

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКТА СОССЮРЕИ СПОРНОЙ, СТИМУЛИРУЮЩЕГО ГЕМОПОЭТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ КОСТНОГО МОЗГА, ОБЛАДАЮЩЕГО ОСТЕОГЕННОЙ И ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Е.Ю. Авдеева, Я.Е. Решетов, Е.И. Гулина, М.В. Белоусов
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ (г. Томск)

The search of the best technology of *Saussurea controversa* extract, stimulating hematopoietic function of bone marrow possessing osteogenic and immunotropic activity

E.Yu. Avdeeva, Ya.E. Reshetov, E.I. Gulina, M.V. Belousov
Siberian state medical University (Tomsk, Russia)

РЕЗЮМЕ

Экстракт листьев соссуреи спорной (*Saussurea controversa* DC.) проявляет остеогенную, иммуномодулирующую, противовоспалительную активность и является перспективным кандидатом для расширения арсенала средств комплексной консервативной терапии остеомиелита. В результате исследования выявлены оптимальные параметры извлечения целевых компонентов (флавоноидов, хелидоновой кислоты, минеральных веществ) экстракта соссуреи спорной. Оптимальными условиями извлечения 40 % водным этанолом явилась трехкратная экстракция измельченных до 3–6 мм листьев растения в соотношении 1:15 при 80 °C в течение 60 мин.

Ключевые слова: *Saussurea controversa* DC, биологическая активность, параметры экстракции.

RESUME

Extract of *Saussurea controversa* leaf possesses osteogenic, immunomodulatory and anti-inflammatory activity and it is a promising candidate for complex conservative therapy of osteomyelitis. As a result of the study, the optimal parameters of extraction of target components (flavonoids, chelidonic acid, minerals) of the *Saussurea controversa* leaf were by determined. The optimal conditions for the extraction by 40 % aqueous ethanol was a three-time extraction of crushed to 3–6 mm leaves of the plant in a ratio of 1:15 at 80 °C for 60 min.

Keywords: *Saussurea controversa* DC, biological activity, extraction parameters.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой современной медицины является поиск лекарственных средств консервативной терапии остеомиелита, предшествующей и последующей хирургическому лечению. В качестве средств комплексного лечения остеомиелита перспективны лекарственные средства на основе природных биологически активных веществ, обладающие остеогенной активностью в сочетании с иммуномодулирующим, противовоспалительным действием и низкой токсичностью. Так, высокую остеогенную активность проявили полисахариды *Gnaphalium affine* [1], флавоноиды

Epimedii Enhances [2], эпигаллокатехингаллат и хлорогеновая кислота [3].

Для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата успешно применяются растения рода *Saussurea* DC (сем. Asteraceae) [4]. Так, вид *Saussurea lappa* включен в фармакопею Китая, на его основе получают препарат для лечения ревматоидного артрита, который стандартизуют по хлорогеновой кислоте и гликозидам кверцетина [5]. Род *Saussurea* DC включает более 350 различных видов, произрастающих в Евразии и Латинской Америке [6]. На территории Российской Федерации встречаются 115 видов, главным образом, на

территории Урала, Сибири и Дальнего Востока [7].

Один из популярных видов в Сибири – соссурея спорная (*Saussurea controversa* DC., далее – *S. controversa*) – многолетнее травянистое растение, обитающее преимущественно в лесной, лесостепной области, на лугово-степных фитоценозах, щебнистых, каменистых склонах. Растение имеет стебли высотой 25–100 см, клочковато-паутинисто опушенные, часто окрашенные в темный фиолетово-коричневый цвет. Листья размером 2,5–9 см на верхней стороне зеленые, снизу беловолочные, по краю неравнозубчатые. Корзинки собраны в небольшом числе в плотном щитке. Обертки черепитчатые, паутинисто-пушистые, наружные листочки их широкояйцевидные, коротко заостренные, внутренние – продолговатые, на верхушке тупые и густо-шерстистые. Все корзинки в верхней части черновато-фиолетовые. Цветоложе густопленчатое. Цветки лилово-фиолетовые [6, 7] (рис. 1).

В народной медицине используют извлечения из листьев *S. controversa* при глаукоме, лёгочных заболеваниях, туберкулезе легких и костей [8], как болеутоляющее, кровоостанавливающее, противоревматическое, ранозаживляющее средство и при желудочно-кишечных заболеваниях [9–11]. *S. controversa* издавна применяется в народной медицине Сибири, Бурятии, Монголии при эпилепсии, диарее, инфекционных заболеваниях и болезнях гепато-билиарной системы [12]. Экспериментальные исследования подтверждают гемостатическую [13] и антимикробную [14] активность *S. controversa*.

Экстракт *S. controversa* на 40 %-ном этаноле проявил остеогенную, иммуномодулирующую и противовоспалительную активность при остеомиелите *in vivo* [15–17]. Применение экстракта *S. controversa* на фоне терапии цефазолином способствует регрессу и локализации воспалительного процесса у животных с экспериментальным остеомиелитом, снижает содержание диеновых конъюгатов, активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови и ТБК-активных продуктов в мышечной ткани зоны поражения [15]. Наблюдается нормализация общего количества лейкоцитов,

моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов в крови экспериментальных животных [16].

При курсовом применении экстракта *S. controversa* происходит выраженная активация регенераторных процессов в костной ткани крыс с модельным остеомиелитом: возрастает плотность распределения остеобластов и площадь зрелой костной ткани по сравнению с нелечеными животными, наблюдается улучшение морфологической картины костной ткани [17]. После применения экстракта *S. controversa* в костном мозге крыс с модельным остеомиелитом наблюдается стимуляция гранулопоэза, происходит активация митотической активности гранулоцитов, увеличение количества миелобластов и зрелых форм гранулоцитов, возрастает общее количество ядросодержащих клеток [17].

Описанные свойства экстракта *S. controversa* связаны с входящими в его состав флавоногликозидами, хелидоновой кислотой и ее комплексным соединением с кальцием [18, 19]. Композиция из пяти гликозидов кверцетина, выделенных из листьев *S. controversa*, стимулировала гранулопоэз и лимфопоэз в костном мозге и усиливала репаративные процессы в зоне экспериментального остеомиелита [18]. Хелидоновая кислота и ее комплексное соединение с кальцием, названное саукалхелин, значительно стимулировали *in vitro* рост клеточной массы и дифференцировку мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) в остеобласты с последующей минерализацией 21-дневной культуры ММСК в стандартной питательной среде без остеогенных добавок [19].



Рис. 1. Соссурея спорная (*Saussurea controversa* DC.) в естественном месте произрастания и гербарный экземпляр.

Таким образом, экстракт *S. controversa* является перспективным кандидатом для расширения арсенала средств комплексной консервативной терапии остеомиелита, обладающий высокой активностью. Для создания нового лекарственного средства необходима разработка оптимальной технологии получения.

Целью настоящей работы явился выбор оптимальных параметров извлечения целевых компонентов экстракта сосюреи спорной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали листья *S. controversa*, собранные в июле 2014 г. в Иркутской области. Воздушно-сухой растительный материал с влажностью $6,3 \pm 0,1$ % измельчали и просеивали через сита с диаметром отверстий 1–6 мм. Экстракцию сырья осуществляли методом многократной мацерации с помощью водного этанола при нагревании, моделируя технологический процесс в лабораторном реакторе (Radley's, Великобритания), снабженном обогревающейся водяной рубашкой и мешалкой RZR 2020 (Heidolph, Германия) при скорости 300 об/мин. Экстракты, полученные после каждого приема мацерации, объединяли, экстрагент удаляли в роторном испарителе при температуре не выше 50 °С. Сконцентрированный густой экстракт высушивали методом конвективной сушки до содержания влаги не более 5 %. Для выбора оптимальных параметров извлечения варьировали соотношение сырья и экстрагента, степень измельченности сырья, время, температуру и кратность экстракции. Оценивали выход экстрактивных веществ (ЭВ), зольность, содержание флавоноидов (ФЛ) и хелидоновой кислоты (ХК).

Для определения содержания флавоноидов 0,1 г (т.н.) сухого экстракта растворяли в 40 % этаноле в мерной колбе вместимостью 25 мл и доводили тем же этанолом до метки (раствор А). 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5 % этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл

концентрированной хлороводородной кислоты и доводили 95 % этанолом до метки. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм через 60 мин. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина. Для этого 1 мл 0,02 % раствора рутина-стандарта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5 % этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили до метки 95% этанолом.

Приготовление раствора ГСО рутина: 0,0050 г (точная навеска) ГСО рутина, высушенного до постоянной массы при температуре 100–105 °С, растворяли в мерной колбе вместимостью 25 мл в небольшом количестве подогретого 95 % этанола и доводили объем до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы флавоноидов (%) осуществляли по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot M_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot M \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot M_0 \cdot 5000}{A_0 \cdot M \cdot (100 - w)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность ГСО рутина (среднее из трех измерений); M_0 – масса ГСО рутина, г; М – масса навески экстракта, г; W – содержание влаги в экстракте, %.

Для определения содержания хелидоновой кислоты 0,25 г (т.н.) сухого экстракта помещали в коническую колбу и растворяли в 15 мл воды при слабом нагревании. После охлаждения добавляли две капли фенолфталеина и титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида до малиново-коричневого окрашивания. 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 9,205 мг хелидоновой кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора оптимального экстрагента целевых веществ использовали воду и водный этанол различной концентрации 20, 40 и 70 % при одинаковых условиях экстракции. Выход флавоноидов при повышении экстракции этанола увеличивался, в то время как при экстракции 70 % этанолом содержание минераль-

Таблица 1

Влияние экстрагента на содержание целевых веществ в экстракте сосюреи спорной (n = 3, p = 0,95)

Экстрагент	Экстрактивные вещества, %	Зольность, %	Флавоноиды, %	Хелидоновая кислота, %
Вода	42,00 ± 0,40	27,2 ± 0,82	1,67 ± 0,05	10,18 ± 0,38
20 % этанол	39,20 ± 0,32	27,8 ± 0,84	1,44 ± 0,05	8,53 ± 0,09
40 % этанол	39,40 ± 0,30	26,15 ± 0,16	1,83 ± 0,03	13,20 ± 0,09
70 % этанол	31,00 ± 0,20	20,0 ± 0,60	1,89 ± 0,04	11,87 ± 0,09

Таблица 2

Влияние параметров экстракции 40 % водным этанолом на содержание целевых веществ в экстракте соссуреи спорной (n = 3, p = 0,95)

№	Соотношение	Кратность	Время, мин	T, °C	Размер частиц, мм	ЭВ, %	Зольность, %	ФЛ, %	ХК, %
1	1:15 1:10 1:10	3	30	80	3–6	39,40 ± 0,20	23,89 ± 0,15	1,50 ± 0,40	13,10 ± 0,05
2	1:15 1:10 1:10	3	60	80	3–6	45,10 ± 0,30	25,11 ± 0,11	1,73 ± 0,27	12,91 ± 0,20
3	1:15 1:10 1:10	3	90	80	3–6	43,40 ± 0,30	23,13 ± 0,10	1,64 ± 0,33	12,75 ± 0,04
4	1:15 1:10	2	60	80	3–6	39,20 ± 0,22	23,45 ± 0,11	1,53 ± 0,35	12,82 ± 0,05
5	1:15 1:15 1:15	3	60	80	3–6	45,70 ± 0,31	24,18 ± 0,12	1,79 ± 0,20	13,20 ± 0,09
6	1:20 1:15 1:15	3	60	80	3–6	43,95 ± 0,29	24,58 ± 0,10	1,48 ± 0,20	11,14 ± 0,11
7	1:10 1:8 1:8	3	60	80	3–6	34,40 ± 0,15	23,82 ± 0,15	1,64 ± 0,15	12,66 ± 0,03
8	1:15 1:10 1:10	3	60	90	3–6	43,60 ± 0,25	23,62 ± 0,12	1,54 ± 0,25	12,53 ± 0,03
9	1:15 1:10 1:10	3	60	70	3–6	41,42 ± 0,25	23,42 ± 0,10	1,69 ± 0,36	12,85 ± 0,05
10	1:15 1:10 1:10	3	60	60	3–6	38,86 ± 0,18	24,95 ± 0,11	1,54 ± 0,09	12,84 ± 0,15
11	1:15 1:10 1:10	3	60	80	1	46,30 ± 0,25	21,95 ± 0,10	1,30 ± 0,12	12,94 ± 0,02
12	1:15 1:10 1:10	3	60	80	2–3	38,80 ± 0,15	26,15 ± 0,16	1,37 ± 0,18	13,06 ± 0,06
13	1:15 1:10 1:10 1:10	4	60	80	3–6	40,06 ± 0,15	23,59 ± 0,12	1,71 ± 0,30	12,92 ± 0,23

ных компонентов и экстрактивных веществ было значительно ниже (табл. 1). Максимальный выход хелидоновой кислоты был получен при экстракции 40 % водным этанолом. Кроме того, такой же экстракт ранее проявил активность в биологических экспериментах [15–17]. Таким образом, 40 % водный этанол является оптимальным экстрагентом целевых компонентов из листьев *S. controversa* и был выбран в качестве экстрагента при проведении дальнейших исследований.

Анализ результатов экстракции 40 % водным этанолом показал, что максимальный выход ЭВ наблюдался в опытах 2, 5 и 11 (табл. 2). Уменьшение кратности экстракции, соотношения сырья и экстрагента при одновременном повышении или понижении времени экстракции приводило к снижению выхода ЭВ. Таким же образом влияло снижение температуры экстракции до 60–70 °C или ее повышение до 90 °C. Максимальный выход ЭВ наблюдали

при экстракции фракции сырья, проходящего через отверстия с диаметром 1 мм, отсеянного от пыли (опыт 11). Это явление можно объяснить особенностью строения листа соссуреи спорной: нижний эпидермис листа обильно покрыт нитевидными трихомами, образующими войлочное покрытие [20]. Поэтому даже при измельчении сырья его частицы посредством волосков слипаются, образуя более крупные. Основная масса сырья (около 98 %) просеивается лишь через сита с отверстиями диаметром 3–6 мм. Через отверстия с диаметром 1 мм проходят частицы сырья, свободные от волосков, вследствие чего содержащие большее количество ЭВ.

Зольность экстракта косвенно свидетельствует о содержании кальция, так как он преобладает в минеральном составе растения [21]. В целом, все варианты экстракции позволяют извлечь примерно равное количество минеральных компонентов. Но трехкратная экс-

тракция в течение 60 мин. при 80 °С при определенном соотношении сырья и экстрагента позволяет несколько увеличить их выход (опыт 2 и 12). Аналогичные условия позволили увеличить выход хелидоновой кислоты (опыт 5). Выход флавоноидов в аналогичных условиях повышается при увеличении соотношения сырья и экстрагента (опыты 2, 5, 13).

Таким образом, оптимальными условиями повышения выхода целевых веществ при экстракции 40 % водным этанолом из листьев *S. controversa* является трехкратная экстракция, измельченных до 3–6 мм, в соотношении 1:15 при 80 °С в течение 60 мин.

ВЫВОДЫ

1. Этанольный экстракт листьев сосюреи спорной (*Saussurea controversa* DC.) является перспективным кандидатом для расширения арсенала средств комплексной консервативной терапии остеомиелита.

2. Оптимальные условия экстракции 40 % водным этанолом ($n = 3$, 1:15, $t = 60$, 80 °С) позволяют повысить выход экстрактивных веществ, в т.ч. целевых компонентов – флавоноидов, хелидоновой кислоты и минеральных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Isolation of Gnaf C, a polysaccharide constituent of *Gnaphalium affine*, and synergistic effects of GnafC and ascorbate on the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells / Y. Aoshima [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2003. – №67(10). – P. 2068–2074.
2. Flavonoids of Herba Epimedii Enhances Bone Repair in a Rabbit Model of Chronic Osteomyelitis During Post-infection Treatment and Stimulates Osteoblast Proliferation in Vitro / D. Shou [et al.] // *Phytother Res.* – 2017. – №31(2). – P.330–339.
3. Amplification by (-)-epigallocatechin gallate and chlorogenic acid of TNF- α -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts / N. Yamamoto [et al.] // *International journal of molecular medicine*. – 2015. – №36. – P. 1707–1712.
4. Comparison of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of three medicinal plants known as «Snow Lotus» herb in traditional Uighur and Tibetan medicines / T. Yi [et al.] // *J. of Ethnopharmacol.* – 2010. – №128. – P.405–411.
5. *Saussurea involucre*: A review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine / W.-I. Chik [et al.] // *J. of Ethnopharmacol.* – 2015. – №172. – P. 44–60.
6. Липшиц, С.Ю. Род *Saussurea* DC. (Asteraceae) / С.Ю. Липшиц. – Л.: Наука, 1979. – 283 с.
7. Флора Сибири т.13.: Asteraceae / И.М. Краснов [и др.]. – Новосибирск: Наука, 1997. – 472 с.
8. Телятьев, В.В. Полезные растения Центральной Сибири / В.В. Телятьев. – Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство, 1985. – 384 с.
9. Дикорастущие полезные растения России / А.А. Буданцев [и др.]. – СПб.: из-во СПбХФА, 2001. – 663 с.
10. Полная энциклопедия лекарственных растений. Т. II. / В.К. Лавренов [и др.]. – СПб.: Издательский дом «Нева», 1999. – 816 с.
11. Свиридонов, Г.М. Полезные растения Горного Алтая / Г.М. Свиридонов. – Алтайское книжное изд-во, 1978. – 231 с.
12. Биологически активные вещества растений рода *Sossurea* / Т.А. Волхонская [и др.] // Тезисы докладов науч. конф. «Лекарственные растения в традиционной и народной медицине». – Улан-Удэ, 1987. – С.38–39.
13. Исследование лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения / Е.С. Шишкина [и др.]. – Томск, 1975. – С.90–92.
14. Макаренко, Н.Г. Антимикробные свойства лекарственных растений Горного Алтая: автореф. дисс. канд. биол. Наук / Н.Г. Макаренко. – Томск, 1974. – 18 с.
15. Биохимическое исследование активности экстрактов *Saussurea controversa* DC и *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – Т.15, №2. – С.5–12.
16. Влияние экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* на иммунологическую реактивность крыс с экспериментальным остеомиелитом / Т.В. Перевозчикова [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2016. – Т.79, №6. – С.68–72.
17. Сравнительная оценка остеогенной активности и влияния на гемопоэтическую функцию красного костного мозга фракций экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т.18, №3 – С. .
18. Flavonol glycosides from *Saussurea controversa* and their efficiency in experimental osteomyelitis / E. Avdeeva [et al.] // *Planta Med. Int. Open*. – 2018. – №5. – P.e24–e29.
19. Chelidonic Acid and its Derivatives from *Saussurea Controversa*: Isolation, Structural elucidation and Influence on the Osteogenic Differentiation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Vitro / E. Avdeeva [et al.] // *Biomolecules*. – 2019. – № 9(5). – P. 189. <https://doi.org/10.3390/biom9050189>
20. Population structure, resource potential and diagnostic features of raw materials of *Saussurea controversa* DC / M.N. Shurupova [et al.] // *Tomsk State University Journal of Biology*. – 2019. – №45. – P.34–46.
21. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* DC. Флоры восточной сибирей / Я.Е. Решетов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2018. – №4. – С.205–214.

Адрес автора

Авдеева Е.Ю., доцент кафедры фармацевтического анализа
elenaavdeev@yandex.ru