата окончания испытания: 01.2027 г.

Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация: нормы отклонения	Периоды контроля, мес.					
				0	3	6	9	12	18 24
Описание	Температура: 25°C ± 2°C, относительная влажность: 60%± 5%	ГФ РК I, т. 3, <i>Лекарственное растительное сырье</i>	Соответствует спецификации	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Исследования стабильности продолжаются
Идентификация		СП-фирмы	Соответствует спецификации	Соответствует	–	–	–	–	
Посторонние примеси		ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.	Органической примеси должно составлять не более 1 % (м/м), минеральной примеси – не более 1 % (м/м)	Соответствует	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК II, т. 1, 2.2.32.	Не более 16,0 %	8,96	8,98	8,98	8,98	9,05	
Общая зола		ГФ РК II, т. 1, 2.4.16.	Не более 6,0 %.	4,63	4,62	4,61	4,62	4,59	
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной		ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.	Не более 1,0 %	0,51	0,52	0,53	0,52	0,50	
Экстрактивные вещества		ГФ РК I, т. 1, <i>Определение экстрактивных веществ лекарственном растительном сырье</i>	не менее 20,0 %	25,5	25,4	25,3	25,3	25,1	
Микробиологическая чистота		ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.13.	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория С: - ТАМС – не более 10 ⁵ КОЕ/г; - ТУМС – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10 ⁴ КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	Соответствует	–	–	–	–	

ПРИЛОЖЕНИЕ Ю

Отчет о научно-исследовательской работе «Определение острой и подострой токсичности, местно-раздражающего и аллергизирующего действия экстракта копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)»

НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С. Д. АСФЕНДИЯРОВА»

УДК: 615.32:582.736

«УТВЕРЖДЕНО»

И.о. руководителя отдела
магистратуры и PhD докторантуры
Шамсутдинова А.М.И.



ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Тема: «Определение острой и подострой токсичности, местно-раздражающего и аллергизирующего действия экстракта копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder)»

Главный исследователь:

PhD докторант 3 года обучения
по ОП 8D10102- «Фармация»
Келеке А.С.

Научный руководитель:

к.фарм.н., ассоц. профессор
Ибрагимова Л.Н.

Алматы, 2025 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Я

Проект спецификации качества на «Копеечника Семенова экстракт сухой»

Показатели качества	Регламентируемые нормы	Ссылки на методы испытаний
Определение	Сухой порошок желтовато-зеленого цвета, полученный из травы <i>Hedysarum semenowii</i> Regel & Herder	ГФ РК I, т. 1, <i>Экстракты</i>
Идентификация: А. Тонкослойная хроматография - мангиферин В. Качественные реакции - флавоноиды	На хроматограмме испытуемого раствора должно наблюдаться флуоресцирующее пятно голубого цвета (R_f около 0,5). При добавлении к спиртовому извлечению из сырья нескольких капель кислоты хлороводородной и 20-30 мг порошка магния <i>P</i> появляется красное-розовое окрашивание	ГФ РК II, т. 1, 2.2.27. СП-фирмы
Потеря в массе при высушивании	не более 10,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.2.32.
Тяжелые металлы и мышьяк: Cd (Кадмий) Pb (Свинец) Hg (Ртуть) As (Мышьяк)	не более 1,0 мг/кг не более 5,0 мг/кг не более 0,1 мг/кг не более 0,5 мкг/кг	ГОСТ 30178-96, ГОСТ 26930-86
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 5.1.8., категория В: - ТАМС – не более 10^4 КОЕ/г; - ТУМС – не более 10^2 КОЕ/г; - Грамотрицательные бактерии, устойчивые к желчи – не более 10^2 КОЕ/г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 25 г	ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, 2.6.31
Количественное определение: - мангиферин - сумма флавоноидов в пересчете на рутин	не менее 0,5 % не менее 2,0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.2.29. ГФ РК II, т. 1, 2.2.25.