

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**  
федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

---

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Тема работы
Исследование химического состава биологически активных веществ <i>S. controversa</i> (Asteraceae), эффективных при остеомиелите

УДК 577.15.19:616.71-007.233

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Решетов Ярослав Евгеньевич		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ИШХБМТ	Белоусов М.В.	д. фарм. н.		

**КОНСУЛЬТАНТЫ:**

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Якимова Т.Б.	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Горбенко М.В.	к.т.н.		

**ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:**

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
18.04.01 Химическая технология				
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**  
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
 высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология

УТВЕРЖДАЮ:  
 Руководитель ООП  
 18.04.01 Химическая  
 технология  
 \_\_\_\_\_ С.В. Романенко  
 09.03.2020 г.

**ЗАДАНИЕ  
 на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

<b>Магистерской диссертации</b>
---------------------------------

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ81	Решетов Ярослав Евгеньевич

Тема работы:

<b>Исследование химического состава биологически активных веществ <i>S. controversa</i> (Asteraceae), эффективных при остеомиелите</b>
Утверждена приказом директора (дата, номер)

Срок сдачи студентом выполненной работы:	15.06.2020 г.
--	---------------

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

<p><b>Исходные данные к работе</b></p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Провести литературный обзор по растениям и биологически активным веществам (БАВ) эффективным при остеомиелите, на его основе выбрать объект исследования. Исследовать химический состав растения, выявить мажорные группы БАВ, изолировать их в индивидуальном виде и исследовать (in vitro) их биологическую активность в отношении патогенетических звеньев остеомиелита (наличие остеогенной и иммуностропной активности). Описать использованное оборудование, представить методики проведенных экспериментов, проанализировать</p>
---	--

	полученные результаты, сделать выводы.
<p><b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b></p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p>	<p>Введение Литературный обзор Экспериментальная часть Результаты и их обсуждение Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение Социальная ответственность Заключение</p>
<p><b>Перечень графического материала</b></p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	Графический материал полученных результатов
<b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b> <i>(с указанием разделов)</i>	
<b>Раздел</b>	<b>Консультант</b>
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Доцент ОСГН к.э.н. Якимова Татьяна Борисовна
Социальная ответственность	Доцент ООД к.т.н. Горбенко Михаил Владимирович
Раздел на иностранном языке	Доцент ОИЯ к.фил.н. Устюжанина Анна Константиновна
<b>Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:</b>	
<b>На русском:</b> 1. Литературный обзор; 2. Объекты и методы исследования; 3. Исследование химического состава объекта исследования; 4. Исследование биологической активности БАВ экстракта листьев <i>S.controversa</i> DC. на 40% этаноле	
<b>На английском:</b> 1.1. Опыт и перспективы использования растений для лечения остеомиелита; 1.2. Общая характеристика <i>Saussurea controversa</i> DC.; 2.1. Объекты исследования; 2.3. Методы общего фитохимического анализа на группы БАВ в листьях <i>S. controversa</i> DC; 2.4. Методы исследования полисахаридов <i>S. controversa</i> DC.; 2.5. Получение и фракционирование экстракта на 40% этаноле; 2.6. Методы биологических исследований; 2.7. Статистическая обработка результатов; 3.1. Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ; 3.3. Получение, фракционирование и установление компонентного состава экстракта листьев <i>S.controversa</i> DC. на 40% этаноле	

<b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b>	09.03.2020 г.
---	---------------

**Задание выдал руководитель:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ИШХБМТ	Белоусов Михаил Валерьевич	д. фарм. н.		09.03.2020 г.

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Решетов Ярослав Евгеньевич		09.03.2020 г.

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**  
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
 высшего образования  
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
 Уровень образования магистратура  
 Период выполнения весенний семестр 2019/2020 учебного года

Форма представления работы:

**Магистерская диссертация**

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН**  
**выполнения выпускной квалификационной работы**

Срок сдачи студентом выполненной работы:	05.06.2020 г.
--	---------------

Дата контроля	Название раздела, вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела
23.03.2020 г.	Литературный обзор по теме исследования	10
06.04.2020 г.	Общий химический анализ биологически активных веществ (БАВ) объекта исследования, выявление мажорных БАВ. Разработка методик выделения индивидуальных веществ.	10
20.04.2020 г.	Выделение индивидуальных мажорных вещества, их подробное химическое исследование с установлением структуры неизвестных веществ	10
04.05.2020 г.	Исследование (in vitro) остеогенной и иммуностропной активности выделенных целевых групп БАВ и индивидуальных соединений. Обработка результатов экспериментов.	10
18.05.2020 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение», раздела ВКР на иностранном языке	10
05.06.2020 г.	Оформление ВКР	10
19.06.2020 г.	Представление ВКР	40

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ИШХБМТ	Белоусов М.В.	д. фарм. н.		09.03.2020 г.

**СОГЛАСОВАНО:**

Руководитель ООП 18.04.01 Химическая технология	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		09.03.2020 г.

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСООБЪЕКТИВНОСТЬ И  
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
9ДМ81	Решетов Я.Е.

<b>Школа</b>	Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий		
<b>Уровень образования</b>	Магистр	<b>Направление</b>	18.04.01 Химическая технология

**Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:**

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов, согласно применяемой техники и технологии, в соответствии с рыночными ценами. Оклады в соответствии с окладами сотрудников «НИ ТПУ»
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	- районный коэффициент- 1.3; - накладные расходы – 16%; - норма амортизации 20%.
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Общий налоговый режим. Отчисления во внебюджетные фонды – 30.2 %

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения исследования	Анализ потенциальных потребителей, анализ конкурентных технических решений, оценка готовности проекта к коммерциализации
2. Планирование и формирование бюджета исследования	Определение этапов работ; определение трудоемкости работ; разработка графика Ганта. Определение затрат на проектирование
3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	Расчет сравнительной эффективности проекта

**Перечень графического материала(с точным указанием обязательных чертежей):**

1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Календарный план график проведения работ

**Дата выдачи задания для раздела по линейному графику**

**Задание выдал консультант:**

<b>Должность</b>	<b>ФИО</b>	<b>Ученая степень, звание</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
Доцент ОСГН	Якимова Татьяна Борисовна	к.э.н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Решетов Я.Е.		



## ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ81	Решетов Ярослав Евгеньевич

Школа	Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий		
Уровень образования	Магистратура	Направление	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Исследование химического состава биологически активных веществ <i>S. controversa</i> (Asteraceae), эффективных при остеомиелите	
<b>Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:</b>	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	Объект исследования – Соссюрея спорная. Рабочая зона – химическая научно-исследовательская лаборатория кафедры фармацевтического анализа СибГМУ. Область применения – фармацевтика.
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</li> <li>– организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</li> </ul>	Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 27.12.2018); -ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования; -ГОСТ Р ИСО 6385-2016. Эргономика. Применение эргономических принципов при проектировании производственных систем. -ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения). -СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03. Гигиенические требования к персональным электронновычислительным машинам и организации работы.
<b>2. Производственная безопасность:</b> 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов	2.1.Выявление вредных факторов: - в ходе работы к вредным факторам

2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия	воздействия можно отнести: токсичные вещества, используемые при выполнении работы (хлороформ, бутанол, этилацетат, спирт этиловый); - для устранения влияния вредных факторов необходимо использовать средства защиты: для коллективной защиты - работа под вытяжным шкафом; для индивидуальной защиты - индивидуальные средства защиты (халат, респиратор, одноразовые перчатки); - освещение, уровень шума и вибрации, микроклиматические условия должны соответствовать требованиям СанПиН 2.2.4.548 – 96; 2.2. Выявление опасных факторов: - для обеспечения электробезопасности токоведущие части оборудования необходимо использовать в соответствии с требованиями СанПиН 2971-84; - молниезащита производственных зданий и сооружений обеспечивается заземлением электрооборудования;
3. Экологическая безопасность:	влияние вредных веществ, которые используются во время эксперимента, на окружающую среду (серная кислота); - загрязнение сточных вод в результате удаления отходов в канализационную сеть; - разработаны решения по обеспечению экологической безопасности: - СанПиН 2.1.6.1032-01; - ГН 2.1.6.1338 – 03; - ГН 2.2.5.2309 – 07; - ГН 2.1.5.1315-03..
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	При разработке и эксплуатации проектируемого решения возможны ЧС: пожар, взрыв и т. д.; - для ликвидации последствий пожара необходимо: 1. вызвать пожарную службу; 2. использовать огнетушитель, песок, асбестовое одеяло; 3. отключить электричество; 4. организовать эвакуацию рабочих; Типичная ЧС - пожар

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
--	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень,	Подпись	Дата
-----------	-----	-----------------	---------	------

		<b>звание</b>		
Доцент	Горбенко М.В.	к.т.н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
9ДМ81	Решетов Ярослав Евгеньевич		

### Планируемые результаты по программе

Код результата	Результат обучения
<b><i>Профессиональные компетенции</i></b>	
P1	Применять <i>глубокие</i> естественно-научные, математические и инженерные знания для создания <i>новых</i> материалов
P2	Применять <i>глубокие</i> знания в области современных технологий химического производства для решения <i>междисциплинарных</i> инженерных задач
P3	Ставить и решать <i>инновационные</i> задачи <i>инженерного анализа</i> , связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, <i>проектировать</i> конкурентоспособных на <i>мировом</i> рынке
P5	Проводить теоретические и экспериментальные <i>исследования</i> в области создания <i>новых</i> материалов, современных химических технологий, нанотехнологий
P6	Внедрять, <i>эксплуатировать</i> современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их <i>высокую эффективность</i> , соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды
<b><i>Универсальные компетенции</i></b>	
P7	Использовать <i>глубокие</i> знания по <i>проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной</i> инженерной деятельности с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности
P8	<i>Активно</i> владеть <i>иностраным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве <i>члена и руководителя группы</i> , состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность <i>следовать корпоративной культуре</i> организации
P10	Демонстрировать <i>глубокие</i> знания <i>социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>
P11	<i>Самостоятельно учиться</i> и непрерывно <i>повышать квалификацию</i> в течение всего периода профессиональной деятельности

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа изложена на 177 страницах, включая 23 рисунка, 46 таблиц, 196 литературных источников и 4 приложения.

Ключевые слова: соссурея спорная (*S. controversa* DC.), биологически активные вещества (БАВ), флавоноиды, полисахариды, производные  $\gamma$ -пирона, химическая структура, остеогенная и иммуностропная активность.

Объектом исследования являются листья соссурии спорной.

Целью работы явилось химическое исследование надземной части *S. controversa* DC. для выявления групп БАВ, обладающих остеогенной и иммуномодулирующей активностью.

Охарактеризован химический состав полисахаридов листьев *S. controversa*, установлена их принадлежность к арабиногалактанам. Выделены два новых гликозида -: кверцетин-7-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид и кверцетин-3-О- $\beta$ -D-диглюкопиранозил-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид. Из водного остатка экстракта выделено производное  $\gamma$ -пирона - 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота (хелидоновая кислота). Установлено что мажорными БАВ экстракта листьев *S. controversa* на 40% этаноле являются полисахариды, флавоноиды и хелидоновая кислота.

Исследована биологическая активность выделенных групп БАВ и индивидуальных соединений. Для полисахаридов, флавоноидов и хелидоновой кислоты установлено присутствие выраженной остеогенной и иммуномодулирующей активности.

Степень внедрения: результаты данной работы могут использоваться для внедрения листьев *S. controversa* в качестве лекарственного растительного сырья, а также для разработки лекарственных препаратов с остеогенной и иммуномодулирующей активностью.

Область применения: разработанные методики можно рекомендовать для контроля качества растительного сырья- соссурии спорной.

**ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ**

БФ – бутанольная фракция

БХ – бумажная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВО – водный остаток

ВРПС – водорастворимые полисахариды

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГХ/МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия

ЖАК – железоаммонийные квасцы

ИК – инфракрасный

кДа – килодальтон

КХ – колоночная хроматография

МГц – мегагерц

мкМ – микромоль

М.м. – молекулярная масса

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

НД – нормативная документация

ОБФ – осадок из бутанольной фракции экстракта

ПВ – пектиновые вещества

ПС – полисахариды

ПССЭ – сумма полисахаридов из спиртового экстракта

РСО – рабочий стандартный образец

Т. пл. – температура плавления

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУ – трифторуксусная кислота

ФПВ – фракция пектиновых веществ

ФПС – фракция полисахаридов

ЭАФ – этилацетатная фракция

ЭВ – экстрактивные вещества

эВ – электронвольт

УФ – ультрафиолетовый

ХЛФ – хлороформная фракция

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## Оглавление

Введение .....	19
<b>1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b>	
1.1. Опыт и перспективы использования растений для лечения остеомиелита .....	21
1.2. Общая характеристика <i>Saussurea controversa</i> DC.....	30
<b>2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	
2.1. Объекты исследования .....	37
2.2. Стандартные образцы, реактивы и растворители.....	37
2.3. Методы общего фитохимического анализа на группы БАВ в листьях <i>S. controversa</i> DC.....	39
2.4. Методы исследования полисахаридов <i>S. controversa</i> DC.....	41
2.4.1. Выделение и очистка.....	41
2.4.2. Определение молекулярно-массового распределения.....	42
2.4.3. Определение содержания белка.....	42
2.4.4. Определение урсоловых кислот .....	42
2.4.5. Получение ацетатов полиолов .....	42
2.4.6. Определение мономерного состава .....	43
2.5. Получение и фракционирование экстракта на 40% этаноле.....	43
2.5.1. Хроматографический анализ экстракта и его фракций.....	43
2.5.2. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений.....	46
2.6. Методы биологических исследований .....	47
2.6.1. Исследование остеогенной активности.....	47
2.6.2. Исследование иммуностропной активности.....	48
2.7. Статистическая обработка результатов .....	49
<b>3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ <i>S. CONTROVERSA</i> DC.</b>	
3.1. Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ.....	50



3.2.	Выделение и характеристика полисахаридов.....	52
3.2.1.	Выделение полисахаридных фракций.....	52
3.2.2.	Определение молекулярно-массового распределения.....	54
3.2.3.	Определение содержания белка в полисахаридах.....	54
3.2.4.	Определение уруновых кислот и моносахаридного состава.....	54
3.3.	Получение, фракционирование и установление компонентного состава экстракта листьев <i>S.controversa</i> DC. на 40% этаноле.....	57
3.3.1.	Получение и фракционирование экстракта.....	57
3.3.2.	Хроматографический анализ экстракта и фракций.....	59
3.3.3.	Исследование бутанольной фракции экстракта.....	66
3.3.4.	Исследование водного остатка экстракта .....	71
4.	ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАВ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ <i>S.CONTROVERSA</i> DC. НА 40% ЭТАНОЛЕ	
4.1.	Исследование остеогенной активности.....	76
4.2.	Исследование иммуностропной активности.....	79
5.	ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ	
5.1.1.	Потенциальные потребители результатов исследования.....	82
5.1.2.	Оценка готовности проекта к коммерциализации.....	83
5.1.3.	Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования.....	85
5.2.	Контрольные события проекта.....	86
5.2.1.	Инициация проекта.....	86
5.2.2.	Планирование управления научно-техническим проектом.....	89
5.2.3.	План проекта.....	90
5.2.4.	Бюджет научно-технического исследования (НТИ).....	94
5.2.5.	Расчет материальных затрат научно-технического исследования....	94
5.2.6.	Основная заработная плата исполнителей темы.....	96
5.2.7.	Организационная структура проекта.....	101

5.2.8. Матрица ответственности.....	102
5.2.9. План управления коммуникациями проекта.....	103
5.3. Реестр рисков проекта.....	104
5.4. Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	104
5.4.1. Оценка сравнительной эффективности исследования.....	104
<b>6. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ</b>	
6.1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности....	108
6.2. Производственная безопасность.....	110
6.3. Анализ вредных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований.....	112
6.3.1. Отклонение показателей микроклимата.....	112
6.3.2. Химические опасные и вредные производственные факторы.....	113
6.3.3. Повышенный уровень шума на рабочем месте.....	115
6.3.4. Недостаточная освещенность рабочей зоны.....	116
6.4. Анализ выявленных опасных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследования.....	118
6.4.1. Электробезопасность.....	118
6.5. Требования к способам обеспечения пожарной безопасности, предотвращения пожара.....	119
6.6. Экологическая безопасность.....	120
6.7. Безопасность в чрезвычайных ситуациях и чрезвычайные ситуации.....	121
Заключение.....	123
Список литературы.....	124
Приложение 1.....	147
Приложение 2.....	163
Приложение 3.....	169
Приложение 4.....	174

## Введение

Остеомиелит (ОМ) - воспалительный процесс костной ткани и костного мозга, вызванный бактериальной флорой. ОМ является острой медицинской и социальной проблемой. Частота случаев ОМ у людей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата превышает 70%, при этом рецидивы наступают в 20-35% случаев, что приводит к повторным оперативным вмешательствам с высоким риском инвалидизации [55, 133].

Ключевыми звеньями патогенеза ОМ являются иммуносупрессия, воспаление и резорбция костной ткани. Стандарт лечения ОМ включает хирургическую санацию и консервативную терапию антибиотиками, сочетанную с иммуномодулирующими и нестероидными противовоспалительными средствами [66].

Комплексы биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения имеют ряд ценных терапевтических качеств, особенно при их использовании в комплексной терапии хронических патологий, за счет системного полимодального терапевтического действия, повышения адаптивного ресурса организма, высокого терапевтического индекса и низкого уровня побочных эффектов. Одним из перспективных направлений лечения ОМ является изыскание растительных источников БАВ, действующих на процессы репарации костной ткани, в сочетании с иммуномодулирующей и противовоспалительной активностью [101, 130, 148]. В данном аспекте представляет интерес сосюра спорная (*Saussurea controversa* DC., род *Saussurea* DC.), произрастающая на территории РФ и успешно применяемая в народной медицине Сибири для лечения ОМ. Учитывая значительный ресурсный потенциал *S. controversa* [145], возможность интродукции [74], применение в народной медицине в качестве противовоспалительного, иммуностропного, ранозаживляющего средства [81,82], а так же, результаты предварительных экспериментальных исследований [1,3,58], данный растительный объект можно считать

перспективным кандидатом для комплексного фармацевтического исследования. А изучение химического состава, фармакологических свойств БАС для комплексной терапии остеомиелита является актуальным.

**Целью** исследования явилось химическое исследование надземной части *S. controversa* DC. для выявления групп БАВ, обладающих остеогенной и иммуномодулирующей активностью.

Для достижения указанной цели, был сформирован ряд **задач**:

- 1) На основании анализа литературных данных обосновать выбор объекта и дизайна исследования.
- 2) Провести исследование химического состава листьев *S. controversa*, и экстракта на 40% этаноле, эффективного на модели экспериментального травматического остеомиелита.
- 3) Выявить индивидуальные соединения и группы БАВ листьев *S. controversa*, обладающие остеогенными и иммуностропными свойствами на моделях *in vitro*.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ОСТЕОМИЕЛИТА

### 1.1. Опыт и перспективы использования растений для лечения остеомиелита

Терапия патологий костной ткани, в т.ч. инфекционной природы, является важной медико-социальной проблемой. Одной из таких патологий является остеомиелит – инфекционный воспалительный процесс, поражающий все элементы кости: костный мозг, компактную и губчатую части кости и надкостницу.

Одним из древнейших свидетельств заболевания остеомиелитом является перелом позвоночника диметродона – хищного ящера существовавшего 250 миллионов лет назад в Пермском периоде. Шероховатость кости, опухоль, выше места перелома, а также трещины в пораженной кости свидетельствуют об обширном воспалительном процессе, что дополнительно подтверждено гистологическими исследованиями [137].

На протяжении многих столетий заболевание с трудом поддавалось лечению и зачастую приводило к смертельным исходам. Совершенствование хирургических приемов, концепция асептики, создание антибиотиков в 20 веке, привело к существенному прогрессу в терапии остеомиелита. В результате произошло значительное снижение смертности и частоты рецидивов болезни. Однако, несмотря на достигнутые успехи в травматологии, частота неблагоприятных результатов лечения переломов конечностей с развитием инфицирования остается высокой. Причиной этого является увеличение количества тяжелых механических травм, ошибки в выборе способа лечения, рост числа и устойчивость возбудителей ОМ, а также нарушение деятельности иммунной системы организма.

Возбудителем острого остеомиелита в 80-85% случаев являются патогенные стафилококки. В 11% случаев заболевание вызвано

метициллинрезистентным золотистым стафилококком, реже стрептококком и пневмококком [44]. Возрастает роль грамотрицательной флоры (около 6-7%), высокорезистентной к антибактериальным препаратам. Зачастую вместе со стафилококками в патогенезе участвуют синегнойная палочка, вульгарный протей, кишечная палочка, сальмонеллы, а также монокультуры клебсиеллы (капсульная форма) [18]. Кроме того возбудителями могут являться риккетсии и патогенные грибы. Важным этиологическим фактором острого гематогенного остеомиелита могут быть и вирусные инфекции, на фоне которых протекает почти 40-50% случаев остеомиелита. Вирусы снижают сопротивляемость организма, повышают вирулентность гноеродных бактерий и создают благоприятную почву для их внедрения [19,40]. Зачастую возбудители травматического и посттравматического остеомиелита представлены полимикробной флорой [22]. Схема патогенеза травматического остеомиелита согласно Гриневу М.В., обозначена на рисунке 1.

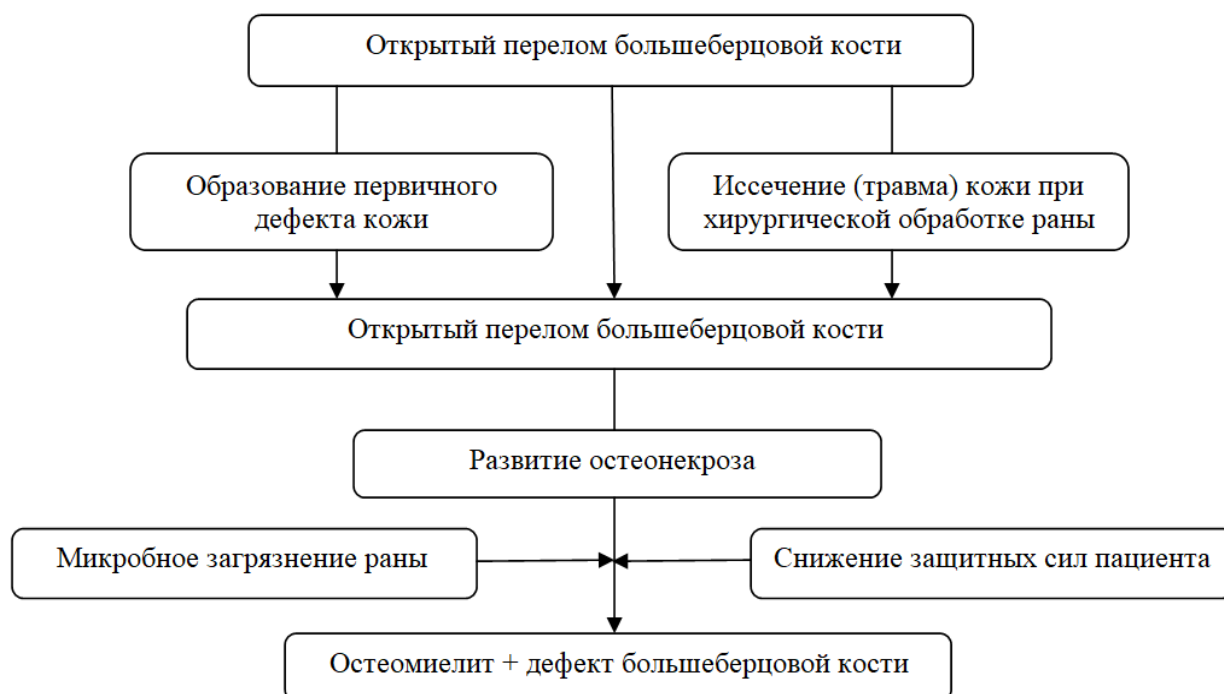


Рисунок 1 – Схема патогенеза травматического остеомиелита

Большое значение при данной патологии имеет иммунный ответ, причем как на клеточном, так и на гуморальном уровне. Обычно, при наличии очагов

гнойных инфекций, организм человека начинает вырабатывать антитела: иммуноглобулины (IgG, IgM, IgA) в определенных соотношениях (73:7:19). В соответствии с данным уровнем антител можно оценивать иммунологический статус больных остеомиелитом. Многими исследователями установлено отсутствие и/или подавление иммунного ответа при остеомиелите, что существенно сказывается на хронизации инфекции. Кроме того, выявлено, что у каждого второго пациента, нарушается дифференцировка макрофагов, что приводит к значительному ослаблению иммунологических реакций [93,107,141]. Нарушения минерального обмена при ОМ проявляются в изменении ряда показателей: снижение содержания сывороточного кальция, железа и хлоридов, увеличение меди, магния, значительное увеличение активности щелочной фосфатазы [69].

В настоящее время, рост травматизма, использование инвазивных методов (эндопротезирование, металлоостеосинтез) в лечении переломов приводит к увеличению числа больных с данной патологией [14,40,51]. Частота встречаемости ОМ у пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата составляет до 78 % лиц трудоспособного возраста [55]. Гнойно-воспалительные поражения костей являются тяжелыми и долго протекающими заболеваниями, приводящими к инвалидизации в 55 % случаев. При этом наблюдается тенденция к смещению от ограниченных форм заболевания в сторону более тяжелых проявлений.

Согласно стандартам оказания медицинской помощи при хирургических инфекциях [67], терапия данного заболевания проводится с помощью сочетанного применения лекарственных средств различных групп: антибиотиков, иммуномодуляторов, препаратов кальция, анальгетиков, нестероидных противовоспалительных средств, венопротекторов, витаминов [52,55]. Очевидно, что такая терапия обуславливает высокую ксенобиотическую нагрузку на организм, а полипрагмазия увеличивает риски

проявления нежелательных побочных реакций лекарственных средств. Проблема осложняется растущей антибиотикорезистентностью возбудителей ОМ. Последствия заболевания сопровождаются значительными экономическими затратами на лечение и пенсионное обеспечение пациентов.

Учитывая особенности заболевания, в качестве средств консервативной терапии перспективны лекарственные средства на основе природных биологически активных веществ, обладающие системным полимодальным терапевтическим действием, повышая адаптивный ресурс организма, относительно низкой токсичностью, высоким терапевтическим индексом и низким уровнем побочных эффектов [11].

Так, в качестве средств вспомогательной терапии остеомиелита в народной медицине используются различные виды растений (рисунок 2).



Рисунок 2 – Растения, используемые в народной медицине для лечения остеомиелита



Известно об употреблении внутрь спиртовой настойки цветков сирени, сока алоэ, водного настоя и сока листьев крапивы, в качестве средств, значительно облегчающих течение болезни [10,31,41,79]. Популярным средством является отвар корней окопника, который применяют как внутрь, так и наружно [48,81]. Успешно применяется отвар сушеницы топяной для промывания свищевых ходов при ОМ, особенно в сочетании с отваром ромашки, 5% спиртовой настойкой календулы с добавлением спиртового раствора борной кислоты [82]. Соссюрея спорная также находит применение в народной медицине для лечения ОМ [79,81]. Экспериментально установлена иммуномодулирующая активность водных и водно-этанольных экстрактов, полученных из надземной части растения [129].

Для выявления растений, перспективных для использования в комплексной терапии ОМ, определения наиболее значимых групп БАВ и фармакологических эффектов, нами проведена систематизация известных растительных и природных средств народной медицины, в сочетании с анализом химического состава по данным литературных источников (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика видов растений применяемых в народной медицине для лечения остеомиелита

Вид растения	Семейство	Используемые части растений	Народное средство	Активные компоненты	Фармакологическое действие	Литература
Окопник лекарственный - <i>Symphytum officinale</i> L.	Бурачниковые <i>Boraginaceae</i>	Корни	Отвар корней на молоке для приема внутрь. В виде водных отваров в качестве примочек и для наружного применения.	Аллантоин; ВРПС (урониды фруктоарабианов); ПВ	Противо- воспалительное Стимулирующее регенерацию Иммуномодулирующее	[81, 92,122]
Алоэ древовидное- <i>Aloe arborescens</i> Mill.	Асфodelовые <i>Asphodelaceae</i>	Листья	Свежий сок листьев в виде примочек для наружного применения	Биогенные элементы, органические кислоты, пиреновые соединения, ПС	Стимулятор обменных процессов, антиоксидантное, иммуно- стимулирующее действие	[57, 61, 71]
Сирень обыкновенная- <i>Syringa vulgaris</i> L.	Маслиновые <i>Oleaceae</i>	Цветки, почки	Спиртовая настойка цветков или почек, для внутреннего и наружного применения (в виде компрессов)	Фенилпропаноиды (сирингин), производные кофейной кислоты; Секоиридоиды	Противо- воспалительное, иммуномодулирующее, антиоксидантное	[15,83, 86,106, 153]
Календула лекарственная <i>Calendula officinalis</i> L.	Астровые <i>Asteraceae</i>	Цветки	Промывание свищей водным настоем (1:10) смешанного в равных частях с 3% раствором борной кислоты	ПС, флавоноиды, каротиноиды	Противо- воспалительное, Иммуномодулирующее	[27, 29, 82, 85]
Осина обыкновенная, <i>Populus tremula</i> L.	Ивовые <i>Salicaceae</i>	Кора	Настои и отвары. Наружные аппликации раствора золы коры осины	Фенологликозиды, биогенные элементы (Ca, Mg, K, Fe Mn, Zn, Cu)	Стимулятор обменных процессов, противо- воспалительное, антибактериальное	[9,10, 28, 33]
Сушеница топяная <i>Gnaphalium uliginosum</i> L.	Астровые <i>Asteraceae</i>	Трава	Водный настой травы сушеницы для внутреннего употребления, масляные отвары для наружного применения в виде примочек	Флавоноиды (гнафалозиды); биогенные элементы (Ca,P, Fe, Mg, Cu); каротиноиды	Противо- воспалительное, противомикробное, стимулирующее грануляцию	[23, 56, 96, 144]

<p>Крапива двудомная <i>Urtica dioica L.</i></p>	<p>Крапивные <i>Urticaceae</i></p>	<p>Листья</p>	<p>Настой листьев, для внутреннего применения. Сок свежих листьев, для промывания свищевых ходов</p>	<p>ПС, фенолокислоты (сиринговая, синаповая, феруловая к-ты), флавоноиды, каротиноиды, токоферолы, биоэлементы (К, Са, Р, Mg, Fe, Cu)</p>	<p>Иммуно- модулирующее, противо- воспалительное, антиоксидантное</p>	<p>[16,76,136, 163]</p>
<p>Соссюрея спорная <i>Saussurea controversa</i> DC.</p>	<p>Астровые <i>Asteraceae</i></p>	<p>Листья</p>	<p>Водный настой и настойка на 40% этаноле</p>	<p>ВРПС, ПВ, лигнаны (сирингин), флавоноиды, биоэлементы</p>	<p>Иммуномодулирующее</p>	<p>[77, 80, 82]</p>

Исходя из данных, представленных в таблице 1, в качестве средств народной медицины при лечении ОМ используются растения, содержащие БАВ следующих групп: полисахариды, биоэлементы, флавоноиды, фенилпропаноиды, иридоиды, карбоновые кислоты, каротиноиды. Следует отметить, что практически для всех используемых видов растительного сырья характерно наличие иммуномодулирующей, противовоспалительной и анаболической активности. Таким образом, скрининг видов, перспективных для терапии ОМ целесообразен с учетом содержащихся в растениях комбинаций вышеуказанных групп БАВ.

В настоящее время проводятся интенсивные научные исследования по влиянию природных соединений при патологии костной ткани. Одним из наиболее перспективных направлений исследований является активация процессов костной репарации. Известны работы зарубежных исследователей о влиянии флавоноидов и изофлавоноидов на течение ОМ путем активации остеобластов и ингибирования активности остеокластов [88,120]. Имеются сведения о действии крахмальных полисахаридов на увеличение скорости пролиферации, дифференцировки и созревания остеобластов посредством индукции костного морфогенетического белка второго типа, что приводит к восстановлению костной ткани [101]. Зарубежными учеными показано, что растительные некрахмальные полисахариды ингибируют остеопороз и уменьшают остеокластогенез посредством увеличения в ядрах клеток количества белка  $\beta$ -катенина и снижения экспрессии генов, связанных с остеокластами [164]. Установлено положительное влияние фенолокислот (хлорогеновой, кофейной, коричной и феруловой) на остеобласты и процессы воспаления [103,113,117,165,166]. Кроме того выявлено, что дубильные вещества, такие как эпигаллокатехин-3-галлат, оказывают аналогичное воздействие, а в комбинации с хлорогеновой кислотой, значительно усиливают положительное влияние на процессы костной репарации [131,158].

Для дополнительной оценки степени воздействия на патогенетические звенья ОМ, проведен анализ современных данных научной медицины. При этом имеющиеся сведения показывают, что растительные полисахариды оказывают значительное влияние на фазу воспаления и иммунитет, и практически не влияют на минеральный обмен [34,35,74,100,142,146,155]. Кроме того, биоэлементы (Са, Mg, P, B, V, Zn, Cu и др.) оказывают влияние на минеральный обмен, в частности на микроархитектуру костной ткани [94,97,108,114,157]. Фенольным соединениям (флавоноидам и фенолокислотам) присуща противовоспалительная и мембраностабилизирующая активность, что также является важным фактором при лечении ОМ [47,84,87,99,112,128,135,152,162].

Соответственно, согласно данным литературы, растения перспективные для лечения ОМ, должны накапливать полисахариды, флавоноиды, биоэлементы и карбоновые кислоты в мажорных количествах.

Предпосылками к данной работе явились скриннинговые исследования, в результате которых было установлено, что экстракт из листьев соссуреи спорной (*Saussurea controversa* DC.) на 40 % этаноле эффективен при экспериментальном остеомиелите [1]. Действие нативного экстракта опосредуется через иммунную систему. В частности имеет место стимуляция гуморальной ветви иммунитета на 7 сутки, после иммунизации мышей эритроцитами барана [129]. Выявлено, что экстракты соссуреи спорной на 20% этаноле значительно стимулируют гуморальный иммунный ответ. Несмотря на перспективность использования соссуреи спорной, ее химический состав малоизучен. Таким образом, на основании результатов экспериментальных исследований, наиболее перспективным кандидатом для комплексной терапии ОМ считаем *S. controversa* DC.

## **1.2. Общая характеристика *Saussurea controversa* DC.**

Соссюрея - *Saussurea* DC. (сем. Asteraceae) – род многолетних травянистых растений, который включает более 350 различных видов, произрастающих в Евразии и Латинской Америке. Главный центр видообразования находится в

Центральной Азии на территории Гималайской горной системы [46]. В Российской Федерации основными местами произрастания являются Урал, Сибирь и Дальний Восток. В частности, на территории Сибири, в лесостепной, лесной и горной зонах, встречаются 52 вида [59].

*Saussurea controversa* DC. (соссюрея спорная) – бореально-монтанный, урало-сибирский вид с дизъюктивным ареалом. После разрыва сибирская часть ареала охватывает юго-восток Западной Сибири, юг Восточной Сибири и север Монголии [54]. Вид обитает преимущественно в лесной области, на лугово-степных фитоценозах, щебнистых, каменистых склонах [60]. В Восточной Сибири часто произрастает на каменистых склонах, карбонатизированных и кальцифицированных почвах, на выходах известняка [21]. Растение имеет стебли высотой 25-100 см, клочковато-паутиристо опушенные, часто окрашенные в темный фиолетово-коричневый цвет. Листья размером 2,5-9 см на верхней стороне зеленые, снизу беловойлочные, по краю неравнозубчатые. Листья представлены тремя формациями - нижние длинночерешковые, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, глубокосердцевидные при основании с острой верхушкой [38,60]. Листья средней формации – короткочерешковые, узкие, при основании тупые, не сердцевидные. Листы верхней формации – сидячие, мелкие, ланцетовидные. Корзинки собраны в небольшом числе в плотном щитке. Обертки черепитчатые, паутиристо-пушистые, наружные листочки их широкояйцевидные, коротко заостренные, внутренние - продолговатые, на верхушке тупые и густошерстистые. Все корзинки в верхней части черновато-фиолетовые [38]. Цветоложе густопленчатое. Цветки лилово - фиолетовые.

Этот вид относится к многолетним травянистым растениям с полициклическими розеточными вегетативными и удлинненными генеративными побегами. В онтогенезе выделены 4 основных фазы: вегетация, бутонизация, цветение, плодоношение. Фаза цветения приходится на июль, не является постоянной и происходит в среднем, раз в 3 года. Ресурсообеспеченность и

возможность интродукции, делают данный вид перспективным для внедрения в государственную фармакопею Российской Федерации [74].



Рисунок 3 – Соссюрея спорная (*Saussurea controversa* DC.), в естественном месте произрастания и гербарный экземпляр

Важно отметить, что из-за большого количества близких видов, сложности систематики и классификации, на территории Сибири и Забайкальского края некоторыми ботаниками вид описывается под названиями *Saussurea discolor* Willd. – соссюрея двухцветная и *S. propinqua* Pjlin – соссюрея близкая. Однако в настоящее время под данными названиями следует понимать именно *Saussurea controversa* DC. - соссюрея спорная. *S. controversa* DC. также известна под названиями горькуша спорная, братский трут, односторонка.

В народной медицине используются листья *S. controversa* DC., которые применяются в виде отвара при глаукоме, остеомиелите, лёгочных заболеваниях, при туберкулезе легких и костей [20,81], как кровоостанавливающее, противоревматическое средство и при желудочно-кишечных заболеваниях [75,82]. *S. controversa* DC. издавна применяется в народной медицине Сибири, Бурятии, Монголии при эпилепсии, диарее, инфекционных заболеваниях, болезнях гепато-билиарной системы [20]. На Алтае водный настой корней принимали при головной боли и скрофулезе, употребляли в качестве

кровоостанавливающего средства при маточных кровотечениях [75]. Свежие листья обладают ранозаживляющим действием, особенно при гнойных ранах [77]. На модели экспериментального травматического остеомиелита *in vivo* установлена эффективность водного и водно-этанольного экстрактов *S. controversa* в сочетании с антибиотикотерапией [3].

В традиционной медицине Тибета и Китая успешно применяют близкие виды - "Tianshan Snow Lotus" (Тянь-шанский снежный лотос), общее название лекарственного растительного сырья, объединяющее несколько видов: *S. lappa* (Decne.) Clarke., *S. costus* (Falc.) Lipsch. и *S. involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. Bip.[150]. Вид *S. lappa* включен в фармакопею Китая. На его основе получают препарат для лечения ревматоидного артрита, стандартизированный по хлорогеновой кислоте и гликозидам кверцетина [98].

Экспериментально установлены противоопухолевая, антибактериальная, противопротозойная, антиоксидантная, иммуностимулирующая виды активностей различных видов соссюрей [126, 140]. Аналогичную активность можно предполагать и у других видов *Saussurea* DC., благодаря способности представителей одного рода накапливать близкие по структуре БАВ.

Среди первичных метаболитов соссюрей, обладающих фармакологической активностью, следует отметить полисахаридный комплекс, проявляющий в эксперименте антиоксидантное и противовоспалительное действие [134,153]. Вторичные метаболиты соссюрей представлены преимущественно фенольными и терпеновыми соединениями. В растениях присутствуют моно- и дигликозиды флавоноидов, при этом, в качестве мажорных агликонов для большинства видов выступают: кверцетин, апигенин, лютеолин и кемпферол [149,161]. Отечественными исследователями установлены различия в качественном составе и содержании флавоноидов в двадцати видах *Saussurea*, произрастающих на территории Сибири. Содержание флавоноидов в листьях разных видов находится в диапазоне 1,5-2,5 % и зависит от места произрастания [20]. Органические кислоты представлены фенолокислотами: оксибензойной, сиригвой;



гидроксикоричными кислотами: хлорогеновой, коричной, сириговой, а также кофейной кислотой и ее сложными эфирами [149]. Среди кумаринов выявлены умбеллиферон, эскулетин, остол, скополетин, скополин, скиммин. Из видов *Saussurea* выделены лигнаны производные тетрагидрофуранового ряда: (сирингарезинол, массаирезинол, арктигенин, ларицирезинол, фенилпропаноид сирингин) и сесквитерпеновые лактоны: (янерин, цинаропикрин, гроссгемин и др.) [123,124]. Среди метаболитов некоторых видов встречаются сесквитерпеновые лактоны, конъюгированные с аминокислотами пролином, аланином и цистеином, [102,119]. Изолированы тритерпеновые соединения, производные урсоловой и олеаноловой кислот:  $\alpha$ -амирин, олеаноловая кислота, тараксастерол, тритерпеновый спирт соссюрал, лупеол [59,150].

В траве *S. controversa* DC. обнаружены водорастворимые нейтральные и пектиновые полисахариды, аскорбиновая и кофейная кислоты, флавоноиды, тритерпеновые сапонины [17,78,129]. Листья растения также содержат ряд биологически активных веществ: флавонолгликозиды - преимущественно производные кверцетина и мирицетина [7,59]; гидроксикоричные кислоты - хлорогеновую, коричную, сириговую; фенилпропаноиды - сирингин, сирингорезинол; биогенные элементы: Са, К, Mg, P [17,78]. Химический состав *S. controversa* DC. представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Химический состав *S. controversa* DC. по данным литературы

№ п/п	Класс биологически активных соединений	Представители	Источник литературы
1	Кумарины	эскулетин	[59]
2	Терпеноиды	5(R)-(b-D- глюкопиранозилокси)-2- [3(R)-гидроксибутил]-1,3,3- триметилциклогексен 5(R)-гидрокси-(b-D- глюкопиранозилоксибутил) 1,3,3-триметилциклогексен	[80]
		$\beta$ -ситостерин, кампестерин,	

3	Фитостерины	стигмастерин β-ситостерин – β-D- глюкопиранозид	[80]
4	Тритерпеновые соединения	Олеаноловая кислота	[78]
5	Флавоноиды	Лютеолин, апигенин, рутин, кверцетин, кемпферол, гиперозид, кверцетин-3,5- глюкоарабинозид, мирицетин-3-глюкозид, мирицетин-3-рамнозид	[59]
6	Фенилпропаноиды	Сирингин	[80]
7	Органические кислоты	Галловая, коричная, кофейная.	[17,59]
8	Полисахариды	Водорастворимые и кислые полисахариды, пектиновые вещества.	[2]
9	Биогенные элементы	Ca, Si, Br, Fe, Na, Au, Ag, Sm, Ce, Lu, Yb, Hf, Nd, Cs, Tb, Sc, Rb, Ta, Eu, La.	[8]
10	Свободные углеводы	D-ксилоза	[78]

Итоги обзора доступных источников научной литературы свидетельствуют об актуальности фармакогностического и фармакологического исследования *S. controversa* DC. Учитывая значительный ресурсный потенциал *S. controversa* DC. [145], возможности интродукции [74], популярность в народной медицине [81,82], а также результаты экспериментальных исследований остеогенной и иммуностропной активностей [1,3,58], данный растительный объект можно считать перспективным кандидатом для комплексного фармацевтического исследования. А изучение химического состава, фармакологических свойств БАВ с последующей разработкой нормативной документации на лекарственное

растительное сырье для комплексной терапии остеомиелита является актуальной задачей нашего исследования.

### **Выводы**

1. Комплексная терапия остеомиелита должна сочетать остеогенные, иммуномодулирующие и противовоспалительные эффекты, действующие на ключевые звенья патогенеза.
2. Основными группами БАВ растений, проявляющими остеогенные иммуномодулирующие и противовоспалительные эффекты при остеомиелите являются полисахариды, флавоноиды и карбоновые кислоты.
3. Сосюра спорная является перспективным объектом для исследования фармакологического воздействия на ключевые патогенетические звенья остеомиелита, выявления целевых групп БАВ, ответственных за биологическую активность.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовали надземную часть сосюреи спорной *S. controversa* DC. – листья с черешками (рисунок 4), заготовленные в фазу цветения в 2014-2018 г. в Иркутской области, Красноярском крае, Республике Хакасия и высушенные воздушно-теневым способом при температуре 20-25 °С до содержания влаги 5-9%.



Рисунок 4 – Цельное и измельченное сырье – листья *S. controversa* DC.

### 2.2. Стандартные образцы, реактивы и растворители

Для выполнения экспериментальных исследований использовали стандартные образцы, реактивы и растворители – таблица 3.

Таблица 3 – Стандартные образцы, реактивы и растворители, использованные в работе

Стандартные образцы		
Наименование	Степень чистоты	Производитель
Апигенин	95,0	Sigma-Aldrich
L-(+)-Арабиноза	98,0	Sigma-Aldrich

L-Аргинин	98,0	Sigma-Aldrich
L-Валин	98,0	Sigma-Aldrich
D-(+)-Галактоза	99,0	Millipore
Галловая кислота	98,0	Supelco
Глицин	99,0	Sigma-Aldrich
D-(+)-Глюкоза	96,0	Sigma-Aldrich
Дигидрокверцетин	90,0	Sigma-Aldrich
Кверцетин	95,0	Sigma-Aldrich
Кемпферол	90,0	Sigma-Aldrich
Коричная кислота	97,0	Supelco
Кофейная кислота	99,0	Supelco
D-(+)-Ксилоза	99,0	Sigma-Aldrich
L-Лизин	98,0	Sigma-Aldrich
Миоинозитол	99,0	Millipore
L-(+)-Рамноза	99,0	Millipore
Рутин	97,0	Sigma-Aldrich
Салициловая кислота	99,0	Supelco
L-Треонин	98,0	Sigma-Aldrich
Умбеллиферон	99,0	Supelco
D-(-)-Хинная кислота	99,0	Supelco
Хлорогеновая кислота	95,0	Sigma-Aldrich
Эскулетин	99,0	Supelco
<b>Реактивы</b>		
<b>Наименование</b>	<b>Степень чистоты</b>	<b>Производитель</b>
Алюминия хлорид	99,0	ЛенРеактив
Борная кислота	хч	ЛенРеактив
Железоаммонийные квасцы	чда	ЛенРеактив
Лимонная кислота	хч	ЛенРеактив
Натрия боргидрид	99,0	Sigma-Aldrich
Натрия гидроксид	98,0	ЛенРеактив
Натрия хлорид	98,0	ЛенРеактив
Свинца ацетат	чда	ЛенРеактив
Формальдегид	37,0	ЛенРеактив

Фосфорномолибденовая кислота	хч	ЛенРеактив
<b>Растворители</b>		
<b>Наименование</b>	<b>Степень чистоты</b>	<b>Производитель</b>
Ацетон	хч	ЛенРеактив
Ацетонитрил	for HPLC	Sigma-Aldrich
Гексан	осч	ЛенРеактив
Изоамиловый спирт	чда	ЛенРеактив
Метанол	хч	ЛенРеактив
Н-бутанол	хч	ЛенРеактив
Н-октанол	for HPLC	Sigma-Aldrich
Пиридин	чда	ЛенРеактив
Серная кислота	хч	ЛенРеактив
Толуол	осч	ЛенРеактив
Трифторуксусная кислота	for HPLC	Sigma-Aldrich
Трихлорметан	хч	ЛенРеактив
Уксусная кислота	хч	ЛенРеактив
Уксусный ангидрид	for GC	Supelco
Хлороводородная кислота	хч	ЛенРеактив
Этанол	95,0	Essentica
Этилацетат	хч	ЛенРеактив

### 2.3. Методы общего фитохимического анализа на группы БАВ

#### в листьях *S. controversa* DC.

Для целей фитохимического анализа на группы БАВ из подготовленного сырья (высушенного и измельченного до размера частиц 2-3 мм) получали водные, водно-спиртовые извлечения на 40% этаноле при нагревании на водяной бане с обратным холодильником.

Для хроматографического анализа и изолирования индивидуальных веществ из 40% этанольного экстракта, сконцентрированного под вакуумом до водного остатка методом жидкость-жидкостной экстракции были получены хлороформные, этилацетатные, бутанольные и водные фракции.

Обнаружение сесквитерпеновых лактонов осуществляли по методу К.С. Рыбалко [70]. Для этого 30,0 г измельченного сырья настаивали с горячей водой в соотношении 1:5, (80 °С, 1 ч), и фильтровали. Полученное водное извлечение трижды экстрагировали хлороформом в соотношении 1:1. Хлороформную фазу отделяли, объединяли, обезвоживали, пропуская через безводный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и удаляли растворитель под вакуумом. Далее в хлороформной пленке снимали ИК-спектр полученного остатка.

Обнаружение сапонинов в водном извлечении проводили с помощью качественных реакций (проба на пенообразование, проба Фонтан – Кандела, реакцию с раствором  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) [39,42].

Обнаружение дубильных веществ в водном извлечении проводили с помощью следующих качественных реакций: с 1%-м раствором желатина в 10%-м растворе  $\text{NaCl}$ ; по Стиасни (40% раствор формальдегида и конц.  $\text{HCl}$ ); с 1% раствором ЖАК [48].

Для определения кумаринов проводили качественные реакции с 5% раствором  $\text{NaOH}$ , азосочетания, лактонную пробу в спиртовом извлечении (96% этанол, 1:10, 80-85 °С, 0,5 ч) [42].

Флавоноиды определяли в спиртовом извлечении с помощью общепринятых качественных реакций: проба Синода по Брианту (конц.  $\text{HCl}$  и магниевая стружка, октиловый спирт); с 5% раствором  $\text{AlCl}_3$ ; реакция Вильсона [36, 39]. Количественное определение флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на рутин [4].

Обнаружение фенолкарбоновых кислот проводили с помощью БХ и ТСХ [146]. Количественное определение – спектрофотометрическим методом в пересчете на хлорогеновую кислоту [43].

Для обнаружения алкалоидов получали два извлечения: кислое – раствор А, и щелочное – раствор Б [30,49]. Раствор А готовили следующим образом: 10,0 г воздушно-сухих измельченных листьев *S. controversa* DC., помещали в колбу с притертой пробкой заливали водой подкисленной  $\text{HCl}$  до

pH 2, в соотношении 1:10, колбу закрывали и оставляли на 12 ч для экстракции алкалоидов. Экстракт фильтровали, фильтрат подщелачивали раствором аммиака до pH 9, затем в делительной воронке проводили реэкстракцию алкалоидов в органическую фазу хлороформом и вновь экстрагировали алкалоиды подкисленной водой, получая при этом осветленный раствор, свободный от балластных веществ.

Для приготовления раствора Б 10,0 г измельченного сырья заливали водным раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 10) и оставляли на 24 ч для экстракции. Экстракт фильтровали и извлекали хлороформом алкалоиды в виде оснований. Полученную вытяжку подкисляли хлористоводородной кислотой до pH 2, затем проводили реэкстракцию в щелочную среду вышеуказанным способом. С растворами А и Б проводили качественные реакции с общеалкалоидными реактивами (Бушарда, Драгендорфа, Зонненштейна, Несслера).

Для обнаружения полисахаридов 2,0 г воздушно-сухого сырья, помещали в коническую колбу и заливали водой очищенной в соотношении 1:10 и нагревали на водяной бане при 80 °С в течение 0,5 ч. Извлечение фильтровали, охлаждали до комнатной температуры. Полисахариды осаждали путем прибавления к 2 мл извлечения 8 мл 96% этанола. Так же проводили реакцию с антронсерным реактивом [37].

## **2.4. Методы исследования полисахаридов *S. controversa* DC.**

### **2.4.1. Выделение и очистка**

Известно, что растения содержат значительное количество хлорофилла, и других соединений, значительно затрудняющих выделение нативных полисахаридов, поэтому для повышения чистоты ПС проводили предварительную обработку сырья органическими растворителями: хлороформом и этилацетатом для удаления пигментов и этанолом для удаления фенольных соединений. Далее из подготовленного депигментированного сырья извлекали ПС ступенчатой экстракцией холодной, горячей водой при нагревании, и 0,7% раствором оксалата



аммония при нагревании. Полученные фракции ПС подвергали депротеинизации по методу Севага [132]. Затем проводили диализ против воды очищенной. Суммы фракций лиофилизировали [45].

#### **2.4.2. Определение молекулярно-массового распределения**

Молекулярно-массовые характеристики полученных ПС определяли методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии в сравнении с растворами стандартных образцов декстранов ( $c = 1$  мг/мл) с  $M_w$  15, 40, 60, 90, 110, 250 и 500 кДа («Sigma-Aldrich», Германия) [141]. Коэффициент гетерогенности ( $M_w/M_n$ ) рассчитывали как отношение средневесовой ( $M_w$ ) к среднечисленной ( $M_n$ ) молекулярной массе полисахаридов.

#### **2.4.3. Определение содержания белка**

Количественное определение белка проводили методом Лоури с предварительным осаждением (ОФС.1.2.3.0012.15 – метод 2 В), используя градуировочный график, построенный для растворов бычьего сывороточного альбумина [25].

#### **2.4.4. Определение уроновых кислот**

Содержание уроновых кислот (УК) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции продуктов окисления углеводов с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты, с использованием градуировочного графика, построенного для растворов галактуроновой кислоты. Измерение проводили при двух длинах волн 400 и 450 нм на спектрофотометре UNICO 2800 (США) [105].

#### **2.4.5. Получение ацетатов полиолов**

По 5 мг фракций ПС помещали в стеклянные ампулы, прибавляли по 3 мл трифторуксусной кислоты в концентрации 2 моль/л, содержащей в качестве внутреннего стандарта мио-инозитол в концентрации 1 мг/мл. Ампулы запаивали в пламени горелки и помещали в сушильный шкаф на 5 часов при температуре 100-105 °С. Полноту проведения гидролиза оценивали с помощью реактива Фелинга. Гидролизаты упаривали досуха в колбах на

шлифах в присутствии метанола. Сухой остаток моноз растворяли в 1 моль/л растворе аммиака, прибавляли 5 мг боргидрида натрия, плотно закрывали стеклянными пробками и оставляли на 24 ч. Растворы упаривали досуха, прибавляли по 0,5 мл безводного пиридина и уксусного ангидрида. Затем реакционную смесь помещали в сушильный шкаф и проводили ацетилирование полиолов при  $t=100\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч. Избыток уксусного ангидрида и пиридина удаляли упариванием под вакуумом в присутствии толуола [32].

#### **2.4.6. Определение мономерного состава**

Идентификацию ацетатов полиолов соответствующих моносахаридов проводили на хроматографе Varian 450-GC (Varian, США), оборудованном пламенно-ионизационным детектором с использованием капиллярной колонки VF-5 MS (Varian, США; 0,25 мм, 30 м), анализ проводили в температурном режиме от  $175^{\circ}\text{C}$  (1 мин) до  $250^{\circ}\text{C}$  (2 мин) со скоростью увеличения температуры  $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  [68].

### **2.5. Получение и фракционирование экстракта на 40% этаноле**

#### **2.5.1. Хроматографический анализ экстракта и его фракций**

Для получения экстракта измельченное сырье экстрагировали 40% водным этанолом (1:15) на водяной бане ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) трижды. Порции объединяли и упаривали под вакуумом до водного остатка. Разделение суммарного экстракта на фракции проводили методом жидкость-жидкостной экстракции последовательно хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом.

Часть полученных фракций, а также водный остаток гидролизovali 5% серной кислотой на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Гидролизаты нейтрализовали до pH 7 бария гидроксидом, агликаны реэкстрагировали хлороформом и этилацетатом, а свободные углеводы определяли в водных фазах. Полученный экстракт, фракции, извлеченные органическими растворителями, водный остаток и их гидролизаты анализировали методом БХ на бумаге марок FN-4 и FN-12 (Германия), «Ленинградская», а также при

помощи хроматографии в тонком слое сорбента на пластинах «Силуфол УФ-254» (Чехия) и «Сорбфил-ПТСХ АФ-УФ» в сравнении со стандартными образцами веществ-свидетелей. Хроматографические системы и способы детектирования представлены в таблице 4 [24,36,89,150].

Таблица 4 – Хроматографические системы и способы детектирования при проведении БХ и ТСХ

Группа БАВ	Анализируемая фракция	Хроматографические системы		Детекция	
		БХ	ТСХ	БХ	ТСХ
Кумарины	ХЛФ, ЭА	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (40:60)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :EtOAc (70:30) C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (50:50); C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (33:65:2)	УФ свет 254/365 нм	УФ свет 254/365 нм 5%-й спиртовый р-р КОН, диазотированная сульфани- ловая кислота, I <sub>2</sub> -пары
Флавоноиды	ХЛФ, ЭА, БФ, ВО	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (85:15; 70:30; 40:60;)	н-BuOH: CH <sub>3</sub> COOH : H <sub>2</sub> O (40:10:50)	УФ-свет 254/365 нм, NH <sub>3</sub> пары, 3% спиртовый раствор AlCl <sub>3</sub>	УФ-свет 254/365 NH <sub>3</sub> пары, 5% спиртовый раствор AlCl <sub>3</sub> , реактив Вильсона
Фенолкарбоновые кислоты	ХЛФ, ЭА, БФ, ВО	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (95:5; 85:15; 70:30;)	EtOAc:H <sub>2</sub> O: HCOOH (65:20:15)	УФ-свет 254/365, NH <sub>3</sub> пары, 3% раствор FeCl <sub>3</sub> в MeOH	УФ-свет 254/365, I <sub>2</sub> -пары. Диазотированная сульфаниловая кислота, 20% раствор Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , видимый свет
Сапонины	БФ, ВО	-	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (19:80:1); CHCl <sub>3</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (70:30); CHCl <sub>3</sub> :MeOH: CH <sub>3</sub> COOH (94:5,5:0,5)	-	25% спиртовый раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты I <sub>2</sub> -пары
Моносахариды	ЭА, БФ, ВО	н-BuOH:C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N: H <sub>2</sub> O (6:4:3)	EtOAc:HCOOH: CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O (60:15:15:10)	Раствор анилин фталата в н-бутаноле, t = 105 °С	0,5% раствор тимола в H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> конц., t = 105 °С
Аминокислоты	ВО	н-BuOH: CH <sub>3</sub> COOH : H <sub>2</sub> O(60:15:25)	н-BuOH:C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N : H <sub>2</sub> O(6:4:3)	0,2% р-р нингидрина в ацетоне	0,3% р-р нингидрина в н-BuOH содержащий CH <sub>3</sub> COOH

Для ВЭЖХ экстракта и его фракций по 2 мг исследуемых образцов растворяли в 0,5 мл 80% этанола, раствор отфильтровывали, отбирали 5 мкл и вносили в устройство для ввода пробы хроматографа (Shimadzu LC-20AD, Япония) с колонкой PerfectSil Target ODS-3 (MZ-Analysentechnik GmbH, Германия). Элюирование осуществляли смесью ацетонитрила, изопропанола – объемное соотношение 5:2, и 0,1% раствора трифторуксусной кислоты с увеличением градиента от 15% к 35% с временным интервалом от 0 до 40 минут, скорость элюирования – 1 мл/мин [5].

Количественное определение веществ методом ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Thermo, США) оснащенном ультрафиолетовым детектором

### **2.5.2. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений**

Различные фракции, полученные из водно-спиртового экстракта подвергали разделению на индивидуальные компоненты методом колоночной хроматографии на силикагеле (Lachema, Чехия) и полиамиде (Woelm, Германия), в качестве элюентов использовали системы хлороформ-метанол и этанол-вода в различных соотношениях [90, 91].

Температуру плавления индивидуальных веществ определяли на приборе Stuart SMF-38 (Bibby scientific, Великобритания). УФ спектры снимали в этанольных растворах с концентрацией веществ  $10^{-4}$  моль/л на спектрометре HP 8453 UV-Vis spectrometer (Hewlett-Packard, Германия). Инфракрасные спектры снимали в таблетках с калия бромидом на приборе Nicolet 5700 (FT-IR, Thermo Fisher Scientific, США) Элементный CHN анализ проводили на анализаторе CarloErba 1106 (CarloErba, Италия). ЯМР-спектры снимали в дейтерированном метаноле и диметилсульфоксиде на ЯМР спектрометре BrukerAV - 600 с рабочими частотами: 600.30 ( $^1\text{H}$ ) и 150,95 МГц ( $^{13}\text{C}$ ) (Bruker BioSpin GmbH, Германия). ГХ/МС спектры получали на масс-спектрометре Thermo Scientific DFS (Thermo Fisher Scientific, США) при

температуре паров 200–220 °С, с электронной ионизацией в 70 эВ. Наличие неорганических компонентов устанавливали на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7900 JP 14,080,159 (Agilent Technologies, Япония) разрушение органической матрицы проводили в микроволновой системе Speedwave MWS TM-3+ в присутствии азотной кислоты [90,91].

## **2.6. Методы биологических исследований**

При проведении биологических экспериментов руководствовались принципами, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ (заключение № 5539 от 02.10.2017).

### **2.6.1. Исследование остеогенной активности**

Исследование остеогенной активности мажорных групп БАВ проводили на мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (ММСК) культивируемых в лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта. Для этого формировали 3 группы клеток: 1) интактные; 2) с добавлением суммы полисахаридов; 3) с добавлением суммы флавоноидов; Вещества прибавляли в культивируемую среду в концентрациях 10, 30 и 50 мг/л. Для подтверждения морфофункциональной природы ММСК клетки культивировали в 1,5 мл среды с реагентом из набора для дифференцировки StemPro (Thermo Fisher Scientific). Клетки окрашивали с использованием набора для фенотипирования и жизнеспособных фиксируемых красителей. Степень дифференцировки МСКК в остеобласты оценивали по площади клеток окрашиваемой 2% раствором ализаринового красного при помощи микроскопа Zeiss Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss Microscopy, США) и программного обеспечения ZEN 2012 software [90].

### 2.6.2. Исследование иммуотропной активности

Иммуотропную активность соединений определяли с помощью теста на продукцию оксида азота макрофагами. В экспериментах использовали 45 мышей-самцов линии C57BL/6 конвенциональной категории в возрасте 8-10 недель, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Все процедуры с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организация процедур при работе с лабораторными животными» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Этическая экспертиза проведена комиссией по биоэтике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ, протокол экспериментов на животных соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований (протокол № 98122015). Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, в брюшную полость заливали ледяной изотонический раствор хлорида натрия 0,9 % (ФР, ООО «Завод Медсинтез»), выделяли суспензию клеток, которую культивировали 2 ч в пластиковых чашках Петри ( $2-2,5 \times 10^6$  клеток/мл) в полной культуральной среде (RPMI 1640 («Sigma», США), 10% ЭТС («HyClone», Великобритания), 20 мМ HEPES («Sigma», США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma», США), 2 мМ L-глутамина («Sigma», США)) в атмосфере 100% влажности и 5% CO<sub>2</sub>. Затем собирали прилипшие к пластику макрофаги, которые культивировали ( $3,0 \times 10^6$  клеток/мл) в плоскодонных 96-луночных планшетах в присутствии исследуемых веществ, 1 мкг/мл липополисахарида (ЛПС, серотип O111:B4, «Sigma», США) или 30 мкг/мл мурамилдипептида (МДП, N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин, «Calbiochem», США) в качестве референтного вещества. Через 48 ч отделяли супернатанты клеток, смешивали их с эквивалентным объёмом реактива Грейса и измеряли экстинкцию раствора на автоматическом анализаторе ChemWell®Combo (Awareness Technology, Inc., США) при длине волны 545

нм [117]. Концентрацию нитритов определяли по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов нитрита натрия и выражали в мкМ. Для оценки пролиферации клеток колориметрическим методом [137] за 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили раствор МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид) («Sigma»), в конечной концентрации 200 мкг/мл. Надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли диметилсульфоксидом («Sigma»), оптическую плотность полученных растворов измеряли на автоматическом анализаторе при длине волны 545 нм [68,115].

### **2.7. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС1.1.0013.15 (Государственная фармакопея 14 издания) [25]. Для расчета использовали программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни. При проявлении эффекта с уровнем значимости  $p < 0,05$  результаты эксперимента считали достоверными.



### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ *S. CONTROVERSA* DC.

#### 3.1. Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ

##### Сесквитерпеновые лактоны

В ИК спектре хлороформного извлечения листьев *S. controversa* обнаружена полоса поглощения  $1739\text{ см}^{-1}$ , характерная для лактонного карбонила (рисунок 5), что свидетельствует о присутствии в сырье сесквитерпеновых лактонов.

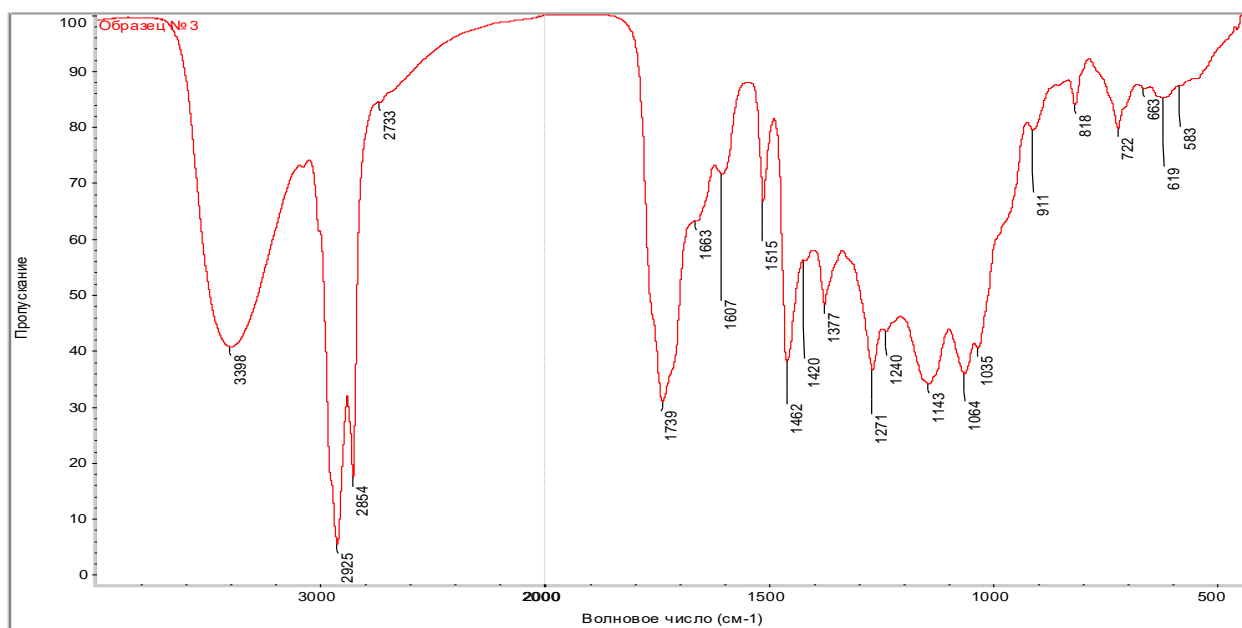


Рисунок 5 – ИК-спектр хлороформного извлечения листьев *S. controversa*

##### Сапонины

При проведении пробы на пенообразование наблюдали образование устойчивой пены в течение 15 мин. В пробе Фонтан-Канделла наблюдали устойчивую пену одинаковую по высоте, как в кислой, так и в щелочной среде. При добавлении раствора свинца ацетата выпадал осадок кремового цвета. Таким образом, в сырье *S. controversa* содержатся сапонины тритерпенового ряда.

##### Дубильные вещества

При действии раствора желатина на водное извлечение *S. controversa* DC. наблюдали появление опалесценции. При проведении реакции по Стиасни происходило выпадение осадка кирпично-красного цвета, а при добавлении ЖАК к раствору после отделения осадка – появление фиолетовой окраски. Из полученных данных следует, что в сырье присутствуют дубильные вещества смешанной группы (конденсируемые и гидролизуемые танины).

### **Кумарины**

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

### **Флавоноиды**

При выполнении пробы Синода наблюдали появление малинового окрашивания, после прибавления октанола – розовое окрашивание органического (агликоны флавоноидов) и водного слоя (гликозиды флавоноидов). Реакция с раствором  $AlCl_3$  привела к образованию светло-желтого раствора. При прибавлении реактива Вильсона к исследуемому раствору наблюдали появление ярко-желтого окрашивания. Количественное содержание флавоноидов в пересчете на рутин составило  $1,51 \pm 0,67$  %.

### **Фенолкарбоновые кислоты**

Методом БХ выявили наличие фенолкарбоновых кислот в спиртовом извлечении. Содержание фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, определенное спектрофотометрически, составило  $4,46\% \pm 0,76\%$  в пересчете на воздушно-сухое сырье.

### **Алкалоиды**

В кислом извлечении из листьев *S. controversa* DC. с реактивами Бушарда, Драгендорфа, Несслера и Зонненштейна наблюдались слабо

выраженные положительные реакции в извлечении А, что может указывать на содержание в растении алкалоидов в следовых количествах.

### Полисахариды

При воздействии 4-х кратного объема этанола 95 % на водное извлечение *S. controversa* DC. наблюдали появление белого хлопьевидного осадка, что свидетельствует о присутствии полисахаридов в растительном сырье. После нагревания извлечения с антронсерным реактивом наблюдали бирюзовое окрашивание. Учитывая, что большинство ПС обладают противовоспалительной и иммуностропной активностью [29,34,35,158], они были подробно исследованы.

## 3.2. Выделение и характеристика полисахаридов

### 3.2.1. Выделение полисахаридных фракций

По разработанной технологической схеме (рег. № 2018146344 от 24.12.2018) (рисунок 6) были получены три полисахаридные фракции: ФПС<sub>1</sub> - экстрагируемая водой очищенной при t=25°C; ФПС<sub>2</sub> - экстрагируемая водой очищенной при t=70°C и ФПВ - пектиновые вещества, экстрагируемые 0,7 % водным раствором оксалата аммония (таблица 5).

Таблица 5 – Внешний вид и технологический выход полисахаридных фракций *S. controversa* DC., n=3, X±x,

Полисахаридные фракции	Внешний вид	Выход, % в пересчете на абсолютно сухое сырье
ФПС <sub>1</sub>	Коричневато-белый хлопьевидный порошок	1,93 ± 0,35
ФПС <sub>2</sub>	Бурый хлопьевидный порошок	0,74 ± 0,16
ФПВ	Белая пористая масса	10,52 ± 1,58

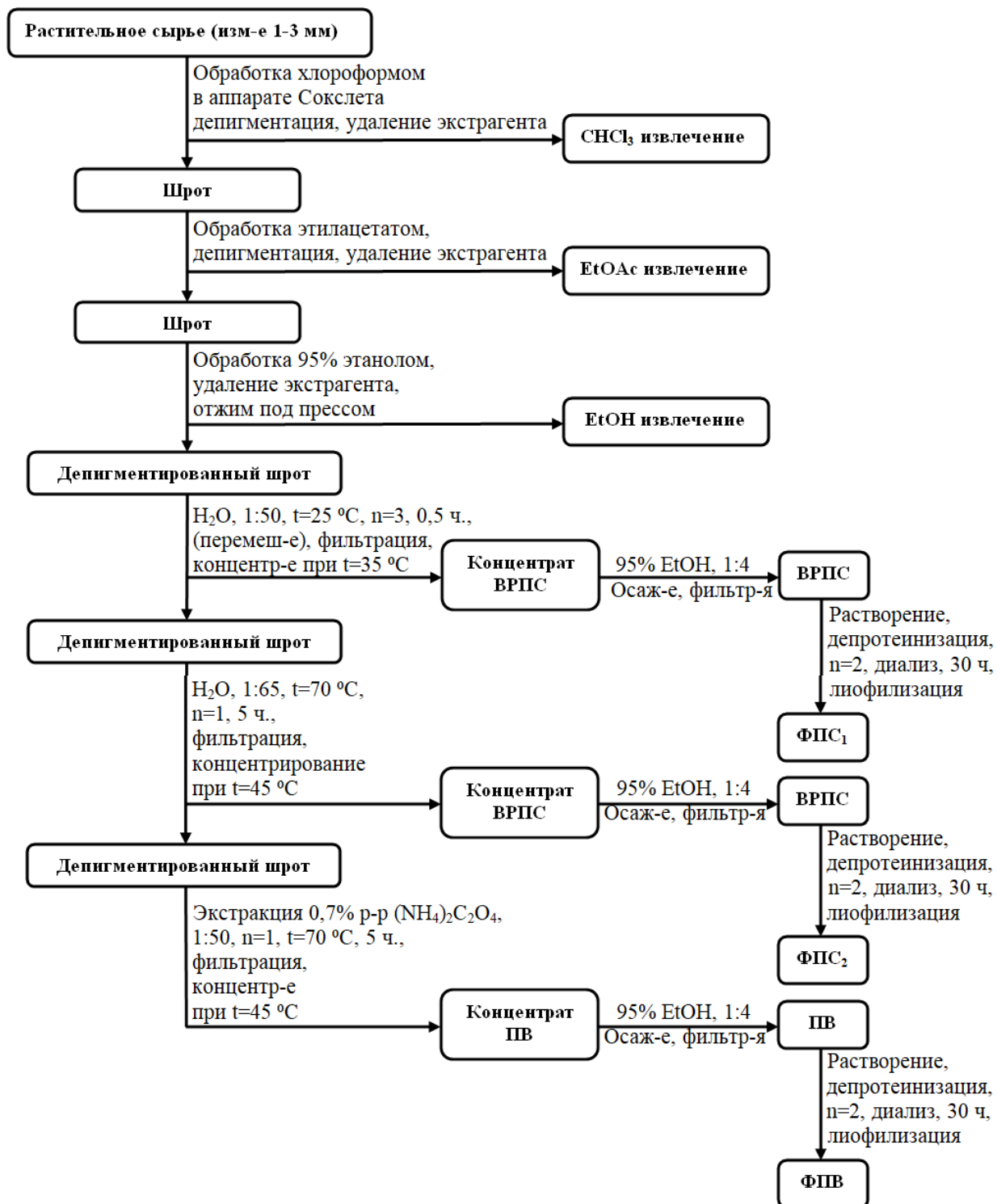


Рисунок 6 – Схема выделения фракций ПС из водного извлечения *S.controversa* DC.

### 3.2.2.Определение молекулярно-массового распределения

В результате эксклюзионной хроматографии установлена высокая степень гетерогенности полученных фракций (таблица 6).

Таблица 6 – Показатели молекулярных масс фракций ПС *S. controversa* DC.

Полисахаридные фракции	Показатели молекулярных масс		
	Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/ Mn
ФПС <sub>1</sub>	448,1	13,2	33,9
ФПС <sub>2</sub>	101,82	10,27	9,9
ФПВ	1430,8	91,9	15,6

Примечание: Mw- средневесовая молекулярная масса

Mn- среднечисленная молекулярная масса

Необходимо отметить высокие значения молекулярных масс у ФПС<sub>1</sub> и ФПВ, так как по данным литературы полисахариды с высокой молекулярной массой могут являться носителями иммуотропной активности [155,159].

### 3.2.3. Определение содержания белка в полисахаридах

Для определения белка использовали калибровочный график, построенный по стандартным растворам сывороточного альбумина (рисунок 7, А). Содержание белка в полученных фракциях ПС существенно различалось. Так, в ФПС<sub>1</sub> полученных экстракцией холодной водой и депротеинизированных по методу Севага белок не обнаружен. В ФПС<sub>2</sub>, несмотря на многократную депротеинизацию, обнаружено значительное количества остаточного белка -  $26,22 \pm 0,68\%$ , а в ФПВ содержание остаточного белка составило  $2,51 \pm 0,14\%$ .

### 3.2.4. Определение уроновых кислот и моносахаридного состава

Для определения уроновых кислот использовали калибровочный график, построенный по стандартным растворам галактурановой кислоты (рисунок 7 Б). При определении уроновых кислот установлено различие в их содержании во всех фракциях ПС. Так, в ФПС<sub>1</sub> их количество составило

59,54±0,35%, в ФПС<sub>2</sub>– 64,20±0,59 соответственно. В ФПВ обнаружено 94,73±0,26% УК, что свидетельствует о преобладании галактуроновой кислоты в составе пектиновых веществ.

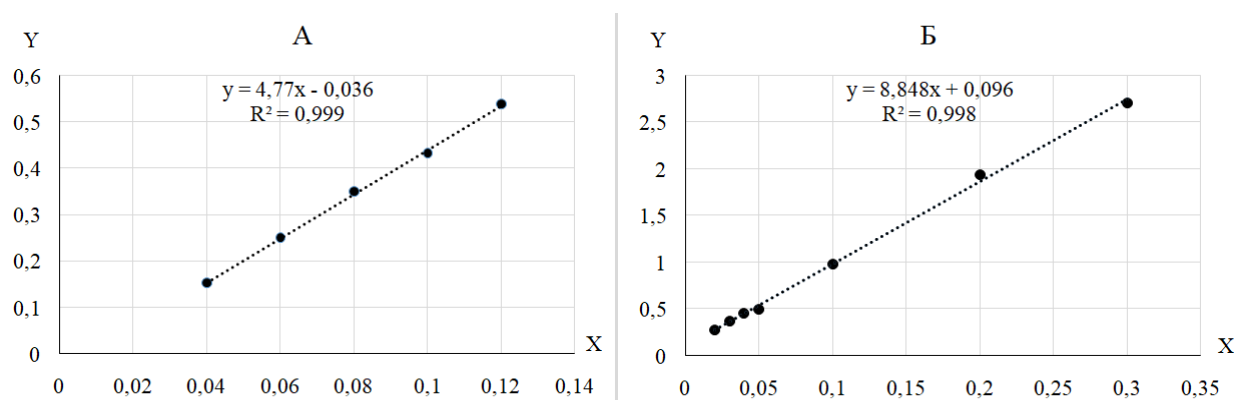


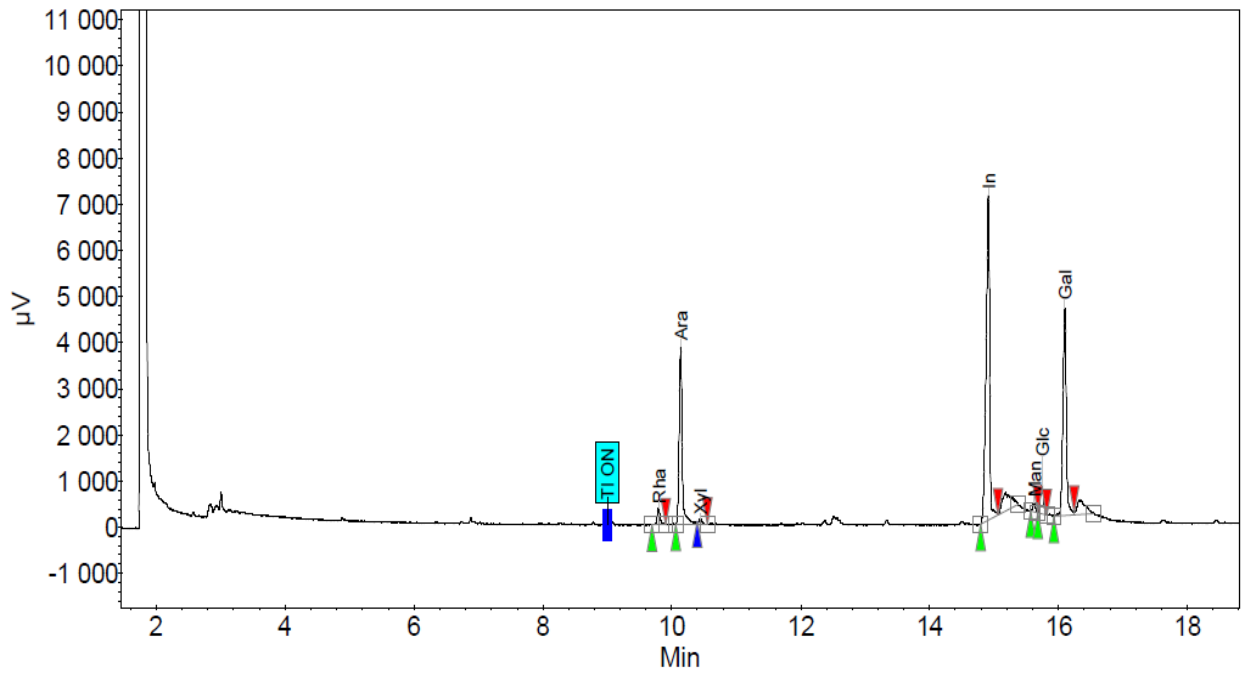
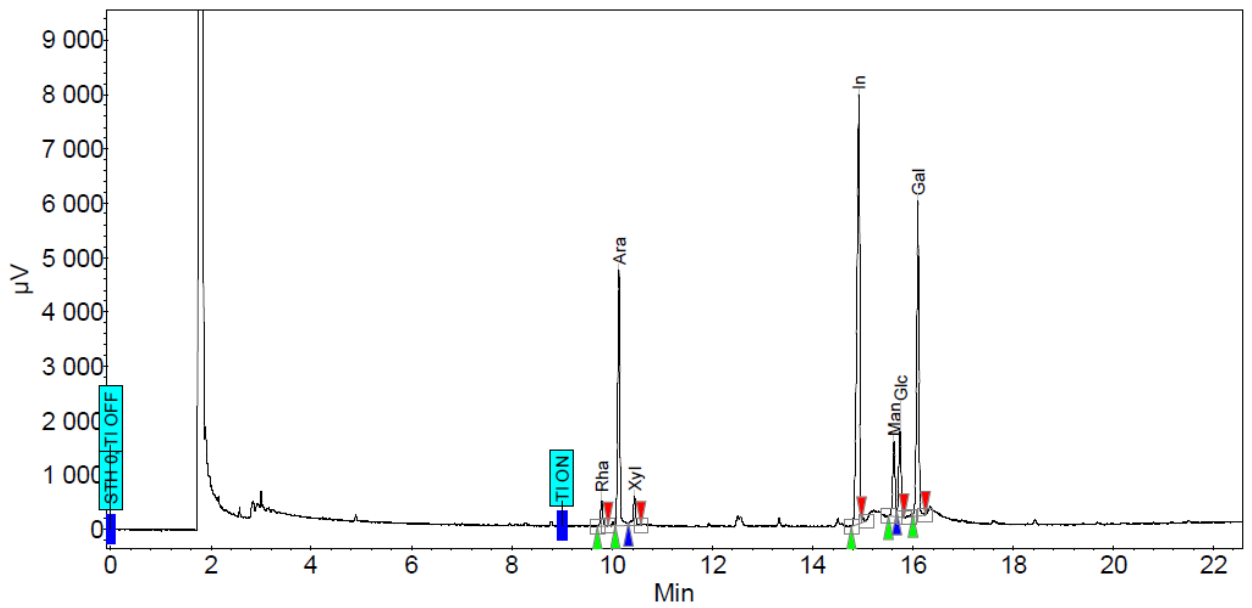
Рисунок 7 – Калибровочные графики: А – по сывороточному альбумину для определения белка; Б – по галактуроновой кислоте для определения уроновых кислот

Результаты ГЖХ ацетатов полиолов фракций ПС представлены в таблице 7, хроматограммы – на рисунках 8-10. Из результатов анализа моносахаридного состава фракций ПС и уроновых кислот следует, что последние являются доминирующими компонентами фракций ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и в большей степени ФПВ. В качестве мажорных моноз выступают галактоза и арабиноза, а остатки рамнозы, ксилозы, маннозы и глюкозы являются минорными компонентами. При этом манноза в ФПВ отсутствует.

Таблица 7 – Результаты ГЖХ моносахаридного состава фракций ПС *S. controversa* DC.

Фракции ПС	Содержание нейтральных полисахаридов, %					
	Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
ФПС <sub>1</sub>	1,65	12,47	2,32	0,67	1,74	21,60
ФПС <sub>2</sub>	0,28	1,87	0,74	1,67	0,83	4,18
ФПВ	0,42	1,87	0,05	-	0,12	0,86

Примечание: «-» моносахарид отсутствует в составе фракции ПС

Рисунок 8 – Хроматограмма ацетатов полиолов ФПС<sub>1</sub>Рисунок 9 – Хроматограмма ацетатов полиолов ФПС<sub>2</sub>

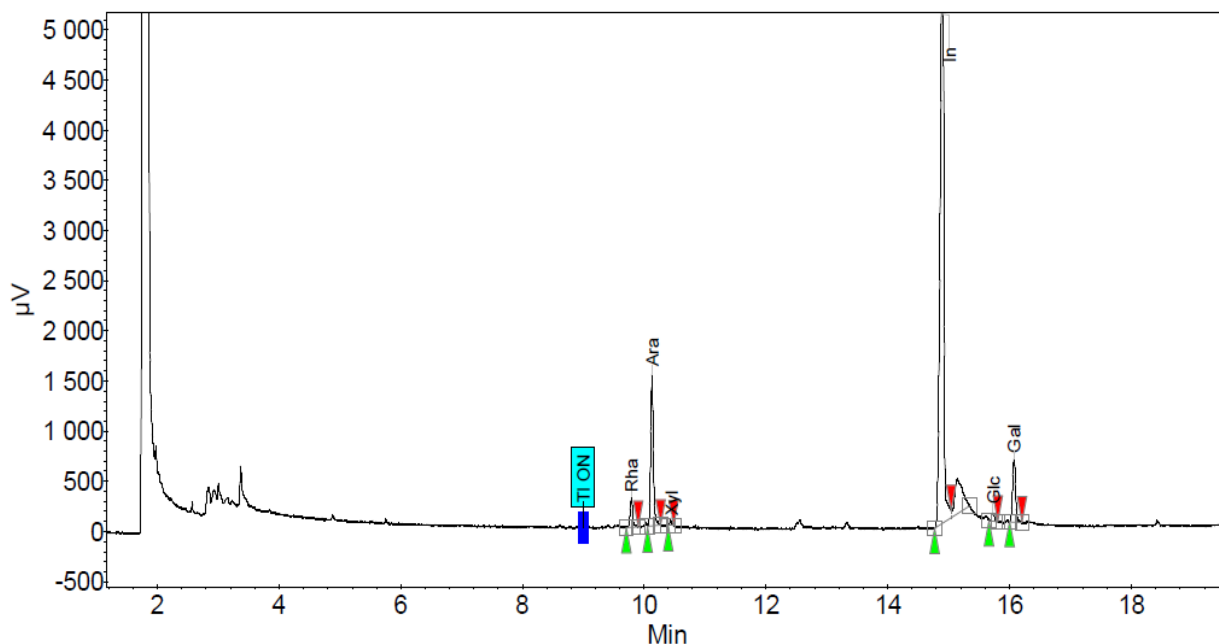


Рисунок 10 – Хроматограмма ацетатов полиолов ФПВ

### 3.3. Получение, фракционирование и установление компонентного состава экстракта листьев *S. controversa* DC. на 40% этаноле

#### 3.3.1. Получение и фракционирование экстракта

100,0 г воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц 3-6 мм, помещали в коническую колбу со шлифом, заливали 40% этанолом, гидромодуль 1:10. Колбу устанавливали на водяную баню, присоединяли обратный холодильник и проводили трехкратную экстракцию при температуре 80°C в течение 0,5 ч каждую. Извлечения фильтровали через 4 слоя марли и бумажный фильтр. Фильтраты объединяли и концентрировали под вакуумом на роторном испарителе до густого остатка при температуре не выше 45°C. Сгущенный остаток высушивали под термовентилятором при температуре 35°C. Сухой экстракт растворяли в воде очищенной в соотношении 1:5, выпавший осадок (ОЭ) отделяли на воронке Бюхнера и промывали водой очищенной. Водный концентрат - фильтрат без осадка, помещали в делительную воронку и последовательно проводили экстракцию в соотношении 1:2, при кратности  $n=3$ , рядом растворителей с возрастающей полярностью: хлороформ – этилацетат – н-бутанол. Растворители удаляли



под вакуумом, густые остатки высушивали. Таким образом, получены хлороформная (ХЛФ), этилацетатная (ЭАФ), бутанольная (БФ) фракции и водный остаток (ВО) после экстракции органическими растворителями.

Схема получения и фракционирования водно-спиртового экстракта представлена на рисунке 11.

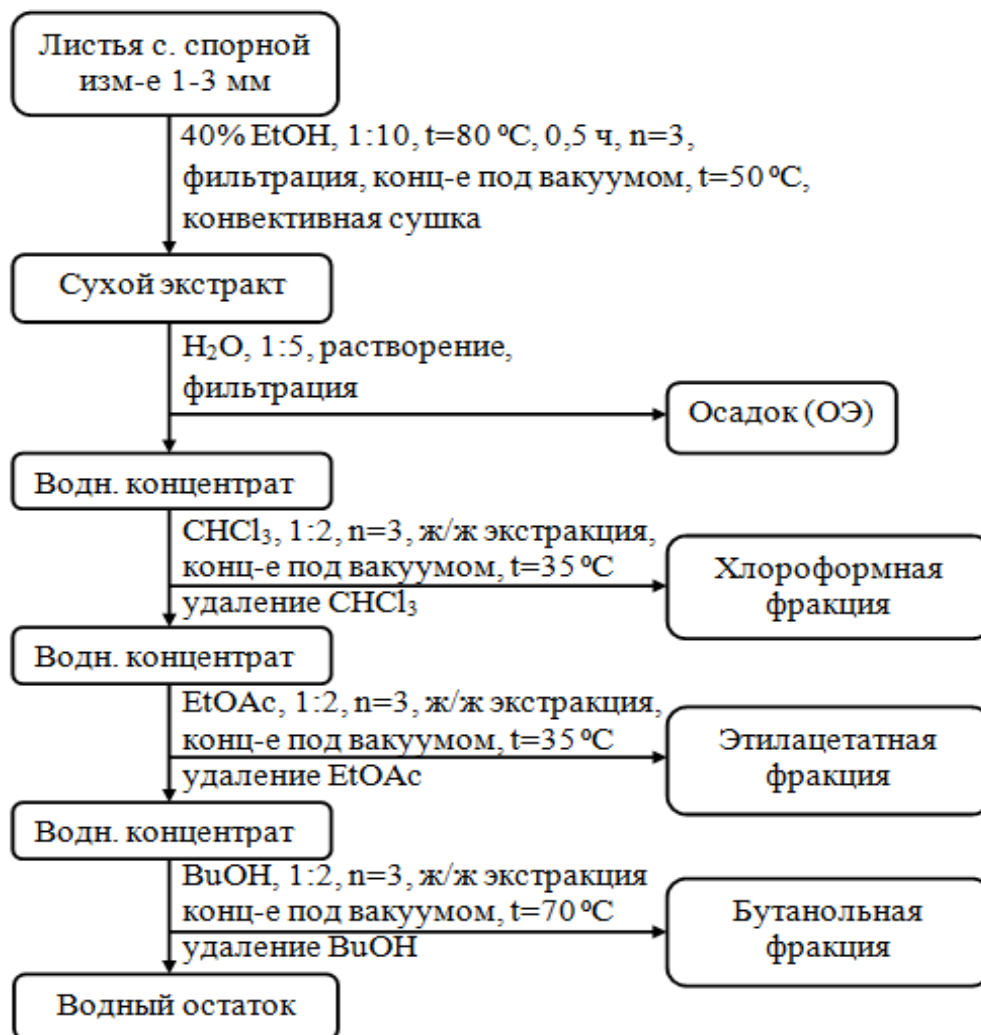


Рисунок 11– Схема получения и разделения экстракта *S. controversa* DC. на 40% этаноле

Выход экстракта составил  $39,4\% \pm 0,3\%$ . Выходы фракций после обработки экстракта органическими растворителями согласно схеме (рисунок 11), представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Описание и технологические выходы фракций экстракта  
*S. controversa* DC.

Фракция	Выход (%), в пересчете на абс. сух. экстракт, n=3, $X \pm x$ ,	Внешний вид
ОЭ	$2,30 \pm 0,24$	Аморфный, сыпучий желтовато-белый порошок
ХЛФ	$1,36 \pm 0,11$	Темно-зеленая вязкая масса
ЭАФ	$3,20 \pm 0,35$	Светло-зеленая вязкая масса
БФ	$8,50 \pm 1,02$	Коричнево-желтый порошок
ВО	$86,94 \pm 3,17$	Коричневый аморфный гигроскопичный порошок

Как видно из таблицы 8, большинство БАВ экстракта на 40% этаноле имеют гидрофильную природу. Все полученные фракции были подвергнуты кислотному гидролизу. Агликоны из гидролизата извлекали хлороформом и этилацетатом. Состав гидролизированных и нативных фракций исследовали хроматографическими методами.

### 3.3.2. Хроматографический анализ экстракта и фракций

В ходе хроматографического анализа (ТСХ) кумаринов как в нативных ХЛФ, ЭАФ, так и липофильной части гидролизата ЭАФ обнаружены два соединения с голубой и желтой зонами адсорбции в УФ свете. Подвижность фракций ( $R_f$ ) указана в таблице 9. Вещества идентифицировали с РСО умбеллиферона и эскулетина.

Примечательно, что в гидролизате ЭАФ также обнаружены эскулетин и умбеллиферон, что может свидетельствовать о нахождении данных соединений в нативной ЭАФ в виде гликозидов.

Таблица 9 – Результаты идентификации кумаринов во фракциях  
*S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей (ТСХ)			Идентифицированный компонент
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :EtOAc (70:30)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (50:50)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (33:65:2)	
ХЛФ	0,74	0,62	0,38	Умбеллиферон
	-	-	-	Эскулетин
гидролизат ХЛФ	-	-	-	Умбеллиферон
	-	-	-	Эскулетин
ЭАФ	-	-	-	Умбеллиферон
	0,64	0,53	0,44	Эскулетин
гидролизат ЭАФ	0,74	0,62	0,38	Умбеллиферон
	0,64	0,53	0,44	Эскулетин

При исследовании хроматограмм ХЛФ, гидролизатов БФ и ВО на присутствие тритерпеновых сапонинов, после обработки кремневольфрамовой кислотой, выявлены два вещества с серо-синей окраской в видимом свете, подвижность фракций представлена в таблице 10. В сравнении с РСО в ХЛФ идентифицирована олеаноловая кислота, а в гидролизатах БФ и ВО – урсоловая кислота, что свидетельствует о ее нахождении в последних в форме гликозидов.

Таблица 10 – Результаты идентификации тритерпеновых сапонинов во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей (ТСХ)			Идентифицированный компонент
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (19:80:1)	CHCl <sub>3</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (70:30)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (94:5,5:0,5)	
ХЛФ фракция	0,23	0,33	0,49	Олеаноловая кислота
БФ гидролизат	0,19	0,37	0,40	Урсоловая кислота
ВО гидролизат	0,19	0,37	0,40	Урсоловая кислота

При хроматографическом анализе флавоноидов в ЭАФ, БФ, ВО и в их гидролизатах выявлены три вещества флавоноидной природы с зонами желто-зеленой флуоресценции в УФ-свете при 254 нм после обработки 5% раствором  $AlCl_3$ . Вещества идентифицированы в сравнении с РСО, как кверцетин, кемпферол и рутин (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты идентификации флавоноидов во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей			Идентифицированный компонент
	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (85:15) (БХ)	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (40:60) (БХ)	н-BuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O (40:10:50) (ТСХ)	
ЭАФ	0,05	0,37	0,55	Кверцетин
БФ гидролизат	0,07	0,53	0,82	Кемпферол
ВО	0,53	0,72	0,42	Рутин

Фенолкарбоновые кислоты определяли в ЭАФ, БФ и ВО. На хроматограммах наблюдали 5 голубых и фиолетовых зон адсорбции в УФ-свете. Вещества идентифицированы в сравнении с РСО, как коричневая, кофейная, хлорогеновая, галловая и хинная кислоты (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты идентификации фенолкарбоновых кислот во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей			Идентифицированный компонент
	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (95:5) (БХ)	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (85:15) (БХ)	EtOAc:H <sub>2</sub> O:HCOOH (65:20:15) (ТСХ)	
ЭАФ	0,65	0,75	0,73	Кофейная кислота
	0,81	0,71	0,42	Галловая кислота
БФ	0,65	0,75	0,73	Кофейная кислота
	0,81	0,71	0,42	Галловая кислота

	0,73	0,47	0,61	Хлорогеновая кислота
	0,22	0,35	0,87	Коричная кислота
ВО	0,73	0,47	0,61	Хлорогеновая кислота
	0,92	0,85	0,33	Хинная кислота

В ходе исследования ВО на содержание аминокислот обнаружено 5 зон адсорбции с различной окраской после обработки раствором нингидрина. Вещества идентифицированы в сравнении с стандартными образцами, как валин, аргинин, треонин, лизин и глицин (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты идентификации аминокислот во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей (БХ)		Идентифицируемый компонент
	н-BuOH: CH <sub>3</sub> COOH : H <sub>2</sub> O (40:10:50)	н-BuOH: C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N: H <sub>2</sub> O (6:4:3)	
ВО	0,53	0,35	Валин
	0,11	0,18	Аргинин
	0,27	0,37	Треонин
	0,15	0,19	Лизин
	0,20	0,30	Глицин

Хроматографическому анализу (БХ и ТСХ) на присутствие свободных и связанных углеводов подвергли нативный ВО и водную часть гидролизатов ЭАФ, БФ и ВО. Выявлено 4 соединения углеводной природы. Данные вещества в сравнении с РСО идентифицированы как D-ксилоза, D-глюкоза, L-арабиноза и L-рамноза. В гидролизате ЭАФ обнаружена L-рамноза, что свидетельствует о наличии в нативной фракции гликозида с данным углеводным компонентом. В гидролизате БФ выявлены L-рамноза, D-ксилоза, D-глюкоза, что также указывает на их гликозидную структуру в нативной фракции. В ВО обнаружена свободная D-ксилоза. В гидролизате ВО, помимо D-ксилозы, обнаружены D-глюкоза, L-арабиноза и L-рамноза,

что указывает на возможное присутствие полисахаридного комплекса в нативном водном остатке (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты идентификации углеводов во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей		Идентифицированный компонент
	н-BuOH:C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N: H <sub>2</sub> O (6:4:3) (БХ)	EtOAc:HCOOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O (60:15:15:10) (ТСХ)	
ВО	0,49	0,57	L-рамноза
ЭА гидролизат (водн. ч.)	0,49	0,57	L-рамноза
БФ гидролизат (водн. ч.)	0,49	0,57	L-рамноза
	0,45	0,23	D-ксилоза
	0,36	0,43	D-глюкоза
ВО гидролизат (водн.ч)	0,42	0,52	L-арабиноза
	0,49	0,57	L-рамноза
	0,45	0,23	D-ксилоза
	0,36	0,43	D-глюкоза

В результате ВЭЖХ анализа в экстракте на 40% этаноле обнаружено 37 соединений, 6 из которых являются мажорными компонентами (рисунок 12).

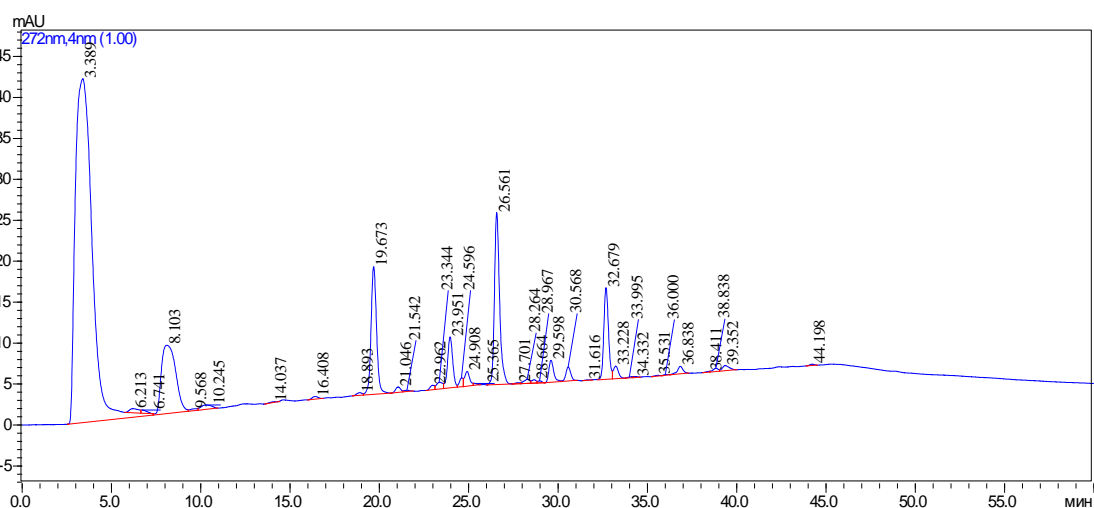


Рисунок 12 – ВЭЖХ водно-спиртового экстракта *S. controversa* DC.

Времена удерживания, максимумы поглощения веществ, их площадь и содержание (%), представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Хроматографические характеристики мажорных компонентов водно-спиртового экстракта

№ п/п	Время удерживания, мин.	Максимум поглощения, нм	Площадь пика, ЕОП×мин.	Содержание, %
1	3,389	200/271/655/678/492	2748435	58,94
2	8,103	326/218/235/655/405	463184	9,93
3	19,673	253/225/354/664	334399	7,17
4	23,951	237/199/329/655	123372	2,64
5	26,561	330/221/238/655	420548	9,02
6	32,679	238/330/678	203681	4,37

ВЭЖХ анализ ЭАФ показал присутствие 20 соединений (рисунок 13), из которых три со временами удерживания 13,394; 33,928 и 39,766 мин., идентифицированы как кофейная, салициловая кислоты и кверцетин соответственно.

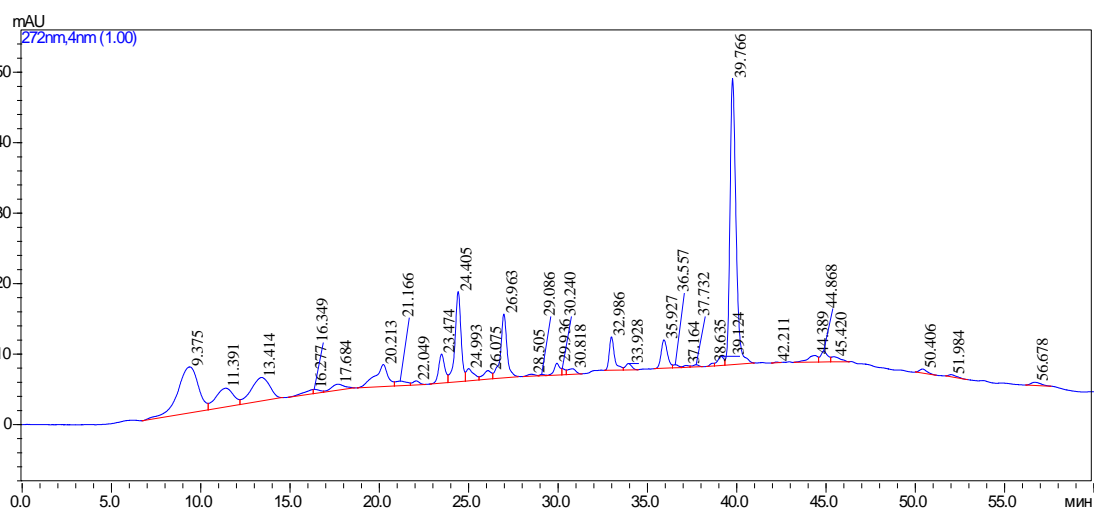


Рисунок 13 – ВЭЖХ ЭАФ экстракта *S. controversa* DC.

В результате исследования БФ обнаружено присутствие 31 соединения (рисунок 14).

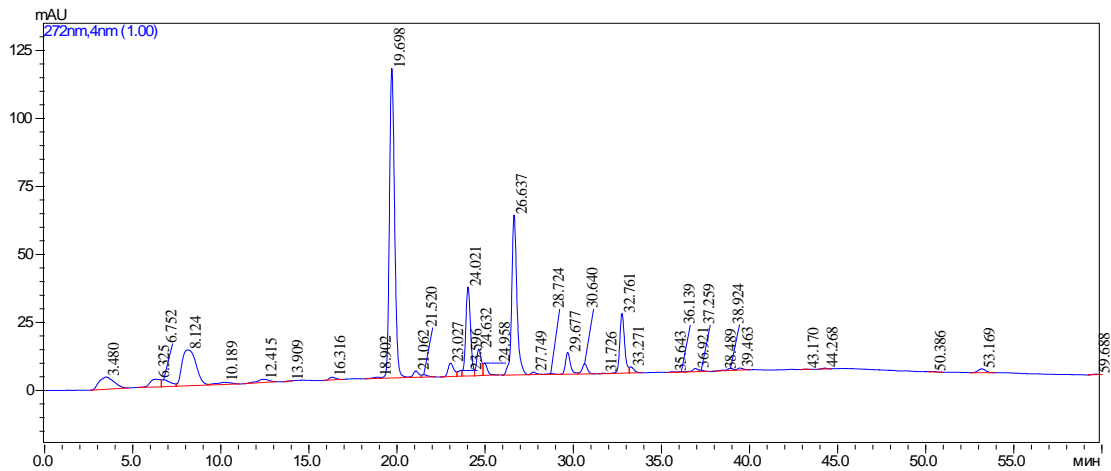


Рисунок 14 – ВЭЖХ БФ экстракта *S. controversa* DC.

Из них 3 вещества со временами удерживания 6,839; 8,133 и 21,061 мин идентифицированы как сирингин, хлорогеновая кислота и дигидрокверцетин соответственно. Их содержание во фракции составило 0,15; 8,82 и 0,67%. Кроме того, на хроматограмме присутствуют два мажорных (38,4% и 19,8%) пика неидентифицированных соединений с временами удерживания 19,697 и 26,637 минут соответственно [5].

ВЭЖХ анализ водного остатка показал присутствие 30 соединений (рисунок 15).

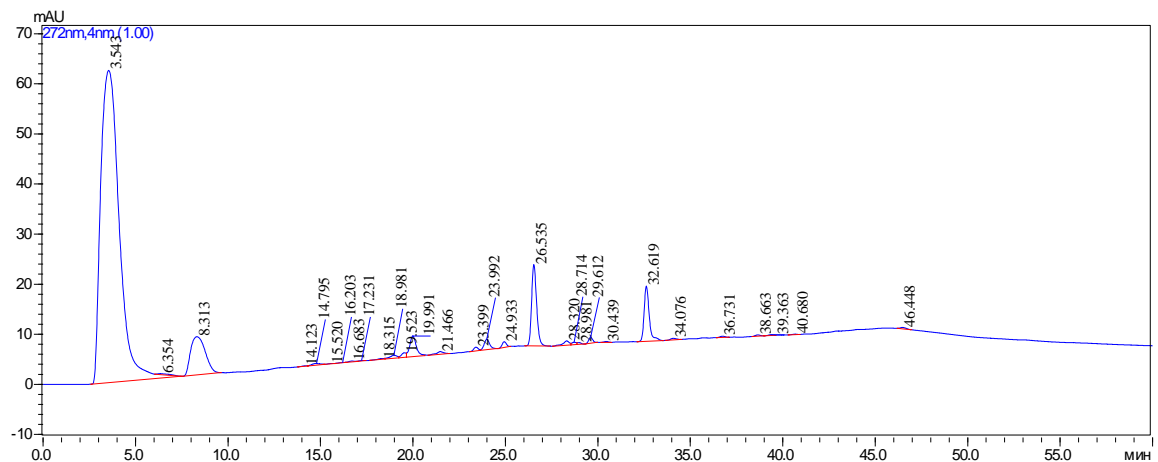


Рисунок 15 – ВЭЖХ ВО экстракта *S. controversa* DC.



Два вещества со временами удерживания 6,354 и 8,313 мин идентифицированы со стандартными образцами сирингина и хлорогеновой кислоты соответственно. Их количественное содержание в ВО составило 0,19% и 7,47% соответственно. Отмечено, что мажорный компонент со временем удерживания 3,543 мин. обнаруженный нами ранее в исходном экстракте (3,389 мин.), практически полностью переходит в водный остаток после экстракции органическими растворителями.

Таким образом, в ходе проведенного ВЭЖХ анализа установлено, что два мажорных компонента экстракта в ходе жидкость-жидкостной экстракции концентрируются в бутанольной фракции и имеют по УФ-спектральным характеристикам флавоноидную природу. В водном остатке после экстракции органическими растворителями присутствует неидентифицированный макрокомпонент (58,94%).

В связи с высоким технологическим выходом (таблица 12) и многокомпонентным составом БФ и ВО являются перспективными для последующего углубленного химического анализа с выделением индивидуальных веществ и установлением их структуры.

### **3.3.3. Исследование бутанольной фракции экстракта**

Бутанольную фракцию (БФ) полученную из этанольного экстракта упаривали под вакуумом при температуре 35°C, до полного удаления бутанола, остаток отстаивали 6 ч, получая при этом гетерогенную смесь состоящую из осадка (ОБФ) и надосадочной жидкости. Осадок переносили на стеклянный фильтр и высушивали(ОБФ). Затем проводили разделение ОБФ методом колоночной хроматографии [90]. Для этого стеклянную колонку с диаметром 2,5 см заполняли силикагелем с размером частиц 100/250 мкм, высота слоя сорбента 70 см. 1,5 г ОБФ вносили в колонку, элюирование осуществляли смесью этилацетат – этанол с увеличением концентрации последнего от 5 до 80%. В результате были выделены три

соединения. Вещества перекристаллизовывали из смеси метанол-хлороформ в различных соотношениях.

Вещество БФ-1 – светло-желтый аморфный порошок (0,080 г), т. пл. 188-190 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 290, 355.  $[\alpha]_D^{25} + 48^\circ$  (с 0,28, EtOH).

Вещество БФ-2 – светло-желтый аморфный порошок (0,468 г), т. пл. 175-176 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 292, 357.  $[\alpha]_D^{25} + 66^\circ$  (с 0,42, EtOH).

Элементный анализ: С - 50,66; Н - 5,05; О - 44,29. Рассчитанная молекулярная масса для  $C_{33}H_{40}O_{18}$  составила 724 г/моль.

Вещество БФ-3 – светло-желтый аморфный порошок (0,570 г), т. пл. 181-182 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 257, 360.

Гидролиз веществ (1%  $H_2SO_4$ ), с последующей с идентификаций ТСХ, показал присутствие кверцетина, глюкозы и рамнозы.

Характеристики химических сдвигов в спектрах ЯМР  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 600 МГц) и ЯМР  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 150 МГц) представлены в таблицах 16 и 17.

Таблица 16 – ЯМР  $^1\text{H}$  веществ, выделенных из БФ *S. controversa* DC. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц)

Атом	Химические сдвиги (м.д.)		
	БФ-1	БФ-2	БФ-3
6	6,26 (1H, д. 2,0)	6,24 (1H, д. 2,0)	6,24 (1H, д. 2,0)
7	-	-	-
8	6,43 (1H, д. 2,0)	6,43 (1H, д. 2,0)	6,43 (1H, д. 2,0)
2'	7,71 (1H, д. 2,0)	7,70 (1H, д. 2,0)	7,70 (1H, д. 2,0)
5'	6,91 (1H, д. 8,0)	6,91 (1H, д. 8,0)	6,91 (1H, д. 8,0)
6'	7,66 (1H, д.д. 8,0; 2,0)	7,66 (1H, д.д. 8,0; 2,0)	7,66 (1H, д.д. 8,0; 2,0)
5-ОН	12,30	12,35	12,35
7-ОН	-	7,87	7,95
3'-ОН	8,08	8,08	8,08
4'-ОН	8,11	8,20	8,15
1''' (1''')	5,00 (1H, д. 7,5)	5,15 (1H, д. 8,0)	5,14 (1H, д. 7,0)
2''' (2''')	3,56 (1H)	3,25-3,52 (8H, м.)	3,25-3,52 (4H, м.)
3''' (3''')	3,32 (1H)		
4''' (4''')	3,48 (1H)		
5''' (5''')	3,40 (1H)		
6''' (6''')	3,60 (1H, д.д. 10,0; 2,0); 3,81 (1H, д. 10,0)	3,57 (2H, д.д. 9,5; 2,0); 3,83 (2H, д. 10,0)	3,57 (1H, д.д. 9,5; 2,0); 3,84 (1H, д. 10,0)
1''	4,55 (1H, с.)	4,55 (1H, с.)	4,55 (1H, с.)
2''	3,12 (1H)	3,23-3,52 (4H, м.)	3,25-3,54 (4H, м.)
3''	3,28 (1H)		
4''	3,48 (1H)		
5''	3,30 (1H)		
6''	1,17 (3H, д. 6,0)		

Таблица 17 – ЯМР  $^{13}\text{C}$  веществ, выделенных из БФ *S. controversa* DC.  
( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 МГц)

Атом	Химические сдвиги (м.д.)		
	БФ-1	БФ-2	БФ-3
2	158,16	158,51	158,52
3	135,54	135,62	135,62
4	179,08	179,41	179,43
5	162,51	162,99	163,00
6	99,84	99,94	99,95
7	165,65	166,03	166,05
8	94,81	94,83	94,86
9	159,17	159,33	159,34
10	105,40	105,62	105,63
1'	122,74	123,10	123,12
2'	117,50	117,67	117,68
3'	145,36	145,84	145,85
4'	149,41	149,81	149,81
5'	115,91	116,03	116,05
6'	123,39	123,54	123,55
1 <sup>'''</sup> (1''')	105,80	104,74; 104,67	104,71
2 <sup>'''</sup> (2''')	75,25	75,71	75,72
3 <sup>'''</sup> (3''')	76,74	77,20	77,22
4 <sup>'''</sup> (4''')	71,66	72,11	72,10
5 <sup>'''</sup> (5''')	77,87	78,16	78,18
6 <sup>'''</sup> (6''')	68,20	68,55; 68,51	68,55
1''	102,50	102,41	102,42
2''	71,91	72,21	72,23
3''	69,28	69,70	69,71
4''	70,81	71,37	71,39
5''	73,67	73,91	73,93
6''	17,75	17,89	17,88

При соотнесении данных спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  (таблица 17) с литературными данными установлено, что агликоном всех трех веществ является кверцетин. ЯМР  $^1\text{H}$  и ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектры содержат сигналы характерные для глюкозы и рамнозы.

Химические сдвиги в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  вещества БФ-1 при  $\delta$  68,20 м.д., а также дублет, характерный для аномерного протона глюкозы в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  при  $\delta$  5,00 м.д. ( $J = 7,5$  Гц) и синглет при  $\delta$  4,55 м.д. относящийся к рамнозе указывают на терминальное положение этих сахаров. Кроме того в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  вещества БФ-1 имеется сигнал при  $\delta$  12,30 м.д. характерный для свободной 5-ОН группы, и отсутствует характеристический сигнал для свободной 7-ой группы. При снятии УФ-спектра с добавлением ацетата натрия наблюдали отсутствие батохромного сдвига, однако в спектре с добавлением раствора хлорида циркония наблюдали выраженную батохромию, исчезающую после прибавления лимонной кислоты, что подтверждает присутствие свободной 5-ОН группы и замещение при 3-ОН и 7-ОН группах. Положение сахарных фрагментов, глюкозы при 3-ОН, а рамнозы при 7-ОН установлено на основании ключевых корреляций в спектре  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.

Число протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  вещества БФ-2, а также химические сдвиги на спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  при  $\delta$  104,74, 104,67 и 102,41 м.д., указывают на присутствие двух остатков глюкозы и одного рамнозы.

В соединениях БФ-2 и БФ-3 сигналы при  $\delta$  68,55 м.д., 68,51 м.д. (БФ-2) и  $\delta$  68,55 м.д. (БФ-3) в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах и дублеты аномерных протонов в ПМР при  $\delta$  5,15 м.д. ( $J=8,0$  Гц) и  $\delta$  5,14 м.д. (БФ-2 и БФ-3 соответственно) указывают на положение глюкозы между С-3 агликона и молекулой рамнозы, а синглет рамнозы Н-1 при  $\delta$  4,55 – на терминальную позицию этого сахара. Сигналы в ПМР спектре для 5-ОН  $\delta$  12,35 м.д. (БФ-2 и БФ-3) и 7-ОН  $\delta$  7,87 м.д. (БФ-2),  $\delta$  7,95 м.д. (БФ-3), характеризуют свободное положение этих групп. Данные спектров  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CONX и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COLOC 2D ЯМР соединений

БФ-2 и БФ-3 позволили установить характер гликозидной связи между молекулами глюкозы и рамнозы при 3-ОН: С-6<sup>II</sup> → С-1<sup>III</sup> (БФ-2 и БФ-3) и С-6<sup>III</sup> → С-1<sup>IIII</sup> (БФ-2). β-конфигурация остатков глюкозы и α-конфигурация рамнозы доказана на основании величин соответствующих констант взаимодействия J (таблица 21).

В результате установлены структуры изолированных из БФ соединений.

**БФ-1:** 5,3',4'-тригидроксифлавоон-7-О-α-L-рамнопиранозид-3-О-β-D-глюкопиранозид (кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид);

**БФ-2:** 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоон-3-О-β-D-глюкопиранозид-(1→6)-β-D-глюкопиранозид-(1→6)-О-α-L-рамнопиранозид (кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид);

**БФ-3:** 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоон-3-О-β-D-глюкопиранозид-(1→6)-О-α-L-рамнопиранозид (кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид (рутин)).

Структурные формулы соединений представлены на рисунке 16.

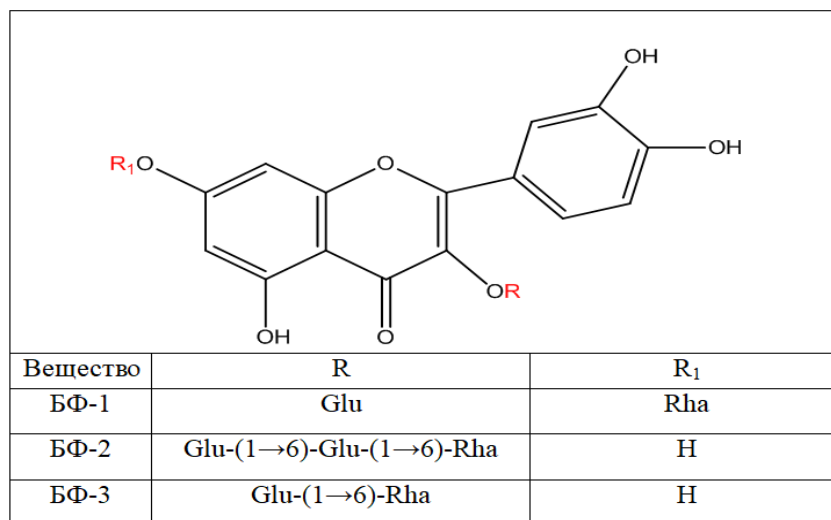


Рисунок 16 – Структурные формулы веществ БФ-1, БФ-2 и БФ-3

### 3.3.4. Исследование водного остатка экстракта

Водный остаток экстракта на 40% этаноле после экстракции органическими растворителями, упаривали под вакуумом и осаждали сумму

полисахаридов 95% этанолом, в объемном соотношении 1:4. Полученную гетерогенную смесь отстаивали в течение 12 ч. Далее осадок отфильтровывали через воронку Бюхнера и промывали этанолом до обесцвечивания фильтрата. Сумму полисахаридов подвергали депротеинизации по методу Севага, диализовали через полупроницаемую мембрану с размером пор 15 кДа и лиофилизировали, получая сумму полисахаридов из спиртового экстракта – ПССЭ. После отделения ПССЭ из водного остатка, к нему прибавляли ацетон в соотношении 1:8 для осаждения низкомолекулярных соединений и оставляли на 24 ч при температуре 18 °С. Выпавший осадок белого цвета переносили на стеклянный фильтр, промывали ацетоном и высушивали (рисунок 17).

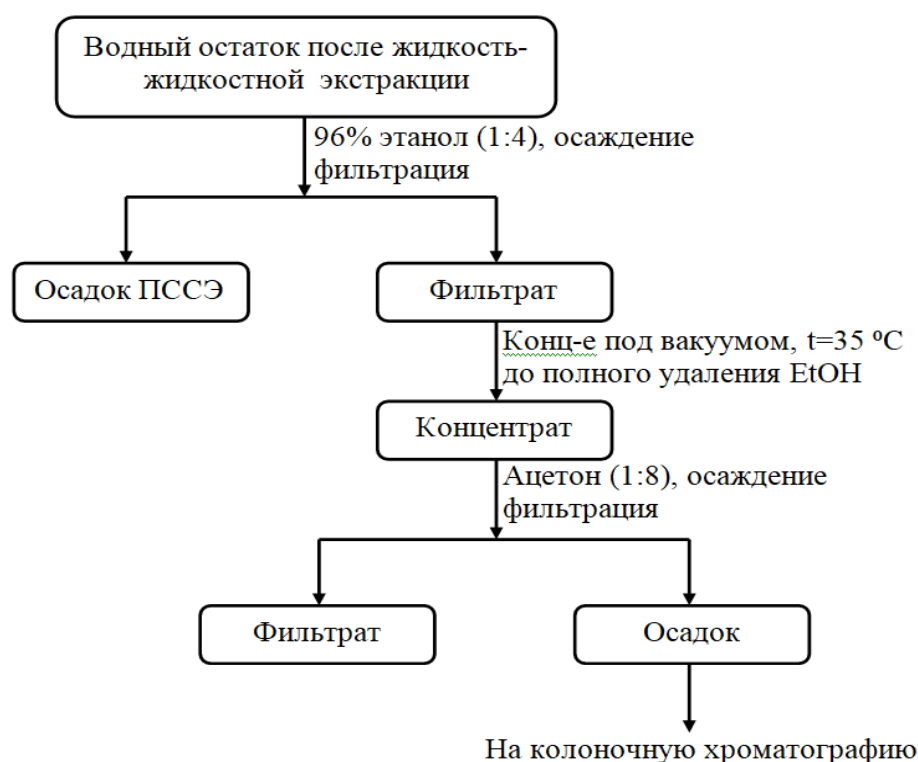


Рисунок 17 – Схема исследования водного остатка экстракта *S. controversa* DC.

0,2 г осадка растворяли в 1 мл воды и наносили на хроматографическую колонку с полиамидом (диаметр 1,2 см, высота слоя сорбента 25 см.), элюируя смесью этанол-вода (5-50%), выделили белое аморфное вещество

(180 мг, 45 мг/г экстракта) [91]. По данным СНН анализа молекулярное содержание углерода составляет 45,65%, водорода – 2,17%, содержание кислорода, вычисленное по разнице составило 52,18%. На спектре ЯМР  $^1\text{H}$  присутствует синглетный сигнал при  $\delta_{\text{H}} = 7,15$  м.д., характерного для протонов ароматической системы. Сигналы в  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектре ( $\delta_{\text{C}}$  180.0 м.д. (C=O); 152.9 м.д., 118.2 м.д. (-C=C-); 160.2 м.д. (-COOH)) характерны для симметричной молекулы. Для определения молекулярного катионного радикала  $m/z$  использовали масс-спектрометрию: 184.0006 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6^+$ ; рассчитано: 184.0002), основные осколочные ионы  $m/z$  139 (-45, ацетил); 69 (-70,  $\gamma$ -пирон).

Таким образом, выделенное вещество имеет следующие физико-химические характеристики: белый аморфный порошок (из  $\text{H}_2\text{O}$ ). Т.пл.  $265^\circ\text{C}$ , УФ спектр (EtOH),  $\lambda$  272 нм; ИК – спектр (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3437 (OH), 3067 ( $\text{CH}_2$ ), 1702 (C=O), 1642 (-C=C-), 1405, 1361(OH), 1123 (C-O), 960, 914, 883, 812, 796, 730, 618, 539, 465; ЯМР  $^1\text{H}$  (600 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  7.02 м.д. (2H, c); ЯМР  $^{13}\text{C}$  (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$  180,0 м.д. (CO), 152,9; 118,2 (C=C), 160,2 (COOH); Масс-спектр  $m/z$ : 184 ( $\text{M}^+$ ), 139, 69; рассчитано для  $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6$  (184,07): C 45,67; H 2,19; найдено: C 45,65; H 2,17. Вещество идентифицировано как 4-оксо-4H-пиран-2,6-дикарбоновая кислота (хелидоновая кислота, рисунок 18)

Рисунок 18 – Структурная формула хелидоновой кислоты



Технологический выход ПССЭ составил  $5,35\% \pm 0,62\%$  (в пересчете на сухой экстракт) и  $6,15\% \pm 0,62$  в пересчете на водный остаток. ПССЭ исследовали на содержание белка и уоновых кислот.

Мономерный состав ПССЭ устанавливали после кислотного гидролиза с внутренним стандартом - миоинозитолом (ТФУ, конц. 2 моль/л). После этого из продуктов гидролиза получали ацетаты полиолов и подвергали их анализу методом ГЖХ (рисунок 19).

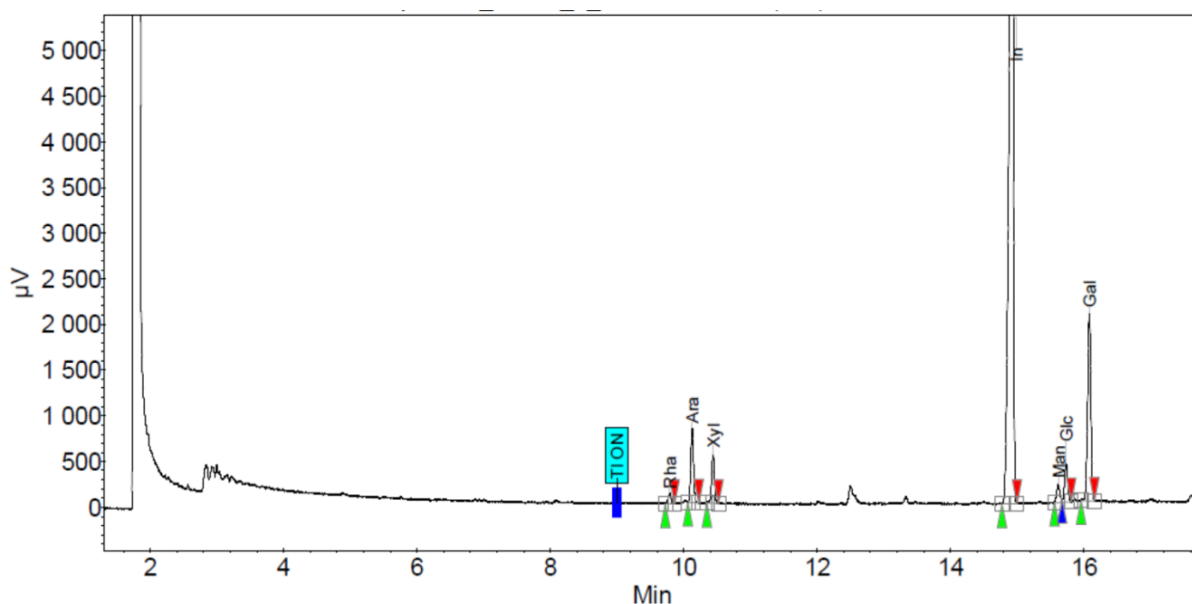


Рисунок 19 – ГЖХ ацетатов полиолов полученных из ПССЭ *S. controversa* DC.

ПССЭ состоит из полисахаридов с различными молекулярными массами. Так, сумма содержит 21 высокомолекулярный полисахарид с молекулярной массой более 5 кДа (от 5,6 до 304,9 кДа). Содержание высокомолекулярных полисахаридов составляет 65,9% от фракции ПССЭ. Кроме того, ПССЭ содержит 9 соединений с молекулярной массой ниже 5 кДа (от 0,9 до 4,8 кДа). Содержание низкомолекулярных полисахаридов составило 34,1% от фракции ПССЭ. Содержание белка в ПССЭ составило  $16,15 \pm 0,48\%$ . Средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ) ПССЭ составила 108,6, а среднечисленная молекулярная масса ( $M_n$ ) - 5,5 кДа. ПССЭ характеризуются высокой степенью гетерогенности, индекс гетерогенности

составил 19,74. Доминирующими монозами ПССЭ, определенных методом ГЖХ, являются галактоза (40,53%) и арабиноза (13,16%). Остатки ксилозы (8,95%), глюкозы (8,55%), маннозы (3,65%) и рамнозы (2,16%) являются второстепенными компонентами углеводных цепей ПССЭ. Содержание уроновых кислот составило  $6,71 \pm 0,25\%$ . Таким образом, ПССЭ структурно можно отнести к арабиногалактану с  $M_w$  108,6 кДа и сложным мономерным составом.

### Выводы

1. Листья *S. controversa* DC. содержат сесквитерпеновые лактоны, сапонины, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды ( $1,20\% \pm 0,05\%$ ), фенолкарбоновые кислоты ( $4,46\% \pm 0,76\%$ ), полисахариды, аминокислоты.

2. Впервые охарактеризованы полисахаридные комплексы водного извлечения и экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. по молекулярно-массовому распределению, содержанию белка, количественному соотношению и мономерному составу нейтральных и кислых сахаров. Технологический выход фракций ПС составил: ФПС<sub>1</sub> ( $1,93\% \pm 0,35\%$ ); ФПС<sub>2</sub> ( $0,74\% \pm 0,16\%$ ); ФПВ ( $10,52\% \pm 1,58\%$ ) и из экстракта на 40% этаноле: ПССЭ ( $6,15 \pm 0,62\%$ ). Основными структурными мономерами ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и ПССЭ являются галактоза и арабиноза, а  $\Sigma$ ПВ – галактуроновая кислота.

3. Хроматографическими методами (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) впервые для данного вида идентифицированы фенолкарбоновые кислоты (коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая, хинная, салициловая), аминокислоты (валин, аргинин, треонин, лизин, глицин), флавоноиды (кверцетин, рутин, кемпферол, дигидрокверцетин), кумарины (умбеллиферон, эскулетин), тритерпеновые сапонины (олеаноловая и урсоловая кислоты).

4. Выделены макрокомпоненты экстракта *S. controversa*: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина, 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина, рутин), хелидоновая

кислота, перспективные для дальнейшего изучения их биологической активности.

#### **4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАВ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ *S. CONTROVERSA* DC. НА 40% ЭТАНОЛЕ**

##### **4.1. Исследование остеогенной активности**

Исследованию на остеогенную активность подвергли сумму флавоноидов (осадок из бутанольной фракции - ОБФ), полисахариды (ПССЭ), а также хелидоновую кислоту полученные из сухого экстракта *S. controversa* DC. на 40% этаноле.

Для этого оценивали влияние вышеуказанных веществ на остеогенную дифференцировку и минерализацию клеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека (ММСК) (таблица 23) после окраски ализариновым красным. Для всех соединений наблюдали увеличение интенсивности красного окрашивания и количества окрашенных участков, что указывает на дифференцировку ММСК в остеобласты с вовлечением депонированных солей кальция в межклеточном матричном пространстве. При добавлении небольшой концентрации веществ (10 мг/л), было отмечено, что клетки меняли форму за счет уменьшения длины и количества отростков. Единичные очаги кальцификации появлялись в межклеточном матриксе, который был интенсивно окрашен ализарином в красный цвет, что указывает на остеогенную дифференцировку отдельных стволовых клеток. В случае увеличения концентрации введенных веществ (30 и 50 мг/л), наблюдали увеличение отдельных очагов минерализации, а также интенсивно окрашенные многослойные волокнистые структуры. Образование данных структур является результатом слияния отдельных участков минерализации и свидетельствует о значительном увеличении остеобластической дифференцировки в культуре ММСК под влиянием изучаемых соединений.

ПССЭ дозозависимо увеличивали количество (до 9 раз) окрашенных ализарином красных участков в культуре клеток. Средние площади участков минерализации соответствовали контрольному уровню (таблица 18).

Таблица 18 – Влияние мажорных компонентов *S. controversa* DC. на остеогенную дифференцировку ММСК *in vitro*

№ п/п	Группа, n=3	Дозировка мг/л	Число участков минерализации клеточной культуры, мм <sup>2</sup>	Средняя площадь участков минерализации, мм <sup>2</sup>
1.	Контроль	0	14 ± 2	0,027 (0,013-0,095)
2.	Клетки + сумма флавоноидов (ОБФ)	10	16 ± 5	0,039 (0,019-0,093)
		30	21 ± 4	0,029 (0,007-0,051)
		50	53 ± 3	0,048 (0,020-0,083)
3.	Клетки + сумма полисахаридов (ПССЭ)	10	47 ± 3	0,037 (0,011-0,179)
		30	118 ± 5	0,025 (0,009-0,090)
		50	128 ± 13	0,018 (0,009-0,064)
4.	Клетки + хелидоновая кислота	10	13 ± 2	0,033 (0,009-0,053)
		30	31 ± 3	0,043 (0,018-0,121)
		50	56 ± 4	0,060 (0,024–0,096)

Примечание: n- количество испытанных лунок культуральной пластины для каждой дозировки; контроль – интактные культивируемые стволовые клетки.

В ходе эксперимента происходила стимуляция трехмерных локусов с преобладанием дифференцировки ММСК в остеобласты без массивной клеточной пролиферации. Остеогенная активность ПССЭ достоверно превышала аналогичную у суммы флавоноидов (ОБФ) и хелидоновой кислоты. Флавоноиды и хелидоновая кислота в дозе 10 мг/л не способствовали дифференцировке клеток в остеобласты, так как область окраски с ализариновым красным в местах минерализации межклеточного

матрикса достоверно не отличалась от контроля, но с увеличением дозы флавоноидов и хелидоновой кислоты до 30 и 50 мг/л число участков кальцификации ММСК увеличивалось в 3,5-4 раза (рисунок 20).

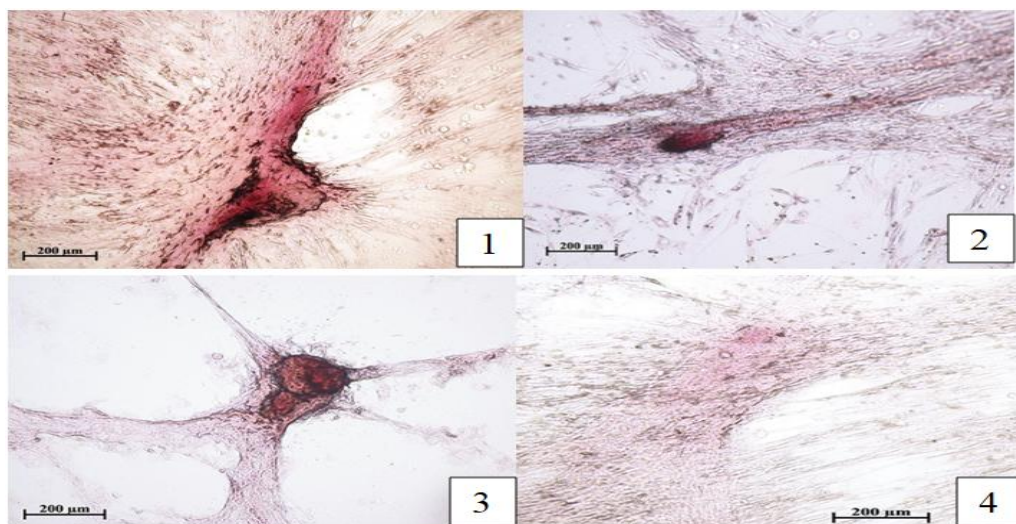


Рисунок 20 – Культура клеток ММСК, после культивирования в течение 21 дня с добавлением: 1) хелидоновой кислоты; 2) суммы флавоноидов (ОБФ); 3) суммы полисахаридов (ПССЭ); 4) интактные (контроль)

Сравнительную остеогенную активность оценивали, рассчитывая общую площадь участков кальцификации. Как видно из рисунка 21, площади кальцификации клеточной культуры составили 2,581 мм<sup>2</sup> для хелидоновой кислоты; 4,368 мм<sup>2</sup> для суммы флавоноидов (ОБФ); 4,901 мм<sup>2</sup> для суммы полисахаридов (ПССЭ).

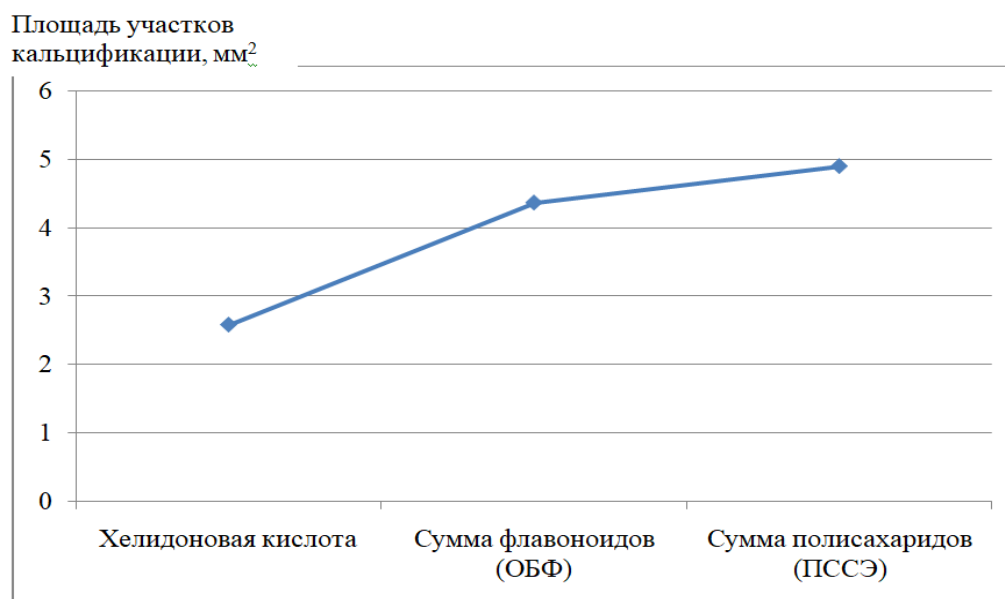


Рисунок 21 – Остеогенная активность мажорных компонентов *S. controversa* DC. в дозе 30 мг/л.

Таким образом, остеогенную активность исследуемых веществ на ММСК оценивали по двум критериям: 1) числу участков минерализации клеточной культуры, окрашенных ализарином (остеобласты) и 2) общей площади участков кальцификации. Соответственно, степень влияния объектов на дифференцировку ММСК в остеобласты формирует следующий ряд активности: хелидоновая кислота  $\leq$  сумма флавоноидов (ОБФ) < сумма полисахаридов (ПССЭ). Из этого следует, что хелидоновая кислота, флавоноиды и ПССЭ являются перспективными агентами для ускорения регенерации костной ткани [126].

#### 4.2. Исследование иммуотропной активности

Фенольные соединения и полисахариды способны изменять основные функции макрофагов: усиливать фагоцитарную активность, продукцию активных форм кислорода и оксида азота (NO). В свою очередь, оксид азота играет важную роль в регуляции функций различных систем организма, участвует в развитии адаптивных иммунных реакций, ингибирует репликацию патогенов, регламентирует апоптоз и пролиферацию клеток, включая макрофаги, Т-лимфоциты, тучные клетки, нейтрофилы и

лимфоциты [45, 121, 156]. Результаты исследования NO-синтазной активности БАВ представлены в таблице 19.

Таблица 19 – NO – стимулирующая активность целевых БАВ экстракта *S. controversa* DC.

Исследуемое вещество	Концентрация нитритов (мкМ)
Контроль 1 (макрофаги + среда)	2,00 ± 0,05
ЛПС (0,1 мкг/мл)	18,97 ± 0,62*
МДП (30 мкг/мл)	3,27 ± 0,15* <sup>■</sup>
Кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид (БФ-1) (20 мкг/мл)	3,23 ± 0,26 <sup>■</sup>
Кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид (БФ-2) (20 мкг/мл)	2,64 ± 1,12 <sup>■</sup>
Кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозил-О-α-L-рамно-пиранозид (БФ-3) (20 мкг/мл)	2,60 ± 0,10 <sup>■</sup>
Хелидоновая кислота (20 мкг/мл)	8,17 ± 0,26* <sup>■</sup>
Полисахариды из экстракта на 40% этаноле (ПССЭ) (20 мкг/мл)	15,76 ± 0,43* <sup>■</sup>

Примечание. \* – различия показателя с контролем 1 достоверны,  $p < 0,05$

<sup>■</sup> – различия показателя с ЛПС достоверны,  $p < 0,05$ ;  $n=5$

Как видно из таблицы 24, степень влияния выделенных БАВ на NO-синтазную активность существенно различается. Наибольшую активность сопоставимую с липополисахаридом проявили ПССЭ. По величине активности можно расположить БАВ в следующий ряд: ПССЭ > хелидоновая кислота > кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид > кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид > рутин.

Таким образом, фракции ПССЭ и хелидоновая кислота обладают выраженным иммуностимулирующим действием за счет увеличения NO-синтазной активности макрофагов, что является важным фактором в коррекции нарушенного при остеомиелите иммунного статуса.

## Выводы

1. По величине остеогенной активности мажорные компоненты экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. распределяются следующим образом: ПССЭ > сумма флавоноидов (ОБФ) > хелидоновая кислота.

2. По величине стимулирования NO-синтазной активности макрофагов выделенные БАВ формируют следующий ряд: ПССЭ > хелидоновая кислота > кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид > кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид > рутин.



## **5. ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ**

Целью раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» является определение перспективности и успешности научно-исследовательского проекта по выделению биологически активных веществ (БАВ) из сосюреи спорной, разработка механизма управления и сопровождения конкретных проектных решений на различных этапах реализации научной работы. Выделение БАВ из растений является сложным и трудоемким процессом, часто сопровождающимся большими материальными затратами. Выбор методов для изолирования веществ и установления их структуры существенно влияет на финансовые издержки проекта. Поэтому основные задачи по данному разделу сводились к выбору наиболее коммерчески доступного метода, использованию минимальных затрат, расчету возможных рисков проекта. Для оценки коммерциализации и выявления основных потребителей проекта, нами проведено сегментирование рынка.

### **5.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования**

Для анализа потребителей результатов научного исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование.

Целевой рынок – сегменты рынка, на котором в будущем будут продаваться разработки. В свою очередь, сегмент рынка – это особым образом выделенная часть рынка, группы потребителей, обладающих определенными общими признаками.

Целевым рынком для внедрения разрабатываемой темы – исследования химического состава сосюреи спорной являются фармацевтические заводы, контрольно-аналитические лаборатории, научно-исследовательские центры. Исходя из этого, можно выделить несколько групп потребителей данного продукта. Во-первых, это различные фармацевтические лаборатории при заводах, осуществляющие контроль качества растительных лекарственных средств. Во-вторых, различные частные и муниципальные контрольно-аналитические лаборатории осуществляющие анализ различных групп биологически активных

веществ в растениях. Важной категорией целевых потребителей являются научно-исследовательские центры, т.к. получаемые нами БАВ могут использоваться в качестве веществ-стандартов для химических и биологических исследований.

Таким образом, проведено сегментирование потребителей разработки. Выделены следующие наиболее крупные сегменты рынка: фармацевтические заводы и контрольно-аналитические лаборатории.

### 5.1.2. Оценка готовности проекта к коммерциализации

Следующим этапом необходимо провести оценку проекта к коммерциализации с использованием таблицы, в которой содержатся показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта. Коммерциализация – процесс экономической (рыночной) реализации на практике результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ. В данном процессе активно взаимодействуют разные стороны – разработчики, инвесторы, а также сопровождающие и обслуживающие непосредственно данный процесс участники. Перечень вопросов приведен в таблице 20.

Таблица 20 – Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	3	4
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	2	2
3.	Определены отрасли и технологии (товары и услуги) для предложения на рынке	4	4
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	4	5

5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	4	5
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	4	4
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	2
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	3	3
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	4	4
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	4	3
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	3	4
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	4	4
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	4	5
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	4	5
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	4	5
	<b>ИТОГО БАЛЛОВ</b>	53	59

На основании проведенных расчетов, можно сделать заключение о перспективности проекта выше среднего (от 45 до 59). Проведение дополнительных маркетинговых исследований рынков сбыта позволило увеличить перспективность проекта, поэтому необходимо увеличение объемов финансирования проекта.

### 5.1.3. Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования

Коммерциализация – это процесс преобразования знаний в продукт, услугу или деятельность, которая может быть использована в целях получения прибыли. Коммерциализация в науке – это практическое использование научных изысканий и разработок в производстве товаров или предоставлении услуг, с тем, чтобы эти товары или услуги, можно было продать с максимальным коммерческим эффектом.

Основной целью коммерциализации проекта является внедрение результатов НИОКР с последующим получением финансовых и прочих материальных ценностей, которые в дальнейшем можно использовать для развития исследований (закупка оборудования, реактивов; наем высококвалифицированного узкоспециализированного персонала), либо для формирования накоплений. Прибыль может быть единоразовой, либо регулярной.

Важно правильно определить методы коммерциализации результатов научно-технического исследования, проведенного в рамках диссертации, для получения максимальных выгод. Для понимания методологии выбора необходимо понимать возможные варианты коммерциализации. А именно:

1. Торговля патентными лицензиями;
2. Передача ноу-хау;
3. Инжиниринг;
4. Фрайчайзинг;
5. Организация собственного предприятия;
6. Организация совместных предприятий.

Наиболее перспективными методами коммерциализации для полученных результатов научно-технической деятельности являются: инжиниринг, торговля патентными лицензиями.

*Инжиниринг* предполагает предоставление на основе договора однойстороной, именуемой консультантом, другой стороне, именуемой

заказчиком, комплекса или отдельных видов инженерно-технических услуг, связанных с проектированием, строительством и вводом объекта в эксплуатацию, с разработкой новых технологических процессов на предприятии заказчика, усовершенствованием имеющихся производственных процессов вплоть до внедрения изделия в производство и даже сбыта продукции. По результатам научно-технической работы разработана методика выделения биологически активных веществ из сосюреи спорной. После защиты результатов патентным правом, и прохождения процедуры аттестации методики, планируется предоставление методики для коммерческой продажи совместно с оборудованием для проведения анализов. Для компаний, у которых имеется оборудование другой фирмы (не требуется оборудование) предусматриваем продажу патентных лицензий на использование разработанной методики.

## **5.2. Контрольные события проекта**

### **5.2.1. Инициация проекта**

Группа процессов инициации состоит из процессов, которые выполняются для определения нового проекта или новой фазы существующего. В рамках процессов инициации определяются изначальные цели и содержание и фиксируются изначальные финансовые ресурсы. Определяются внутренние и внешние заинтересованные стороны проекта, которые будут взаимодействовать, и влиять на общий результат научного проекта. Данная информация закрепляется в Уставе проекта.

*Устав проекта* документирует бизнес-потребности, текущее понимание потребностей заказчика проекта, а также новый продукт, услугу или результат, который планируется создать.

*Устав научного проекта магистерской работы* имеет следующую структуру:

#### **1. Цели и результат проекта.**

Информация по заинтересованным сторонам проекта представлена в табл. 21.

Таблица 21–Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидание заинтересованных сторон проекта
Министерство науки и образования РФ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- оформление патентов;</li> <li>- разработка методик качественного и количественного определения;</li> <li>-доклады на конференциях разного уровня;</li> <li>-публикация статей в журналах с высокимвысокимимпакт-фактором.</li> </ul>

В таблице 22 представлена информация об иерархии целей проекта и критериях достижения целей.

Таблица 22 – Цели и результат проекта

<b>Цели проекта</b>	Разработать методики качественного и количественного определения биологически активных веществ (БАВ) сосюреи спорной
<b>Ожидаемые результаты проекта</b>	Обосновать возможность использования полученных в ходе исследований данных для определения БАВ: полисахаридов, флавоноидов, хелидоновой кислоты
<b>Критерии приемки результата проекта</b>	Результат должен технологически, экономически и экологически обоснован
<b>Требования к результату проекта</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Проблема проекта должна быть актуальной, имеющей технологическое, экономическое и экологическое значение.</li> <li>2) Установить вещественный состав и фармакологические свойства основных биологически активных веществ.</li> </ol>

## 2. Организационная структура проекта

Необходимо определить участников рабочей группы, определить роль каждого участника в проекте, а также прописать функции каждого участника проекта и определить трудозатраты. Организационная структура проекта представлена в таблице 23.

Таблица 23 – Рабочая группа проекта

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудовые затраты, час.
1.	Белоусов М.В.	Руководитель проекта	Отвечает за реализацию проекта, координирует деятельность участников проекта	1506
2.	Авдеева Е.Ю.	Зам. руководителя	Обеспечивает снабжение необходимыми материалами для работы, организует рабочее место; консультирует по отдельным видам работ	1506
3.	Якимова Т.Б.	эксперт	Консультирует по вопросам финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения	2
4.	Горбенко М.В.	эксперт	Консультирует по вопросам безопасности жизнедеятельности	2
5.	Устюжанина А.К.	эксперт	Консультирует по части английского языка	2
6.	Решетов Я.Е.	исполнитель	Выполняет отдельные работы по проекту	2200

### 3. Ограничения и допущения по проекту

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а так же «границы проекта» - параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованными в рамках данного проекта. Данные представлены в таблице 24

Таблица 24 – Ограничения проекта

Фактор	Ограничения /допущения
3.1. Бюджет проекта, руб.	600000
3.1.1. Источник финансирования	Министерство образования и науки РФ
3.2. Сроки проекта	01.09.2018 г. – 31.08.2020 г.
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	01.01.2018 г.

## 5.2.2. Планирование управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей. План управления включает в себя следующие элементы:

### 1. Иерархическая структура работ проекта

*Иерархическая структура работ* (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рисунке 22 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.

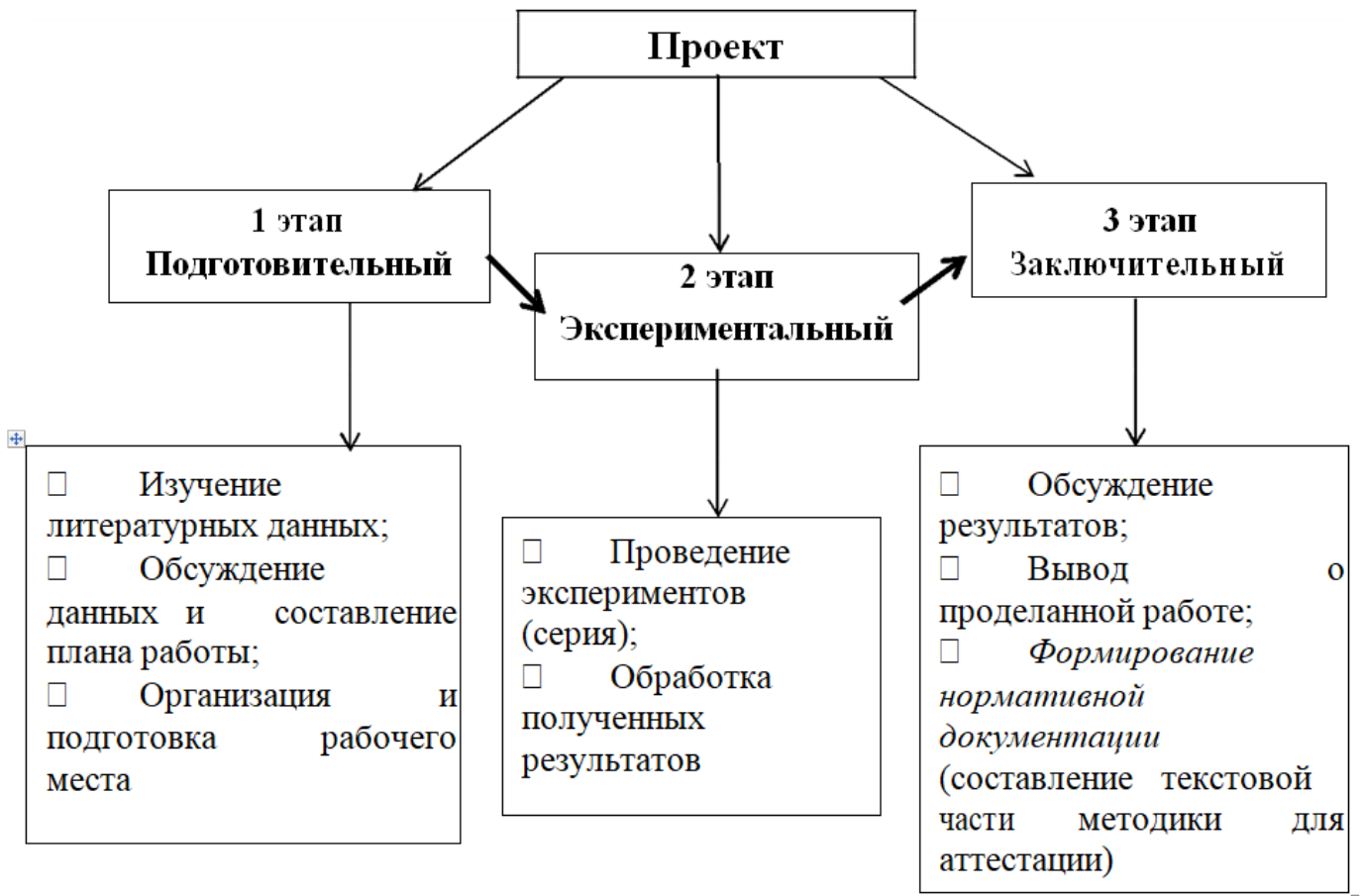


Рисунок 22 – Иерархическая структура работ проекта

### 2. Контрольные события проекта



В рамках данного раздела необходимо определить ключевые события проекта, определить их даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты. Эта информация представлена в таблице 25

Таблица 25 – Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Анализ литературных данных	Сентябрь-октябрь, 2018 г.	Литературный обзор в ВКР
2	Постановка цели и задач	Ноябрь 2018	Раздел цели и задачи в ВКР
3	Разработка плана экспериментальных работ	Ноябрь 2018	План работ
4.	Разработка оптимальных методик выделения биологически активных веществ (БАВ) из сосюреи спорной	Декабрь 2018 – Апрель 2019 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
5.	Выделение БАВ: полисахаридов, флавоноидов, производных $\gamma$ -пирона	Май – Октябрь, 2019 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
6.	Установление структуры выделенных веществ	Ноябрь 2019 – Январь 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
7.	Анализ биологической активности (остеогенной и иммуномодулирующей) выделенных соединений	Январь – Февраль, 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
8.	Обсуждение результатов, доработка экспериментальной части ВКР	Апрель – Июнь, 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
9.	Оформление ВКР	Апрель – Июнь, 2020 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР

### 5.2.3. План проекта

В рамках планирования научного проекта построен календарный и линейный графики проекта. Линейный график представлен в виде таблицы 26.

Таблица 26 – Календарный план проекта

<b>Код работы (из ИСР)</b>	<b>Название</b>	<b>Длительность, дни</b>	<b>Дата начала работ</b>	<b>Дата окончания работ</b>	<b>Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)</b>
1.	Анализ литературных данных	53	01.09.18	04.11.18	Авдеева Е.Ю., Решетов Я.Е.
2.	Постановка целей и задач	2	6.11.18	8.11.18	Авдеева Е.Ю., Решетов Я.Е., Белоусов М.В
3.	Разработка плана экспериментальных работ	5	08.11.18	13.11.18	Решетов Я.Е., Белоусов М.В
4.	Разработка оптимальных методик выделения биологически активных веществ из с. спорной	109	14.11.18	2.04.19	Авдеева Е.Ю., Решетов Я.Е.
5.	Выделение БАВ: полисахаридов, флавоноидов, производных $\gamma$ -пирона	74	3.04.19	29.09.19	Решетов Я.Е.
6.	Установление структуры выделенных веществ	78	1.10.19	10.01.20	Авдеева Е.Ю., Решетов Я.Е.
7.	Анализ биологической активности (остеогенной и иммуномодулирующей) выделенных соединений	42	11.01.20	28.02.20	Решетов Я.Е.
8.	Обсуждение результатов, доработка экспериментальной части ВКР	25	1.03.20	30.03.20	Авдеева Е.Ю., Решетов Я.Е., Белоусов М.В
9.	Оформление ВКР	54	1.04.20	06.06.20	Решетов Я.Е.
ИТОГО, дней		442			





#### 5.2.4. Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

Бюджет затрат на выполнение НИР составлялся с учетом проведения НИР за один год (365 дней). Затраты на НИР рассчитывали по статьям калькуляции, которые включают две группы затрат прямые затраты и накладные затраты.

#### 5.2.5. Расчет материальных затрат научно-технического исследования

Данная статья включает стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта:приобретаемые со стороны сырье и материалы, необходимые для создания научно-технической продукции;покупные материалы, используемые в процессе создания научно-технической продукции для обеспечения нормального технологического процесса.

Все затраты на оборудование, реактивы, лабораторную посуду и средства защиты приведены в таблицах 28 -32.

Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений (табл.28).

Таблица 28 – Материальные затраты на оборудование

Наименование	Количество, шт	Стоимость с НДС, руб/шт	Сумма, руб	Срок эксплуатации, лет	Амортизация, руб
Весы аналитические	1	78740	78740	5	15748
Комплексный набор для выделения индивидуальных веществ	1	148000	148000	5	29600
Итого: <b>226740</b>			Амортизация: <b>45348,00</b>		

Таблица 29 – Материальные затраты на реактивы

Наименование	Кол-во	Стоимость с НДС	Сумма, руб
Стандарт кварцетина (Merck)	1 уп.	630,00 (за 20 уп.)	31,50
Бутанол	1л	115,00 (1л)	115,00
Вода бидистиллированная	1 л	65,0 (5л)	13,00
Хлороформ	1 л	870,00 (1л)	870,00
Силикагель (Woelm)	0,01 кг	500,00 (кг)	5,00
Серная кислота	0,01 л	120,00 (л)	1,20
Калия хлорид	0,500 кг	100,00 (кг)	50,00
Итого:			<b>1085,7</b>

Таблица 30 – Материальные затраты на лабораторную посуду

Наименование	Кол-во, шт	Стоимость с НДС	Сумма, руб
Колбы простые, различных объемов, стеклянные	4	1 л – 210,00 – 1 шт 50 мл – 100,0 – 2 шт 100 мл – 120,0 – 2 шт	430,00
Пробирки типа Эппендорф	20	519,00 (500 шт)	20,76
Дозатор одноканальный 20 мкл	1	4000,00	4000,00
Фильтровальная бумага	1 уп	150,00	150,00
Кювета кварцевая	3 шт	490,00	1470,00
Мерные колбы на 1 литр, стеклянные	3 шт	780,00	2340,00
Мерные колбы на 100 мл, стеклянные	6 шт	750,00	4500,00
Аппарат Сокслета	1 шт	4500,00	4500,00
Итого:			<b>17410,76</b>

Таблица 31 – Материальные затраты на средства защиты

Наименование	Кол-во, шт	Стоимость с НДС	Сумма, руб
Халат	1	1500,00	1500,00
Перчатки	2	100,00	200,00
Итого:			1700,00

Таблица 32 – Материальные затраты на научно-технические исследования

Вид затрат	Сумма, руб
Материальные затраты на реактивы	1085,70
Материальные затраты на лабораторную посуду	17410,76
Материальные затраты на средства защиты	1700,00
Материальные затраты на оборудование	45348,00
Итого:	65544,46

### 5.2.6. Основная заработная плата исполнителей темы

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда). Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (5.1)$$

где  $Z_{осн}$  – основная заработная плата;

$Z_{доп}$  – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ( $Z_{\text{осн}}$ ) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (5.2)$$

где  $Z_{\text{осн}}$  – основная заработная плата одного работника;

$T_{\text{р}}$  – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{\text{дн}}$  – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (5.3)$$

где  $Z_{\text{м}}$  – месячный должностной оклад работника, руб.

$M$  – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 24 раб.дня  $M = 11,2$  месяца, 5-дневная неделя; при отпуске в 48 раб. дней  $M = 10,4$  месяца, 6-дневная неделя;

$F_{\text{д}}$  – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб.дн.

Расчет заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта проводили с учетом работы 3-х человек – научного руководителя, консультанта и исполнителя. На выполнение НИР понадобилось 275 рабочих дней. Баланс рабочего времени исполнителей представлен в таблице 33.

Таблица 33 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Ассистент	Инженер (дипломник)



Календарное число дней	365	365	365
Количество нерабочих дней	58	58	62
- выходные дни	44	44	48
- праздничные дни	14	14	14
Потери рабочего времени	56	56	28
- отпуск	56	56	28
-невыходы по болезни	-	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	251	275

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_b \cdot (k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (5.4)$$

где  $Z_b$  – базовый оклад, руб.;

$k_{пр}$  – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

$k_d$  – коэффициент доплат и надбавок (в НИИ и на промышленных предприятиях – за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: определяется Положением об оплате труда);

$k_p$  – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

При расчете заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта учитывались месячные должностные оклады работников, которые рассчитывались по формуле:

$$Z_m = Z_b \cdot K_p \quad (5.5)$$

где  $Z_b$  – базовый оклад, руб.;

$K_p$  – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Таблица 34 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$Z_б$	$K_{пр}$	$K_д$	$K_p$	$Z_м$ , руб	$Z_{дн}$ , руб	$T_p$ , раб. дн.	$Z_{осн}$
Руководитель	18221,96	-	-	1,3	23688,6	1134,20	2,50	2835,5
Ассистент	14584,32	-	-	1,3	18959,6	907,20	12,50	11340,0
Дипломник	12130,00	-	-	1,3	15769,0	754,50	132	99594,0

### Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

В данную статью включается сумма выплат, предусмотренных законодательством о труде, например, оплата очередных и дополнительных отпусков; оплата времени, связанного с выполнением государственных и общественных обязанностей; выплата вознаграждения за выслугу лет и т.п. (в среднем – 12 % от суммы основной заработной платы).

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:  $Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн}$  (4.6) где

$Z_{доп}$  – дополнительная заработная плата, руб.; где

$k_{доп}$  – коэффициент дополнительной зарплаты;

$Z_{осн}$  – основная заработная плата, руб.

В табл. 35 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 35 – Заработная плата исполнителей НИИ

Заработная плата	Руководитель	Ассистент	Дипломник

Основная зарплата	2835,5	11340,0	99594,0
Дополнительная зарплата	340,26	1360,8	11951,76
Итого по статье С <sub>зп</sub>	3175,8	12700,8	111545,76

### Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} * (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) \quad (5.6)$$

где  $K_{\text{внеб}}$  – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.)

Отчисления на социальные нужды составляет 30,2 % от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляют отчисления в пенсионный фонд, отчисление на социальное страхование, отчисления на медицинское страхование.

Затраты на отчисления на социальные нужды рассчитывали по формуле:

$$Z_{\text{о.с.н.}} = 0,302 * Z_{\text{осн.}} \quad (5.7)$$

где  $Z_{\text{о.с.н.}}$  – затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

### Накладные расходы

В эту статью включены затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему. Накладные расходы составили 16% от всех расходов –  $C_{\text{накл}} = 36148,03$  руб.

### Затраты на проведение НИР

На основании полученных данных по отдельным статьям затрат составляется калькуляция плановой себестоимости НИР. В проекте не

предусмотрены затраты, связанные с выплатой дополнительной заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта, научными и производственными командировками, оплатой работ, выполняемых другими организациями и предприятиями. Смета затрат приведена в таблице 36.

Таблица 36 – Смета затрат на выполнение НИР

Статьи затрат	Затраты, руб.
Сырье и материалы	18796,46
Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	45348,00
Фонд заработной платы	127422,36
Отчисления на социальные нужды	34358,39
Накладные расходы	36148,03
<b>Итого</b>	<b>262073,24</b>

Анализ сметы затрат на выполнение научно – исследовательской работы показал, что существующий вариант решения, поставленный в магистерской диссертации, с позиции финансовой и ресурсной эффективности является наиболее приемлемым в сравнении с существующими методами (например, высокоэффективная жидкостная хроматография).

### 5.2.7. Организационная структура проекта

В практике используются несколько базовых вариантов организационных структур. Для выбора наиболее подходящей структуры использована таблица 23 из методического указания. Таким образом, определена проектная организационная структура научного проекта и представлена на рисунке 23.



Рисунок 23 – Проектная организационная структура проекта

### 5.2.8. Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проектаформируется матрица ответственности (табл. 37).

Таблица 37 – Матрица ответственности

Этапы проекта	Белоусов М.В., Руководитель проекта	Авдеева Е.Ю., Зам. руковод. проекта	Якимова Т.Б., Эксперт	Горбенко М.В., Эксперт	Устюжанина А.К., Эксперт	Решетов Я.Е. Исполнитель
Составление технического задания	О					
Изучение литературы		О, И				И, О
Выбор направления исследования	О					И, О
Теоретические и экспериментальные исследования		И				И, О
Обобщение и оценка результатов	О	И				И, О
Разработка технической документации и проектирование	О					И, О

Оформление комплекта документации	О, С		О, С	О, С	О, С	И, О
-----------------------------------	------	--	------	------	------	------

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

*Ответственный (О)* –лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход.

*Исполнитель (И)* –лицо(лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта.

*Утверждающее лицо (У)* –лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение).

*Согласующее лицо (С)* –лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

### 5.2.9. План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. План управления коммуникациями приведен в таблице 38.

Таблица 38 – План управления коммуникациями

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Статус проекта	Исполнитель проекта	Руководителю проекта, зам. руководителя проекта	Еженедельно (среда)
2.	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель проекта	Участникам проекта	Еженедельно (понедельник)
3.	Документы и информация по проекту	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже сроков графиков и контрольных

				точек
4.	О выполнении контрольной точки	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже дня контрольного события по плану управления

### 5.3. Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя неопределенные события, которые могут возникнуть в проекте и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты. Возможные риски проекта приведены в таблице 39.ь

Таблица 39 – Реестр рисков

№ п/п	Риск	Вероятность наступления	Влияние риска	Уровень риска	Способы смягчения риска	Условия наступления
1.	Технический	3	5	высокий	Повышение требований, проработка технологии	Неисправность оборудования
2.	Организационный	5	5	высокий	Финансирование проекта, расстановка приоритетов	Нехватка ресурсов
3.	Управление проектом	1	4	низкий	Долгосрочное планирование	Некомпетентное управление

### 5.4. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

#### 5.4.1. Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{\text{ри}}}{\Phi_{\text{финр}}^{\max}}, \quad (10)$$

где  $I_{\text{исп.}i}$  – интегральный финансовый показатель разработки;

$\Phi_{\text{ри}}$  – стоимость  $i$ -го варианта исполнения;

$\Phi_{\text{макс}}$  – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I = \sum_{\text{ри}} a_i \cdot b_i, \quad (11)$$

где  $I_{\text{ри}}$  – интегральный показатель ресурсоэффективности для  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$a_i$  – весовой коэффициент  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$b_i^a, b_i^p$  – балльная оценка  $i$ -го варианта исполнения разработки,

устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

$n$  – число параметров сравнения.

Результаты по расчету интегрального показателя ресурсоэффективности представлены в таблице 40.



Таблица 40 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Колоночная хроматография Исп.1	Высокоэффективная жидкостная хроматография Исп.2
Чувствительность	0,30	5	5
Простота аппаратного оформления	0,20	5	2
Быстрота определения	0,30	5	3
Отсутствие пробоподготовки	0,20	5	4
Итого	1,00	5,0	3,6

$$I_{p-исп1} = 5 \times 0,3 + 5 \times 0,2 + 5 \times 0,3 + 5 \times 0,2 + 5 \times 0,2 = 5$$

$$I_{p-исп2} = 5 \times 0,3 + 2 \times 0,2 + 3 \times 0,3 + 4 \times 0,2 = 3,6$$

### Выводы

1. Проведена оценка коммерциализации результатов проекта, выявлены потенциальные потребители разработки. Создана организационная структура, календарный план и схема управления проектом.
2. Осуществлено планирование и формирование бюджета исследования. Рассчитаны все материальные затраты на выполнение научно-технического исследования (262073,24 руб.). Рассмотрены возможные риски при выполнении проекта и способы их преодоления.
3. Определена ресурсосберегающая, финансовая, бюджетная и экономическая эффективность исследования. Создана матрица ответственности проекта. Выполнен сравнительный анализ эффективности выбранного метода исследования по сравнению с альтернативным. Выбранный метод показал достаточно высокую эффективность ( $I_{p-исп1} = 5$ ).

## **6. Социальная ответственность**

### **Введение**

Научная работа проводилась в химической научно-исследовательской лаборатории кафедры фармацевтического анализа СибГМУ под руководством профессора ИШХБМТ Белоусова Михаила Валерьевича и связана выделением биологически активных веществ (полисахаридов, флавоноидов и др.) из растения – сосюрея спорная. Для этого, нами был использован метод колоночной хроматографии, основанный на разделении веществ на специальном сорбенте – силикагеле, путем элюирования (промыывания колонки с нанесенными суммами веществ), различными органическими, растворителями (хлороформ, этилацетат, н-бутанол, этанол и их смесями).

Лаборатория представляет собой помещение площадью 25 м<sup>2</sup>, с двумя двустворчатými окнами, оборудованное двумя рабочими местами. Рабочее место укомплектовано столом для проведения химических опытов, стулом, на столе располагается стеклянная хроматографическая колонка для выделения индивидуальных веществ, растворители для хроматографии хранятся в специальном металлическом сейфе и применяются по мере необходимости. Лаборатория оснащена одним вытяжным вентиляционным шкафом. Освещение представлено двумя рядами люминесцентных светильников типа ОД, каждый ряд состоит из двух светильников.

Целью данной части магистерской диссертации является обеспечение социальной ответственности при выполнении экспериментальной части научно-исследовательской работы, а также и на производстве, заключающееся в создании безопасных, безвредных, благоприятных и комфортных условий труда.

В разделе рассматриваются вопросы охраны труда и техники безопасности, связанные с работой в лаборатории, а также разрабатываются

мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье работников лабораторий опасных и вредных факторов.

### **6.1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

Для обеспечения корректной работы с использованием данной методики необходимо прежде всего ознакомиться с правовыми нормами и актами. Согласно [167] нормирован:

- режим рабочего времени - для работников, условия труда на рабочих местах, которых по результатам специальной оценки условий труда отнесены к вредным условиям труда 3 или 4 степени, или опасным условиям труда, - не более 36 часов в неделю. При этом максимально допустимая продолжительность ежедневной работы (смены) не может превышать 8 часов.
- защита персональных данных работника – согласно ТК РФ Статей 86-90. В данных статьях описаны: общие требования к получению от работника персональной информации и правила ее обработки, хранения и передачи при необходимости, а также ответственности за нарушение норм, связанных с обработкой и защитой персональных данных;
- оплата и нормирование труда- осуществляется с нормами трудового кодекса; Оплата труда в районах Крайнего Севера и приравненных к ним местностях осуществляется с применением районных коэффициентов и процентных надбавок к заработной плате. Размер районного коэффициента и порядок его применения для расчета заработной платы работников организаций, расположенных в районах Крайнего Севера и приравненных к ним местностях, устанавливаются Правительством Российской Федерации.
- особенности обязательного социального страхования и пенсионного обслуживания – согласно Федерального закона "Об основах

обязательного социального страхования" от 16.07.1999 N 165-ФЗ (в редакции от 03.08.2018) установлены права и обязанности застрахованных лиц на своевременное получение страхового обеспечения в порядке и на условиях, которые установлены федеральными законами о конкретных видах обязательного социального страхования.

Все работники лаборатории обязаны пройти инструктаж по технике безопасности: знать меры при возникновении аварийных ситуаций, расположение первичных средств пожаротушения, план эвакуации и нахождение кнопок оповещения.

Согласно [168] на работу в химико-аналитические лаборатории принимаются

лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинское освидетельствование для решения вопроса о возможности работы в лаборатории.

От каждого работника лаборатории требуется соблюдение следующих правил:

- к работе не допускаются лица, не прошедшие инструктаж (периодичность для студентов – 2 раза в год);
- работа с химическими веществами запрещена беременным женщинам и несовершеннолетним [169];
- продолжительность работы в лаборатории составляет не более 8 часов в день (перерывы через каждые 45-50 минут)
- периодичность медосмотров – раз в год [170].
- при работе с химическими веществами следует предотвратить любую возможность проникновения в организм человека: через легкие, кожу или через рот;
- не использовать высокоопасные растворители для технических целей (мытья посуды);

-любые работы с газообразными, летучими или пылящими жидкими и твердыми веществами проводить только в вытяжном шкафу при включенной вентиляции, летучие твердые и жидкие вещества держать плотно закупоренными, а наиболее летучие — на специальных полках в вытяжном шкафу, взвешивать летучие твердые и жидкие вещества только в плотно закрывающихся сосудах;

При проектировании места исследователя необходимо учитывать требования эргономики для создания комфортных условий труда, направленных на сохранение здоровья работника. Согласно [171] конструкция рабочего места и взаимное расположение всех его элементов (сиденье, органы управления, средства отображения информации и т.д.) должны соответствовать антропометрическим, физиологическим и психологическим требованиям, а также характеру работы.

## 6.2. Производственная безопасность

Производственная безопасность – это система организационных и технических мероприятий, технических принципов, методов и средств, предотвращающих или уменьшающих вероятность воздействия на работающих опасных производственных факторов, с целью снижения риска травмирования работающих. Включает в себя электробезопасность, безопасную эксплуатацию оборудования, безопасное протекание технологических процессов. Согласно ГОСТ 12.003-2015[172] приведена классификация вредных и опасных факторов, выявленные на каждом этапе выполнения работ по методикам. Результаты представлены в виде таблицы 41.

Таблица 41 – Возможные опасные и вредные факторы

Факторы	Этапы работ	Нормативные
---------	-------------	-------------

(ГОСТ 12.0.003-2015)	Разработ ка	Изгото вление	Эксплу атация	документы [7-20]
1.Отклонение показателей микроклимата	+	+	+	ГОСТ 12.1.005-88ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны [173]. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений* [174].
2.Превышение уровня шума	+	-	-	ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности* [175]. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. Классификация* [176].
3.Отсутствие или недостаток естественного света	+	-	-	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий* [177].
4.Недостаточная освещенность рабочей зоны	+	+	+	СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95* [178].
5.Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека	+	+	+	ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты* [179]. ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление* [180]. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов* [181]. ГОСТ 12.1.045-84 ССБТ. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля* [182].
6. Взаимодействие с химическими	+	+	+	ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества.

реагентами и смесями				Классификация и общие требования безопасности [183]. ГОСТ 12.1.010-76 ССБТ. Взрывобезопасность. Общие требования* [184].
7. Физические перегрузки, связанные со статичностью позы	+	+	+	Р 2.2.2006–05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда* [185].
8. Нервно-психические перегрузки, связанные с перенапряжением анализаторов и умственные перегрузки	+			СанПиН 2.2.2/2.4.1340–03. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования к персональным электронно-вычислительным машинам и организации работы»* [186].

### 6.3. Анализ вредных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследований

#### 6.3.1. Отклонение показателей микроклимата

В лабораторных помещениях для соблюдения специальных норм микроклимата предусмотрены следующие в соответствии с СанПиН 2.2.4.548-96 [187] и ГОСТ 12.1005 – 88 (2000)[188] («Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны»): помещения оснащена, устройством для отопления; используются теплоизоляционные материалы (асбест);

Согласно вышеописанным нормативным документам описанная работа относится к категории Ia: работы с интенсивностью энергозатрат до 120 ккал/ч (до 139 Вт). Поэтому в лабораторных помещениях создаются оптимальные микроклиматические условия для нормального функционального состояния человека.

Таблица 42 – Допустимые нормы микроклимата в рабочей зоне производственных помещений (Категория работ Ia)[188].

Сезон года	Категория работ по	Температура воздуха, С <sup>0</sup>	Относительная	Скорость движения
------------	--------------------	-------------------------------------	---------------	-------------------

	уровню энергозатрата , ккаль/ч			влажность, %	воздуха, м/сек	
		Диапазон ниже оптимальны х	Диапазон выше оптимальны х		Если $t^0 < t^0$ оптим.	Есл и $t^0 > t^0$ оптим.
Теплый	1а (до 139)	21,0-22,9	25,1-28,0	15-75	0,1	0,2
Холодный		20,0-21,9	24,1-25,0		0,1	0,1

Для обеспечения нормальных условий труда санитарные нормы СанПиН 2.2.1/2.1.1.1031-01 [189] устанавливают, что на одного рабочего должно приходиться  $4,5 \text{ м}^2$  площади помещения и  $20 \text{ м}^3$  объема воздуха.

Помещение лаборатории имеет следующие параметры:

длина помещения - 5 м;

ширина - 5 м;

высота - 3 м.

Исходя из этих параметров, площадь данного помещения составляет:

$$S = 5 \times 5 = 25 \text{ м}^2;$$

$$\text{объем: } V = 5 \times 5 \times 3 = 75 \text{ куб. м.}$$

В лаборатории работает 2 человека. Значит, на каждого человека приходится  $12,5 \text{ м}^2$  рабочей площади и  $37,5 \text{ м}^3$  объема воздуха. Это удовлетворяет санитарным нормам.

Фактическая температура воздуха в теплый период составляла  $25-28^\circ\text{C}$ , в холодный период  $20-23^\circ\text{C}$ , что соответствует требуемым нормам.

### 6.3.2. Химические опасные и вредные производственные факторы

При выполнении научной работы вредными факторами являются пары летучих используемых реактивов и растворителей. Для защиты от вредных и опасных факторов предусмотрены следующие меры предосторожности: работу ведут в вытяжном шкафу с вентиляцией с применением защитного респиратора. Все работники в лаборатории обязаны работать специальных одеждах и должны не реже 1 раза в год проходить инструктаж по



требованиям, предъявляемым к нему при работе в указанных помещениях с соответствующей записью в журнале. Характеристики возможных вредных веществ, при химическом выделении биологически активных веществ из сосюреи спорной.

Таблица 43. Характеристика вредных веществ по ГН 2.1.5.689-98[190]

№ п/п	Название вещества (формула)	Физические свойства	Класс опасности, Величина ПДК (мг/м3)	Общий характер воздействия	Первая помощь
1.	Буганол	бесцветная жидкость чуть маслянистая жидкость с характерным запахом сивушного масла	3, 10	раздражает глаза и дыхательные пути человека, могут вызвать у него головные боли, головокружение, токсическое действие на центральную нервную систему.	при попадании на слизистые, промыть большим количеством воды и использовать средства содержащие пантенол
2.	Этилацетат	Бесцветная подвижная жидкость с резким запахом эфира. Температура воспламенения 400 °С	4, 200	Оказывает раздражающее действие на верхние дыхательные пути и слизистые оболочки	промывание желудка; при обмороке— вдыхание нашатырного спирта; при метгемоглобинемии — внутривенное введение 1% раствора метиленового синего, аскорбиновой кислоты и глюкозы.
3.	Хлороформ	Бесцветная прозрачная жидкость с резким характерным запахом, сладковатым, жгучим вкусом. Летуч.	2, 20	Оказывает токсическое действие на центральную нервную систему и внутр. органы, особенно на печень.	При остром ингаляционном отравлении — Сердечные средства: камфара (20%), кофеин (10%). кордиамин (25%) по 1—2 мл подкожно; успокаивающие

					средства,
4.	Этиловый спирт	Легко воспламеняющаяся бесцветная жидкость с характерным запахом. Область воспламенения 3,6-19%	4, 100	Токсическое воздействие на центральную нервную систему, поражает слизистые оболочки	При попадании на слизистые, промыть большим количеством воды и использовать средства содержащие пантенол
5.	Серная кислота (концентрированная)	Бесцветная маслянистая жидкость с химической формулой $H_2SO_4$	1, 2	Поражает дыхательные пути, кожу, слизистые оболочки.	Промыть большим количеством воды с мылом. При попадании на слизистые, промыть большим количеством воды и использовать средства содержание пантенол

Обозначения\*: ПДК – предельно допустимая концентрация; Класс опасности: 1 класс – чрезвычайно опасные; 2 класс – высокоопасные; 3 класс – умеренно опасные; 4 класс – малоопасные.

### 6.3.3. Повышенный уровень шума на рабочем месте

В результате гигиенических исследований установлено, что шум ухудшает условия труда, оказывая вредное воздействие на организм человека. При длительном воздействии шума на организм человека происходят нежелательные изменения: снижается острота зрения и слуха, повышается кровяное давление, притупляется внимание. Сильный продолжительный шум может быть причиной функциональных изменений сердечнососудистой и нервной системы.

В химической лаборатории установлены предельно допустимые уровни звукового давления и звука, указанные в таблице 44[191].

Таблица 44 – Значение предельно допустимого звукового давления.

Показатель	Значения								
	31,5	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000
Уровень звукового давления в октавных полосах, дБ	103	91	83	77	73	70	68	66	64
Эквивалентный уровень звука, дБА	75								

Согласно таблице, предельно допустимый уровень звукового давления составляет  $L_{max} = 75$  дБ. Иными словами, шум, создаваемый работой компьютеров, по своим характеристикам удовлетворяет санитарным нормам.

#### 6.3.4. Недостаточная освещенность рабочей зоны

В данной лаборатории используют искусственное и естественное освещение, поскольку работа в основном зрительная, то естественного освещения недостаточно, особенно в темное время суток.

Правильно спроектированное и выполненное освещение обеспечивает высокий уровень работоспособности, оказывает положительное психологическое действие на человека и способствует повышению производительности труда. При выборе типа светильников следует учитывать светотехнические требования, экономические показатели, условия среды.

В помещении в качестве источников искусственного освещения используются люминесцентные лампы типа ОД. Лампы ОД (открытые двухламповые) предназначены для помещений с хорошим отражением потолка и стен, допускаются при умеренной влажности и запыленности. Согласно санитарно – гигиеническим требованиям рабочее место должно освещаться естественным и искусственным освещением. Лаборант постоянно работает за персональным компьютером, напрягая при этом зрение. По нормам освещения и отраслевым нормам освещения [192] в помещении при работе с ПК рекомендуется 300 - 500 лк при общем освещении.

Помещение имеет размеры:

А - длина помещения - 5 м;

В- ширина - 5 м;

h - высота - 3 м.

Рекомендуемая освещенность помещения, при среднем контроле различия с тёмным фоном, составляет  $E = 300 \text{лк}$  [192, 193]. Коэффициент отражения светового потока от потолка (свежепобеленного), стен (свежепобеленных, с окнами без штор), соответственно равны:  $\rho_{\text{п}}=70\%$ ,  $\rho_{\text{с}}=50\%$  [194]. Уровень от рабочей поверхности до потолка составляет:

$$H = h - h_{\text{р}} - h_{\text{с}}$$

Где, h - высота помещения

$h_{\text{р}}$  - высота рабочей поверхности;

$h_{\text{с}}$  - расстояние светильников от перекрытия.

$$H = 3\text{м} - 0,80\text{м} - 0\text{м} = 2,2 \text{ м}$$

Для освещения используются светильники типа ОД мощностью 40 Вт, для которых оптимальность расположения светильников составляет  $\lambda=1.4$ .

Расчетная длина между двумя рядами светильников:

$$L = \lambda \times h = 1,4 \times 2,2 = 3,08 \text{ м}$$

Число рядов светильников:

$$n = B/L = 5/3,08 = 1,62 \approx 2$$

где, В – ширина помещения, м; L-расчетная длина между двумя рядами светильников, м.

Выбираем  $n=2$  ряда светильников. Тогда индекс помещения рассчитываем по формуле [194]:

$$i = \frac{S}{(A+B) \times H} = \frac{25}{(5+5) \times 2,2} = 1,14, \text{ где}$$

S – площадь помещения,  $\text{м}^2$ ; А – длина помещения, м; В – ширина помещения, м, H – высота светильников над рабочей поверхностью

Коэффициент отражения светового потока от потолка (свежепобеленного), стен (свежепобеленных, с окнами без штор), соответственно равны:  $q_{п}=70\%$ ,  $q_{с}=50\%$ , индекс освещения 1,1 [194], коэффициент использования светового потока можно определить по таблице [194], который в данных условиях будет равен 0,51.

Световой поток лампы ЛБ, мощностью 40 Вт составляет  $F_0=2800$  лм[28]. Тогда световой поток светильника ОД, состоящего из двух ламп:  $F=2F_0=2 \times 2800=5600$  лм.

Преобразуем формулу светового потока светильника  $\Phi = \frac{E \times S \times Z \times K}{N \times \eta}$  [194] и

определим необходимое число светильников в ряду:

$$N = \frac{E \times S \times Z \times K}{F \times \eta} = \frac{300 \times 25 \times 1,15 \times 1,5}{5600 \times 0,51} = \frac{12937,5}{2856} = 4,53 \approx 5$$

где,  $E=300$  – требуемая освещенность, лк

$S=25$  – площадь освещаемого помещения, м<sup>2</sup>

$Z=1,15$  – коэффициент неравномерности освещения;

$K=1,5$  – коэффициент запаса (помещения с малым выделением пыли)[194].

$F=5600$  – световой поток светильника, лм.

$\eta=0,51$  – коэффициент использования светового потока.

При длине светильника  $l_{св} = 0,933$  м, их общая длина составляет:

$$l_{общ} = N \times l_{св} = 5 \times 0,933 = 4,66 \text{ м}$$

Таким образом, в лаборатории необходимо установить по 5 светильников в два ряда.

#### **6.4. Анализ выявленных опасных факторов, которые могут возникнуть в лаборатории при проведении исследования**

##### **6.4.1. Электробезопасность**

По действующим правилам устройства электроустановок (ПЭУ) лабораторные помещения с точными приборами относятся к 1 категории по степени опасности поражения электрическим током

В настоящее время оснащение химической лаборатории электрооборудованием высоко. Обеспечение электробезопасности в лаборатории следуют в соответствии по ГОСТу 12.1.013-98[195]. Источниками электроопасности могут быть: сушильный шкаф, электрические плитки, магнитные мешалки, комплекс вольтамперометрический, компьютер для обработки данных. Работу с электрооборудованием и электрическими приборами, находящимися под напряжением, нужно выполнять с применением электрозащитных средств (диэлектрических резиновых перчаток, галош, ковров, изолирующих подставок). При напряжении в 42В и более, электроприборы надежно заземлены и при аварийной ситуации происходит защитное выключение. Все розетки должны быть промаркированы для определения ее напряжения. Строго запрещается работать на неисправных электрических приборах и установках. При чрезвычайных происшествиях нужно оказать первую медицинскую помощь, которая состоит из двух этапов это освобождение пострадавшего от действия тока и оказания ему доврачебной медицинской помощи. Нужно избавить как можно быстрее пострадавшего от действия тока, и сразу же оказать медицинской помощи, так как исход поражения зависит от длительности прохождения тока через человека.

#### **6.5. Требования к способам обеспечения пожарной безопасности, предотвращения пожара**

В целях защиты жизни, здоровья, имущества людей, работающих в лаборатории, и имущества лаборатории принимается закон технического регулирования и устанавливает требования пожарной безопасности (Федеральный закон от 22.07.2008 N 123-ФЗ (ред. От 02.07.2013) «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности») [196]. Научно-исследовательская лаборатория кафедры фармацевтического анализа СибГМУ относится к классу Д, к зоне с пониженной пожароопасностью.

Пожар на рабочем месте может возникнуть при использовании неисправного электрооборудования, при коротком замыкании, при использовании открытых нагревательных приборов, при очистке, перегонке легковоспламеняющихся растворителей.

Таблица 45 – Легковоспламеняющиеся жидкости, используемые при выполнении ВКР

Наименование вещества	Температура кипения, °С	Температура вспышки, °С	Температура самовоспламенения, °С
Этанол	78,39	13	363
Этилацетат	77,00	2	400

В соответствии с правилами пожарной безопасности в химической лаборатории на видном месте должен быть жидкостный или углекислотный огнетушитель у входной двери. Горящие нерастворимые в воде вещества нельзя тушить водой (битум, масло, бензин, бензол), а также загоревшуюся электропроводку тушить водой нельзя. В этих случаях нужно применять углекислотный огнетушитель, сухой песок, или покрывать очаг пожара асбестом.

### 6.6. Экологическая безопасность

При исследовании химического состава сосюреи спорной возможны некоторые вредные воздействия на воздушную среду, воду и может произойти загрязнение почвы. Чтобы исключить загрязнения, в таблице 46, приведены природоохранные мероприятия.

Таблица 46 – Вредные воздействия на окружающую среду и природоохранные мероприятия при исследовании химического состава сосюреи спорной

Природные ресурсы и компоненты окружающей среды. НД, регламентирующие экологические показатели	Вредные воздействия, источники загрязнения	Природоохранные мероприятия
	Летучие вещества,	Использование

Атмосфера	применяемые в ходе работы (Хлороформ, этилацетат)	герметичного оборудования и шлифов;
Гидросфера	Попадание в общую систему водоотведения реактивов, кислот и щелочей	Организация слива неорганических и органических отходов;
Литосфера	Химическое загрязнение почвы при неверной утилизации органических отходов, реактивов	Соблюдение правил верного сбора и хранения твердых органических и неорганических отходов; Организация утилизации органических отходов

Таким образом, основными природоохранными мероприятиями является создание системы сбора, хранения и утилизации неорганических и органических отходов, образующихся в результате работы.

### **6.7. Безопасность в чрезвычайных ситуациях и чрезвычайные ситуации**

Чрезвычайная ситуация (ЧС) – это совокупность таких обстоятельств, которые сопровождаются разрушениями зданий, сооружений, материальных ценностей, поражению и гибелью людей.

Чрезвычайную ситуацию можно квалифицировать следующим образом:

1. ЧС, связанная с производственными авариями (пожары, взрывы, выброс вредных веществ в окружающую среду);
2. ЧС, связанная со стихийными бедствиями (землетрясения, наводнения, ураганы, смерчи, снежные бури, заносы, оползни, обвалы, эпидемии, лесные и торфяные пожары);
3. ЧС конфликтного характера (вооруженное нападение, волнения в отдельных районах, вызванные выступлениями экстремистских групп, применения оружия массового поражения).

При выполнении научной работы может возникнуть чрезвычайная ситуация замыкание проводки и возгорание. По возможности, пламя необходимо потушить песком, но перед этим необходимо сообщить руководителю. Соблюдая все правила с электрическим оборудованием



можно избежать ЧС.К чрезвычайным ситуациям в лаборатории относится возникновение пожара на рабочем месте. В случае пожара ЧС предусмотрены первичные средства пожаротушения: огнетушители ОП-10 и ОУ-5 для тушения электрооборудования.

Для защиты работающих от вредных выбросов в случае аварийных выбросов необходимо использовать средства индивидуальной защиты (халат, перчатки, очки из органического стекла, респираторы).

Во избежание таких ситуаций предпринимается ряд мер:

- прохождение инструктажа по технике безопасности;
- постоянный контроль и отбраковка, имеющей сколы и трещины, лабораторной посуды;
- применение средств индивидуальной и коллективной защиты.

Для исключения получения травм и порезов не рекомендуется работать с битой и имеющей сколы посудой.

В случае возникновения пожара эвакуация людей проводится согласно плану эвакуации (рисунок 23)

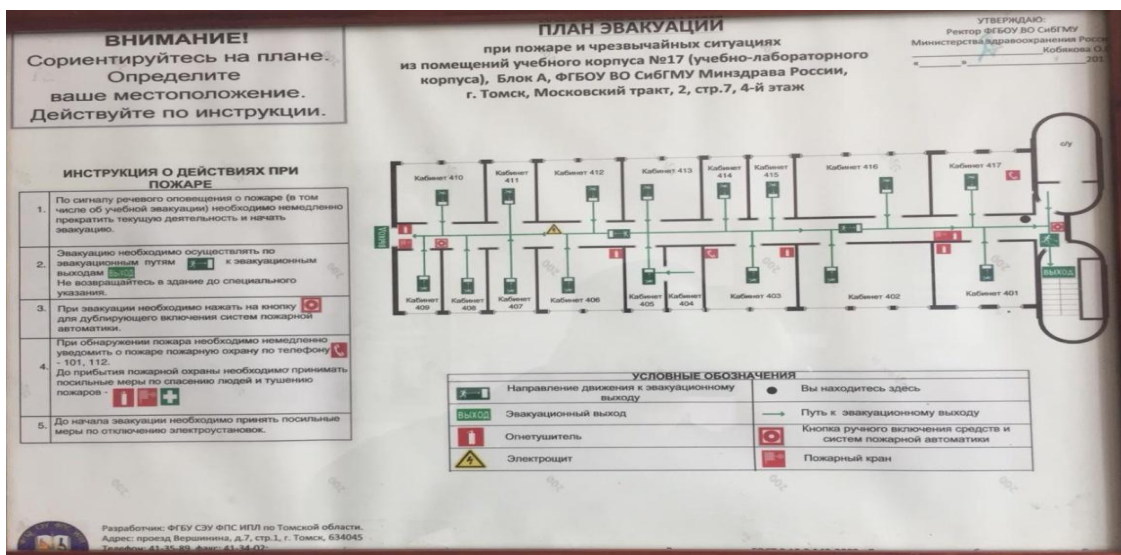


Рисунок 23. План эвакуации из аудитории 401, в которой расположена научно-исследовательская лаборатория кафедры фармацевтического анализа СибГМУ.

### Выводы

1. Рассмотрены условия труда на рабочем месте в химической лаборатории кафедры фармацевтического анализа СибГМУ, проведен анализ вредных производственных факторов.
2. Рассмотрено влияние химических веществ на экологическую безопасность (атмосферу, гидросферу и литосферу), описаны меры предупреждения загрязнения окружающей среды.
3. При разработке данного раздела выявлена недостаточная освещенность рабочего места. В связи с этим произведен расчет необходимого количества светильников, согласно норме, число рядов светильников составило:  $n = B/L = 5/3,08 = 1,62 \approx 2$ , количество светильников ряду составило:  $N=5$ . Таким образом, для создания необходимого освещения требуются два ряда светильников по 5 штук в каждом.

### ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Согласно анализу литературных данных, *S. controversa* DC. является перспективным объектом для исследования фармакологического воздействия на ключевые патогенетические звенья остеомиелита, выявления целевых групп БАВ, ответственных за биологическую активность, их стандартизации для разработки и внедрения НД в фармацевтическую практику.

2. Листья *S. controversa* DC. содержат сесквитерпеновые лактоны, сапонины, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды ( $1,20\% \pm 0,05\%$ ), фенолкарбоновые кислоты ( $4,46\% \pm 0,76\%$ ), полисахариды, аминокислоты.

3. Хроматографическими методами (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) впервые для данного вида идентифицированы фенолкарбоновые кислоты (коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая, хинная, салициловая), аминокислоты (валин, аргинин, треонин, лизин, глицин), флавоноиды (кверцетин, рутин, кемпферол, дигидрокверцетин), кумарины (умбеллиферон, эскулетин), тритерпеновые сапонины (олеаноловая и урсоловая кислоты).

4. Полисахаридные комплексы водного извлечения и экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. охарактеризованы по молекулярно-массовому распределению, содержанию белка, количественному соотношению и мономерному составу нейтральных и кислых сахаров. Технологический выход фракций ПС составил: ФПС<sub>1</sub> (1,93% ± 0,35%); ФПС<sub>2</sub> (0,74% ± 0,16%); ФПВ (10,52% ± 1,58%) и из экстракта на 40% этаноле: ПССЭ (6,15 ± 0,62%). Основными структурными мономерами ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и ПССЭ являются галактоза и арабиноза, а  $\Sigma$ ПВ – уроновые кислоты.

5. В результате проведенных исследований установлены целевые БАВ экстракта *S. controversa*: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина, 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина, рутин), перспективные для дальнейшего изучения их биологической активности.

6. Все целевые БАВ экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. проявляют в эксперименте статистически достоверную остеогенную активность, стимулируя дифференцировку ММСК в остеобласты, в ряду: хелидоновая кислота < гликозиды кверцетина < полисахариды. По величине стимулирования NO-синтазной активности макрофагов целевые БАВ формируют следующий ряд: рутин < кверцетин-3-О- $\beta$ -D-диглюкопиранозил-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид < кверцетин-7-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид < хелидоновая кислота < полисахариды.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют что *S. controversa* DC. является ценным источником БАВ, перспективных для разработки активных фармацевтических субстанций с остеогенным и иммуотропным действием.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.Ю. Исследование активности экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите методом трехфазной сцинтиграфии / Е.Ю. Авдеева, М.А. Зоркальцев, В.Д. Завадовская, Г.В.Слизовский, Е.А. Краснов, Г.В. Пехенько, М.Ю. Степанов // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – №3. – С.5–9.
2. Авдеева, Е.Ю. Содержание полисахаридов в надземной части *Saussurea controversa* DC / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов // Химия раст. сырья. – 2015. – №3. – С.43–48.
3. Авдеева, Е.Ю. Биохимическое исследование активности экстрактов *Saussurea controversa* DC. и *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева, Э.В. Сапрыкина Г.В. Слизовский, Е.А. Краснов, М.Ю. Степанов, В.Г. Пехенько // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – №2. – С. 5–12.
4. Авдеева, Е.Ю. Содержание флавоноидов в надземной части *Saussurea controversa* DC. (Asteraceae) / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – № 2. – С.28–29.
5. Авдеева, Е.Ю. Компонентный состав фенольных соединений семи видов *Saussurea* / Е.Ю. Авдеева, Л.Н. Зибарева, Е.А.Кастерова, Я.Е. Решетов, М.Н. Шурупова, М.В. Белоусов // Химия раст. сырья. – 2018. – №4. – С. 197–204.
6. Авдеева, Е.Ю. 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, М.Г. Скороходова, И.В.Суходоло, Е.Д. Порохова, Г.В. Слизовский, Л.С. Муштоватова, Я.Е. Решетов, С.Д. Иванов, М.В. Белоусов // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – №3. – С. 6–14.
7. Авдеева, Е.Ю., Исследование фенольных соединений сосюреи спорной: «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья»

- материалы V Всеросс. конф. с междунар. участием / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов, С.Н. Соколова. – Барнаул, 2012. – С. 259–260.
8. Авдеева, Е.Ю. Исследование элементного состава Соссюреи спорной: «Актуальные проблемы современной науки» сборник материалов XI Телеконференции с международным участием / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов. – Томск, 2013. – С. 102–103.
  9. Авцын, А.П. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
  10. Ахмедов, Р. Растения — твои друзья и недруги / Р. Ахмедов. – Уфа: Китап, 2008. – 480 с.
  11. Бакуридзе, А.Д. Иммуномодуляторы растительного происхождения / А.Д. Бакуридзе, М.Ш. Курцикидзе, В.М. Писарев, Р.В. Махарадзе, Д.Т. Берашвили // Химико-фармацевтический журнал. – 1993. – № 8. – С. 43–49.
  12. Белохвостикова, Т.С. Иммунологическое прогнозирование нарушений регенерации костной ткани / Т.С. Белохвостикова, И.М. Михалевич // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – №3. – С. 98–104.
  13. Березовская, Т.П., Методы микроскопического анализа ботанических объектов / Т.П. Березовская, Н.В. Доцинская, Е.А.Серых. – Томск: Красное знамя, 1978. – 139 с.
  14. Беслекоев, У.С. Восстановление дефектов длинных костей конечностей после огнестрельных остеомиелитов / У.С. Беслекоев, М.М. Федосеев, А.Н. Анипченко // Воен.- мед. журн. – 2005. – №6. – С. 19–21.
  15. Бобожонов, А.А. Лекарственное растение Сирень обыкновенная / А.А. Бобожонов, И.Д. Кароматов // Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина». – 2017. – №6. – С.48–53.
  16. Борсук, О.С. Исследование влияния препаратов растительного происхождения, на развитие иммунного ответа / О.С. Борсук, Н.В. Масная, Е.Ю.Шерстобоев, Н.В. Исайкина, Г.И. Калинкина, Д.В. Рейхарт // Бюллетень

- экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т.151. – №2. – С.157–159.
17. Быструшкина, Е.В. Биохимическое разнообразие горькуш высокогорий Урала / Е.В. Быструшкина, Л.И. Алексеева, А.Г. Быструшкин // *Turczaninowia*. – 2012. – №15. – С. 114 – 119.
  18. Винник, Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика / Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, А.А. Шагеев // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2009. – № 6. – С. 12–15.
  19. Винник, Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика / Ю.С. Винник, Е. И. Шишацкая, Н. М. Маркелова, А. П. Зуев // *Московский хирургический журнал*. – 2014.– №2. – С.50–53.
  20. Волхонская, Т.А. Биологически активные вещества растений рода *Соссюреи*: тез. докл. науч. конф. «Лекарственные растения в традиционной и народной медицине» / Т.А. Волхонская, И.М. Красноборов, О.И. Фролова. – Улан-Удэ, 1987. – С. 38–39.
  21. Вылцан, Н.Ф. Определитель растений Томской области / Н. Ф. Вылцан. – Томск: Изд-во Томского Университета, 1994. – 301 с.
  22. Гаврилов, А.Н. Клинические, морфологические и бактериологические характеристики остеомиелитического очага и перифокальной области / А.Н. Гаврилов, Е.В. Перова // *Фундаментальные исследования*. – 2005. – № 5 – С. 44–45.
  23. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения (Растения-целители) / А.Ф. Гаммерман, Г.Н. Кадаев, А.А. Яценко-Хмелевский. – М.: Высшая школа, 1990. – 544 с.
  24. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.

25. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2018. – Т.2. – 1814 с.
26. Гринев, М.В. Остеомиелит. / М.В.Гринев. – М.: Медицина, 1977. – 152 с.
27. Дейнека, В.И. Каротиноиды лепестков цветков календулы / В.И. Дейнека, И.А. Гостищев, М.Ю. Третьяков, И.В. Индина // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: естественные науки. – 2011. – №15-2. – С.277– 285.
28. Дейнеко, И.П. Элементный и групповой химический состав коры и древесины осины / И.П. Дейнеко, Н.М. Фаустова // Химия растительного сырья. – 2015. – №1. – С. 51–62.
29. Дутова, С.В. Перспективы исследования иммуностропных фитопрепаратов / С.В.Дутова, М.Р. Карпова // Вестник Хакасского Государственного Университета им. Н.Ф. Катанова. – 2016. – №18. – С.117–121.
30. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений. / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, М.И. Смирнова-Иконникова, Н.П. Ярош, Г.А. Луковникова. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
31. Задорожный, А.М. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г.Кошкин, С.Я. Соколов, А.И. Шретер. – М.: Лесн. пром-ть, 1988. – 415 с.
32. Иванова, Н.В., Общая характеристика полисахаридов коры лиственницы / Н.В.Иванова, Р.Г. Оводова, В.А. Бабкин // Химия растительного сырья. – 2006. – №1. – С.15–20.
33. Изотова, М.А. Травник: Лучшие рецепты народной медицины / М.А. Изотова, Т.Ф. Плотникова, Ю.И. Кирова, Н.А. Сарафанова. – М.: Эксмо, 2007. – 896 с.
34. Касьянов, З.В. Анализ химического состава и противовоспалительная активность полисахаридного комплекса листьев Бодяка разнолистного /

- З.В.Касьянов, К.Л. Ганькова, М.В. Шустов, А.Г. Гольдштейн // Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т.20. – №8. – С. 94–98.
35. Кириченко, Е.Е. Исследования противовоспалительной активности полисахарида цветков пижмы обыкновенной / Е.Е. Кириченко, И.А. Сычев, Г.Ю. Чекулаева // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2012. – №3. – С.53–57.
36. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстикова. – Новосибирск: Тео, 2007. – 232 с.
37. Кочетков, Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков, А.Ф. Бочков, Б.А. Дмитриев, А.И. Усов, О.С. Чижов, В.Н. Шибяев. – М.: Химия, 1967. – 674 с.
38. Красноборов, И. М. Флора Сибири. Т. 13: Asteraceae (Compositae) / И. М. Красноборов. – Новосибирск: Наука, 1997. – 472 с.
39. Краснов, Е.А. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е.А. Краснов, Т.П. Березовская, Н.В. Алексеюк, Н.И. Белоусова, Л.А. Демиденко, В.В. Дудко, С.Е. Дмитрук, Г.И. Калинкина, Г.А. Романова. – Томск: Изд-во Томского университета, 1987. – 184 с.
40. Кутин, А.А. Гематогенный остеомиелит у взрослых / А.А.Кутин, Н.И. Мосиенко. – М.: Медицина и жизнь, 2000. – 224 с.
41. Лавренова, Г.В., Энциклопедия лекарственных растений / Г.В. Лавренова, В.К. Лавренов. – Донецк: Донеччина, 1997. – Т.1. – 279 с.
42. Лазурьевский, Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазурьевский, И.В. Терентьева, А.А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.
43. Ларькина, М.С. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого / М.С. Ларькина, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова // Химия растительного сырья. – 2008. – №3. – С. 71–74.



44. Леонова, С.М. Классификация хронического травматического остеомиелита / С.М. Леонова, А.В. Рехов, Д.Г. Данилов, А.В. Золотарев, И.А. Очиров // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 4. – С. 158–163.
45. Лигачева, А.А. Влияние способа получения на состав полисахаридов *Saussurea controversa* DC. и их NO-стимулирующую активность / А.А. Лигачева, Я.Е. Решетов, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т.22. – № 7. – С. 32–37.
46. Липшиц, С. Ю. Род *Saussurea* DC. (Asteraceae) / С. Ю. Липшиц. – Л., Наука, 1979. – 283 с.
47. Ловкова, М.Я. О возможности использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний / М.Я. Ловкова, Г.Н. Бузук, С.М. Соколова, Л.Н. Деревяго // Микроэлементы в медицине. – 2005. – №6. – С. 3–10.
48. Мазнев, Н.И. Высокоэффективные лекарственные растения / Н.И. Мазнев. – М.: Эксмо, 2012. – 608 с.
49. Максютин, Н.П. Растительные лекарственные средства / Н.П. Максютин, Н.Ф. Комиссаренко, А.П. Прокопенко. – К.: Здоров'я, 1985. – 280 с.
50. Маркова, А. Травник. Золотые рецепты народной медицины / А. Маркова. – М.: Эксмо, 2007. – 928 с.
51. Масликов, В.М. Актуальные вопросы хирургии детского возраста: 50 лет детской хирургии Томской области, Сб. науч. тр. Томского университета / В.М. Масликов, О.Н. Афанасьев, Л.Б. Ерошенко.– Томск, 1996. – С.48–50.
52. Микулич, Е.В. Современные принципы лечения хронического остеомиелита / Е.В. Микулич // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – № 2. – С.180–184.
53. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012 – 944 с.

54. Науменко, Н.И. К вопросу о секторных флористических границах в Южном Зауралье / Н.И. Науменко // Вестник Удмуртского Университета. – 2016. – Т.26. – №2. – С.75–83.
55. Новомлинский, В. В. Современные аспекты диагностики и лечения остеомиелита / В. В. Новомлинский, Н.А. Малкина, А.А. Андреев, А.А. Глухов, Е.В. Микулич // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С.122.
56. Николаева, И.Г. Микроэлементный состав сушеницы топяной / И.Г. Николаева, Г.Г. Николаева // Сибирский медицинский журнал. – 2005. – №6. – С. 64–65.
57. Оленников, Д.Н. Исследование химического состава алоэ древовидного (*Aloe Arborescens* Mill.) / Д.Н. Оленников, И.Н. Зилфикаров, Т.А. Ибрагимов // Химия растительного сырья. – 2010. – №3. – С. 77–82.
58. Перевозчикова, Т. В. Влияние экстрактов *Saussurea controversa* и *Fillipendula ulmaria* на иммунологическую реактивность крыс с экспериментальным остеомиелитом / Т. В. Перевозчикова, Е. Ю. Авдеева, Е. А. Файт, М. Г. Скороходова, Е. А. Краснов // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2016. – Т. 79. – № 6. – С. 68–72.
59. Погодин, И.С. Химический состав растений рода *Saussurea* DC. произрастающих на территории Сибири / И.С. Погодин, Е.А. Лукша, Н.А. Предейн // Химия растительного сырья. – 2014. – №3. – С.43–52.
60. Положий, А.В. Определитель растений юга Томской области / А.В. Положий, А.С. Ревушкин, В.В. Баранова. – Томск: Изд-во Томского Университета, 1985. – 211 с.
61. Пат. Российская Федерация, № 2587784, 06.01.2011. Композиции и способы полисахаридов алоэ / И. Е. Данхов – № 2587784, 2016.
62. Пат. Российская Федерация, № 2416415, 08.02.2010. Средство для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата человека и животных, в том

- числе переломов костей и заболеваний, связанных с дефицитом кальция в организме, на основе соли кальция / А. Л. Боришпольский, Г. Ю. Князькин, С. А. Малютин, О. В. Полухин, И. П. Пьянзина – № 2416415, 2011
63. Пат. Российская Федерация, № 2584402, 18.03.2015. Способ моделирования травматического остеомиелита / Е.Ю. Авдеева, Г.В. Слизовский, М.Г. Скороходова, Т.И. Фомина, М. А. Зоркальцев, В. В. Иванов, Е. А. Краснов – № 2584402, 2016.
64. ПНД Ф 16.1:2.3:3.11-98. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений содержания металлов в твердых объектах методом спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. М., 1998. 31 с.
65. ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011 Количественный химический анализ почв. Методика измерения массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения спектральными методами. М., 2011.38 с.
66. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11.08.2005 № 520 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным остеомиелитом».
67. Решетов, Я.Е. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* / Я.Е. Решетов, М.В. Белоусов, Е.Ю. Авдеева, М.Н. Шурупова // Химия растительного сырья. – 2018. – №4. – С. 205–214.
68. Решетов, Я.Е. Полисахариды трех видов *Saussurea* DC (*S. controversa*, *S. salicifolia*, *S. frolovii*): выделение, характеристика и влияние на NO-продуцирующие свойства макрофагов / Я.Е. Решетов, А.А. Лигачёва, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, В.В. Головченко, Е.С. Трофимова, Е.И. Гулина, Е.Ю. Шерстобоев, А.М. Гурьев, К.И. Ровкина, С.В. Кривощек, М.В. Белоусов // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 77–85.

69. Родионова, Л.В. Изменение показателей минерального обмена у больных хроническим остеомиелитом / Л.В. Родионова, С.В. Леонова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 4. – С. 278–282.
70. Рыбалко, К.С. Природные сесквитерпеновые лактоны / К.С. Рыбалко. – М.: Медицина, 1978. – 319 с.
71. Рюшина, В.А. Идентификация биологически активных компонентов *Aloe arborescens* Mill. / В.А. Рюшина, Н.Г. Габрук, Т.А. Шутеева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2010. – вып. 10. – №3. – С.93–96.
72. Сакович, Н.В. Современные аспекты этиологии, диагностики и лечения остеомиелита / Н.В. Сакович, А.А. Андреев, Е.В. Микулич, А.П. Остроушко, В.Г. Звягин // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2018. – Т.11. – №1. – С. 70–79.
73. Салохин, А.В. Стоматография листьев короткокорневищных видов *Cypripedium* (Orchidaceae) Восточной Сибири и Дальнего Востока / А.В.Салохин, С.А. Волкова, П.Г. Горовой // Turczaninowia. – 2005. – №8. – С.69–74.
74. Свиридова, Т.П. Биологические особенности *Saussurea controversa* DC. (Asteraceae) при интродукции на юге Томской области / Т.П. Свиридова // Вестник Томского государственного университета. – 2012. – №356. – С.176–178.
75. Свиридонов, Г.М. Полезные растения Горного Алтая / Г.М. Свиридонов. – Горно-Алтайск: Алтайское книжное изд-во, 1978. – 231 с.
76. Скалозубова, Т.А. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Фармация. – 2012. – №2. – С. 5–7.

77. Соколов, П.Д. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, и их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae) / П.Д. Соколов. – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
78. Соколова, С.Н. Изучение химического состава и биологической активности *Saussurea controversa*: тез. докл. науч. конф. «Всероссийская 70-я итоговая научная студенческая конференция им. Н.И. Пирогова» / С.Н. Соколова. – Томск, 2011. – С.233-234.
79. Степочкин, С. Сборник народных рецептов лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата / С. Степочкин. – Екатеринбург: Издательские решения, 2015. – 614 с.
80. Сырчина, А.И., Семенов А.А. Иммуномодуляторы из *Saussurea controversa* и *Cirsium setosum*: тез. докл. науч. конф. посвященной памяти В.Г.Минаевой «Физиолого-биохимические аспекты изучения лекарственных растений», / А.И. Сырчина, А.А. Семенов. – Новосибирск, 1998. – С.61–62.
81. Телятьев, В.В. Целебные клады Восточной Сибири / В.В. Телятьев. – Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство, 1976. – 445 с.
82. Телятьев, В.В. Полезные растения Центральной Сибири / В.В. Телятьев. – Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство, 1985. – 384 с.
83. Федосеева, А.А. Состав и антирадикальная активность экстрактов сирени / А.А. Федосеева, О.С. Лебедкова, Л.В. Каниболоцкая, А.Н. Шендрик, В.В. Дудзинская, Л.Н. Ткаченко, Н.В. Шинева // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т.45. – №2. – С.29–30.
84. Хобракова, В.Б. Влияние фенольных и полисахаридных соединений растительного происхождения на состояние иммунной системы организма при экспериментальной иммунодепрессии / В.Б. Хобракова, Д.Н. Оленников // Вестник Бурятского государственного университета. – 2012. – № S 3. – С.176–181.

85. Шарова, О.В. Флавоноиды цветков календулы лекарственной / О.В. Шарова, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65–68.
86. Яковлева, О.А. Антимикробная и антиоксидантная активность сирени сорта «М. Шолохов» *in vivo* и в культуре *in vitro* / О.А. Яковлева, Л.А. Любаковская // Вестник ВГМУ. – 2010. – Т.9. – №1. – С. 1–6.
87. Ajay, S. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents / S. Ajay, K. Dharambir, S. Katrin, S. T. Hardeep, K. S. Anil // Pharmaceutical Patent Analyst. – 2018. – Vol.7. – P.15–32.
88. An, J. Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption / J. An, D. Hao, Q. Zhang, B. Chen, R. Zhang, Y. Wang, H. Yang // International Immunopharmacology. – 2016. – Vol. 36. – P. 118–131.
89. Avdeeva, E. Chemical analysis of bioactive substances in seven siberian Saussurea species / E. Avdeeva, Ya. Reshetov, M. Belousov, M. Shurupova, L. Zibareva, E. Borisova // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1899. – P. 050001-1–050001-7.
90. Avdeeva, E. Flavonol glycosides from Saussurea controversa and their efficiency in experimental osteomyelitis / E. Avdeeva, E. Shults, M. Skorokhodova, Ya. Reshetov, E. Porokhova, I. Sukhodolo, E. Krasnov, M. Belousov // Planta medica international open. – 2018. – Vol. 5. – № 01. – P. e24–e29.
91. Avdeeva, E. 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, E. Shults, T. Rybalova, Ya. Reshetov, E. Porokhova, I. Sukhodolo, L. Litvinova, V. Shupletsova, O. Khaziakhmatova, I. Khlusov, A. Guryev, M. Belousov // Biomolecules. – 2019. – Vol.9. – № 189. – P. 1–12.

92. Balick, M. *Rodale's 21st-Century Herbal: A practical guide for healthy living using nature's most powerful plants* / M. Balick. – Pennsylvania: Rodale Inc., 2014. – 512 p.
93. Bansal, V. P. Humoral immune responses in osteomyelitis / V. P. Bansal, P. K. Mittal, G. Ashokraj // *International Orthopaedics*. – 1992. – № 16. – P. 297–301.
94. Barrio, D.A. Vanadium and bone development: putative signaling pathways / D.A. Barrio, S.B. Etcheverry // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol.84. – P. 677–686.
95. Belian, M.F. Synthesis and characterization of Cr (III), Mn (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II), and Zn (II) complexes with 2,6 pyridinedicarboxylic acid, chelidamic acid, and chelidonic acid / M.F. Belian, V.E. Silva, G.F. de Sa, S. Alves, R.F. de Farias // *Synthesis and reactivity in inorganic, metal-organic, and nano-metal chemistry*. – 2014. – Vol. 44. – P.1461–1463.
96. Bogdanova, L.S. Carotenoids of the lipid complex of *Gnaphalium uliginosum* / L.S. Bogdanova, M.P. Strukova, G.A. Fedorova // *Chemistry of natural compounds*. – 1983. – Vol.19. – №2. – P. 232.
97. Bonaventura, P. Zinc and its role in immunity and inflammation / P. Bonaventura, G. Benedetti, F. Albarède, P. Miossec // *Autoimmunity reviews*. – 2015. – Vol.14. – P. 277–285.
98. Chik, W.I. *Saussurea involucrata*: A review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine / W.I. Chik, L. Zhu, L.L. Fan, T. Yi, G.Y. Zhu, X.J. Gou, Y.N. Tang, J. Xu, W.P. Yeung, Z.Z. Zhao, Z.L. Yu, H.B. Chen // *Journal of ethnopharmacology*. – 2015. – Vol. 172. – P. 44 – 60.
99. Choi, K.C. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum* / K.C. Choi, Y.O. Son, J.M. Hwang, B.T. Kim, M. Chae, J.C. Lee // *Pharmaceutical Biology*. – 2016. – Vol. 55. – P. 611–619.

100. Cui, Y. Preparation of *Lentinula edodes* polysaccharide-calcium complex and its immunoactivity / Y. Cui, H. Yan, X. Zhang // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2015. – Vol. 79. – P. 1619–1623.
101. Dan, S. Flavonoids of herba *Epimedii* enhances bone repair in a rabbit model of chronic osteomyelitis during post-infection treatment and stimulates osteoblast proliferation in vitro / S. Dan, Z. Yang, S. Lifeng, Z. Rongzong // *Phytotherapy research*. – 2017. – Vol.5. – №.31. – P. 330–339.
102. Dong-Sung, L. Pulchellamin G, an amino acid-sesquiterpene lactone, from *Saussurea pulchella* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via heme oxygenase-1 expression in murine peritoneal macrophages / L. Dong-Sung, C. Hyun-Gyu, W. Kyeong Wan, K. Dae-Gil, L. Ho-Sub, O. Hyuncheol, L. Kang Ro, K. Youn-Chul // *European journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 715. – P. 123–132.
103. Du, L. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide inhibits osteoporosis by promoting osteoblast formation and blocking osteoclastogenesis through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway / L. Du, M. N Nong, J. M. Zhao, X. M. Peng // *Scientific reports*. – 2016. – № 6. – P. 1–12.
104. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith // *Anal. Chem.* – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.
105. Dudareva, M. The microbiology of chronic osteomyelitis: changes over ten years / M. Dudareva, A.J. Hotchen, J. Ferguson, S. Hodgson, M. Scarborough, B.L. Atkins, M.A. McNally // *Journal of infection*. – 2019. – Vol.79. – №3. – P. 189–198.
106. Dudek, M.K. Hydroxycinnamoyl derivatives and secoiridoid glycoside derivatives from *Syringa vulgaris* flowers and their effects on the pro-inflammatory responses of human neutrophils / M.K. Dudek, B. Michalak, M. Woźniak, M.E. Czerwińska, A. Filipek, S. Granica, A.K. Kiss // *Fitoterapia*. – 2017. – Vol.121. – P. 194–205.



107. Eid, A. M. Some immunological aspects of staphylococcal haematogenous osteomyelitis / A. M. Eid, H. Eisa, A. Deif // Archives of orthopaedic and traumatic surgery. –1980. – № 96. – P. 221–224.
108. Eiji, T. Dietary phosphorus in bone health and quality of life / T. Eiji, Y. Hironori, Y.O. Hisami, T. Yutaka // Nutrition reviews. – 2012. – Vol. 70. – P. 311–321.
109. European Pharmacopoeia 6th Edition / Council of Europe European (COE) - European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) // Two Volumes. – 2007. – 4392 p.
110. Fantoni, M. Systemic antibiotic treatment of chronic osteomyelitis in adults / M. Fantoni, F. Taccari, F. Giovannenze // European review for medical and pharmacological sciences. – 2019. –Vol.23. – №2. – P. 258–270.
111. Ferreira, S.S. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review / S.S. Ferreira, C.P. Passos, P. Madureira, M. Vilanova, M.A. Coimbra // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 132. – P. 378–396.
112. Folwarczna, J. Effects of natural phenolic acids on the skeletal system of ovariectomized rats / J. Folwarczna, M. Zych, J. Burczyk, H. Trzeciak, I. Henryk, H.I. Trzeciak // Planta Medica. – 2009. – Vol. 75. – P. 1567–1572.
113. Folwarczna, J. Effects of caffeic and chlorogenic acids on the rat skeletal system / J. Folwarczna, M. Pytlik, M. Zych, U. Cegiela // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2015. – №19. – P. 682–693.
114. Forrest, H.N. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone / H.N. Forrest, J.S. Barbara // Journal of trace elements in medicine and biology. – 2009. – Vol. 23. – P. 195–203.
115. Fung, F.M. Extraction, separation and characterization of endotoxins in water samples using solid phase extraction and capillary electrophoresis-laserinduced fluorescence / F.M. Fung, M. Su, H.T. Feng, S.F.Y. Li // Scientific reports. – 2017. –Vol.7. – P.1–10.

116. Geurts, J. Treatment strategies for chronic osteomyelitis in low- and middle-income countries: systematic review / J. Geurts, A. Hohnen, T. Vranken, P. Moh // *Tropical medicine & international health*. – 2017. – Vol. 22. – №9. – P. 1054–1062.
117. Green, L.C. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum // *Analytical Biochemistry*. – 1982. – Vol.126. – P. 131–138.
118. Hari, M. D. Ferulic acid, a dietary polyphenol suppresses osteoclast differentiation and bone erosion via the inhibition of RANKL dependent NF-κB signalling pathway / M. D. Hari, S. Snigdha, G. Ramamoorthi, R. Mahaboobkhan // *Life sciences*. – 2018. – Vol.207. – P. 284–295.
119. Hisashi, M. Effects of sesquiterpenes and amino acid–sesquiterpene conjugates from the roots of *Saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide activated macrophages / M. Hisashi, T. Iwao, N. Kiyofumi, K. Tadashi, M. Toshio Y. Masayuki // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2003. – Vol. 11. – P. 709–715.
120. Horcajada, M.N. Naturally plant-derived compounds: role in bone anabolism / M.N. Horcajada, E. Offord // *Current molecular pharmacology*. – 2012. – Vol.5. – P. 205–218.
121. Ibiza, S. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses / S. Ibiza, J.M. Serrador // *Inmunología*. – 2008. – № 27. – P. 103–117.
122. Iserin, P. *Encyclopédie des plantes médicinales* / P. Iserin, M. Masson, J.P. Restellini, E. Ybert. – Paris: Larousse, 2001. – 335 p.
123. Jiaju, Z. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines. Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications* / Z. Jiaju, X. Guirong, Y. Xinjian. – Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2011. – Vol.1. – 590 p.
124. Jiaju, Z. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines. Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications* / Z. Jiaju, X. Guirong, Y. Xinjian. – Berlin. Springer-Verlag Berlin, 2011. – Vol.4. – 669 p.

125. Jong, H.L. p-Coumaric acid stimulates longitudinal bone growth through increasing the serum production and expression levels of insulin-like growth factor 1 in rats / H.L. Jong, H.C.Yoon, H.K. Ho, S.B. Joon, W.J. Tae, P. Taekwang, P. Jinwoo, K.S. Uiseok, L. Hoon, H. J. Ji // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2018. – Vol. 505. – P. 1103–1106.
126. Jun-Li, Y. Phytochemicals and biological activities of *Saussurea* species / Y. Jun-Li, W. Rui, L. Lei-Lei, S. Yan-Ping // *Journal of Asian natural products research*. – 2010. – Vol. 12. – P. 162–175.
127. Khlusov, I. Comparative in vitro evaluation of antibacterial and osteogenic activity of polysaccharide and flavonoid fractions isolated from the leaves of *Saussurea controversa* / I. Khlusov, E. Avdeeva, V. Shupletsova, O. Khaziakhmatova, L. Litvinova, E. Porokhova, Ya. Reshetov, I. Zvereva, L. Mushtovatova, M. Karpova, A. Guryev, I. Sukhodolo, M. Belousov // *Molecules*. – 2019. – Vol.24. – № 20. – P. 1–15.
128. Kilani-Jaziri, S. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study / S. Kilani-Jaziri, I. Mokdad-Bzeouich, M. Krifa, N. Nasr, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira // *Drug Chem. Toxicol.* – 2017. – №40. – P. 416–424.
129. Krasnov, E.A. The composition of biological active substances and pharmacological activity of perspective species flora of Siberia: тез. докл. науч. конф. «Современные достижения в химии природных соединений и биотехнологии» / E.A. Krasnov, E. Yu. Avdeeva, Y.V. Gorina, E.Yu. Sherstoboev. – Новосибирск, 2012. – С. 37.
130. Kuriya, K. Antiosteoporotic effects of acer palmatum extract on osteoclastogenesis and osteoblastogenesis / K. Kuriya, M. Nishio, S. Wada, H. Katsuzaki, M. Nishise, H. Okamoto, H. Umekawa // *Journal of medicinal food*. – 2019. – Vol.22. – №4. – P. 1–9.

131. Kuroyanagi, G. Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E<sub>2</sub>- stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts / G. Kuroyanagi, H. Tokuda, N. Yamamoto, S. Kainuma // *Prostaglandins Other Lipid mediat.* – 2017. – Vol. 129 – P. 27–33.
132. Li, X., Deproteinization of polysaccharide from the *Stigma Maydis* by Sevag method / X. Li, R. Zhao, H.L. Zhou, D.H. Wu // *Advanced materials research.* – 2012. – Vol. 340. – P. 416–420.
133. Lima, A.L.L. Recommendations for the treatment of osteomyelitis / A.L.L. Lima, P. R. Oliveira, V.C. Carvalho, S. Cimerman, E. Savio // *The Brazilian journal of infectious diseases.* – 2014. – Vol.18. – №5. – P. 526–534.
134. Lingyun, Y. Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated *Saussurea involucrata*. / Y. Lingyun, Z. Qingsheng, X. Jie, S. Jian, Y. Xiaofan, Z. Bing, S. Huiming, N. // *Shengming International journal of biological macromolecules.* – 2012. – Vol.50. – P. 849–853.
135. Liu, H. Anti-inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages / H. Liu, S. Ma, H. Xia, H. Lou, F. Zhu, L. Sun // *Journal of ethnopharmacology.* – Vol. 222. – P. 201–207.
136. Mihaylova, D. Carotenoids, tocopherols, organic acids, carbohydrate and mineral content in different medicinal plant extracts / D. Mihaylova, R. Vrancheva, N. Petkova, M. Ognyanov, I. Deseva, I. Ivanov, M. Popova, A. Popova // *Zeitschrift für naturforschung C.* – 2018. – Vol. 73. – №11. – P. 439–448.
137. Moodie, R.L. Studies in paleopathology. Pleistocene examples of traumatic osteomyelitis / R.L. Moodie // *Ann. Med. Rist.* – 1926. – №19. – P. 413–418.
138. Mosmann, T.R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties / T.R. Mosmann, R.L. Coffman // *Annu Rev Immunol.* – 1989. – Vol. 7. – P. 145–173.

139. Niu, W. Starch-derived absorbable polysaccharide hemostat enhances bone healing via BMP-2 protein / W. Niu, Y. Wang, Y. Liu, B. Zhang // *Acta Histochem.* – 2017. – №.119. – P. 257 – 263.
140. Pandey, M. M. *Saussurea costus*: botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant / M. M. Pandey, S. Rastogi, A. K. S. Rawat // *Journal of ethnopharmacology.* – 2007. – Vol. 110. – P. 379–390.
141. Peters, K. M. Alteration in the pattern of macrophage subtypes in chronic osteomyelitis compared with acute joint infection / K. M. Peters, K. Koberg, T. Rosendahl, W. Schmutzler // *International orthopaedics.* – 1995. – № 19. – P. 162 – 166.
142. Rammal, H. Combining calcium phosphates with polysaccharides: a bone-inspired material modulating monocyte/macrophage early inflammatory response / H. Rammal, C. Bour, M. Dubus, L. Entz, L. Aubert, S. C. Gangloff, S. Audonnet, N.B. Bercu, F. Boulmedais, C. Mauprivez, H. Kerdjoudj // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – Vol.19. – P. 1–13.
143. Rovkina, K.I. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai / K.I. Rovkina, S.V. Krivoshchekov, A.M. Guryev, M.S. Yusubov, M.V. Belousov // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2018. – Vol. 44. – № 7. – P. 854–859.
144. Shikov, A. N. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia, history and applications / A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, H. Wagner, R. Verpoorte, M. Heinrich // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2014. – Vol.154. – P. 481–536.
145. Shurupova, M.N. Population structure, resource potential and diagnostic features of raw materials of *Saussurea controversa* DC. / M.N. Shurupova, E.P. Parshina, Ya. E. Reshetov, A.A. Krasnobaeva, E.Yu. Avdeeva, M. V. Belousov // *Tomsk State University journal of biology.* – 2019. – Vol.45. – P.34–46.

146. Song, Y.R. Enzyme-assisted extraction, chemical characteristics, and immunostimulatory activity of polysaccharides from Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) / Y.R. Song, S.K. Sung, M. Jang, T.G. Lim, C.W. Cho, C. J. Han, H. D. Hong // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – Vol. 116. – P. 1089–1097.
147. Suleimen, E. M. Constituent Composition of Essential Oil from *Saussurea pulchella* / E. M. Suleimen, Z. A. Ibataev, P. G. Gorovoi, R. V. Dudkin, K. A. Aubakirov, A. A. Tlepov, S. A. Ross // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2016. – Vol. 52. – №6. – P. 1127–1128.
148. Suzuki, R. Screening for natural medicines effective for the treatment of osteoporosis / R. Suzuki, S. Fukami, M. Tomomura, A. Tomomura, Y. Shirataki // *Journal of natural medicines*. – 2019. – Vol.73. – №1. – P.331–337.
149. Ting, Z. Chemical constituents from the genus *Saussurea* and their biological activities / Z. Ting, L. Shao – Jing, Z. Zhao – Xin, Z. Man – Li, S. Qing – Wen, G. Yu – Cheng // *Heterocyclic communications*. – 2017. – Vol.23. – P.1–28.
150. Troshchenko, A. T. Investigation of the chemical composition of *Saussurea Frolovii* Ldb. / A. T. Troshchenko, V. S. Kobrin // *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*. – 1965. – Vol. 1. – №4. – P. 286–262.
151. Waksmundzka-Hajnos, M. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* / M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska. – New York: CRC Press, 2008. – 874 p.
152. Wang, S.J. Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves / S.J. Wang, Y. Tong, S. Lu, R. Yang, X. Liao, Y. F. Xu, X. Li // *Planta Medica*. – 2010. – Vol. 76. – P. 1492–1496.
153. Wenbo, C. Two novel polysaccharides from the torus of *Saussurea laniceps* protect against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes / C. Wenbo, M. Juanjuan, G. Fan, X. Hongru, Z. Qiping, L. Xiaofeng, W. Fashan, W. Hui, L. Furao // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – Vol. 200. – P. 446–455.

154. Wozniak, M. Effects of phytochemically characterized extracts from *Syringa vulgaris* and isolated secoiridoids on mediators of inflammation in a human neutrophil model / M. Wozniak, B. Michalak, J. Wyszomierska, M.K. Dudek, A.K. Kiss // *Front. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1–15.
155. Xu, H. Tea polysaccharide inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells and ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis in rats / H. Xu, D. Yin, T. Liu, F. Chen, Y. Chen, X. Wang, J. Sheng // *Biomedicine & pharmacotherapy.* – 2018. – Vol. 102. – P. 539 – 548.
156. Yahfoufi, N. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols / N.Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar // *Nutrients.* –2018. – Vol.10. – P. 1–23.
157. Yamaguchi, M. Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro / M. Yamaguchi, R. Hamamoto, S. Uchiyama, K. Ishiyama // *Molecular and cellular biochemistry.* –2007. – Vol.303. – P. 83–88.
158. Yamamoto, N. Amplification by (-)-epigallocatechin gallate and chlorogenic acid of TNF- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts /N. Yamamoto, H. Tokuda, G. Kuroyanagi, S. Kainuma // *Int. J. Mol.Med.* –2015. – Vol.11 – P. 1707 – 1712.
159. Yang, L.C. Structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from the stems of a new medicinal *Dendrobium* species: *Dendrobium taiseed tosnobile* / L.C. Yang, C.C. Hsieh, C.L. Wen, C.H. Chiu, W.C. Lin // *International journal of biological macromolecules.* – 2017. – Vol.103. – P.1185–1193.
160. Yi, T. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as «Snow Lotus» herb in traditional Uighur and Tibetan medicines /T. Yi, Z.Z. Zhao, Z.L. Yu, H.B. Chen // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2010. –Vol. 128. – P. 405–411.
161. Yu-Fang, W. Secondary metabolites of plants from the genus *Saussurea*: chemistry and biological activity / W. Yu-Fang, N. Zhi-Yu, D. Mei, C. Bin, S. Qing-Wen, G.

- Yu-Cheng, K. Hiromasa // *Chemistry & Biodiversity*. – 2010. – Vol. 7. – P. 2623–2659.
162. Ze, G. In vivo and in vitro immunomodulatory and anti-inflammatory effects of total flavonoids of astragalus / G. Ze, X. Hong-Yan, X. Lu, W. Sha-Sha, Z. Xue-Mei // *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. – 2016. – Vol. 13. – № 4. – P.60–73.
163. Zekovića, Z. Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques / Z. Zekovića, A. Cvetanovića, J. Švarc-Gajića, S. Gorjanovića, D. Sužnjevića, P. Maškovića, S. Savića, M. Radojkovića, S. Đurovića // *Industrial Crops & Products*. – 2017. – Vol. 108. – P. 423–430.
164. Zhang, Y. Puerarin prevents LPS-induced osteoclast formation and bone loss via inhibition of akt activation / Y. Zhang, M. Yan, Q.F. Yu, P.F. Yang // *Biol. Pharm. Bull.* – 2016. – № 39. – P. 2028–2035.
165. Zhang, M. Mechanism of chlorogenic acid treatment on femoral head necrosis and its protection of osteoblasts / M. Zhang, X. Hu // *Biomedical reports*. – 2016. – Vol.5. – №2. – P. 682–693.
166. Zhou, R.P. Chlorogenic acid prevents osteoporosis by Shp2/PI3K /Akt pathway in ovariectomized rats / R.P. Zhou, S.J. Lin, W. B. Wan, H.L. Zuo // *Plos one*. –
167. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 27.12.2018)
168. ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения)
169. Инструкция по охране труда при работе в химической лаборатории ИОТ - 003 – 10.
170. Приказ Минздравсоцразвития от 12 апреля 2011 г. N 302н "Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования), и порядка проведения



обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров (обследований) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

171. ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования.
172. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.
173. ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
174. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.
175. ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности.
176. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. Классификация.
177. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий.
178. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95
179. ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
180. ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление.
181. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
182. ГОСТ 12.1.045-84 ССБТ. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля.
183. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

184. ГОСТ 12.1.010-76 ССБТ. Взрывобезопасность. Общие требования.
185. Р 2.2.2006–05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда.
186. СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03 Гигиенические требования к персональным электронно-вычислительным машинам и организации работы.
187. СанПиН 2.2.4.54896. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.
188. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
189. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1031-01 Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов.
190. ГН 2.1.5.689-98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.
191. СП 51.13330.2011 Защита от шума. Актуализированная редакция СНиП 23-03-2003.
192. СП 52.13330.2011 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95.
193. ГОСТ Р 55710-2013 Освещение рабочих мест внутри зданий. Нормы и методы измерений.
194. Безопасность жизнедеятельности. Расчёт искусственного освещения. Методические указания к выполнению индивидуальных заданий для студентов дневного и заочного обучения всех направлений и специальностей ТПУ. – Томск: Изд. ТПУ, 2008. – 20 с.
195. ГОСТ 12.1.013-78 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Строительство. Электробезопасность. Общие требования.
196. Федеральный закон от 22.07.2008 N 123-ФЗ (ред. От 02.07.2013) «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности»

**Приложение 1 (Справочное)**

**LITERATURE REVIEW:  
PROSPECTS OF USING PLANTS IN COMPLEX THERAPY OF  
OSTEOMYELITIS**

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ81	Решетов Ярослав Евгеньевич		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ИШХБМТ	Белоусов Михаил Валерьевич	Профессор, д.х.н.		

Консультант-лингвист отделения иностранных языков ШБИП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Устюжанина Анна Константиновна	к. фил. наук		

# **1. LITERATURE REVIEW: PROSPECTS OF USING PLANTS IN COMPLEX THERAPY OF OSTEOMYELITIS**

## **1.1. Experience and prospects of using plants for the treatment of osteomyelitis**

Therapy of bone tissue pathologies, including infectious ones, is an important medical and social problem. One of these pathologies is osteomyelitis – an infectious inflammatory process that affects all elements of the bone: the bone marrow, the compact and spongy parts of the bone, and the periosteum.

One of the oldest evidence of osteomyelitis is a fracture of the spine of a dimetrodon-a predatory lizard that existed 250 million years ago in the Permian period. The roughness of the bone, the tumor above the fracture site, as well as cracks in the affected bone indicate an extensive inflammatory process, which is further confirmed by histological studies [137].

For centuries, the disease has been difficult to treat and often fatal. Improvement of surgical techniques, the concept of asepsis, the creation of antibiotics in the 20th century, led to significant progress in the treatment of osteomyelitis. As a result, there was a significant reduction in mortality and the frequency of relapses of the disease. However, despite the success achieved in traumatology, the frequency of adverse results of treatment of limb fractures with the development of infection remains high. The reason for this is an increase in the number of severe mechanical injuries, errors in the choice of treatment, an increase in the number and resistance of OM pathogens, as well as a violation of the body's immune system.

Pathogenic staphylococci are the causative agent of acute osteomyelitis in 80-85% of cases. In 11% of cases, the disease is caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus, less often streptococcus and pneumococcus [44]. The role of gram-negative flora increases (about 6-7%), which is highly resistant to antibacterial drugs. Often, along with staphylococci, pseudomonas aeruginosa, vulgar proteus, escherichia coli, salmonella, and monocultures of klebsiella (capsule form) are involved in pathogenesis [18]. In addition, pathogens can be rickettsii and pathogenic fungi. An important etiological factor of acute hematogenous osteomyelitis can also be viral infections, against which almost 40-50% of cases of osteomyelitis occur. Viruses reduce the body's resistance, increase the virulence of pustular bacteria, and create a favorable ground for their introduction [19,40]. Often pathogens of traumatic and post-traumatic osteomyelitis are represented by polymicrobial flora [22].

Of great importance in this pathology is the immune response, both at the cellular and humoral level. Usually, in the presence of foci of purulent infections, the human body begins to produce antibodies: immunoglobulins (IgG, IDM, IDA) in certain ratios (73:7:19). According to this level of antibodies, the immunological status of patients with osteomyelitis can be assessed. Many researchers have established the absence and / or suppression of the immune response in osteomyelitis, which significantly affects the chronization of infection. In addition, it was found that in every second patient, macrophage differentiation is impaired, which leads to a significant weakening of immunological reactions [93,107,141]. Violations of mineral metabolism in OM are manifested in changes in a number of indicators: a decrease in the content of serum calcium, iron and chlorides, an increase in copper, magnesium, and a significant increase in the activity of alkaline phosphatase [69].

Currently, the growth of injuries and the use of invasive methods (endoprosthesis, metallosteosynthesis) in the treatment of fractures leads to an increase in the number of patients with this pathology [14,40,51]. The incidence of OM in patients with diseases of the musculoskeletal system is up to 78 % of people of working age [55]. Purulent-inflammatory bone lesions are severe and long-lasting diseases that lead to disability in 55 % of cases. At the same time, there is a tendency to shift from limited forms of the disease towards more severe manifestations.

According to the standards of medical care for surgical infections [67], the treatment of this disease is carried out using the combined use of medicines of various groups: antibiotics, immunomodulators, calcium preparations, analgesics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, venoprotectors, vitamins [52,55]. It is obvious that such therapy causes a high xenobiotic load on the body, and polypragmasia increases the risk of undesirable side reactions of drugs. The problem is complicated by the growing antibiotic resistance of OM pathogens. The consequences of the disease are accompanied by significant economic costs for treatment and pension provision of patients.

Taking into account the features of the disease, as a means of conservative therapy, promising drugs based on natural biologically active substances that have a systemic polymodal therapeutic effect, increasing the adaptive resource of the body, relatively low toxicity, high therapeutic index and low level of side effects [11].

It is known about the use of alcohol tincture of lilac flowers, aloe juice, water infusion and juice of nettle leaves, as means that significantly facilitate the course of the disease [10,31,41,79]. A popular remedy is a decoction of comfrey roots,

which is used both internally and externally [48,81]. A decoction of dried marshmallow is successfully used for washing fistula passages in OM, especially in combination with a decoction of chamomile, 5% alcohol tincture of calendula with the addition of an alcoholic solution of boric acid [82]. *Saussurea* controversial also finds application in folk medicine for the treatment of OM [79,81]. The immunomodulatory activity of water and water-ethanol extracts obtained from the aboveground part of the plant was experimentally established [129].

To identify plants that are promising for use in the complex therapy of OM, to determine the most significant groups of BAS and pharmacological effects, we have systematized the known herbal and natural remedies of folk medicine, in combination with the analysis of the chemical composition according to literary sources.

As folk medicine in the treatment of OM, plants containing BAS of the following groups are used: polysaccharides, bioelements, flavonoids, phenylpropanoids, iridoids, carboxylic acids, carotenoids. It should be noted that almost all types of plant raw materials used are characterized by the presence of immunomodulatory, anti-inflammatory and anabolic activity. Thus, screening of species that are promising for OM therapy is appropriate taking into account the combinations of the above-mentioned BAS groups contained in plants.

Currently, intensive scientific research is being conducted on the influence of natural compounds in bone pathology. One of the most promising areas of research is the activation of bone repair processes. There are known works of foreign researchers on the influence of flavonoids and isoflavonoids on the course of OM by activating osteoblasts and inhibiting the activity of osteoclasts [88,120]. There is evidence of the effect of starch polysaccharides on increasing the rate of proliferation, differentiation and maturation of osteoblasts by inducing bone morphogenetic protein of the second type, which leads to the restoration of bone tissue [101]. Foreign scientists have shown that plant non-starch polysaccharides inhibit osteoporosis and reduce osteoclastogenesis by increasing the amount of  $\beta$ -catenin protein in cell nuclei and reducing the expression of genes associated with osteoclasts [164]. The positive effect of phenolic acids (chlorogenic, coffee, cinnamon and ferulic) on osteoblasts and inflammatory processes was established [103,113,117,165,166]. In addition, it was found that tannins, such as epigallocatechin-3-gallate, have a similar effect, and in combination with chlorogenic acid, significantly enhance the positive effect on bone repair processes [131,158].

For an additional assessment of the degree of impact on the pathogenetic links of OM, the analysis of modern data of scientific medicine is carried out. At the same time, the available data show that plant polysaccharides have a significant effect on the phase of inflammation and immunity, and practically do not affect the mineral exchange [34,35,74,100,142,146,155]. In addition, Bioelements (Ca, Mg, P,B, V, Zn, Cu, etc.) influence mineral metabolism, in particular the microarchitecture of bone tissue [94,97,108,114,157]. Phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) have anti-inflammatory and membrane-stabilizing activity, which is also an important factor in the treatment of OM [47,84,87,99,112,128,135,152,162].

Accordingly, according to the literature, plants promising for the treatment of OM should accumulate polysaccharides, flavonoids, bioelements and carboxylic acids in major quantities.

The prerequisites for this work were screening studies, which resulted in the establishment that the extract from the leaves of *Saussurea controversa* DC. is 40 % ethanol effective in experimental osteomyelitis [1]. The action of the native extract is mediated through the immune system. In particular, the humoral branch of the immune system is stimulated on day 7 after mouse immunisation with sheep red blood cells [129]. It has been found that extracts of soy sauce of the disputed 20% ethanol significantly stimulate the humoral immune response. Despite the promising use of soy sauce is controversial, its chemical composition is poorly known. Thus, based on the results of experimental studies, we consider *S. controversa* DC to be the most promising candidate for complex therapy of OM.

### **1.2. General characteristics of *Saussurea controversa* DC.**

*Saussurea* DC. (Asteraceae) is a genus of perennial herbaceous plants that includes more than 350 different species native to Eurasia and Latin America. The main center of speciation is located in Central Asia on the territory of the Himalayan mountain system [46]. In the Russian Federation, the main places of growth are the Urals, Siberia and the far East. In particular, on the territory of Siberia, in the forest-steppe, forest and mountain zones, there are 52 species [59].

*Saussurea controversa* DC. (*Saussurea* controversial) – boreal-montanny, Ural-Siberian species with disjunctive habitat. After the break, the Siberian part of the range covers the South-East of Western Siberia, the South of Eastern Siberia, and the North of Mongolia [54]. The species lives mainly in the forest area, on meadow-steppe phytocenoses, gravelly, stony slopes [60]. In Eastern Siberia, it often grows on stony slopes, carbonated and calcified soils, and limestone outcrops [21]. The plant has stems 25-100 cm high, tufted-web-like pubescent, often colored

in a dark purple-brown color. The leaves are 2.5-9 cm in size on the upper side are green, whitish-woolly below, and unevenly toothed along the edge. The leaves are represented by three formations-the lower ones are long-stemmed, ovate or oblong-ovate, and deep-heart-shaped at the base with a sharp tip [38,60]. Leaves of medium formation-short-stemmed, narrow, blunt at the base, not heart-shaped. Leaves of the upper formation are sessile, small, and lanceolate. Baskets are collected in a small number in a tight flap. The wrappers are shingled, spider-downy, their outer leaves are broadly ovate, short pointed, the inner ones are oblong, blunt and densely woolly at the top. All baskets in the upper part are blackish-purple [38]. The color is more dense. The flowers are purple - violet.

This species belongs to perennial herbaceous plants with polycyclic rosette vegetative and elongated generative shoots. There are 4 main phases in ontogenesis: vegetation, budding, flowering, and fruiting. The flowering phase occurs in July, is not constant and occurs on average once every 3 years. Resource availability and the possibility of introduction make this type promising for introduction into the state Pharmacopoeia of the Russian Federation [74].

It is important to note that due to the large number of similar species, the complexity of taxonomy and classification, on the territory of Siberia and the TRANS – Baikal territory, some botanists describe the species under the names *Saussurea discolor* Willd. – two-color *Saussurea* and *S. propinqua* Iljin-close *Saussurea*. However, currently these names should be understood as *Saussurea controversa* DC. - *Saussurea controversa* DC. it is also known by the names *Gorkusha disputable*, *fraternal tinder*, *one-sided*.

In folk medicine, *S. controversa* DC leaves are used. they are used as a decoction for glaucoma, osteomyelitis, pulmonary diseases, tuberculosis of the lungs and bones [20,81], as a hemostatic, anti-rheumatic agent and for gastrointestinal diseases [75,82]. *S. controversa* DC. it has long been used in folk medicine in Siberia, Buryatia, and Mongolia for epilepsy, diarrhea, infectious diseases, and diseases of the hepatobiliary system [20]. In Altai, an aqueous infusion of roots was taken for headaches and scrofulosis, and used as a hemostatic agent for uterine bleeding [75]. Fresh leaves have a wound-healing effect, especially in purulent wounds [77]. The effectiveness of water and water-ethanol extracts of *S. controversa* in combination with antibiotic therapy was established on the model of experimental traumatic osteomyelitis in vivo [3].

In traditional medicine of Tibet and China, similar species are successfully used - "Tianshan Snow Lotus" (Tien Shan snow Lotus), a common name for medicinal plant raw materials, combining several species: *S. lappa* (Decne.) Clarke., *S. costus*



(Falc.) Lipsch. and *S. involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. Bip.[150]. The species *S. lappa* is included in the Pharmacopoeia of China. It is used to prepare a drug for the treatment of rheumatoid arthritis, standardized for chlorogenic acid and quercetin glycosides [98].

Antitumor, antibacterial, antiprotozoal, antioxidant, and immunostimulating activities of various types of *Saussurea* have been experimentally established [126, 140]. Similar activity can be assumed in other species of *Saussurea* DC., due to the ability of representatives of the same genus to accumulate similar BAS in structure. Among the primary metabolites of *Saussurea* that have pharmacological activity, a polysaccharide complex should be noted, which shows an antioxidant and anti-inflammatory effect in the experiment [134,153]. Secondary metabolites of *Saussurea* are mainly represented by phenolic and terpene compounds. In plants, there are mono - and diglycosides of flavonoids, while quercetin, apigenin, luteolin and kaempferol act as major aglicons for most species [149,161]. Russian researchers have found differences in the qualitative composition and content of flavonoids in twenty species of *Saussurea* growing in Siberia. The content of flavonoids in the leaves of different species is in the range of 1.5-2.5 % and depends on the place of growth [20]. Organic acids are represented by phenolic acids: oxybenzoic, syringic; hydroxicoric acids: chlorogenic, cinnamic, syringic, as well as caffeic acid and its esters [149]. Among coumarins, umbelliferon, esculetin, ostol, scopoletin, scopolin, and skimmin were identified. From the *Saussurea* species, lignans derived from the tetrahydrofuran series were isolated: (syringarezinol, massairezinol, arctigenin, lariciresinol, phenylpropanoid syringin) and sesquiterpene lactones: (yanerin, cynaropicrin, grossgemin, etc.) [123,124]. Among the metabolites of some species, there are sesquiterpene lactones conjugated with the amino acids Proline, alanine, and cysteine [102,119]. Triterpene compounds derived from ursolic and oleanolic acids were isolated:  $\alpha$ -amyrin, oleanolic acid, taraxasterol, triterpene alcohol sossurol, lupeol [59,150]. In the grass of *S. controversa* DC. water-soluble neutral and pectin polysaccharides, ascorbic and caffeic acids, flavonoids, and triterpene saponins were found [17,78,129]. The leaves of the plant also contain a number of biologically active substances: flavonolglycosides-mainly derivatives of quercetin and myricetin [7.59]; hydroxycinnamic acids - chlorogenic, cinnamic, syringic; phenylpropanoids-syringin, syringoresinol; biogenic elements: CA, K, Mg, P [17.78].

The results of the review of available sources of scientific literature indicate the relevance of pharmacognostic and pharmacological research of *S. controversa* DC.

Given the significant resource potential of *S. controversa* DC. [145], the possibility of introduction [74], popularity in folk medicine [81,82], as well as the results of experimental studies of osteogenic and immunotropic activities [1,3,58], this plant object can be considered a promising candidate for a comprehensive pharmaceutical study. The study of the chemical composition and pharmacological properties of BAS with the subsequent development of regulatory documentation for medicinal plant raw materials for complex therapy of osteomyelitis is an urgent task of our research.

### **Conclusions**

1. Complex therapy of osteomyelitis should combine osteogenic, immunomodulatory and anti-inflammatory effects acting on key links of pathogenesis.
2. The main groups of BAS plants that exhibit osteogenic immunomodulatory and anti-inflammatory effects in osteomyelitis are polysaccharides, flavonoids and carboxylic acids.
3. *Saussurea controversa* is a promising object for research of pharmacological effects on key pathogenetic links of osteomyelitis, identification of target groups of BAS responsible for biological activity.

## **2. THE EXPERIMENTAL PART**

### **2.1. The objects of study**

As the object of research, we used the aboveground part of the *S. controversa* DC. - leaves with petioles harvested during the flowering phase in 2014-2018 in the Irkutsk region, Krasnoyarsk territory, and the Republic of Khakassia and dried by air-shadow method at a temperature of 20-25 °C to a moisture content of 5-9%.

### **2.3. Methods of general phytochemical analysis for BAS groups in the leaves of *S. controversa* DC.**

For the purposes of phytochemical analysis of BAS groups from prepared raw materials (dried and crushed to a particle size of 2-3 mm), water, water-alcohol extracts of 40% ethanol were obtained when heated in a water bath with a reverse refrigerator.

For chromatographic analysis and isolation of individual substances, chloroform, ethyl acetate, butanol and water fractions were obtained from 40% ethanol extract concentrated under vacuum to an aqueous residue by liquid-liquid extraction.

Detection of sesquiterpene lactones was performed using the method of K. S. Rybalko [70]. To do this, 30.0 g of crushed raw material was infused with hot water in a ratio of 1: 5, (80 °C, 1 h), and filtered. The resulting water extraction

was extracted three times with chloroform in a ratio of 1: 1. the Chloroform phase was separated, combined, dehydrated, passed through anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and the solvent was removed under vacuum. Then the IR spectrum of the resulting residue was taken in a chloroform film.

Detection of saponins in water extraction was performed using qualitative reactions (foaming test, Fountain-Candela test, reaction with solution  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) [39,42].

Detection of tannins in water extraction was performed using the following qualitative reactions: with 1% gelatin solution in 10%  $\text{NaCl}$  solution; by Stiasni (40% formaldehyde solution and hcl conc.); with 1% solution of iron-ammonium alum [48].

To determine coumarins, qualitative reactions were performed with a 5%  $\text{NaOH}$  solution, azo combinations, and a lactone sample in alcohol extraction (96% ethanol, 1: 10, 80-85 °C, 0.5 h) [42].

Flavonoids were determined in the ethanolic extract using standard qualitative reactions: a test of the Shynoda by Briant (conc.  $\text{HCl}$  and magnesium chips, octyl alcohol); with 5%  $\text{AlCl}_3$  solution; Wilson reaction [36, 39]. Quantitative determination of flavonoids was performed using a spectrophotometric method in terms of rutin [4].

Detection of phenolcarbonic acids was performed using paper chromatography and thin layer chromatography [146]. Quantitative determination – by the spectrophotometric method in terms of chlorogenic acid [43].

To detect alkaloids, two extracts were obtained: acidic-solution A, and alkaline-solution B [30,49]. Solution A was prepared as follows: 10.0 g of air-dry crushed leaves of *S. controversa* DC., placed in a flask with a lapped stopper, filled with water acidified with  $\text{HCl}$  to pH 2, in a ratio of 1:10, the flask was closed and left for 12 hours for the extraction of alkaloids. The extract was filtered, the filtrate was alkalized with an ammonia solution to pH 9, then the alkaloids were re-extracted to the organic phase in a dividing funnel with chloroform and the alkaloids were extracted again with acidified water, obtaining a clarified solution free of ballast substances.

To prepare the solution B, 10.0 g of crushed raw material was filled with an aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 10) and left for 24 hours for extraction. The extract was filtered and extracted with chloroform alkaloids in the form of bases. The resulting extract was acidified with hydrochloric acid to pH 2, then re-extracted to an alkaline medium by the above method. With solutions A and B

conducted a qualitative reaction with obmelchanie reagents (of Bouchard, Dragendorf, Sonnenstein, Nessler).

To detect polysaccharides, 2.0 g of air-dry raw materials were placed in a conical flask and filled with purified water in a ratio of 1:10 and heated in a water bath at 80 ° C for 0.5 h. The extraction was filtered and cooled to room temperature. Polysaccharides were precipitated by adding 8 ml of 96% ethanol to 2 ml of extraction. The reaction with an antron reagent was also performed [37].

## **2.4. Research methods for polysaccharides of *S. controversa* DC.**

### **2.4.1. Highlighting and clearing**

It is known that plants contain a significant amount of chlorophyll and other compounds that significantly complicate the release of native polysaccharides (PS), so to increase the purity of PS, pretreatment of raw materials with organic solvents was performed: chloroform and ethyl acetate to remove pigments and ethanol to remove phenolic compounds. Further, PS was extracted from the prepared depigmented raw material by step extraction with cold, hot water when heated, and 0.7% solution of ammonium oxalate when heated. The obtained PS fractions were deproteinized using the Sevag method [132]. Then dialysis was performed against purified water. The sum of fractions was lyophilized [45].

### **2.4.2. Determination of molecular mass distribution**

The molecular mass characteristics of the obtained PS were determined by high-performance exclusive chromatography in comparison with solutions of standard dextran samples ( $C = 1 \text{ mg / ml}$ ) with  $M_w$  15, 40, 60, 90, 110, 250 and 500 kDa (Sigma-Aldrich, Germany) [141]. The heterogeneity coefficient ( $M_w/M_n$ ) was calculated as the ratio of the average weight ( $M_w$ ) to the average molecular weight ( $M_n$ ) of polysaccharides.

### **2.4.3. The determination of protein content**

The protein was quantified using the Lowry method with pre-deposition (OFS.1.2.3.0012.15 – method 2 In), using a calibration graph constructed for solutions of bovine serum albumin [25].

### **2.4.4. determination of uronic acids**

The content of uronic acids (UC) was determined by a spectrophotometric method based on the reaction of carbohydrate oxidation products with 3,5-dimethylphenol in the presence of concentrated sulfuric acid, using a calibration graph constructed for galacturonic acid solutions. The measurement was performed at two wavelengths of 400 and 450 nm using A Unico 2800 spectrophotometer (USA) [105].

### **2.4.5. Production of polyol acetates**

5 mg of PS fractions were placed in glass ampoules, and 3 ml of trifluoroacetic acid was added at a concentration of 2 mol / l, containing myo-Inositol at a concentration of 1 mg/ml as the internal standard. Ampoules were sealed in the flame of a burner and placed in a drying Cabinet for 5 hours at a temperature of 100-105 °C. The completeness of hydrolysis was evaluated by using felling reagent. The hydrolysates were evaporated to dryness in a flask on the ground in the presence of methanol. The dry residue of monose was dissolved in 1 mol / l of ammonia solution, 5 mg of sodium borohydride was added, tightly closed with glass stoppers and left for 24 hours. Solutions were evaporated to dry, and 0.5 ml of anhydrous pyridine and acetic anhydride were added. Then the reaction mixture was placed in a drying Cabinet and the polyols were acetylated at t=100 °C for 1 h. Excess acetic anhydride and pyridine were removed by vacuum evaporation in the presence of toluene [32].

#### **2.4.6. Determination of the monomer composition**

Identification of polyol acetates of the corresponding monosaccharides was performed on a Varian 450-GC chromatograph (Varian, USA) equipped with a flame ionization detector using a VF-5 MS capillary column (Varian, USA; 0.25 mm, 30 m), the analysis was performed in a temperature range from 175°C (1 min) to 250°C (2 min) with a temperature increase rate of 3°C/min [68].

### **2.5. Preparation and fractionation of extract on 40% ethanol**

#### **2.5.1. Chromatographic analysis of the extract and its fractions**

To obtain the extract, the crushed raw material was extracted with 40% water ethanol (1: 15) in a water bath (80 °C) three times. The portions were combined and evaporated under vacuum to a water residue. The total extract was divided into fractions by liquid-liquid extraction method successively with chloroform, ethyl acetate and n-butanol.

Some of the obtained fractions, as well as the water residue, were hydrolyzed with 5% sulfuric acid in a boiling water bath for 2 hours. the Hydrolysates were neutralized to pH 7 with barium hydroxide, the aglycones were re-extracted with chloroform and ethyl acetate, and free carbohydrates were determined in water phases. The resulting extract, fractions extracted with organic solvents, water residue and their hydrolysates were analyzed using the BX method on paper of the Fn-4 and FN-12 brands (Germany), "Leningradsкая", as well as using chromatography in a thin layer of sorbent on plates "Silufol UV-254" (Czech Republic) and "Sorbfil-PTSX AF-UV" in comparison with standard samples of witness substances.

For HPLC, the extract and its fractions of 2 mg of the test samples were dissolved in 0.5 ml of 80% ethanol, the solution was filtered, 5  $\mu$ l was taken and introduced into a chromatograph sample input device (Shimadzu LC-20AD, Japan) with a PerfectSil Target ODS-3 column (MZ-Analysentechnik GMBH, Germany). Elution was performed with a mixture of acetonitrile, isopropanol-a volume ratio of 5:2, and 0.1% solution of trifluoroacetic acid with an increase in the gradient from 15% to 35% with a time interval from 0 to 40 minutes, the elution rate – 1 ml/min [5].

Quantitative determination of substances by HPLC was performed on the Ultimate 3000 liquid chromatograph (Thermo, USA) equipped with an ultraviolet detector

### **2.5.2. Identification and establishment of the structure of individual compounds**

Various fractions obtained from the water-alcohol extract were separated into individual components by column chromatography on silica gel (Lachema, Czech Republic) and polyamide (Woelm, Germany). the systems chloroform-methanol and ethanol-water in different ratios were used as eluents [90, 91].

The melting point of individual substances was determined using a Stuart SMF-38 device (Bibby scientific, great Britain). UV spectra were taken in ethanol solutions with a concentration of  $10^{-4}$  mol/l on the HP 8453 UV-Vis spectrometer (Hewlett-Packard, Germany). Infrared spectra were taken in tablets with potassium bromide on the Nicolet 5700 device (FT-IR, Thermo Fisher Scientific, USA).Elemental CHN analysis was performed on the carloerba 1106 analyzer (CarloErba, Italy). NMR spectra were taken in deuterated methanol and dimethylsulfoxide using a BrukerAV - 600 NMR spectrometer with operating frequencies of 600.30 (1H) and 150.95 MHz (13C) (Bruker BioSpin GmbH, Germany). GC / MS spectra were obtained using a Thermo Scientific DFS mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) at a vapor temperature of 200-220  $^{\circ}$  C, with electron ionization of 70 eV. The presence of inorganic components was determined on a mass spectrometer with inductively coupled plasma Agilent 7900 JP 14,080,159 (Agilent Technologies, Japan) destruction of the organic matrix was performed in the microwave system Speedwave MWS TM-3+ in the presence of nitric acid [90.91].

### **2.6. Methods of biological research**

The principles set out in the European community directives (86/609/EEC) and the Helsinki Declaration were used in conducting biological experiments. The research was approved by the local ethics Committee OF Sibsmu (conclusion no. 5539 dated 02.10.2017).

### **2.6.1. A study of osteogenic activity**

The study of osteogenic activity of major BAS groups was performed on multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) cultured in the laboratory of immunology and cell biotechnologies of the Innovation Park of the Kant Baltic Federal University. For this purpose, 3 groups of cells were formed: 1) intact; 2) with the addition of the sum of polysaccharides; 3) with the addition of the sum of flavonoids; Substances were added to the cultured medium in concentrations of 10, 30 and 50 mg/l. To confirm the morphofunctional nature of MMSCs, cells were cultured in 1.5 ml of a medium with a reagent from the StemPro differentiation kit (Thermo Fisher Scientific). The cells were stained using a phenotyping kit and viable fixable dyes. The degree of differentiation of MSCS into osteoblasts was estimated from the cell area stained with 2% alizarin red solution using the Zeiss Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss Microscopy, USA) and ZEN 2012 software [90].

### **2.6.2. Study of the immunotropic activity**

The immunotropic activity of the compounds was determined using a test for the production of nitric oxide by macrophages. The experiments used 45 male mice of the C57BL/6 line of the conventional category at the age of 8-10 weeks, obtained from the Department of experimental biological models of the Niifirm named after E. D. Goldberg. All procedures with animals were performed in accordance with GOST 33215-2014 "Rules for equipment of premises and organization of procedures for working with laboratory animals" and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Ethical expertise was carried out by the Commission on bioethics Of the niifirm named after E. D. Goldberg, THE Protocol of animal experiments corresponded to the ethical standards and principles of biomedical research (Protocol No. 98122015). Mice were killed by cervical dislocation, an icy isotonic solution of 0.9% sodium chloride was poured into the abdominal cavity (FR, LLC "Plant Medsintez"), a suspension of cells was isolated, which was cultured for 2 hours in plastic Petri dishes ( $2-2.5 \cdot 10^6$  cells/ml) in a complete culture medium (RPMI 1640 ("Sigma", USA), 10% ETS ("HyClone", UK), 20 mm HEPES ("Sigma", USA), 0.05 mm 2-mercaptoethanol ("Sigma", USA), 50 mcg/ml gentamicin ("SIGMA", USA), 2 mm l-glutamine ("Sigma", USA)) in an atmosphere of 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. Then macrophages adhering to the plastic were collected and cultured ( $3,0 \cdot 10^6$  cells/ml) in flat-bottomed 96-well tablets in the presence of the studied substances, 1 mcg/ml of lipopolysaccharide (LPS, serotype O111:B4, "Sigma", USA) or 30 mcg/ml of muramyldipeptide (TIR,

N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, "Calbiochem", USA) as a reference substance. After 48 hours, cell supernatants were separated, mixed with an equivalent volume of Grace reagent, and the solution extinction was measured using An automatic chemwell Combo analyzer (Awareness Technology, Inc.,USA) at a wavelength of 545 nm [117]. The concentration of nitrites was determined using a calibration graph constructed using standard solutions of sodium nitrite and expressed in microns. To assess cell proliferation by colorimetric method [137], a solution of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ("Sigma") was added to the wells 4 hours before the end of cultivation, at a final concentration of 200 mcg/ml. The settling liquid was removed, the precipitate was dissolved with dimethylsulfoxide ("Sigma"), and the optical density of the resulting solutions was measured on an automatic analyzer at a wavelength of 545 nm [68,115].

### **2.7. Statistical processing of results**

Statistical processing of the results was performed in accordance with OFS1. 1. 0013. 15 (State Pharmacopoeia 14 edition) [25]. We used Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, student's criteria, and Mann-Whitney programs for the calculation. When an effect with a significance level of  $p < 0.05$  was observed, the results of the experiment were considered reliable.

## **3. RESEARCH OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF LEAVES**

### **S. CONTROVERSA DC.**

#### **3.1. General phytochemical analysis of the main groups of BAS**

##### **Sesquiterpene lactones**

In the IR spectrum of chloroform extraction of *S. controversa* leaves, an absorption band of 1739  $\text{cm}^{-1}$  was found, characteristic of lactone carbonyl, which indicates the presence of sesquiterpene lactones in the raw material.

##### **Saponins**

During the foaming test, the formation of a stable foam was observed for 15 minutes. In the Fountain-Candella sample, a stable foam of the same height was observed in both acidic and alkaline environments. When a solution of lead acetate was added, a cream-colored precipitate fell out. Thus, the raw materials of *S. controversa* contain saponins of the triterpene series.

##### **Tannins**

When the gelatin solution acts on the aqueous extraction of *S. controversa* DC., the appearance of opalescence was observed. When conducting the Stiasni reaction, a brick-red precipitate was deposited, and when adding the iron-ammonium alum to



the solution after separation of the precipitate, a purple color appeared. From the data obtained, it follows that the raw materials contain tannins of a mixed group (condensed and hydrolyzable tannins).

#### **Coumarins**

After the action of 5% NaOH solution on alcohol extraction, an intense yellow color was observed, and after the addition of diazoreactive, a red color was observed. During the lactone test, the formation of a white suspension that is not soluble in water was observed, which indicates the presence of coumarins in the raw material.

#### **Flavonoids**

When performing the Shynoda test, the appearance of crimson staining was observed, and after adding octanol, pink staining of the organic (flavonoid aglycones) and water layer (flavonoid glycosides) was observed. The reaction with the  $\text{AlCl}_3$  solution resulted in the formation of a light yellow solution. When adding the Wilson reagent to the test solution, the appearance of bright yellow staining was observed. The quantitative content of flavonoids in terms of rutin was  $1.51 \pm 0.67$  %.

#### **Phenol-carboxylic acids**

The paper chromatography method revealed the presence of phenol-carboxylic acids in alcohol extraction. The content of phenolcarboxylic acids in terms of chlorogenic acid, determined spectrophotometrically, was  $4.46\% \pm 0.76\%$  in terms of air-dry raw materials.

#### **Alkaloids**

In acidic extraction from the leaves of *S. controversa* DC. with the reagents of Bouchard, Dragendorff, Nessler and Sonnenstein, weakly expressed positive reactions were observed in the extraction of A, which may indicate the content of alkaloids in the plant in trace amounts.

#### **Polysaccharides**

When exposed to a 4-fold volume of ethanol 95 % on the water extraction of *S. controversa* DC., the appearance of a white flake-like precipitate was observed, which indicates the presence of polysaccharides in plant raw materials. After heating, extraction with antron reagent was observed by turquoise staining. Given that most PS have anti-inflammatory and immunotropic activity [29,34,35,158], they have been studied in detail.

### **3.3. Obtaining, fractionation and determination of the component composition of *S. controversa* DC leaf extract on 40% ethanol**

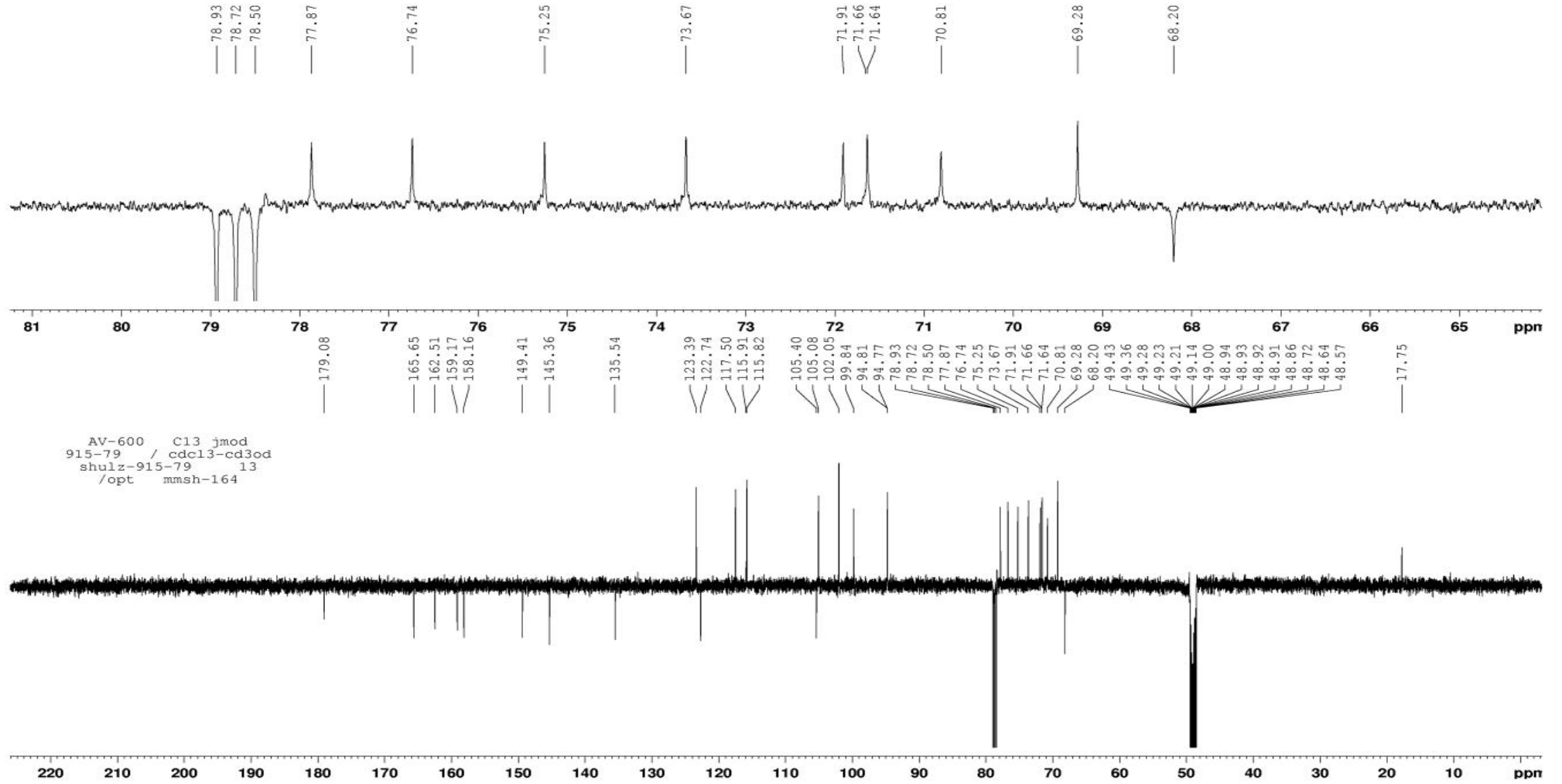
#### **3.3.1. The receipt and fractionation of the extract**

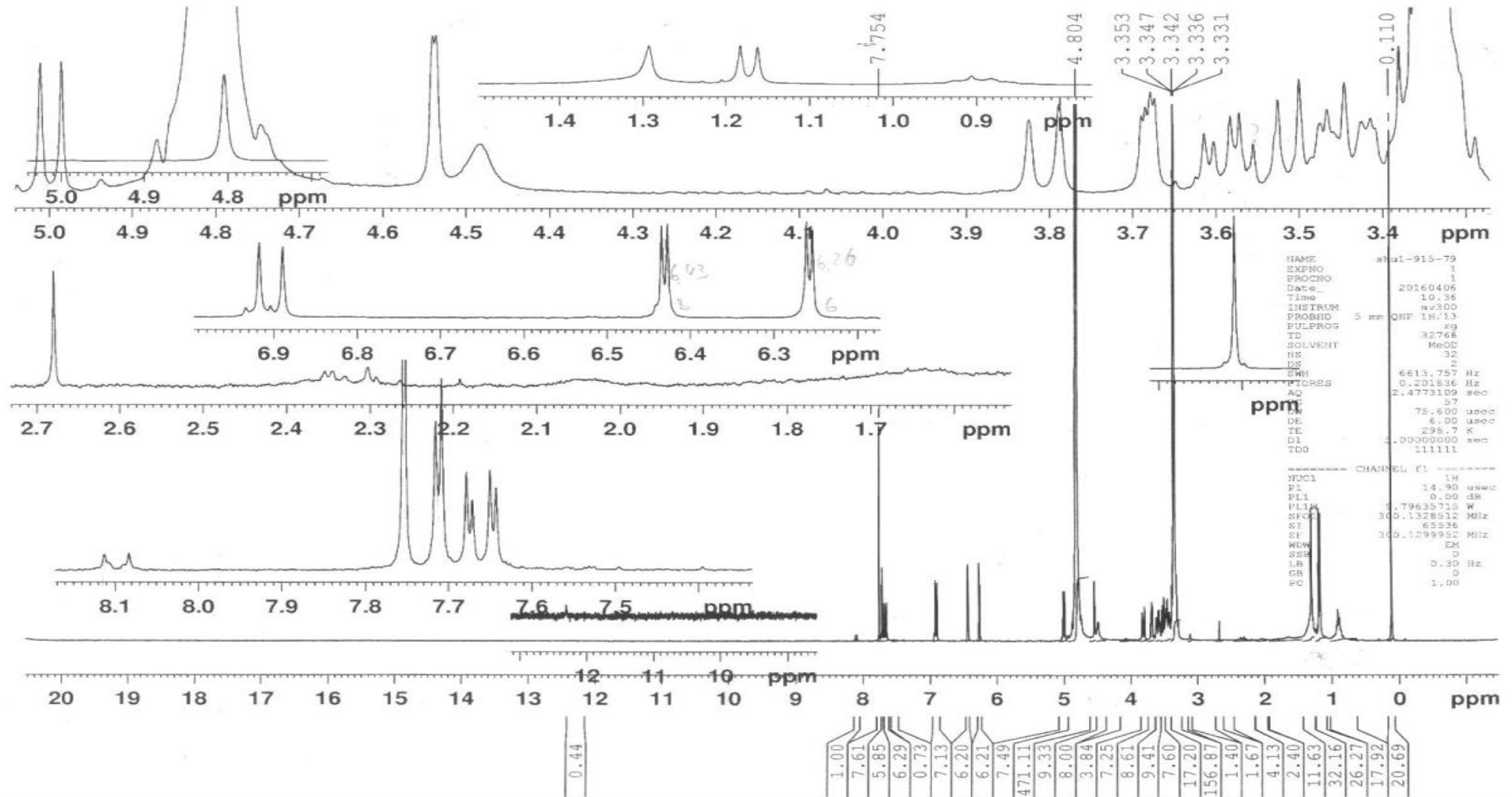
100.0 g of air-dry raw materials were crushed to a particle size of 3-6 mm, placed in a conical flask with a slot, filled with 40% ethanol, hydromodule 1:10. The flask was placed on a water bath, a reverse refrigerator was attached, and three-time extraction was performed at a temperature of 80 ° C for 0.5 h each. Extracts were filtered through 4 layers of gauze and a paper filter. Filtrates were combined and concentrated under vacuum on a rotary evaporator to a thick residue at a temperature no higher than 45 °C. The condensed residue was dried under a thermal fan at a temperature of 35 °C. The dry extract was dissolved in purified water in a ratio of 1:5, the precipitate (OE) was separated at the Buchner funnel and washed with purified water. An aqueous concentrate-filtrate without sediment, was placed in a dividing funnel and sequentially extracted in a ratio of 1:2, with a multiplicity of  $n=3$ , by a number of solvents with increasing polarity: chloroform – ethyl acetate – n-butanol. The solvents were removed under vacuum, and the thick residues were dried. Thus, the chloroform (CHLF), ethyl acetate (EAF), butanol (BF) fractions and the aqueous residue (AR) were obtained after extraction with organic solvents.

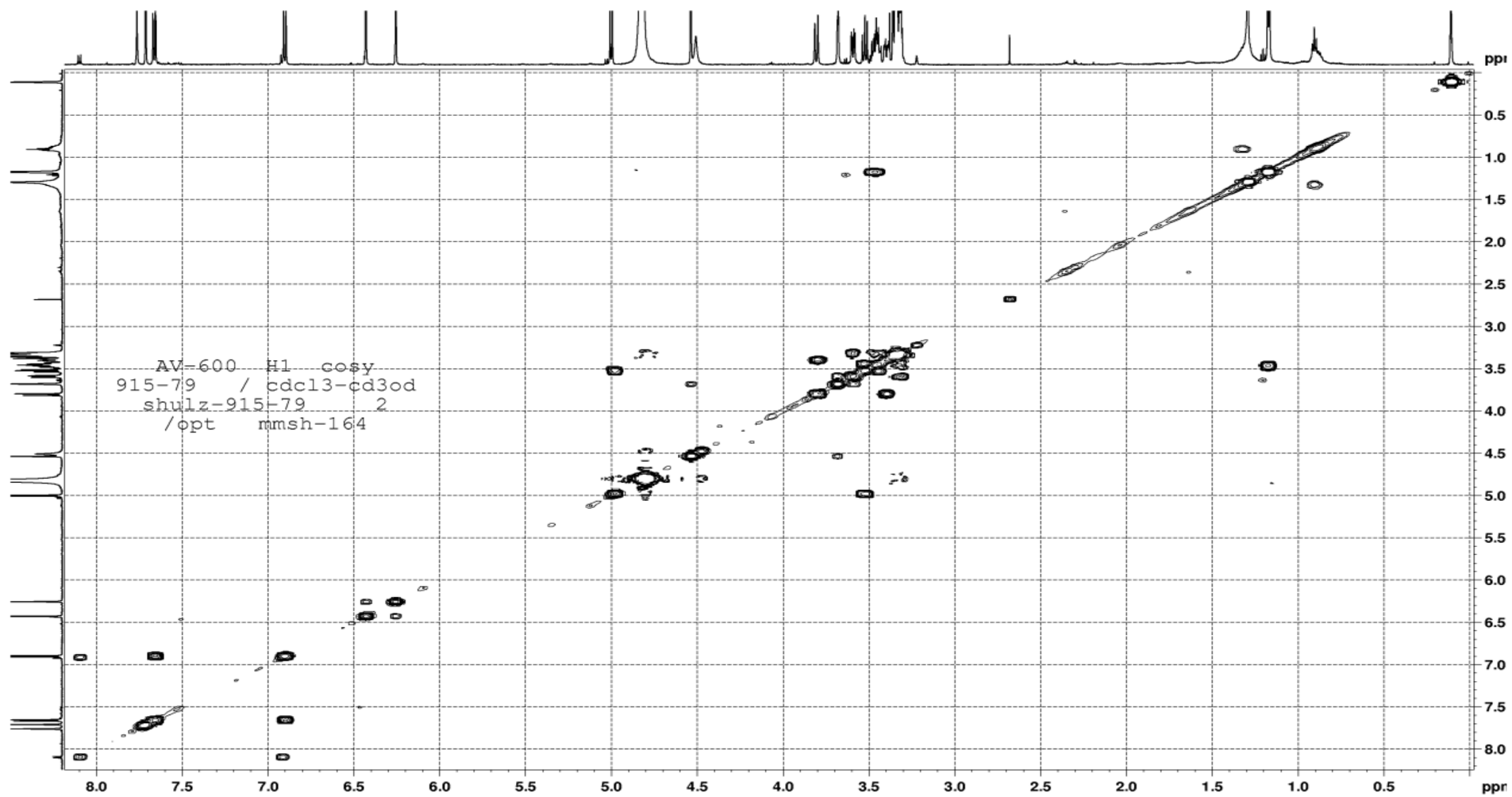
Most of the bioactive substances of the extract in 40% ethanol have a hydrophilic nature. All the obtained fractions were subjected to acid hydrolysis. Aglycones were extracted from the hydrolysate by chloroform and ethyl acetate. The composition of hydrolyzed and native fractions was studied by chromatographic methods.

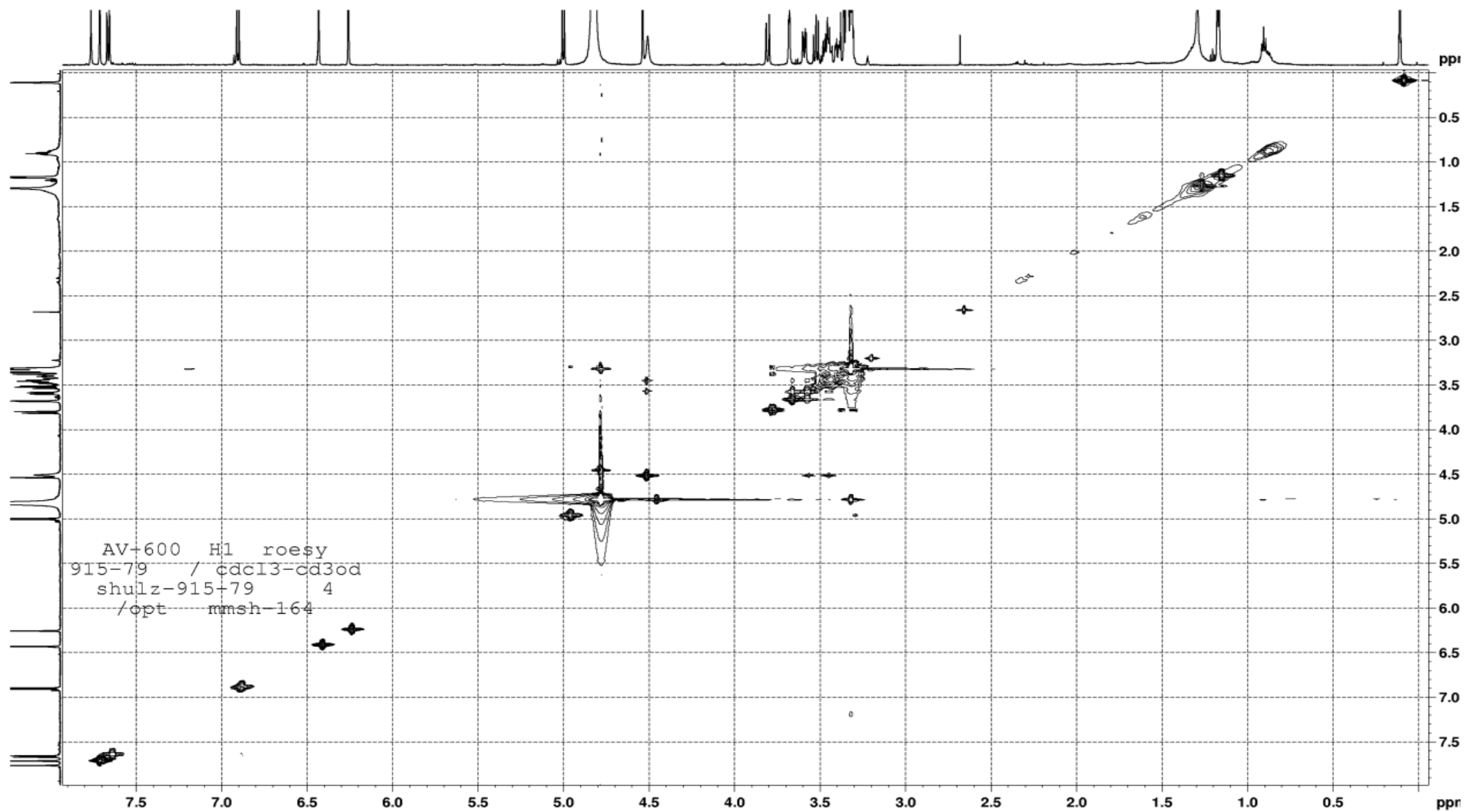
## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 2**

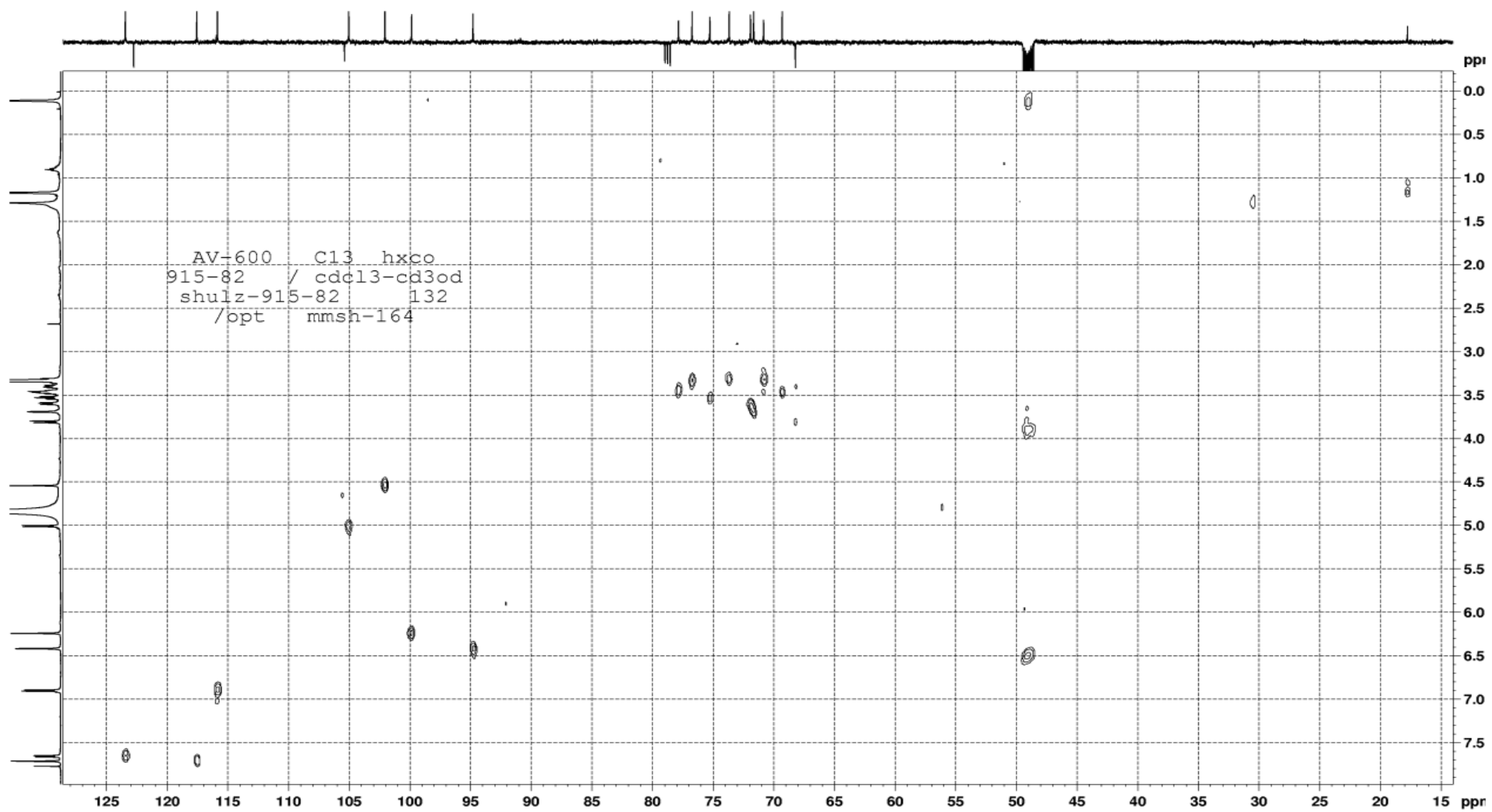
ЯМР спектры 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-  
глюкозид кверцетина

ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектр 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  спектр COSY 7-O- $\alpha$ -L-рамнозид-3-O- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

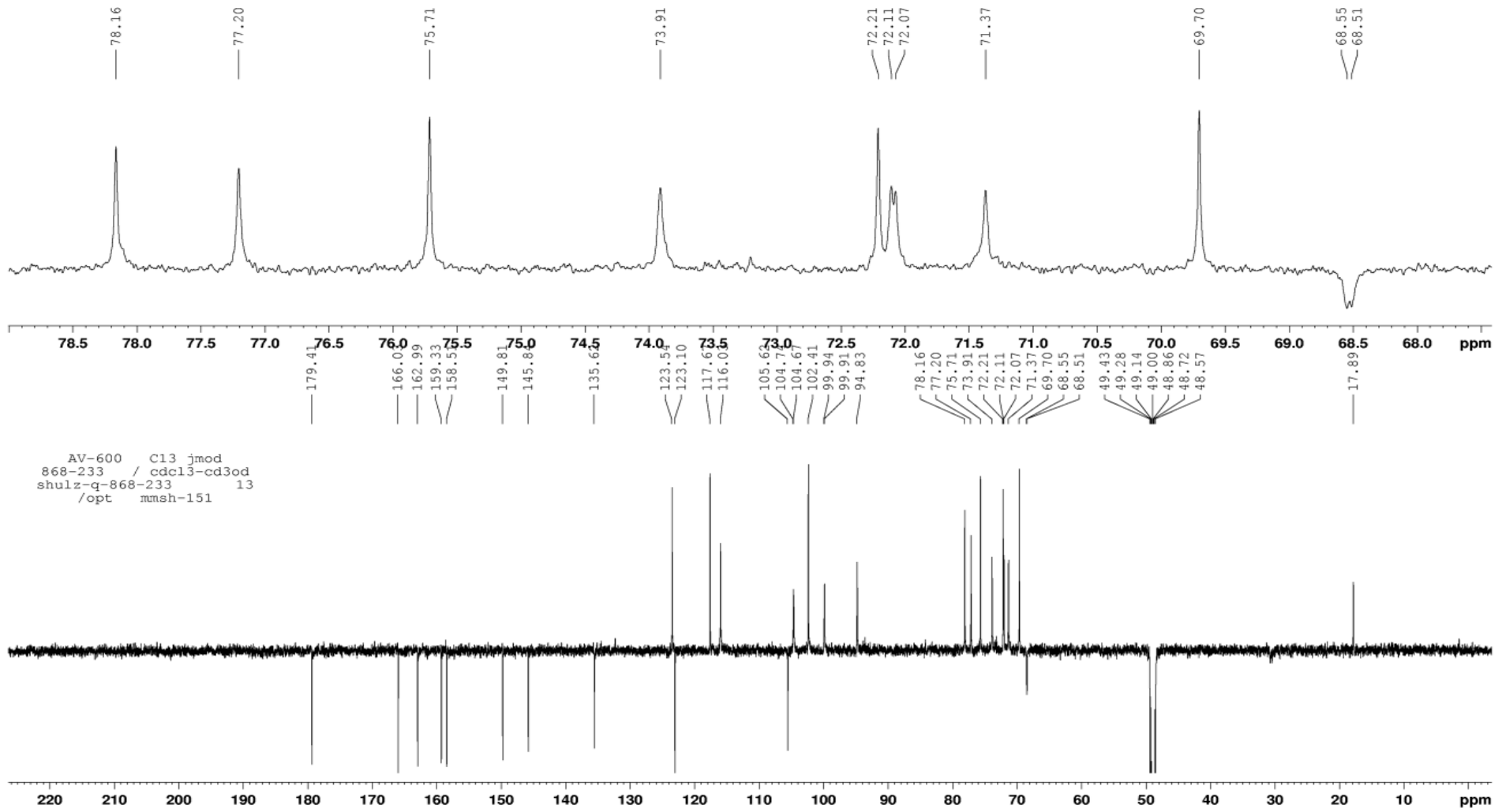
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  спектр ROESY 7-O- $\alpha$ -L-рамнозид-3-O- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

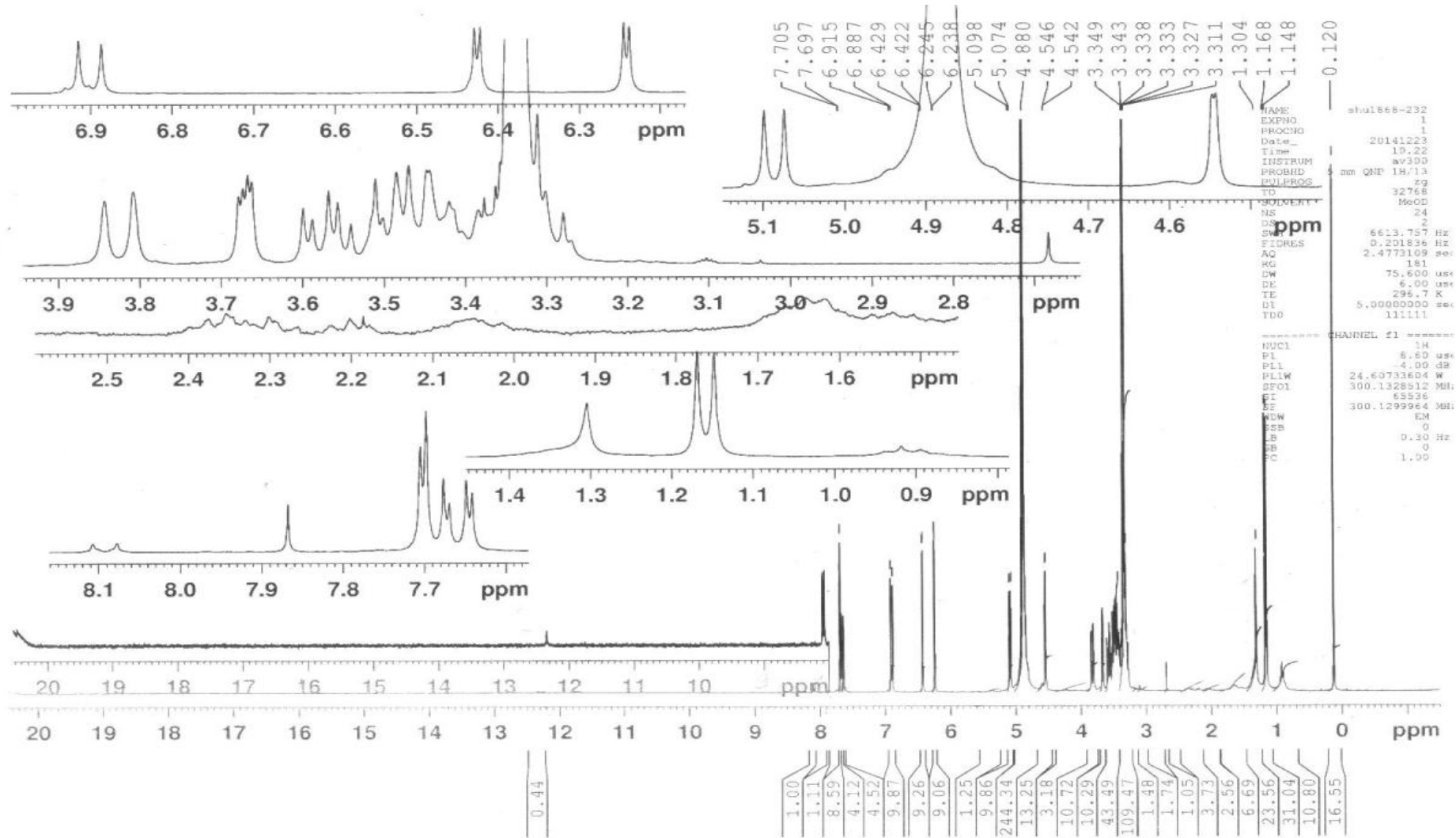
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  СОНХ 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

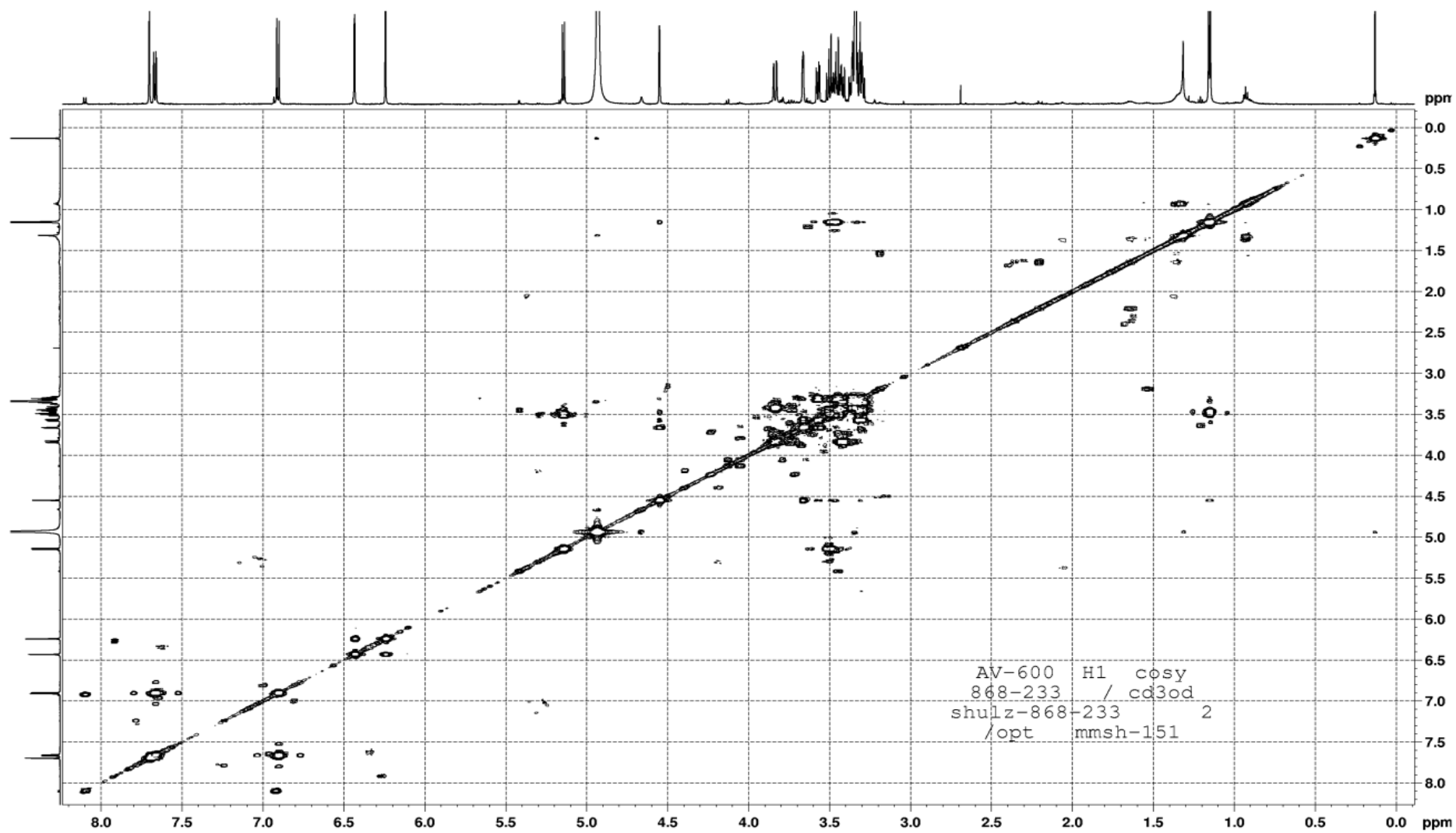


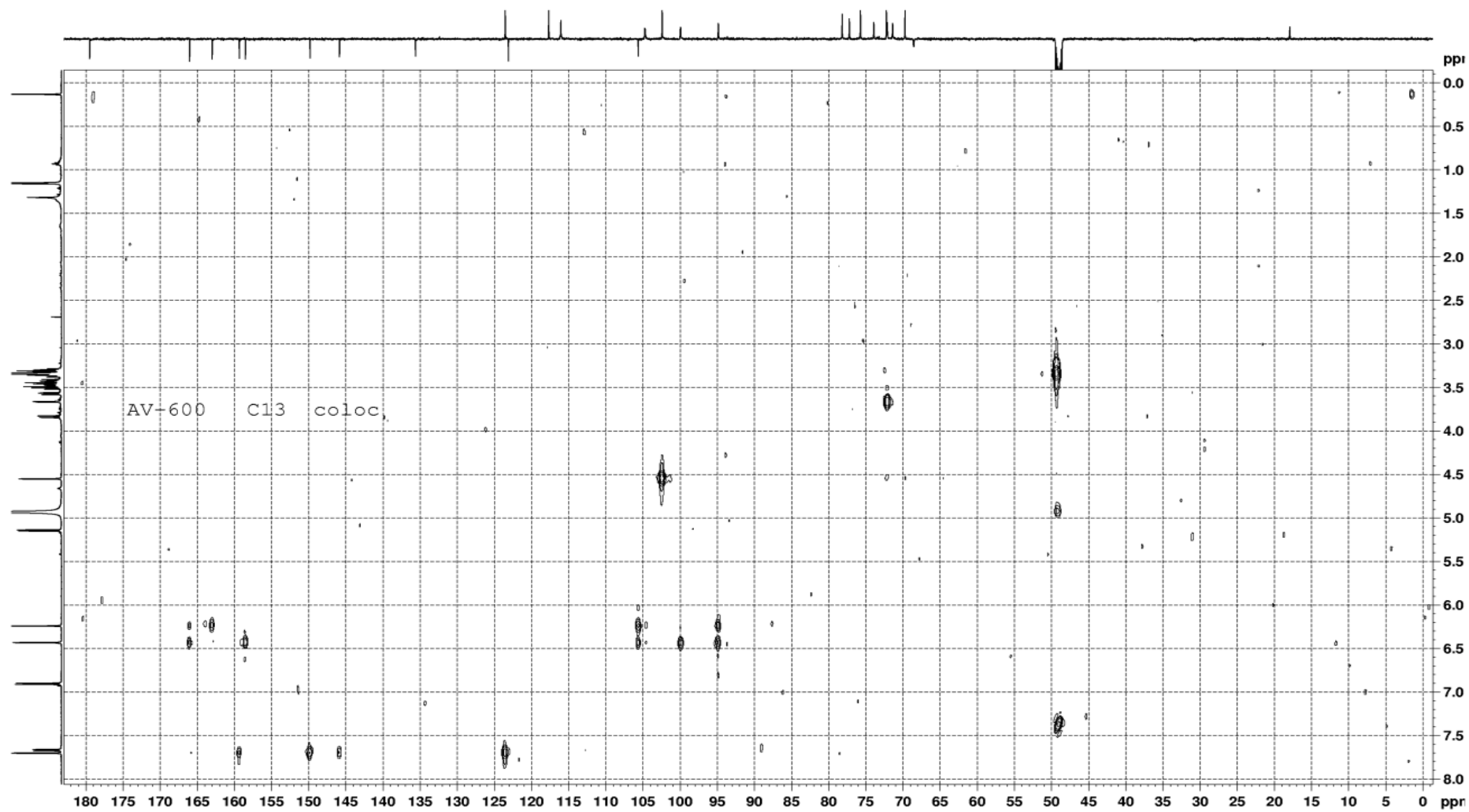
## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 3**

ЯМР спектры 3-О-β-D-диглюкозид-  
О-α-L-рамнозид кверцетина

ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектр 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

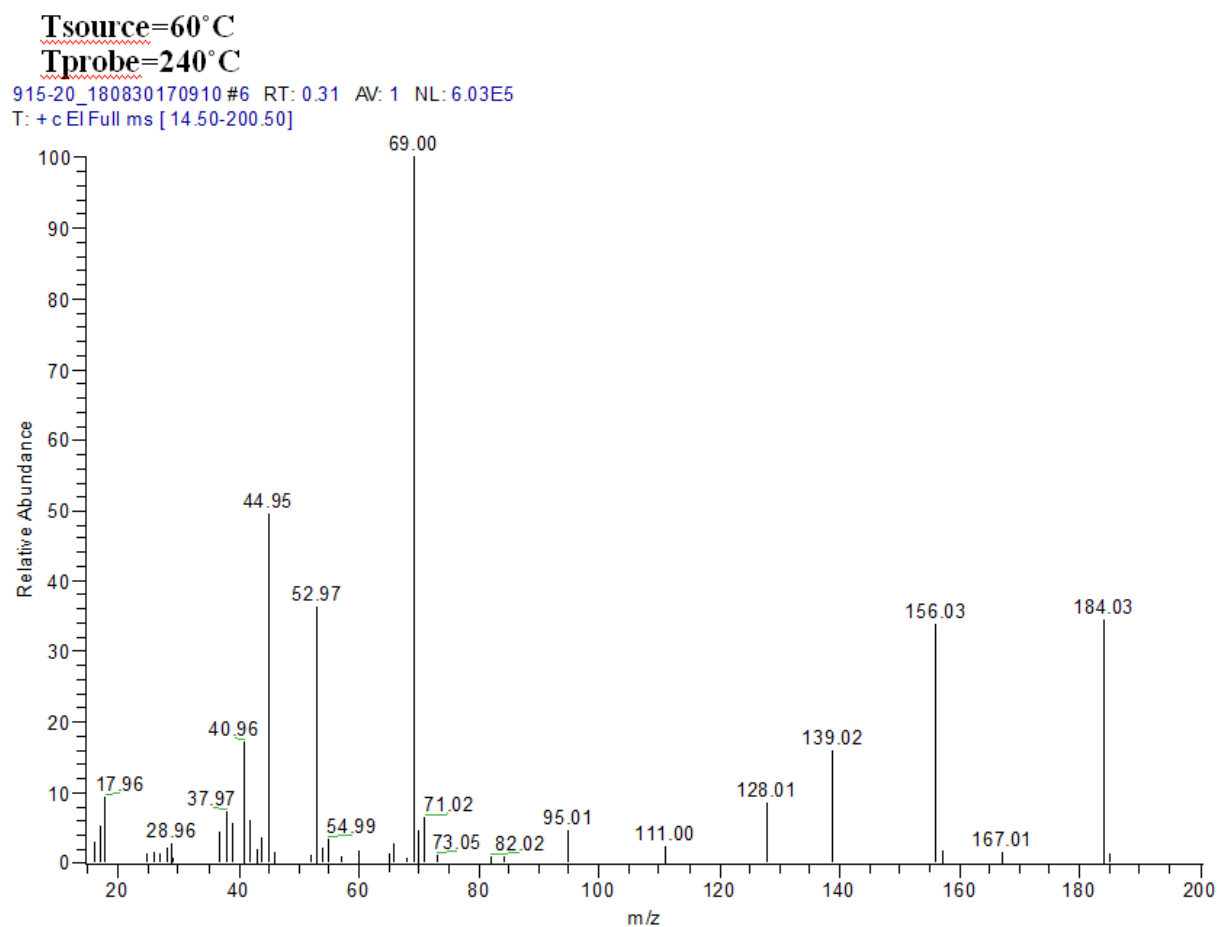
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  спектр COSY 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектр COLOC 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 4**

Масс- и ЯМР спектры 4-оксо-4Н-пиран-  
2,6-дикарбоновой кислоты

## Масс-спектр 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты



Расчетное значение  $(C_7H_4O_6)^+$   $m/z=184.0002$

Измеренное значение  $m/z=184.0006$

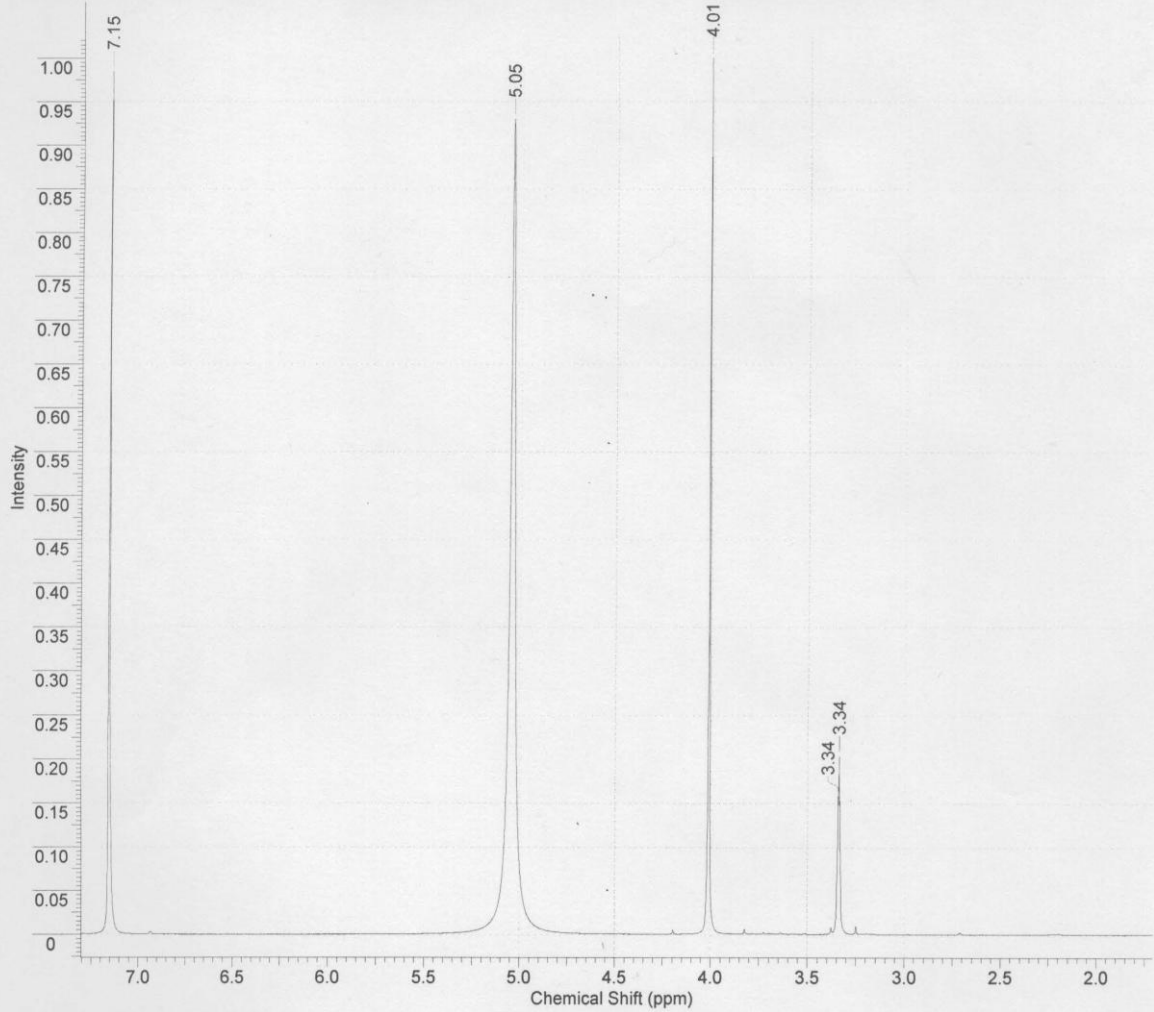
Элементный состав RDB Ошибка (ppm)

C7 H4 O6 6.0 1.959

Аналитические и спектральные исследования выполнены в Химическом Сервисном Центре коллективного пользования СО РАН.

ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр (в дейтерированном метаноле) 4-оксо-4Н-пиран-2,6-  
дикарбоновой кислоты

Acquisition Time (sec)	1.8612	Comment	936(249); CD3OD		
Date	04 Dec 2017 11:50:18				
File Name	C:\Documents and Settings\Lbac2\Рабочий стол\lmc-936-249_001001r				
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	$^1\text{H}$	Number of Transients	168
Original Points Count	16384	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg30
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	8802.82	Temperature (degree C)	18.600

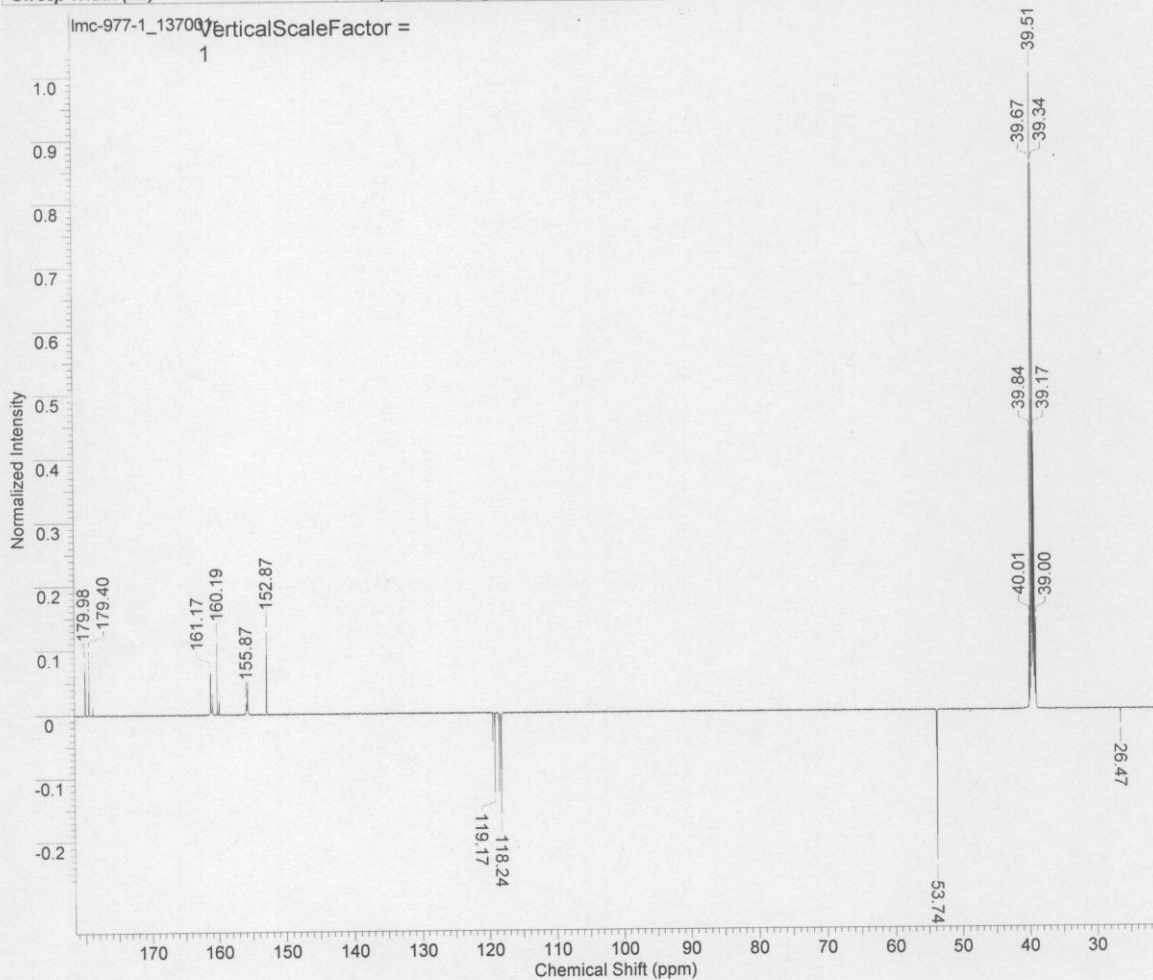


No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	3.34	1334.6	0.1573
2	3.34	1336.1	0.2046
3	3.34	1337.7	0.1586
4	4.01	1605.4	1.0000
5	5.05	2018.9	0.9300
6	7.15	2861.3	0.9851



ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектр 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты

Acquisition Time (sec)	1.0813	Comment	977 - 1; DMSO/D6	
Date	06 Sep 2018 03:12:00	Date Stamp	06 Sep 2018 03:12:00	
File Name	C:\Documents and Settings\Ibac2\Рабочий стол\lmc-977-1_137001r			
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients
Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner
Points Count	131072	Pulse Sequence	jmod	Receiver Gain
SW(cyclical) (Hz)	30303.03	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)
Sweep Width (Hz)	30302.80	Temperature (degree C)	20.200	



No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	26.47	3329.3	-0.0248
2	39.00	4905.2	0.1418
3	39.17	4926.2	0.4349
4	39.34	4947.2	0.8564
5	39.51	4968.3	1.0000
6	39.67	4989.1	0.8544
7	39.84	5010.1	0.4349
8	40.01	5031.2	0.1434
9	53.74	6758.6	-0.2382
10	118.24	14869.8	-0.1603
11	119.17	14987.1	-0.1264
12	152.87	19224.4	0.1275
13	155.87	19602.2	0.0195
14	160.19	20144.5	0.1111
15	161.17	20268.7	0.0658
16	179.40	22561.4	0.0996
17	179.98	22633.6	0.0808