

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»

На правах рукописи

Лосева Анна Ивановна



**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ  
ТЕХНОЛОГИЙ НАПИТКОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ,  
КУЛЬТИВИРУЕМОГО *IN VITRO***

4.3.3. – Пищевые системы

4.3.5. – Биотехнология продуктов питания  
и биологически активных веществ

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени доктора технических наук

**Научные консультанты:**

доктор технических наук,  
доктор биологических наук,  
профессор, член-корреспондент РАН  
**Просеков Александр Юрьевич**

доктор технических наук, доцент  
**Милентьева Ирина Сергеевна**

Кемерово 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ И НАПРАВЛЕНИЯ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ</b> .....	17
1.1 Химический состав и фармакологические свойства растений .....	17
1.2 Перспективы использования клеточных культур <i>in vitro</i> растений для получения вторичных метаболитов .....	33
1.3 Обзор технологий экстракции растительного сырья и выделения вторичных метаболитов растений из экстрактов.....	45
1.4 Маркетинговое исследование рынка растительных экстрактов и БАВ на основе вторичных метаболитов растений .....	65
1.5 Обоснование основных направлений исследований, их цель и задачи.....	75
<b>ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	78
2.1 Организация выполнения работы.....	78
2.2 Объекты исследований, используемые реактивы, материалы и оборудование .....	82
2.3 Методы исследований .....	86
<b>ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИСХОДНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПЕРСПЕКТИВ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ</b> .....	115
3.1 Характеристика химического состава, показателей качества и безопасности исходного растительного сырья .....	115
3.2 Изучение состава биологически активных веществ в надземных и подземных частях исходных растений .....	123

3.3 Изучение биологической активности (антимикробной, антиоксидантной) <i>in vitro</i> надземных и подземных частей исходных растений .....	143
3.4 Заключение по третьей главе .....	158
<b>ГЛАВА 4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР <i>IN VITRO</i> И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБОВ ЭКСТРАКЦИИ КОМПЛЕКСА БАВ ИЗ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР .....</b>	<b>163</b>
4.1 Подбор составов питательных сред и параметров культивирования клеточных культур <i>in vitro</i> растений и оценка их ростовых характеристик .....	163
4.2 Подбор параметров экстракции природного растительного сырья и клеточных культур <i>in vitro</i> растений методом мацерации .....	175
4.3 Подбор параметров экстракции природного растительного сырья и клеточных культур <i>in vitro</i> растений методом циркуляционного экстрагирования .....	189
4.4 Подбор параметров микроволновой экстракции природного растительного сырья и клеточных культур <i>in vitro</i> растений.....	197
4.5 Заключение по четвертой главе .....	203
<b>ГЛАВА 5. АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТОКСИЧНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ.....</b>	<b>208</b>
5.1 Оценка компонентного состава экстрактов природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами.....	208
5.2 Оценка физико-химических свойств и показателей токсичности экстрактов, полученных разными методами.....	216
5.3 Изучение биологической активности <i>in vitro</i> экстрактов, полученных разными методами .....	225
5.4 Заключение по пятой главе .....	241

<b>ГЛАВА 6. ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ ОЧИСТКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР .....</b>	<b>244</b>
6.1 Подбор параметров очистки ультрафильтрационным методом растительных экстрактов, полученных из природного сырья и клеточных культур .....	244
6.2 Подбор параметров очистки хроматографическим методом растительных экстрактов, полученных из природного сырья и клеточных культур .....	255
6.3 Заключение по шестой главе. ....	264
<b>ГЛАВА 7. ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И СУШКИ ОЧИЩЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ .....</b>	<b>267</b>
7.1 Подбор рациональных параметров концентрирования растительных экстрактов.....	267
7.2 Подбор рациональных параметров высушивания растительных экстрактов методом распыления .....	277
7.3 Подбор рациональных параметров лиофильного высушивания растительных экстрактов.....	288
7.4 Изучение компонентного состава и показателей качества сухих растительных экстрактов.....	296
7.5 Заключение по седьмой главе .....	303
<b>ГЛАВА 8. ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>306</b>
8.1 Технологические схемы производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i> , установление сроков хранения.....	306
8.2 Проектирование рецептур и разработка процессуальных схем производства напитков функциональной направленности на основе растительных экстрактов.....	330



8.3 Оценка показателей качества и функциональных характеристик напитков на основе растительных экстрактов, разработка рекомендаций по их применению .....	339
8.4 Оценка экономической эффективности и расчет себестоимости функциональных напитков .....	352
8.5 Опытно-промышленная апробация и внедрение технологий в производство и учебный процесс .....	361
8.6 Заключение по восьмой главе.....	369
<b>ВЫВОДЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ.....</b>	<b>373</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>378</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>380</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>435</b>
Приложение А. Копии соглашений ФЦП и государственных заданий на оказание государственных услуг .....	436
Приложение Б. Патенты и заявка на изобретения.....	442
Приложение В. Нормативные документы .....	445
Приложение Г. Опытно-промышленная апробация и внедрение технологий .....	460

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

По данным ООН, ожидается, что численность населения планеты увеличится с 7,7 млрд (2019 г.) до 9,7 млрд человек к 2050 году [447]. Эта перспектива вызывает ряд опасений, связанных с глобальным потреблением биомассы, ископаемого топлива и других полезных ископаемых. При этом ежегодное образование отходов, учитывая современные тенденции, увеличится на 70 % в ближайшие 40 лет [462]. В этом сценарии парадоксальным кажется то, что 820 млн человек в мире страдают от голода и недоедания, в то время как другая часть населения – от заболеваний, связанных с чрезмерным употреблением продуктов питания [281]. В этой связи особое значение приобретает извлечение биологически активных веществ из растений с целью создания нутрицевтиков нового поколения.

Термин «нутрицевтик» используется для пищевого продукта или его функциональных компонентов, обладающих питательными и фармацевтическими свойствами, поэтому нутрицевтики могут быть функциональными пищевыми ингредиентами или пищевыми добавками, полученными из природных источников (в основном, растительного происхождения) [407, 275, 336]. Интерес потребителей к функциональным диетам, поддерживающим здоровье и долголетие человека, быстро растет во всем мире [120].

Очевидно, что ежедневное потребление растительных продуктов настоятельно рекомендуется из-за высокого содержания в них фитохимических веществ (вторичных метаболитов), оказывающих разнообразное благотворное влияние на здоровье человека [214, 97, 189, 230]. Вторичные метаболиты обладают антиоксидантными, антиканцерогенными, гипотензивными, противовоспалительными, антимикробными, иммуностимулирующими и гипохолестеринемическими свойствами [305, 373].

Вторичные метаболиты растений делятся на три класса, которые включают терпеноиды, фенольные метаболиты и алкалоиды. В свою очередь, в классе терпеноидов выделяют монотерпеноиды, иридоиды, сесквитерпены, дитерпеноиды, тритерпеноиды, сапонины, стероиды, фитостеролы, каротиноиды; в классе фенольных соединений – антоцианы, бензофураны, кумарины, флавоноиды, флавононы и флавонолы, лигнаны, фенольные кислоты, стильбены, танины; в классе алкалоидов – индол, изохинолин, монотерпены, сесквитерпены, пирролидин, пиперидин, стероидные и тропановые соединения [285]. На данный момент известно около 25000 биоактивных веществ растений, обладающих высоким потенциалом применения в пищевой, фармацевтической, сельскохозяйственной, косметической промышленности.

Природные биофенолы представляют собой обширную группу молекул (на данный момент описано более 8000), обнаруженных только в царстве растений. Их молекулы содержат одно или несколько ароматических колец, несущих одну или несколько гидроксильных групп; эти молекулы характеризуются высокой антиоксидантной способностью и производятся как вторичные метаболиты растения для защиты от нападения бактерий, грибков и насекомых (фитоалексины) [409]. Широко распространенной группой полифенолов являются флавоноиды, которые, в свою очередь, классифицируются на флавонолы, флавононолы, флавоны, антоцианы, процианидины, фенолокислоты, стильбены и дубильные вещества в зависимости от количества гидроксиллов в молекуле и от природы и положения других заместителей [19, 109].

Растительные полифенолы известны своими замечательными антиоксидантными свойствами. Кроме того, для них описаны такие эффекты, как антивозрастной, противоопухолевый [296], кардиопротекторный [77]. Полифенолы зарекомендовали себя как эффективное средство для предотвращения нейродегенеративных заболеваний [372, 99], метаболического синдрома, диабета 2 типа [221].

Сегодня большинство вторичных метаболитов растений получают путем прямой экстракции из растительного материала. Эта стратегия экономически целесообразна только для очень небольшого числа соединений растительного происхождения. Экстракция веществ из растительного материала обычно является сложной задачей, поскольку растения часто содержат сложные смеси химически близкородственных вторичных метаболитов. Концентрации вторичных метаболитов растений подвержены сезонным и географическим колебаниям, кроме того, не каждое желаемое соединение вырабатывается постоянно и во всех тканях растений [346]. Таким образом, использование дикорастущих растений и трудоемкие процедуры экстракции ограничивают коммерческое получение вторичных метаболитов растений.

С целью преодоления этих недостатков биотехнология предлагает привлекательные возможности для производства растительных систем *in vitro*. Так, «бородатые» корни, образующиеся в результате трансформации растений грамотрицательной почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, продуцируют такие же биохимические вещества, что и природные растения, но в более высоких концентрациях. Быстрый рост, а также генетическая и биохимическая стабильность трансформированных корней в течение длительного периода сделали эту технологию перспективной для производства вторичных метаболитов растений. Для биотехнологических применений не меньший интерес представляют недифференцированные каллусные клетки, формирующиеся на месте повреждения растительной ткани [155].

Основными преимуществами выращивания клеток и тканей растений *in vitro*, по сравнению с культивированием целых растений, являются следующие: независимость от внешних факторов (состава почвы, сезонных изменений, климатических факторов); отсутствие риска контаминации растительного материала микроорганизмами или повреждения насекомыми; противодействие исчезновению редких видов растений; снижение

экономических затрат и повышение производительности за счет возможности автоматизации. Культуры растительных клеток представляют собой эффективное средство для крупномасштабного производства терапевтически значимых вторичных метаболитов в биореакторах [197].

С учетом вышеизложенного актуальность исследований, направленных на разработку теоретических и практических основ создания функциональных напитков, обогащенных вторичными метаболитами растительного сырья, культивируемого *in vitro*, не вызывает сомнений.

**Степень разработанности темы исследования.** Изучению функциональных свойств (антимикробных, антиоксидантных, противовирусных, кардиопротекторных и др.) растений, культивированию клеточных культур *in vitro* и созданию функциональных продуктов питания посвящены научные труды российских и зарубежных ученых: А.В. Абрамчук, Е.В. Авдеевой, О.О. Бабич, Р.Р. Баймурадова, Ф.А. Вагабовой, Н.А. Величко, Л.С. Дышлюк, И.А. Евдокимова, А.В. Заушинценой, О.В. Кригер, В.А. Куркиной, И.С. Милентьевой, С.К. Мингалева, Н.А. Некратовой, В.В. Платоновой, А.Ю. Просекова, Э.Ф. Степановой, Н.П. Тимофеева, Т.Г. Толстиковой, V. Todorova, Y. Sun, J. Wang, L. Zhang, E. Skala, J. Kim, T. Efferth, R. Rameshkumara и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках:

– ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» по теме «Получение биологически активных лекарственных растений эндемиков Сибири с использованием культур клеток и органов высших растений», соглашение №: 075-02-2018-223 от 26.11.2018 г.;

– реализации государственных работ в сфере научной деятельности в рамках государственного задания по теме «Скрининг биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих геропротекторными свойствами, и разработка технологии получения нутрицевтиков, замедляющих старение» (проект FZSR-2020-0006);

– реализации государственных работ в сфере научной деятельности в рамках государственного задания по теме «Полифенолы растений СФО: оценка молекулярной и пространственной структуры веществ, характеристика биофункциональных свойств и токсикологических показателей безопасности на модельных системах *in vivo*» (проект FZSR-2023-0002) (Приложение А).

**Цель и задачи исследований.** Целью диссертационной работы является развитие научных аспектов и практических решений получения клеточных культур растений биотехнологическими методами *in vitro*, извлечение из них комплекса вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности, а также создание технологий получения экстрактов и функциональных напитков на их основе.

Для выполнения поставленной цели сформулированы задачи исследования:

– проанализировать химический состав, показатели качества и безопасности, а также биологическую активность нативного растительного сырья: левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной;

– подобрать рациональные составы питательных сред и параметры культивирования клеточных культур (каллусных и корневых) *in vitro* изучаемых растений;

– оценить эффективность различных методов экстракции (мацерация, перколяция и микроволновая экстракция) природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений и подобрать рациональные параметры процессов;

– проанализировать компонентный состав (содержание флавоноидов, тритерпеноидов, кумаринов, фенилпропаноидов, антоцианов), физико-химические свойства, биологическую активность и показатели токсичности

экстрактов природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами;

– подобрать рациональные параметры очистки (ультрафильтрационный, хроматографический методы), концентрирования и сушки растительных экстрактов, полученных разными методами;

– разработать технологические схемы производства жидких и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*;

– разработать рецептуры и процессуальные схемы производства напитков функциональной направленности на основе растительных экстрактов, оценить показатели качества, безопасности и функциональные характеристики, разработать техническую документацию;

– оценить экономическую эффективность предлагаемых технологий, провести опытно-промышленную апробацию и внедрение технологий в производство и учебный процесс.

**Научная концепция диссертационной работы.** В основу диссертационной работы положена концепция обеспечения доступности для потребителей биологически активных веществ на основе вторичных метаболитов, выделенных из клеточных культур растений. Выдвинута гипотеза, что использование биологически активных веществ, полученных из клеточных культур растений с доказанными биологическими свойствами *in vitro*, будет являться альтернативой выделения их из природного растительного сырья.

**Научная новизна.** В изученных видах растений: левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin (Asteraceae)), женьшене обыкновенном (*Panax ginseng* C.A. Mey (Araliaceae)), элеутерококке колючем (*Eleutherococcus senticosus* (Maxim. & Rupr.) Maxim. (Araliaceae)), пальчатокореннике пятнистом (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae)), диоскореи обыкновенной (*Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin (Dioscoreaceae)), сапожниковии растопыренной (*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Apiaceae)),

дифференцированно и экспериментально определено содержание соединений фенольной природы: апигенин – от 1,95 до 345,67 мг/г сухой массы, кверцетин – от 1,50 до 121,09 мг/г сухой массы, рутин – от 0,90 до 112,56 мг/г сухой массы, а также фенольные кислоты: кофейная кислота – от 0,31 до 52,12 мг/г сухой массы, хлорогеновая кислота – от 0,52 до 44,52 мг/г сухой массы, феруловая кислота – от 0,45 до 12,31 мг/г сухой массы.

Подобраны рациональные параметры культивирования каллусных и корневых культур *in vitro* растений, выбранных в качестве объектов исследования. Определены рациональные параметры процесса экстракции комплекса биологически активных веществ из биомассы каллусных и корневых культур растений методом перколяции: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, гидромодуль 1 : 10, продолжительность экстракции – 2–4 ч (в зависимости от вида растения); методом микроволновой экстракции: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, гидромодуль 1 : 10, мощность излучения 200–500 Вт (в зависимости от вида растения), продолжительность 20–40 мин. (в зависимости от вида растения).

Установлены качественный и количественный состав БАВ, физико-химические свойства, показатели безопасности и токсичности экстрактов, полученных разными методами из биомассы каллусных и корневых культур растений.

В экспериментах *in vitro* доказано наличие у экстрактов, полученных из биомассы каллусных и корневых культур растений, антимикробных (по отношению к патогенным и условно патогенным тест-штаммам родов *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus viridans*, *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Penicillium citrinum*) и антиоксидантных свойств.

Подобраны параметры очистки, концентрирования и сушки растительных экстрактов, полученных из природного сырья и клеточных культур.



Научно обоснована безопасность применения биологически активных добавок на основе вторичных метаболитов, выделенных их клеточных культур растений *in vitro*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основе теоретических и экспериментальных исследований сформулированы основные требования к технологическому процессу получения биологически активных веществ из биомассы клеточных культур растений *R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. Divaricata*: рациональные параметры получения каллусных и корневых культур растений *in vitro*; оптимизированные параметры экстракции комплекса биологически активных веществ из биомассы клеточных культур растений; подобраны методы очистки растительных экстрактов, концентрирования и сушки.

Разработаны рецептуры и технологические схемы производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. Divaricata*. Экспериментально установлены сроки их хранения.

Разработаны рецептуры и процессуальные схемы производства функциональных напитков на основе растительных экстрактов с широким спектром биологического действия. Проведена оценка показателей качества напитков, доказана их антиоксидантная активность.

Предложены рецептуры и технологические схемы получения напитков, содержащих комплекс вторичных метаболитов, выделенных из экстрактов клеточных культур растений. Исследованы свойства, состав и биологическая активность полученных напитков. Техническая новизна разработанных технологических решений подтверждена патентами RU 2 792 775 «Способ получения биологически активной добавки на основе молочной сыворотки и растительного экстракта», RU 2 783 445 «Способ выделения и очистки байкалина из корневых культур шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*

*Georgi*)» и заявкой на патент № 2023 105 526 «Геронейропротектор на основе байкалина» (Приложение Б).

Разработаны и утверждены технические условия и технологическая инструкция по производству густых и сухих экстрактов на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из растительного сырья и клеточных культур растений (ТУ 10.89.19-273-02068309-2020 и ТИ 10.89. 19-273-02068309-2020) и функциональных напитков на их основе (ТУ 10.32.23-274-02068309-2021 и ТИ 10.32.23-274-02068309-2021; ТУ 10.83.14-275-02068309-2021 и ТИ 10.83.14-275-02068309-2021; ТУ 10.83.15-276-02068309-2021 и ТИ 10.83.15-276-02068309-2021; ТУ 10.89.19-277-02068309-2021 и ТИ 10.89. 19-277-02068309-2021; ТУ 10.83.12-278-02068309-2021 и ТИ 10.83.12-278-02068309-2021; ТУ 10.51.55-279-02068309-2021 и ТИ 10.51.55-279-02068309-2021) (Приложение В).

Разработанные рецептуры и процессуальные схемы получения густых и сухих экстрактов на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из экстрактов клеточных культур растений, прошли производственную проверку и апробацию в ряде научно-исследовательских и промышленных предприятий: ООО «РУСЭКСТРАКТ», ООО «НПО Сибирка», ООО НПО «Здоровое питание», ООО «СибБарс». Результаты исследований используются в учебном процессе ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» при подготовке студентов бакалавриата и магистратуры по направлениям подготовки 19.03.01 и 19.04.01 «Биотехнология», 19.03.02 и 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья», а также при организации научно-исследовательской и практической работы студентов (Приложение Г).

**Методология и методы исследования.** Исследование состоит из теоретического, экспериментального и практического блоков. Для реализации поставленных задач применялись общенаучные и специальные методы сбора, обработки и анализа научной информации, органолептические, физико-химические (высокоэффективная жидкостная

хроматография, ИК-спектроскопия) и микробиологические методы определения показателей исследуемых объектов.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

- Химический состав растительного сырья и оценка перспектив его использования для извлечения вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности.
- Условия культивирования клеточных культур растений *in vitro*.
- Параметры выделения и очистки биологически активных веществ из природного растительного сырья, каллусных культур и адвентивных корней.
- Компонентный состав, биологическая активность, безопасность и токсичность полученных экстрактов.
- Технологические параметры получения жидких и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*; напитков функциональной направленности на их основе.
- Процессуальные схемы получения напитков функциональной направленности на основе комплекса вторичных метаболитов нативных растений или выделенных из экстрактов клеточных культур растений.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений (5–7-кратной повторностью), применением стандартных и современных методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках.

Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Основные положения и результаты исследований диссертационной работы были предметом докладов и обсуждений на научно-технических мероприятиях различного уровня в период с 2012 года: I Международный конгресс «Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий» (Кемерово); Международные конференции «От модернизации к опережающему развитию: обеспечение конкурентоспособности и научного лидерства АПК» (Екатеринбург); «Инновационные биотехнологии природных и синтетических биологически активных веществ» (Минск–Ставрополь,); «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово).

**Публикации.** Основные материалы диссертации опубликованы в более чем сорока печатных работах, в том числе монографии, статьях, индексируемых в Scopus, Web of Science, RSCI, журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных материалов диссертационных исследований: «Foods and Raw materials», «Food Processing: Techniques and Technology», «Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture», «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология», «Ползуновский вестник», «Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии», «Новые технологии», «Пищевая промышленность», отчетах по НИОКР, а также патентах РФ и материалах конференций.

**Соответствие темы паспорту научной специальности.** Диссертационные исследования соответствуют п. 11, 12, 13, 16, 17 паспорта специальности 4.3.3. – Пищевые системы и п. 6, 10, 13, 16, 25, 26 паспорта научной специальности 4.3.5. – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, восьми глав, результатов и выводов, списка использованных литературных источников (469 наименований) и 4 приложений. Основной текст изложен на 377 страницах, содержит 117 таблиц, 112 рисунков.

## ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ И НАПРАВЛЕНИЯ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данная глава посвящена изучению химического состава и фармакологических свойств растений, анализу перспектив использования клеточных культур *in vitro* растений для получения вторичных метаболитов, изучению технологий их экстракции и выделения, проведению маркетингового исследования российского и мирового рынка растительных экстрактов и БАВ для разных отраслей промышленности, рынка функциональных продуктов на основе вторичных метаболитов растений, а также формулировке цели и задач собственных исследований.

### 1.1 Химический состав и фармакологические свойства растений

Территория Российской Федерации занимает более 17 млн км<sup>2</sup>. Климат страны имеет особую дифференциацию: неоднородность расположения водоёмов, большое разнообразие рельефа и протяженность по матерiku позволяют выделить 4 климатических пояса. Общее число видов в составе флоры России определяется почти 20 тысячами, в том числе 12,5 тысяч видов сосудистых, число эндемиков — около 2700 видов и подвидов.

Эндемиком СФО (Алтай и Саянские горы) является левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*). Растение входит в семейство сложноцветных и является многолетним, другое ее название — маралий корень, а также левзея русская. В диком виде левзею можно обнаружить на высоте 1200–2300 м над уровнем моря [265, 298]. Левзея широко распространена как в Китае, так и в России [18, 20, 274, 169]. Традиционное

название «маралий корень» использовалось местными целителями Алтая. Такое название растение получило в результате наблюдения за маралами, которые восстанавливали свои силы после поедания корней левзеи [260].

В традиционной медицине используют корни левзеи при перенапряжении, а также слабости после перенесенных заболеваний. На основе корней растения создают препараты с тонизирующими и адаптогенными эффектами для спортсменов. По данным традиционной медицины, левзея способствует кровообращению, очищению и детоксикации [166]. Экстракты из растения на основе корней и корневищ способствуют устранению умственной и физической усталости, их применяют при лечении импотенции, а также при инфекционных заболеваниях.

Примеры фармакологических свойств экстрактов левзеи сафлоровидной (*R. carthamoides*) представлены в таблице 1.1.1.

Как видно из таблицы 1.1.1, экстракты левзеи сафлоровидной проявляют разнообразные биологические свойства, обусловленные присутствием в них различных фитохимических веществ. К основным веществам, присутствующим в *R. carthamoides*, относят: фенольные кислоты, флавоноиды, а также фитостероиды и эфирные масла. Фитостероиды включают от 27 до 29 атомов углерода, полигидроксо-группы, а также скелет, состоящий из четырех колец [208, 435, 426]. Из двухсот описанных в литературе экистероидов из левзеи сафлоровидной были получены пятьдесят. Основным экистероидом левзеи является 20-гидроксиэкистерон, который доминирует в корнях растения [30, 31, 135]. Вещество имеет ряд фармакологических свойств: противовоспалительные, тонизирующие, метаболические, адаптогенные, антидиабетические [1, 30, 42, 43].

Флавоноиды *R. carthamoides* обуславливают антиоксидантные и гиполипидемические свойства растения. Антиоксидантный эффект связан с химическим строением веществ, в частности, наличием гидроксильных групп [408]. Из флавоноидов корни и листья содержат производные кверцетина, изорамнетина, патулетина, кемпферола. Кроме этого, в корнях

*R. carthamoides* присутствуют разнообразные фенольные кислоты, среди них – хлорогеновая, феруловая, эллаговая, салициловая, галловая и другие [441].

Таблица 1.1.1 – Биологическая активность экстрактов левзеи сафлоровидной

Тип экстракта / активные соединения	Биологическая модель	Оптимальная доза	Свойства / результаты	Источник
Водно-метанольный / кофеилхиновые кислоты	Клетки яичника китайского хомяка (СНО)	1 мг/мл	Антиоксидантное / EC <sub>50</sub> 5,29 мг/мл, стимулирование клеток СНО к восстановлению, защита ДНК от повреждения	[3, 82]
Водно-метанольный / кофеилхиновые кислоты	Клетки глиомы человека	0,75 мг/мл	Противораковое / ингибирование роста клеток и индуцирование апоптоза, двухцепочечного разрыва ДНК, снижение уровней мРНК UHRF1 и DNMT1, повышение экспрессии Вах и p53 и подавление Bcl-2	[238, 369]
Сухой экстракт	Самцы мышей F1 (СВАхС57В1/6)	100 мг/кг	Иммуномодулирующее / увеличение антителобразующих клеток в 1,9 и 2,1 раз	[37]
Водно-метанольный / кофеилхиновые кислоты	Клетки аденокарциномы легкого А549 и лейкоза человека – ССRF-СЕМ, К-562	0,313 мг/мл	Противораковое / появление митохондриальной дисфункции, индуцирование апоптоза	[368]
Эфирные масла / аплотаксен, нардозин-1(10),11-диен, циперен	<i>Enterococcus faecalis</i> (АТСС 29212) и <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (АТСС 27853), астроциты	125 мкг/мл	Антибактериальная, противовоспалительная / ингибирование роста бактерий, повышение уровней IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 и TNF- $\alpha$	[432]
Метанольный экстракт / экидистероны	Самцы крыс Sprague-Dawley	20 мг/кг	Нейропротекторный / повышенная регуляция PI3K, Akt, mTOR и фосфорилированных Akt и mTOR, предотвращение потери клеток гиппокампа, вызванного глутаматом	[144]

Эфирные масла левзеи сафлоровидной представлены монотерпенами ( $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -пинен, лимонен) и сесквитерпенами ( $\beta$ -кариофиллен, циперен, кадален). Несмотря на то, что эфирное масло упоминается как компонент растения, на сегодняшний день лимитировано количество информации по изучению его состава.

Более двух тысяч лет в народной медицине использовался женьшень настоящий или обыкновенный (*Panax ginseng*). Русский ботаник К.А. Мейер придумал название растению, у которого приставка «пан» означает все, а «аксос» – исцеление [282]. Женьшень настоящий входит в семейство *Araliaceae* и представляет собой многолетнее травянистое растение. В фитохимическом составе растения, в основном, присутствуют гинзенозиды, сапонины, эфирные масла, полисахариды, кислоты и другие вещества [318, 317, 422].

Гинзенозиды являются одними из главных биологически активных веществ женьшеня. Около двухсот гинзенозидов было изучено. К основным представителям данной группы соединений относятся Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rg<sub>1</sub> и другие. В зависимости от химического строения гинзенозиды делят на две группы. К первой относят протопанаксадиолы (PD), ко второй – протопанаксатриолы (PT). Они имеют общую стероидоподобную структуру, включающую четыре кольца, а также сахарный фрагмент. Отличие данных групп заключается в наличии различных углеводных фрагментов и карбоксильной группы в положениях углерода: 3, 6 и 20 [259]. Фармакологические свойства гинзенозидов представлены в таблице 1.1.2.

В таблице 1.1.2 рассмотрены несколько примеров положительного влияния гинзенозидов на живой организм. Наличие гинзенозидов в женьшене обыкновенном определяет его нейропротекторные, противовоспалительные, противодиабетические, противораковые, антивозрастные свойства.



Таблица 1.1.2 – Фармакологические свойства гинзенозидов *P. Ginseng*

Эффект	Гинзенозиды	Роль в организме	Источник
Нейропротекторный	Rg <sub>1</sub> и Rg <sub>2</sub>	Облегчение когнитивных дисфункций. Влияние на пути метаболизма сфинголипидов, гипоксантина и лецитина	[55]
	Rg <sub>1</sub>	Снижение отложения Aβ через путь GSK-3β/tau и PI3K/Akt/GSK-3β	[203, 300]
		Воздействие на митохондриальные белки, связанные с дисфункцией в патогенезе болезней	[209]
		Нейропротекторная защита, связанная с апоптозом	[200]
	Rg <sub>3</sub>	Снижение митохондриальной дисфункции	[205]
	Rf	Снижение токсичности β-амилоида на клеточном уровне	[301]
	K	Регулирует уровень Aβ через путь Nrf2/Keap1, ингибирует апоптоз нейронов	[199]
Противовоспалительный	Rb <sub>1</sub> , Rb <sub>2</sub> , Rd, Re, Rg <sub>5</sub> , Rh <sub>1</sub> , Rh <sub>2</sub> и Rp <sub>1</sub>	Регулируют сигнальные пути активин 1, NF-κB, подавление производства провоспалительных цитокинов	[375]
	Rc	Противовоспалительное свойство за счет ингибирования TANK-связывающей киназы и пути p38/ATF-2	[202]
	Rg <sub>1</sub>	Ингибирование экспрессии гена, кодирующего белок TLR4 и нижестоящие	[352]
Противодиабетический	Rg <sub>1</sub> , Rg <sub>3</sub> , Rg <sub>5</sub> , Rb <sub>1</sub> , Rb <sub>2</sub> , Rb <sub>3</sub> , Rk <sub>1</sub> , Re, Rd и Rh <sub>2</sub>	Увеличение устойчивости к инсулину, регулирование транспорта глюкозы, защита островковых клеток	[440]
Противораковый	Rg <sub>3</sub>	Замедление роста клеток колоректального рака	[206]
		Замедление развития рака печени за счет подавления выработки Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> коммутатора 1	[204]
		Ингибирование развития запущенной меланомы B16, опосредованное ингибированием путей Akt и ERK	[85]
	Rh <sub>2</sub>	Замедление развития глиобластомы у мышей за счет пути Wnt/β-катенина, усиление иммунологического ответа	[207]
	Rg <sub>5</sub>	Индукция аутофагии и апоптоза клеток рака молочной железы за счет подавления PI3K/Akt	[262]
Антивозрастной	Rg <sub>1</sub>	Смягчает повреждения тимуса и селезенки в крысиной модели старения	[353]
	Rb <sub>1</sub>	Подавление клеточного цикла и факторов апоптоза – Caspase-3 и Bax у мышей	[201]

Полисахариды также являются важными биологически активными соединениями женьшеня обыкновенного (*P. ginseng*). В растении они присутствуют в основном двух видов: крахмалоподобные глюканы и пектин. Декстран и арабиногалактан относят к крахмалоподобным. Галактоза, арабиноза, рамноза, галактуроновая кислота включены в пектин [469]. Очищенные полисахариды из *P. ginseng* обладают противовоспалительным действием на кишечник у крыс. При воздействии полисахаридами происходит увеличение аутофагии и подавление воспалительных реакций за счет угнетения LPS-продуцирующих бактерий. Они также активируют путь mTOR [239]. В другом исследовании лечение полисахаридами, выделенными из *P. ginseng*, способствовало снижению окислительного стресса. Кроме того, происходило уменьшение воспалительных цитокинов в результате ингибирования метаболического пути JAK2/STAT1/NLRP3 [338].

В состав растения входят эфирные масла, содержание (0,081–0,223 %) которых зависит от места произрастания и года. В эфирное масло женьшеня входят: сесквитерпеноиды, альдегиды, сложные эфиры, гетероциклы, жирные кислоты. Среди них *n*-гексадекановая кислота и фалкаринол содержатся в наибольшем количестве (около 32,28 % и 29,64 %, соответственно) [118].

Из несапониновых фракций *P. ginseng* содержит фенольные соединения, среди которых антиоксидантной активностью обладают салициловая, кофейная, ванилиновая, феруловая, *n*-кумаровая кислоты [324].

Элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*), также называемый сибирским женьшенем, представляет собой растение, которое традиционно использовалось в России и Китае как адаптогенное средство [52, 330]. Это кустарниковое растение из семейства *Araliaceae*. В 1855 году два русских ученых после путешествия по Дальнему Востоку положили начало изучению данного растения. В СССР элеутерококк колючий внедрили в медицинскую практику. После этого растение стало популярно в Европе [405, 434]. На данный момент его классифицируют как истинный адаптоген [49, 179]. В

народной медицине растение применяют при таких заболеваниях, как ревматизм, гепатит и диабет.

Фитохимический анализ элеутерококка колючего свидетельствует о наличии в нем таких веществ, как фенилпропаноиды (сирингин), флавоноиды, терпеноиды, лигнаны [50, 316, 395]. Ученые L. Zhang, B.B. Li и их коллеги выделили из этилацетатного экстракта элеутерококка четыре нелигнана, а также известные соединения: эритро-гваяцилглицерол- $\beta$ -кониферилловый альдегидный эфир, 1,3-пропандиол-2-*O*-4'-синапиловый эфир и другие. Было установлено, что данные вещества проявляли ингибирующий эффект в отношении протеинтирозинфосфатазы 1B (PTP1B), который считается негативным регулятором передачи сигналов инсулина [186]. Такое же свойство продемонстрировали выделенные из элеутерококка фуурофурановые лигнаны [138].

Экстракт корня элеутерококка, богатый сирингином, кофейной кислотой и изофраксидином, воздействует на макрофаги человека, которые поддерживают постоянство тканей [291]. Так, компоненты экстракта способствуют усилению полимеризации актина, а также улучшению фагоцитоза *E. coli* макрофагами [44].

Выделенный из элеутерококка колючего сирингин имеет широкий спектр фармакологических эффектов. Так, он эффективен при печеночной недостаточности. Имеются сведения о положительном влиянии сирингина на мышиную модель с острым повреждением легких. После воздействия биологически активным веществом у мышей увеличивалась активность миелопероксидазы, уменьшался отек легких. Уровни фактора некроза опухоли, вызванные липополисахаридом, снижались [354]. Также есть исследование, показывающее, что сирингин вызывает окислительный стресс в раковых клетках молочной железы [362].

Этанольный экстракт (70 %-ный) элеутерококка, включающий элеутерозид, способствовал подавлению ALOX12 (кодирует арахидонат-12-липоксигеназу и способствует нейротоксичности), что говорит о

нейропротекторном потенциале растения. Польза экстракта обнаруживается при лечении рака молочной железы, так как он подавляет экспрессию гена рецептора простагландина E 3-PTGER3 [315].

В другом исследовании этанольный экстракт элеутерококка вводился мышам в концентрации 200 мг/кг. Он активировал вещества, связанные с памятью, а именно ответный цАМФ-элемент и Akt, Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимую протеинкиназу II [126].

Экстракт растения, полученный с использованием воды в качестве экстрагента, положительно влиял на способность к обучению у облученных мышей. Он лучше влиял на баланс глутаматного цикла мозга [57]. S. Miyazaki, H. Oikawa и другие ученые продемонстрировали анксиолитические эффекты водного экстракта *E. senticosus*. Обработка 5 %-ным экстрактом усилила экспрессию белка BDNF в гиппокампе, а также воздействовала на функции вегетативных нервов [87].

Экстракт листьев *E. senticosus* оказывает положительное действие против ишемического инсульта. В работе R. Wang и других были выявлены потенциальные биомаркеры (около 42), связанные с ишемическим инсультом и подвергающиеся положительному воздействию экстракта. Так, например, было показано увеличение метаболитов в организме крыс: адреновой кислоты, L-уробилина, дезоксицитидина, L-метионина, простагландина E3, холевой кислоты и других [270].

Растение *E. senticosus* обладает антиоксидантным потенциалом. Выделенный из растения элеутерозид E1 имеет высокую противорадикальную активность с полумаксимальной эффективной концентрацией 37 мкг/мл в отношении 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилгидрата (DPPH) [468]. Показана активность полисахаридов и флавонов растения при окислительном стрессе *in vivo*. После обработки мышей облучением и последующего лечения растительными веществами у них были снижены показатели: белки теплового шока, глутатион-S-трансфераза, дисульфидизомераза [359].

Полисахариды из элеутерококка колючего проявляют противораковые свойства. Экстрагированные биологически активные вещества сдерживали пролиферацию клеток рака легких NCI-H520. Механизм связан с передачей сигналов Wnt/бета-катенина. Полумаксимальная ингибирующая концентрация составила 160 мг/мл [56].

Растение пальчатокоренник пятнистый или ятрышник (*Dactylorhiza maculata*) относится к семейству орхидные и является редким видом, внесенным в Красную книгу [17]. На территории Кемеровской области 20 видов орхидных из 27 являются исчезающими и включены как в Красную книгу России, так и Кемеровской области [22]. Несмотря на это, лишь небольшое количество данных растений производят на коммерческих предприятиях [288]. Слово «orchis» означает ядро, связанное с формой клубней у многих видов данного семейства. По-другому ятрышник называют: кукушкины слезы, зозулипец, дремлик. Встречается пальчатокоренник пятнистый как в сосновых лесах, так и на болотах. Растение является многолетним. В традиционной медицине ятрышник используют при отравлениях, катарах желудка, поражении кишечника, а также как адаптоген. Кроме этого, пальчатокоренник пятнистый полезен при эпилепсии, диабете, астме. Его используют как декоративное растение в разных странах в производстве кондитерских изделий, мороженого и напитков [167].

На Ближнем Востоке высушенные клубни пальчатокоренника пятнистого называют «салеп». В его фитохимический состав входит слизь, которая включает полисахарид глюкоманнан [4]. Глюкоманнан является пищевым волокном, который в традиционной медицине используется при желтухе, параличе, расстройствах желудка, диспепсии [312]. В «салепе» также содержатся крахмал, азотистые вещества, летучие масла, сахара, железо, калий [110].

На территории СФО произрастает пальчатокоренник пятнистый (ятрышник) (*Dactylorhiza maculata* L.). С использованием метода хромато-

масс-спектрометрии было показано, что ятрышник содержит сложные по химическому составу соединения. Ятрышник имеет противоопухолевый, антикоагулянтный потенциал благодаря содержанию кумаринов [38].

Этанольный экстракт (70 %-ный), полученный экстрагированием пальчатокоренника пятнистого при 60 °С, содержит в своем составе такие флавоноиды, как рутин, кверцетин, колеофолит, апигенин. Исследование показывает, что рутин содержится в больших количествах (73 мг/кг) [7].

Рутин представляет собой флаваноловый гликозид [380]. Известны его противовоспалительные свойства. Так, в мышечных клетках мышей рутин подавлял воспалительные процессы, обусловленные липополисахаридом. Механизм противовоспалительного действия заключался в сдерживании экспрессии iNOS, IL-6, TNF- $\alpha$  [382]. На звездчатых клетках печени (HSC-T6) и первичных гепацитах крыс (Sprague-Dawley) продемонстрировали способность рутина смягчать фиброгенез и воспаление печени. Жизнеспособность HSC-T6 значительно подавлялась концентрациями рутина от 12,5 до 200 мкМ. Подавление HSC является следствием воздействия рутина на экспрессию белка  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 и коллагена-1. После обработки веществом (концентрация 20–50 мкМ) наблюдалось снижение секреции воспалительных цитокинов [384].

Положительное влияние рутина наблюдается при сердечных заболеваниях [377]. Исследование с введением рутина в организм крыс в дозе 50 мг/кг показало улучшенную активность эритроцитов (АТФазную и Cd/Pb-индуцированную) [383]. В результате лечения рутином и кверцетином в концентрациях 50 и 100 мг/кг самцов крыс было выявлено защитное действие БАВ при кардиотоксичности, обусловленной 5-FU [396]. В работе Н. Yang, С. Wang и их коллег был описан кардиопротекторный эффект рутина. Клетки кардиомиоцитов крысы (H9c2) были обработаны рутином в концентрации 50 мкМ, которые далее подвергались гипоксии. В результате исследования было выявлено повышение жизнеспособности клеток H9c2, а также увеличение экспрессии SIRT 1. Концентрация биомаркеров, изучаемых

при окислительном стрессе (ферменты SOD, CAT и GSH-Px), повышалась, что говорит о защите рутина от повреждения гипоксией / реоксигенацией при стрессе [379].

Противораковая активность рутина наблюдалась в отношении клеток рака толстой кишки и молочной железы. Полуэффективная концентрация вещества составляла 29,1 и 45,6 мкМ, соответственно [220]. Эффективность вещества была показана против клеток рака почек человека (786-О) при концентрации 50 мкМ [73].

Также была зафиксирована антидиабетическая активность рутина. В результате лечения соединением крыс, больных диабетом, у них наблюдалось снижение уровня глюкозы в крови [74]. Кетоновые тела в моче перестают образовываться при лечении рутином при аллоксановом диабете. Снижаются уровни мочевины, холестерина, триглицеридов при использовании вещества в концентрации 100 мг/кг [381].

Диоскорея обыкновенная (*Dioscorea communis*), называемая также тамус обыкновенный, представляет собой многолетнее вьющееся растение. Растение имеет большие клубни длиной около 20–30 см, сердцевина которых покрыта пробковым слоем. В традиционной медицине используют все части растения, которые применяют для приготовления мочегонного, слабительного, рассасывающего средства. Сок, приготовленный из свежего корневища, используют при ревматизме, болях в мышцах [319].

В качестве сырья для экстрагирования используют свежие корневища, которые перед сушкой моют и нарезают. Экстракты диоскореи обычно готовят на оливковом масле или в 70 %-ном этаноле. Имеются данные, что экстракты на воде не обладают терапевтическим потенциалом [326]. А. Boudjada, А. Touil и другие выделяли фенантрены и дигидрофенантрены из растения диэтиловым эфиром. Содержание действующих веществ было очень низким – около 0,16 % [319]. В фитохимическом составе диоскореи обыкновенной присутствуют полярные и умеренно полярные биологически активные вещества. К ним относятся флавоноиды и фенольные кислоты.

Поэтому метиловый спирт также рассматривается в качестве экстрагента биологически активных веществ из диоскореи [320].

Мацерация или использование аппарата Сокслета – это основные методы, которые использовались при экстрагировании веществ из *D. communis*. При этом продолжительность экстрагирования варьируется от двух дней до одной недели [79, 83].

Первое исследование, описывающее химический состав диоскореи обыкновенной, было сделано в 1969 году. Так, было идентифицировано пять фенантронов [410]. Данные вторичные метаболиты позволяют растению приспособливаться к изменяющимся факторам окружающей среды. Их качественный и количественный состав различаются в зависимости от сезонных и геоклиматических условий произрастания растения. В настоящее время известно о более пятнадцати фенантренах (лузиантридин, орхинол, героренсо́ль, хризотоксен, нудоль и другие), присутствующих в диоскореи обыкновенной. Среди стеролов на силикагеле были получены  $\beta$ -ситостерол, стигмастерол, кампестерол [112, 193].

Полициклические ароматические соединения такие, как фенантроны и дигидрофенантроны, демонстрируют противовоспалительные свойства. Такие фенантроны, как 2,7-дигидрокси-4,6-диметоксифенантрен, 2,6-дигидрокси-4,7-диметоксифенантрен, 6,7-диметоксифенантрен и 6-гидрокси-2,4,7-триметоксифенантрен проявляли соизмеримую противовоспалительную активность с ибупрофеном и аспирином [321]. Среди идентифицированных веществ *D. communis* 2,7-дигидрокси-4,6-диметоксифенантрен подавляет экспрессию iNOS, COX-2 и ядерного фактора карра В (NF- $\kappa$ B), ответственных за воспаление [76]. Кроме противовоспалительных эффектов, фенантроны демонстрируют подавляющую способность пролиферации различных раковых клеток [442].

Среди стероидных сапонинов интерес представляет диосцин и его агликон диосгенин, обнаруженные в *D. communis*. Соединения проявляют противовоспалительное действие [364, 143]. При сердечно-сосудистых



заболеваниях диосгенин способен понижать уровень медиаторов воспаления: TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, циклооксигеназа-2 [94]. В случае с ишемией миокарда он воздействует на трансформирующий фактор роста-бета. Данный фактор стимулирует митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал (mitoK<sub>АТР</sub>) и снижает выработку цитокинов, регулирующих воспаление [142].

Исследование диосгенина в отношении раковых клеток молочной железы (MCF-7 и Hs578T) показало ингибирующую активность вещества. Через 48 часов практически 80 % клеток MCF-7 и 70 % – Hs578T подавляется при концентрации диосгенина 40 мкМ. Фосфорилирование играет большую роль в пролиферации клеток. Таким образом, в клетках MCF-7 диосгенин способен увеличивать уровень фосфорилирования p53 по Ser15 через активацию p-Chk1<sup>Ser345</sup> [235]. В клетках рака желчных протоков под влиянием биологически активного вещества происходит задержка фазы G2/M и митохондриально-опосредованный апоптоз. Было показано, что путь GSK3 $\beta$ / $\beta$ -катенин является индуктором апоптоза [267]. Апоптоз рака желчного пузыря связан с воздействием диосгенина на сигнальный путь PI3K/AKT, в результате чего происходит генерирование радикалов [140]. TAZ является коактиватором транскрипции с мотивом связывания PDS и играет онкогенную роль в канцерогенезе печени. Было показано, что вторичный метаболит растения ингибировал данный коактиватор [141].

Диоскорея обыкновенная также содержит специфические лиганды, связывающие ионы цинка. Было продемонстрировано, что в растении концентрация цинка превышает содержание ионов меди и железа [297].

Сапожниковия растопыренная (*Saposhnikovia divaricata*) относится к многолетним травянистым растениям из семейства зонтичных. В традиционной медицине для лечения простуды, инсульта, столбняка, головных болей, ревматизма используют корни растения (*Saposhnikovia Radix*) [228, 429]. Растение имеет разветвленный стебель, и его высота достигает 80 см. Это засухо- и холодоустойчивое растение, что обуславливает его

распространенность как на холмах и лугах, так и на гравийных склонах [151, 145, 323].

В сапожниковии растопыренной обнаружено около 100 биологически активных соединений, имеющих различную структуру. Были выделены следующие вещества: хромоны, сложные эфиры, кумарины, полисахариды, полиацетилены [390, 261, 256].

Хромоны являются одними из самых изученных вторичных метаболитов *S. divaricata*. В настоящее время расшифровано около 17 хромонов. Хромоны представляют собой кислородосодержащие соединения, включающие гетероциклы. Этот подкласс флавоноидов содержит бензоциклизированное кольцо  $\gamma$ -пирона. В сапожниковии встречаются следующие хромоны [258]: вогонин, ледебуриеллол, сек-О-глюкозилхамаудол, 3'-О-ацетилхамаудол, диварикатол, цимифугин, ундулатозид А.

Фармакологические свойства хромонов заключаются в противовоспалительных, антиоксидантных, иммуностимулирующих эффектах [78, 71, 423]. Цимифугин и прим-О-глюкозилцимифугин являются первичными чаще встречающимися хромонами [88, 399, 117]. Прим-О-глюкозилцимифугин, цимифугин и 4'-О- $\beta$ -D-глюкозил-5-О-метилвисамминол, выделенные из корня *Saposhnikovia Radix*, эффективно ингибируют высвобождение гистамина, что показывает их противоаллергическое действие [392].

Из сверхкритического CO<sub>2</sub> и этанольного экстракта сапожниковии растопыренной были выделены кислоты и их эфиры. Одним из них является фенипропаноидный эфир, который в липополисахаридных индуцированных макрофагах мышей подавляет оксид азота. Еще одним выделенным эфиром из сапожниковии является линдиол.

К другим распространенным веществам *S. divaricata* относят бензопироны (кумарины). Они включают бензольное и пирановое кольцо. В растении встречаются как простые кумарины, так и фуранокумарины, пиранокумарины и другие. Среди простых кумаринов известны [389]:

фраксидин, изофраксидин, скополетин, умбеллиферон, 5-метокси-7- (3,3-диметилаллилокси)-кумарин.

Известно, что кумарины обладают противораковой активностью и эффективны при простудных заболеваниях [360]. Такие кумарины, как бергаптен, изоимператорин, мармезин, (+)-декурсинол, оксипеucedанина гидрат, показали цитотоксический эффект в клетках рака предстательной железы DU-154. При этом их потенциал был более высокий, чем у цисплатина. Также подавляющее действие на клетки меланомы показал (+)-декурсинол [123].

Среди полиацетиленовых веществ в фитохимическом составе сапожниковии растопыренной обнаружены: фалькариндиол, (8E)-гептадека-1,8-диен-4,6-диин-3,10-диол, панаксинол, (8E)-10-гидроперокси-1,8-гептадекадиен-4,6-диин-3-ол и (9Z)-1-метокси-9-гептадецен-4,6-диин-3-ол [119]. Недавно Y. Sun и другие ученые выделили четыре новых полиацетилена (садиваэтин A–D) и оценили их цитотоксичность по отношению к двум линиям раковых клеток человека. Соединения проявляли ингибирующее действие со значениями полумаксимальной эффективной концентрации 16,56; 12,89; 1,22 и 35,60 мкМ, соответственно [187].

Из экстракта высушенных корней *S. divaricata* получают полисахариды. В одном исследовании были выделены и очищены два нативных полисахарида (SDNP-1 и SDNP-2), включающих арабинозу и галактозу. Полисахариды являлись арабиногалактанами AGII-типа. Кроме того, SDNP-2 обладает антагонистическим свойством при иммуносупрессии [414]. Y. Meng и другие извлекли из *S. divaricata* четыре фракции полисахаридов. SDP1 представляет собой 1,4- $\alpha$ -глюкан. SDP2, помимо 1,4- $\alpha$ -глюкана, включает арабиногалактан. SDP3 содержит большое количество арабиногалактана. SDP4 отнесен к пектиновому арабиногалактану. Все извлеченные вещества проявляли антиоксидантную активность на молекулярном и клеточном уровне [356]. В другом исследовании было показано, что полисахариды сапожниковии способствуют росту U937 (клеточная линия макрофагов), что ведет к

торможению роста опухоли у мышей, включая ксентрансплантатные опухоли [139].

Таким образом, приведенный обзор показывает многообразие химического состава растительного сырья, произрастающего на территории Евразии. Оно обладает различной фармакологической активностью, но их промышленное использование сдерживает ряд объективных причин: сохранение редких и исчезающих видов растений, фитогеографические и сезонные колебания, трудности выращивания и низкая продуктивность процесса. Клеточная инженерия – один из основных разделов современной биотехнологии, позволяющая выделять и культивировать ткани и клетки высших многоклеточных микроорганизмов вне организма в специально подобранных условиях. Это рациональный способ получения биокomпонентов растительного происхождения без антропогенного прессинга на флору.

## 1.2 Перспективы использования клеточных культур *in vitro* растений для получения вторичных метаболитов

В растениях содержится большое разнообразие важных биологически активных веществ. Несмотря на это, неограниченное их использование может привести к исчезновению видов. Некоторые растения уже занесены в Красную книгу, что ограничивает их применение. Для альтернативного экологического решения предусматривается использование культур растительных клеток *in vitro*. Этот метод является эффективным и многообещающим, позволяющим выращивать растения в биореакторах [159]. Клеточные или тканевые культуры растений выращивают на питательной среде для получения клонов. Таким образом, используется восстанавливающая способность растений при использовании эксплантов или черенков. Основными преимуществами метода являются [332, 331, 115]:

- поставка свежего материала независимо от сезона;
- отсутствие контаминации вторичных метаболитов;
- возможность выращивания редких и исчезающих растений;
- выращивание растений можно производить в регионах, не занимающихся сельским хозяйством.

Метод выращивания клеточных культур *in vitro* включает производство каллусов, зародышей, иммобилизованных клеток, клеточных суспензий, корней [294].

Первые каллусные культуры растений были получены в начале 20-го века [107]. Только к шестидесятым годам появился практический интерес к биологическому синтезу растительных метаболитов. У растений возникновение каллусов (непрямого органогенеза) связано с перепрограммированием клеток паренхимы [108]. В результате этого появляется дезорганизованная масса, состоящая из быстро делящихся клеток. Предполагается, что дифференцированные клетки растений могут

дифференцировать и регенерировать поврежденную ткань, а также полностью все растение [337]. Также имеется концепция, утверждающая, что каллус формируется из стволовых клеток [155].

Физические и химические раздражители являются индукторами каллусогенеза [287]. Такие пути и регуляторные каскады, как путь, вызванный раной, а также пути, связанные с цитокином и ауксином, способствуют клеточному перепрограммированию [134]. К сигналам, связанным с путем, индуцированным ранением, относятся давление и электрический ток, активные формы кислорода, этилен, некоторые кислоты (салициловая), олигосахариды. Они играют большую роль в регенерации [467]. В одной работе было исследовано формирование мозоли, и установлено, что ранение воздействует на экспрессию генов, ответственных за биосинтез гормонов. Это является следствием повышенного накопления цитокина, который обуславливает образование мозолей [465]. В другом исследовании была подтверждена выработка факторов WIND1, N3K9/14ac и N3K27ac, обусловленных ранением растений [227].

На формирование вторичных метаболитов в каллусной культуре влияют внешние факторы (рН, свет, температура, аэрирование, влажность). В основном, каллусы выращивают на твердых агаризованных средах с внесением сахаров, витаминов, солей, а также молекул-предшественников [329, 393]. Для фотосинтеза, а также гликолиза в среду добавляют фосфаты, которые в высоких концентрациях также поддерживают метаболизм растения и благоприятствуют росту каллусов. Для накопления вторичных метаболитов требуется внесение фосфатов. Такие среды, как Скуга, среда Уайта, а также среда для древесных растений, используются в качестве стандартных при выращивании каллусов [290, 463, 263].

Необходимым условием для формирования каллусов является использование фитогормонов, которые способствуют регенерации растений из каллусной ткани. Известны такие гормоны, как ауксин, цитокинины, гиббереллины. Первым идентифицированным гормоном являлся ауксин,

который играет важную роль в эмбриогенезе, прорастании, цветении, фототропизме. Среди цитокининов известны зеатин и дигидрозеатин, идентифицированные в семенах кукурузы и люпина. Недавно было обнаружено, что психоактивный препарат фипексид вызывает образование каллусов и побегов [188].

Вторичные метаболиты обуславливают потенциал лекарственных растений для лечения и профилактики различных заболеваний. Клеточные культуры *in vitro* являются многообещающим сырьем при производстве биологически активных веществ [211].

Биологически активные вещества в каллусных культурах накапливаются в больших количествах, чем в растениях дикого типа. В работе R. Rameshkumara и других было показано, что в экстракте из каллуса *N. ciliatus* содержится сквалена (21,4 %) больше, чем в контроле (9,3 %) [348]. В другой работе количество тритерпеновых кислот продуцировалось в плодах *A. sellowiana in vitro* на 27,93 мг/г выше, чем *in vivo* [454]. Метанольный экстракт каллуса *S. asoca* проявлял значительную антимикробную активность и имел более высокое содержание общего фенола (984,2 мг/г) и танина (684,6 мг/г) по сравнению с диким растением (864,1 и 312,3 мг/г, соответственно) [456].

Различные вторичные метаболиты из растительных источников, полученных *in vitro*, могут выступать как противораковые агенты. В работе C.F. Wu, A. Karioti и других из каллусной культуры *S. miltiorrhiza* были выделены розмариновая и сальвианоловая кислоты. При этом содержание активных соединений в экстрактах каллусных культур было выше, чем в экстрактах нативных растений. Экстракт с повышенным содержанием веществ проявил цитотоксическую активность по отношению к клеткам острого лимфобластного лейкоза CCRF-CEM. Полумаксимальная эффективная концентрация составляла 13,1 мкг/мл [347].

Таксол представляет собой дитерпеновый алкалоид, который входит в фитохимический состав дерева *Taxus*. Это противораковое вещество выпускают на рынке с 1993 года, но существует проблема, заключающаяся в увеличении

потребления таксола, что ведет к ограничению ресурса, так как деревья растут и созревают на протяжении нескольких лет. Кроме того, концентрация вещества в растении очень низкая. При выращивании каллусных культур *Taxus baccata* получили повышенное содержание таксола [431].

На специальной среде M10 с содержанием спиролины, гидролизата казеина и геллерита вырастили каллусы *C. avellana* L. Выделенный из каллусной культуры таксол (107 мкг/л) по содержанию превосходил контроль (78 мкг/л) [386]. Повышенное содержание таксанов также наблюдалось в каллусах, выращенных на среде Гамборга В5, содержащей 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту [178].

Исходным материалом для получения веществ (тенипозид и этопозид), применяемых в терапии рака, является лигнан (подофиллотоксин) [90]. Растения (*P. hexandrum* и *P. peltatum*), содержащие биологически активное вещество, имеют медленный темп роста, поэтому был оптимизирован способ выращивания каллусов (по органогенному пути) из *Linum album* с высоким уровнем лигнана [147]. Из каллусов *D. pleiantha* получили подофиллотоксин, а также кемпферол и кверцетин [255].

Низкие концентрации индольных алкалоидов (винкристина и винбластин) содержит растение *C. roseus*. Поэтому для повышенного накопления вещества были культивированы каллусные культуры *C. roseus* на среде В5 с дополнительным внесением сахарозы, кинетина, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, а также нафталин-уксусной кислоты. Содержание алкалоидов в каллусе было на 5,67 мг/г выше, чем в контроле [111].

Экстракты из каллусной культуры *E. purpurea*, выращенные на среде с различными концентрациями наночастиц ZnO, имеют повышенное содержание флавоноидов. Экстракты каллусов показали цитотоксическую активность в отношении раковых клеток MCF-7 [162].

Противоопухолевой и противомикробной активностью обладают флавоны и алкалоиды из *S. flavescens*. Само растение используют при астме, желудочно-кишечных кровотечениях, воспалениях. Также в составе растения



присутствует маакианин, который является флавоноидом (производное птерокарпана). Каллусы растения обладают высокой антиоксидантной активностью в отношении радикалов DPPH и продуцируют в 10 раз больше маакианина по сравнению с растением дикого типа [345].

Новые биологически активные вещества, такие как сальвиалактомин, 3-дигидроксипропиловый эфир, 5-метилфлаван, были выделены из каллуса *S. santolinifolia*. Полуэффективная ингибирующая концентрация в отношении рака шейки матки и предстательной железы была менее 30 мкМ, если учитывать, что в качестве стандарта использовался доксорубицин [48].

Для получения повышенного содержания БАВ изучают воздействие различных факторов на накопление вторичных метаболитов в клеточных культурах. В исследовании V. Ossipov и его коллег изучали воздействие света на накопление фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения (*Camellia sinensis*). Моно-, олиго- и полимеры флаван-3-ола, а также салициловая, галловая и галлоилхинная кислоты были основными изучаемыми фенольными веществами. Было показано, что каллус, выращенный на свету, содержал флаван-3-олов в 2 раза выше, но при этом накопление кислот уменьшалось в 3 раза [436].

Основными пигментами, обнаруженными в чернике, являются антоцианы. Различные исследования показывают, что ягоду можно использовать для профилактики от возникновения опухолей [266], диабета [53], нейродегенеративных расстройств [299, 365], сердечно-сосудистых заболеваний [150]. Процесс выделения данных биологически активных веществ из растительных тканей ограничен, что связано с их низким выходом, а также сезонной доступностью сырья. В качестве альтернативы дикого сырья используется культура каллуса. Изучение влияния света на накопление антоцианов показало, что применение красного света увеличивало содержание антоцианов в каллусе. При этом появляются такие антоцианы, как петунидин-3-О-арабинозид, цианидин-3-О-арабинозид и процианидины [237].

Перспективным биотехнологическим подходом является производство биологически активных веществ из каллусных культур с использованием элиситоров (стрессоры). Данные вещества стимулируют и защищают растение, а также имеют химический или биологический характер [105]. При получении биоактивных метаболитов из каллуса базилика в качестве элиситора использовалась салициловая кислота, которая усиливает устойчивость растения к патогенам. С использованием кислоты были получены каллусы с максимальной биомассой, содержащей высокую концентрацию кофейной кислоты (0,54 мг/г). Экстракт показал эффективность при окислительном стрессе и потенциал при профилактике диабета [421]. В качестве элиситора используются нановолокна целлюлозы. В результате использования данного вещества была индуцирована повышенная выработка бетулина (0,7 мг/г) и бетулиновой кислоты (0,98 мг/г) в каллусах березы [451]. Обработка хитозаном, уменьшающим окислительный стресс, способствует повышению выхода эфирных масел, в частности тимола и *n*-цимола в каллусах *Carum copticum* L. При этом содержание тимола в каллусе выше, чем в проростках [361].

Добавление сахаров стимулирует выработку вторичных метаболитов. Культура каллусов *F. indica*, обработанная глюкозой, имела повышенное содержание фенолов и высокую антиоксидантную активность [113].

Воздействие ультрафиолетовым излучением на каллусные культуры *L. sativum* в течение 60 минут показало максимальное накопление биомассы растения. Содержание фенолов составило 448,11 мг/л. Кроме того, экстракт каллуса имеет антидиабетический эффект: ингибирование  $\alpha$ -амилазы (55,54 %) и  $\alpha$ -глюкозидазы (48,59 %) [149].

Другой разновидностью клеточных культур *in vitro* являются суспензионные культуры из дедифференцированных клеток. Метод получения суспензионных культур считается эффективным, простым и экономически выгодным. Суспензионную культуру получают из выращенных в жидкой питательной среде каллусов. Период культивирования

занимает около трех недель [100]. На рисунке 1.2.1 представлена схема получения клеточной суспензии из каллусных культур.

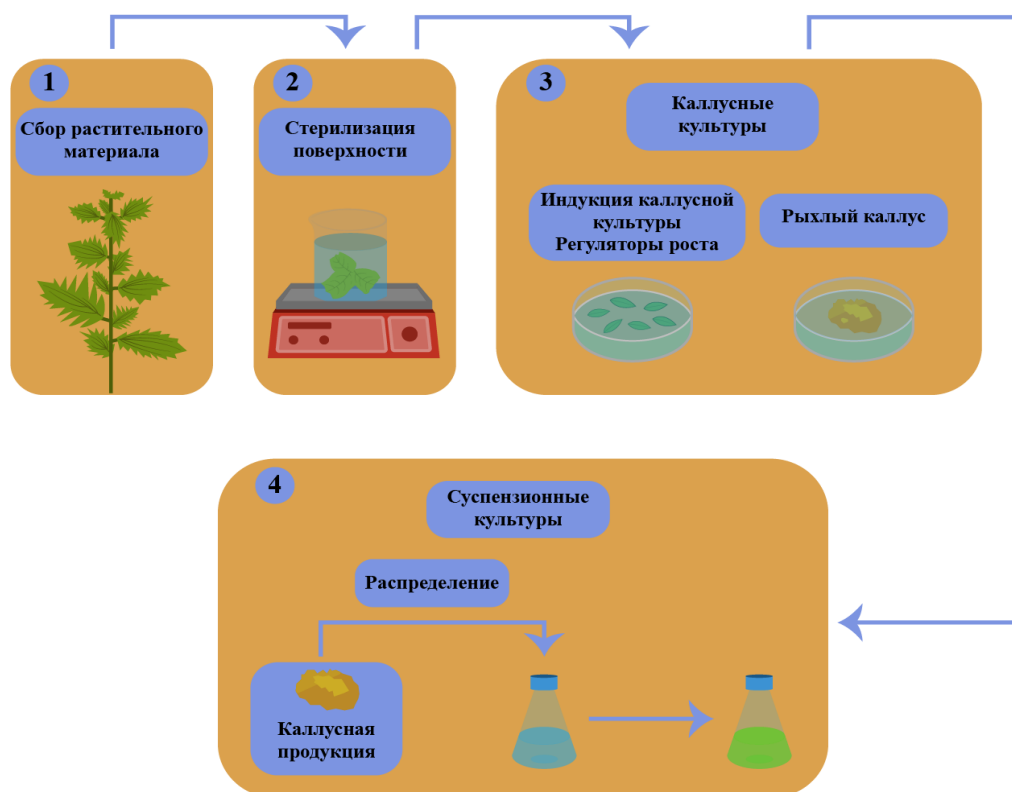


Рисунок 1.2.1 – Получение клеточной суспензии

Суспензионные культуры можно выращивать как в лабораторных, так и промышленных условиях. В промышленности используются крупномасштабные биореакторы [101]. Успешное получение суспензионных культур зависит от условий выращивания рыхлого каллуса, которые необходимо оптимизировать. Как и при выращивании каллусов, при производстве суспензионных культур необходимо применять элиситоры (хитин, глюкан, целлюлаза, жасмоновая, салициловая кислоты, УФ-лучи, давление) [106].

Для коммерческого и крупномасштабного производства клеточных культур используют следующие биореакторы [159]:

– биореактор с мешалкой (STB) – осуществляет механическое перемешивание. Внутри реактора имеется смеситель (пропеллерный или

турбинный). Некоторые аппараты имеют входной поток для газации. Работает как в периодическом, так и полунепрерывном режиме. Преимуществом оборудования является использование эффективной системы смешивания, а также возможность использования высоковязких жидкостей. Несмотря на это, использование аппарата приводит к высокому потреблению энергии;

– эрлифтный биореактор (ALB) – реактор пневматического типа. Представляет собой башенный реактор, в котором жидкость перемешивается с газом, попадающим в нижнюю часть трубы. Преимуществами оборудования являются простота обслуживания, отсутствие подвижных частей, снижающее риск загрязнения продукта. К недостаткам относят повышенное пенообразование, недостаточное перемешивание вязких жидкостей, невысокий перенос кислорода;

– барботажная колонна (BC) – цилиндрические колонны, которые работают в условиях течения газа снизу вверх через сопло или распылительные кольца. Отличительным признаком конструкции является ее простота и сниженный риск загрязнения продукта;

– биореактор с волновым перемешиванием (WSB).

Биологически активные вещества, получаемые из суспензионных культур растений, и их свойства представлены в таблице 1.2.1.

Таблица 1.2.1 – Биологически активные вещества, получаемые из суспензионных культур растений

Суспензионная культура растения	Биологически активное вещество	Содержание в суспензионных культурах (растениях)	Биологическое свойство	Источник
Душица обыкновенная ( <i>O. vulgare</i> )	Розмариновая кислота	31,25 мг/г (23,53 мг/г)	Антиоксидантное	[137, 322]
Шалфей лекарственный ( <i>S. officinalis</i> )	Розмариновая кислота	360 мг/г (30 мг/г)	Антиоксидантное	[402]

Продолжение таблицы 1.2.1

Суспензионная культура растения	Биологически активное вещество	Содержание в суспензионных культурах (растениях)	Биологическое свойство	Источник
Тис китайский ( <i>Taxus chinensis</i> )	Таксол	1,5 мг/г (0,02 мг/г)	Противораковое	[104]
Полынь однолетняя ( <i>A. annua</i> )	Артемизинин	9,33 мг/л (1 мг/г)	Антиоксидантное	[385, 103]
Вербена лекарственная ( <i>V. officinalis</i> )	Вербаскозид	70,59 мг/г (22,63 мг/г)	Антиоксидантное, противовоспалительное, антипролиферативное, антибактериальное	[349]
Камптотека остроконечная ( <i>C. acuminata</i> )	Камптотецин	2,03 мг/г (0,2 до 5,0 мг/г)	Противораковое	[160]
Шафран посевной ( <i>Crocus sativus</i> )	Кроцин	0,22 мг/мл (0,032 мг/мл)	Антидепрессивное, антиоксидантное, противораковое	[388, 430]
Базилик душистый ( <i>Ocimum basilicum</i> )	Розмариновая кислота	12,32 мг/г (0,7 мг/г)	Антиоксидантное	[59, 158, 232]
	Цикоревая кислота	5,10 мг/г (нет данных)		
	Рутин	7,56 мг/г (1,16 мг/г)		
	Изокверцетин	4,68 мг/г (нет данных)		
Тимьян ( <i>T. persicus</i> )	Олеаноловая кислота. Урсоловая кислота	0,10 мг/г (нет данных) 0,11 мг/г (нет данных)	Противоопухолевое, противовоспалительное	[96, 304]
Аралия высокая ( <i>Aralia elata</i> )	Олеаноловая кислота	0,655 мг/г (нет данных)	Противоопухолевое, противовоспалительное	[54]
Расторопша пятнистая ( <i>S. marianum</i> )	Силимарин	0,309 мг/мл (0–77 мг/г)	Гепатопротекторное, Кардиопротекторное, антибактериальное, противовоспалительное	[146, 439]
Гигрофила иволистная ( <i>H. Angustifolia</i> )	Кофейная кислота	1,02 мкг/мг (1,04)	Антиоксидантное, иммуномодулирующее	[325]
	Рутин	0,98 мкг/мг (нет данных)		
	Катехин	1,45 мкг/мг (1,47 мкг/мг)		

Из таблицы 1.2.1 видно, что содержание вторичных метаболитов с различной биологической активностью в суспензионных культурах практически во всех рассмотренных примерах выше, чем в диких растениях.

Получение трансформированных корней (hairy roots) является актуальным при производстве биологически активных веществ коммерческого назначения. Этот метод предполагает получение тканевой культуры с помощью почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes*. В целом, корневые культуры имеют следующие преимущества [271]: генетическая и биосинтетическая устойчивость, быстрый рост, отсутствие геотропизма, простота ухода.

Почвенная бактерия *A. rhizogenes* имеет палочковидную форму и является грамотрицательной [403, 46]. В результате воздействия данных бактерий на корневые культуры происходит образование пролиферативных разветвленных придаточных корней [191]. Такие корни называют волосатые, так как они имеют более разветвленную структуру, которая обладает значительным меристематическим ростом [216]. Почвенная бактерия имеет Ti- или Ri-плазмиды, фрагменты которой переносятся в хромосому растений [195, 194, 427]. Другое название данной плазмиды – Т-ДНК. Она включает в себя гены, ответственные за синтез опинов (модифицированные аминокислоты). Эти аминокислоты представляют собой источник азота для определенных видов *Agrobacterium*. К основным видам *Agrobacterium* относят *A. vitis* и *A. tumefaciens*. Синтезу ауксина у них способствует экспрессия онкогенов *iaaH* и *iaaM*. За продукцию цитокининов отвечает ген *ipt*.

У *A. rhizogenes* Т-ДНК наблюдается ген двух видов, как единый фрагмент, так и состоящий из двух частей. Одна часть Т-ДНК включает гены, кодирующие корнеобразование, другая ответственна за биосинтез опинов и ауксина [370]. Существует несколько штаммов *A. rhizogenes*, которые различаются между собой по продуцированию опинов (агропин, октопин,

нопалин и др.). Предпочтение отдается штаммам, несущим ген агропина и позволяющим в большей степени влиять на образование корней [114].

Для выращивания корневых культур используются такие экспланты, как листья, стебли, протопласты, корни и клубни. Повреждение эксплантов осуществляют стерильной иглой или скальпелем. Далее на поврежденную поверхность вносят бактериальную суспензию. Культивирование эксплантов с бактериями осуществляют в полутвердой среде. Для удаления избыточных бактерий с поверхности экспланта в среду вносят такие антибиотики, как стрептомицин, карбенициллин, тетрациклин и другие. Около 7–30 дней происходит проращивание корней. Индуцированные корни пересаживают на среды с различными элиситорами. Кроме того, осуществляют варьирование условий выращивания (рН, свет, температура).

Вторичные метаболиты растений можно выделять из нетрансгенных и трансгенных волосатых корней. В первом случае выбирают растения, которые производят интересующий метаболит в диком типе [217, 394]. Примером биологически активного вещества является камптотетин. Это соединение исследовалось как противоопухолевое вещество, направленное на лечение рака яичников [461]. Другим соединением, представляющим интерес при регенерации мозга, является витанолид А [69]. Методы генной инженерии позволяют получить трансгенные растения с увеличенным производством специального биологически активного вещества. Были получены следующие вещества: гиосциамин и скополамин [425, 257]; гинзенозиды; витамин С [234].

В исследовании S. Sirikantaramas и F. Taura получили каннабиноиды из корневых культур растения *N. tabacum*, дикий тип которого ранее не синтезировал данное соединение [401].

Оптимизация условий культивирования и выработка биологически активных веществ в корневых культурах представлены в таблице 1.2.2.

Таблица 1.2.2 – Биологически активные вещества, получаемые из корневых культур растений

Корневая культура	Элиситоры	БАВ	Концентрация	Свойство	Источник
<i>T. wilfordii</i>	10:50 мМ (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Сесквитерпеновые алкалоиды (вильфоргин и вильфорин)	1,101 мг/колба; 0,433 мг/колба	иммуносупрессивное	[231, 433]
<i>S. officinalis</i>	TiO <sub>2</sub> (50 мг/л)	Кумаровая кислота	53,68 мг/кг	антиоксидантное	[367]
<i>T. foenum graecum</i>	ZnO (2х базовой среды В5)	Тригонеллин	1,85 мг/г	Противовоспалительное, антиоксидантное, нейропротекторное	[243, 443]
<i>P. tuni-coides</i>	Хитозан (200 мг/л)	Сапонин	14,82 мг/г	антиоксидантное	[122]
<i>S. miltio-rrhiza</i>	AgNP-β-CD (30 мг/л)	Таншинон	10,8 мг/л	сердечнозащитное, антиагрегационное, противараковое	[411]
<i>A. hypogaea</i>	Без света, паракват (500 мкМ), метилжасмонат (100 мкМ), циклодекстрин (6,87 мМ)	<i>транс</i> -ресвератрол	274,29 мг/г	антиоксидантное	[148]
<i>C. cajan</i>	УФ-излучение (3 Вт/м <sup>2</sup> )	Флавоноиды (ориентин, витексин, генистин, генистеин и апигенин)	414,95 мкг/г	антиоксидантное, противораковое, противовоспалительное, нейропротекторное	[89, 335, 269, 424]
<i>A. scaber</i>	Дрожжевой экстракт (100 мг/л)	Флавоноиды (мирицетин, кверцетин, кемпферол, рутин, нарингенин, биоханин А, формонетин)	6,0 мг/г	антиоксидантное, антидиабетическое, противовоспалительное, противораковое	[198]
<i>O. tenuiflorum</i>	Дрожжевой экстракт (50 мг/л)	Урсоловая кислота, эвгенол	1,56 мг/г 0,41 мг/г	антиоксидантное, антигенотоксическое, противодиабетическое, антимикробное	[397, 95, 448]
<i>R. tinctorum</i>	Метилжасмонат (100 мкМ)	Антрахиноны	62,4 мкМ	Фотосенсибилизирующее, противораковое	[161]
<i>T. pratense</i>	Сахароза (60 г/л)	Изофлавоны	27,88 мг/г	антиоксидантное, гипополипидемическое	[244, 154]



Рассмотренные преимущества выращивания клеточных и тканевых культур *in vitro* делают их перспективным сырьем для получения ценных вторичных метаболитов, так как это экологически чистое сырье имеет повышенное содержание различных веществ, которые можно выделять различными методами экстрагирования в течение года.

### **1.3 Обзор технологий экстракции растительного сырья и выделения вторичных метаболитов растений из экстрактов**

Методы экстрагирования биологически активных веществ играют значительную роль при получении высококачественных растительных продуктов. Как одна из важных процедур, экстракция влияет на выход веществ из растительного материала и их разнообразие. Сама экстракция обуславливается многими факторами, такими как выбор сырья, растворителя, а также способа воздействия. Выбор правильного процесса экстрагирования необходим для максимального извлечения вторичных метаболитов из сырья, в качестве которого выступают корни, плоды, листья, ягоды, цветы, корневища [252].

Методы экстрагирования делят на традиционные и современные («продвинутое») [420]. Традиционные методы основываются на применении различных растворителей, а также перемешивании в сочетании с нагреванием.

Одним из простых методов является мацерация, которая предусматривает получение термолабильных веществ [406, 366]. Биологически активные компоненты извлекают различными растворителями (масло, вода, спирт) при комнатной температуре. Перед экстракцией сырье измельчают до порошкообразного состояния. Далее его замачивают в

закрытом сосуде совместно с растворителем. По окончании процесса растворитель подвергают фильтрованию и отжиму. Для усиления диффузии активных веществ используют перемешивание [398, 61]. Несмотря на простоту, способ имеет серьезный недостаток, заключающийся в длительности процесса (до нескольких недель). Примером использования технологии является получение фенольного вещества (антрахинона) из растения *R. emodi*. В качестве растворителя использовался этанол, продолжительность экстракции составляла 24 ч [91].

Простотой в эксплуатации отличаются методы получения настоя и отвара. Настой, по сравнению с мацерацией, имеет более короткий период замачивания, при этом сырье может заливаться как холодной, так и горячей водой. Отвар применяется для извлечения термостабильных соединений посредством кипячения растительного материала. K. Acharya, S. Ghosh и R. Biswas сделали сравнительный анализ применения этих двух методов для извлечения БАВ из грибов. Показано, что фракция настоя содержала значительно больше фенолов, аскорбиновой кислоты, флавоноидов, ликопина [58]. N. Ergen и другие выявили, что экстракты, полученные на основе настоев и отваров, проявляют геропротекторные свойства [168]. Также в другом исследовании [241] имеются данные о высокой антиоксидантной активности и содержании фенолов. Несмотря на положительные фармакологические эффекты отваров и настоев, они требуют больших затрат растворителя [175].

Более эффективным способом, по сравнению с мацерацией, является перколяция. Процесс осуществляют в перколяторе, имеющем специальную систему фильтрации на дне. Перед основным процессом производят замачивание сырья в растворителе (около 2–4 часов). При данном способе происходит непрерывный процесс экстрагирования, при котором постоянно происходит смена растворителя на более свежий. В конце процесса экстракты объединяют вместе. Недостатками метода являются использование большого количества растворителя и длительность процесса [254].

Экстракция по Сокслету [9, 68, 455, 251] заключается в проведении перколяции с обратным холодильником. Растительное измельченное сырье помещают в специальные гильзы («наперсток»), которые расположены в экстракционной камере аппарата Сокслета (разработан в 1879 году). Растворитель подвергается нагреванию и охлаждению, в результате чего происходит смачивание образца и экстрагирование активных веществ. Экстракт собирают в колбе через трубку сифона. Процесс проводят несколько раз. После этого выпаривают растворитель. Метод широко применяется для получения масла из растительного сырья [66]. Примером извлечения масла по экстракции Сокслета является экстрагирование вещества из сладкой маракуйи. В качестве растворителя наиболее эффективным оказался *n*-гексан, который после процесса экстрагирования содержал наибольшее количество токоферола и имел повышенную антиоксидантную активность [93].

Эфирные масла извлекают при помощи метода гидродистилляции, при котором вместе с водой растительное сырье помещается в перегонный куб. Смесь подвергают нагреванию, что приводит к образованию паров. Также модификацией метода является введение паров растворителя непосредственно в сырье. После конденсирования паровой смеси происходит разделение масла и воды. Метод не применим для получения термолабильных веществ [190, 387].

Инновационным и экологичным подходом является использование солнечных коллекторов, которые соединяются с аппаратом для генерации пара. Такой вид экстракции еще называют солнечной дистилляцией. В работе А. Afzal, А. Munir и их коллег описано извлечение эфирных масел с помощью разработанной системы солнечной дистилляции. Установка включала первичный рефлектор, фотогальваническую панель, телескопический зажимной механизм, пароприемник, колонну перегонного куба, бочковой калориметр, конденсатор. Концентрация полученных

эфирных масел из листьев эвкалипта и мяты перечной составила 0,59 и 0,40 %, соответственно [136].

В другом исследовании были получены эфирные масла апельсина. Авторы отметили, что процесс гидродистилляции с использованием системы сбора солнечной энергии, которая была оснащена вторичным отражателем, протекал быстрее, чем в традиционной системе [212].

Традиционные методы экстракции используют в лабораторной практике, так как они имеют относительно низкую стоимость и простоту в использовании. В крупномасштабном производстве данные методы требуют повышенных объемов органических растворителей. Поэтому в последнее время развиваются нетрадиционные методы, которые имеют название «зеленые технологии», так как при их использовании снижается потребление органических растворителей, а также энергии.

К одной из «зеленых технологий» относится метод экстрагирования при помощи микроволнового излучения (MAE). Метод часто применяют для экстрагирования флавоноидов, фенольных кислот, антоцианов из растений [279, 437, 374]. Излучение взаимодействует с растворителем, в результате чего происходит теплоперенос [67]. Электромагнитная индукция инициирует разрыв водородных связей, что способствует лучшему проникновению растворителя в клетки растения и увеличивает диффузию фитохимических веществ [280]. На экстракцию влияет множество параметров, таких как мощность микроволн, продолжительность облучения, частота, температура, давление процесса и другие. Важным параметром является природа растворителя. Наибольшей диэлектрической проницаемостью обладают полярные соединения, что делает их подходящими растворителями в экстракции с помощью микроволнового излучения [45, 457].

Хорошо себя зарекомендовала техника получения натуральных продуктов с помощью ультразвука (UAE) [446]. Ультразвук представляет собой волну (частота 20 кГц – 100 МГц), которая распространяется в любой среде. Основной движущей силой данного способа экстрагирования является

«акустическая кавитация», которая представляет собой процесс образования и взрыва кавитационных пузырьков. Это приводит к сильному перемешиванию растворителя с частицами образца за счет возникновения микротурбулентности [128]. Вместе с тем схлопывание на границе твердое тело – жидкость может привести к повреждению матрицы.

Основными параметрами процесса являются: плотность акустической энергии, интенсивность и мощность ультразвука, а также режим работы. Экстрагирование с помощью ультразвука проводят либо в специальной ванне, либо в системе зондового типа. Ультразвуковые преобразователи могут быть установлены как по бокам и снизу ванны, так и в виде индивидуальной преобразовательной коробки. В другой системе зонд соединяют с преобразователем и погружают в растворитель. Этот вариант обладает меньшей потерей энергии. Многие современные устройства позволяют варьировать акустическую мощность [127]. Данным способом эффективно извлекают различные фитохимические вещества (транс-лютеин, гинзенозиды, сальвианоловая кислота, байкалеин и др.) [311, 63, 307, 445].

Экстракция с применением ферментов (ЕАЕ) представляет собой безопасный и эффективный способ для извлечения различных биоактивных веществ. Такие ферменты, как  $\alpha$ -амилаза, пектиназа, целлюлаза, вносят при экстракции для увеличения эффективности процесса, при котором происходит высвобождение связанных с полисахаридами или лигнином компонентов [163]. Разные параметры влияют на эффективность процесса. Такой параметр, как температура, может положительно и отрицательно сказаться на ферментативной реакции. Очень высокие температуры способствуют инактивации ферментов. Умеренная температура, наоборот, будет благоприятно сказываться на скорости реакции и массопереносе [233]. Значение оптимального рН подбирают индивидуально для каждого субстрата [70]. Кроме этого, проводят оптимизацию соотношения субстрат / фермент, так как высокие количества фермента увеличивают стоимость процесса. В

таблице 1.3.1 представлены примеры использования ферментов и ферментных препаратов для получения биоактивных веществ из растений.

Помимо температуры, pH, продолжительности экстракции, на процесс может влиять природа растворителя. Активность ферментов будет наблюдаться не во всех веществах. Различные ферменты активны в воде, но ингибируются в полярных растворителях (например, метанол или этанол). Поэтому для достижения максимальных показателей экстракции необходимо тщательно оптимизировать концентрацию полярного растворителя.

Таблица 1.3.1 – Ферменты и ферментные препараты, применяемые для получения биологически активных веществ

Фермент	Экстракты / БАВ	Растение	Оптимальные параметры (% , t, τ, pH)	Источник
Целлюлаза	Полисахарид	<i>M. sylvestris</i>	5,64 %, 55,65 °С, 3,4 ч, 5,22	[378]
Пектинекс ультра SP-L	Фруктаны	<i>D. wheeleri</i>	11,6–45,6 Ед/мл	[309]
Кемзайм	Полифенолы	<i>M. sativa</i>	2,9 %, 68 °С	[164]
Вискозим	Белковый концентрат	<i>P. granatum</i>	1,32 мл/100 мл, 44,85 °С, 1,82 ч	[293]
Целлюлаза	Галловая кислота	<i>C. fistula</i>	3,40 %, 55,11 °С, 75 мин, 6,1	[289]

Многообещающей технологией экстракции является извлечение веществ на основе сверхкритической CO<sub>2</sub> жидкости (SFE). Технологию признают безопасной и применяют как экологичный подход для получения фитохимических веществ из различного сырья [171]. Растворитель CO<sub>2</sub> недорог, нетоксичен, а также не имеет запаха. Его можно использовать повторно. При температуре 31,1 °С и давлении 73 атм CO<sub>2</sub> находится в состоянии газа и жидкости (сверхкритическая жидкость), вследствие чего имеет такие признаки, как более высокая диффузия и плотность (по сравнению с газом). В экстракционную систему входит насос, камера давления, а также сборная емкость. Растворитель пропускают через зону

нагрева для создания сверхкритических условий. После экстрагирования извлечения поступают в сепаратор и далее охлаждаются. Растворитель перерабатывают или сбрасывают в атмосферу. В процессе извлечения веществ подбирают умеренное давление и температуру, а также скорость потока [236, 121]. Для повышения экстрагируемости соединений в качестве «модификатора» в  $\text{CO}_2$  добавляют органический растворитель, увеличивающий скорость диффузии веществ.

Многие ценные вещества были извлечены из растительных продуктов. Из шелухи стручков какао [453] и листьев редьки [417] получили фенольные вещества, а из масла семян *D. kotschyi* – омега-3 [404]. Из сахарной свеклы и тростника получают аминокислоты [419]. Камфора, кетон, борнеол, монотерпены, сесквитерпены извлечены из тысячелистника [418]. Это некоторые примеры использования данной технологии, за последние 5 лет было зафиксировано более двух тысяч научных исследований с применением данной технологии в базе данных Scopus [416].

Большое внимание привлекает субкритическая водная экстракция (SWE). Субкритическое состояние воды достигается при поддержании критической температуры (от 100 до 374 °С). При этом жидкое состояние обеспечивается за счет давления, которое устанавливают на уровне 1–22,1 МПа. Получается, что при повышении температуры такие показатели растворителя, как вязкость, поверхностное натяжение и диэлектрическая проницаемость, будут понижаться. Повышенное давление усиливает проникновение воды в поры матрицы, куда она не попадает при обычном давлении [225]. Это способствует улучшению перехода соединений из твердого вещества в растворитель. Интересно, что воду можно привести в условия, при которых она будет вести себя подобно органическим растворителям, например, как метанол или этанол.

Температура является одним из факторов экстрагирования. При ее повышении меняется свойство субкритической воды с полярного на неполярное. Давление, как правило, контролируют в пределах от 10 до 80

бар. Ключевым фактором SWE является размер частиц, от которого зависит выход активных соединений. Предпочтение отдается более мелким частицам, так как при их использовании увеличивается площадь контакта между растворителем и сырьем, что сокращает продолжительность экстрагирования и повышает эффективность процесса. Такие параметры, как содержание влаги в образце, продолжительность экстрагирования, добавление модификаторов, также влияют на процесс извлечения субкритической водой [363].

Оборудование для экстракции делится на два типа [363]:

1. Динамическая система. В основные устройства данной системы входят: насос, сосуд для экстрагирования, регулятор давления и коллектор. Теплообменник применяется для нагрева воды. Для того чтобы предотвратить кипение воды, используют регулятор давления.

2. Статическая система. Для ускорения массопереноса используют магнитную мешалку. Данная система не требует насоса. Нагрев осуществляют нагревательной рубашкой или лентой.

Преимуществом метода является использование экологически чистого, негорючего растворителя. Также имеется возможность извлекать полярные и неполярные соединения. Несмотря на это, экстрагирование термочувствительных соединений ограничено, так как может происходить гидролиз или окисление веществ.

С использованием SWE получают большой спектр фитохимических соединений (полисахариды, пектины, полифенолы, эфирные масла). J. Zhang и другие с помощью субкритической воды получили полисахарид из *S. sagittifolia* в статическом режиме. Процесс осуществляли 16 минут при температуре 170 °C и давлении 1 МПа. Выход фракции полисахаридов составил 24,6 % [413]. Из шелухи какао-бобов в докритических условиях выделили пектин с выходом 10,9 %. Образец содержал в 2 раза меньше примесей по сравнению с пектином, полученным с помощью лимонной кислоты [412]. В динамическом режиме из отходов луковой шелухи при температуре 170–230 °C, давлении 30 бар и



продолжительности экстрагирования 30 минут получили экстракт, содержащий фенольные вещества [415].

Известна жидкостная экстракция под давлением от 4 до 20 МПа (PLE). Растворитель поддерживается в жидкой фазе (ниже критической точки). Повышение температуры способствует снижению натяжения и вязкости растворителя [355]. Экстракция включает три этапа. Первый этап называется статическим, так как в определенном сосуде происходит процесс экстрагирования при подобранных температуре и давлении. Далее осуществляют стадию промывки, пропуская растворитель через сосуд. На последнем этапе полное вытеснение растворителя обеспечивают продувкой инертным газом сосуда. Данная система поддерживает диапазон температур от 20 до 200 °С и давления от 35 до 200 бар. Различные растворители можно использовать в данной технологии, кроме высококоррозионных и с низкой температурой самовоспламенения (например, диоксан) [464].

Различные исследования демонстрируют эффективность выделения нелетучих биоактивных веществ из растений по технологии PLE. Так, подобраны условия для получения антоцианов из виноградной выжимки. Наилучшим растворителем для получения мальвидина-3-О-глюкозида оказался этанол-вода при рН 2, температуре 100 °С и давлении 100 бар [342]. Полученные экстракты из артишока шаровидного содержали кофеилхиновые кислоты (14–37 мг/г) [341]. Кроме того, данную технологию оптимизировали для дальнейшего количественного анализа трех куркуминоидов по методу ВЭЖХ. В качестве растворителя использовали этанол при температуре 100 °С. Время статического этапа составило 5 минут, давление 1500 фунтов [400]. Флавонолы и алкалоиды выделяли из скорлупы какао-бобов [343].

Новой нетепловой технологией извлечения биологически активных веществ из растений является применение импульса электрического поля (PEF). Принцип метода основывается на воздействии импульсами высокого напряжения в определенные короткие периоды времени. В процессе

экстрагирования происходит электропорация, при которой наблюдается увеличение проницаемости клеточных мембран растения за счет электрического поля. Электрическое поле способствует появлению пор и усилению диффузии внутриклеточных соединений [51].

Для осуществления процесса экстрагирования сырье помещают между электродами. Через электроды периодически пропускают импульсы постоянного тока. Электропорация происходит при достаточно высоком электрическом поле. Установка для экстрагирования имеет источник импульсного питания. С помощью него можно преобразовывать переменный ток в импульсы с пиковым напряжением и энергией. Процесс осуществляют в специальной камере для обработки. Напряженность электрического поля, частота импульсов, форма волн, а также продолжительность воздействия являются параметрами экстрагирования в данной технологии. Основное преимущество технологии PEF заключается в том, что не нужно нагревать сырье, что позволяет получать термолабильные соединения. Недостатком является ограничение в экстракции липофильных веществ, а также использование дорогостоящего оборудования [51].

Оптимизацию параметров экстрагирования фенольных веществ из коры провели В. Pashazadeh, А.Н. Elhamirad и их коллеги. В литровую камеру помещали электроды в виде параллельных дисков. В качестве растворителя использовали этанол. Напряжение подавали от 2 до 6 кВ. В результате исследования было показано, что при напряжении 5,12 кВ/см и количестве импульсов 40 происходит максимальный выход фенольных веществ с антиоксидантной активностью 91,7 % [310].

Биоактивное соединение нарингин было выделено из растительного сырья с помощью обработки импульсным электрическим полем. Различные показатели напряженности влияли на выход вещества. Выход экстракции увеличивался при возрастании напряженности до 4 кВ/см и импульсах 30 и снижался при более высоких значениях. Максимальный выход нарингина из растения составил 16,19 мг/мл, что было выше на 20 % по сравнению с

необработанным сырьем. Антиоксидантная активность увеличивалась в соответствии с выходом соединения. Более высокую антиоксидантную активность авторы связывают с конформационными превращениями нарингина. Потенциал PEF был показан также для экстрагирования других комплексов веществ таких, как полисахариды и пигменты [153].

Инновационным способом экстрагирования является механохимическая экстракция (МСАЕ). Механохимия представляет собой раздел химии, который изучает химические и физические превращения. Они вызываются механической силой. Процесс механохимической экстракции заключается в нескольких этапах [272]:

1. Исходное сырье подвергают механической обработке. Сырье измельчают в дезинтеграторе до размера частиц 0,5–2 мм. Его хранят в сухом месте.

2. Заранее активируют материалы твердым реагентом, измельчают их при высокоинтенсивном механическом воздействии в течение нескольких минут. Измельчение осуществляют в шаровой мельнице.

3. Дальнейшие процедуры экстракции заключаются в растворении измельченного сырья в воде или другом растворителе.

При механоактивации происходит ударно-сдвиговое действие, что приводит к разрушению клеточных стенок растений и высвобождению различных вторичных метаболитов из клеток.

Такие показатели, как высокая эффективность, невысокий расход растворителей, невысокая температура, являются преимуществами метода. Недостатком является использование технологии в небольших масштабах. Данный вид экстрагирования осуществляется только в периодическом режиме [420].

Впервые метод механохимической экстракции был применен для получения тритерпеновых кислот. Выход данных веществ увеличивался с 2,9 до 4,7 %. После этого выделили следующие вещества: изофраксидин,

хондроитинсульфат, рутин, магнолол, трилактоны терпена, полисахариды и другие.

В недавних исследованиях был получен тритерпеноид из *A. camphorata*. Выход вещества составил 1,82 %. Процесс измельчения занял 20 минут. Образец смешивали с 10 мас. %  $\text{NaHCO}_3$  [273]. Гесперидин извлекли из *Pericarpium citri Reticulatae*. Несколько переменных варьировали для оптимизации процесса. В результате получили рациональные параметры. После измельчения сырья (20 минут) с  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (30,0 %) проводили экстрагирование 10 минут [308].

Метод мгновенной экстракции (FE) используется для извлечения первичных и вторичных метаболитов растений. Было показано, что способ прост и эффективен [180]. Отличительной особенностью метода является его промышленная приемлемость. Впервые по данной технологии были выделены дубильные вещества при использовании минимального количества сырья, а также в короткие сроки [358].

Принцип метода основывается на вращении внутреннего лезвия, которое приводится в движение высокоскоростным двигателем. В процессе возникает мощная сила сдвига между лезвиями (внутренним и внешним), что способствует разрушению и перемешиванию сырья. Из-за перепадов давления между внутренней и наружной полостью происходит массообмен между растворителем и образцом. Возникновение высокой интенсивной силы сдвига, сильного столкновения и сброс перепада давления обуславливают короткое время экстрагирования. Процесс извлечения веществ занимает от десятков секунд до нескольких минут [172].

Для мгновенной экстракции был разработан экстрактор, быстро измельчающий растительный материал. Существует четыре типа экстракторов, которые используются в лаборатории и промышленности. Промышленное устройство имеет систему управления, электродвигатель, режущую головку, вытяжной бак, охлаждающую рубашку, фильтр. Основной компонент – режущая головка, является разработанной двухлопастной

конструкцией, две лопасти которой соединены точным концентрическим валом [181]. Под действием отрицательного давления растительное сырье измельчается с помощью резака [313]. Режущая головка аппарата может разрушать как мягкий растительный материал, так и твердый. Диапазон ее вращения задают от 15000 до 30000 об/мин.

N. Guo и другие применили данный метод совместно с растворителями глубокой эвтектики для разработки и оптимизации экстрагирования антоцианов. Антоцианы извлекали из шелковицы (*Fructus mori*). Учеными были подобраны оптимальные параметры, которые включали: продолжительность гомогенизации 60 секунд, скорость измельчения 12000 об/мин, продолжительность экстрагирования 30 минут при давлении 0,08 МПа. Выход антоцианов, который оказался в 1,24 раза выше по сравнению с традиционными методами, составил 6,05 мг/г [295].

В другом исследовании экстрагировали стевиозид и ребаудиозид А из листьев стевии медовой (*Stevia rebaudiana*). Способ высокоскоростной гомогенизационной экстракции сравнили с другими методами. В итоге путем моделирования методом поверхности отклика были подобраны рациональные параметры процесса. В качестве экстрагента применили 59 %-ный раствор, при этом продолжительность экстрагирования составила 8 минут. Выход соединений составил 5,37 % для стевиозида, 8,68 % для ребаудиозида А. Авторы отмечают, что метод мгновенной экстракции имеет такие преимущества, как низкая температура процесса, низкое потребление энергии, а также высокая эффективность [174].

Исследователи X. Guoabcd, W. Zhao и их коллеги выделили пектин из кожуры помело. Оптимальная продолжительность экстрагирования составила 240 секунд. Среди других параметров были подобраны рН растворителя (1,24) и напряжение (156 В). Экспериментальный выход вещества составил 209 г/кг. Пектин, полученный методом высокоскоростной гомогенизационной экстракции, отличался от пектина, извлеченного традиционными способами. Он обладал высокой вязкостью и

средневязкостной молекулярной массой. При этом выход вещества был значительно выше, чем при термической экстракции (175 г/кг) [172].

Исследования показывают, что технология FE эффективна при извлечении флавоноидов. Выходы хризина, байкалеина, ороксина А, ороксина В составили 90,17 %, 84,14 %, 78,34 %, 98,18 %, соответственно, что было выше, чем при ультразвуковой экстракции [444]. Большой выход, чем при экстракции микроволновым излучением и ультразвуком, наблюдался при экстрагировании алкалоидов – эводиамина и рутакарпина (16,1 мг/г и 7,5 мг/г, соответственно) [358]. Из *R. uncaria* выделили алкалоиды в количестве 0,53 мг/г [458]. Кроме этих веществ, извлечены лигнаны, процианидины, антоцианы, дигидрокверцетин и антрахиноны [358].

Универсальным процессом для промышленного применения является экструзионная технология. Она представляет собой механическую обработку, которая адаптирована к растительному сырью. Технология имеет следующие возможности [51]: получение продуктов высокого качества; высокий уровень автоматизации непрерывной производственной линии; возможность очищать производственную линию.

Принцип извлечения биологически активных веществ основывается на том, что растительное сырье попадает в цилиндр и под давлением перемешивается при помощи шнеков. По двушнековой технологии получают соединения из растительной матрицы. В двушнековом экстракторе одновременно происходят следующие действия: транспортирование, нагревание, нарезание, перемешивание, экстрагирование жидкой фазой, разделение и высушивание.

При помощи метода повышают стоимость отходов агропромышленного производства. Получены полифенолы из древесных отходов. Из побочных продуктов конопли выделили гидроксикоричные кислоты. Технологию часто применяют для экстракции масел из семян. По экструзионной технологии получили фильтраты с повышенным содержанием

полифенолов (1 г/100 г) из маракуйи. Выход веществ составил 67,5 % от всех экстрагируемых полифенолов во фрукте [240].

С помощью модифицированного промышленного экспеллера экстрагировали антоцианы и флаван-3-олы из виноградного жмыха. В качестве экстрагента использовали нагретую воду. Поток воды подавался в экспеллерный барабан при помощи насоса. В нем находится винт, который совершает вращательное действие. Для извлечения максимального количества веществ подбирали оптимальные параметры. Таким образом, температура вала 50 °С была наилучшей. Скорость его вращения составила 20 Гц. Рациональная скорость потока была выбрана 65 мл/мин [51].

Во время экстракции биологически активных веществ извлекается большое количество примесей, таких как сахара, белки, органические кислоты и другие. Эти примеси влияют на физиологические свойства конечного продукта. Кроме того, от их содержания зависит качество и стабильность готового продукта. Следовательно, для получения высококачественных вторичных метаболитов из растений необходимо применять разделение и очистку сырого экстракта [170].

Одним из методов очистки биологически активных веществ является колоночная хроматография [328]. Принцип основывается на разных коэффициентах распределения активных веществ в двух фазах: твердой и подвижной. В качестве неподвижной фазы используются макропористые и полиамидные смолы, сефадекс-100. Макропористая смола имеет такие преимущества, как высокая адсорбционная способность и скорость адсорбции, а также низкая стоимость ее производства [459].

Метод колоночной хроматографии широко используется при очистке различных фитохимических соединений растений, в частности антоцианов. Было показано, что смола XDA-7HP обладает удовлетворительными характеристиками для их получения. Элюирование 40 %-ным раствором этанола дало чистоту антоцианов в 8,5 раз выше по сравнению с сырым экстрактом [60]. С помощью Sephadex LH-20 получали антоцианы в виде

порошка со степенью очистки 90,96 % [245]. Недостатком метода колоночной хроматографии является сильное разбавление материала при промывке, что требует еще одной стадии концентрирования. Из-за малого выхода веществ трудно организовать крупномасштабное производство в промышленности [327].

Экономичным методом разделения, не требующим сложной аппаратуры, является тонкослойная хроматография (ТСХ). Метод имеет ограничение в масштабах обработки образцов. Используется при разделении веществ в малых количествах. Экстракт помещают на пластину, включающую кремнезем. Подвижная фаза обычно состоит из смеси растворителей бензол:ацетон (3:1) или вода:ацетонитрил. Разделение соединений экстракта происходит в соответствии с их полярностью. Таким способом выделяли полиметоксифлавоны из цитрусовых [284].

Интерес представляет технология разделения биоактивных веществ с помощью ионной жидкости. Ионные жидкости являются расплавленными солями, включающими несимметричные органические катионы и органические или неорганические анионы [64, 450]. Они имеют незначительную воспламеняемость, нелетучесть и высокую сольватирующую способность для разных соединений и материалов [213]. Алкалоиды (глауцин, кофеин, пиперин), терпеноиды, флавоноиды (катехин, рутин), сапонины, фенолы (ресвератрол), лигнаны (схизандрин) и другие вещества были получены с применением различных ионных жидкостей [242]. Недавно с использованием ионной жидкости, состоящей из 1-пропил-3-метилимидазолия хлорида ( $[\text{C}_3\text{mim}]\text{Cl}$ ) с привитым диоксидом кремния ( $[\text{C}_3\text{mim}]^+\text{Cl}^-@ \text{SiO}_2$ ) был выделен и очищен байкалин из экстракта *S. baicalensis*. Чистота вещества составила 96,5 % [177]. При совместном использовании методов колоночной хроматографии и синтезированной протонной жидкости была получена розмариновая кислота с высокой чистотой 90,4 % из семян *P. frutescens* [173].



Разделение и очистку веществ можно осуществлять с помощью технологии мембранного разделения. Метод основывается на различной молекулярной массе выделяемых веществ [268]. Для этого используется полупроницаемая мембрана, которую применяют в зависимости от размеров пор в микрофльтрации (размер пор 0,1–10 мкм), ультрафльтрации (размер пор 1–100 нм), нанофльтрации (размер пор менее 2 нм), а также в обратном осмосе. Для изготовления мембран используются полиамиды, сульфированные полиэфирсульфоны, полисульфоны [276]. Перепады давления, температуры или разность концентрации являются движущими силами процесса [176]. Данный физический процесс имеет такие преимущества, как низкое электропотребление и затраты на обслуживание, мягкое действие, отсутствие фазового перехода, устойчивость к щелочам и кислотам [129, 278, 305].

Примером использования метода является получение антоцианов с чистотой 95,93 % с помощью мембраны с молекулярной массой 3 кДа, при этом происходит удаление белков и полисахаридов. После сорбции антоцианов смолой используют мембрану с массой 200 Да [460]. U.T. Syed, С. Brazinha и другие предложили получение экстракта, обогащенного мономерными флаван-3-олами, которые были очищены от олигомерных флаван-3-олов методом диананофльтрации с мембраной Duramem 900 [452]. Высокий выход полифенолов (80 %), очищенных от углеводов, был достигнут при выделении веществ из ягод годжи (*L. barbarum*) с использованием мембраны 2,5 кДа [130].

Метод высокоскоростной противоточной хроматографии был разработан в 1980-х годах для увеличения эффективности разделения [247]. Растворенное вещество распределяется между двумя несмешивающимися растворителями. Растворители находятся в спиральной трубе, которая совершает вращающееся движение и испытывают сложное гидродинамическое движение. Соединения разделяются на основе коэффициента распределения. При разделении таких биологически активных

веществ, как фенольные вещества, первоначально колонку заполняют неподвижной фазой, после чего при быстром вращении добавляют подвижную [226]. Преимущества метода заключаются в более высоком выходе соединений, уменьшенном потреблении растворителя. При данной технологии не происходит необратимой адсорбции аналита [428, 62].

С использованием метода высокоскоростной противоточной хроматографии разделяют и очищают фенолкислоты. Так, из плодов *Sorbus pohuashanensis Hedl* были выделены хлорогеновая, неохлорогеновая и 3,5-О-дикафеоилхиновая кислоты. В результате выделения были подобраны оптимальные параметры, при которых растворителями являлись: этилацетат–*n*-бутанол–вода (3,5:1,5:5) и *n*-гексан–этилацетат–метанол–вода (1:3:1:3,5). Чистота была выше 95 % [339]. Применение усовершенствованного метода противоточной хроматографии с рН-зоной очистки позволило получить розмариновую (55,6 мг), кофейную (69,0 мг), сальвианоловую (259,9 мг) и литосперминовую кислоты (28,75 мг). В качестве растворителей использовали: петролейный эфир–этилацетат–ацетонитрил–вода (1:5:2,5:1:5) и метил-трет-бутиловый эфир–вода (1:1) [340].

Среди других фенольных веществ успешно разделены флавонолы листьев яблока (производные кверцетина и кемпферола, рутин) [182], флавонол (кверцетин) из *G. pentaphyllum* [314]. Антоцианы (пеларгонидин-3-глюкозид, пеларгонидин-3-рутинозид и цианидин-3-глюкозид) с чистотой более 95 % получены из экстракта клубники [246].

Другим хроматографическим методом разделения биологически активных веществ является высокоэффективная препаративная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), принцип которой основывается на разных физико-химических характеристиках соединений, входящих в состав экстрактов. Распределение компонентов происходит между двумя несмешивающимися фазами. Элюирование веществ происходит в разное время, что способствует их разделению. Одной из особенностей метода является использование высоких концентраций веществ или их объемов. Также можно варьировать

скорость потока и получать очищенные вещества в больших количествах [350]. В настоящее время используются автоматизированные ВЭЖХ.

Важным элементом препаративной ВЭЖХ является колонка. Ее заполняют различными компонентами, такими как кремнезем или химически модифицированный силикагель. Эти вещества являются стационарной фазой, которая способна селективно поглощать различные химические соединения из-за их особенностей в структуре и полярности.

Для того чтобы можно было элюировать все соединения с колонки, необходимо подбирать рациональный состав подвижной фазы (элюента). В качестве элюента используют смесь, состоящую из двух смешивающихся между собой растворителей. Состав подвижной фазы определяет хроматографическое удерживание и селективность. При использовании более полярной неподвижной фазы (нормально-фазное разделение) элюирующее свойство растворителя будет увеличиваться с возрастанием его полярности. В то же время применение менее полярной неподвижной фазы (по сравнению с подвижной) и увеличение полярности элюента ведет к снижению элюирующей способности растворителя. Кроме того, процесс вымывания биологически активных веществ может осуществляться при постоянстве состава элюирующей смеси (изократические условия), а также при изменении ее градиента. Самый распространенный элюент при обращенно-фазовом разделении представляет собой раствор, состоящий из воды и ацетонитрила или водного буфера с метанолом [61].

Обнаружение и измерение свойств (УФ-поглощение, флуоресценция и др.) соединений, выходящих из колонки, осуществляют с помощью детекторов. Они должны иметь следующие характеристики [61]: иметь высокую чувствительность, быстро воспроизводить реакции на исследуемые вещества, иметь стабильность в работе.

В хроматографической практике применяют следующие типы детекторов: спектрофотометрические, электрохимические, матричные фотодиодные, детекторы флуоресценции и др.

Метод препаративной ВЭЖХ активно используют для извлечения биологически активных веществ из растений. С использованием данного метода недавно был выделен куркумин с чистотой 92 %. В качестве подвижной фазы использовали раствор из воды и ацетонитрила, который пропускали через колонку со скоростью 20 мл/мин [131].

Большое внимание привлекает метод препаративной сверхкритической флюидной хроматографии, который показывает свою эффективность, а также обеспечивает защиту окружающей среды. Принцип метода заключается в использовании колонок с адсорбентами, которые подобны колонкам, используемым в ВЭЖХ. Отличительным признаком способа является использование в качестве подвижной фазы сверхкритического флюида [156]. Самым распространенным элюентом является газ  $\text{CO}_2$ . Его можно легко подвергнуть давлению и нагреть до критических значений. Помимо этого, данный элюент имеет такие преимущества, как нетоксичность, доступность, относительная дешевизна, инертность [65]. Примером использования метода является получение трех куркуминоидов из метанольного экстракта куркумы. Скорость потока составляла 80 мл/мин. Данный способ показал выход куркумина 20,8 мг с чистотой 97,9 % [253].

Таким образом, рассмотрены традиционные и инновационные методы экстрагирования биологически активных веществ из растительного сырья, а также результаты их применения. Данные методы обладают различными преимуществами и недостатками. Недостатки способов извлечения можно исключить при комбинировании различных технологий между собой. Кроме того, для повышения чистоты отдельных соединений из лекарственного сырья используют методы препаративной очистки, позволяющие повысить качество и стабильность готового продукта.

#### **1.4 Маркетинговое исследование рынка растительных экстрактов и БАВ на основе вторичных метаболитов растений**

*Мировой рынок растительных экстрактов и ФПП на их основе.* С ростом обеспокоенности о здоровье, увеличением распространенности хронических заболеваний и потребности населения в улучшении питания растительные экстракты находят все большее применение. Различные виды растительных экстрактов используются в качестве ингредиентов в продуктах питания, а также пищевых добавках благодаря их пользе для здоровья и питательным свойствам, которые восполняют дефицит питательных веществ и повышают иммунитет и общее самочувствие потребителей [10, 13, 16, 24, 132, 306]. Прогнозируется, что рост рынка растительных экстрактов останется высоким в течение периода 2021–2026 гг. из-за его растущего применения в различных отраслях [334].

Рынок растительных экстрактов принято классифицировать по типу продукции (фитопрепараты и растительные экстракты, эфирные масла, специи, ароматизаторы), сфере применения (фармацевтические препараты и БАД, еда и напитки, косметические средства) и источникам (фрукты, цветы и луковицы; листья; кора и стебли; корневища и корни) [333].

В условиях кризиса COVID-19 мировой рынок растительных экстрактов, оцениваемый в 26,9 млрд долл. США в 2020 г., по прогнозам, достигнет пересмотренного размера в 73,2 млрд долл. США к 2027 г., увеличившись в среднем в 2,7 раза за анализируемый период 2020–2027 гг. [210].

Рынок растительных экстрактов в США оценивался в 7,2 млрд долл. в 2020 г. По прогнозам, Китай достигнет размера рынка растительных экстрактов в 16,9 млрд долл. США к 2027 г., а среднегодовой темп роста составит 20 % за анализируемый период с 2020 по 2027 гг. Среди других заслуживающих внимания географических рынков – Япония и Канада, каждый из которых, по прогнозам, вырастет на 10,9 % и 13,5 %, соответственно, в период 2020–2027 гг.

Прогнозируется, что рост рынка в Германии составит примерно 12,1 %. Китай останется одним из самых быстрорастущих в этом кластере региональных рынков. Предполагается, что к 2027 году рынок Азиатско-Тихоокеанского региона, возглавляемый такими странами, как Австралия, Индия и Южная Корея, достигнет 11,2 млрд долл. США, в то время как в Латинской Америке среднегодовой темп роста в течение анализируемого периода составит 14,9 %.

В зависимости от типа продукта глобальными сегментами рынка растительных экстрактов являются специи, в 2020 году на их долю приходилось 27,4 %, эфирные масла – 36,2 % и фитопрепараты 18,7 %. Ожидается, что до 2027 г среднегодовой темп роста доли фитопрепаратов на мировом рынке растительных экстрактов будет самым быстрым из-за растущего спроса на растительные компоненты. По областям применения на мировом рынке растительных экстрактов сегмент фармацевтических препаратов имеет наибольшую долю рынка, составляющую 62,5 %, косметические средства – 18,7 %, а на долю еды и напитков приходится около 3 %. Согласно прогнозу, ситуация на мировом рынке растительных экстрактов по долевым значениям практически не изменится и будет оставаться на одном уровне в ближайшие 7 лет [223].

В 2020 году наибольшая доля растительных экстрактов приходилась на рынок Азиатско-Тихоокеанского региона. Это доминирование объясняется такими факторами, как резкое увеличение потребления веганских продуктов питания и напитков, рост спроса на функциональные продукты питания и повышение осведомленности населения о пользе пищевых продуктов растительного происхождения. Кроме того, в регионе есть несколько малых и средних производителей растительных экстрактов. Производители в Индонезии, Индии и Таиланде постоянно инвестируют в рынок и сосредотачиваются на инновациях для расширения ассортимента своей продукции. Это связано с ростом торговли растительными экстрактами между Азией и международными производителями продуктов на основе растительных экстрактов [334].

Среди ведущих компаний, работающих на мировом рынке растительных экстрактов, можно выделить: Givaudan (Швейцария), Sensient Technologies Corporation (США), International Flavors & Fragrances, Inc (США), Kangcare Bioindustry Co., Ltd. (Китай), Synthite Industries Private Ltd. (Индия) и PT. Indesso Aroma (Индонезия) [26].

Что касается рынка функциональных продуктов питания, то в развитых странах формирование здорового образа жизни, в том числе за счет сбалансированного рациона питания, возведено в ранг государственной политики. В Японии, Англии, США, Германии, Франции и ряде других стран реализуются целевые национальные программы по оздоровлению населения путем разработки и организации производства пищевых компонентов, корректирующих биохимический состав продуктов питания массового потребления. В результате по экспертным оценкам 40–60 % североамериканцев и японцев, а также около 32 % жителей Западной Европы вместо традиционных лекарственных препаратов для укрепления и восстановления здоровья используют биологически активные добавки к пище и функциональные пищевые продукты. На рисунке 1.4.1 видно, что США лидирует по позиции на глобальном рынке функциональных продуктов питания (60,5 %), это означает, что реализация программ на данной территории ведется активно, как и поддержка производителей в отрасли специализированных продуктов [8].

*Российский рынок растительных экстрактов и ФПП на их основе.* Структуру российского рынка экстрактов можно условно разделить на 5 категорий (рисунок 1.4.2) [32]: масляные экстракты; докритические и сверхкритические CO<sub>2</sub>-экстракты; сухие экстракты; водно-пропиленгликолевые экстракты; эмульсии и экстракт-концентраты.

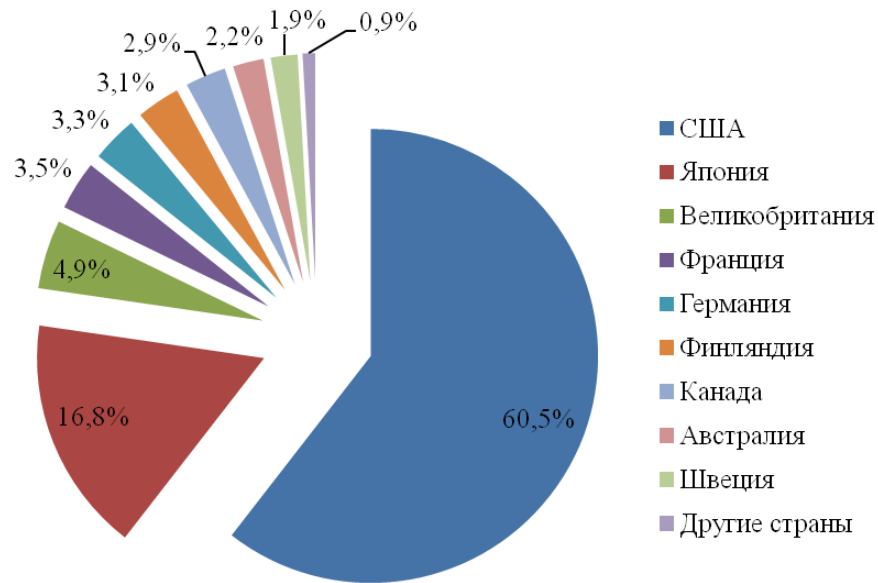


Рисунок 1.4.1 – Глобальный рынок функциональных продуктов питания в 2020 г., %



Рисунок 1.4.2 – Структура российского рынка растительных экстрактов

Структура потребления растительных экстрактов по федеральным округам (ФО) определяется, главным образом, размещением производств, использующих растительные экстракты в качестве сырья для выпуска готовой продукции. На Приволжский и Центральный ФО в 2019 году



пришлось более половины (58 %) от совокупного объема потребления растительных экстрактов в РФ. На третьем месте – Северо-Западный ФО с долей в 17 %. Менее всего пришлось на Дальневосточный (4 %) и Северо-Кавказский (1 %) ФО (рисунок 1.4.3) [229].

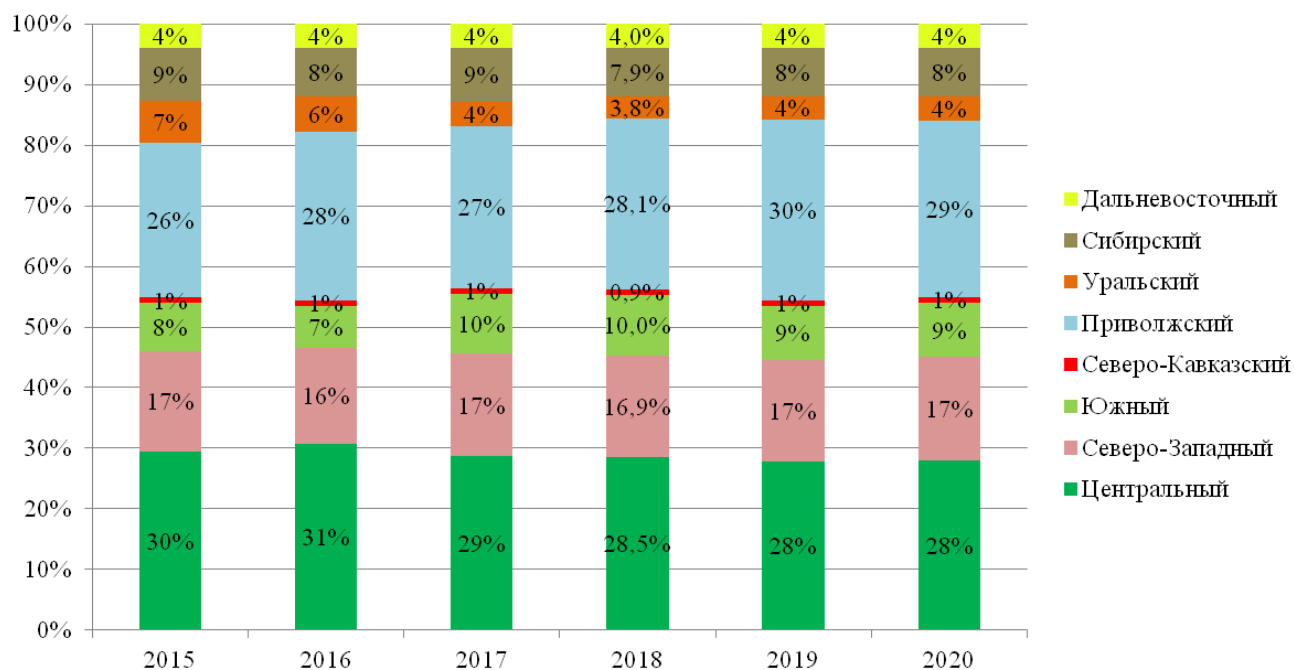


Рисунок 1.4.3 – Структура потребления растительных экстрактов по ФО в 2015–2020 гг., в натуральном выражении

Основные игроки российского рынка растительных экстрактов приведены в таблице 1.4.1.

Российский рынок растительных экстрактов развивается в зависимости от спроса со стороны ключевых потребляющих отраслей: производителей БАД и лекарственных средств, производителей пищевых продуктов, табачных изделий, косметики. Объем предложения на российском рынке растительных экстрактов в 2020 г. составил 1576,4 т, что всего на 0,3 % ниже уровня 2019 г. (рисунок 1.4.4) [229].

Таблица 1.4.1 – Основные игроки российского рынка растительных экстрактов

Производитель	Продукция
ООО «АНБ» (г. Москва)	Асаи – порошок, экстракт Семена подорожника – порошок Гуарана – порошок Хлорелла – порошок Спирулина – порошок Барлейграсс – порошок Витграсс – порошок
ООО «Грумант» (г. Великий Новгород)	Череда – экстракт Экстракт ромашки Экстракт ягод облепихи Экстракт цветов липы Экстракт подорожника Экстракт калины Паприка экстракт (сухая и жидкая форма) Экстракт хлопка Экстракт бессмертника Экстракт можжевельника Экстракт шалфея Экстракт шиповника (корень) Экстракт окопника (корень)
ООО «Виларагро» (Краснодарский край, ст-ца Тбилисская)	Экстракт натуральный тархун Экстракт можжевельника Гидролат мяты Гидролат корня одуванчика
ООО «Экстракты Алтая» (г. Барнаул)	Экстракт сухой корня лопуха Экстракт сухой травы клевера Экстракт сухой листа кипрея Экстракт сухой корня дягиля Экстракт сухой горца птичьего Экстракт сухой травы манжетки Экстракт сухой листа малины Экстракт сухой листа крапивы Экстракт сухой листа толокнянки Экстракт сухой травы зверобоя Экстракт сухой травы Melissa Экстракт сухой травы лабазника Экстракт сухой корня левзеи

Продолжение таблицы 1.4.1

Производитель	Продукция
ООО «Вистерра» (Алтайский край, с. Алтайское)	Сухой экстракт – Боярышник (цветки)
	Сухой экстракт – Гриб рейши (Трутовик лакированный)
	Сухой экстракт – Девясил (корень)
	Сухой экстракт – Манжетка (трава)
	Сухой экстракт – Морковь (корнеплод)
	Сухой экстракт – Мумиё
	Сухой экстракт – Мята перечная (лист)
	Сухой экстракт – Мелисса (лист)
	Сухой экстракт – Алтай (корень)
	Сухой экстракт – Альфредия (трава)
	Сухой экстракт – Бадан (лист)
	Сухой экстракт – Бессмертник (цветки)
	Сухой экстракт – Боровая матка (трава)
	Сухой экстракт – Валериана (корень)
	Сухой экстракт – Герань (трава)
	Сухой экстракт – Дуб (кора)
	Сухой экстракт – Женьшень (корень, лист)
	Сухой экстракт – Золототысячник (трава)
	Сухой экстракт – Имбирь (корень)
	Сухой экстракт – Каштан (плоды)
Сухой экстракт – Шлемник байкальский (корень)	
Сухой экстракт – Ромашка (цветки)	
Сухой экстракт – Хвощ (трава)	

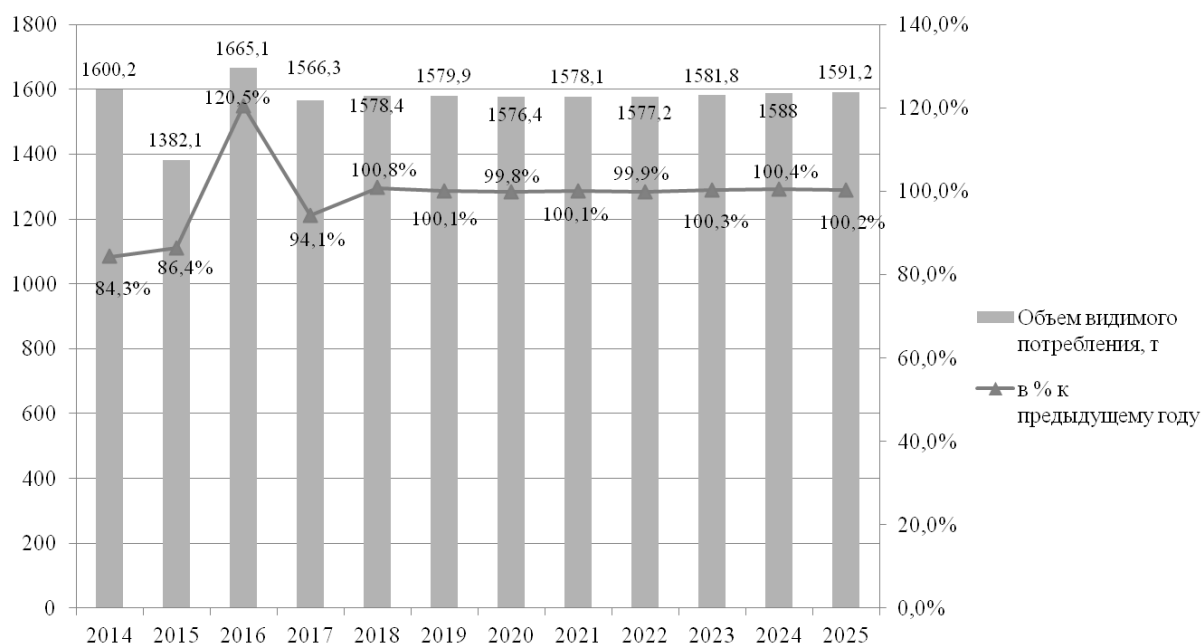


Рисунок 1.4.4 – Объем предложения на рынке растительных экстрактов в 2014–2020 гг. и прогноз до 2025 г., т (в рамках базового сценария развития)

Последствия пандемии COVID-19 обеспечили в 2020 году положительную динамику развития рынка растительных экстрактов, поддерживаемую возросшим спросом со стороны производителей лекарственных средств и БАД, а также косметических и парфюмерных производств (мыла и других товаров личной гигиены); дополнительный вклад в увеличение потребления внес временно возросший спрос на пивоваренную продукцию в период карантина.

Объем российского производства растительных экстрактов с 2016 г. имеет положительную динамику. По итогам 2020 г. значение данного показателя выросло к уровню предыдущего года и составило 470 т (против 463 т). Ситуация представлена на рисунке 1.4.5 [229].

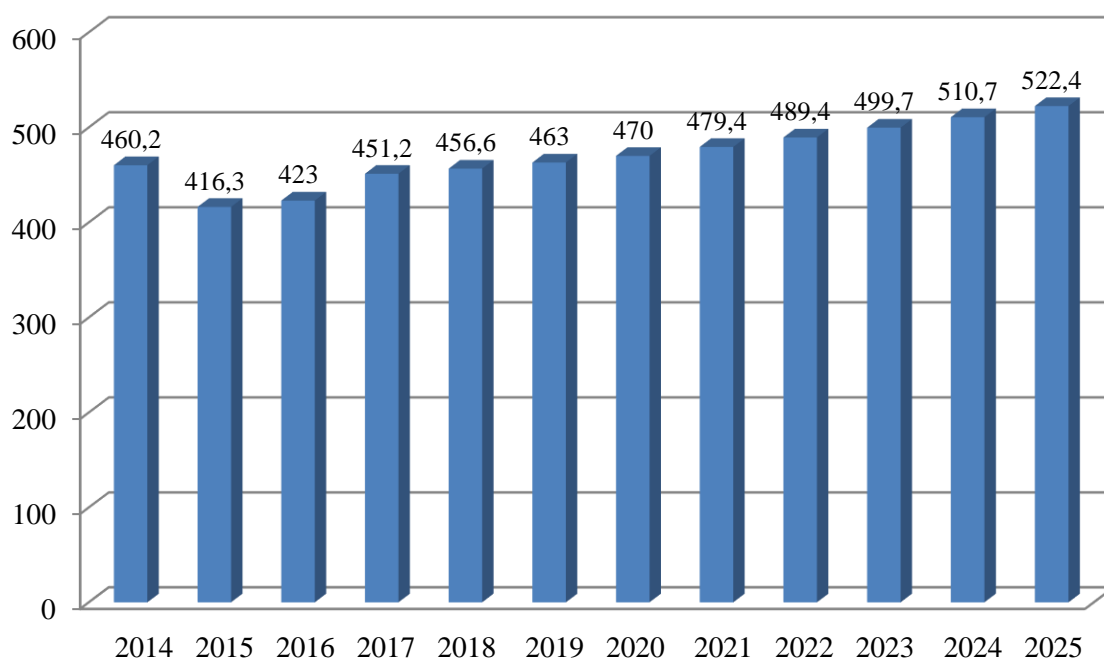


Рисунок 1.4.5 – Динамика объемов производства на рынке растительных экстрактов в 2014–2020 гг. и прогноз до 2025 г., т  
(в рамках базового сценария развития)

На рынке растительных экстрактов преобладает продукция импортного производства: в 2019 году на нее пришлось около 82 %. На экспорт было

поставлено 179,4 т, что составляет 38,4 % от объема произведенной продукции. В среднесрочной перспективе позиции импорта сохранятся на уровне порядка 82 % [229] (рисунки 1.4.6, 1.4.7).

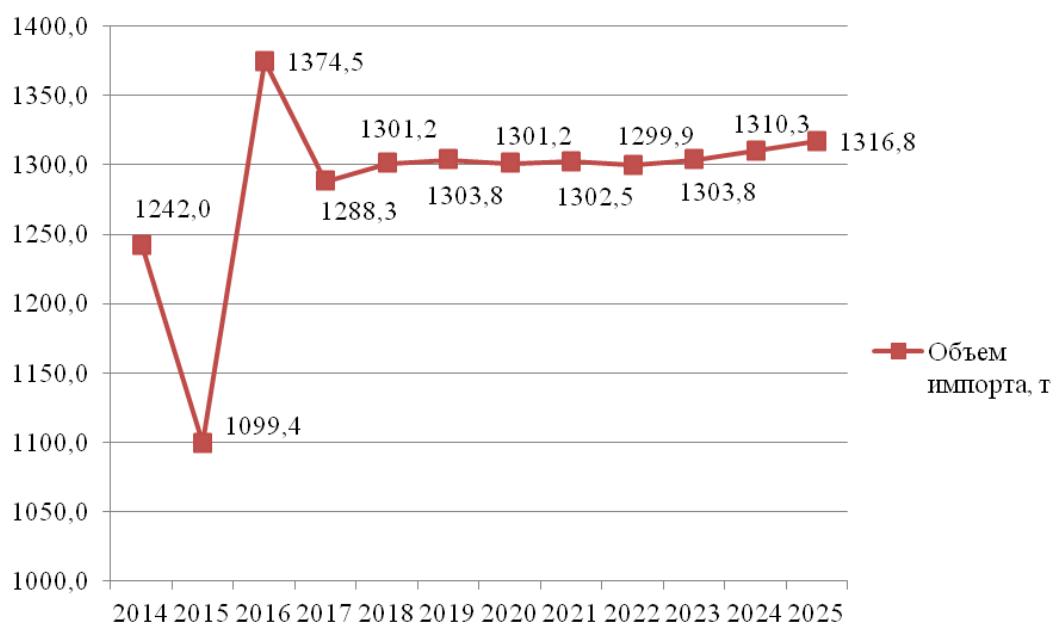


Рисунок 1.4.6 – Динамика импорта растительных экстрактов в 2014–2020 гг. и прогноз до 2025 г., т (в рамках базового сценария развития)

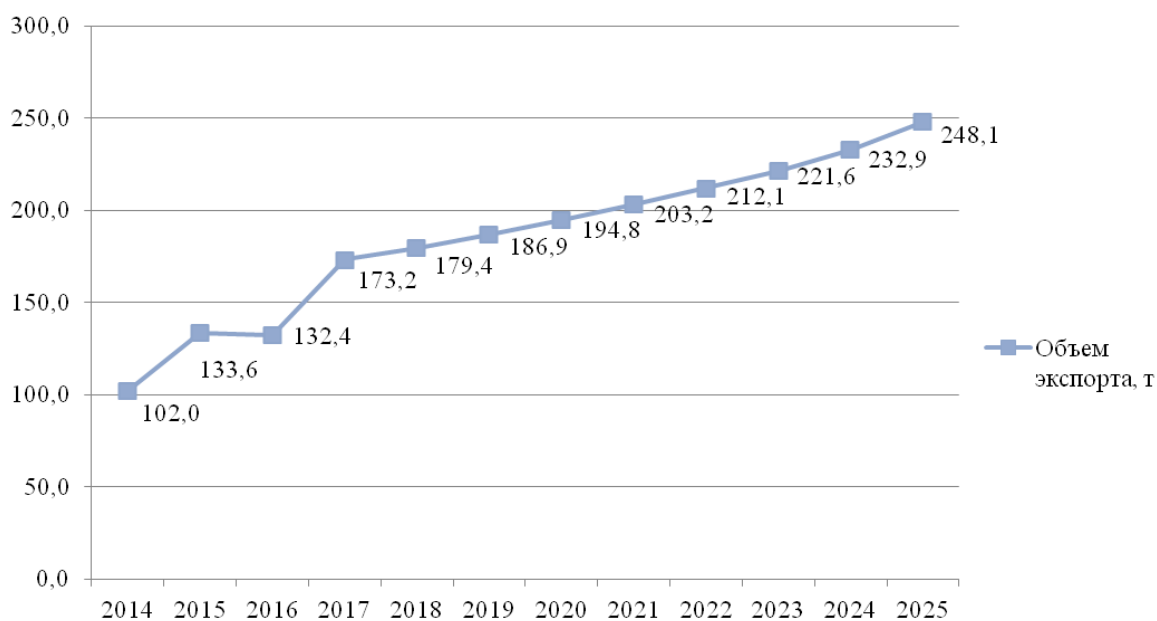


Рисунок 1.4.7 – Динамика экспорта растительных экстрактов в 2014–2020 гг. и прогноз до 2025 г., т (в рамках базового сценария развития)

Ключевыми игроками, заинтересованными в растительных экстрактах, являются производители функциональных продуктов и напитков, фармацевтических и лекарственных препаратов, косметических средств.

С ростом популярности продуктов функционального питания на основе растительных экстрактов наблюдается положительная динамика объемов производства. Только за последние 5 лет объемы производства увеличились почти в 2 раза [34]. Прогнозируется, что к 2024 году объём российского рынка функциональных продуктов превысит 350 млрд руб. (рисунок 1.4.8).

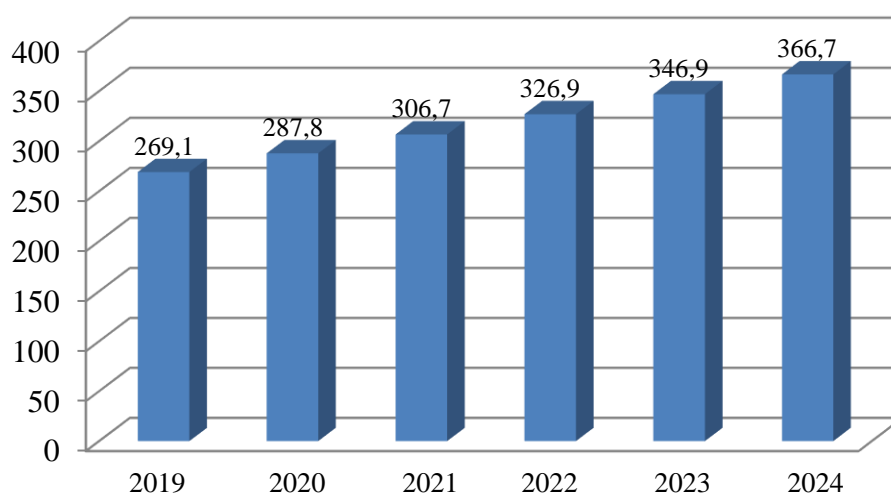


Рисунок 1.4.8 – Прогноз объема производства функциональных продуктов питания в России на период 2019–2024 гг. в денежном выражении, млрд руб.

Развитие российского рынка функциональных продуктов постепенно происходит за счет компаний, которые пытаются его адаптировать. Растительные функциональные продукты пользуются наибольшей популярностью. Согласно аналитическим данным на 2020 г., доля функциональных продуктов растительного происхождения составляет 0,2 % (около 11 тыс. т). К 2029 г. ожидается, что эта цифра возрастет до 10,7 % (около 664 тыс. т).

Структура российского рынка функциональных продуктов и напитков изображена на рисунке 1.4.9.

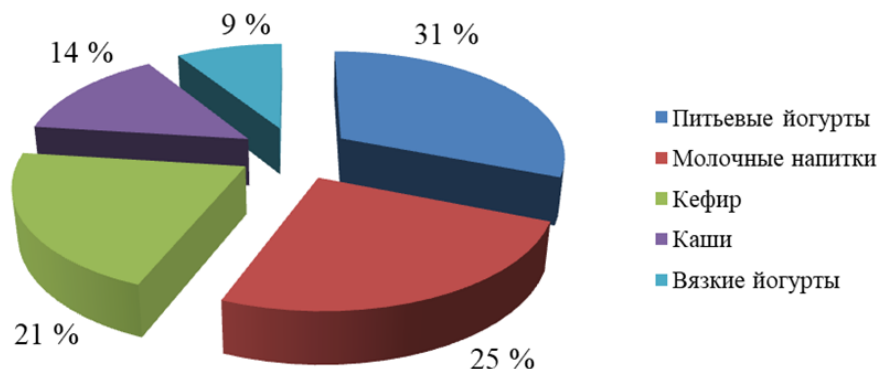


Рисунок 1.4.9 – Структура потребления функциональных пищевых продуктов в расчете на душу населения в 2020 г.

Согласно прогнозам экспертов, в России будет наблюдаться тенденция роста доли каш и хлопьев в общем объеме потребления функциональной пищевой продукции, а также незначительное снижение доли молочной продукции, что может быть связано с уменьшением роста потребления молочных функциональных продуктов в связи с относительной насыщенностью данного сегмента рынка.

## 1.5 Обоснование основных направлений исследований, их цель и задачи

Использование клеточных культур растений для получения ценных веществ вторичного синтеза является перспективным направлением. Продуктивность культивируемых клеток *in vitro* может значительно превышать продуктивность целых растений. Это рациональный способ получения биоконпонентов растительного происхождения без атропогенного прессинга на флору и независимый от климатических условий и сезонности. Уникальные свойства вторичных метаболитов и инновационные технологии

производства помогают расширять область применения фитопрепаратов делая их доступными для широких слоев населения и обогащая традиционные продукты питания.

На основании вышеизложенного анализа литературных данных сформулирована цель диссертационной работы – развитие научных аспектов и практических решений получения клеточных культур растений биотехнологическими методами *in vitro*, извлечению из них комплекса вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности, а также создание технологий получения экстрактов и функциональных напитков на их основе.

Для выполнения поставленной цели сформулированы задачи исследования:

- проанализировать химический состав, показатели качества и безопасности, а также биологическую активность нативного растительного сырья: левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной;

- подобрать рациональные составы питательных сред и параметры культивирования клеточных культур (каллусных и корневых) *in vitro*;

- оценить эффективность различных методов экстракции (мацерация, перколяция и микроволновая экстракция) природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений и подобрать рациональные параметры процессов;

- проанализировать компонентный состав (содержание флавоноидов, тритерпеноидов, кумаринов, фенилпропаноидов, антоцианов), физико-химические свойства, биологическую активность и показатели токсичности экстрактов природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами;



– подобрать рациональные параметры очистки (ультрафильтрационный, хроматографический методы), концентрирования и сушки растительных экстрактов, полученных разными методами;

– разработать технологические схемы производства жидких и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*;

– разработать рецептуры и процессуальные схемы производства напитков функциональной направленности на основе растительных экстрактов, оценить показатели качества, безопасности и функциональные характеристики, разработать техническую документацию;

– провести опытно-промышленную апробацию и широкомасштабные внедрения технологий в производство, оценить экономическую эффективность внедрения предлагаемых технологий.

## ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава содержит описание организационной схемы исследования, объектов и методов исследования.

### 2.1 Организация выполнения работы

Теоретические и экспериментальные исследования выполнены в соответствии с поставленными задачами в лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков и на кафедре бионанотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» (КемГУ). Организационная схема исследования представлена на рисунке 2.1.1.

Отдельные этапы диссертационной работы выполнялись в рамках реализации государственных работ в сфере научной деятельности в рамках государственного задания по теме «Скрининг биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих геропротекторными свойствами, и разработка технологии получения нутрицевтиков, замедляющих старение» (проект FZSR-2020-0006) и «Полифенолы растений СФО: оценка молекулярной и пространственной структуры веществ, характеристика биофункциональных свойств и токсикологических показателей безопасности на модельных системах *in vivo*» (проект FZSR-2023-0002), и в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» по теме «Получение биологически активных лекарственных растений-эндемиков Сибири с использованием культур клеток и органов высших растений», соглашение №: 075-02-2018-223 от 26.11.2018 г.

Весь цикл исследований состоял из трех блоков: теоретического, экспериментального и практического. На первом этапе (*теоретический блок*) проводили анализ отечественных и зарубежных литературных данных по теме исследования, формулировали цель и задачи собственных исследований.

*Экспериментальный блок* исследований включал пять логически взаимосвязанных этапов. Первый этап экспериментального блока посвящен изучению химического состава (в том числе содержания БАВ), показателей качества и безопасности выбранного для исследования растительного сырья: надземных и подземных частей левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной. Также на данном этапе оценивали биологическую активность (антимикробную, антиоксидантную) на моделях *in vitro* надземных и подземных частей исходных растений.

При выполнении второго этапа экспериментального блока подбирали составы питательных сред и параметры культивирования клеточных (каллусных культур и культур адвентивных корней) культур изучаемых растений. Другая задача второго этапа заключалась в подборе параметров разных видов экстракции комплекса БАВ из природного растительного сырья и клеточных культур: водно-спиртовой экстракции путем мацерации, перколяции и микроволновой экстракции. Эффективность разных вариантов экстракции оценивали по содержанию вторичных метаболитов в получаемых экстрактах.

Задачей третьего этапа экспериментального блока являлась оценка компонентного состава и физико-химических свойств экстрактов из природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами. Кроме того, на данном этапе устанавливали биологическую активность (антимикробные и антиоксидантные свойства в экспериментах *in vitro*) и показатели токсичности (содержание тяжелых металлов и степень ингибирования хемилюминесценции тест-штамма *Vibrio fischeri*) рассматриваемых экстрактов.

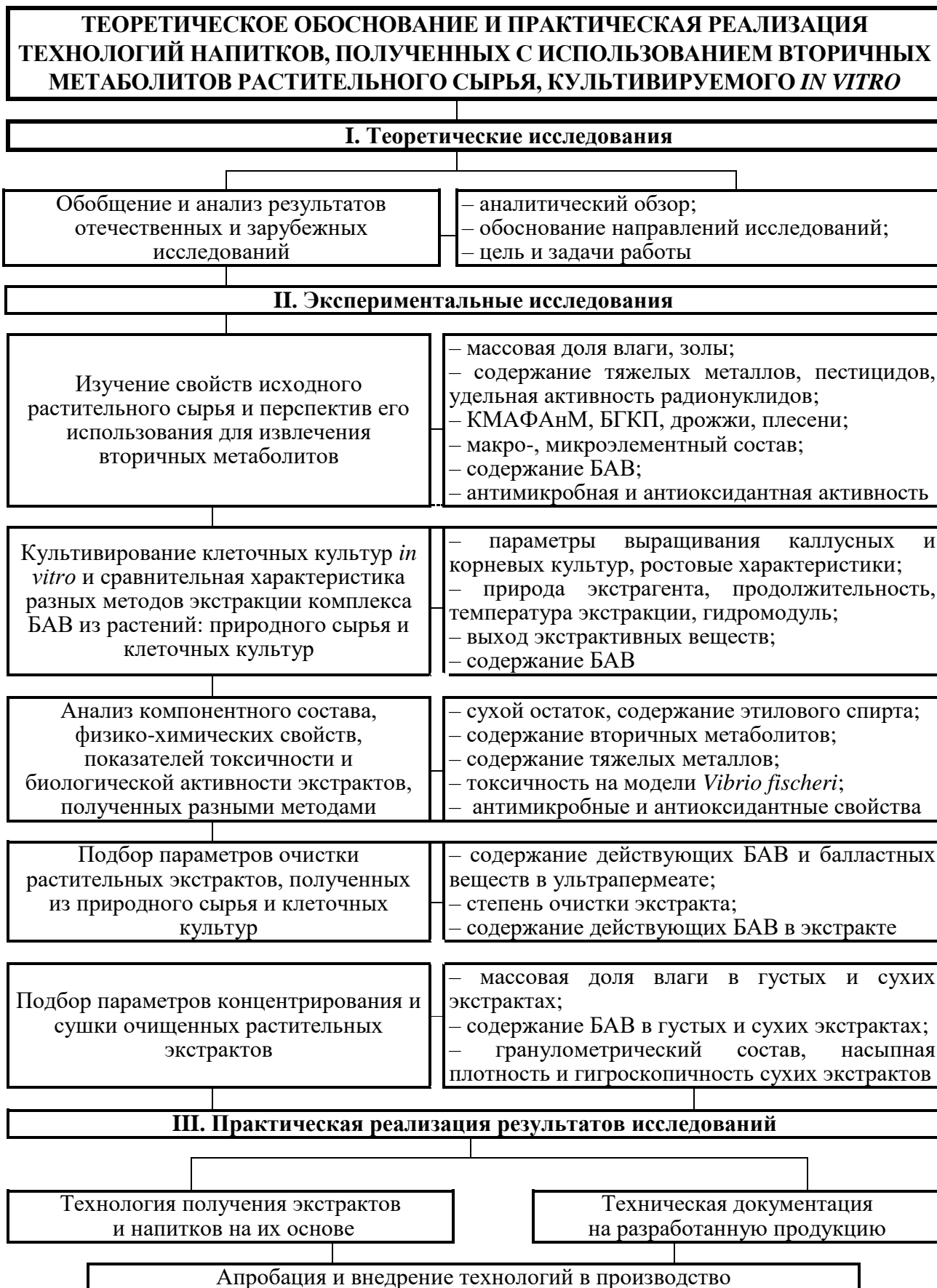


Рисунок 2.1.1 – Схема проведения исследований

Следующий (четвертый) этап экспериментального блока направлен на подбор параметров очистки экстрактов, полученных из надземных и подземных частей растений, а также из биомассы их клеточных культур, выращенных *in vitro*: каллусных и корневых. Исследовали два метода очистки экстрактов от балластных веществ: ультрафильтрационный и хроматографический. Очищенные экстракты подвергали анализу на предмет установления показателей качества, безопасности и биологической активности.

На пятом этапе экспериментального блока подбирали рациональные параметры получения густых экстрактов из природного растительного сырья и клеточных культур растений, являющихся объектами исследований в рамках данной работы. Также пятый этап посвящен подбору рациональных параметров сушки экстрактов распылительным и лиофильным способами, оценке компонентного состава и показателей качества высушенных экстрактов.

*Практический блок исследований* связан с разработкой процессуальных схем производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур изучаемых растений, а также разработкой рецептур и процессуальных схем производства напитков функциональной направленности на основе густых и сухих экстрактов. Для разработанных напитков изучали показатели качества и функциональные характеристики, после чего разрабатывали рекомендации по их применению. Также задачами практического блока являлись оценка экономической эффективности внедрения предлагаемых технологий, расчет себестоимости разработанных напитков, разработка технической документации и апробация технологии.

## 2.2 Объекты исследований, используемые реактивы, материалы и оборудование

В настоящем исследовании в качестве объектов исследований использовали растительное сырье, заготовленное в Сибирском федеральном округе 2012–2021 гг.:

- левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin (Asteraceae)) – листья, корневище с корнями;
- женьшень обыкновенный (*Panax ginseng* C.A. Mey (Araliaceae)) – листья, корень;
- элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus* (Maxim. & Rupr.) Maxim. (Araliaceae)) – листья, корневище;
- пальчатокоренник пятнистый (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae)) – листья, клубни;
- диоскорея обыкновенная (*Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin (Dioscoreaceae)) – листья, корень;
- сапожниковия растопыренная (*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Ariaceae)) – стебель, корень.

После сбора растительное сырье высушивалось воздушно-теневым способом и измельчалось.

Кроме природного растительного сырья, при проведении исследований использовались также семена левзеи сафлоровидной, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной, корневище женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего. Семена, зеленые части растений и корневище применяли в качестве исходного сырья для выращивания клеточных культур растений: каллусных и корневых.

Материалы и реактивы, использованные при выполнении диссертационного исследования, приведены в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 – Материалы и реактивы, использованные при выполнении диссертационного исследования

Наименование реактива, материала*	Квалификация, НД
Спирт этиловый	ХЧ по ГОСТ Р 51999-2002
Ацетон	ХЧ по ГОСТ 2603-79
Изопропанол	ХЧ по ГОСТ 9805-84
Этилацетат	ХЧ по ГОСТ 22300-76
Диэтиловый эфир	ХЧ по ГОСТ 6265-52
Ацетонитрил	ХЧ по ТУ 2636-040-44493179-00
Метилен хлористый	ХЧ по ГОСТ 9968-86
Метанол	ХЧ по ГОСТ 6995-77
Гексан	ХЧ по ТУ 6-09-4521-77
Уксусная кислота	ХЧ по ГОСТ 61-75
Толуол	ХЧ по ГОСТ 5789-78
Алюминия хлорид	ХЧ по ГОСТ 3759-75
Трифторуксусная кислота	ХЧ по ТУ 6-09-3877-80
Пропанол	ХЧ по ГОСТ 9805-84
2,2-дифенил-2-пикрилгидразил	ХЧ по CAS 84077-81-6
Диаммонийная соль 2-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS))	ХЧ по CAS 30931-67-0
Трихлоруксусная кислота	ХЧ по ТУ 6-09-1926-77
Диметилсульфоксид (ДМСО) дейтерированный	ХЧ по CAS 2206-27-1
Кислота азотная	ОС.Ч по ГОСТ 11125-84
Кислота ортофосфорная	ХЧ по ГОСТ 6552-80
Перекись водорода	ОС.Ч по ГОСТ 10929-76
Кислота хлористоводородная	ХЧ по ГОСТ 3118-77
Гидроксид натрия	ХЧ по ГОСТ 4328-77
Аммиак водный	ХЧ по ГОСТ 3760-79
Сульфат натрия безводный	Первый сорт по ГОСТ 5644-75
Кислота серная	ХЧ по ГОСТ 4204-77

## Окончание таблицы 2.2.1

Натрий двууглекислый	Первый сорт по ГОСТ 2156-76
Оксид алюминия	АОА-1 по ГОСТ 8136-85
Бензимидазол	ХЧ по CAS 51-17-2
Винная кислота	ЧДА по ГОСТ 5817-77
18-краун-6	ХЧ по CAS 17455-13-9
Гидроксиламина гидрохлорид	ЧДА по ГОСТ 5456-79
Натрий уксуснокислый	ЧДА по ГОСТ 199-78
Ортофенантролин	ЧДА по CAS 5144-89-8
Калий йодноватокислый	ХЧ по ГОСТ 4202-75
Пероксодисульфат калия	ЧДА по ГОСТ 4146-74
Ртуть двухлористая	ХЧ по CAS 7487-94-7
Сахароза	ХЧ по ГОСТ 5833-75
Мезоинозит	ЧДА по CAS 87-89-8
Нафтилуксусная кислота (НУК)	ЧДА по CAS 86-87-3
Индолилуксусная кислота (ИУК)	ЧДА по CAS 87-51-4
2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)	ЧДА по CAS 94-75-7
Кинетин	ЧДА по CAS 525-79-1
Аденин	ЧДА по CAS 73-24-5
6-бензиламинопурин (БАП)	ЧДА по CAS 1214-39-7
Магний хлористый	ЧДА по ГОСТ 4209-77
Пептон сухой ферментативный	по ГОСТ 13805-76
Индигосульфоокислота	ЧДА по CAS 860-22-0
Калий марганцовокислый	ХЧ по ГОСТ 20490-75
Натрий тетраборнокислый	ХЧ по ГОСТ 4199-76
Борная кислота	ХЧ по ГОСТ 18704-78
Пиридоксин	ЧДА по CAS 58-56-0
Тиамин	ЧДА по CAS 59-43-8
Никотиновая кислота	ЧДА по CAS 59-67-6

\* Другие используемые реактивы отечественного и зарубежного производства имели квалификацию не ниже х.ч.



В таблице 2.2.2 представлено научно-исследовательское оборудование, которое использовалось при проведении диссертационного исследования.

Таблица 2.2.2 – Оборудование, использованное при выполнении диссертационного исследования

Наименование оборудования, модель	Производитель, страна
Весы аналитические AND HR-202 i	A&D Company, Япония
Шкаф сушильный ШС-80-01	Смоленское СКТБ СПУ, Россия
Электропечь камерная лабораторная СНОЛ 6/1	Umega, Литва
Атомно-абсорбционный спектрометр МГА-1000	Люмэкс, Россия
Гамма-спектрометр «Прогресс-гамма»	НПП «Доза», Россия
Газо-жидкостной масс-спектрометр GCMS-QP2010Ultra SE	Shimadzu, Япония
Роторный вакуумный испаритель ПЭ-8910	ГК «Экрос», Россия
Термостат ТМ-100	ООО «ПЭП «СИБЭКОПРИБОР», Россия
Вертикальный паровой стерилизатор DGM-80	DGM Pharma Apparate Handel AG, Швейцария
Спектрофотометр UV-3600	Schimadzu, Япония
Многорезимный ридер GloMax Multi	Promega, США
Жидкостной хроматограф LC-20AD	Schimadzu, Япония
ЯМР-спектрометр NMR Avidence	Bruker, Германия
Анализатор азота Rapid N Cube	Elementar, Германия
Шейкер-инкубатор LSI-3016A/LSI-3016R	Daihan Labtech, Южная Корея
Микроволновой экстрактор Scientz-IIIM	Scientz, Китай
Ультрафильтрационная установка МФУ-Р-45-300	Россия
Система капиллярного электрофореза «Капель-105»	Люмэкс, Россия
Сублимационная установка «ИНЕЙ-6М»	Россия
Распылительная сушилка Mini Spray Dryer B-290	BUCHI, Швейцария

### 2.3 Методы исследований

Отбор проб растительного сырья проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Массовую долю влаги в растительном сырье определяли в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Аналитическую пробу свежего растительного сырья измельчали до размера частиц не более 10 мм, перемешивали и брали две навески по 3–5 г, взвешенные с погрешностью  $\pm 0,01$  г. Каждую навеску растительного сырья помещали в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный бюкс с крышкой и ставили в сушильный шкаф, нагретый до 130–135 °С. Высушивание растительного сырья проводили в открытых бюксах вместе со снятыми крышками. Первое взвешивание охлажденных в эксикаторе анализируемых образцов проводили через 1 ч. Высушивание образцов осуществляли до постоянной массы. Постоянная масса считалась достигнутой, если разница между двумя последовательными взвешиваниями после 30 мин дополнительного высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышала  $\pm 0,01$  г. Влажность ( $W$ ) растительного сырья в процентах вычисляли по формуле:

$$W = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m}, \quad (2.1)$$

где  $m$  – масса образца до высушивания, г;

$m_1$  – масса образца после высушивания, г.

За окончательный результат определения принимали среднее арифметическое трех параллельных определений, вычисленных до десятых долей процента.

Для определения массовой доли общей золы в растительном сырье использовали ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая».

Растительное сырье измельчали до размера частиц не более 2 мм. Фарфоровый тигель нагревали до красного каления (550–650 °С) в течение 30 мин, затем охлаждали в эксикаторе и точно взвешивали. Прокаливание тигля проводили до постоянной массы. Около 3–5 г высушенного растительного сырья помещали в подготовленный тигель. Испытуемый образец в тигле осторожно нагревали при 100–105 °С в течение 1 ч и далее проводили сжигание с последующим прокаливанием остатка образца при температуре 550–650 °С. После сжигания образца тигель охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Прокаливание повторяли до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания её со стенками тигля.

Содержание общей золы ( $X$ ) в процентах в растительном сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2}, \quad (2.2)$$

где  $m_1$  – масса золы, г;

$m_2$  – масса растительного сырья, г.

Массовую долю золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, определяли в соответствии с ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте».

В тигель, содержащий остаток после определения общей золы, прибавляли 25 мл 10 %-ной хлористоводородной кислоты, тигель накрывали часовым стеклом, нагревали на кипящей водяной бане до закипания смеси и

выдерживали в течение 10 мин. После охлаждения фильтровали содержимое тигля через беззольный фильтр, перенося на него осадок и обмывая часовое стекло горячей водой. Фильтр с осадком промывали горячей водой до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге, переносили его в тот же тигель, сушили и прокаливали при красном калении (550–650 °С), охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Прокаливание проводили до постоянной массы остатка.

Содержание золы, нерастворимой в 10 %-ной хлористоводородной кислоте, в сырье в процентах ( $X_1$ ) вычисляли по формуле:

$$X_1 = \frac{(m_1 - m) \cdot 100}{m_2}, \quad (2.3)$$

где  $m_1$  – масса золы, г;

$m$  – масса золы фильтра, г;

$m_2$  – масса сырья, г.

Содержание тяжелых металлов (свинец, кадмий, ртуть), алюминия, цинка и мышьяка в исходном растительном сырье и растительных экстрактах устанавливали методом атомно-абсорбционной спектрометрии с соблюдением требований ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Предварительно осуществляли подготовку проб растительного сырья методом «мокрой» минерализации. Для этого около 0,5 г измельченного растительного сырья помещали в сосуд для микроволнового разложения, приливали 3 мл воды и 5 мл концентрированной азотной кислоты, осторожно перемешивали до полного смачивания и выдерживали в течение 5–10 мин. Сосуд герметично закрывали, помещали его в защитный кожух и затем в ротор микроволновой системы. Далее проводили обработку с параметрами, указанными в таблице 2.3.1.

В конце цикла сосуды охлаждали на воздухе, открывали и полученный раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, фильтруя через беззольный фильтр, промытый 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты, затем доводили объем раствора водой до метки и перемешивали.

Таблица 2.3.1 – Программа обработки образцов растительного сырья в системе микроволнового разложения

Номер этапа	Продолжительность обработки, мин	Температура, °С	Мощность излучения, Вт
1	5,0	80	до 350
2	3,5	160	до 800
3	3,5	190	до 1000
4	12,0	190	до 800

Далее проводили измерения подготовленных проб с использованием атомно-абсорбционного спектрометра. Обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ. Содержание металла в испытуемом растительном сырье ( $X_2$ ) в мкг/г вычисляли по формуле:

$$X_2 = \frac{C_x \cdot V}{a} - C_k \cdot V_k, \quad (2.4)$$

где  $C_x$  – концентрация металла в испытуемом растворе, мкг/мл;

$V$  – разведение, мл;

$C_k$  – концентрация металла в контрольном («холостом») опыте, мкг/мл;

$V_k$  – объем контрольной пробы, мл;

$a$  – навеска сырья, г.

Удельную активность радионуклидов в растительном сырье устанавливали в соответствии с ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и

лекарственных растительных препаратах» с использованием гамма-спектрометра. Пробоподготовка растительных образцов заключалась в следующем. Перед проведением анализа осадок предварительно подготовленных носителей (иттрия и стронция) смывали с фильтров минимальным количеством – 6 М, раствора хлористоводородной кислоты и собирали в отдельном стаканчике. К навеске озоленного лекарственного сырья прибавляли раствор, содержащий носители. Нагревали на песчаной бане и постепенно прибавляли смесь концентрированных хлористоводородной и азотной кислот в объемном соотношении 3:1 до растворения основной массы озоленного сырья (приблизительно 200 мл).

Осадок декантировали и промывали «царской водкой». Промывной раствор прибавляли к фильтрату. Осадок промывали водой и высушивали в сушильном шкафу при 80–90 °С, охлаждали и проводили регистрацию активности осадка на бета-спектрометре. Фильтрат нейтрализовывали 20 %-ным раствором гидроксида натрия при постоянном перемешивании до pH 3–4, используя универсальную индикаторную бумагу. Затем к раствору приливали при перемешивании 25 %-ный раствор аммиака до pH 8 и 5 мл насыщенного раствора карбоната аммония.

Выпавший осадок выдерживали в течение 30 мин в равновесии с раствором и фильтровали на воронке Бунзена. Осадок промывали 2–3 раза водой по 3–5 мл, спиртом и подсушивали (промыванием диэтиловым эфиром). Фильтр с осадком осторожно снимали с воронки и помещали в счетную кювету. Сушили при температуре 40–45 °С и измеряли активность образца на бета-спектрометре без учета удельной активности калия.

Содержание остаточных пестицидов в растительном сырье определяли в соответствии с ОФС.1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», используя метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

Пробы растительного сырья измельчали и просеивали через сито с размером отверстий 0,5 мм. Затем около 5 г сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 100 мкл стандартного раствора внутреннего стандарта с общей концентрацией 1 мкг/мл и 50 мл перегнанного гексана, перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч при нагревании с использованием обратного холодильника. Затем полученное извлечение отфильтровывали через стекловату и проводили повторную экстракцию 30 мл гексана. Остаток на фильтре промывали 30 мл гексана и промывную жидкость объединяли с полученными извлечениями. К объединенному извлечению добавляли сульфат натрия безводный в соотношении 1:10 и выдерживали 1–1,5 ч, а затем упаривали на роторном вакуумном испарителе до объема 10–15 мл.

В делительную воронку вместимостью 100 мл помещали 10–15 мл полученного объединенного извлечения и прибавляли 20–25 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое делительной воронки осторожно встряхивали 5–10 раз и оставляли до расслоения фаз, после чего нижний слой (кислотный) отбрасывали. Очистку повторяли несколько раз до получения бесцветного слоя серной кислоты. Очищенные извлечения нейтрализовывали 0,5 М раствором гидрокарбоната натрия и промывали водой до нейтральной реакции промывных вод, после чего извлечения пропускали через колонку (длиной 10 см и диаметром 1 см), последовательно заполненную алюминия оксидом (высота слоя 3 см) и натрия сульфатом безводным (высота слоя 3 см). Колонку промывали 20 мл метилхлорида. Полученное очищенное извлечение упаривали на роторном вакуумном испарителе досуха. Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетона.

Хромато-масс-спектрометрический анализ полученных растворов проводили на газовом хроматографе с масс-селективным детектором с использованием стандартных веществ (стандартный образец состава:  $\alpha$ -гексахлорциклогексан,  $\gamma$ -гексахлорциклогексан, ДДТ, ДДЕ, ДДД, альдрин, гептахлор), а также внутреннего стандарта – 4,4'-дибромдифенила.

Для анализа использовали 30 м кварцевую капиллярную колонку HP-5MS (сополимер – 5 % дифенила и 95 % диметилсилоксана) с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,3 мкм. Параметры хроматографирования: начальная температура термостата колонки

( $T_{нач}$ ) 70 °С, конечная температура колонки ( $T_{конеч}$ ) 300 °С, скорость линейного нагрева колонки ( $\nu$ ) 10 °С/мин, температура испарителя ( $T_{исп}$ ) 280 °С, температура интерфейса ( $T_{инт}$ ) 280 °С, объем вводимой пробы ( $V$ ) 1 мкл.

Содержание пестицидов в растительном сырье рассчитывали методом внешнего стандарта, в качестве которого использовали растворы стандартных веществ определяемых соединений. Рассчитывали среднее значение из трех измерений площадей пиков анализируемых веществ.

Количество определяемого компонента ( $C_{исп}$ ) в нг/г или нг/мл вычисляли по формуле:

$$C_{исп} = \frac{S}{S_{ст} \cdot P(V)} - C_{ст} - C_{контр}, \quad (2.5)$$

где  $C_{контр}$  – концентрация определяемого соединения в контрольной пробе, нг/г или нг/мл;

$S$  – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме испытуемого раствора;

$C_{ст}$  – концентрация определяемого соединения в стандартном растворе;

$S_{ст}$  – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме стандартного раствора;

$P(V)$  – навеска в г или объем пробы в мл.

Для установления микробиологических показателей безопасности исходного растительного сырья использовали ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота».



Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) использовали чашечный агаровый метод (в варианте модифицированного глубинного культивирования). Подсчет колоний производили через 48–72 ч (предварительный результат) и через 5 сут (окончательный результат). Количество микроорганизмов ( $N$ ) в 1 г или в 1 мл рассчитывали по формуле:

$$N = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10, \quad (2.6)$$

где  $c$  – количество колоний на всех чашках Петри;

$n$  – число чашек Петри;

$d$  – коэффициент разведения образца;

10 – коэффициент пересчета при проведении высева на чашку в объеме 0,1 мл.

Макроэлементный состав, содержание бария в растениях определяли методом капиллярного электрофореза. Метод основан на извлечении катионов натрия, калия, кальция, магния из проб растительного сырья раствором соляной кислоты, дальнейшем разделении, идентификации и определении катионов методом капиллярного электрофореза (спектрофотометрический детектор, длина волны 254 нм).

Условия разделения: фоновый электролит – бензимидазол, винная кислота с добавкой 18-краун-6; капилляр с параметрами: длина 75 мкм,  $L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}} = 50/60$  см.

Содержание железа в растительном сырье определяли спектрофотометрическим методом по ГОСТ 26928-86. Сырье предварительно минерализовали по ГОСТ 26929 («сухая» минерализация). Зола, полученную при сухой минерализации, растворяли в 5 мл раствора соляной кислоты (1:1) при нагревании на водяной бане, переносили с промывными водами в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили водой до метки.

Далее в мерную колбу на 50 мл вносили раствор полученного минерализата в таком объеме, чтобы масса железа составила 20–80 мкг. Добавляли 1 мл солянокислого раствора гидроксиламина, доводили рН до значения 4,0–6,0 по индикаторной бумаге с помощью уксуснокислого натрия. В колбу вносили 1 мл раствора ортофенантролина и доводили объем до метки. Перемешивали и через 15 мин измеряли оптическую плотность раствора по отношению к контролю при длине волны 510 нм (толщина кюветы 20 мм).

Предварительно строили градуировочный график, используя в качестве стандартного раствора основной раствор железа массовой концентрации 1 г/л.

Массовую долю железа в растительном сырье вычисляли по формуле:

$$X_3 = \frac{m_1 \cdot V}{V_1 \cdot M}, \quad (2.7)$$

где  $m$  – масса навески растительного сырья, взятая для минерализации, г;

$m_1$  – масса железа, найденная по градуировочному графику, мкг;

$V$  – общий объем раствора минерализата, мл;

$V_1$  – объем раствора минерализата, взятый для определения, мл.

Содержание марганца в растительном сырье определяли спектрофотометрическим методом, основанным на окислении марганца периодатом до окрашенного перманганата-иона и сравнении оптических плотностей анализируемых растворов и растворов сравнения с известной концентрацией марганца, по ГОСТ 27997-88.

Предварительно осуществляли озоление растительного материала. В тигле взвешивали навеску испытуемой пробы массой 2 г. Тигель помещали в холодную муфельную печь и повышали температуру до 250–300 °С. После прекращения выделения дыма температуру печи поднимали до (525±25) °С и вели прокаливание в течение трех часов. Затем тигель охлаждали, золу смачивали несколькими каплями дистиллированной воды и приливали 2 мл

соляной кислоты, разбавленной 1:1. Тигель помешали на кипящую водяную баню и упаривали кислоту до влажных солей. Приливали в тигель 5 мл соляной кислоты, разбавленной 1:10, накрывали часовым стеклом и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Раствор золы, не фильтруя, с помощью палочки переносили через воронку в пробирку, установленную в штативе. Тигель, палочку и воронку тщательно обмывали дистиллированной водой, доводили раствор дистиллированной водой до метки, перемешивали и давали осадку отстояться. Пробу для анализа брали, не взмучивая осадка.

Для количественного определения марганца в полученных минерализатах из растворов золы отбирали пробы по 5 мл, помещали в стаканы из термостойкого стекла, приливали по 5 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно упаривали на плитке. К остаткам приливали по 5 мл азотной кислоты и упаривали досуха. Обработку остатков азотной кислотой повторяли три раза. Затем к сухим остаткам приливали по 20 мл фосфорной кислоты, разбавленной 1:10, нагревали на плитке до полного растворения остатков, приливали по 5 мл раствора йоднокислого натрия (калия), перемешивали круговым движением и сливали в градуированные пробирки вместимостью 25 мл, установленные в штативе.

Одновременно в пять пробирок помещали по 5 мл растворов сравнения, приливали по 5 мл раствора йоднокислого натрия (калия), доводили до меток фосфорной кислотой, разбавленной 1:10, перемешивали и устанавливали в штатив. Штатив с пробирками помещали в кипящую водяную баню и выдерживали в ней в течение 30 мин. Растворы охлаждали, доводили до меток дистиллированной водой и перемешивали. Оптическую плотность растворов измеряли в кювете с толщиной просвечиваемого слоя 50 мм относительно первого раствора сравнения, не содержащего марганец, при длине волны 536 нм. Одновременно проводили контрольный опыт.

Если значение оптической плотности анализируемого раствора превышало значение оптической плотности пятого раствора сравнения,

раствор золы разбавляли соляной кислотой, разбавленной 1:40, и повторяли описанные выше операции в том же порядке. При таком же разбавлении повторяли и контрольный опыт.

По результатам фотометрирования растворов сравнения строили градуировочный график. По градуировочному графику находили массовые концентрации марганца в анализируемых растворах.

При изучении химического состава исходного растительного сырья и экстрактов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) руководствовались требованиями ГОСТ 28366-89 и «Государственной фармакопеи Российской Федерации» (ОФС.1.2.1.2.0003.15). Методика проведения анализа фракционного состава растительных экстрактов методом тонкослойной хроматографии описана ниже.

Сухой остаток после упаривания растворителя из растительного экстракта растворяли в 1 мл подходящего растворителя (метанол, хлористый метилен, ацетон) и наносили пятно на пластинку для тонкослойной хроматографии с помощью стеклянного капилляра. Пластинку помещали в камеру для ТСХ, в которую добавляли соответствующий элюент. В случае использования ТСХ на силикагеле без модификации хроматографию проводили в градиентном режиме в системе  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH с градиентом метанола 0–10 %, с шагом в 1 %. В случае обращенно-фазовой хроматографии использовали элюентную систему  $\text{H}_2\text{O}$  : MeCN с градиентом ацетонитрила 0–20 % с шагом 2 %, в качестве модификатора использовали трифторуксусную кислоту, которую добавляли в количестве 0,1 %.

При изучении химического состава исходного растительного сырья и экстрактов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) руководствовались требованиями «Государственной фармакопеи Российской Федерации» (ОФС.1.2.1.2.0005.15).

ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа Shimadzu LC-20AD, детектирование осуществляли с использованием диодно-матричного детектора в диапазоне детектирования 180 нм – 900 нм, скорость потока

элюента во всех случаях составляла 1 мл/мин. Элюирование проводили в градиентном режиме, время и градиент подбирали индивидуально для каждого случая разделения, в качестве растворителей использовали смесь подготовленной (очищенной) воды и ацетонитрила с добавкой 0,1 % трифторуксусной кислоты. Разделение проводили на обращенно-фазовой колонке Phenomenex 250 мм × 2,5 мм, размер частиц 25 мкм, сорбент силикагель модифицированный С-18, с фенильным эндкэпированием.

Для проведения анализа методом ЯМР-спектроскопии использовали ЯМР-спектрометр NMR Avidence с рабочей частотой 400 МГц Bruker (Германия).

Исследование антимикробной активности растительных экстрактов проводили диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-2004. Метод основан на способности антимикробного агента (экстракта) диффундировать из пропитанных им бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. В качестве тест-штаммов использовали: *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *L. mesenteroides*, *B. cereus*, *S. viridans*, *C. albicans*, *M. canis*, *P. citrinum*.

Плотные питательные среды готовили в соответствии с инструкциями изготовителя. Толщина слоя агара в чашке составляла (4,0±0,5) мм, что достигалось при внесении в чашку Петри диаметром 90 мм строго 20 см<sup>3</sup> агара, диаметром 100 мм – 25 см<sup>3</sup> агара, а диаметром 150 мм – 60 см<sup>3</sup> агара. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливали на строго горизонтальную поверхность (выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей). Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляли при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией контролировали отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

При определении антимикробной активности экстрактов использовали стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления. Для инокуляции приготовленных чашек с агаром стандартный инокулюм наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1–2 см<sup>3</sup>, равномерно распределяли по поверхности покачиванием, после чего удаляли избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин.

Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносили диски с растительными экстрактами. Аппликацию дисков проводили с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками составляло 15–20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм помещали не более 6 дисков с экстрактами. Диски равномерно контактировали с поверхностью агара, для этого их аккуратно прижимали пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 35 °С в течение 24 ч.

После окончания инкубации чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45°. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм, используя штангенциркуль.

Для оценки антиоксидантных свойств растительных экстрактов использовали два метода: (1) спектрофотометрический метод, основанный на измерении их способности улавливать радикал АВТС, и (2) метод, основанный на способности антиоксидантов восстанавливать радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH).

(1) Метод основан на оценке способности потенциальных антиоксидантов улавливать свободные радикалы диаммонийной соли 2-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоной кислоты (АВТС).

Катион-радикал ABTS получали при инкубации смеси, содержащей 7 мМ ABTS и 2,45 мМ пероксодисульфата калия, в течение 16–18 часов. Перед определением катион-радикал ABTS разбавляли предварительно подготовленным цитратным буферным раствором с pH = 4,0, приготовленным на этиловом спирте так, чтобы поглощение при  $\lambda=734$  нм было  $0,70\pm 0,02$ .

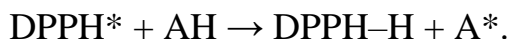
Для проведения эксперимента готовили реакционные смеси с разной массовой концентрацией растительных экстрактов. Затем к реакционной смеси добавляли 3 мл рабочего раствора ABTS. После 10 мин инкубации при комнатной температуре измеряли оптическую плотность растворов. Контролем служил рабочий раствор ABTS без добавления экстрактов. Активность по улавливанию радикалов для образцов выражали как процент улавливания радикала ABTS (%) по формуле:

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100, \quad (2.8)$$

где  $A_0$  – оптическая плотность контроля;

$A_1$  – оптическая плотность образца.

(2) Антиоксидантную активность растительных экстрактов определяли по их способности восстанавливать радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). Реакция взаимодействия антиоксидантов с DPPH-радикалом протекает по схеме:



В результате восстановления DPPH-радикала антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности методом спектрофотометрии.

Для проведения анализа экстракты растений смешивали с 2,85 мл свежеприготовленного 0,1 мМ раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила.

Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Уменьшение оптической плотности, по сравнению с контролем (70 %-ный раствор метанола), регистрировали при 517 нм (спектрофотометр UV-3600, Shimadzu, Япония). В качестве стандартных растворов использовали растворы аскорбиновой кислоты (АК) известной концентрации. Результаты анализов выражали в мг эквивалента АК на грамм сухой массы растительной культуры (мг АК/г).

Для выращивания каллусных культур растений предварительно получали стерильные проростки. В качестве исходного материала использовали семена левзеи сафлоровидной, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной, корневище женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего.

Для стерилизации семян растений их ополаскивали детергентом, смешивали 3 %-ную перекись водорода и 96 %-ный этанол (1:1), проводили инкубацию семян в полученном стерилизующем растворе в 5 мл (~ 1–3 мин), затем подсушивали в потоке стерильного воздуха на стерильной фильтровальной бумаге.

Для стерилизации материала женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего листовые пластинки, стебли и части корневища промывали детергентом и помещали в 0,1 %-ный раствор сулемы ( $\text{HgCl}_2$ ) на 1 мин. После стерилизации материал трехкратно отмывали в течение 20 мин в дистиллированной стерильной воде. Листовые пластинки, стебли и части корневища разрезали скальпелем на сегменты размером 5×5 мм и использовали в качестве эксплантов, которые помещали на агаризованную среду в чашки Петри диаметром 4 и 6 см.

Для экспериментов использовали среды с минеральной основой Мурасиге-Скуга (MS), Гамборга (B5) и Шенка Хильдебрандта (SH) с добавлением гидролизата казеина (0,5 г/л), мезоинозита (0,1 г/л), 3 %-ной сахарозы, 0,5 %-ного агара. Использовали 10 вариантов сред, отличающихся по составу регуляторов роста, в качестве которых выступали



$\alpha$ -нафтилуксусная кислота (НУК), индолилуксусная кислота (ИУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), кинетин, аденин, 6-бензиламинопурин (БАП).

Питательные среды автоклавировали в течение 15 мин подготовительного и 15 мин основного режима при добавочном давлении 0,7–0,8 атм. Первые проростки наблюдали через 6–8 недель культивирования. Для индукции каллусных культур клеток использовали 8 недельные стерильные проростки с 2–4 настоящими листьями. Для этого листья и стебли проростков разрезали на части и высаживали на агаризованную среду в чашки Петри диаметром 60 и 90 мм. Образование первичных каллусов наблюдали на 7–14 сутки культивирования. Первичный каллус отделяли от остатков растительных эксплантов и переносили на свежую питательную среду. Дальнейший цикл выращивания культуры составлял 4–5 недель.

Культуры выращивали как в темноте, так и на свету (16-часовой световой день) при температуре 23 °С. Каллус при пересеве делился на 3–7 частей, в зависимости от прироста. Для полученных каллусных культур, отобранных через 14 и 28 суток от начала выращивания, регистрировали индекс роста по формуле:

$$P_i = \frac{X_i - X_0}{X_0} \quad (2.9)$$

где  $X_i$  – вес культуры на  $i$ -ые сутки выращивания (стандартно:  $i = 7, 14, 21$  и 28 сутки культивирования);

$X_0$  – начальный вес культуры (вес транспланта).

При получении культур адвентивных корней в качестве объекта трансформации использовали проростки семян растений, а именно листья 14–28 дневных проростков, а также корневище женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего. Для трансформации листьев и корневищ применяли

штаммы почвенных агробактерий *Agrobacterium rhizogenes* Swiss 15834, 8196 и А4. Бактерии *Agrobacterium rhizogenes* выращивали на агаризованной питательной среде YEB (5 г/л пептона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л сахарозы, 0,5 г/л хлористого магния) в течение 24 ч в темноте, при 23 °С на качалке с круговым вращением (амплитуда 5–10 см, скорость вращения 90 об/мин). Для трансформации эксплантов их протыкали стерильной иглой и помещали на питательную среду Гамборга В5, содержащую суспензию ( $OD_{600}=0,4$ ) агробактерии.

После 12–48 ч выдерживания в бактериальной суспензии экспланты промывали стерильной водой, удаляли с них влагу (насухо) стерильной фильтровальной бумагой и помещали на твёрдую среду В5, содержащую 500 мг/л цефотаксима («Клафоран», Великобритания). Антибиотик добавлялся для удаления остатков агробактерий. Через 30 суток культивирования оценивали частоту трансформации (количество трансформированных эксплантов к их общему количеству). Отбирали трансформированные экспланты, опираясь на фенотипические признаки (латеральное ветвление, отсутствие геотропизма, способность расти в среде без гормонов).

В дальнейшем два пассажа полученных корней осуществлялись на твердой среде В5, не содержащей гормоны, но содержащей уменьшенную дозу цефотаксима (250 мг/л). Культивирование происходило как на свету (16-часовой световой день), так и в темноте, при температуре 23 °С на качалке с частотой 100 об/мин, продолжительность 5 недель. Последующую пересадку на свежую среду проводили по мере появления контаминации агробактерией. Через 14 суток наблюдали ризогенез на отдельных эксплантах. Для характеристики роста корневых культур *in vitro* использовали показатель индекса роста (формула 2.9).

Экстрагирование комплекса вторичных метаболитов из природного растительного сырья и клеточных культур проводили тремя методами: мацерации, циркуляционного экстрагирования (перколяции) и микроволновой экстракции.

В качестве экстрагента выбран этиловый спирт (40 %). Высушенный растительный материал измельчали в лабораторной мельнице и просеивали через сито с размером отверстия 1 мм. Полученное сырье хранили при комнатной температуре в темном помещении. В случае мацерации мелкодисперсный порошок изучаемого растения экстрагировали в определенном объеме (в зависимости от гидромодуля) этилового спирта на шейкере в термостатируемых условиях. В варианте экстракции при температуре кипения растворителя процесс вели на водяной бане с использованием обратного холодильника.

Циркуляционное экстрагирование осуществляли при температуре кипения растворителя в аппарате Сокслета. Микроволновую экстракцию вели с использованием микроволнового экстрактора Scientz-ИДМ, варьируя мощность излучения от 200 до 600 Вт с шагом 100 Вт.

Выход экстрактивных веществ в растительных экстрактах определяли в соответствии с ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Для этого 25,0 мл фильтрата, полученного после фильтрования растительного экстракта, переносили в предварительно высушенную при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7–9 см и выпаривали содержимое на водяной бане досуха. Чашку с сухим остатком высушивали при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, охлаждали в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится кальция хлорид безводный, и немедленно взвешивали.

Содержание экстрактивных веществ в абсолютно сухом растительном сырье в процентах ( $X$ ) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}{a \cdot (100 - W) \cdot 25}, \quad (2.10)$$

где  $m$  – масса сухого остатка, г;

$a$  – навеска растительного сырья, взятая для экстракции, г;

$V$  – объем экстрагента, используемый при однократной обработке растительного сырья, мл;

$W$  – влажность растительного сырья, %.

Для определения сухого остатка в жидких растительных экстрактах руководствовались требованиями ОФС.1.4.1.0021.15. Для этого 5,0 мл жидкого экстракта помещали во взвешенный бюкс, выпаривали на водяной бане и сушили в течение 3 ч при  $(102,5 \pm 2,5)$  °С, затем охлаждали в эксикаторе в течение 30 мин и взвешивали.

Содержание этилового спирта в жидких экстрактах определяли методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС.1.2.1.0016.15. Использовали газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и с хроматографической колонкой размером 150×0,4 см, заполненной полимерным сорбентом Рогарак Q. Параметры хроматографирования: температура колонки 150 °С; температура испарителя 170 °С; температура детектора 170 °С, скорость газа-носителя (гелий) – 30 мл/мин.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали точно отмеренное количество экстракта, прибавляли 5,0 мл пропанола (внутренний стандарт), перемешивали, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. 10,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали.

Для приготовления стандарта в мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 5,0 мл спирта этилового не менее 95 % (стандартный образец) и 5,0 мл пропанола (внутренний стандарт), доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. 10,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали.

В испаритель газового хроматографа, выведенного на рабочий режим, вводили последовательно по 1–2 мкл испытуемого экстракта и раствора стандартного образца и регистрировали хроматограммы.

Содержание спирта этилового в препарате в объемных процентах ( $X$ , % (o/o)) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot S'_0 \cdot 5 \cdot P}{S_0 \cdot S' \cdot V_{пр}}, \quad (2.11)$$

где  $S$  и  $S'$  – площади пика спирта этилового на хроматограммах анализируемого раствора и раствора стандартного образца, соответственно;

$S_0$  и  $S'_0$  – площади пика пропанола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца, соответственно;

$V_{пр}$  – объем препарата, взятый для анализа, мл;

$P$  – содержание спирта этилового в стандартном образце, %.

Методика определения токсичности растительных экстрактов с помощью биолюминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* основана на оценке снижения флюоресценции под действием исследуемого образца в сравнении со стандартом (контролем). Степень подавления интенсивности свечения в образце является мерой токсичности. Диапазон измерения – от 0 до 100 % ингибирования.

Тестируемый экстракт количественно 1–10 мкл наносился на линию старта с использованием градуированного микрошприца МШ-10. Растворитель тщательно удалялся.

В качестве стандарта токсичности использовался раствор *n*-аминофенола. Точная навеска вещества в количестве 0,01–5 мг растворялась в 10 мл водно-спиртовой смеси. Раствор образца количественно 1–10 мкл наносился на линию старта с использованием градуированного микрошприца МШ-10. Растворитель тщательно удалялся.

Приготовление раствора с биолюминесцентными бактериями осуществлялось следующим образом. 1 флакон ледяного раствора для реактивации «BioFix Lumi» размораживали при температуре 4 °С в течение суток. Затем доводили температуру раствора до +15 °С на водяной бане в течение 10 минут, оставляли в термоконтейнере. Пробирку с реагентом, содержащую люминесцентные бактерии BioFix Lumi, доставали из глубокой заморозки непосредственно перед реактивацией и добавляли 1 мл для реактивации BioFix Lumi. Размораживали и растворяли биолюминесцентные бактерии на водяной бане в течение 2 минут. Помещали пробирку с ресуспендированными люминесцентными бактериями на водяную баню. Доводили до температуры 15 °С в течение 15 мин.

Для анализа использовали пластину для ТСХ марки АФ-А, толщина слоя 90–120 мкм, с размером частиц 8–12 мкм. Наносили раствор образцов растительных экстрактов полосой 5–10 мм (варьируя количество), содержащий 1 мкг, с использованием аппликатора механического АПА-2 и производили тщательное удаление растворителя. Пластины помещали в камеру для ТСХ с подвижной фазой, состоящей из БУВ (60-15-26), развивали хроматограмму.

Фиксирование естественной флюоресценции образца осуществляли в денситометре в УФ-свете (254, 365 нм). Методом наката производили обработку суспензией микроорганизмов и фиксировали изменение флюоресценции отдельно взятых пятен с экспозицией 0, 3, 5, 10, 15 минут.

Токсические вещества детектировались как темные пятна на люминесцирующем фоне с отличающейся интенсивностью флюоресценции.

Количество клеток/мл культуры рассчитывали путем сравнения оптической плотности суспензии со стандартами мутности Макфарланда для суспензий микроорганизмов (стандарты мутности, подготовленные ВВЛ (Бектон-Дикинсон и соавт. Нью-Джерси, США), согласно которому  $0,5$  поглощения =  $6 \cdot 10^8$  клеток/мл в измеренной суспензии.

Гранулометрический состав высушенных экстрактов определяли в соответствии с ОФС.1.1.0015.15. Определяли массу каждого сита (2,00 мм; 1,40 мм; 1,00 мм; 710 мкм; 500 мкм; 355 мкм; 250 мкм), используемого для анализа, с точностью до 0,1 г. Точную навеску испытуемого сухого экстракта помещали на верхнее сито и закрывали крышкой. Проводили просеивание в течение установленного времени, затем осторожно (без потерь вещества) снова взвешивали каждое сито и определяли массу вещества на каждом из сит. Таким же способом определяли массу вещества на поддоне.

Для определения насыпной плотности сухих экстрактов в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 в мерный цилиндр (50,0 мл) небольшими порциями насыпали сухой экстракт, одновременно постукивая по стенке цилиндра, после заполнения цилиндра его взвешивали. Расчет насыпной плотности (г/мл) производили по формуле:

$$K = \frac{m}{V}, \quad (2.12)$$

где  $m$  – масса экстракта, г;

$V$  – объем экстракта, мл.

Гигроскопичность сухих экстрактов оценивали следующим образом.

В предварительно взвешенный стеклянный сосуд (внешний диаметр 50 мм, высота 15 мм) с подходящей пробкой помещали испытуемый образец и взвешивали. Открытый сосуд помещали в эксикатор при температуре 25 °С, содержащий насыщенный раствор аммония хлорида. Выдерживали в течение 24 ч. Сосуд укупоривали пробкой и взвешивали.

Увеличение массы экстракта в процентах рассчитывали по формуле:

$$g = \frac{m_3 - m_2}{m_2 - m_1} \cdot 100, \quad (2.13)$$

где  $m_1$  – масса пустого стеклянного сосуда, г;

$m_2$  – масса стеклянного сосуда с испытуемым образцом до экспозиции во влажной среде, г;

$m_3$  – масса стеклянного сосуда с испытуемым образцом после экспозиции во влажной среде, г.

Титруемая кислотность функциональных напитков на основе молочной сыворотки определялась в соответствии с ГОСТ Р 54669-2011. Из напитков максимально полно удаляли растительные компоненты, помещали в стакан вместимостью 500 мл, тщательно растирали и нагревали на водяной бане до температуры  $(25\pm 2)$  °С, тщательно перемешивая шпателем до получения однородной смеси. Подготовленную пробу переносили в колбу вместимостью 500 мл с притертой пробкой и охлаждали до температуры  $(20\pm 2)$  °С.

В колбу вместимостью 250 мл вносили 10 мл подготовленной пробы и 20 мл дистиллированной воды, добавляли 3 капли 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина, после чего смесь перемешивали и титровали 0,1 М раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Кислотность функциональных напитков (°Т) вычисляли умножением объема раствора гидроксида натрия (мл), пошедшего на нейтрализацию кислот, содержащихся в определенном объеме анализируемого продукта, на коэффициент 10.

Содержание лактозы в функциональных напитках определяли спектрофотометрическим методом в соответствии с ГОСТ 34304–2017.

Метод определения лактозы основан на гидролизе лактозы, содержащейся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молочных продуктов, в присутствии  $\beta$ -галактозидазы до глюкозы и галактозы, окислении имеющейся в пробе галактозы (свободная галактоза плюс образовавшаяся при гидролизе лактозы), под действием НАД в присутствии фермента  $\beta$ -галактозодегидрогеназы и фотометрическом



измерении массовой доли образовавшегося НАДН на длинах волн 334, 340 или 365 нм, эквивалентной массовой доле галактозы, и расчете массовой доли лактозы по разности оптических плотностей данного раствора и раствора, используемого при определении свободной галактозы.

Массовую долю белка в функциональных напитках определяли по методу Дюма, основанному на измерении теплопроводности молекулярного азота, образующегося после сжигания анализируемого образца при температуре около 1000 °С в атмосфере кислорода и последующего восстановления всех образующихся оксидов азота при помощи восстанавливающего агента (меди), с использованием анализатора белкового азота RAPID N Cube (Elementar, Германия). На этапе пробоподготовки пробу капсулировали с использованием фольги, не содержащей азота. Навеска образца составляла 250 мг.

Содержание дубильных веществ (в пересчете на танин) в функциональных напитках определяли в соответствии с ОФС.1.5.3.0008.18.

250 мл функционального напитка фильтровали через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл так, чтобы частицы сырья не попали в колбу, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Далее 25 мл полученного водного извлечения помещали в коническую колбу вместимостью 1000 мл, прибавляли 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании 0,02 М раствором перманганата калия до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно проводили контрольный опыт: в коническую колбу вместимостью 1000 мл помещали 525 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании 0,02 М раствором перманганата калия до золотисто-желтого окрашивания.

1 мл 0,02 М раствором перманганата калия соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание флавоноидов в функциональных напитках определяли спектрофотометрическим методом, основанным на взаимодействии флавоноидов с хлоридом алюминия.

В две мерные колбы вместимостью 25 мл вносили по 5 мл испытуемого функционального напитка. В одну колбу (анализируемый раствор) добавляли 4 мл 5 %-ного раствора хлористого алюминия в 60 %-ном этаноле. Обе колбы доводили до метки 60 %-ным этанолом и тщательно перемешивали. Через 30 мин измеряли оптическую плотность анализируемого раствора относительно раствора сравнения (образец без хлористого алюминия) при длине волны максимума поглощения в интервале 390–420 нм в кюветах с толщиной оптического слоя 1 см.

Предварительно строили калибровочный график, используя в качестве стандартов растворы рутина (концентрация исходного раствора 1,0 мг/мл).

Содержание антоцианов в функциональных напитках определяли методом ВЭЖХ в соответствии с ГОСТ 32709-2014.

Образцы функциональных напитков разбавляли дистиллированной водой в массовом соотношении от 1:2 до 1:5. Подготовленную пробу для удаления мутной взвеси центрифугировали и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Готовили раствор ортофосфорной кислоты с рН 2,0. Для этого в стакан с водой по каплям добавляли концентрированную ортофосфорную кислоту, регистрируя показания рН-метра.

Для приготовления подвижной фазы полученный раствор ортофосфорной кислоты смешивали с ацетонитрилом в соотношении 88:12 в процентах по объему. Подвижную фазу фильтровали под вакуумом через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Далее определяли с помощью ВЭЖХ количество антоцианов.

Идентификацию пиков основных, специфических, индивидуальных антоцианов осуществляли по абсолютным временам удерживания путем

сравнения полученных хроматограмм напитков с профилями стандартных веществ.

Относительное содержание индивидуальных антоцианов,  $X_i$ , %, вычисляли как отношение площади хроматографического пика индивидуального антоциана к сумме площадей пиков всех идентифицированных антоцианов по формуле:

$$X_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \cdot 100, \quad (2.14)$$

где  $S_i$  – площадь пика  $i$ -го антоциана на хроматограмме;

$n$  – количество пиков идентифицированных компонентов на хроматограмме.

Содержание алкалоидов (кофеина) в функциональных напитках определяли методом ВЭЖХ по ГОСТ 30059-93.

Условия хроматографирования: колонка с фазой C-18, 5–6 мкм, 0,15x4,6 мм; подвижная фаза: 15 % ацетонитрила, 85 % 0,0125 М раствора дигидрофосфата калия, доведенного фосфорной кислотой до pH 3,2; скорость потока: линейный градиент от 1,2 см/мин до 1,7 см/мин за 8 мин. Температура термостата 35 °С. Давление на колонке при скорости потока 1,2 см/мин – 120 кг/см<sup>2</sup>. Обнаружение по поглощению в УФ-области спектра при длине волны 210 нм. Вводимый объем образца 10,0 мкм.

Общее содержание вторичных метаболитов в функциональных напитках определяли колориметрическим методом с использованием реактива Folin-Ciocalteu в соответствии с ГОСТ Р ИСО 14502-1-2010.

Реактив Folin-Ciocalteu содержит фосфорно-вольфрамовые кислоты, которые восстанавливаются при взаимодействии с легко окисляющимися ОН-группами фенола. При этом образуется вольфрамовая синь, обладающая характерной полосой поглощения с максимумом 765 нм, придающая исследуемому раствору синий цвет. Несмотря на то, что реактив Folin-

Ciocalteu по-разному взаимодействует с различными полифенолами, использование галловой кислоты в качестве стандарта позволяет достоверно определить общее содержание полифенолов.

1 мл функционального напитка помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли воду до метки и перемешивали. В градуированные пробирки помещали по 1 мл стандартных растворов (концентрации 10, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл) галловой кислоты, по 5 мл водного раствора реактива Folin-Ciocalteu и перемешивали. Через 3–8 мин после добавления реактива Folin-Ciocalteu в каждую из пробирок добавляют по 4,0 мл 7,5 %-ного раствора карбоната натрия в каждую градуированную пробирку. Закрывали пробирки пробками и перемешивали.

Выдерживали растворы в течение 60 мин при комнатной температуре, затем с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность растворов относительно воды в кювете с длиной оптического пути 10 мм и при длине волны 765 нм. Строили градуировочный график.

Затем проводили аналогичные измерения для тестируемых напитков. Массовую долю полифенолов (%) в образцах рассчитывали по формуле:

$$W = \frac{(A_{sample} - A_{intercept}) \cdot V_{sample} \cdot d \cdot 100}{S_{std} \cdot m_{sample} \cdot 1000 \cdot W_{DM, sample}}, \quad (2.15)$$

где  $A_{sample}$  – оптическая плотность раствора;

$A_{intercept}$  – оптическая плотность, соответствующая точке пересечения калибровочной зависимости с осью  $y$ ;

$m_{sample}$  – масса пробы, г;

$S_{std}$  – тангенс угла наклона градуировочной прямой;

$V_{sample}$  – объем образца напитка, мл;

$d$  – коэффициент разбавления, используемый для колориметрического анализа (обычно 100);

$W_{DM, sample}$  – массовая доля сухого вещества в образце, %.

Витаминный состав (водорастворимые витамины – витамин С и витамины группы В) функциональных напитков оценивали методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105».

Метод капиллярного электрофореза основан на миграции и разделении ионных форм анализируемых компонентов под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности с последующей регистрацией спектрофотометрическим детектором при длинах волн 200 и 267 нм.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом. 25 мл напитка помещали в пробирку типа Эппендорф и центрифугировали в течение 5 мин при 5000–6000 об/мин, раствор над осадком отбирали в чистую пробирку типа Эппендорф. Далее осуществляли фильтрование образца через мембранный фильтр, отбрасывая первые 1–1,5 мл раствора.

Для проведения анализа промывали капилляр ведущим электролитом (0,05 М раствор тетрабората натрия, 0,2 М раствор борной кислоты) в течение 10–15 минут. Далее устанавливали на выходе в рабочее положение пробирку с таким же буферным раствором, а на входе – пробирку с пробой и производят ее ввод, регистрировали электрофореграмму. Предварительно получали электрофореграмму стандартного раствора витаминов и строили градуировочный график.

Условия разделения: фоновый электролит – боратный, рН 8,9; капилляр с параметрами: длина 50 мкм.

Витаминный состав (жирорастворимые витамины А, Е) функциональных напитков оценивали методом высокоэффективной газожидкостной хроматографии по ГОСТ 26573.1-93. Предварительно проводили омыление образцов. Для этого навеску функционального напитка массой 10 г помещали в круглодонную колбу объемом 250 мл. Далее добавляли 50 мл 10 %-ного водно-спиртового раствора КОН и 0,1 г

антиоксиданта (гидрохинона). Далее колбу подсоединяли к обратному холодильнику и выдерживали 30 минут при температуре 82–85 °С.

После окончания омыления колбу охлаждали под струёй воды до комнатной температуры, после чего проводили экстракцию гексаном. Для этого смесь тщательно перемешивали и количественно переносили в коническую колбу. Круглодонную колбу ополаскивали 50 мл дистиллированной воды, которую также сливали в коническую колбу. Далее в колбу добавляли 50 мл гексана, тщательно перемешивали, и оставляли на пару минут, до появления чёткой границы раздела фаз.

Верхнюю гексановую часть переносили в чистую, сухую круглодонную колбу. Экстракцию проводили ещё дважды порциями гексана по 50 мл. Объединенные вытяжки упаривали досуха на роторном испарителе при температуре 70 °С. После этого растворяли в подвижной фазе (1 мл изопропилового спирта + 1 мл ацетонитрила). Полученный образец помещали в вials, пропуская через фильтр, после чего проводили хроматографический анализ.

Время удержания витаминов определяли с помощью стандартных растворов. Для омыления стандартных образцов 0,25 мл раствора витамина А и 0,2 мл раствора витамина Е помещали в круглодонные колбы на 250 мл. Добавляли к ним 30 мл 10 %-ного водно-спиртового раствора КОН и 0,1 г антиоксиданта (гидрохинона). Далее колбы подсоединяли к обратному холодильнику и подогревали 30 минут на водяной бане, при температуре 85 °С.

#### Статистическая обработка результатов

Все результаты представлены в формате «среднее значение ± стандартная ошибка среднего», по крайней мере, для трех независимых измерений. Для двухгрупповых сравнений результаты анализировали с помощью двустороннего критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ . Многогрупповые анализы выполняли с помощью дисперсионного анализа ANOVA в программе Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2005, США).

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИСХОДНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПЕРСПЕКТИВ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

В данной главе представлены результаты оценки химического состава, в том числе содержания вторичных метаболитов, показателей качества и безопасности исходного растительного сырья, выбранного для исследований: левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной. Также глава содержит результаты изучения биологической активности (антимикробной, антиоксидантной) *in vitro* надземных и подземных частей исходных растений и оценки перспектив использования выбранного растительного сырья для извлечения вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности.

#### 3.1 Характеристика химического состава, показателей качества и безопасности исходного растительного сырья

Для растений, выбранных в качестве объектов исследования (левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*) – листья, корневище с корнями; женьшень обыкновенный (*Panax ginseng*) – листья, корень; элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*) – листья, корневище; пальчатокоренник пятнистый (*Dactylorhiza maculata*) – листья, клубни; диоскорея обыкновенная (*Dioscorea communis*) – листья, корень; сапожниковия растопыренная (*Saposhnikovia divaricata*) – стебель, корень), анализировали такие показатели качества, как влажность, зола общая, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте; и показатели безопасности: содержание тяжелых металлов (свинца, кадмия, ртути, мышьяка), радионуклидов (Cs-137,

Sr-90), остаточные количества пестицидов (гексахлорциклогексан и его изомеры, ДДТ и его метаболиты, альдрин, гептахлор), микробиологические показатели безопасности. Также для изучаемого растительного сырья определяли макро- и микроэлементный состав.

Результаты определения массовой доли влаги, золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в исходном растительном сырье приведены в таблице 3.1.1, результаты определения содержания тяжелых металлов, пестицидов и радионуклидов в объектах исследования отражены в таблице 3.1.2. Данные по микробиологическим показателям безопасности растительных объектов, выбранных для исследования, представлены в таблице 3.1.3.

Таблица 3.1.1 – Результаты определения массовой доли влаги, золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, в исходном растительном сырье

Растительное сырье	Массовая доля влаги, %	Массовая доля золы общей, %	Массовая доля золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, %
<i>R. carthamoides</i> , листья	12,33±0,74	7,48±0,52	0,77±0,07
<i>R. carthamoides</i> , корневище с корнями	11,76±0,94	7,82±0,55	0,86±0,05
<i>P. ginseng</i> , листья	11,62±0,70	4,72±0,33	0,83±0,04
<i>P. ginseng</i> , корень	10,44±0,94	3,15±0,19	0,75±0,06
<i>E. senticosus</i> , листья	12,55±0,75	6,89±0,34	0,53±0,03
<i>E. senticosus</i> , корневище	12,04±0,96	6,29±0,44	0,42±0,03
<i>D. maculata</i> , листья	11,62±0,58	7,88±0,55	0,85±0,05
<i>D. maculata</i> , клубни	12,33±0,62	8,15±0,49	0,98±0,06
<i>D. communis</i> , листья	9,80±0,49	7,04±0,42	0,83±0,05
<i>D. communis</i> , корень	9,54±0,57	6,12±0,43	0,73±0,04
<i>S. divaricata</i> , стебель	11,67±0,58	7,33±0,51	1,16±0,06
<i>S. divaricata</i> , корень	11,40±0,68	7,11±0,43	1,02±0,06



Согласно данным таблицы 3.1.1, массовая доля влаги во всех исследуемых образцах принимает значения в диапазоне от 9,54 до 12,55 %, массовая доля общей золы – от 3,15 до 8,15 %, массовая доля золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, – от 0,42 до 1,16 %. Максимальной влажностью характеризуются образцы листьев элеутерококка колючего (12,55 %), клубней пальчатокоренника пятнистого (12,33 %) и листьев левзеи сафлоровидной (12,33 %), минимальная влажность зафиксирована в образцах корней и листьев диоскореи обыкновенной (9,54 и 9,80 %, соответственно). Наибольшее значение массовой доли общей золы характерно для образцов клубней и листьев пальчатокоренника пятнистого (8,15 и 7,88 %, соответственно), минимальное – для образцов корней и листьев женьшеня обыкновенного (3,15 и 4,72 %, соответственно).

Кроме того, следует отметить, что имеются фармакопейные статьи на корни женьшеня настоящего (ФС.2.5.0013.15), на корневища и корни элеутерококка колючего (ФС.2.5.0053.15). Согласно ФС.2.5.0013.15, влажность измельченного порошка женьшеня не должна превышать 13 %, массовая доля золы – 5 %. Согласно ФС.2.5.0053.15, влажность измельченного порошка элеутерококка не должна превышать 14 %, массовая доля золы – 8 %. Исходя из данных таблицы 3.1.1, рассматриваемое сырье соответствует требованиям фармакопейных статей по данным показателям.

Учитывая, что выбранное растительное сырье после подбора рациональных параметров экстракции будет использовано для создания функциональных напитков, для него изучали показатели безопасности на соответствие требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», а также фармакопейных статей ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», ОФС.1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение

содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Согласно ТР ТС 021/2011, содержание свинца в растительном сырье не должно превышать 5,0 мг/кг, содержание мышьяка – 3,0 мг/кг, содержание кадмия – 1,0 мг/кг, содержание ртути – 1,0 мг/кг. В соответствии с ОФС.1.5.3.0009.15 данные значения составляют 6,0 мг/кг (свинец), 3,0 мг/кг (мышьяк), 1,0 мг/кг (кадмий), 1,0 мг/кг (ртуть). По требованиям ТР ТС 021/2011 удельная активность Cs-137 в растениях не должна превышать 80,0 Бк/кг, удельная активность Sr-90 – 40,0 Бк/кг. В соответствии с ОФС.1.5.3.0001.15 данные значения составляют 400,0 Бк/кг (Cs-137) и 200,0 Бк/кг (Sr-90). В соответствии с требованиями ТР ТС 021/2011 и ОФС.1.5.3.0011.15, содержание гексахлорциклогексана ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -изомеров) в растительном сырье не должно превышать 0,1 мг/кг, содержание дихлордифенил трихлорметилметана и его метаболитов – 0,1 мг/кг, содержание альдрина и гептахлора не допускается (<0,002 мг/кг). Результаты, представленные в таблице 3.1.2, свидетельствуют о том, что все изученные образцы растений по химическим показателям безопасности соответствуют требованиям ТР ТС 021/2011, ОФС.1.5.3.0009.15, ОФС.1.5.3.0001.15, ОФС.1.5.3.0011.15 и могут быть использованы для последующих исследований, посвященных подбору параметров экстракционного извлечения комплекса вторичных метаболитов.

По микробиологическим показателям безопасности образцы надземных и подземных частей рассматриваемых растений также подчиняются требованиям действующей нормативной документации – ТР ТС 021/2011 и ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» (таблица 3.1.3).

Таблица 3.1.2 – Содержание тяжелых металлов, пестицидов и радионуклидов в исходном растительном сырье

Растительное сырье	Содержание тяжелых металлов, мг/кг				Удельная активность радионуклидов, Бк/кг		Содержание пестицидов, мг/кг			
	свинец	кадмий	ртуть	мышьяк	Cs-137	Sr-90	ГХЦГ ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -изомеры)	ДДТ и его метаболиты	альдрииин	гептахлор
<i>R. carthamoides</i> , листья	0,94± 0,05	0,067± 0,004	н/о	н/о	1,0±0,1	0,7±0,1	0,023± 0,001	0,017± 0,001	н/о	н/о
<i>R. carthamoides</i> , корневище с корнями	0,78± 0,04	0,075± 0,004	н/о	0,125±0, 007	2,50±0,1	1,7±0,1	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>P. ginseng</i> , листья	1,01± 0,05	0,087± 0,005	н/о	н/о	1,2±0,1	0,9±0,1	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>P. ginseng</i> , корень	0,89± 0,05	0,093± 0,005	н/о	0,034±0, 002	1,1±0,1	0,6±0,1	0,016± 0,001	0,022± 0,001	н/о	н/о
<i>E. senticosus</i> , листья	0,47± 0,03	0,066± 0,004	н/о	0,105±0, 005	3,4±0,2	2,3±0,1	0,010± 0,001	0,015± 0,001	н/о	н/о
<i>E. senticosus</i> , корневище	0,69± 0,04	0,051± 0,003	н/о	н/о	4,2±0,2	1,8±0,1	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>D. maculata</i> , листья	0,22± 0,01	0,111± 0,005	н/о	н/о	3,7±0,2	2,5±0,1	0,024± 0,001	0,035± 0,002	н/о	н/о
<i>D. maculata</i> , клубни	0,37± 0,02	0,095± 0,005	н/о	0,046±0, 002	2,1±0,1	1,8±0,1	0,018± 0,001	0,028± 0,002	н/о	н/о
<i>D. communis</i> , листья	1,12± 0,06	0,044± 0,002	н/о	н/о	2,6±0,1	2,0±0,1	0,011± 0,001	0,024± 0,001	н/о	н/о
<i>D. communis</i> , корень	0,80± 0,04	0,048± 0,002	н/о	н/о	1,8±0,1	2,3±0,1	0,027± 0,001	0,017± 0,001	н/о	н/о
<i>S. divaricata</i> , стебель	0,86± 0,05	0,077± 0,004	н/о	н/о	1,4±0,1	1,9±0,1	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>S. divaricata</i> , корень	0,99± 0,05	0,062± 0,003	н/о	н/о	3,0±0,2	3,2±0,2	н/о	н/о	н/о	н/о

Таблица 3.1.3 – Микробиологические показатели безопасности исходного растительного сырья

Растительное сырье	Количество мезофильных аэробных микроорганизмов, КОЕ/г		Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, КОЕ/г		Бактерии группы кишечной палочки (БГКП), масса продукта, в которой не обнаружены		Дрожжи, КОЕ/г		Плесени, КОЕ/г	
	норма*	значение	норма	значение	норма	значение	норма	значение	норма	значение
<i>R. carthamoides</i> , листья	не более $5 \cdot 10^4$ / не более $10^5$	$2,1 \cdot 10^2$	не более $5 \cdot 10^4$ / не более $10^5$	$2,4 \cdot 10^2$	Отсутствие в 1 г / Отсутствие в 1 г	н/о** в 1 г	не более $10^4$	$8,5 \pm 0,4$	не более $10^4$	$15,0 \pm 0,8$
<i>R. carthamoides</i> , корневище с корнями		$1,6 \cdot 10^3$		$2,2 \cdot 10^3$		н/о в 1 г		$5,0 \pm 0,3$		$7,5 \pm 0,4$
<i>P. ginseng</i> , листья		$5,5 \cdot 10^2$		$1,7 \cdot 10^3$		н/о в 1 г		$10,0 \pm 0,5$		$9,0 \pm 0,5$
<i>P. ginseng</i> , корень		$2,8 \cdot 10^2$		$4,5 \cdot 10^2$		н/о в 1 г		$8,0 \pm 0,4$		$10,8 \pm 0,5$
<i>E. senticosus</i> , листья		$1,5 \cdot 10^3$		$3,6 \cdot 10^2$		н/о в 1 г		$6,4 \pm 0,3$		$13,0 \pm 0,7$
<i>E. senticosus</i> , корневище		$1,0 \cdot 10^2$		$1,6 \cdot 10^3$		н/о в 1 г		$7,7 \pm 0,4$		$12,6 \pm 0,6$
<i>D. maculata</i> , листья		$1,0 \cdot 10^3$		$3,3 \cdot 10^3$		н/о в 1 г		$12,5 \pm 0,6$		$15,0 \pm 0,8$
<i>D. maculata</i> , клубни		$2,0 \cdot 10^2$		$4,0 \cdot 10^2$		н/о в 1 г		$11,0 \pm 0,6$		$8,8 \pm 0,5$
<i>D. communis</i> , листья		$1,4 \cdot 10^3$		$1,2 \cdot 10^3$		н/о в 1 г		$7,0 \pm 0,4$		$11,4 \pm 0,6$
<i>D. communis</i> , корень		$5,4 \cdot 10^2$		$2,6 \cdot 10^2$		н/о в 1 г		$12,0 \pm 0,6$		$12,3 \pm 0,6$
<i>S. divaricata</i> , стебель		$3,7 \cdot 10^2$		$1,5 \cdot 10^2$		н/о в 1 г		$8,0 \pm 0,4$		$14,1 \pm 0,7$
<i>S. divaricata</i> , корень		$3,3 \cdot 10^2$		$1,9 \cdot 10^2$		н/о в 1 г		$10,0 \pm 0,5$		$9,7 \pm 0,5$

\* в числителе – в соответствии с требованиями ТР ТС 021/2011, в знаменателе – в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота»

\*\* н/о – не обнаружено

Данные по содержанию в растительном сырье макроэлементов (калия, кальция, магния, натрия) и микроэлементов (железо, алюминий, барий, цинк, марганец) отражены на рисунках 3.1.1–3.1.2.

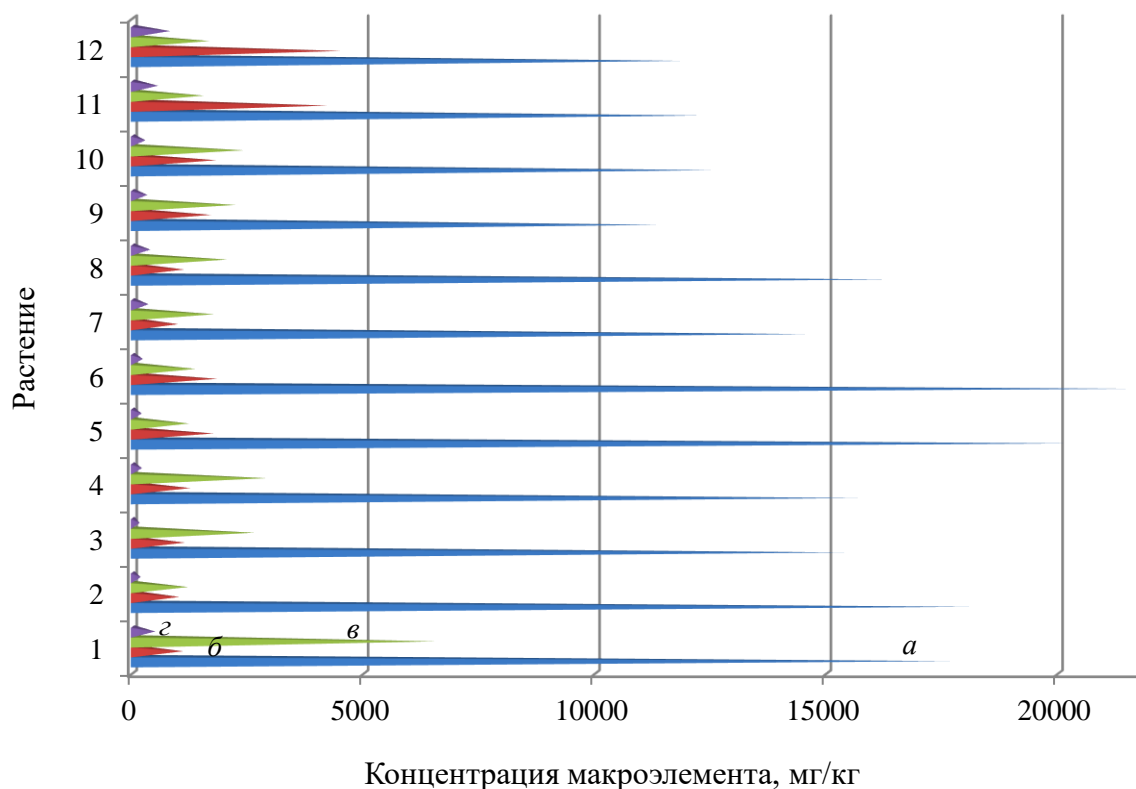


Рисунок 3.1.1 – Макроэлементный состав растений:

- 1 – *R. carthamoides*, листья; 2 – *R. carthamoides*, корневище с корнями;  
 3 – *P. ginseng*, листья; 4 – *P. ginseng*, корень; 5 – *E. senticosus*, листья;  
 6 – *E. senticosus*, корневище; 7 – *D. maculata*, листья; 8 – *D. maculata*, клубни;  
 9 – *D. communis*, листья; 10 – *D. communis*, корень;  
 11 – *S. divaricata*, стебель; 12 – *S. divaricata*, корень;  
 а – калий, б – кальций, в – магний, г – натрий

Как видно из рисунка 3.1.1, лидером по содержанию калия является элеутерококк колючий (21560,0 мг/кг в корневище и 20256,0 мг/кг в листьях). В других растительных объектах содержание калия варьируется от 11363,20 мг/кг (листья *Dioscorea communis*) до 18090,2 мг/кг (корневище с корнями *Rhaponticum carthamoides*). Максимальная концентрация кальция зафиксирована в сапожниковии растопыренной (4211,0 мг/кг в стебле и

4508,6 мг/кг в корнях). Больше всего магния (6548,2 мг/кг) накапливается в листьях левзеи сафлоровидной. В остальных изучаемых растениях данная величина принимает значения от 1200,20 мг/кг (корневище с корнями *R. carthamoides*) до 2900,0 мг/кг (корень *P. ginseng*). Содержание натрия в растениях колеблется в диапазоне от 155,6 мг/кг (листья *P. ginseng*) до 816,1 мг/кг (корень *S. divaricata*).

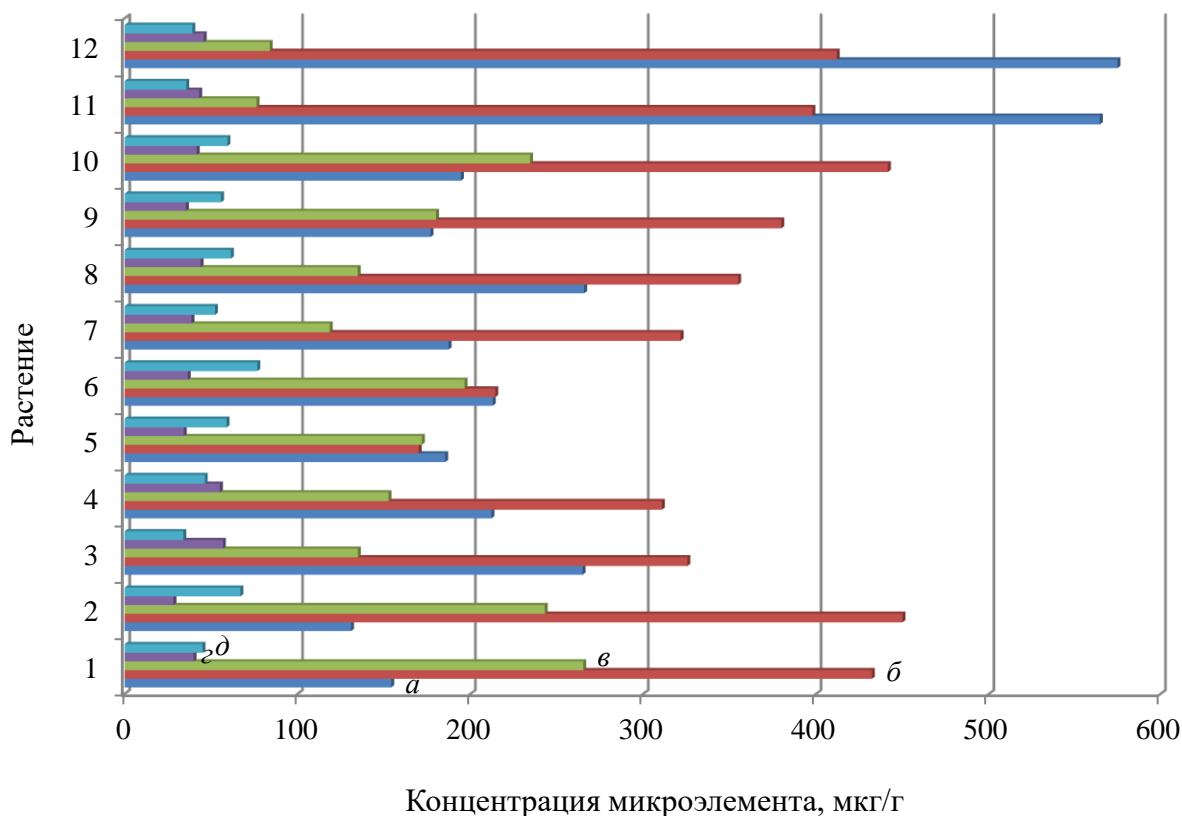


Рисунок 3.1.2 – Микроэлементный состав растений:

- 1 – *R. carthamoides*, листья; 2 – *R. carthamoides*, корневище с корнями;  
 3 – *P. ginseng*, листья; 4 – *P. ginseng*, корень; 5 – *E. senticosus*, листья;  
 6 – *E. senticosus*, корневище; 7 – *D. maculata*, листья; 8 – *D. maculata*, клубни;  
 9 – *D. communis*, листья; 10 – *D. communis*, корень;  
 11 – *S. divaricata*, стебель; 12 – *S. divaricata*, корень;  
 а – железо, б – алюминий, в – барий, г – цинк, д – марганец

Согласно рисунку 3.1.2, максимальным содержанием железа в растительном материале характеризуется сапожниковия растопыренная (564,7 мкг/г в стебле и 575,0 мкг/г в корне), а минимальным – левзея

сафлоровидная (154,3 мкг/г в листьях и 131,0 мкг/г в корневище с корнями). Концентрация алюминия принимает значения от 170,2 мкг/г (листья *Eleutherococcus senticosus*) до 450,10 мкг/г (корневище с корнями *R. carthamoides*). Концентрация бария принимает значения от 84,0 мкг/г (корень *S. divaricata*) до 265,4 мкг/г (листья *R. carthamoides*), концентрация цинка – от 28,3 мкг/г (корневище с корнями *R. carthamoides*) до 56,9 мкг/г (листья *P. ginseng*), концентрация марганца – от 34,0 мкг/г (листья *P. ginseng*) до 76,8 мкг/г (корневище *Eleutherococcus senticosus*).

### **3.2 Изучение состава биологически активных веществ в надземных и подземных частях исходных растений**

Как показывает анализ литературных данных, все изучаемые растения (леuzeя сафлоровидная, женьшень обыкновенный, элеутерококк колючий, пальчатокоренник пятнистый, диоскорея обыкновенная, сапожниковия растопыренная) характеризуются высоким содержанием биологически активных веществ, относящихся к разным группам химических соединений, в том числе полифенолов. В этой связи предварительно для растительного материала изучали суммарное содержание веществ разных групп: флавоноидов, дубильных веществ, кумаринов, хромонов, эфирных масел и других.

В таблице 3.2.1 представлены результаты определения суммарного содержания экстрактивных веществ, флавоноидов, фенольных кислот, фитостероидов, эфирных масел в усредненных пробах надземной и подземной частей левзеи сафлоровидной.

Далее проводили детальный анализ содержания веществ в корневище с корнями и листьях левзеи сафлоровидной методами тонкослойной (ТСХ) и

высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии. Результаты ТСХ для подземной части растения приведены на рисунке 3.2.1.

Таблица 3.2.1 – Суммарное содержание экстрактивных веществ, вторичных метаболитов в образцах левзеи сафлоровидной

Наименование группы веществ	Суммарное содержание группы веществ, %	
	Надземная часть	Подземная часть
Экстрактивные вещества	37,32±1,87	42,15±2,11
Флавоноиды	2,06±0,10	3,15±0,16
Фенольные кислоты	1,67±0,08	2,15±0,11
Фитостероиды	1,98±0,10	3,43±0,17
Эфирные масла	0,66±0,03	1,02±0,06

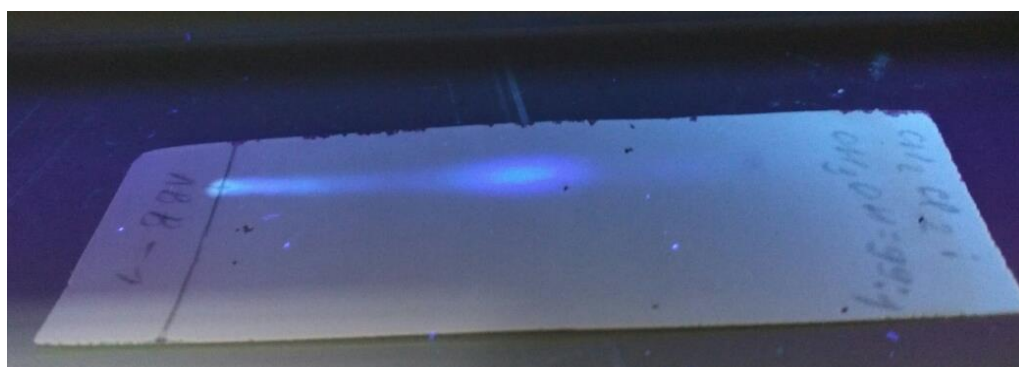


Рисунок 3.2.1 – Результаты анализа фракций экстрактов комплекса БАВ, содержащихся в корневище с корнями левзеи сафлоровидной, методом ТСХ

В образцах надземной и подземной частей левзеи сафлоровидной выявлено наличие фракций экидистероидов, флавоноидов и фенольных кислот, которые дополнительно разделяли методом препаративной ВЭЖХ с использованием хроматографа Shimadzu, скорость потока 10 мл/мин, градиент фазы А – Б 1% – 90 % за 15 мин, фаза А – 0,1 %-ная трифторуксусная кислота, Б – ацетонитрил. Каждую индивидуальную фракцию упаривали досуха, взвешивали, определяли выход, структуру соединений идентифицировали методом ЯМР-спектromетрии.



Результаты определения компонентного состава образцов листьев и корневища с корнями *Rhaponticum carthamoides* представлены в таблице 3.2.2.

Таблица 3.2.2 – Компонентный состав образцов листьев и корневища с корнями *Rhaponticum carthamoides*

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы	
	Корневище с корнями	Листья
Сумма экистероидов	57,45±2,87	45,18±2,26
В-ситостерин	0,25±0,01	0,09±0,01
Стигмастерин	0,28±0,01	0,08±0,01
Изофраксидин	1,22±0,06	0,98±0,05
20-гидроксиэкдизон	2,32±0,11	1,96±0,10
В-амирин	0,78±0,04	0,32±0,02
А-амирин	0,64±0,03	0,20±0,01
Рутин	112,56±5,64	85,42±4,27
Мангиферин	23,07±1,15	12,12±0,61
Кверцетин	121,09±6,05	88,00±4,41
Апигенин	345,67±17,28	276,31±13,82
Хлорогеновая кислота	44,52±2,23	34,01±1,71
Кофейная кислота	52,12±2,61	41,15±2,06
Феруловая кислота	12,31±0,62	9,89±0,49
Эллаговая кислота	7,87±0,39	5,45±0,27
Салициловая кислота	8,12±0,41	6,54±0,33

Методом ВЭЖХ в составе фракции экистероидов, выделенной из подземной части левзеи сафлоровидной, удалось извлечь пять соединений (рисунок 3.2.2), структура которых установлена методом ЯМР-спектromетрии (рисунки 3.2.3–3.2.7). Расшифровка и интерпретация ЯМР-спектров пяти экистероидов приведена в таблице 3.2.3.

Таким образом, в результате изучения химического состава левзеи сафлоровидной, произрастающей на территории Сибирского федерального округа, установлено, что корневище с корнями и листья данного растения богаты экидистероидами, флавоноидами апигенином, кверцетином, рутином, мангиферином, а также фенольными кислотами, такими как кофейная, хлорогеновая, феруловая, эллаговая и салициловая. Полученные результаты согласуются с литературными данными [208, 30, 31].

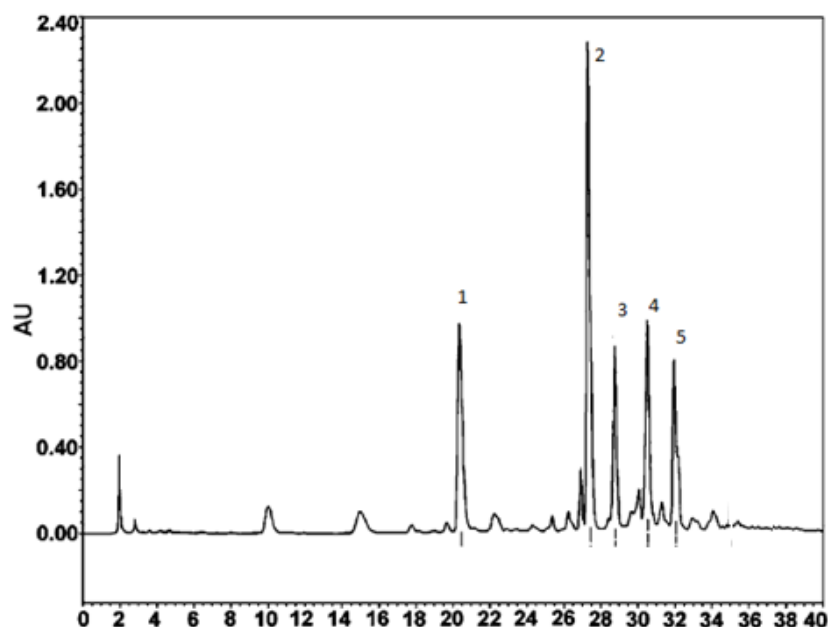
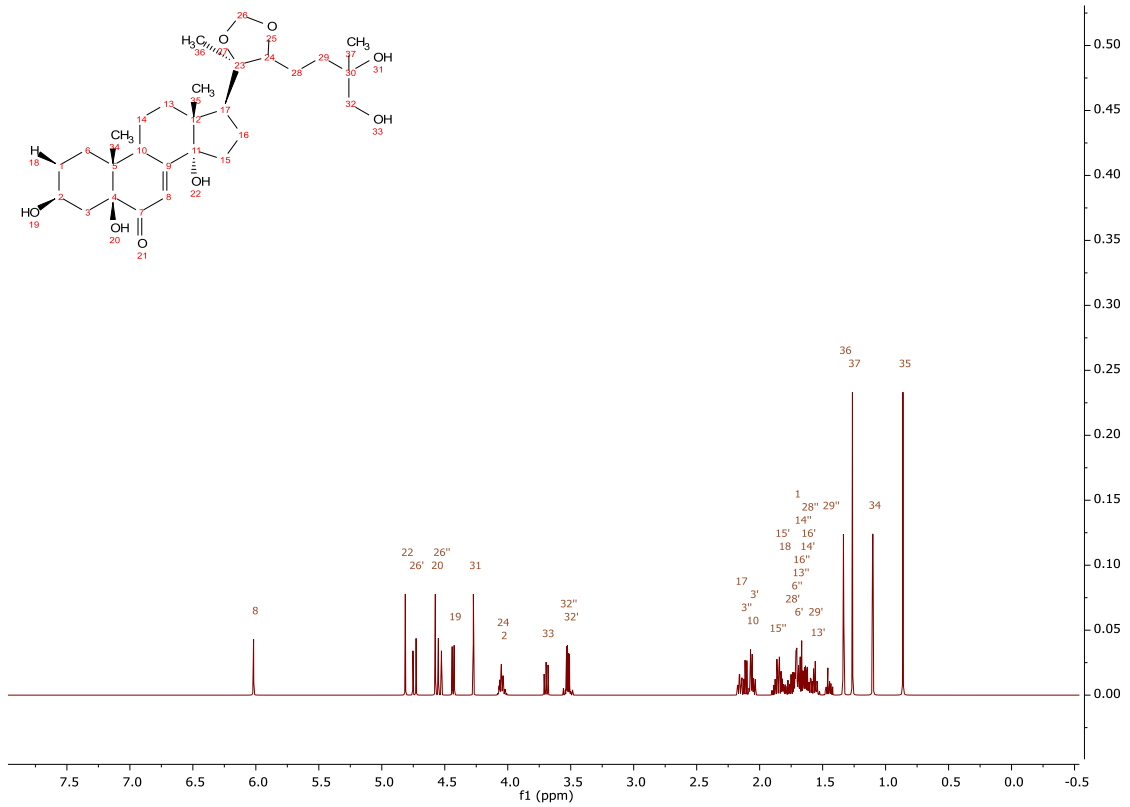
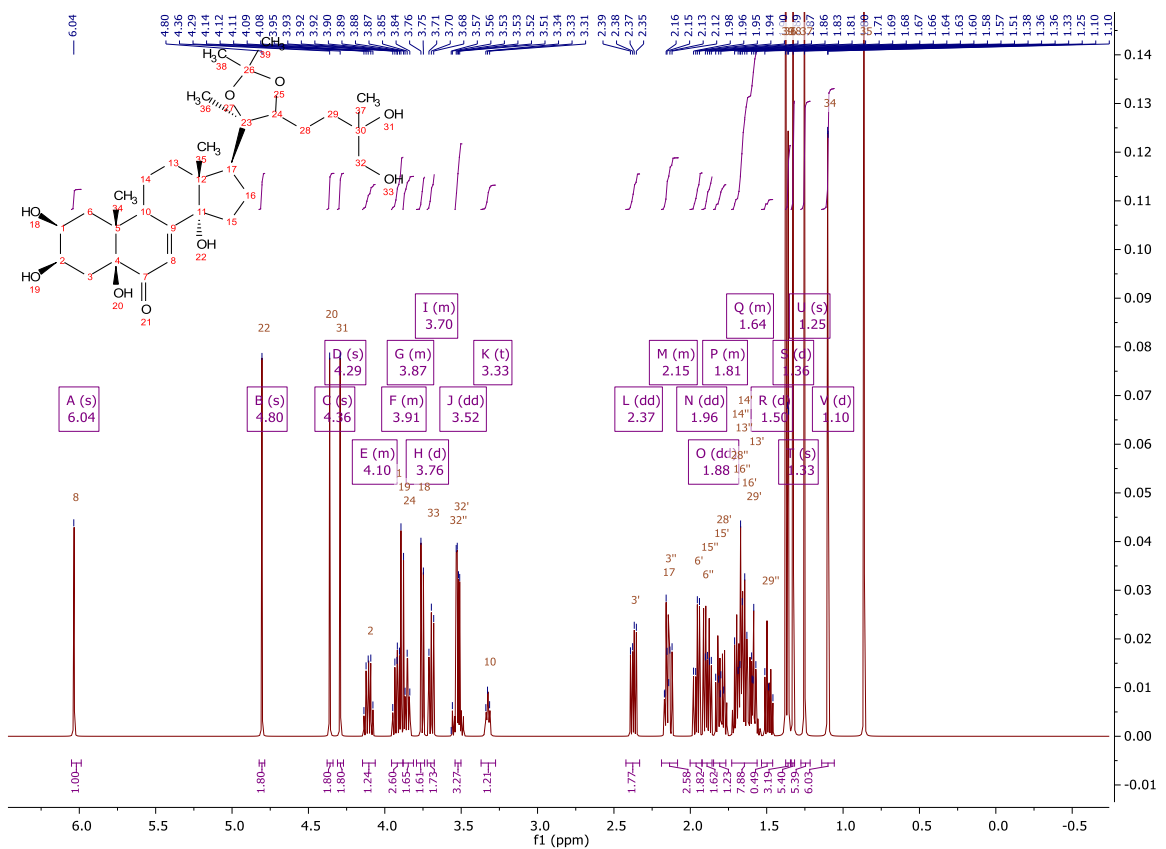


Рисунок 3.2.2 – Результаты препаративного ВЭЖХ-разделения фракции экидистероидов подземной части левзеи сафлоровидной: 1 – 2-деокси-5,20,26-тригидроксиэкидисон; 2 – 5,20,26-тригидроксиэкидисон 20,22-ацетонид; 3 – 2-деокси-5,20,26-тригидроксиэкидисон 20,22-ацетонид; 4 – 20,26-дигидроксиэкидисон 20,22-ацетонид; 5 – экидисон 20,22-ацетонид

Рисунок 3.2.3 – ЯМР  $^1\text{H}$  спектр 2-деокси-5,20,26-тригидроксиэксидонаРисунок 3.2.4 – ЯМР  $^1\text{H}$  спектр 5,20,26-тригидроксиэксидон 20,22-ацетонида

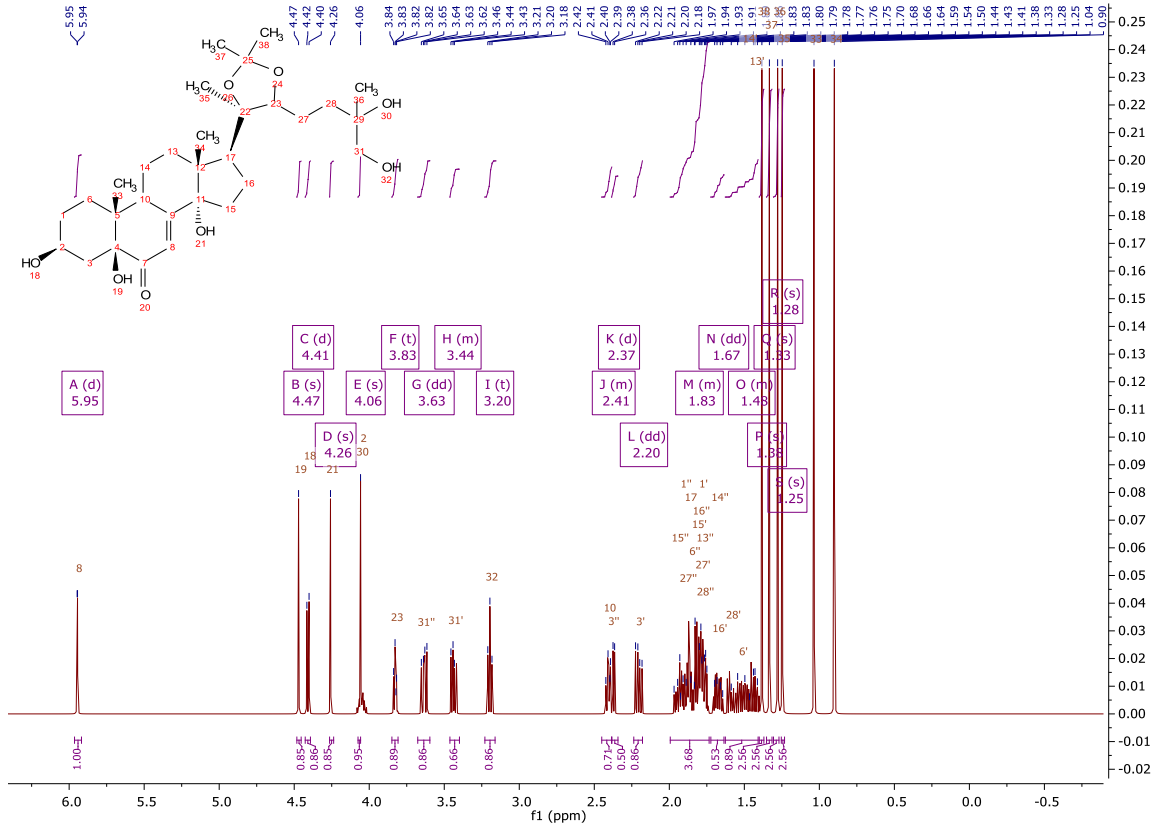


Рисунок 3.2.5 – ЯМР <sup>1</sup>H спектр 2-деокси-5,20,26-тригидроксиэктисон 20,22-ацетонида

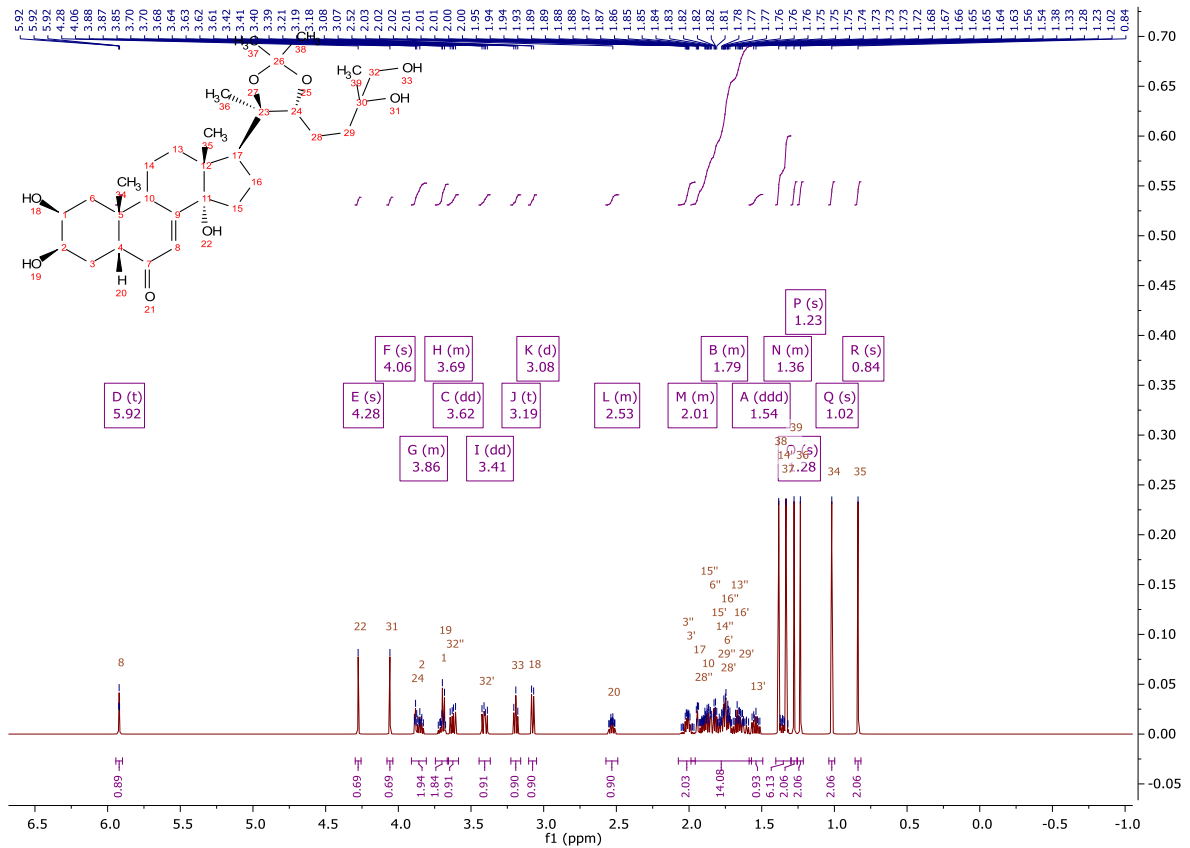


Рисунок 3.2.6 – ЯМР <sup>1</sup>H спектр 20,26-дигидроксиэктисон 20,22-ацетонида

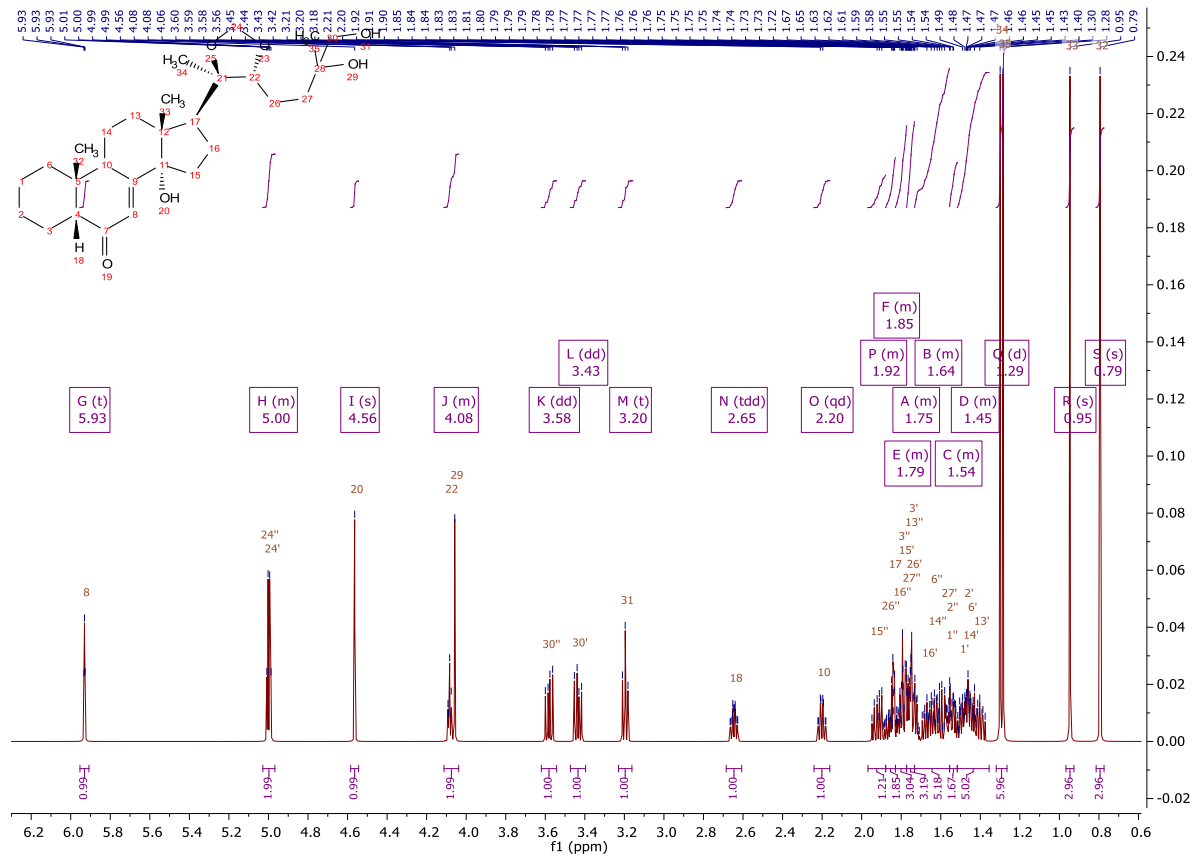
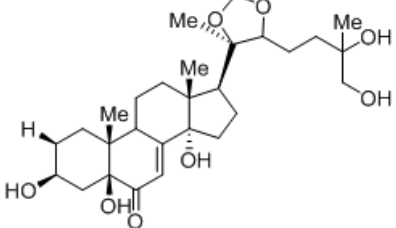
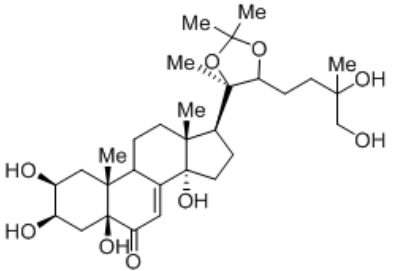
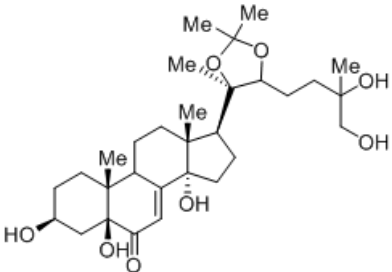
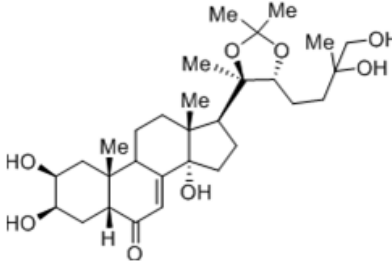
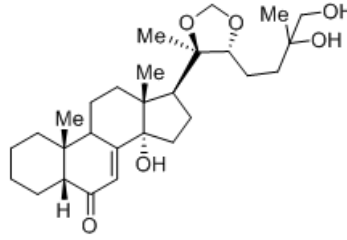


Рисунок 3.2.7 – ЯМР  $^1\text{H}$  спектр экидон 20,22-ацетонида

Результаты собственных исследований позволили сделать вывод о том, что концентрация вторичных метаболитов в корневище с корнями лезвев сафлоровидной превышает таковую в надземной части растения (листьях) в среднем на 30,1 %, что делает подземную часть лезвев перспективным сырьем для экстракционного извлечения вторичных метаболитов.

Таблица 3.2.3 – Расшифровка и интерпретация ЯМР-спектров пяти экистероидов, идентифицированных в подземной части левзеи сафроловидной

Наименование и структура экистероида	Расшифровка и интерпретация ЯМР-спектра
 <p>2-деокси-5,20,26-тригидроксиэкидсон</p>	<p>[<math>\alpha</math>] 25 D +41 (c 0.05 MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log<math>\epsilon</math>) 243 nm (4.02) nm; <sup>1</sup>HNMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) <math>\delta</math> 5.85 (1H, d, J) 2.2 Hz, H-7), 4.08 (1H, s, br, H-3R), 3.37 (2H, s, H-26a, H-26b), 3.34 (1H, m, H-22), 3.27 (1H, m, H-9R), 2.39 (1H, t, J) 8.8 Hz, H-17R), 1.19 (3H, s, H-21), 1.14 (3H, s, H-27), 0.90 (3H, s, H-18), 0.89 (3H, s, H-19); <sup>13</sup>CNMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) <math>\delta</math> 120.7 (CH, C-7), 85.2 (C, C-14), 81.0 (C, C-5), 78.7 (CH, C-22), 77.9 (C, C-20), 73.6 (C, C-25), 70.8 (CH<sub>2</sub>, C-26), 67.2 (CH, C-3), 50.5 (CH, C-17), 48.8 (C, C-13), 43.3 (C, C-10), 37.9 (CH, C-9), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C-24), 32.6 (CH, C-12), 25.3 (CH<sub>2</sub>, C-1), 23.6 (CH<sub>3</sub>, C-27), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C-21), 18.2 (CH<sub>3</sub>, C-18), 17.2 (CH<sub>3</sub>, C-19); ESIMS<math>m/z</math> 535 [M + K]<sup>+</sup> (100); HRESIMS<math>m/z</math> 497.3108 [M + H]<sup>+</sup> (calcdforC<sub>27</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>, 497.3102)</p>
 <p>5,20,26-тригидроксиэкидсон 20,22-ацетонид</p>	<p>[R]<sub>T</sub> 25 D +89 (c 0.05 MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\max}</math> (log <math>\epsilon</math>) 242 (3.76) nm; <sup>1</sup>HNMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) <math>\delta</math> 5.86 (1H, d, J) 2.8 Hz, H-7), 3.99 (1H, q, J) 3.0 Hz, H-3R), 3.95 (1H, ddd, J) 10.0, 7.4, 3.6 Hz, H-2R), 3.695 (1H, t, J) 6.0 Hz, H-22), 3.375 (1H, d, J) 11.0 Hz, H-26b), 3.355 (1H, d, J) 11.0 Hz, H-26a), 3.19 (1H, ddd, J) 11.3, 7.0, 2.7 Hz, H-9R), 2.31 (1H, dd, J) 9.4, 8.1 Hz, H-17R), 2.12 (1H, td, J) 13.1, 5.0 Hz, H-12R), 2.075 (1H, dd, J) 14.7, 3.0 Hz, H-4R), 2.03 (1H, m, H-16<sub>⊥</sub>), 1.96 (1H, dd, J) 12.4, 6.5 Hz, H-15<sub>⊥</sub>), 1.87 (1H, m, H-16R), 1.86 (1H, m, H-12<sub>⊥</sub>), 1.81 (1H, m, H-11b), 1.77 (1H, dd, J) 14.9, 3.0 Hz, H-4<sub>⊥</sub>), 1.74 (1H, m, H-11R), 1.73 (2H, m, H-1R, H-1<sub>⊥</sub>), 1.71 (1H, m, H-24b), 1.61 (1H, m, H-15R), 1.55 (1H, m, H-23b), 1.53 (1H, m, H-23a), 1.52 (1H, m, H-24a), 1.39 (3H, s, H-30), 1.32 (3H, s, H-29), 1.18 (3H, s, H-21), 1.15 (3H, s, H-27), 0.915 (3H, s, H-19<sub>⊥</sub>), 0.83 (3H, s, H-18<sub>⊥</sub>); <sup>13</sup>CNMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) <math>\delta</math> 202.5 (C, C-6), 167.4 (C, C-8), 120.7 (CH, C-7), 108.2 (C, C-28), 86.0 (C, C-20), 85.3 (C, C-14), 83.6 (CH, C-22), 80.4 (C, C-5), 73.6 (C, C-25), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-26), 70.4 (CH, C-3), 68.6 (CH, C-2), 50.5 (CH, C-17), 48.7 (C, C-13), 45.5 (C, C-10), 39.2 (CH, C-9), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C-24), 36.3 (CH<sub>2</sub>, C-4), 34.3 (CH<sub>2</sub>, C-1), 32.6 (CH<sub>2</sub>, C-12), 31.8 (CH<sub>2</sub>, C-15), 29.5 (CH<sub>3</sub>, C-30), 27.3 (CH<sub>3</sub>, C-29), 24.0 (CH<sub>2</sub>, C-23), 23.9 (CH<sub>3</sub>, C-27), 22.7 (CH<sub>3</sub>, C-21), 22.65 (CH<sub>2</sub>, C-11), 22.5 (CH<sub>2</sub>, C-16), 17.8 (CH<sub>3</sub>, C-18), 17.1 (CH<sub>3</sub>, C-19); ESIMS<math>m/z</math> 575 [M + Na]<sup>+</sup> (46), 553 [M + H]<sup>+</sup> (100), 537 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (5), 535 [M + H - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (2), 520 [M + H - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (2), 495 [M + H - acetone]<sup>+</sup> (59), 481 (1), 477 (3), 437 (3), 359 (3), 328 (14); HRESIMS<math>m/z</math> 553.3366 [M + H]<sup>+</sup> (calcdforC<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>9</sub>, 553.3363)</p>

 <p>2-деокси-5,20,26-тригидроксиэктисон 20,22-ацетонид</p>	<p>[R]<sub>2</sub>D<sub>25</sub> +25 (<i>c</i> 0.05 MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\text{max}}</math> (log <math>\epsilon</math>) 238 (4.08) nm; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) <math>\delta</math> 5.86 (1H, s, br, H-7), 4.08 (1H, s, br, H-3), 3.70 (1H, m, H-22), 3.37 (1H, d, <i>J</i>) 11.0 Hz, H-26b), 3.36 (1H, d, <i>J</i>) 11.0 Hz, H-26a), 3.28 (1H, m, H-9R), 2.32 (1H, t, <i>J</i>) 8.7 Hz, H-17R), 2.12 (1H, td, <i>J</i>) 12.4, 5.7 Hz, H-12R), 2.04 (1H, m, H-16), 2.035 (1H, m, H-4b), 1.97 (1H, m, H-15), 1.96 (1H, m, H-2b), 1.88 (1H, m, H-16R), 1.86 (1H, m, H-12), 1.84 (1H, m, H-1b), 1.77 (1H, m, H-2a), 1.73 (1H, m, H-11a), 1.72 (1H, m, H-24b) 1.61 (2H, m, H-4a, H-15R), 1.55 (2H, m, H-23a, H-23b), 1.53 (1H, m, H-24a), 1.50 (1H, m, H-1a), 1.39 (3H, s, H-30), 1.32 (3H, s, H-29), 1.18 (3H, s, H-21), 1.15 (3H, s, H-27), 0.89 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) <math>\delta</math> 167.9 (C, C-8), 120.7 (CH, C-7), 108.2 (C, C-28), 86.0 (C, C-20), 85.4 (C, C-14), 83.6 (CH, C-22), 81.2 (C, C-5), 73.6 (C, C-25), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-26), 67.2 (CH, C-3), 50.6 (CH, C-17), 48.7 (C, C-13), 43.25 (C, C-10), 38.1 (CH, C-9), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C-24), 36.9 (CH<sub>2</sub>, C-4), 32.6 (CH<sub>2</sub>, C-12), 31.8 (CH<sub>2</sub>, C-15), 29.5 (CH<sub>3</sub>, C-30), 29.3 (CH<sub>2</sub>, C-2), 27.3 (CH<sub>3</sub>, C-29), 25.6 (CH<sub>2</sub>, C-1), 24.05 (CH<sub>2</sub>, C-23), 23.8 (CH<sub>3</sub>, C-27), 22.7 (CH<sub>3</sub>, C-21), 22.5 (CH<sub>2</sub>, C-11), 22.5 (CH<sub>2</sub>, C-16), 17.8 (CH<sub>3</sub>, C-18), 17.3 (CH<sub>3</sub>, C-19); ESIMS <i>m/z</i> 559 [M + Na]<sup>+</sup> (100), 537 [M + H]<sup>+</sup> (36), 518 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (3), 541 [M + Na - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (12), 501 [M + H - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (2), 445 (10), 385 [M + H - H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>O<sub>3</sub>H<sub>14</sub>]<sup>+</sup> (3), 315 (12), 304 (24); HRESIMS <i>m/z</i> 537.3420 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>O<sub>8</sub>, 537.3414)</p>
 <p>20,26-дигидроксиэктисон 20,22-ацетонид</p>	<p>[R]<sub>2</sub>D<sub>25</sub> +145 (<i>c</i> 0.005 MeOH); UV (MeOH) <math>\lambda_{\text{max}}</math> (log <math>\epsilon</math>) 242 (4.01) nm; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) <math>\delta</math> 5.86 (1H, d, <i>J</i>) 2.6 Hz, H-7), 3.70 (1H, m, H-22), 3.38 (1H, d, <i>J</i>) 10.9 Hz, H-26b), 3.36 (1H, d, <i>J</i>) 11.0 Hz, H-26a), 2.42 (1H, dd, <i>J</i>) 12.6, 4.0 Hz, H-5), 2.33 (1H, dd, <i>J</i>) 9.2, 8.6 Hz, H-17R), 1.39 (3H, s, H-30), 1.32 (3H, s, H-29), 1.18 (3H, s, H-21), 1.15 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) <math>\delta</math> 121.8 (CH, C-7), 85.9 (C, C-20), 85.5 (C, C-14), 83.6 (CH, C-22), 73.2 (C, C-25), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-26), 50.5 (CH, C-17), 49.3 (C, C-13), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C-24), 32.55 (CH<sub>2</sub>, C-12), 29.4 (CH<sub>3</sub>, C-30), 27.3 (CH<sub>3</sub>, C-29), 24.4 (CH<sub>3</sub>, C-19), 23.7 (CH<sub>3</sub>, C-27), 22.7 (CH<sub>3</sub>, C-21), 17.8 (CH<sub>3</sub>, C-18); ESIMS <i>m/z</i> 575 [M + K]<sup>+</sup> (14), 560 [M + H + Na]<sup>+</sup> (6), 559 [M + Na]<sup>+</sup> (5), 542 (100), 521 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (23), 519 [M + H - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (2), 503 [M - CH<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (7), 501 [M + H - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (23), 478 [M - acetone]<sup>+</sup> (4), 445 (14), 413 (6), 314 (10), 304 (55); HRESIMS <i>m/z</i> 537.3418 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>, 537.3414)</p>
 <p>эктисон 20,22-ацетонид</p>	<p>UV (MeOH) <math>\lambda_{\text{max}}</math> (log <math>\epsilon</math>) 245 (6.01) nm; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) <math>\delta</math> 3.70 (1H, m, H-22), 3.38 (1H, d, <i>J</i>) 10.9 Hz, H-26b), 3.36 (1H, d, <i>J</i>) 11.0 Hz, H-26a), 2.42 (1H, dd, <i>J</i>) 12.6, 4.0 Hz, H-5), 2.33 (1H, dd, <i>J</i>) 9.2, 8.6 Hz, H-17R), 1.39 (3H, s, H-30), 1.32 (3H, s, H-29), 1.18 (3H, s, H-21), 1.15 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) <math>\delta</math> 121.8 (CH, C-7), 85.9 (C, C-20), 85.5 (C, C-14), 83.6 (CH, C-22), 73.2 (C, C-25), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-26), 50.5 (CH, C-17), 49.3 (C, C-13), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C-24), 32.55 (CH<sub>2</sub>, C-12), 29.4 (CH<sub>3</sub>, C-30), 27.3 (CH<sub>3</sub>, C-29), 24.4 (CH<sub>3</sub>, C-19), 23.7 (CH<sub>3</sub>, C-27), 22.7 (CH<sub>3</sub>, C-21), 17.8 (CH<sub>3</sub>, C-18); HRESIMS <i>m/z</i> 476.3278 [M + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>, 476.3138)</p>

Результаты количественного определения основных групп химических соединений в женьшене обыкновенном отражены в таблице 3.2.4.

Таблица 3.2.4 – Суммарное содержание вторичных метаболитов в образцах женьшеня обыкновенного

Наименование группы веществ	Суммарное содержание группы веществ, %	
	Надземная часть	Подземная часть
Экстрактивные вещества	44,06±2,21	47,11±2,36
Тритерпеновые сапонины	4,94±0,25	3,45±0,17
Флавоноиды	0,11±0,01	0,09±0,01
Фенольные кислоты	0,08±0,01	0,07±0,01
Эфирные масла	0,18±0,02	0,12±0,01
Полиацетилены	0,09±0,01	0,14±0,01
Полисахариды	27,89±1,37	31,21±1,62

С использованием методов ТСХ (рисунок 3.2.8) и ВЭЖХ проведен детальный химический анализ выявленных в образцах женьшеня фракций, результаты которого (таблица 3.2.5) показали, что доминирующими БАВ корней и листьев женьшеня являются гинзенозиды, относящиеся к группе тритерпеновых сапонинов. В частности, суммарное содержание гинзенозида LC<sub>1</sub>, гинзенозида RB<sub>1</sub> и панаксозида составляет 4,08 мг/г и 3,36 мг/г в корнях и листьях, соответственно. Также женьшень обыкновенный может рассматриваться в качестве перспективного источника флавоноидов: рутина, кверцетина, мангиферина, кемпферола. Содержатся в женьшене настоящем и фенольные кислоты, среди которых доминируют сиреневая (1,09 мг/г в корнях и 0,92 мг/г в листьях) и феруловая (0,92 мг/г в корнях и 0,77 мг/г в листьях) кислоты.



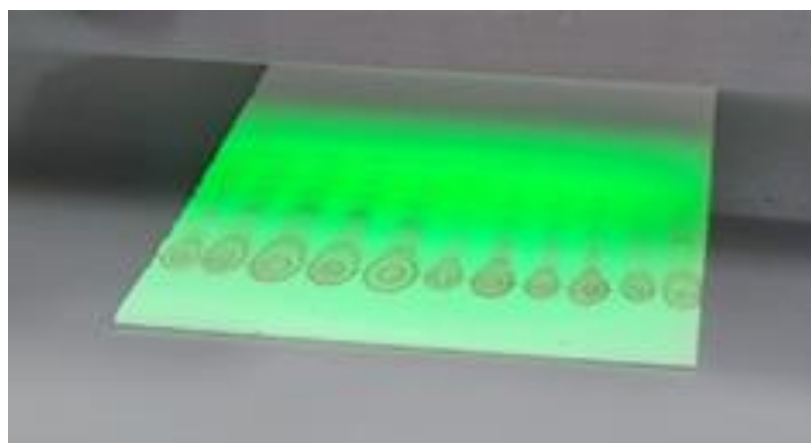


Рисунок 3.2.8 – Результаты анализа фракций экстрактов комплекса БАВ, содержащихся в корнях женьшеня настоящего, методом ТСХ

Таблица 3.2.5 – Компонентный состав образцов листьев и корней *Panax ginseng*

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы	
	Корни	Листья
Сиреневая кислота	1,09±0,06	0,92±0,05
Кофейная кислота	0,65±0,03	0,40±0,02
Синапиновая кислота	0,35±0,02	0,28±0,01
Салициловая кислота	0,21±0,01	0,14±0,01
Ванилиновая кислота	0,51±0,03	0,33±0,02
<i>n</i> -кумаровая кислота	0,34±0,02	0,27±0,02
Феруловая кислота	0,92±0,05	0,77±0,04
Гинзенозид LC <sub>1</sub>	0,58±0,03	0,36±0,02
Панаксен	0,77±0,04	0,50±0,03
Гинзенозид RB <sub>1</sub>	3,15±0,16	2,79±0,14
Панаксозид	0,35±0,02	0,21±0,01
Гомизин А	0,89±0,04	0,68±0,03
Гомизин В	1,12±0,05	0,80±0,04
Экдизон	0,80±0,04	0,54±0,03

## Окончание таблицы 3.2.5

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы	
	Корни	Листья
Рутин	1,22±0,06	0,90±0,05
Кверцетин	1,54±0,08	1,18±0,06
Мангиферин	0,40±0,02	0,26±0,02
Кемпферол	0,76±0,04	0,40±0,02

Как видно из таблицы 3.2.5, рассматриваемые БАВ накапливаются преимущественно в корнях растения. Полученные результаты по составу БАВ в женьшене обыкновенном не противоречат данным, полученным другими авторами [318, 317, 422].

Согласно данным таблицы 3.2.6, корневище и листья элеутерококка колючего накапливают преимущественно такие группы БАВ, как флавоноиды, фенилпропаноиды, терпеноиды, лигнаны.

Таблица 3.2.6 – Суммарное содержание экстрактивных веществ, флавоноидов, фенилпропаноидов, терпеноидов, лигнанов в образцах элеутерококка колючего

Наименование группы веществ	Суммарное содержание группы веществ, %	
	Надземная часть	Подземная часть
Экстрактивные вещества	32,40±1,62	38,65±1,94
Флавоноиды	0,50±0,03	0,84±0,04
Фенилпропаноиды	2,34±0,12	3,12±0,16
Терпеноиды	2,02±0,10	2,78±0,14
Лигнаны	0,87±0,04	1,45±0,07

С использованием методов ТСХ (рисунок 3.2.9) и ВЭЖХ проведен детальный химический анализ выявленных в образцах *Eleutherococcus senticosus* фракций, в результате которого (таблица 3.2.7) установлено, что

основными вторичными метаболитами растения являются 2-ацетил-3-гидроксифуран-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, 1,6-Бис(3,4,5-тригидроксифенил)-1,6-гександион, 7,9':7'9'-диэпокси-8,8'-лигнан-3,3',4,4',5,5'-гексанол, эритрогваяцилглицерол- $\beta$ -кониферилловый альдегидный эфир, 1,3-пропандиол-2-О-4'-синапиловый эфир, элеутерозид, рутин, гиперозид, кверцитрин, кофейная, олеаноловая, феруловая, урсоловая и *n*-кумаровая кислоты.

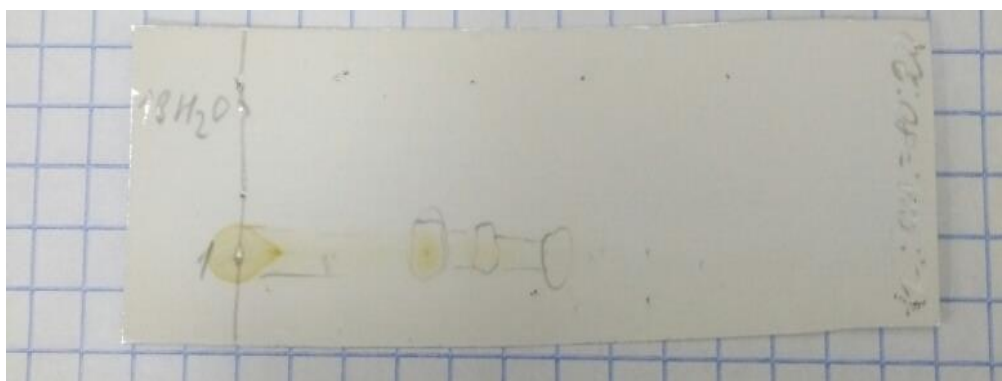


Рисунок 3.2.9 – Результаты анализа фракций экстрактов комплекса БАВ, содержащихся в корневище элеутерококка колючего, методом ТСХ

Таблица 3.2.7 – Компонентный состав образцов листьев и корневища *Eleutherococcus senticosus*

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы	
	Корневище	Листья
2-ацетил-3-гидроксифуран-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозид	0,66 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,02
1,6-Бис(3,4,5-тригидро-ксифенил)-1,6-гександион	0,54 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01
7,9':7'9'-диэпокси-8,8'-лигнан-3,3',4,4',5,5'-гексанол	0,78 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,02
Эритро-гваяцилглицерол- $\beta$ -кониферилловый альдегидный эфир	0,84 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,03
1,3-пропандиол-2-О-4'-синапиловый эфир	1,02 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,03
Сумма элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В (сирингин)	3,72 $\pm$ 0,19	3,15 $\pm$ 0,16
Изофраксидин	0,23 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01
Сесамин	0,21 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01
Рутин	1,22 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,05

## Окончание таблицы 3.2.7

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы	
	Корневище	Листья
Гиперозид	1,60±0,08	1,17±0,05
Кверцитрин	0,95±0,05	0,63±0,03
Кофейная кислота	4,62±0,23	3,87±0,19
п-кумаровая кислота	0,54±0,03	0,47±0,03
Феруловая кислота	0,79±0,04	0,45±0,02
Олеаноловая кислота	1,12±0,06	0,78±0,04
Урсоловая кислота	0,55±0,03	0,38±0,02

Для элеутерококка колючего отмечена тенденция преимущественного накопления биологически активных веществ в подземной части по сравнению с надземной. Данные по химическому составу растения не противоречат литературным данным [50, 316, 395].

В таблице 3.2.8 представлены результаты определения суммарного содержания экстрактивных веществ, флавоноидов, фенольных кислот в усредненных пробах надземной и подземной частей пальчатокоренника пятнистого.

Таблица 3.2.8 – Суммарное содержание вторичных метаболитов в образцах пальчатокоренника пятнистого

Наименование группы веществ	Суммарное содержание группы веществ, %	
	Надземная часть	Подземная часть
Экстрактивные вещества	37,89±1,89	45,63±2,28
Флавоноиды	3,20±0,16	5,14±0,26
Фенольные кислоты	1,09±0,05	1,76±0,09
Алкалоиды	1,45±0,07	1,03±0,05
Сапонины	2,09±0,10	1,76±0,09
Танины	2,33±0,12	2,08±0,10



В соответствии с таблицей 3.2.9, к основным вторичным метаболитам пальчатокоренника пятнистого относятся такие флавоноиды, как рутин (4,45–6,76 мг/г), кверцетин (3,55–4,09 мг/г), кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозид (2,78–3,12 мг/г), апигенин (1,95–2,78 мг/г), колеофолит (0,98–1,14 мг/г). Также в заметных количествах отмечено накопление γ-ситостерола (2,21–2,47 мг/г), сиреневой (1,11–1,66 мг/г) и галловой (0,84–1,02 мг/г) кислот. Полученные результаты коррелируют с литературными данными [38, 7]. Метаболизм *Dactylorhiza maculata* характеризуется преимущественным накоплением вторичных метаболитов в подземных частях (клубнях) растения.

Далее изучали суммарное содержание экстрактивных веществ, флавоноидов, фенольных кислот, фенантронов и стероидных сапонинов в образцах надземной и подземной частей диоскореи обыкновенной (таблица 3.2.10).

Таблица 3.2.10 – Суммарное содержание вторичных метаболитов в образцах диоскореи обыкновенной

Наименование группы веществ	Суммарное содержание группы веществ, %	
	Надземная часть	Подземная часть
Экстрактивные вещества	41,76±2,09	46,80±2,34
Флавоноиды	2,62±0,13	3,56±0,18
Фенольные кислоты	0,71±0,04	1,09±0,05
Фенантроны	2,84±0,14	3,14±0,16
Стероидные сапонины	2,11±0,11	2,78±0,14

С использованием методов ТСХ (рисунок 3.2.11) и ВЭЖХ проведен детальный химический анализ выявленных в образцах *Dioscorea communis* фракций, в результате которого (таблица 3.2.11) установлено, что в процессе метаболизма растения в нем накапливаются апигенин-гликозид, спиростенон

А, спиростенол Б, диосцин, диосгенин, рутин, кверцетин, кофейная, розмариновая, хлорогеновая, сиреневая кислоты, лузиантридин, орхинол.



Рисунок 3.2.11 – Результаты анализа фракций экстрактов комплекса БАВ, содержащихся в корнях диоскореи обыкновенной, методом ТСХ

Таблица 3.2.11 – Компонентный состав образцов листьев и корней *Dioscorea communis*

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы	
	Корни	Листья
Апигенин-гликозид	1,80±0,09	0,90±0,05
Рутин	1,94±0,10	1,32±0,07
Кверцетин	2,08±0,10	1,50±0,08
Спиростенол А	2,13±0,10	1,44±0,07
Спиростенол Б	1,56±0,08	0,95±0,05
Диосцин	2,18±0,11	1,44±0,07
Диосгенин	1,54±0,08	0,99±0,05
Лузиантридин	0,75±0,04	0,42±0,02
Орхинол	0,51±0,03	0,28±0,02
Кофейная кислота	0,76±0,04	0,31±0,02
Розмариновая кислота	0,99±0,05	0,70±0,04
Хлорогеновая кислота	0,65±0,03	0,52±0,03
Сиреневая кислота	0,83±0,04	0,49±0,03

Полученные результаты определения компонентного состава БАВ в корнях и листьях диоскореи обыкновенной не противоречат данным литературных источников [319, 320, 410, 112, 193]. Максимальные концентрации биологически активных веществ зафиксированы преимущественно в корнях растения по сравнению с листьями (таблица 3.2.11).

Еще одним растением, выбранным для исследования, является сапожниковия растопыренная, богатая флавоноидами, дубильными веществами, хромоном, кумаринами и полисахаридами. Результаты определения суммарного содержания экстрактивных веществ, флавоноидов, дубильных веществ, хромонов, кумаринов и полисахаридов в усредненных пробах надземной и подземной частей сапожниковии растопыренной приведены в таблице 3.2.12.

Таблица 3.2.12 – Суммарное содержание экстрактивных веществ, флавоноидов, дубильных веществ, хромонов, кумаринов и полисахаридов в усредненных пробах надземной и подземной частей сапожниковии растопыренной

Наименование группы веществ	Суммарное содержание группы веществ, %	
	Надземная часть	Подземная часть
Экстрактивные вещества	48,56±2,43	44,12±2,21
Флавоноиды	3,05±0,15	0,45±0,02
Дубильные вещества	5,34±0,27	0,51±0,03
Хромоны	1,34±0,07	4,18±0,21
Кумарины	0,83±0,04	2,66±0,13
Эфирные масла	0,56±0,03	0,42±0,02
Полисахариды	0,77±0,04	0,96±0,05



Согласно таблице 3.2.12, флавоноиды и дубильные вещества накапливаются преимущественно в стебле растения, в корнях содержание данных БАВ ниже в 6,8–10,5 раз (в зависимости от группы БАВ) по сравнению с надземной частью *Saposhnikovia divaricata*. В то же время концентрация кумаринов, хромонов и полисахаридов выше в корнях по сравнению со стеблем растения в 1,2–3,2 раза.

Подробный химический анализ выявленных в образцах *Saposhnikovia divaricata* фракций с использованием методов ТСХ (рисунок 3.2.12) и ВЭЖХ показал, что доминирующими действующими веществами сапожниковии растопыренной являются хромоны цимифугин (1,12–1,75 мг/г), гамаудол (2,05–2,33 мг/г), перв-*O*-глюкозилцимифугин (3,65–5,14 мг/г), 4'-*O*- $\beta$ -D-глюкозил-5-*O*-метилвисамминол (2,24–3,08 мг/г), флавон вогонин (0,44–0,87 мг/г), кумарины фраксидин (0,78–1,32 мг/г), изофраксидин (0,90–1,46 мг/г), скополетин (0,76–1,11 мг/г), умбеллиферон (1,23–2,02 мг/г), бергаптен (2,10–2,49 мг/г), мармезин (0,75–0,95 мг/г), флавоноиды астрагалин (1,18–1,44 мг/г), монохаетин (0,96–1,58 мг/г), кверцетин-3,7-дигликозид (1,22–2,04 мг/г) (таблица 3.2.13).

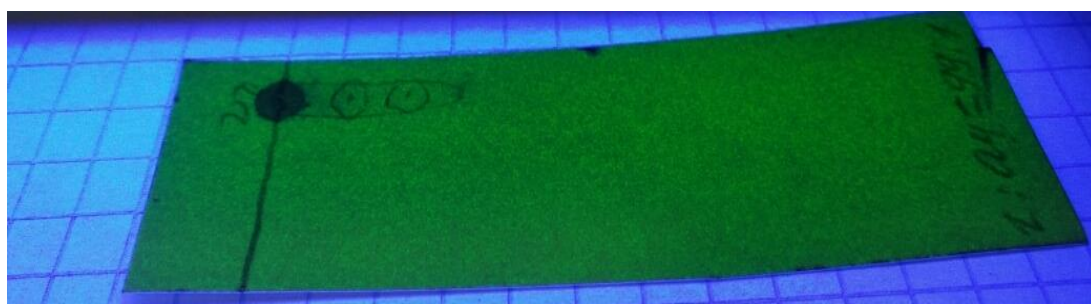


Рисунок 3.2.12 – Результаты анализа фракций экстрактов комплекса БАВ, содержащихся в стебле сапожниковии растопыренной, методом ТСХ

Таблица 3.2.13 – Компонентный состав образцов стебля и корней *Saposhnikovia divaricata*

Наименование вещества	Содержание вещества, мг/г сухой массы
-----------------------	---------------------------------------

	Корень	Стебель
Цимифугин	1,75±0,09	1,12±0,05
Гамаудол	2,33±0,12	2,05±0,10
Перв- <i>O</i> - глюкозилцимифугин	5,14±0,26	3,65±0,18
4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -глюкозил-5- <i>O</i> - метилвисамминол	3,08±0,15	2,24±0,11
Вогонин	0,87±0,04	0,44±0,02
Фраксидин	1,32±0,07	0,78±0,04
Изофраксидин	1,46±0,07	0,90±0,05
Скополетин	1,11±0,06	0,76±0,04
Бергаптен	2,49±0,12	2,10±0,10
Мармезин	0,95±0,05	0,75±0,04
Умбеллиферон	2,02±0,10	1,23±0,06
Астрагалин	1,18±0,06	1,44±0,07
Монохаетин	0,96±0,05	1,58±0,08
Кверцетин-3,7-дигликозид	1,22±0,06	2,04±0,10

Полученные результаты согласуются с литературными данными [390, 261,256], в частности согласно требованиям Фармакопеи Китайской Народной Республики суммарное содержание хромонов цимифугина, перв-*O*-глюкозилцимифугина и 4'-*O*-β-*D*-глюкозил-5-*O*-метилвисамминола должно быть не менее 0,24 %.

### 3.3 Изучение биологической активности (антимикробной, антиоксидантной) *in vitro* надземных и подземных частей исходных растений

Из литературных источников известно, что биологически активные вещества, содержащиеся в растениях, обладают широким спектром физиологической активности: антимикробной и антиоксидантной. Так, показан иммуномодулирующий, антимикробный и антимикотический эффект кофейной кислоты, а также её способность к поглощению супероксидного радикала, образующегося в ходе автоокисления адреналина *in vitro* [33]. Кофейная кислота при пероральном применении ингибирует рост и выживаемость линий опухолевых клеток у кроликов [449], обладает гепатопротекторным действием у крыс [351], наряду с феруловой кислотой оказывает кардиопротекторный эффект, увеличивая время жизни у крыс с аритмией [41]. В исследованиях [264] кофейная кислота дозозависимо подавляет бактериальные активности *E. coli* и *P. aeruginosa* как в интактных клетках, так и в цитозольных экстрактах желудочно-кишечного тракта человека.

Рутин, относящийся к классу флавоноидов, обладает широким спектром биологической активности, в основе которой находятся ярко выраженные антиоксидантные свойства [124, 81, 286]. В разных модельных системах *in vitro* рутин проявляет антирадикальную активность, сравнимую или превосходящую активность таких природных антиоксидантов, как витамины Е и С [466]. В то же время в исследованиях *in vivo* в условиях окислительного стресса разной этиологии было обнаружено, что антиоксидантная активность рутина связана не только с его антирадикальными свойствами, но и со способностью активировать антиоксидантные ферменты [224, 222, 81, 84].

Продуцируемый многими растениями флавоноид кверцетин относится к полифенольным соединениям и является вторичным метаболитом. Способность кверцетина захватывать пероксинитриты и гидроксильные радикалы, обладающие высокой реакционной способностью, является доказательством протекторного свойства [218, 183]. Кверцетин – это один из самых мощных антиоксидантов среди полифенолов [185, 344]. Также были продемонстрированы его противовирусные, антибактериальные, противораковые и противовоспалительные эффекты [184, 219]. Антиканцерогенные свойства кверцетина проявляются за счет его значительного воздействия на увеличение апоптоза в мутантных клетках, ингибирование синтеза ДНК, ингибирование роста раковых клеток, снижение и модификацию сотовой сигнальной трансдукции [165].

Мангиферин обладает высокой биологической активностью, и это подтверждают современные зарубежные исследования. Выявлена иммунопротекторная [292], радиопротекторная [249, 248], антиоксидантная [376] активность. Мангиферин обладает протекторной функцией при индуцированном инфаркте миокарда, восстанавливая антиоксидантные свойства ферментов сердечной ткани. Отмечено высокоэффективное действие мангиферина в предотвращении сердечно-сосудистых дисфункций благодаря антиоксидантным и кардиотоническим свойствам [248].

Свойства хлорогеновой кислоты интенсивно изучаются последние несколько лет, благодаря обнаружению широкого спектра биологической активности. В литературе описаны антиоксидантные свойства хлорогеновой кислоты [36, 29]. Хлорогеновая кислота проявляет способность ингибировать рост опухолей [86], оказывает ингибирующий эффект на колоректальный рак, рак печени, рак гортани [438, 215, 72], способствует предотвращению сахарного диабета 2-го типа [125], обладает антигипертензивным [75], противовирусным [250], антибактериальным и противогрибковым действием [133]. При этом данное соединение обладает относительно низкой токсичностью и отсутствием побочных эффектов.

Известно, что, как и многие вторичные метаболиты природного происхождения (флавоноиды, антоцианы и др.), резвератрол проявляет ярко выраженное антиоксидантное действие [302, 303]. Это объясняется молекулярной структурой резвератрола [116]. Доказана более высокая антиоксидантная активность транс-изомера резвератрола, по сравнению с цис-изомером [80,] и транс-резвератрола, по сравнению с другими транс-стильбенами [152].

На основании вышеизложенного интерес представляет изучение *in vitro* биологической (антимикробной и антиоксидантной) активности растительных объектов (надземной и подземной частей), выбранных для исследования: левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной.

Предварительно получали экстракты надземной и подземной частей растений с использованием разных растворителей, параметры экстракции приведены в таблице 3.3.1.

Антимикробные (антибактериальные и фунгицидные) свойства экстрактов оценивали диско-диффузионным методом в соответствии с требованиями МУК 4.2.1890-04. Экстракты предварительно упаривали до массовой доли сухих веществ 60–65 %.

В качестве тестовых микроорганизмов выбрали бактерии: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus viridans*; и микроскопические грибы: *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Penicillium citrinum*.

Результаты определения антимикробных свойств растительных экстрактов приведены в таблице 3.3.2.

Таблица 3.3.1 – Параметры получения экстрактов надземной и подземной частей растений для изучения биологической активности

Обозначение образца	Экстрагент	Гидромодуль	Температура экстракции, °С
Левзея сафлоровидная <i>R. carthamoides</i> (листья)			
R <sub>c</sub> -1	этанол 70 %	1:20	50
R <sub>c</sub> -2	этилацетат	1:10	40
R <sub>c</sub> -3	изопропанол	1:15	40
Левзея сафлоровидная <i>R. carthamoides</i> (корневище с корнями)			
R <sub>c</sub> -4	этанол 70 %	1:20	50
R <sub>c</sub> -5	этилацетат	1:10	40
R <sub>c</sub> -6	изопропанол	1:15	40
Женьшень обыкновенный <i>P. ginseng</i> (листья)			
P <sub>g</sub> -1	этанол 70 %	1:20	50
P <sub>g</sub> -2	этилацетат	1:10	40
P <sub>g</sub> -3	изопропанол	1:15	40
Женьшень обыкновенный <i>P. ginseng</i> (корень)			
P <sub>g</sub> -4	этанол 70 %	1:20	50
P <sub>g</sub> -5	этилацетат	1:10	40
P <sub>g</sub> -6	изопропанол	1:15	40
Элеутерококк колючий <i>E. senticosus</i> (листья)			
E <sub>s</sub> -1	этанол 70 %	1:20	50
E <sub>s</sub> -2	этилацетат	1:10	40
E <sub>s</sub> -3	изопропанол	1:15	40
Элеутерококк колючий <i>E. senticosus</i> (корневище)			
E <sub>s</sub> -4	этанол 70 %	1:20	50
E <sub>s</sub> -5	этилацетат	1:10	40
E <sub>s</sub> -6	изопропанол	1:15	40

## Окончание таблицы 3.3.1

Пальчатокоренник пятнистый <i>D. maculata</i> (листья)			
D <sub>m</sub> -1	этанол 70 %	1:20	50
D <sub>m</sub> -2	этилацетат	1:10	40
D <sub>m</sub> -3	изопропанол	1:15	40
Пальчатокоренник пятнистый <i>D. maculata</i> (клубни)			
D <sub>m</sub> -4	этанол 70 %	1:20	50
D <sub>m</sub> -5	этилацетат	1:10	40
D <sub>m</sub> -6	изопропанол	1:15	40
Диоскорея обыкновенная <i>D. communis</i> (листья)			
D <sub>c</sub> -1	этанол 70 %	1:20	50
D <sub>c</sub> -2	этилацетат	1:10	40
D <sub>c</sub> -3	изопропанол	1:15	40
Диоскорея обыкновенная <i>D. communis</i> (корень)			
D <sub>c</sub> -4	этанол 70 %	1:20	50
D <sub>c</sub> -5	этилацетат	1:10	40
D <sub>c</sub> -6	изопропанол	1:15	40
Сапожниковия растопыренная <i>S. divaricata</i> (стебель)			
S <sub>d</sub> -1	этанол 70 %	1:20	50
S <sub>d</sub> -2	этилацетат	1:10	40
S <sub>d</sub> -3	изопропанол	1:15	40
Сапожниковия растопыренная <i>S. divaricata</i> (корень)			
S <sub>d</sub> -4	этанол 70 %	1:20	50
S <sub>d</sub> -5	этилацетат	1:10	40
S <sub>d</sub> -6	изопропанол	1:15	40

Таблица 3.3.2 – Антимикробные свойства растительных экстрактов

Образец экстракта	Диаметр зоны лизиса тест-штаммов, мм								
	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. viridans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>	<i>P. citrinum</i>
R <sub>c</sub> -1	8,10±0,39	8,00±0,39	8,20±0,42	8,30±0,44	8,20±0,42	8,60±0,43	8,50±0,42	8,30±0,43	8,50±0,42
R <sub>c</sub> -2	8,40±0,38	8,10±0,38	8,30±0,43	8,50±0,42	8,10±0,40	8,60±0,42	8,60±0,42	8,40±0,39	8,30±0,43
R <sub>c</sub> -3	8,30±0,42	8,10±0,40	8,30±0,42	8,40±0,43	8,00±0,39	8,50±0,39	8,60±0,41	8,30±0,42	8,40±0,38
R <sub>c</sub> -4	10,10±0,46	9,80±0,49	9,90±0,49	10,20±0,48	9,70±0,49	10,30±0,52	10,30±0,51	10,10±0,45	10,10±0,44
R <sub>c</sub> -5	10,80±0,55	10,40±0,48	10,60±0,51	10,80±0,56	10,50±0,51	11,00±0,56	10,90±0,55	10,80±0,56	10,90±0,54
R <sub>c</sub> -6	9,60±0,48	10,40±0,49	10,60±0,50	11,00±0,57	9,90±0,50	9,70±0,49	10,50±0,50	10,40±0,47	10,80±0,55
P <sub>g</sub> -1	6,80±0,34	6,80±0,33	7,10±0,34	6,90±0,35	6,70±0,33	7,10±0,35	7,10±0,34	6,80±0,32	7,00±0,35
P <sub>g</sub> -2	6,70±0,32	6,60±0,33	7,00±0,35	6,80±0,33	6,60±0,31	7,10±0,34	7,30±0,37	6,80±0,32	6,90±0,34
P <sub>g</sub> -3	6,90±0,35	6,80±0,33	7,10±0,35	7,00±0,34	6,70±0,32	7,20±0,36	7,20±0,36	6,80±0,33	7,00±0,35
P <sub>g</sub> -4	8,70±0,44	8,60±0,41	8,90±0,43	8,80±0,43	8,60±0,40	9,10±0,46	9,30±0,45	8,60±0,42	8,90±0,43
P <sub>g</sub> -5	8,00±0,41	7,90±0,39	8,30±0,40	8,20±0,38	7,90±0,36	8,40±0,42	8,50±0,43	8,00±0,40	8,10±0,37
P <sub>g</sub> -6	8,40±0,41	8,30±0,40	8,60±0,41	8,50±0,42	8,20±0,41	8,70±0,44	8,90±0,45	8,30±0,30	8,50±0,43
E <sub>s</sub> -1	6,60±0,33	6,50±0,31	6,90±0,34	6,60±0,33	6,50±0,31	7,00±0,35	7,10±0,36	6,60±0,32	6,80±0,34
E <sub>s</sub> -2	7,00±0,35	6,90±0,35	7,20±0,37	7,10±0,35	6,80±0,30	7,30±0,35	7,40±0,37	6,90±0,34	7,20±0,38
E <sub>s</sub> -3	7,10±0,34	7,00±0,35	7,30±0,39	7,20±0,37	6,90±0,32	7,40±0,38	7,40±0,37	7,00±0,35	7,20±0,36
E <sub>s</sub> -4	10,20±0,52	10,40±0,53	10,60±0,55	10,20±0,51	10,50±0,54	10,80±0,55	10,40±0,53	10,70±0,55	10,30±0,52
E <sub>s</sub> -5	10,50±0,53	10,70±0,56	10,80±0,56	10,50±0,53	10,70±0,55	10,90±0,56	10,60±0,54	10,90±0,57	10,50±0,54
E <sub>s</sub> -6	9,30±0,47	9,40±0,47	9,60±0,48	9,10±0,46	9,50±0,48	9,80±0,49	9,20±0,47	9,60±0,48	9,20±0,46
D <sub>m</sub> -1	8,50±0,43	8,70±0,44	8,90±0,45	8,50±0,43	8,70±0,44	9,20±0,46	8,60±0,43	9,00±0,45	8,50±0,42



## Окончание таблицы 3.3.2

Образец экстракта	Диаметр зоны лизиса тест-штаммов, мм								
	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. viridans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>	<i>P. citrinum</i>
D <sub>m</sub> -2	8,20±0,41	8,50±0,43	8,60±0,43	8,10±0,39	8,40±0,42	9,00±0,45	8,30±0,41	8,80±0,44	8,30±0,41
D <sub>m</sub> -3	8,70±0,44	9,20±0,45	9,10±0,45	8,60±0,43	9,00±0,45	9,30±0,47	8,90±0,44	9,10±0,45	8,90±0,43
D <sub>m</sub> -4	9,90±0,50	9,90±0,49	10,20±0,51	9,80±0,49	10,40±0,52	9,90±0,51	9,80±0,48	10,30±0,52	10,10±0,49
D <sub>m</sub> -5	10,10±0,50	10,30±0,51	10,40±0,52	10,10±0,50	10,40±0,52	10,10±0,49	10,00±0,50	10,40±0,52	10,30±0,51
D <sub>m</sub> -6	9,10±0,45	9,30±0,47	9,40±0,48	9,00±0,36	9,70±0,46	9,20±0,46	9,10±0,45	9,60±0,51	9,40±0,48
D <sub>c</sub> -1	7,60±0,38	7,80±0,39	7,90±0,41	7,70±0,38	7,70±0,37	7,90±0,40	7,90±0,41	7,90±0,40	8,10±0,41
D <sub>c</sub> -2	7,30±0,36	7,40±0,37	7,60±0,38	7,50±0,36	7,30±0,35	7,50±0,35	7,80±0,40	7,50±0,37	7,70±0,37
D <sub>c</sub> -3	7,00±0,35	7,30±0,36	7,40±0,37	7,20±0,34	7,00±0,35	7,30±0,36	7,30±0,35	7,30±0,36	7,50±0,38
D <sub>c</sub> -4	9,80±0,49	10,20±0,51	10,10±0,50	10,0±0,50	9,80±0,48	10,20±0,50	10,20±0,51	10,10±0,51	10,30±0,52
D <sub>c</sub> -5	9,70±0,46	10,00±0,50	9,90±0,49	9,80±0,48	9,70±0,47	9,90±0,49	10,00±0,50	9,90±0,50	10,00±0,50
D <sub>c</sub> -6	10,00±0,50	10,30±0,52	10,30±0,52	10,10±0,51	10,10±0,51	10,20±0,51	10,40±0,53	10,30±0,52	10,40±0,53
S <sub>d</sub> -1	11,20±0,56	11,00±0,55	11,20±0,56	11,50±0,57	11,60±0,57	11,50±0,56	11,00±0,54	11,30±0,56	11,10±0,55
S <sub>d</sub> -2	11,00±0,55	11,00±0,55	11,20±0,56	11,30±0,56	11,40±0,57	11,30±0,55	11,00±0,55	11,10±0,55	11,20±0,54
S <sub>d</sub> -3	11,80±0,59	12,80±0,63	12,40±0,62	11,90±0,60	12,20±0,61	12,90±0,65	12,50±0,63	11,90±0,60	12,40±0,62
S <sub>d</sub> -4	6,60±0,33	6,60±0,33	6,70±0,34	6,60±0,33	6,70±0,34	6,80±0,34	6,50±0,33	6,80±0,34	6,80±0,34
S <sub>d</sub> -5	6,70±0,34	6,60±0,33	6,70±0,34	6,50±0,34	6,60±0,33	6,80±0,34	6,60±0,33	6,80±0,35	6,60±0,33
S <sub>d</sub> -6	6,40±0,32	6,50±0,35	6,30±0,34	6,20±0,31	6,40±0,32	6,30±0,32	6,50±0,35	6,20±0,31	6,40±0,32
Ванкомицин	14,80±0,74	15,40±0,77	15,00±0,75	14,70±0,74	14,90±0,75	15,60±0,78	15,70±0,79	15,20±0,73	15,10±0,76
Ампициллин	14,50±0,73	13,80±0,69	13,70±0,68	14,70±0,75	13,90±0,70	14,00±0,71	14,20±0,71	13,80±0,69	13,70±0,66

Согласно данным, представленным в таблице 3.3.2, все тестируемые экстракты проявляют антимикробную активность по отношению к видам условно-патогенных бактерий *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *L. mesenteroides*, *B. cereus*, *S. viridans* и микроскопических грибов *C. albicans*, *M. canis*, *P. citrinum*. В целом, для экстрактов левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого и диоскореи обыкновенной выявлена закономерность: наибольшей антагонистической активностью характеризуются их экстракты, полученные из подземных частей растений (корни, корневище, клубни) по сравнению с экстрактами надземных (листья и стебли) частей. Для сапожниковии растопыренной, напротив, максимальные антимикробные свойства зафиксированы в случае экстрактов надземной части. Максимальной ингибирующей активностью по отношению к рассматриваемым тест-штаммам характеризуются этанольные, этилацетатные и изопропанольные экстракты, полученные из стебля *Saposhnikovia divaricata* (диаметр зоны лизиса составляет 11,00–12,90 мм), а минимальной – аналогичные экстракты, полученные из корня этого растения (диаметр зоны лизиса 6,20–6,80 мм).

Для определения антиоксидантной активности экстрактов использовали спектрофотометрический метод, основанный на измерении их способности улавливать радикал ABTS (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоной кислоты). Для всех изучаемых экстрактов строили зависимость «содержание экстракта в реакционной смеси – процент улавливания радикала ABTS» (рисунки 3.3.1–3.3.6), по которой определяли полумаксимальные эффективные концентрации экстрактов (EC<sub>50</sub>). Чем меньше EC<sub>50</sub> экстракта, тем более высокими антиоксидантными свойствами он обладает. Результаты определения полумаксимальной эффективной концентрации экстрактов приведены в таблице 3.3.3.

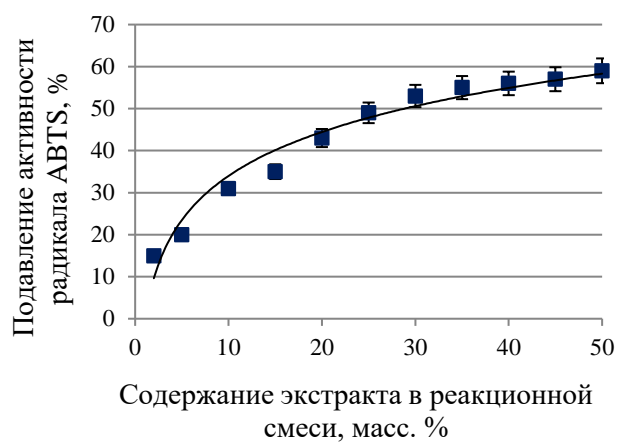
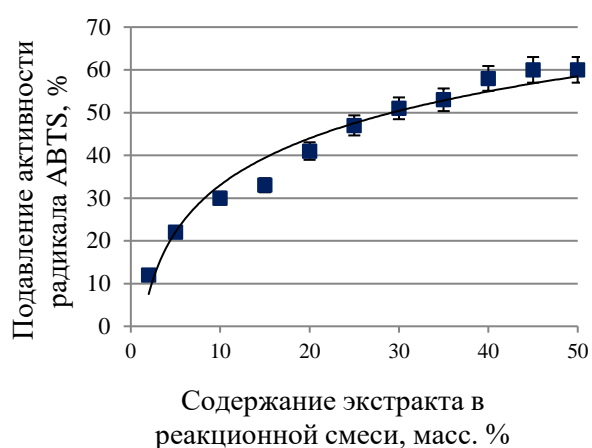
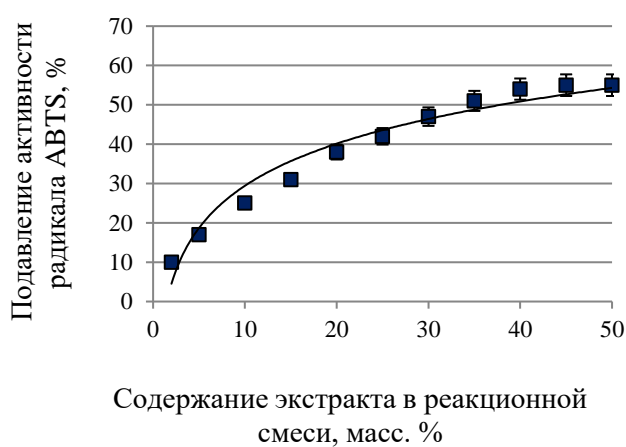
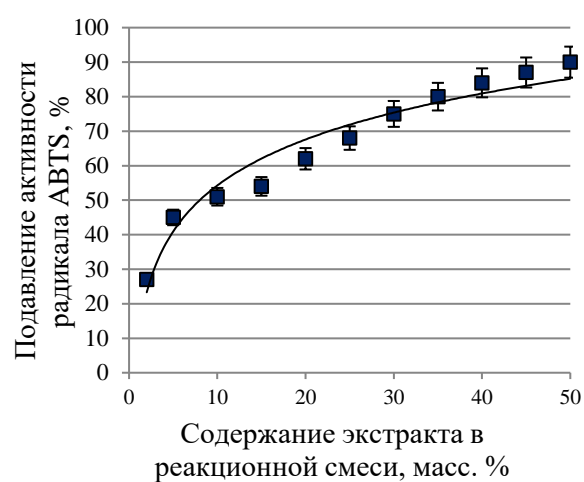
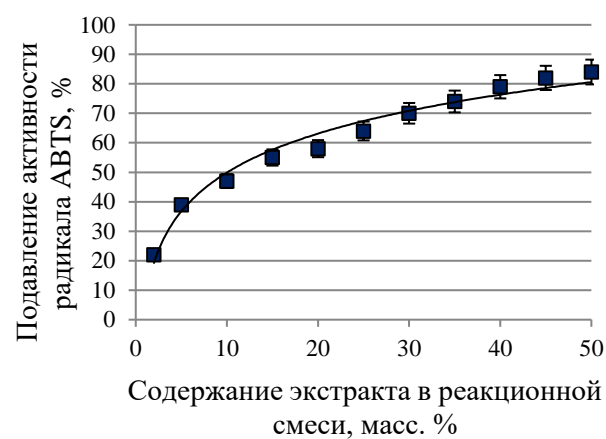
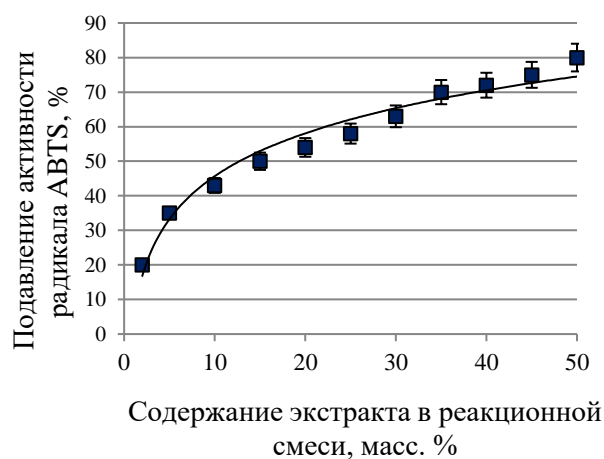
R<sub>c</sub>-1R<sub>c</sub>-2R<sub>c</sub>-3R<sub>c</sub>-4R<sub>c</sub>-5R<sub>c</sub>-6

Рисунок 3.3.1 – Антиоксидантная активность образцов экстрактов левзеи сафлоровидной (*R. Carthamoides*)

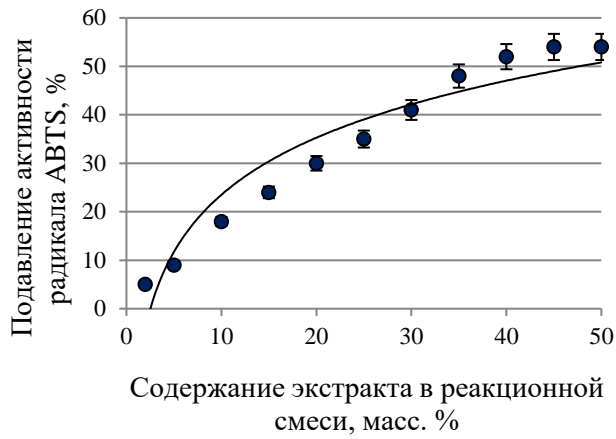
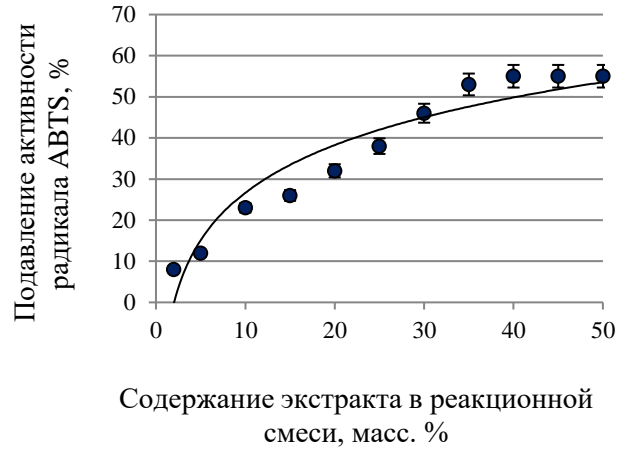
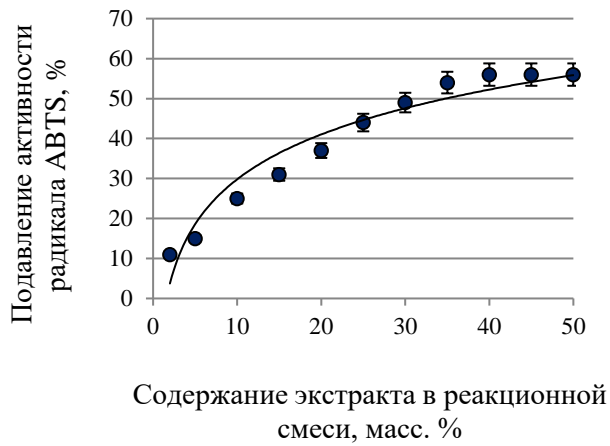
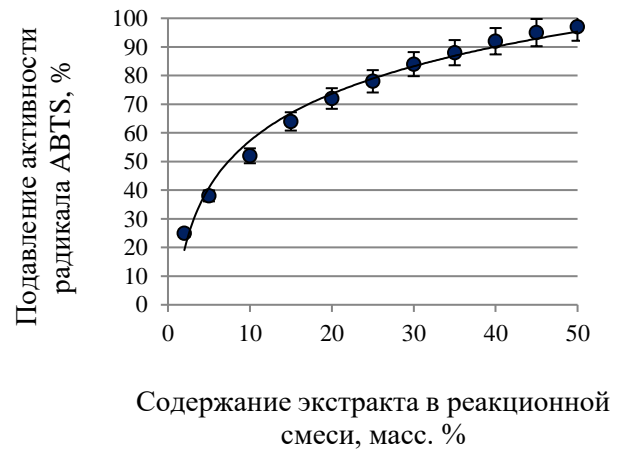
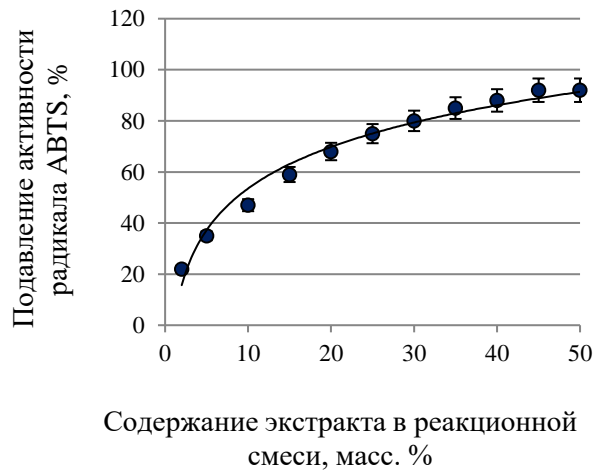
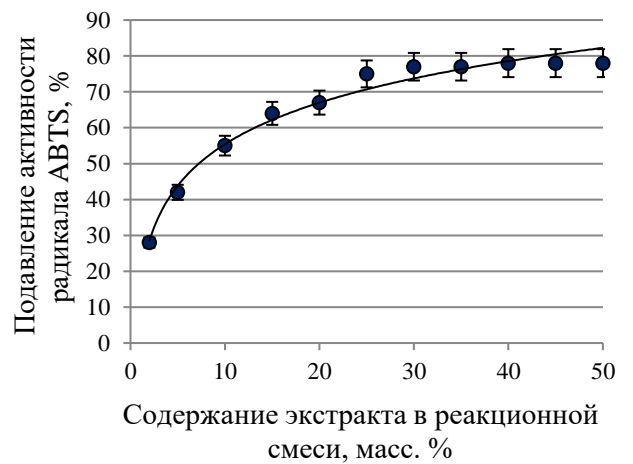
P<sub>g</sub>-1P<sub>g</sub>-2P<sub>g</sub>-3P<sub>g</sub>-4P<sub>g</sub>-5P<sub>g</sub>-6

Рисунок 3.3.2 – Антиоксидантная активность образцов экстрактов женьшеня обыкновенного (*P. Ginseng*)

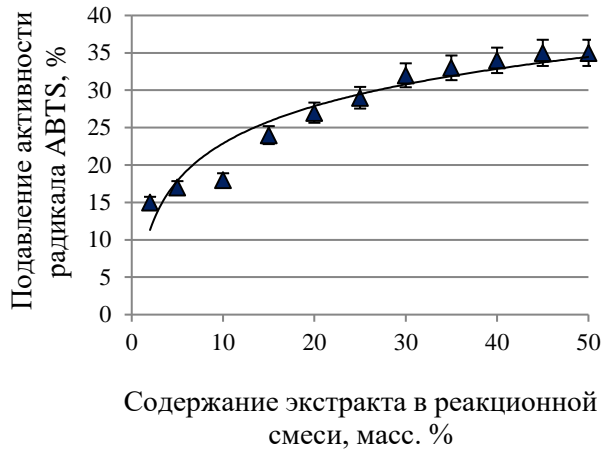
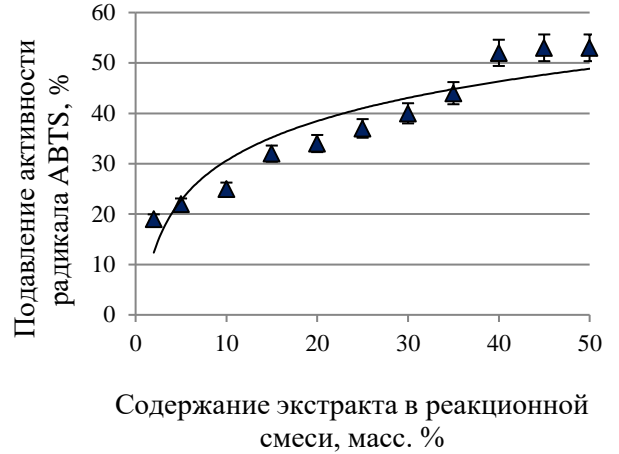
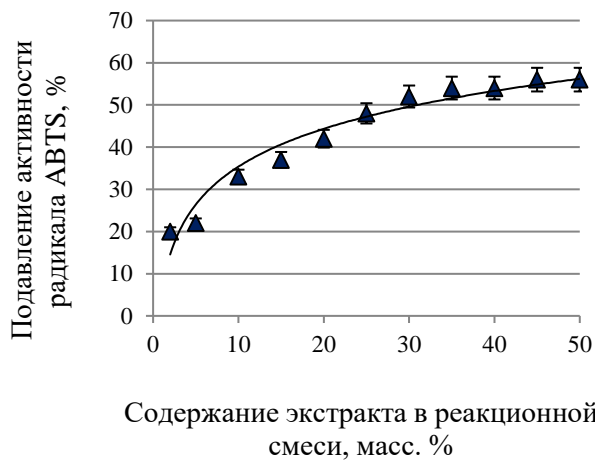
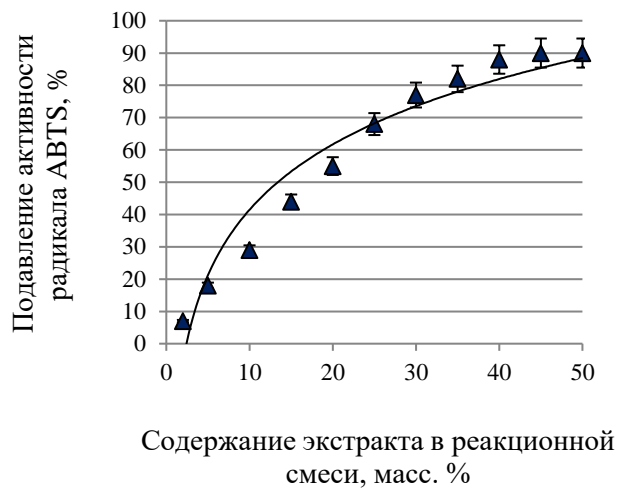
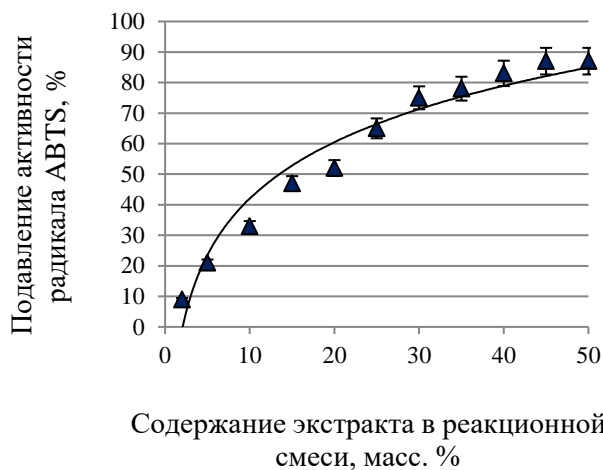
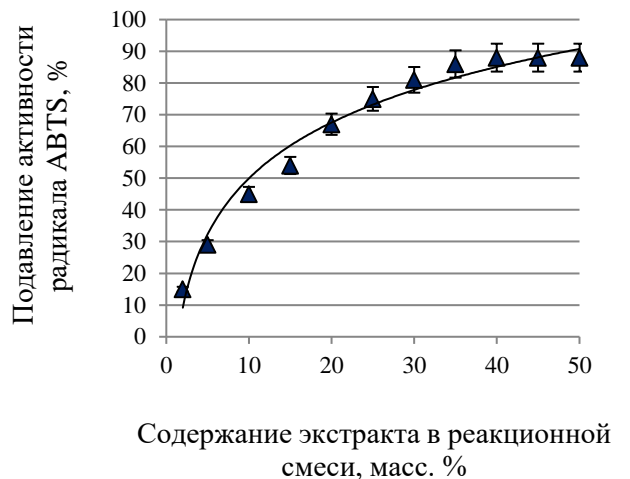
E<sub>s</sub>-1E<sub>s</sub>-2E<sub>s</sub>-3E<sub>s</sub>-4E<sub>s</sub>-5E<sub>s</sub>-6

Рисунок 3.3.3 – Антиоксидантная активность образцов экстрактов элеутерококка колючего (*E. Senticosus*)

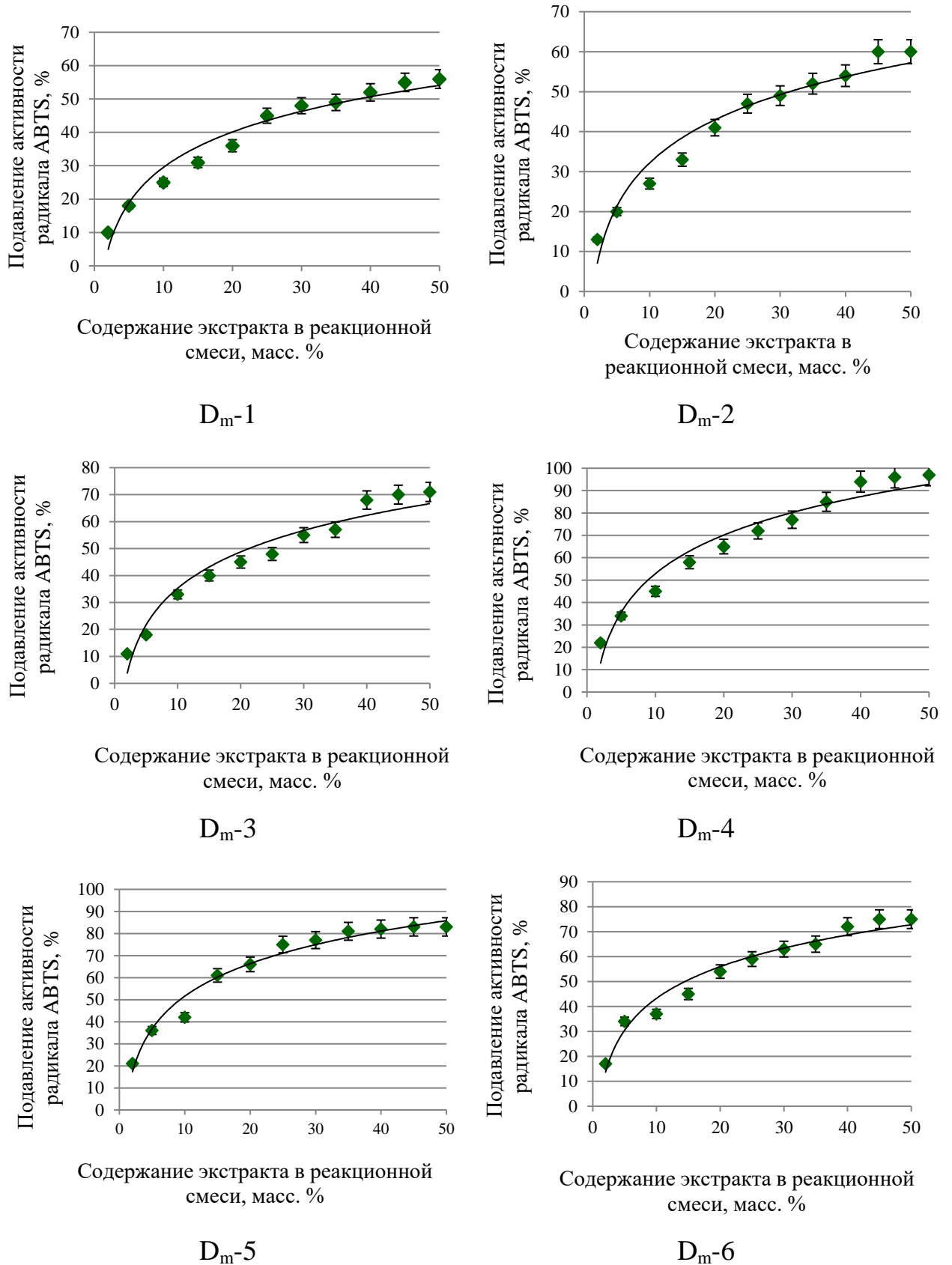


Рисунок 3.3.4 – Антиоксидантная активность образцов экстрактов пальчатокоренника пятнистого (*D. Maculate*)

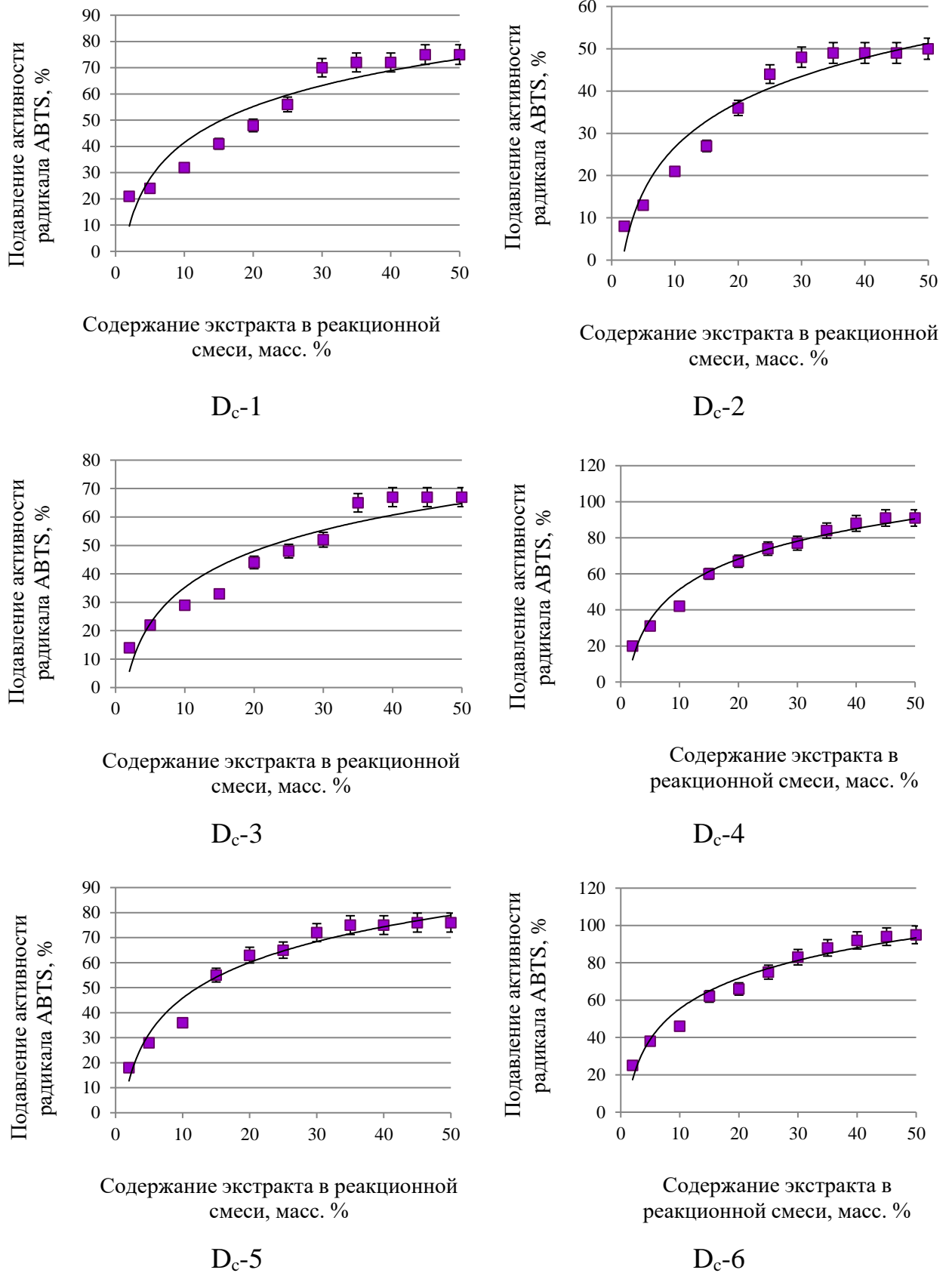


Рисунок 3.3.5 – Антиоксидантная активность образцов экстрактов диоскореи обыкновенной (*D. Communis*)

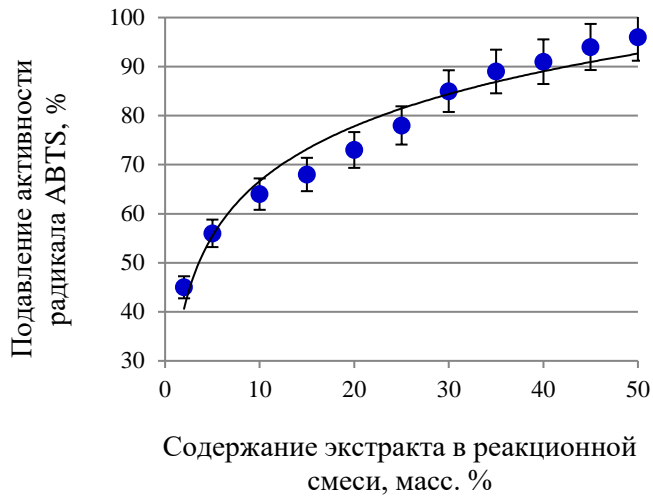
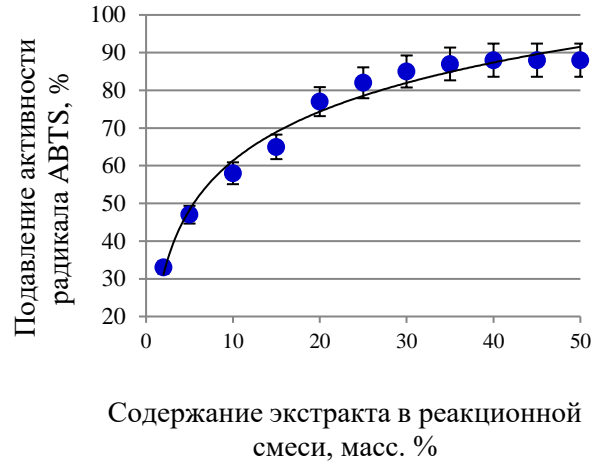
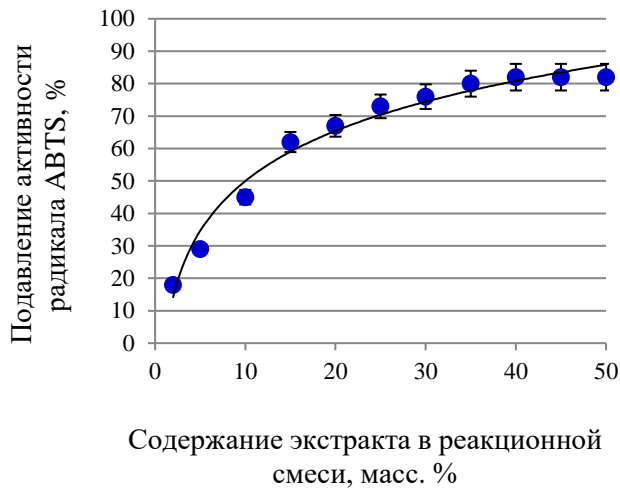
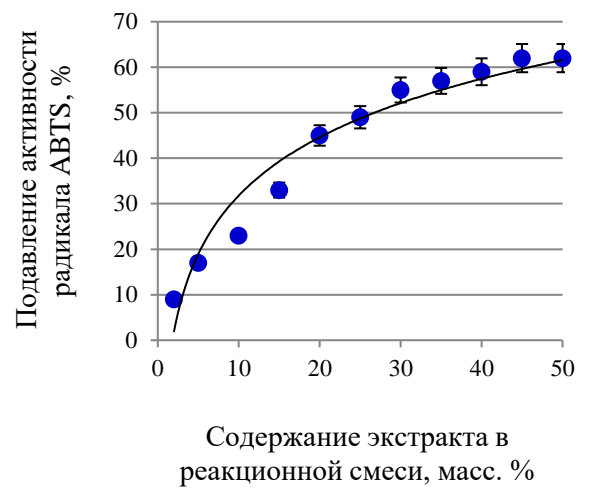
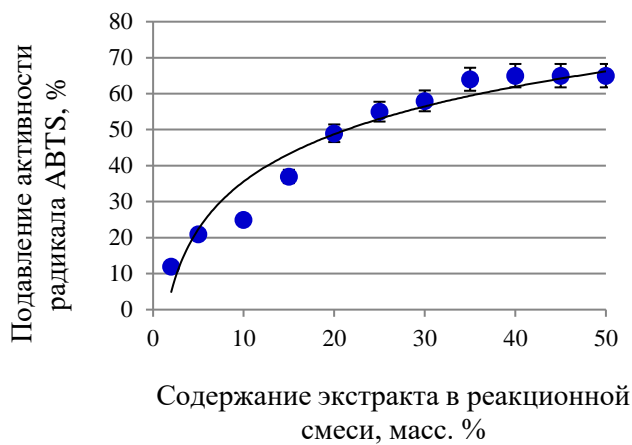
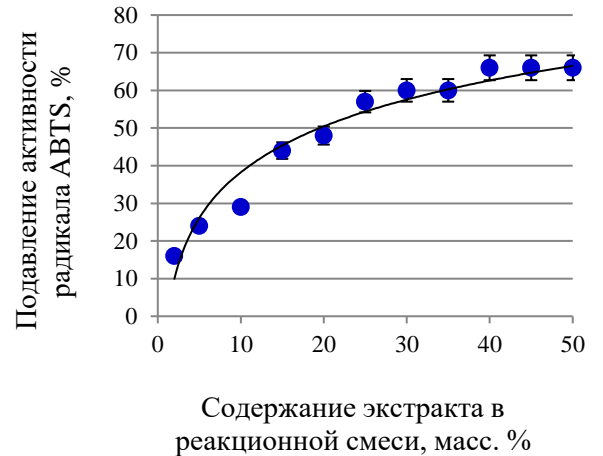
S<sub>d</sub>-1S<sub>d</sub>-2S<sub>d</sub>-3S<sub>d</sub>-4S<sub>d</sub>-5S<sub>d</sub>-6

Рисунок 3.3.6 – Антиоксидантная активность образцов экстрактов сапожниковии растопыренной (*S. Divaricate*)



Таблица 3.3.3 – Результаты определения полумаксимальной эффективной концентрации экстрактов

Обозначение экстракта	EC <sub>50</sub> , масс. %	Обозначение экстракта	EC <sub>50</sub> , масс. %
R <sub>c</sub> -1	29,0±1,5	D <sub>m</sub> -1	39,0±2,0
R <sub>c</sub> -2	30,0±1,5	D <sub>m</sub> -2	34,0±1,7
R <sub>c</sub> -3	35,0±1,8	D <sub>m</sub> -3	22,0±1,1
R <sub>c</sub> -4	9,0±0,5	D <sub>m</sub> -4	9,0±0,5
R <sub>c</sub> -5	10,0±0,5	D <sub>m</sub> -5	9,0±0,5
R <sub>c</sub> -6	15,0±0,8	D <sub>m</sub> -6	14,0±0,7
P <sub>g</sub> -1	47,0±2,4	D <sub>c</sub> -1	16,0±0,8
P <sub>g</sub> -2	42,0±2,1	D <sub>c</sub> -2	47,0±2,4
P <sub>g</sub> -3	36,0±1,8	D <sub>c</sub> -3	22,0±1,1
P <sub>g</sub> -4	8,0±0,4	D <sub>c</sub> -4	10,0±0,5
P <sub>g</sub> -5	9,0±0,5	D <sub>c</sub> -5	12,0±0,6
P <sub>g</sub> -6	8,5±0,5	D <sub>c</sub> -6	8,0±0,4
E <sub>s</sub> -1	0	Sd-1	4,0±0,2
E <sub>s</sub> -2	50,0±2,5	Sd-2	5,0±0,3
E <sub>s</sub> -3	30,0±1,5	Sd-3	10,0±0,5
E <sub>s</sub> -4	14,0±0,7	Sd-4	28,0±1,4
E <sub>s</sub> -5	13,0±0,6	Sd-5	20,0±1,0
E <sub>s</sub> -6	11,0±0,6	Sd-6	21,0±1,1

Согласно полученным данным, максимальной активностью по улавливанию радикала ABTS обладают этанольный (EC<sub>50</sub>=4,0 масс. %) и этилацетатный (EC<sub>50</sub>=5,0 масс. %) экстракты стебля сапожниковии растопыренной, этанольный экстракт корня женьшеня обыкновенного (EC<sub>50</sub>=8,0 масс. %), изопропанольный экстракт корня диоскореи обыкновенной (EC<sub>50</sub>=8,0 масс. %), изопропанольный экстракт корня женьшеня обыкновенного (EC<sub>50</sub>=8,5 масс. %), этилацетатный экстракт корня

женьшеня обыкновенного ( $EC_{50}=9,0$  масс. %), этанольный экстракт корневища левзеи сафлоровидной ( $EC_{50}=9,0$  масс. %), этанольный и этилацетатный экстракты ( $EC_{50}=9,0$  масс. %) клубней пальчатокоренника пятнистого.

Выявленные у экстрактов изучаемых растений антимикробные и антиоксидантные свойства, обусловленные присутствием в их составе физиологически активных веществ, позволяют рассматривать их в качестве перспективного сырья для создания функциональных напитков широкого спектра биологического действия.

### 3.4 Заключение по третьей главе

Растительное сырье, выбранное для исследования (леuzeя сафлоровидная, женьшень обыкновенный, элеутерококк колючий, пальчатокоренник пятнистый, диоскорея обыкновенная, сапожниковия растопыренная), охарактеризовано по физико-химическим свойствам и показателям безопасности. Установлено соответствие таких показателей женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего, как массовая доля влаги и общей золы, требованиям фармакопейных статей ФС.2.5.0013.15 и ФС.2.5.0053.15. Массовая доля влаги во всех исследуемых образцах растений принимает значения в диапазоне от 9,54 до 12,55 %, массовая доля общей золы – от 3,15 до 8,15 %, массовая доля золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, – от 0,42 до 1,16%.

Показано, что все изученные образцы растений по химическим показателям безопасности (содержание свинца, мышьяка, кадмия, ртути, удельная активность Cs-137 и Sr-90, содержание пестицидов) соответствуют требованиям ТР ТС 021/2011, ОФС.1.5.3.0009.15, ОФС.1.5.3.0001.15, ОФС.1.5.3.0011.15. По микробиологическим показателям безопасности

(БГКП, КМАФАНМ, дрожжи, плесени) растений также не выявлено отклонение от требований нормативной документации – ТР ТС 021/2011 и ОФС.1.2.4.0002.18.

По результатам анализа макроэлементного и микроэлементного состава растений выявлено, что по содержанию калия лидирует элеутерококк колючий (21560,0 мг/кг в корневище и 20256,0 мг/кг в листьях), по содержанию кальция – сапожниковия растопыренная (4211,0 мг/кг в стебле и 4508,6 мг/кг в корнях), по содержанию магния – листья левзеи сафлоровидной (6548,2 мг/кг), по содержанию натрия – корень сапожниковии растопыренной (816,1 мг/кг). Максимальное содержание железа отмечено в сапожниковии растопыренной (564,7 мкг/г в стебле и 575,0 мкг/г в корне), бария – в листьях левзеи сафлоровидной (265,4 мкг/г), цинка – в листьях женьшеня обыкновенного (56,9 мкг/г), марганца – в корневище элеутерококка колючего (76,8 мкг/г).

Проанализирован состав БАВ в надземной и подземной частях растений с использованием хроматографических методов. В результате изучения химического состава левзеи сафлоровидной установлено, что корневище с корнями и листья данного растения богаты экидистероидами (45,18–57,45 мг/г сухой массы), флавоноидами апигенином (276,31–345,67 мг/г), кверцетином (88,00–121,09 мг/г), рутином (85,42–112,56 мг/г), мангиферином (12,12–23,07 мг/г), а также фенольными кислотами (97,04–124,94 мг/г), такими как кофейная, хлорогеновая, феруловая, эллаговая и салициловая. Концентрация всех изучаемых вторичных метаболитов в корневище с корнями *Rhaponticum carthamoides* превышает таковую в надземной части растения в среднем на 30,1 %, что делает подземную часть левзеи перспективным сырьем для экстракции.

В корнях и листьях женьшеня обыкновенного выявлено высокое содержание тритерпеновых сапонинов – гинзенозидов (3,36–4,08 мг/г), а также флавоноидов (2,74–3,92 мг/г) и фенольных кислот (3,11–3,67 мг/г).

Рассматриваемые БАВ накапливаются преимущественно в корнях *Panax ginseng*.

Надземные и подземные части элеутерококка колючего демонстрируют преимущественное накопление таких вторичных метаболитов, как флавоноиды, фенилпропаноиды, терпеноиды, лигнаны. В частности, ткани данного растения богаты элеутерозидами (3,15–3,72 мг/г). Для *Eleutherococcus senticosus* отмечена тенденция преимущественного накопления биологически активных веществ в подземной части по сравнению с надземной.

В результате изучения химического состава пальчатокоренника пятнистого установлено высокое содержание таких групп БАВ в нем, как флавоноиды, фенольные кислоты, алкалоиды, сапонины и танины. К доминирующим вторичным метаболитам *Dactylorhiza maculata* относятся такие флавоноиды, как рутин (4,45–6,76 мг/г), кверцетин (3,55–4,09 мг/г), кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозид (2,78–3,12 мг/г), апигенин (1,95–2,78 мг/г), колеофолид (0,98–1,14 мг/г). Также в заметных количествах отмечено накопление γ-ситостерола (2,21–2,47 мг/г), сиреневой (1,11–1,66 мг/г) и галловой (0,84–1,02 мг/г) кислот. Метаболизм *Dactylorhiza maculata* характеризуется преимущественным накоплением вторичных метаболитов в подземных частях (клубнях) растения.

Надземные и подземные ткани диоскорей обыкновенной характеризуются накоплением флавоноидов, фенольных кислот, фенантронов и стероидных сапонинов. Детальный анализ БАВ показал, что фенольные кислоты (2,02–3,23 мг/г) представлены, в основном, кофейной, розмариновой, хлорогеновой, сиреневой; флавоноиды (3,72–5,82 мг/г) – рутином, кверцетином и апигенин-гликозидом. К стероидным сапонином *Dioscorea communis* относятся спиростенол А (1,44–2,13 мг/г), спиростенол Б (0,95–1,56 мг/г), диосцин (1,44–2,18 мг/г) и диосгенин (0,99–1,54 мг/г). Максимальные концентрации биологически активных веществ

зафиксированы преимущественно в корнях растения по сравнению с листьями.

Сапожниковия растопыренная богата такими биоактивными веществами как флавоноиды, дубильные вещества, хромоны, кумарины. Также ткани данного растения накапливают эфирные масла и полисахариды. Важным является то, что флавоноиды и дубильные вещества накапливаются преимущественно в стебле растения, в корнях содержание данных БАВ ниже в 6,8–10,5 раз по сравнению с надземной частью *Saposhnikovia divaricata*. В то же время концентрация кумаринов, хромонов и полисахаридов выше в корнях, по сравнению со стеблем растения, в 1,2–3,2 раза. Доминирующими действующими веществами сапожниковии растопыренной являются хромоны: цимифугин (1,12–1,75 мг/г), гамаудол (2,05–2,33 мг/г), перв-О-глюкозилцимифугин (3,65–5,14 мг/г), 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол (2,24–3,08 мг/г).

Изучены антимикробные и антиоксидантные свойства водно-этанольных, этилацетатных и изопропанольных экстрактов рассматриваемых растений. В результате изучения антибактериальных и фунгицидных свойств установлено, что все тестируемые экстракты проявляют антимикробную активность по отношению к видам условно-патогенных бактерий *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *L. mesenteroides*, *B. cereus*, *S. viridans* и микроскопических грибов *C. albicans*, *M. canis*, *P. citrinum*. Выявлена закономерность: наибольшей антагонистической активностью характеризуются их экстракты, полученные из подземных частей растений (корни, корневище, клубни), по сравнению с экстрактами надземных (листья и стебли) частей. Для сапожниковии растопыренной, напротив, максимальные антимикробные свойства зафиксированы в случае экстрактов надземной части. Максимальную ингибирующую активность по отношению к рассматриваемым тест-штаммам проявили этанольные, этилацетатные и изопропанольные экстракты, полученные из стебля *Saposhnikovia divaricata* (диаметр зоны лизиса составляет 11,00–12,90 мм), а минимальную –

аналогичные экстракты, полученные из корня этого растения (диаметр зоны лизиса 6,20–6,80 мм).

В результате изучения антиоксидантной активности экстрактов спектрофотометрическим методом выявлено, что максимальной активностью по улавливанию радикала ABTS обладают этанольный ( $EC_{50}=4,0$  масс. %) и этилацетатный ( $EC_{50}=5,0$  масс. %) экстракты стебля сапожниковии растопыренной, этанольный экстракт корня женьшеня обыкновенного ( $EC_{50}=8,0$  масс. %), изопропанольный экстракт корня диоскореи обыкновенной ( $EC_{50}=8,0$  масс. %), изопропанольный экстракт корня женьшеня обыкновенного ( $EC_{50}=8,5$  масс. %), этилацетатный экстракт корня женьшеня обыкновенного ( $EC_{50}=9,0$  масс. %), этанольный экстракт корневища левзеи сафлоровидной ( $EC_{50}=9,0$  масс. %), этанольный и этилацетатный экстракты ( $EC_{50}=9,0$  масс. %) клубней пальчатокоренника пятнистого.

Выявленные у экстрактов изучаемых растений антимикробные и антиоксидантные свойства, обусловленные присутствием в их составе вторичных метаболитов (флавоноидов, фенольных кислот, тритерпеновых гликозидов, дубильных веществ, кумаринов), позволяют рассматривать их в качестве перспективного сырья для создания функциональных напитков широкого спектра биологического действия.

## **ГЛАВА 4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO* И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБОВ ЭКСТРАКЦИИ КОМПЛЕКСА БАВ ИЗ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

В данной главе представлены результаты подбора составов питательных сред и параметров культивирования клеточных (каллусных и корневых) культур растений, выбранных для исследования (левзея сафлоровидная, женьшень обыкновенный, элеутерококк колючий, пальчатокоренник пятнистый, диоскорея обыкновенная, сапожниковия растопыренная), и оценки их ростовых характеристик. Также глава содержит результаты подбора параметров разных видов экстракции комплекса БАВ из природного растительного сырья и клеточных культур: водно-спиртовой экстракции путем мацерации, перколяции и микроволновой экстракции.

### **4.1 Подбор составов питательных сред и параметров культивирования клеточных культур *in vitro* растений и оценка их ростовых характеристик**

Культуры растительных клеток, полученные *in vitro*, являются альтернативным источником вторичных метаболитов растений. Использование данных биотехнологических решений позволяет круглый год получать экологически чистое сырье, в том числе редких и исчезающих видов растений. Это приобретает особую актуальность в данной работе, поскольку подавляющая часть объектов исследования включена в Красную книгу РФ или региональные Красные книги. Так, вид *Rhaponticum carthamoides* отнесен к числу редких, уязвимых и исчезающих видов и

занесен в Красные книги России, Казахстана, Монголии и некоторых других государств. *Panax ginseng* – вид, находящийся под угрозой исчезновения, занесен в Красную книгу РФ и некоторых других государств. *Eleutherococcus senticosus* включён в Красную книгу Амурской области (статус – очень ценный лекарственный вид, численность которого сокращается в результате чрезмерного использования человеком и может быть стабилизирована специальными мерами охраны), охраняется в Хинганском и Норском заповедниках. *Dactylorhiza maculata* занесен в Красную книгу Московской области. *Saposhnikovia divaricata* внесена в Красную книгу Забайкальского края.

Подробная методика получения каллусных культур растений описана в главе 2. Исследуемые варианты питательных сред для выращивания каллусных культур представлены в таблице 4.1.1. Для полученных каллусных культур, отобранных через 14 и 28 суток от начала выращивания, регистрировали индекс роста (таблица 4.1.2).

Для всех изучаемых растений начало интенсивного каллусогенеза наблюдали в среднем на 10–14 сутки. Большинство полученных каллусных культур имело плотную консистенцию и низкую степень оводненности клеток (соотношение сухая масса клеток / сырая масса клеток было в диапазоне 1/8–1/10). Цвет культур желтоватый и желтовато-бурый, иногда коричневый, реже образовывался более рыхлый светлый каллус.

На основе полученных результатов (таблица 4.1.2) сделали вывод о том, что для получения каллусных культур левзеи сафлоровидной целесообразно использовать питательную среду № 5 (таблица 4.1.1), индекс роста при этом составляет  $6,7 \pm 0,7$  после 28 суток культивирования.



Таблица 4.1.1 – Состав сред (на 1 дм<sup>3</sup> среды) для получения стерильных проростков и культивирования каллусных культур

Питательная среда Компонентный состав	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Минеральная основа	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	B5	B5	B5
Сахароза, г	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Гидролизат казеина, мг	–	–	500	–	–	–	–	–	–	–
Инозит, мг	–	100	100	–	100	100	100	100	100	100
Тиамин, мг	0,1	–	0,1	0,4	0,1	0,1	1,0	1,0	1,0	10
Пиридоксин, мг	0,1	–	0,1	–	0,1	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0
Никотиновая кислота, мг	0,5	–	0,5	–	0,5	0,5	–	–	–	1,0
Кальция пантотенат, мг	–	–	–	–	–	–	10	10	10	–
Кинетин, мг	–	–	1,0	2,0	0,3	–	0,05	–	0,05	–
БАП, мг	1,0	0,2	–	–	–	0,3	–	0,05	–	–
Аденин, мг	–	–	–	–	–	–	–	1,0	0,1	–
ИУК, мг	–	1,0	–	–	–	–	–	1,0	0,5	–
НУК, мг	–	–	2,0	3,0	–	2,0	0,1	–	–	–
2,4-Д, мг	2,0	1,0	–	–	1,0	–	0,5	–	–	–

MS – среда, с минеральной основой Мурасиге-Скуга;

B5 – среда, с минеральной основой Гамборга.

Таблица 4.1.2 – Результаты определения индекса роста каллусных культур, выращенных в темноте / на свету (продолжительность культивирования 14 и 28 суток, температура 23 °С)

Культура	Индекс роста (P <sub>i</sub> ) по сухой биомассе при культивировании на разных питательных средах									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>R. carthamoides</i> (14 суток)	2,2±0,2/ 1,5±0,2	2,5±0,3/ 1,7±0,2	3,6±0,4/ 2,0±0,2	1,4±0,1/ 0,8±0,1	5,5±0,6/ 3,8±0,4	4,1±0,4/ 2,7±0,3	2,8±0,3/ 1,5±0,2	1,4±0,1/ 0,8±0,1	2,6±0,3/ 1,1±0,1	1,7±0,2/ 0,7±0,1*
<i>R. carthamoides</i> (28 суток)	2,5±0,3/ 1,8±0,2	3,1±0,3/ 2,4±0,2	4,0±0,4/ 2,2±0,2	1,8±0,2/ 1,1±0,1	<b>6,7±0,7</b> <b>/4,0±0,4</b>	4,5±0,5/ 3,1±0,3	3,2±0,3/ 1,8±0,2	1,9±0,2/ 1,2±0,1	3,0±0,3/ 1,4±0,1	2,2±0,2/ 1,0±0,1
<i>P. ginseng</i> (14 суток)	4,5±0,5/ 3,5±0,4	3,7±0,4/ 2,7±0,3	5,0±0,5/ 4,0±0,4	2,9±0,3/ 1,8±0,2	5,0±0,5/ 4,2±0,4	3,9±0,4/ 2,6±0,3	6,4±0,6/ 5,5±0,6	4,2±0,4/ 3,7±0,4	5,5±0,6/ 4,0±0,4	4,9±0,5/ 3,7±0,4
<i>P. ginseng</i> (28 суток)	7,7±0,8/ 6,1±0,6	6,2±0,6/ 4,8±0,5	8,9±0,9/ 7,7±0,8	4,6±0,5/ 3,6±0,4	8,8±0,9/ 7,2±0,7	6,1±0,6/ 5,3±0,5	<b>11,2±1,1/</b> <b>9,8±1,0</b>	7,5±0,8/ 6,0±0,6	9,3±0,9/ 7,7±0,8	7,5±0,8/ 5,8±0,6
<i>E. senticosus</i> (14 суток)	4,7±0,5/ 3,5±0,4	3,5±0,4/ 2,6±0,3	10,8±1,1/ 8,7±0,9	5,1±0,5/ 3,8±0,4	4,4±0,4/ 3,0±0,3	6,2±0,6/ 5,3±0,5	4,3±0,4/ 3,1±0,3	3,2±0,3/ 1,7±0,2	7,5±0,8/ 5,9±0,6	5,3±0,5/ 4,4±0,4
<i>E. senticosus</i> (28 суток)	7,6±0,8/ 6,2±0,6	5,1±0,5/ 4,0±0,4	<b>17,5±1,8/</b> <b>13,2±1,3</b>	9,6±1,0/ 6,6±0,7	7,0±0,7/ 5,1±0,5	9,9±1,0/ 8,0±0,8	7,8±0,8/ 5,8±0,6	5,0±0,5/ 3,7±0,4	14,3±1,4/ 11,9±1,2	11,2±1,1/ 8,5±0,9
<i>D. maculata</i> (14 суток)	2,7±0,3/ 1,5±0,2	3,3±0,3/ 1,8±0,2	2,9±0,3/ 2,1±0,2	5,5±0,6/ 4,6±0,5	4,7±0,5/ 3,4±0,3	6,0±0,6/ 4,8±0,5	4,9±0,5/ 3,3±0,3	3,5±0,4/ 1,8±0,2	5,1±0,5/ 2,3±0,2	1,9±0,2/ 1,2±0,1
<i>D. maculata</i> (28 суток)	3,6±0,4/ 2,2±0,2	5,0±0,5/ 3,5±0,4	4,7±0,5/ 3,4±0,3	9,9±1,0/ 6,5±0,7	8,8±0,9/ 5,3±0,5	<b>10,7±1,1/</b> <b>7,6±0,8</b>	8,0±0,8/ 6,9±0,7	5,2±0,5/ 3,9±0,4	8,9±0,9/ 7,7±0,8	2,5±0,3/ 1,4±0,1
<i>D. communis</i> (14 суток)	5,4±0,5/ 3,8±0,4	3,2±0,3/ 1,7±0,2	3,0±0,3/ 1,5±0,2	1,8±0,2/ 0,9±0,1	2,7±0,3/ 1,6±0,2	2,5±0,3/ 1,8±0,2	4,1±0,4/ 3,3±0,3	4,7±0,5/ 3,4±0,3	3,3±0,3/ 1,8±0,2	4,0±0,4/ 2,6±0,3
<i>D. communis</i> (28 суток)	<b>12,3±1,2/</b> <b>10,9±1,1</b>	5,7±0,6/ 4,2±0,4	5,4±0,5/ 3,9±0,4	3,3±0,3/ 1,7±0,2	4,4±0,4/ 2,3±0,2	4,8±0,5/ 2,7±0,3	7,7±0,8/ 5,5±0,6	6,6±0,7/ 5,4±0,5	5,2±0,5/ 3,6±0,4	6,9±0,7/ 5,4±0,5
<i>S. divaricata</i> (14 суток)	3,6±0,4/ 2,2±0,2	4,8±0,5/ 3,5±0,4	2,9±0,3/ 1,7±0,2	5,4±0,5/ 4,2±0,4	3,8±0,4/ 3,1±0,3	2,2±0,2/ 1,5±0,2	4,5±0,5/ 3,3±0,3	8,1±0,8/ 6,7±0,7	4,0±0,4/ 2,5±0,3	3,5±0,4/ 2,7±0,3
<i>S. divaricata</i> (28 суток)	5,7±0,6/ 4,5±0,5	9,2±0,9/ 7,7±0,8	5,0±0,5/ 4,1±0,4	8,7±0,9/ 7,2±0,7	6,1±0,6/ 4,5±0,5	3,5±0,4/ 2,6±0,3	6,9±0,7/ 5,4±0,5	<b>18,5±1,9/</b> <b>16,7±1,7</b>	9,3±0,9/ 7,2±0,7	5,1±0,5/ 3,9±0,4

\*числитель – культивирование в темноте, знаменатель – на свету

Для выращивания каллусных культур женьшеня обыкновенного рекомендована питательная среда № 7 (индекс роста достигает  $11,2 \pm 1,1$  после 28-дневного культивирования), а для выращивания каллусов элеутерококка колючего – питательная среда № 3, индекс роста при данных параметрах достигает значения  $17,5 \pm 1,8$  (после 28 суток выращивания). Каллусные культуры пальчатокоренника пятнистого демонстрируют наилучший результат (индекс роста, равный  $10,7 \pm 1,1$ ) на среде № 6 после 28 суток инкубации, культуры диоскореи обыкновенной – на среде № 1 (индекс роста  $12,3 \pm 1,2$  по истечении 28-дневного периода). Наконец, для выращивания каллусных культур сапожниковии растопыренной наиболее рациональным является использование питательной среды № 8, в данном варианте 28-дневного культивирования индекс роста достигает  $18,5 \pm 1,9$ .

Следует отметить, что для всех изучаемых растений выращивание каллусных культур необходимо вести в течение 28 суток, это позволяет достичь максимальных значений индекса роста. Кроме того, результаты экспериментов показали, что проводить культивирование каллусов на свету не целесообразно, поскольку ростовые параметры в этом случае ниже, чем при культивировании в темноте, в среднем в 1,1–2,1 раза.

Для выращивания корневых культур растений подбирали такие параметры, как вид штамма агробактерии для трансформации, состав питательных сред, продолжительность и световой режим. Подробная методика получения корневых культур растений описана в главе 2.

С целью выбора наиболее предпочтительного штамма агробактерии для трансформации растений проводили подсчет числа эксплантов, на которых образовались корни. Полученные результаты представлены в таблице 4.1.3.

Таблица 4.1.3 – Эффективность трансформации растений штаммами *Agrobacterium rhizogenes* Swiss 15834, 8196 и А4

Наименование растения	Общее число используемых эксплантов, шт.	Число эксплантов с корнями, шт.			Доля эксплантов с корнями, %		
		15834	8196	А4	15834	8196	А4
<i>R. carthamoides</i>	75	23	9	44	30,67	0,12	58,67
<i>P. ginseng</i>	75	26	11	40	34,67	0,15	53,33
<i>E. senticosus</i>	75	28	3	32	37,33	0,04	42,67
<i>D. maculata</i>	75	21	7	41	28,00	0,09	54,67
<i>D. communis</i>	75	19	6	30	25,33	0,08	40,00
<i>S. divaricata</i>	75	17	10	28	22,67	0,13	37,33

Как показали результаты экспериментов (таблица 4.1.3), эффективность трансформации растительного материала находится под влиянием вида используемой агробактерии. Так, максимальную эффективность при трансформации растительных эксплантов продемонстрировал штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4 (доля эксплантов с корнями составляет 40,00–58,67 %), а минимальную – штамм *A. rhizogenes* 8196 (доля эксплантов с корнями составила всего 3–11 %).

Для подтверждения данного наблюдения регистрировали динамику изменения длины «бородатых» корней при трансформации штаммами *A. rhizogenes* A4 и 15834, полученные данные обрабатывали методами математической статистики и получали усредненные значения, представленные на рисунке 4.1.1.

Результаты показали, что за 28 суток культивирования средняя длина «бородатых» корней левзеи сафлоровидной увеличилась в 7,7 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* A4 и в 6,4 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* 15834. За такой же период выращивания средняя длина корней женьшеня обыкновенного увеличилась в 7,8 раз при использовании штамма

*A. rhizogenes* A4 и в 6,6 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* 15834; корней элеутерококка колючего – в 11,9 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* A4 и в 10,1 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* 15834; корней пальчатокоренника пятнистого – в 12,5 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* A4 и в 10,3 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* 15834; корней диоскореи обыкновенной – в 8,7 раз при использовании штамма

*A. rhizogenes* A4 и в 7,9 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* 15834; корней сапожниковии растопыренной – в 9,3 раза при использовании штамма *A. rhizogenes* A4 и в 4,7 раз при использовании штамма *A. rhizogenes* 15834. Полученные данные подтверждают более высокую эффективность трансформации растений штаммом *A. rhizogenes* A4 по сравнению с

*A. rhizogenes* 15834, поэтому в последующих исследованиях использовали штамм А4.

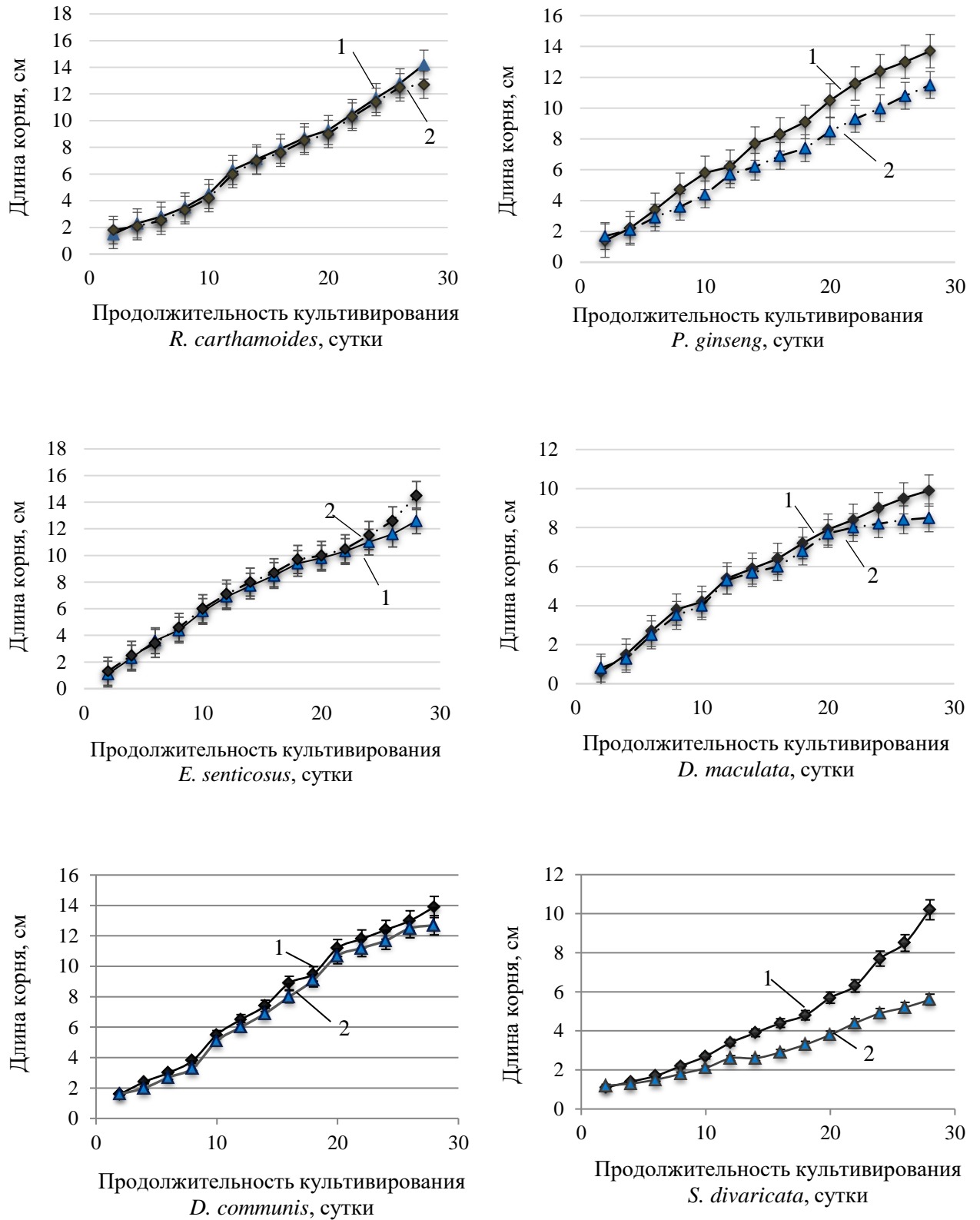


Рисунок 4.1.1 – Динамика роста «бородатых» корней растений:

1 – штамм *A. rhizogenes* А4; 2 – штамм *A. rhizogenes* 15834

Для выбора рационального светового режима выращивания корневых культур растений для них регистрировали показатель индекса роста (рисунки 4.1.2–4.1.7).

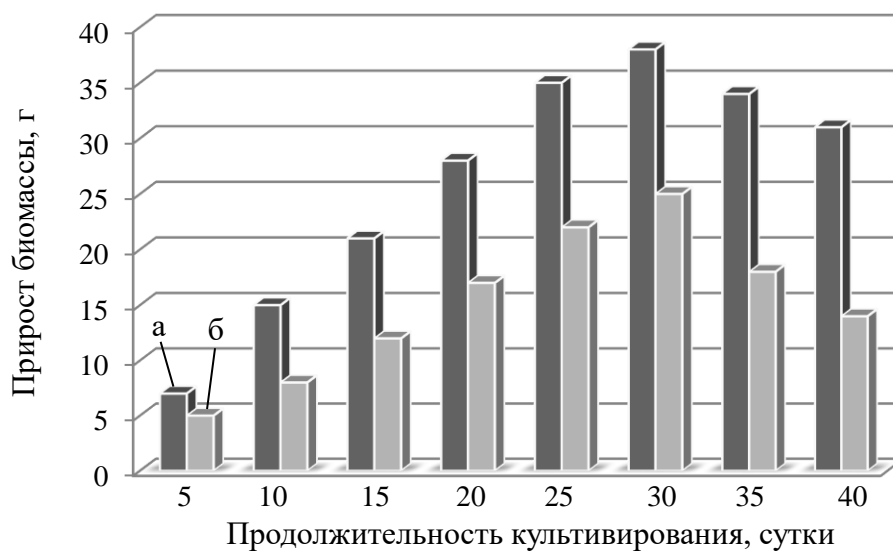


Рисунок 4.1.2 – Зависимость индекса роста корневой культуры *in vitro* левзеи сафлоровидной от продолжительности культивирования:

а – в темноте, б – на свету

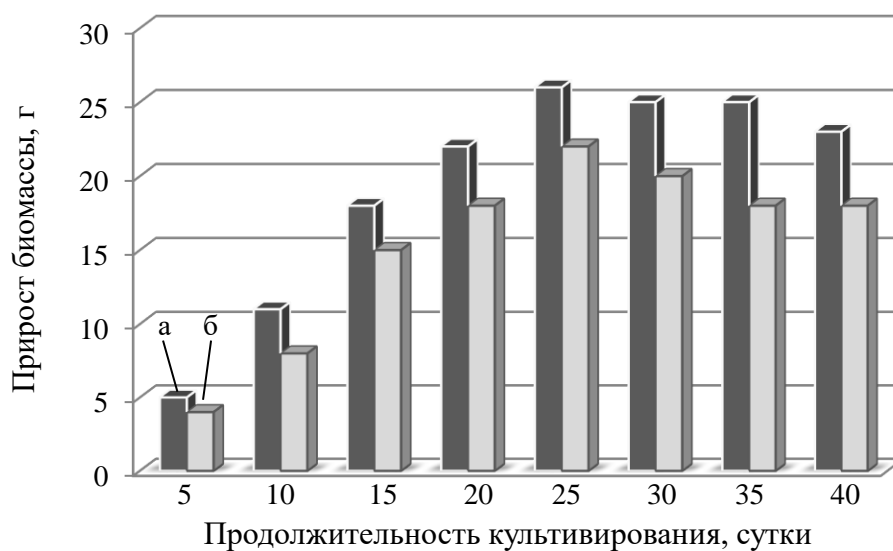


Рисунок 4.1.3 – Зависимость индекса роста корневой культуры *in vitro* женьшеня обыкновенного от продолжительности культивирования:

а – в темноте, б – на свету

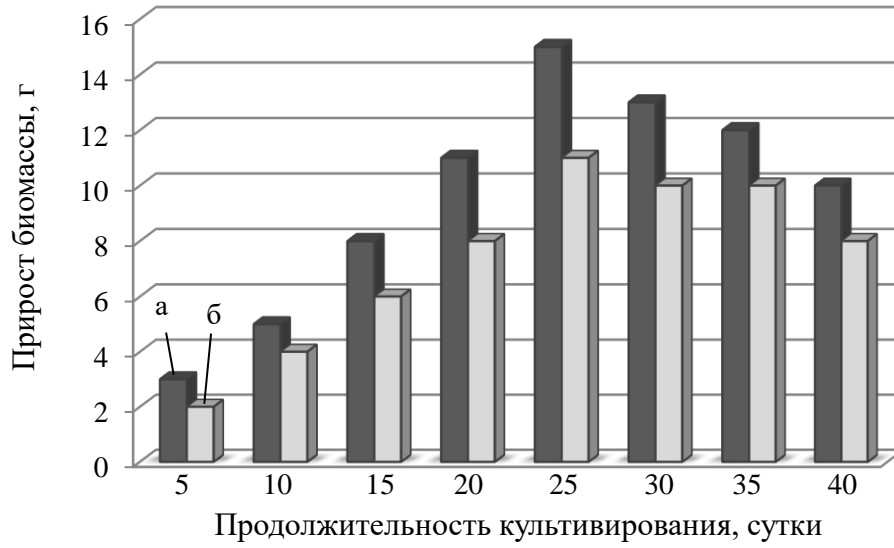


Рисунок 4.1.4 – Зависимость индекса роста корневой культуры *in vitro* элеутерококка колючего от продолжительности культивирования:

а – в темноте, б – на свету

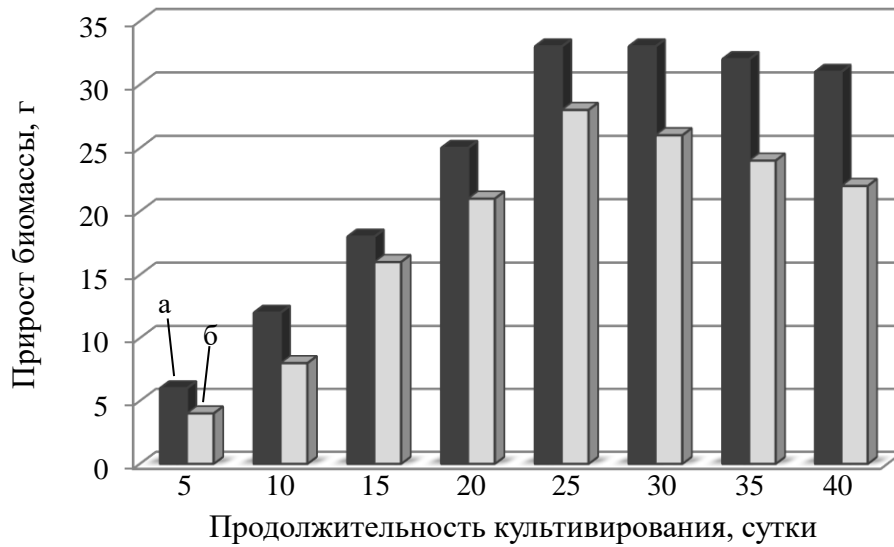


Рисунок 4.1.5 – Зависимость индекса роста корневой культуры *in vitro* пальчатокоренника пятнистого от продолжительности культивирования:

а – в темноте, б – на свету



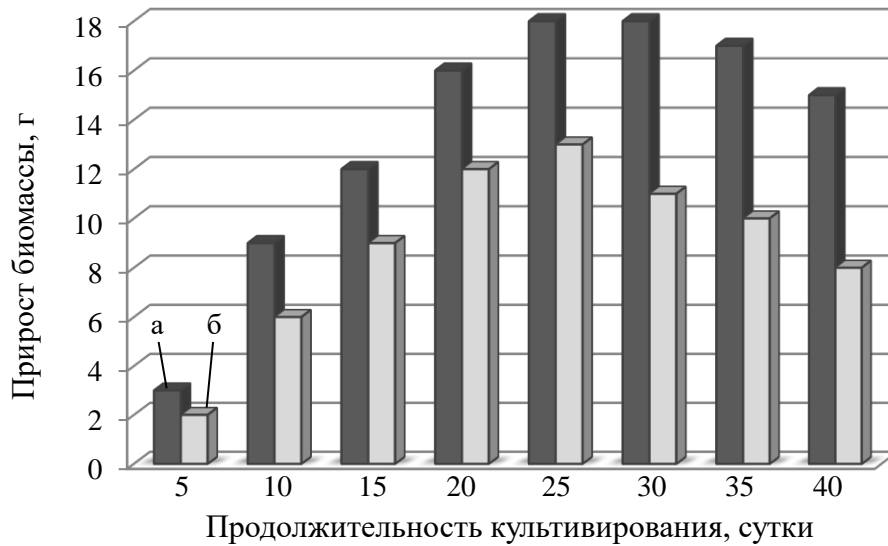


Рисунок 4.1.6 – Зависимость индекса роста корневой культуры *in vitro* диоскорей обыкновенной от продолжительности культивирования:

а – в темноте, б – на свету

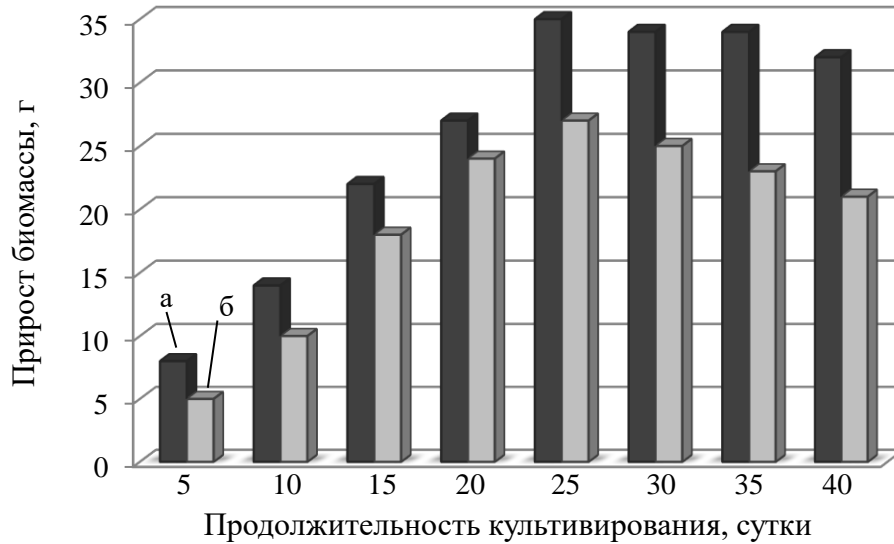


Рисунок 4.1.7 – Зависимость индекса роста корневой культуры *in vitro* сапожниковии растопыренной от продолжительности культивирования:

а – в темноте, б – на свету

Согласно полученным данным (рисунки 4.1.2–4.1.7), корневые культуры всех изучаемых растений целесообразно выращивать в темноте, прирост биомассы в этом случае максимальный (по сравнению с культивированием на свету): 38 г после 30 суток выращивания для *Rhaponticum carthamoides*, 26 г после 25 суток для *Panax ginseng*, 15 г после 25 суток для *Eleutherococcus senticosus*, 33 г после 25 суток для *Dactylorhiza maculata*, 18 г после 25 суток для *Dioscorea communis*, 35 г после 25 суток для *Saposhnikovia divaricata*.

Все кривые роста характеризуются S-образной формой с выраженными фазами: лаг-фазой, фазой экспоненциального роста, стационарной фазой и фазой отмирания. Наибольшие значения индекса роста при культивировании в темноте продемонстрировали левзея сафлоровидная ( $P_i=38$ ), сапожниковия растопыренная ( $P_i=35$ ) и пальчатокоренник пятнистый ( $P_i=33$ ).

Таким образом, в дальнейших исследованиях, направленных на подбор параметров экстракции растительного сырья, будут использованы следующие условия выращивания каллусных и корневых культур.

Культивирование каллусов будет осуществляться в темноте, при температуре 23 °С в течение 28 суток. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры левзеи сафлоровидной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахароза – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, кинетин – 0,3 мг, 2,4-Д – 1,0 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусных культур элеутерококка колючего (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахароза – 30 г, гидролизат казеина – 500 мг, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, кинетин – 1,0 мг, НУК – 2,0 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры женьшеня обыкновенного (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахароза – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 1,0 мг, пиридоксин – 1,0 мг, кальция пантотенат – 10 мг, кинетин – 0,05 мг, НУК –

0,1 мг, 2,4-Д – 0,5 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, БАП – 0,3 мг, НУК – 2,0 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры диоскореи обыкновенной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, БАП – 1,0 мг, 2,4-Д – 2,0 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры сапожниковии растопыренной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Гамборгу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 1,0 мг, пиридоксин – 1,0 мг, кальция пантотенат – 10 мг, БАП – 0,05 мг, аденин – 1,0 мг, ИУК – 1,0 мг.

Для выращивания корневых культур рекомендуется использовать параметры: штамм для трансформации – *Agrobacterium rhizogenes* A4, классическая среда Гамборга, не содержащая гормоны, но содержащая антибиотик цефотаксим, температура культивирования 23 °С в течение 5 недель при перемешивании (100 об/мин), в темноте.

#### **4.2 Подбор параметров экстракции природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений методом мацерации**

В качестве статического метода экстракции вторичных метаболитов из природного растительного сырья, каллусных и корневых культур использовали метод мацерации.

Подбору параметров экстрагирования вторичных метаболитов из растительного сырья с использованием метода мацерации предшествовал выбор экстрагента, обеспечивающего максимальный выход экстрактивных веществ. Для этого навеску сухого природного растительного сырья

(надземные и подземные части растений) и высушенной биомассы каллусных и корневых культур, полученных согласно п. 4.1, помещали в пробирку, добавляли экстрагент (гидромодуль 1:10), помещали на шейкер и перемешивали в течение 60 мин. Сухую массу отделяли от раствора фильтрованием, фильтрат дополнительно центрифугировали для удаления взвешенных частиц. Растворитель из экстракта упаривали при пониженном давлении, после чего определяли содержание экстрактивных веществ в полученном экстракте.

Результаты определения массовой доли экстрактивных веществ в экстрактах природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* в зависимости от природы экстрагента приведены в таблице 4.2.1. Полученные результаты позволили выбрать экстрагент для последующих исследований – для всех тестируемых культур растений целесообразно использовать 40 %-ный этиловый спирт, поскольку выход экстрактивных веществ при данных условиях максимальный. Следует отметить, что наибольшее значение выхода экстрактивных веществ при экстракции 40 %-ным этанолом зафиксировано для адвентивных корней (39,72 %) и корневища с корнями (43,78 %) левзеи сафлоровидной; корня (45,29 %) и каллуса (46,21 %) женьшеня обыкновенного; корневища (34,11 %) и корневой культуры *in vitro* (35,11 %) элеутерококка колючего; клубней (44,41 %) и каллуса (45,32 %) пальчатокоренника пятнистого; корня (45,12 %) и адвентивных корней (45,53 %) диоскореи обыкновенной; стебля (46,32 %) и корневой культуры *in vitro* (47,18 %) сапожниковии растопыренной.

Таблица 4.2.1 – Эффективность экстракции вторичных метаболитов из растительного сырья в зависимости от природы экстрагента (комнатная температура, экспозиция 60 мин, гидромодуль 1:10)

Наименование образца	Выход экстрактивных веществ, %						
	этанол 50 %	этанол 70 %	этанол 40 %	диэтиловый эфир	этилацетат	ацетон	изопропанол
<i>R. carthamoides</i> , листья	23,12±1,16	31,09±1,55	36,55±1,83	5,21±0,26	7,79±0,39	3,34±0,17	26,67±1,33
<i>R. carthamoides</i> , корневище с корнями	25,06±1,20	33,45±1,57	<b>43,78±2,14</b>	6,19±0,29	8,32±0,41	4,67±0,23	28,09±1,40
<i>R. carthamoides</i> , каллус	21,45±1,05	30,55±1,53	35,89±1,76	4,87±0,24	7,54±0,36	3,10±0,16	25,52±1,28
<i>R. carthamoides</i> , корневая культура	23,09±1,11	34,09±1,50	<b>39,72±1,99</b>	5,58±0,28	8,09±0,40	4,50±0,22	27,11±1,30
<i>P. ginseng</i> , листья	21,34±1,05	37,56±1,88	42,67±2,09	4,12±0,21	6,87±0,33	3,22±0,16	13,44±0,66
<i>P. ginseng</i> , корень	24,87±1,24	38,05±1,90	<b>45,29±2,17</b>	5,43±0,27	7,22±0,35	3,58±0,18	15,29±0,73
<i>P. ginseng</i> , каллус	25,12±1,21	39,44±1,98	<b>46,21±2,26</b>	5,55±0,27	6,34±0,32	3,85±0,18	16,11±0,81
<i>P. ginseng</i> , корневая культура	20,66±0,99	36,50±1,83	41,87±2,01	4,47±0,22	7,52±0,36	2,99±0,15	13,25±0,66
<i>E. senticosus</i> , листья	16,58±0,83	24,55±1,23	30,75±1,51	3,88±0,19	5,79±0,28	1,21±0,06	9,12±0,46
<i>E. senticosus</i> , корневище	17,18±0,82	26,01±1,27	<b>34,11±1,71</b>	4,72±0,25	6,10±0,29	2,33±0,12	10,45±0,51

Продолжение таблицы 4.2.1

Наименование образца	Выход экстрактивных веществ, %						
	этанол 50 %	этанол 70 %	этанол 40 %	диэтиловый эфир	этилацетат	ацетон	изопропанол
<i>E. senticosus</i> , каллус	15,90±0,80	23,90±1,15	31,06±1,55	3,72±0,18	5,44±0,27	1,34±0,07	8,95±0,44
<i>E. senticosus</i> , корневая культура	17,86±0,89	26,12±1,28	<b>35,11±1,76</b>	5,03±0,24	6,21±0,31	2,50±0,13	11,09±0,55
<i>D. maculata</i> , листья	19,44±0,97	31,02±1,52	38,56±1,93	4,68±0,23	6,34±0,32	0,98±0,05	11,33±0,56
<i>D. maculata</i> , клубни	22,31±1,11	35,18±1,76	<b>44,41±2,17</b>	5,11±0,26	7,18±0,36	1,48±0,07	13,48±0,65
<i>D. maculata</i> , каллус	22,66±1,13	36,19±1,74	<b>45,32±2,27</b>	5,30±0,27	7,32±0,37	1,56±0,08	14,33±0,70
<i>D. maculata</i> , корневая культура	18,71±0,88	32,44±1,62	39,07±1,95	4,80±0,24	6,22±0,31	1,11±0,06	12,09±0,60
<i>D. communis</i> , листья	22,08±1,08	33,24±1,66	40,66±1,95	6,12±0,31	5,88±0,29	2,24±0,11	15,43±0,77
<i>D. communis</i> , корень	24,12±1,16	34,71±1,74	<b>45,12±2,26</b>	7,21±0,35	7,23±0,35	3,15±0,16	17,05±0,82
<i>D. communis</i> , каллус	21,99±1,10	32,77±1,64	41,19±2,06	6,32±0,30	6,05±0,29	2,55±0,12	15,80±0,79
<i>D. communis</i> , корневая культура	25,18±1,26	35,02±1,71	<b>45,53±2,28</b>	7,40±0,37	7,44±0,36	3,22±0,16	17,33±0,85
<i>S. divaricata</i> , стебель	24,50±1,23	37,33±1,87	<b>46,32±2,27</b>	6,05±0,30	7,73±0,39	4,23±0,21	13,11±0,66
<i>S. divaricata</i> , корень	18,65±0,91	34,20±1,71	42,10±2,10	4,77±0,24	6,08±0,30	2,98±0,15	10,76±0,53
<i>S. divaricata</i> , каллус	18,82±0,94	35,13±1,76	41,43±2,07	4,80±0,23	6,12±0,31	3,07±0,15	11,14±0,52
<i>S. divaricata</i> , корневая культура	25,54±1,40	37,10±1,82	<b>47,18±2,36</b>	6,16±0,30	7,95±0,40	4,40±0,22	14,55±0,70

Задачей следующего этапа исследований являлся подбор рациональных параметров экстрагирования вторичных метаболитов из природного растительного сырья (корневище левзеи сафлоровидной и элеутерококка колючего, женьшеня обыкновенного, диоскорей обыкновенной, клубни пальчатокоренника пятнистого, стебель сапожниковии растопыренной) и клеточных культур *in vitro* (калусы женьшеня обыкновенного, пальчатокоренника пятнистого, культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной, элеутерококка колючего, диоскорей обыкновенной, сапожниковии растопыренной) этанолом (40 %) при использовании методов мацерации (при постоянном перемешивании на лабораторном шейкере) и перколяции в аппарате Сокслета. Интерес представляли такие параметры экстракции, как температурный режим, гидромодуль, продолжительность (экспозиция). Контролируемыми показателями являлись: суммарное содержание экистероидов в экстрактах левзеи сафлоровидной, суммарное содержание флавоноидов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого, суммарное содержание тритерпеновых гликозидов в экстрактах женьшеня обыкновенного, суммарное содержание фенилпропаноидов в экстрактах элеутерококка колючего, суммарное содержание гликозидов в экстрактах диоскорей обыкновенной, суммарное содержание хромонов в экстрактах сапожниковии растопыренной.

С целью установления рациональных параметров экстракции вторичных метаболитов комплекса из изучаемых растительных объектов методом мацерации провели серию экспериментов, полученные результаты приведены в таблицах 4.2.2–4.2.13.

Таблица 4.2.2 – Суммарное содержание экистероидов в этанольных экстрактах корневища левзеи сафлоровидной, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание экистероидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	12,55±0,60	15,11±0,73	15,20±0,76	13,44±0,67
1:10	14,72±0,74	17,09±0,84	18,33±0,92	16,52±0,81
1:20	15,06±0,75	19,34±0,91	19,45±0,93	16,15±0,80
Экспозиция 120 мин				
1:5	15,37±0,75	18,21±0,87	18,05±0,88	17,12±0,82
1:10	17,00±0,83	21,32±1,07	21,24±1,00	20,09±1,01
1:20	18,55±0,93	22,08±1,10	21,89±1,09	21,43±1,05
Экспозиция 240 мин				
1:5	24,12±1,21	29,88±1,49	29,84±1,49	27,10±1,36
1:10	27,05±1,33	<b><u>33,56±1,68</u></b>	33,40±1,67	31,88±1,59
1:20	27,11±1,36	33,67±1,62	33,72±1,62	31,50±1,54
Экспозиция 360 мин				
1:5	24,16±1,21	29,75±1,43	29,70±1,49	26,12±1,31
1:10	26,77±1,34	33,70±1,69	33,54±1,61	31,54±1,55
1:20	27,05±1,35	33,65±1,65	33,60±1,68	31,27±1,56

Таблица 4.2.3 – Суммарное содержание экистероидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание экистероидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	28,46±1,37	33,90±1,70	34,08±1,70	31,09±1,55
1:10	35,15±1,76	37,44±1,87	38,10±1,91	36,39±1,75
1:20	36,09±1,77	41,11±1,97	41,77±2,09	37,05±1,85



## Окончание таблицы 4.2.3

Экспозиция 120 мин				
1:5	32,66±1,60	38,90±1,95	39,06±1,91	35,85±1,68
1:10	38,54±1,93	44,55±2,14	45,13±2,26	41,08±2,05
1:20	44,88±2,24	45,16±2,26	45,70±2,29	44,50±2,14
Экспозиция 240 мин				
1:5	53,44±2,67	71,23±3,49	71,35±3,56	68,31±3,42
1:10	58,12±2,91	<b><u>76,12±3,81</u></b>	76,22±3,73	72,56±3,63
1:20	59,03±2,95	76,08±3,73	76,25±3,81	69,08±3,45
Экспозиция 360 мин				
1:5	54,08±2,61	71,18±3,56	71,25±3,55	65,10±3,26
1:10	57,85±2,89	76,20±3,81	76,15±3,73	66,54±3,33
1:20	59,12±2,96	76,15±3,73	77,04±3,85	63,28±3,10

Таблица 4.2.4 – Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов в этанольных экстрактах корня женьшеня обыкновенного, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	8,56±0,42	12,05±0,60	16,34±0,82	14,08±0,71
1:10	11,34±0,54	14,65±0,70	18,55±0,93	16,57±0,83
1:20	11,65±0,58	15,05±0,75	18,73±0,94	15,77±0,77
Экспозиция 120 мин				
1:5	11,67±0,58	15,58±0,78	20,54±1,03	17,11±0,82
1:10	14,85±0,73	18,22±0,91	24,30±1,22	21,33±1,07
1:20	15,12±0,73	19,34±0,93	24,55±1,23	20,60±1,03
Экспозиция 240 мин				
1:5	14,56±0,69	17,65±0,88	22,33±1,12	18,76±0,94
1:10	23,46±1,17	21,34±1,07	<b><u>28,11±1,35</u></b>	22,04±1,06
1:20	24,05±1,21	22,09±1,08	28,24±1,41	21,98±1,10
Экспозиция 360 мин				
1:5	15,09±0,75	18,06±0,90	22,40±1,17	18,80±0,94
1:10	23,68±1,18	21,47±1,07	28,40±1,43	21,87±1,09
1:20	23,87±1,19	22,15±1,11	28,21±1,41	22,05±1,09

Таблица 4.2.5 – Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы каллусной культуры женьшеня обыкновенного, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	12,10±0,58	18,14±0,91	21,77±1,07	18,44±0,89
1:10	17,09±0,85	23,48±1,13	27,12±1,36	22,09±1,10
1:20	17,33±0,84	24,62±1,23	28,33±1,42	21,15±1,02
Экспозиция 120 мин				
1:5	23,10±1,16	27,12±1,36	30,92±1,55	26,24±1,26
1:10	27,37±1,34	34,55±1,73	38,11±1,87	31,05±1,55
1:20	28,08±1,40	35,09±1,68	39,25±1,96	30,89±1,51
Экспозиция 240 мин				
1:5	32,11±1,61	45,75±2,39	58,34±2,92	53,22±2,66
1:10	37,56±1,80	53,21±2,66	<b>67,12±3,36</b>	60,99±3,05
1:20	37,52±1,84	54,08±2,65	67,23±3,23	61,25±2,94
Экспозиция 360 мин				
1:5	33,61±1,68	46,02±2,31	59,21±2,96	52,77±2,64
1:10	38,09±1,87	54,30±2,55	67,34±3,30	59,55±2,86
1:20	37,62±1,84	55,18±2,76	67,15±3,29	60,14±3,11

Таблица 4.2.6 – Суммарное содержание фенилпропаноидов в этанольных экстрактах корневища элеутерококка колючего, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание фенилпропаноидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	10,52±0,51	14,59±0,73	15,66±0,78	12,15±0,61
1:10	14,18±0,71	19,26±0,94	22,31±1,12	16,89±0,79
1:20	15,43±0,76	20,95±1,05	24,19±1,16	21,33±1,07
Экспозиция 120 мин				
1:5	24,56±1,20	31,22±1,50	32,44±1,62	28,55±1,43
1:10	28,51±1,43	37,15±1,82	38,67±1,86	34,12±1,64
1:20	29,40±1,47	<b>42,78±2,14</b>	43,11±2,16	36,76±1,84

## Окончание таблицы 4.2.6

Экспозиция 240 мин				
1:5	25,73±1,29	31,08±1,55	33,11±1,66	27,55±1,38
1:10	29,12±1,40	38,42±1,92	39,10±1,92	33,07±1,65
1:20	30,15±1,51	42,67±2,05	43,40±2,17	35,57±1,74
Экспозиция 360 мин				
1:5	26,02±1,30	31,47±1,57	32,76±1,64	27,94±1,39
1:10	28,79±1,44	37,54±1,88	38,80±1,90	34,37±1,72
1:20	29,55±1,42	43,01±2,15	44,16±2,21	35,81±1,72

Таблица 4.2.7 – Суммарное содержание фенилпропаноидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней элеутерококка колючего, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание фенилпропаноидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	23,66±1,18	27,62±1,33	29,25±1,40	24,11±1,21
1:10	32,15±1,58	37,11±1,86	42,44±2,12	35,09±1,75
1:20	33,05±1,65	38,23±1,91	44,20±2,21	36,56±1,83
Экспозиция 120 мин				
1:5	42,18±2,11	65,11±3,26	66,09±3,17	57,18±2,86
1:10	47,86±2,30	68,75±3,44	69,15±3,46	55,33±2,77
1:20	49,12±2,46	<b><u>74,06±3,71</u></b>	75,14±3,76	62,26±3,11
Экспозиция 240 мин				
1:5	43,45±2,17	66,07±3,17	66,12±3,31	55,27±2,76
1:10	48,19±2,31	69,05±3,45	70,33±3,45	56,47±2,82
1:20	50,33±2,52	75,26±3,76	75,32±3,77	63,00±3,15
Экспозиция 360 мин				
1:5	42,80±2,14	65,48±3,27	66,20±3,31	56,44±2,82
1:10	48,04±2,40	69,36±3,47	70,04±3,51	56,28±2,81
1:20	50,11±2,41	74,32±3,72	75,22±3,61	62,77±3,14

Таблица 4.2.8 – Суммарное содержание флавоноидов в этанольных экстрактах клубней пальчатокоренника пятнистого, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание флавоноидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	16,76±0,80	18,33±0,92	19,54±0,98	17,75±0,89
1:10	21,78±1,09	24,55±1,20	26,77±1,34	21,33±1,07
1:20	22,15±1,11	25,68±1,28	27,20±1,31	20,90±1,00
Экспозиция 120 мин				
1:5	23,54±1,18	29,48±1,47	30,64±1,53	27,23±1,36
1:10	28,26±1,41	34,56±1,69	35,12±1,76	29,11±1,46
1:20	30,54±1,53	35,08±1,75	36,07±1,77	28,65±1,43
Экспозиция 240 мин				
1:5	32,56±1,56	41,10±2,06	42,15±2,11	38,66±1,93
1:10	38,79±1,94	<b><u>47,34±2,32</u></b>	48,09±2,31	41,62±2,08
1:20	39,04±1,95	48,25±2,41	48,55±2,43	42,39±1,12
Экспозиция 360 мин				
1:5	33,05±1,65	41,23±2,06	43,21±2,16	39,45±1,89
1:10	39,76±1,99	48,34±2,42	48,56±2,38	42,30±2,12
1:20	40,09±1,96	49,06±2,35	49,08±2,45	43,00±2,15

Таблица 4.2.9 – Суммарное содержание флавоноидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание флавоноидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	38,67±1,89	42,68±2,13	43,22±2,16	39,12±1,96
1:10	45,32±2,27	48,76±2,44	49,54±2,48	47,33±2,37
1:20	46,08±2,21	49,32±2,47	50,06±2,50	46,14±2,31

## Окончание таблицы 4.2.9

Экспозиция 120 мин				
1:5	52,65±2,58	56,22±2,81	57,33±2,87	53,12±2,66
1:10	57,80±2,89	64,75±3,24	65,44±3,27	56,11±2,75
1:20	58,04±2,90	65,34±3,27	66,09±3,30	59,76±3,01
Экспозиция 240 мин				
1:5	66,18±3,31	74,55±3,73	75,12±3,76	68,66±3,43
1:10	72,43±3,2	<b><u>82,33±4,12</u></b>	83,06±4,15	75,12±3,76
1:20	73,78±3,69	82,67±4,13	83,22±4,16	76,05±3,80
Экспозиция 360 мин				
1:5	67,07±3,35	75,32±3,77	75,43±3,77	67,43±3,37
1:10	73,44±3,53	83,11±4,16	84,16±4,21	74,46±3,72
1:20	73,06±3,65	83,06±4,15	83,77±4,19	75,32±3,77

Таблица 4.2.10 – Суммарное содержание гликозидов в этанольных экстрактах корня диоскореи обыкновенной, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание гликозидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	5,17±0,26	6,33±0,30	6,89±0,41	5,74±0,29
1:10	6,32±0,31	8,24±0,40	9,44±0,46	7,10±0,36
1:20	7,77±0,39	9,15±0,46	11,12±0,56	8,14±0,39
Экспозиция 120 мин				
1:5	7,55±0,35	8,25±0,41	11,53±0,56	8,08±0,40
1:10	9,40±0,47	10,03±0,50	14,19±0,71	12,33±0,62
1:20	12,80±0,63	12,18±0,61	16,43±0,82	14,50±0,71
Экспозиция 240 мин				
1:5	10,67±0,52	13,11±0,66	<b><u>18,46±0,92</u></b>	12,08±0,58
1:10	12,72±0,64	15,34±0,75	18,53±0,89	14,37±0,72
1:20	14,88±0,74	15,48±0,77	18,30±0,92	14,95±0,73
Экспозиция 360 мин				
1:5	11,06±0,55	13,08±0,65	18,65±0,90	12,56±0,63
1:10	12,90±0,63	15,43±0,76	18,30±0,92	13,11±0,66
1:20	15,05±0,75	15,56±0,78	19,04±0,91	14,07±0,70

Таблица 4.2.11 – Суммарное содержание гликозидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней диоскореи обыкновенной, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание гликозидов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	12,57±0,62	15,12±0,76	18,44±0,92	14,40±0,72
1:10	15,08±0,75	18,84±0,89	22,06±1,06	16,35±0,78
1:20	16,66±0,81	21,21±1,06	24,47±1,22	15,54±0,78
Экспозиция 120 мин				
1:5	17,01±0,82	24,56±1,23	26,75±1,34	23,35±1,17
1:10	23,45±1,17	27,09±1,35	31,44±1,51	25,40±1,27
1:20	27,21±1,36	29,15±1,46	35,88±1,79	26,15±1,25
Экспозиция 240 мин				
1:5	31,08±1,55	42,13±2,11	<b>54,22±2,60</b>	35,65±1,78
1:10	35,78±1,79	47,76±2,39	54,36±2,72	38,30±1,92
1:20	37,11±1,86	48,10±2,41	52,25±2,61	39,03±1,95
Экспозиция 360 мин				
1:5	32,00±1,60	42,54±2,13	55,04±2,75	36,32±1,82
1:10	36,12±1,81	48,09±2,40	54,77±2,74	39,23±1,96
1:20	37,05±1,83	48,33±2,37	53,11±2,66	39,58±1,98

Таблица 4.2.12 – Суммарное содержание хромонов в этанольных экстрактах стебля сапожниковии растопыренной, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание хромонов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	4,48±0,22	7,32±0,37	9,11±0,44	6,50±0,33
1:10	6,21±0,30	9,12±0,44	13,44±0,67	8,18±0,41
1:20	7,19±0,36	12,08±0,60	16,76±0,84	11,32±0,55

Окончание таблицы 4.2.12

Экспозиция 120 мин				
1:5	13,11±0,66	18,33±0,92	25,09±1,23	15,06±0,75
1:10	15,66±0,78	21,09±1,05	27,45±1,37	18,55±0,91
1:20	17,00±0,82	22,78±1,14	<b>33,12±1,66</b>	21,90±1,09
Экспозиция 240 мин				
1:5	13,25±0,66	18,56±0,93	25,43±1,27	16,79±0,81
1:10	16,09±16,04	22,32±1,12	27,78±1,39	21,04±1,05
1:20	17,11±0,86	23,01±1,13	33,55±1,64	25,54±1,28
Экспозиция 360 мин				
1:5	13,21±0,63	18,40±0,92	25,23±1,51	15,77±0,79
1:10	15,85±0,79	21,33±1,07	27,64±1,38	20,46±1,02
1:20	17,20±0,86	22,90±1,15	33,20±1,59	25,49±1,27

Таблица 4.2.13 – Суммарное содержание хромонов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней сапожниковии растопыренной, полученных методом мацерации

Гидромодуль	Суммарное содержание хромонов, мг/мл экстракта			
	Температура экстракции, °С			
	30	40	60	кипение
Экспозиция 60 мин				
1:5	32,65±1,63	35,12±1,76	38,88±1,94	34,56±1,73
1:10	43,78±2,15	46,09±2,30	47,90±2,40	45,82±2,29
1:20	48,90±2,44	52,78±2,59	55,43±2,77	47,06±2,31
Экспозиция 120 мин				
1:5	67,90±3,40	74,33±3,72	81,80±4,09	72,27±3,61
1:10	73,10±3,51	76,12±3,81	85,34±4,18	75,09±3,75
1:20	78,12±3,91	80,11±4,06	<b>94,56±4,73</b>	76,37±3,82
Экспозиция 240 мин				
1:5	68,12±3,27	74,72±3,59	82,31±4,12	71,21±3,56
1:10	73,44±3,67	76,54±3,83	86,00±4,30	74,85±3,74
1:20	78,32±3,92	80,32±4,02	95,67±4,78	75,40±3,77
Экспозиция 360 мин				
1:5	67,88±3,39	74,66±3,73	82,04±4,12	71,50±3,58
1:10	73,32±3,67	76,60±3,75	85,65±4,28	75,01±3,75
1:20	78,08±3,90	80,25±4,01	95,11±4,76	75,84±3,79

Полученные результаты определения содержания действующих веществ в экстрактах, полученных методом мацерации, показали, что экстракцию растительного материала левзеи сафлоровидной 40 %-ным этанолом целесообразно проводить при температуре 40 °С, гидромодуле 1:10 в течение 4 ч, при этом выход экистероидов из высушенной биомассы культуры адвентивных корней (76,12 мг/мл) *Rhaponticum carthamoides* превышает таковой для корневища растения (33,56 мг/мл) в 2,27 раза (таблицы 4.2.2–4.2.3). Что касается женьшеня обыкновенного, в качестве наиболее рациональных параметров экстракции, позволяющих максимально извлечь тритерпеновые гликозиды из растительного сырья, выбраны температура 60 °С, гидромодуль 1:10 и продолжительность 4 ч. Следует отметить превышение содержания тритерпеновых гликозидов в экстрактах из высушенной биомассы каллусной культуры *Panax ginseng* (67,12 мг/мл) по сравнению с экстрактами корня (28,11 мг/мл) данного растения в 2,39 раза (таблицы 4.2.4–4.2.5).

Экстракцию корневища и биомассы корневой культуры *in vitro* элеутерококка колючего рекомендуется проводить при температуре 40 °С, гидромодуле 1:20 в течение 2 ч. Корневые культуры *in vitro* *Eleutherococcus senticosus* накапливают в 1,73 раза больше фенилпропаноидов по сравнению с корневищем данного растения (соответственно, 74,06 и 42,78 мг/мл, таблицы 4.2.6–4.2.7). Максимальное суммарное содержание флавоноидов в этанольных экстрактах клубней (47,34 мг/мл) и высушенной биомассы каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого (82,33 мг/мл) отмечается при температуре 40 °С, гидромодуле 1:10 и продолжительности процесса 4 ч. Суммарное содержание флавоноидов в биомассе каллусной культуры *Dactylorhiza maculata* превышает данный показатель для клубней в 1,74 раза (таблицы 4.2.8–4.2.9). Для экстракции диоскореи обыкновенной рекомендованы параметры: температура 60 °С, гидромодуль 1:5, продолжительность 4 ч, причем биомасса культуры адвентивных корней (54,22 мг/мл) *Dioscorea communis* накапливает в 2,94 раза больше гликозидов, чем корень растения (18,46 мг/мл, таблицы 4.2.10–4.2.11).



Наконец, рациональными параметрами водно-этанольной экстракции комплекса хромонов из сапожниковии растопыренной являются: температура 60 °С, гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч. Выход хромонов из биомассы корневой культуры *Saposhnikovia divaricata* (94,56 мг/мл) в 2,86 раза превышает выход данных БАВ из стебля растения (33,12 мг/мл, таблицы 4.2.12–4.2.13).

### **4.3 Подбор параметров экстракции природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений методом циркуляционного экстрагирования**

Из динамических методов наибольший интерес представляло циркуляционное экстрагирование (перколяция в аппарате Сокслета), характеризующееся повышенной скоростью диффузии по сравнению со статическими методами экстракции.

Провели серию экспериментов с использованием в качестве экстрагента 40 %-ного этилового спирта в аппарате Сокслета, экстракция осуществлялась при температуре кипения растворителя. Варьируемыми параметрами являлись гидромодуль (1:5, 1:10, 1:20) и экспозиция (60, 120, 240, 360 мин). Результаты экспериментов приведены на рисунках 4.3.1–4.3.12.

Анализ рисунков 4.3.1–4.3.12 позволил сделать вывод о более высокой эффективности экстракции комплексов целевых БАВ из изучаемого растительного сырья при использовании циркуляционного экстрагирования по сравнению с мацерацией. Так, для экстракта корневища левзеи сафлоровидной суммарное содержание экдистероидов в экстракте при перколяции составило 45,75 мг/мл (рисунок 4.3.1), что превышает данный показатель для аналогичного экстракта, полученного мацерацией, на 36,3 %. Для экстракта биомассы культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной данные значения составили, соответственно, 102,34 мг/мл и 34,4 % (рисунок 4.3.2).

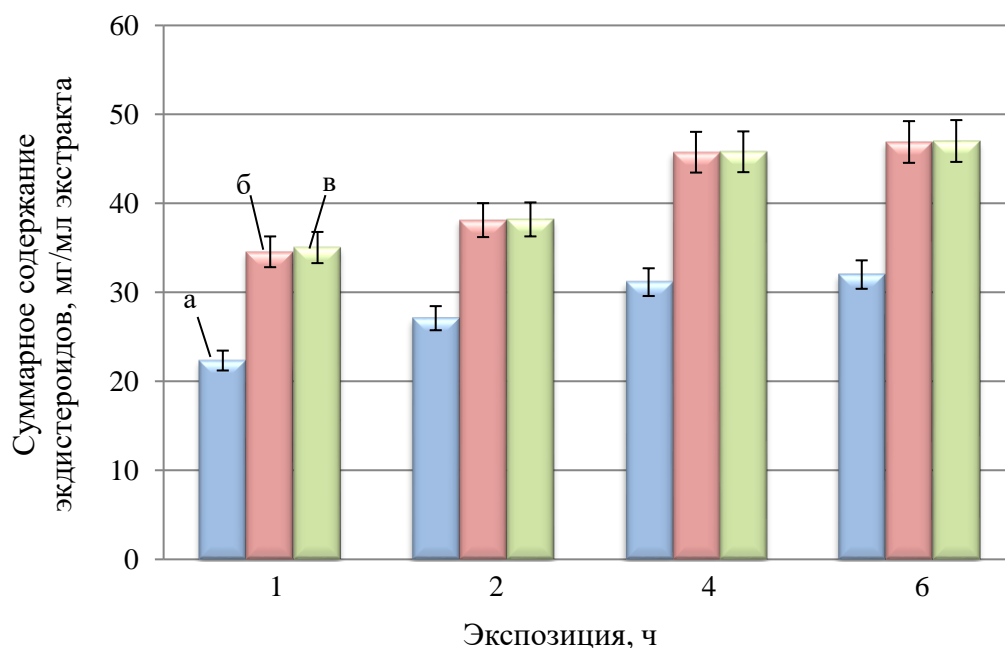


Рисунок 4.3.1 – Суммарное содержание эхдистероидов в этанольных экстрактах корневища левзеи сафлоровидной, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

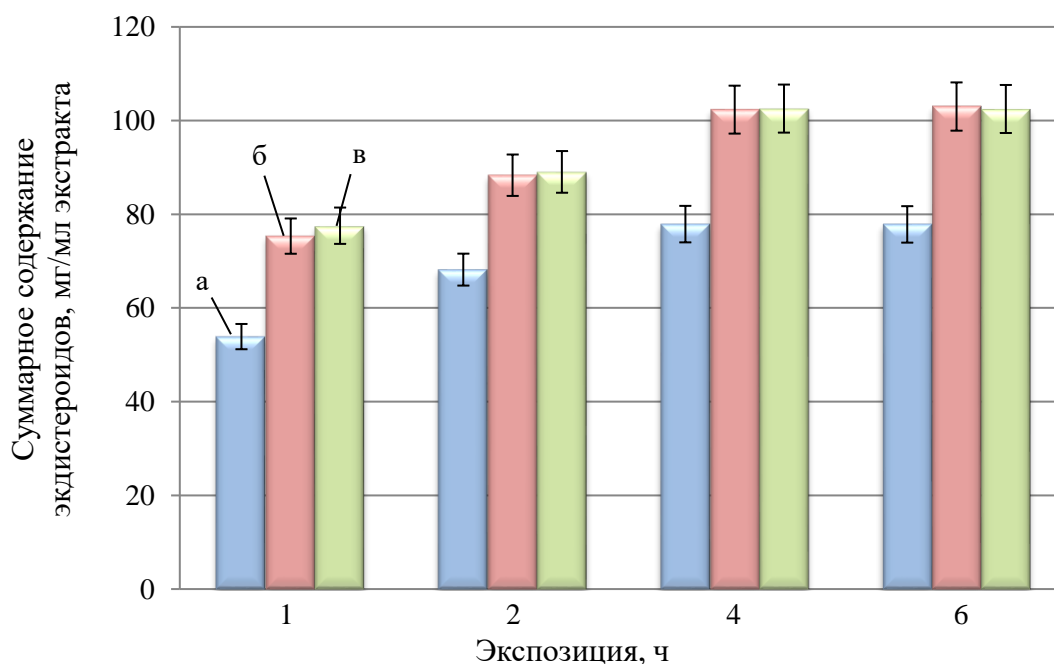


Рисунок 4.3.2 – Суммарное содержание эхдистероидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

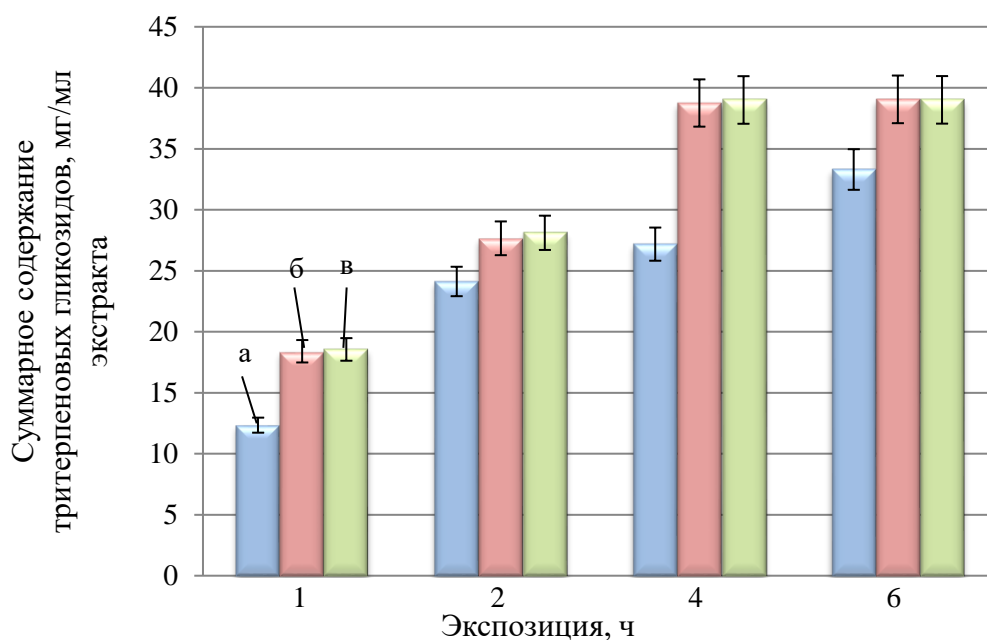


Рисунок 4.3.3 – Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов в этанольных экстрактах корня женьшеня обыкновенного, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

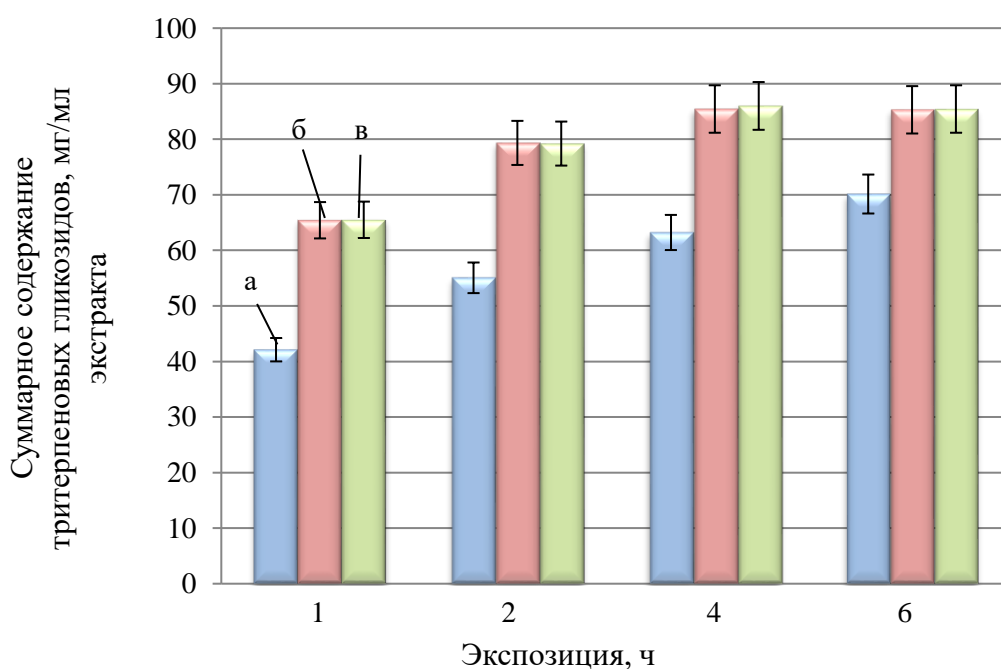


Рисунок 4.3.4 – Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы каллусной культуры женьшеня обыкновенного, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

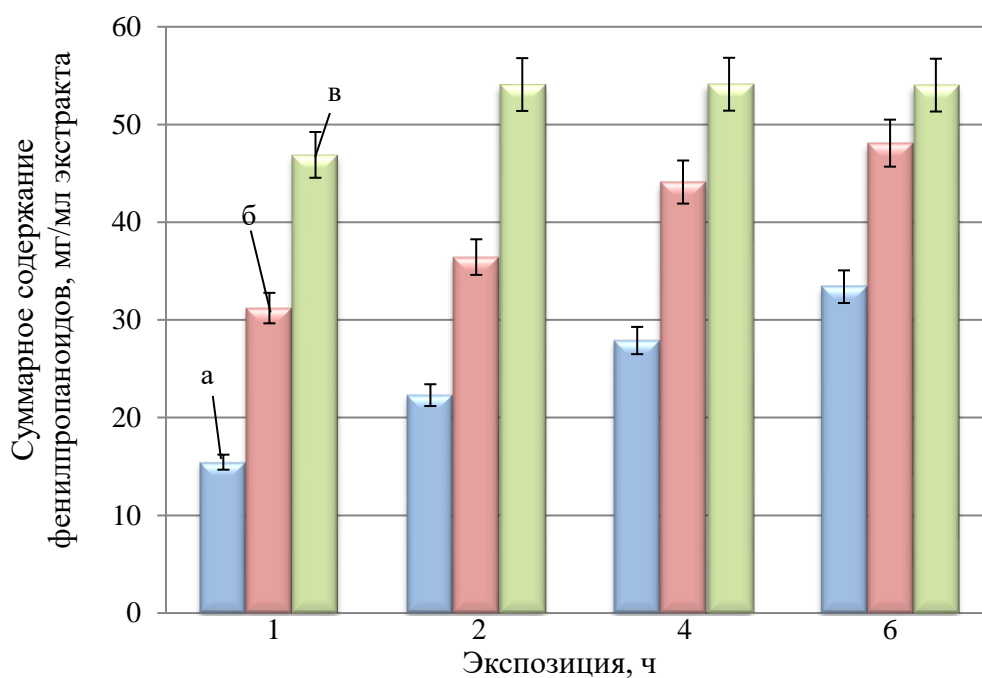


Рисунок 4.3.5 – Суммарное содержание фенилпропаноидов в этанольных экстрактах корневища элеутерококка колючего, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

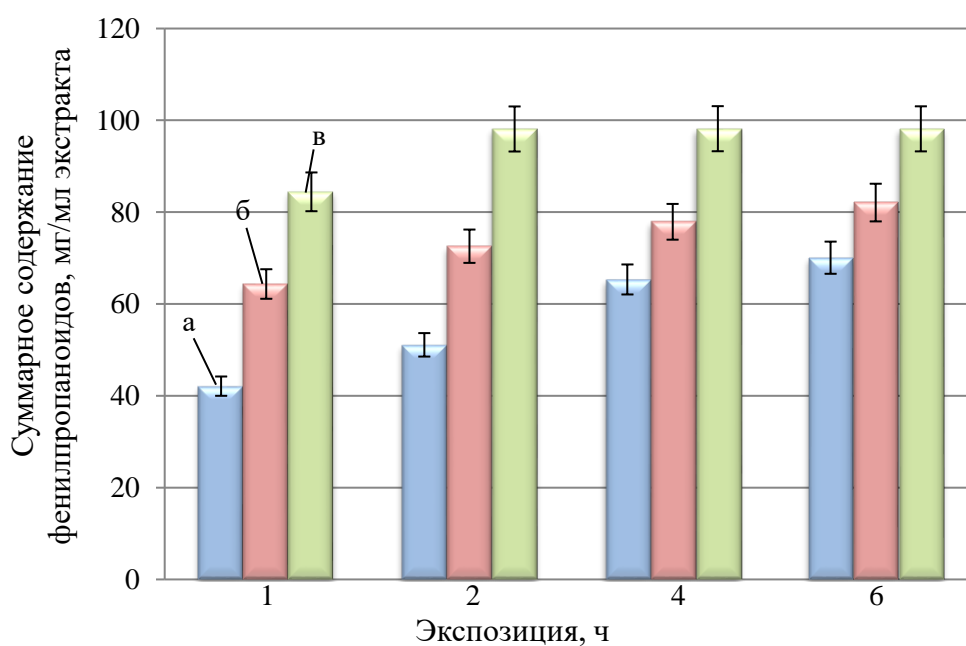


Рисунок 4.3.6 – Суммарное содержание фенилпропаноидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней элеутерококка колючего, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

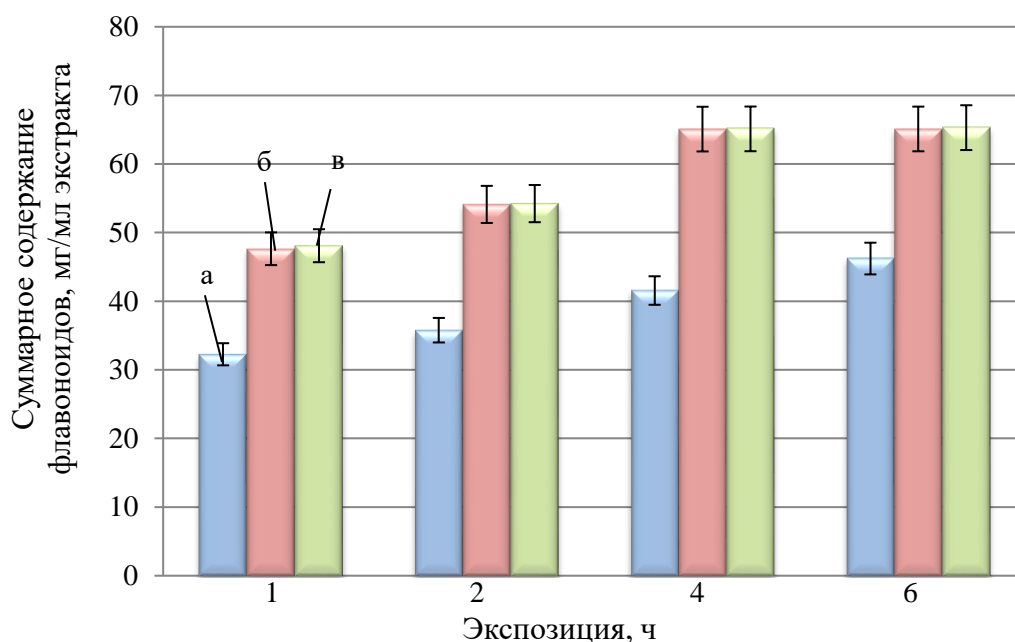


Рисунок 4.3.7 – Суммарное содержание флавоноидов в этанольных экстрактах клубней пальчатокоренника пятнистого, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

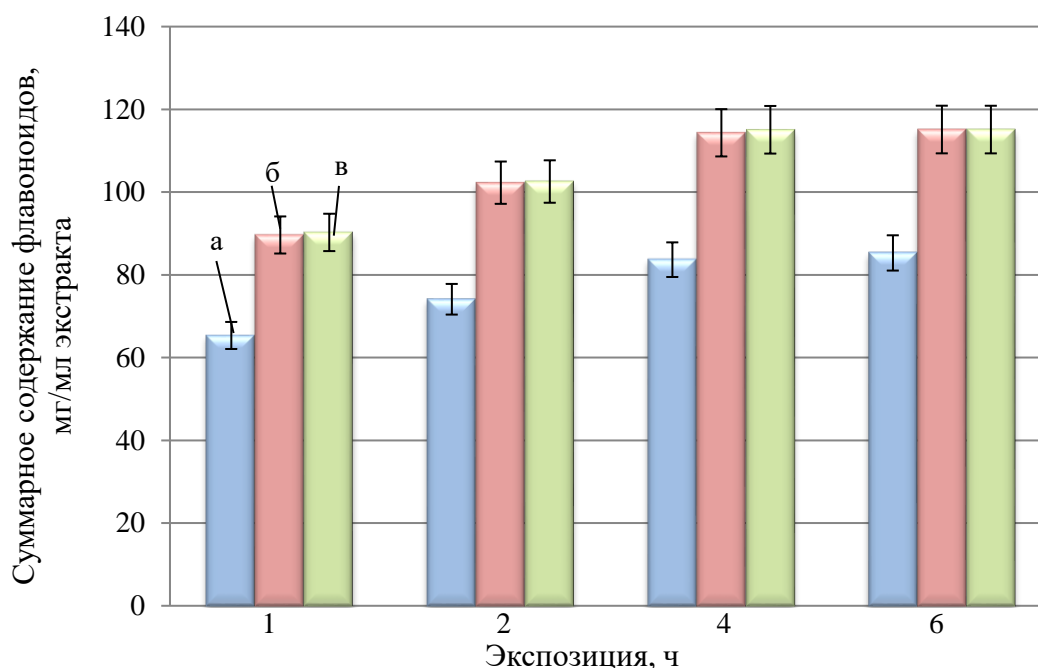


Рисунок 4.3.8 – Суммарное содержание флавоноидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

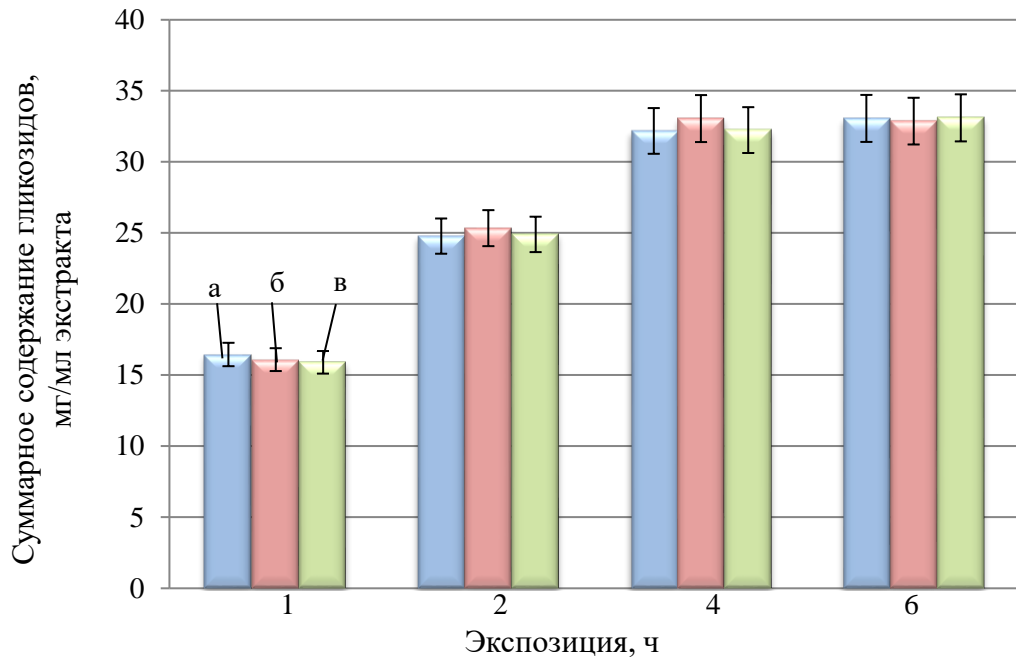


Рисунок 4.3.9 – Суммарное содержание гликозидов в этанольных экстрактах корней диоскорей обыкновенной, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

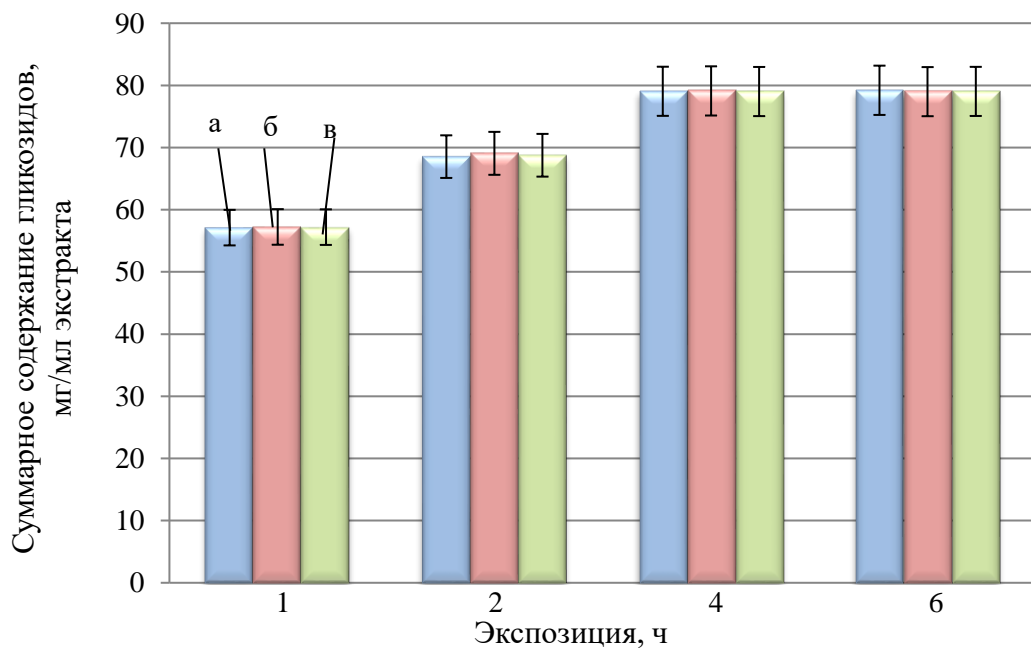


Рисунок 4.3.10 – Суммарное содержание гликозидов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней диоскорей обыкновенной, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

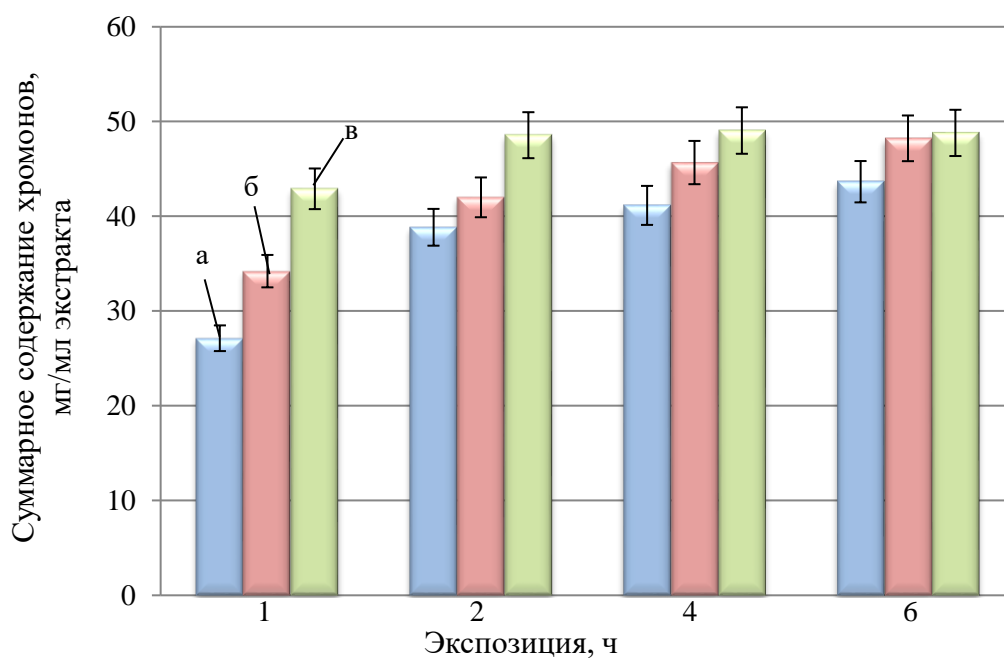


Рисунок 4.3.11 – Суммарное содержание хромонов в этанольных экстрактах стебля сапожниковии растопыренной, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

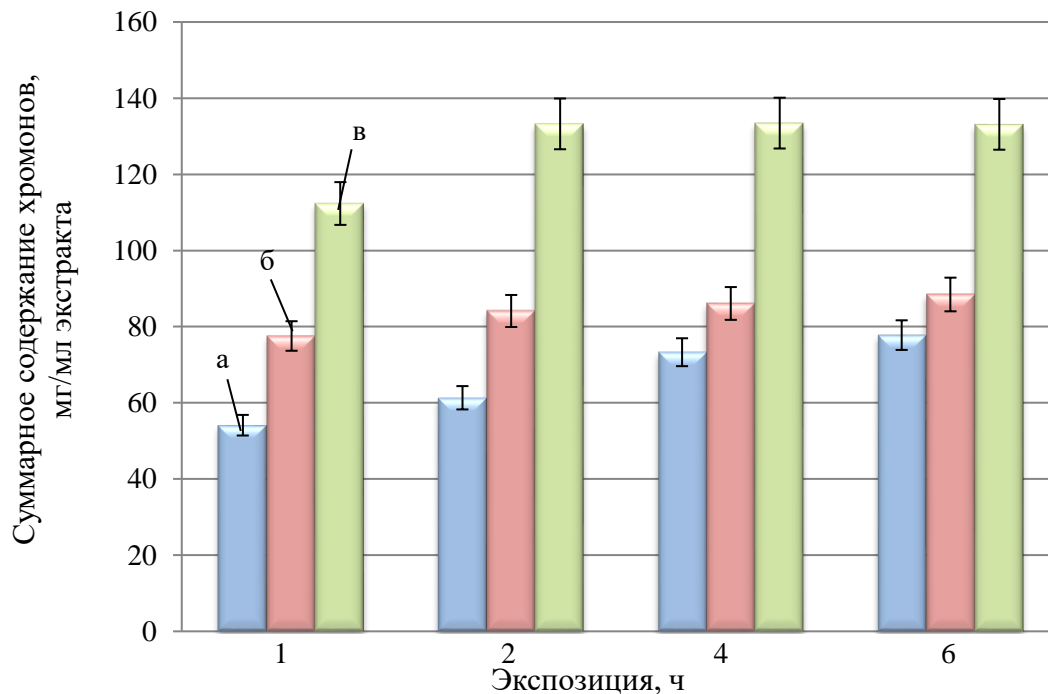


Рисунок 4.3.12 – Суммарное содержание хромонов в этанольных экстрактах высушенной биомассы культуры адвентивных корней сапожниковии растопыренной, полученных методом перколяции: а – гидромодуль 1:5; б – гидромодуль 1:10; в – гидромодуль 1:20

Рациональные параметры циркуляционного экстрагирования корневища и биомассы корневой культуры *in vitro* левзеи сафлоровидной: гидромодуль 1:10 в течение 4 ч. Дальнейшее увеличение соотношения сырье / экстрагент и продолжительности процесса не сопровождается заметным ростом содержания целевых БАВ в экстракте, следовательно, не целесообразно.

В экстракте корня женьшеня обыкновенного, полученном методом перколяции, отмечено превышение суммарного содержания тритерпеновых гликозидов (38,75 мг/мл) на 37,9 % по сравнению с экстрактом, полученным мацерацией (рисунок 4.3.3). Для экстракта биомассы каллусной культуры женьшеня обыкновенного данные значения равны, соответственно, 85,44 мг/мл и 27,3 % (рисунок 4.3.4). Рациональные параметры циркуляционного экстрагирования корня и биомассы каллусной культуры женьшеня обыкновенного: гидромодуль 1:10 в течение 4 ч.

В экстракте корневища элеутерококка колючего, полученном методом перколяции в аппарате Сокслета, зафиксировано более высокое (54,09 мг/мл) на 26,4 % содержание фенолпропаноидов, чем в аналогичном экстракте – результате метода мацерации (рисунок 4.3.5). Для экстракта биомассы культуры адвентивных корней элеутерококка колючего данные значения равны, соответственно, 98,12 мг/мл и 32,5 % (рисунок 4.3.6). Рациональные параметры циркуляционного экстрагирования корневища и биомассы культуры адвентивных корней элеутерококка колючего: гидромодуль 1:20 в течение 2 ч.

Экстракт клубней пальчатокоренника пятнистого, полученный методом циркуляционного экстрагирования (рисунок 4.3.7), характеризуется повышенным на 37,5 % по сравнению с экстрактом, полученным методом мацерации, содержанием флавоноидов (65,09 мг/мл). Для экстракта биомассы каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого данные значения равны, соответственно, 114,33 мг/мл и 38,9 % (рисунок 4.3.8). Рациональные параметры циркуляционного экстрагирования клубней и биомассы каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого: гидромодуль 1:10 в течение 4 ч.



Экстракт корня диоскореи обыкновенной, полученный методом перколяции, характеризуется повышенным на 74,3 % содержанием гликозидов (32,18 мг/мл) по сравнению с экстрактом, полученным в результате мацерации (рисунок 4.3.9). Для экстракта биомассы корневой культуры *in vitro* диоскореи обыкновенной данные значения равны, соответственно, 79,05 мг/мл и 45,8 % (рисунок 4.3.10). Рациональные параметры циркуляционного экстрагирования корня и биомассы корневой культуры *in vitro* диоскореи обыкновенной: гидромодуль 1:5 в течение 4 ч.

Для экстракта стебля сапожниковии растопыренной суммарное содержание хромонов в экстракте при перколяции составило 48,56 мг/мл, что превышает данный показатель для аналогичного экстракта, полученного мацерацией, на 46,6 % (рисунок 4.3.11). Для экстракта биомассы культуры адвентивных корней сапожниковии растопыренной данные значения составили, соответственно, 133,25 мг/мл и 40,9 % (рисунок 4.3.12). Рациональные параметры циркуляционного экстрагирования стебля и биомассы корневой культуры *in vitro* сапожниковии растопыренной: гидромодуль 1:20 в течение 2 ч.

#### **4.4 Подбор параметров микроволновой экстракции природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений**

Для интенсификации процесса извлечения биологически активных веществ из растительного сырья и снижения продолжительности экстракции изучали процесс микроволновой экстракции при использовании 40 %-ного этанола в качестве экстрагента и гидромодулей, выбранных на предыдущем этапе. Продолжительность экстрагирования варьировали в диапазоне от 10 до 60 мин с шагом 10 мин, мощность микроволнового излучения – от 200 до 600 Вт с шагом 100 Вт. Полученные результаты приведены на рисунках 4.4.1–4.4.6.

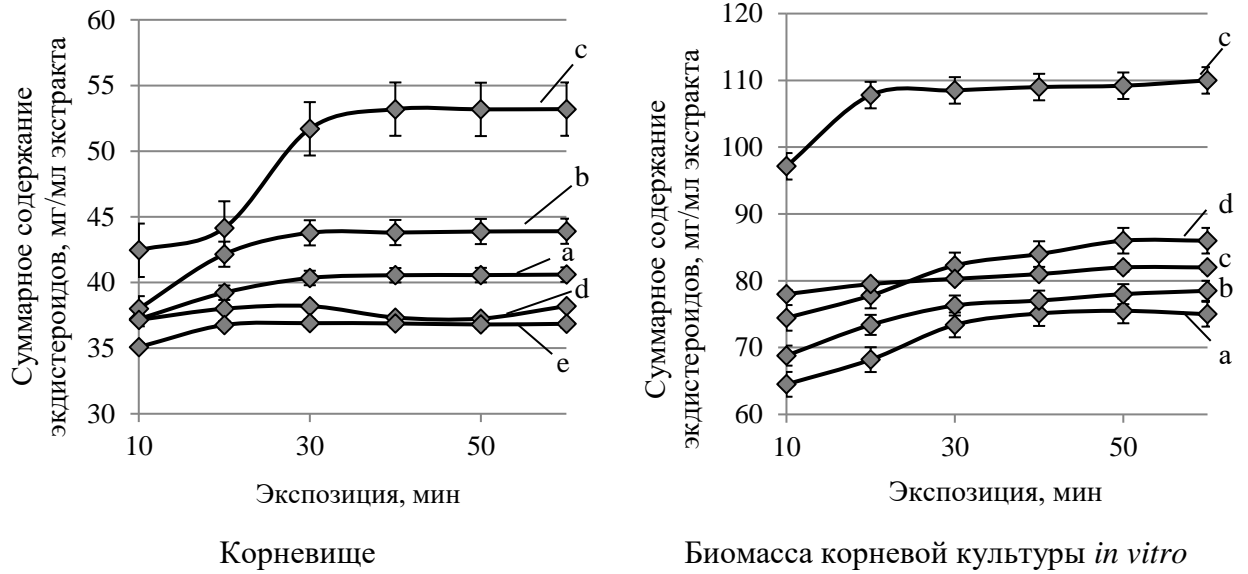


Рисунок 4.4.1 – Суммарное содержание экистероидов в экстрактах левзеи сафлоровидной, полученных путем микроволновой экстракции: а – мощность излучения 200 Вт, б – 300 Вт, с – 400 Вт, д – 500 Вт, е – 600 Вт

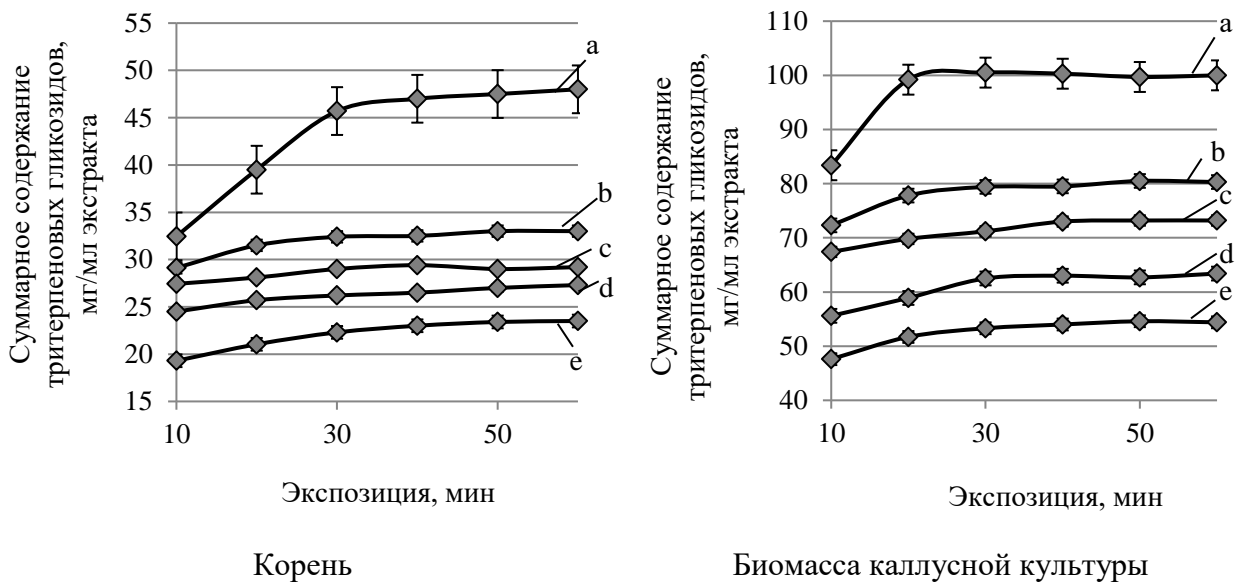


Рисунок 4.4.2 – Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов в экстрактах женьшеня обыкновенного, полученных путем микроволновой экстракции: а – мощность излучения 200 Вт, б – 300 Вт, с – 400 Вт, д – 500 Вт, е – 600 Вт

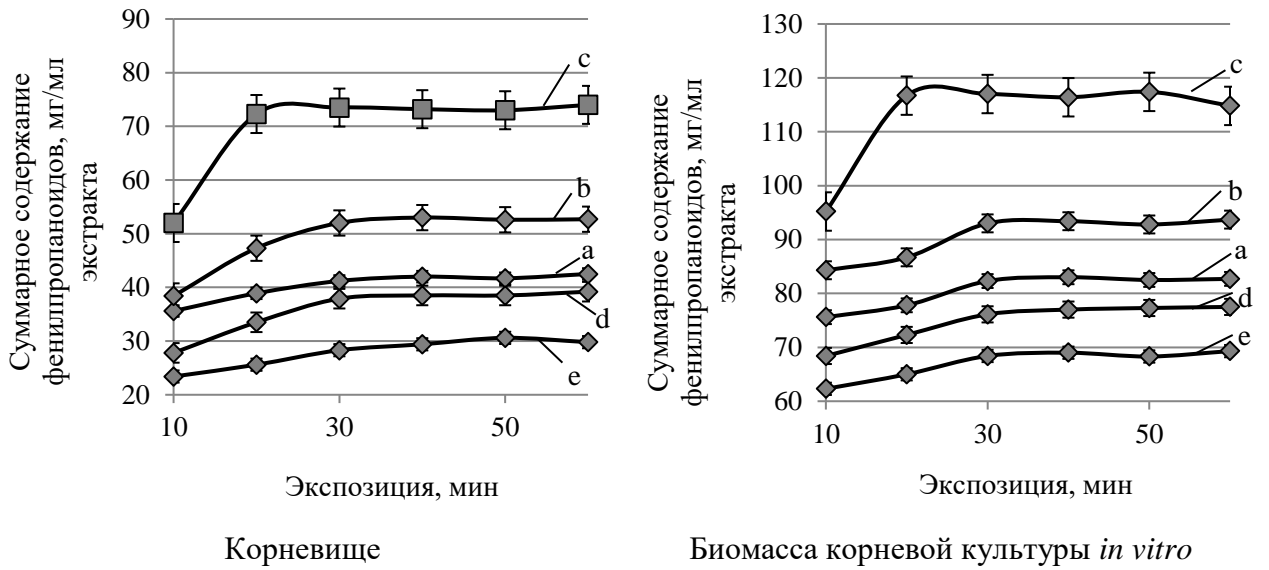


Рисунок 4.4.3 – Суммарное содержание фенилпропаноидов в экстрактах элеутерококка колючего, полученных путем микроволновой экстракции: а – мощность излучения 200 Вт, б – 300 Вт, в – 400 Вт, д – 500 Вт, е – 600 Вт

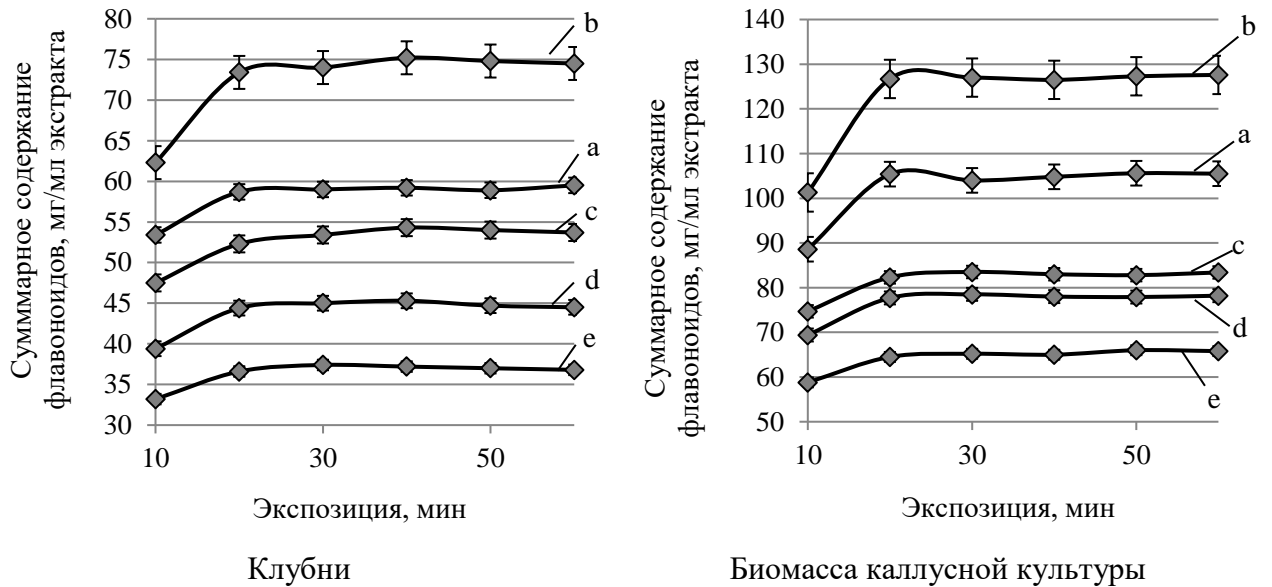


Рисунок 4.4.4 – Суммарное содержание флавоноидов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого, полученных путем микроволновой экстракции: а – мощность излучения 200 Вт, б – 300 Вт, в – 400 Вт, д – 500 Вт, е – 600 Вт

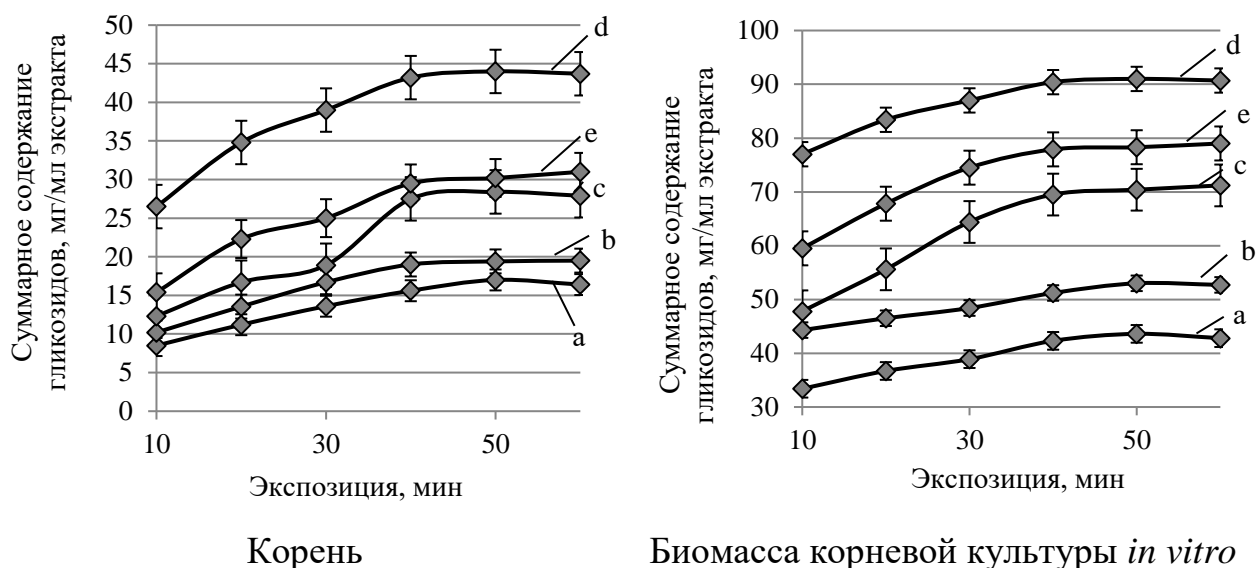


Рисунок 4.4.5 – Суммарное содержание гликозидов в экстрактах диоскореи обыкновенной, полученных путем микроволновой экстракции: а – мощность излучения 200 Вт, б – 300 Вт, с – 400 Вт, д – 500 Вт, е – 600 Вт

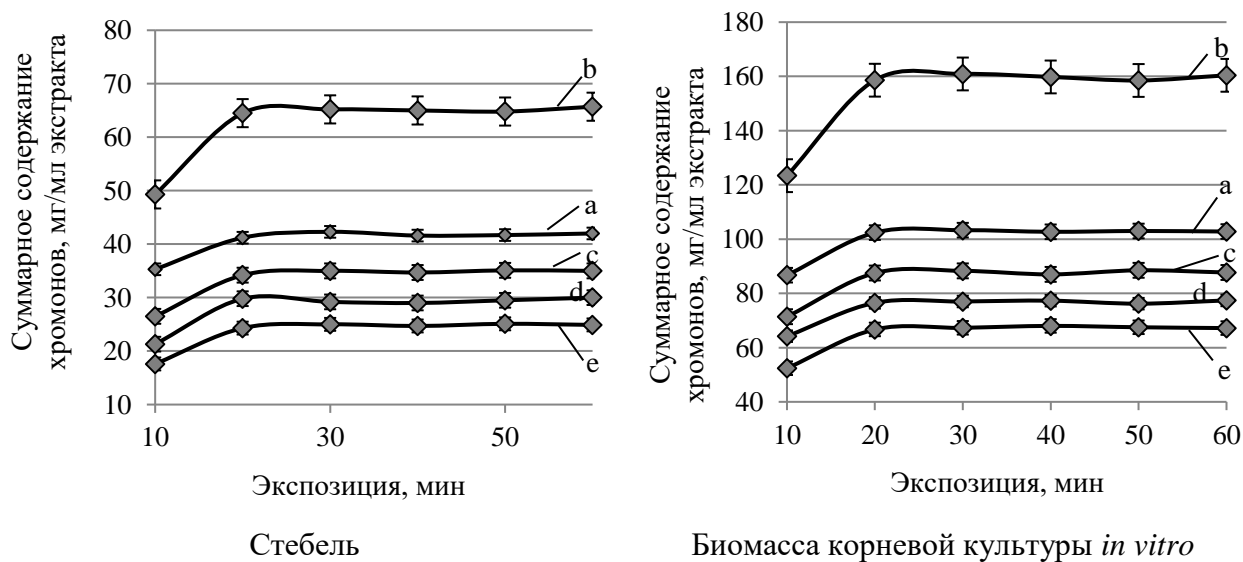


Рисунок 4.4.6 – Суммарное содержание хромонов в экстрактах сапожниковии растопыренной, полученных путем микроволновой экстракции: а – мощность излучения 200 Вт, б – 300 Вт, с – 400 Вт, д – 500 Вт, е – 600 Вт

Полученные результаты показали, что микроволновая экстракция изучаемого растительного сырья позволяет достичь более высокого уровня извлечения целевых БАВ при меньшей продолжительности процесса по сравнению с мацерацией и перколяцией.

При микроволновой экстракции корневища левзеи сафлоровидной (мощность излучения 400 Вт, продолжительность 30 мин) суммарное содержание экистероидов в полученном экстракте составляет 51,70 мг/мл, что превышает данное значение в экстракте, полученном перколяцией (45,75 мг/мл) на 13,0 %. Микроволновая экстракция биомассы корневой культуры *in vitro* данного растения при мощности 400 Вт в течение 30 мин позволяет получить суммарное содержание экистероидов на уровне 108,50 мг/мл, что выше аналогичного показателя для метода перколяции (102,34 мг/мл) на 6,0 % (рисунок 4.4.1).

В экстракте корня женьшеня обыкновенного, полученном под действием микроволнового излучения (200 Вт, 30 мин), зафиксировано повышенное на 17,9 % суммарное содержание тритерпеновых гликозидов по сравнению с экстрактом, полученным циркуляционным экстрагированием (38,75 мг/мл). Аналогичное значение превышения суммарного содержания тритерпеновых гликозидов для случая экстракции биомассы каллусной культуры женьшеня обыкновенного составляет 17,6 % (при перколяции – 85,44 мг/мл, при микроволновом способе экстракции – 100,50 мг/мл, рисунок 4.4.2).

Микроволновая экстракция корневища элеутерококка колючего при мощности излучения 400 Вт в течение 20 мин позволяет получить суммарное содержание фенилпропаноидов (72,3 мг/мл), на 33,7 % превышающее аналогичное значение в экстракте, полученном перколяцией (54,09 мг/мл). В экстракте биомассы культура адвентивных корней элеутерококка колючего накапливается 116,70 мг/мл фенилпропаноидов, что на 18,9 % выше, чем в аналогичном экстракте, полученном методом перколяции (98,12 мг/мл, рисунок 4.4.3).

Экстракт, полученный в результате микроволновой экстракции клубней пальчатокоренника пятнистого при мощности излучения 300 Вт в течение

20 мин, характеризуется повышенным на 12,8 % содержанием флавоноидов (73,40 мг/мл) по сравнению с экстрактом, полученным в результате перколяции (65,09 мг/мл). Для экстракта из биомассы каллусной культуры данного растения, полученного под действием микроволнового излучения при аналогичных параметрах, отмечено содержание флавоноидов на уровне 126,70 мг/мл, что выше на 10,8 %, чем при использовании метода перколяции (114,33 мг/мл, рисунок 4.4.4).

В экстракте, полученном из корня диоскорей обыкновенной методом микроволновой экстракции (мощность излучения 500 Вт, продолжительность 40 мин), суммарное содержание гликозидов (43,20 мг/мл) на 34,2 % выше, чем при циркуляционном экстрагировании в аппарате Сокслета (32,18 мг/мл). Что касается экстракта, полученного под действием микроволнового излучения из корневой культуры *in vitro* данного растения, в нем отмечено содержание гликозидов (90,40 мг/мл), на 14,4 % превышающее данный показатель для метода перколяции (79,05 мг/мл, рисунок 4.4.5).

Экстракт стебля сапожниковии растопыренной, полученный микроволновой экстракцией (300 Вт, 20 мин), демонстрирует повышенное на 32,8 % суммарное содержание хромонов (64,50 мг/мл) по сравнению с экстрактом, полученным методом перколяции (48,56 мг/мл). Для экстракта из биомассы корневой культуры *in vitro* данного растения зафиксировано суммарное содержание хромонов на уровне 158,60 мг/мл, что на 19,0 % выше, чем в аналогичном экстракте, полученном методом перколяции (133,25 мг/мл, рисунок 4.4.6).

#### 4.5 Заключение по четвертой главе

На основе результатов оценки ростовых характеристик подобраны составы питательных сред и параметры культивирования клеточных культур *in vitro* (каллусных культур и адвентивных корней) растений левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной.

Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры левзеи сафлоровидной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, кинетин – 0,3 мг, 2,4-Д – 1,0 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусных культур элеутерококка колючего (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, гидролизат казеина – 500 мг, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, кинетин – 1,0 мг, НУК – 2,0 мг.

Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры женьшеня обыкновенного (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 1,0 мг, пиридоксин – 1,0 мг, кальция пантотенат – 10 мг, кинетин – 0,05 мг, НУК – 0,1 мг, 2,4-Д – 0,5 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, БАП – 0,3 мг, НУК – 2,0 мг.

Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры диоскореи обыкновенной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, БАП – 1,0 мг, 2,4-Д – 2,0 мг.

Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры сапожниковии растопыренной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Гамборгу, сахароза – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 1,0 мг, пиридоксин – 1,0 мг, кальция пантотенат – 10 мг, БАП – 0,05 мг, аденин – 1,0 мг, ИУК – 1,0 мг.

Параметры культивирования каллусов: в темноте, при температуре 23 °С, в течение 28 суток.

Для выращивания корневых культур рекомендуется использовать параметры: штамм для трансформации – *Agrobacterium rhizogenes* A4, классическая среда Гамборга, не содержащая гормоны, но содержащая антибиотик цефотаксим, температура культивирования 23 °С в течение 5 недель при перемешивании (100 об/мин), в темноте.

Подобраны параметры экстракции природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений методом мацерации:

– для корневища и культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, температура 40 °С, гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч; суммарное содержание экистероидов при данных условиях в экстракте корневища *R. carthamoides* составляет 33,56 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 76,12 мг/мл;

– для корня и каллусной культуры женьшеня обыкновенного: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, температура 60 °С, гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч; суммарное содержание тритерпеновых гликозидов при данных условиях в экстракте корня *Panax ginseng* составляет 28,11 мг/мл, в экстракте каллусной культуры – 67,12 мг/мл;

– для корневища и корневой культуры *in vitro* элеутерококка колючего: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, температура 40 °С, гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч; суммарное содержание фенилпропаноидов при данных условиях в экстракте корневища *Eleutherococcus senticosus* составляет 42,78 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 74,06 мг/мл;

– для клубней и каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, температура 40 °С, гидромодуль



1:10, продолжительность 4 ч; суммарное содержание флавоноидов при данных условиях в экстракте клубней *Dactylorhiza maculata* составляет 47,34 мг/мл, в экстракте каллусной культуры – 82,33 мг/мл;

– для корня и культуры адвентивных корней диоскореи обыкновенной: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, температура 60 °С, гидромодуль 1:5, продолжительность 4 ч; суммарное содержание гликозидов при данных условиях в экстракте корня *Dioscorea communis* составляет 18,46 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 54,22 мг/мл;

– для стебля и корневой культуры *in vitro* сапожниковии растопыренной: экстрагент – 40 %-ный этиловый спирт, температура 60 °С, гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч; суммарное содержание хромонов при данных условиях в экстракте стебля *Saposhnikovia divaricata* составляет 33,12 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 94,56 мг/мл.

С целью увеличения выхода целевых БАВ в экстракты подобраны параметры экстракции природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений методом циркуляционного экстрагирования с использованием в качестве экстрагента 40 %-ного этилового спирта (при температуре кипения растворителя):

- для корневища и культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной: гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч; суммарное содержание экистероидов при данных условиях в экстракте корневища *R. carthamoides* составляет 45,75 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 102,34 мг/мл;
- для корня и каллусной культуры женьшеня обыкновенного: гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч; суммарное содержание тритерпеновых гликозидов при данных условиях в экстракте корня *Panax ginseng* составляет 38,75 мг/мл, в экстракте каллусной культуры – 85,44 мг/мл;
- для корневища и корневой культуры *in vitro* элеутерококка колючего: гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч; суммарное содержание

фенилпропаноидов при данных условиях в экстракте корневища *Eleutherococcus senticosus* составляет 54,09 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 98,12 мг/мл;

- для клубней и каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого: гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч; суммарное содержание флавоноидов при данных условиях в экстракте клубней *Dactylorhiza maculata* составляет 65,09 мг/мл, в экстракте каллусной культуры – 114,33 мг/мл;
- для корня и культуры адвентивных корней диоскореи обыкновенной: гидромодуль 1:5, продолжительность 4 ч; суммарное содержание гликозидов при данных условиях в экстракте корня *Dioscorea communis* составляет 32,18 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 79,05 мг/мл;
- для стебля и корневой культуры *in vitro* сапожниковии растопыренной: гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч; суммарное содержание хромонов при данных условиях в экстракте стебля *Saposhnikovia divaricata* составляет 48,56 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 133,25 мг/мл.

Для интенсификации процесса извлечения биологически активных веществ из растительного сырья и снижения продолжительности экстракции подобраны параметры микроволновой экстракции при использовании 40 %-ного этанола в качестве экстрагента. Выявлено, что рациональными параметрами микроволновой экстракции корневища и культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной являются гидромодуль 1:10, мощность излучения 400 Вт, продолжительность 30 мин. Такой вариант экстракции способствует более полному извлечению экидистриодов, их концентрация в экстракте корневища достигает уровня 51,70 мг/мл, в экстракте корневой культуры *in vitro* – 108,50 мг/мл.

Для корня и каллусной культуры женьшеня обыкновенного подобраны рациональные параметры экстракции с использованием микроволнового

излучения: гидромодуль 1:10, мощность излучения 200 Вт, продолжительность 30 мин. При соблюдении данных условий содержание тритерпеновых гликозидов в экстракте корня растения составляет 45,70 мг/мл, в экстракте каллусной культуры – 100,50 мг/мл.

Микроволновую экстракцию корневища и корневой культуры *in vitro* элеутерококка колючего целесообразно вести при гидромодуле 1:20, мощности излучения 400 Вт и продолжительности процесса 20 мин. В полученных экстрактах корневища растения суммарное содержание фенилпропаноидов составляет 72,3 мг/мл, в экстрактах корневой культуры – 116,70 мг/мл.

Рациональные параметры микроволновой экстракции клубней и каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого: гидромодуль 1:10, мощность излучения 300 Вт, продолжительность 20 мин. При данных параметрах в экстракте клубней растения накапливается 73,40 мг/мл флавоноидов, в экстракте каллусной культуры – 126,70 мг/мл флавоноидов.

Для корня и корневой культуры *in vitro* диоскореи обыкновенной подобранные параметры микроволновой экстракции составили: гидромодуль 1:5, мощность излучения 500 Вт, продолжительность 40 мин. В данных условиях в экстракте корня растения суммарное содержание гликозидов составляет 43,20 мг/мл, в экстракте корневой культуры – 90,40 мг/мл.

Рациональные параметры микроволновой экстракции стебля и корневой культуры *in vitro* сапожниковии растопыренной: гидромодуль 1:20, мощность излучения 300 Вт, продолжительность 20 мин. Данные параметры позволяют получить экстракт стебля растения с суммарным содержанием хромонов 64,50 мг/мл и экстракт корневой культуры с суммарным содержанием хромонов 158,60 мг/мл.

## **ГЛАВА 5. АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТОКСИЧНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ**

Глава посвящена изучению компонентного состава и физико-химических свойств экстрактов из природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами (циркуляционное экстрагирование и микроволновая экстракция водно-этанольной смесью). Также в главе представлены результаты оценки биологической активности (антимикробные и антиоксидантные свойства в экспериментах *in vitro*) и показателей токсичности (содержание тяжелых металлов и степень ингибирования хемилюминесценции тест-штамма *Vibrio fischeri*) рассматриваемых экстрактов.

### **5.1 Оценка компонентного состава экстрактов природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами**

По итогам подбора параметров водно-этанольной экстракции комплекса вторичных метаболитов из природного растительного сырья и клеточных культур растений для дальнейших исследований выбрали 28 экстрактов, которым присвоили условные обозначения (таблица 5.1.1).

Для всех полученных экстрактов оценивали компонентный (качественный и количественный) состав методами тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии. Результаты исследований приведены в таблицах 5.1.2–5.1.7.

Таблица 5.1.1 – Экстракты, используемые для изучения компонентного состава

Растительный объект	Обозначение образца	Способ экстракции	Параметры экстракции
<i>R. carthamoides</i> , корневище	Rc-r1	перколяция	гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч
<i>R. carthamoides</i> , корневая культура	Rc-a1	перколяция	гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч
<i>R. carthamoides</i> , корневище	Rc-r2	микроволновая экстракция	гидромодуль 1:10, мощность излучения 400 Вт, продолжительность 30 мин
<i>R. carthamoides</i> , корневая культура	Rc-a2	микроволновая экстракция	
<i>P. ginseng</i> , корень	Pg-r1	перколяция	гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч
<i>P. ginseng</i> , каллус	Pg-c1	перколяция	
<i>P. ginseng</i> , корень	Pg-r2	микроволновая экстракция	гидромодуль 1:10, мощность излучения 200 Вт, продолжительность 30 мин
<i>P. ginseng</i> , каллус	Pg-c2	микроволновая экстракция	
<i>E. senticosus</i> , корневище	Es-r1	перколяция	гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч
<i>E. senticosus</i> , корневая культура	Es-a1	перколяция	гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч
<i>E. senticosus</i> , корневище	Es-r2	микроволновая экстракция	гидромодуль 1:20, мощность излучения 400 Вт, продолжительность 20 мин
<i>E. senticosus</i> , корневая культура	Es-a2	микроволновая экстракция	
<i>D. maculata</i> , клубни	Dm-t1	перколяция	гидромодуль 1:10, продолжительность 4 ч
<i>D. maculata</i> , каллус	Dm-c1	перколяция	
<i>D. maculata</i> , клубни	Dm-t2	микроволновая экстракция	гидромодуль 1:10, мощность излучения 300 Вт, продолжительность 20 мин
<i>D. maculata</i> , каллус	Dm-c2	микроволновая экстракция	
<i>D. communis</i> , корень	Dc-h1	перколяция	гидромодуль 1:5, продолжительность 4 ч
<i>D. communis</i> , корневая культура	Dc-a1	перколяция	
<i>D. communis</i> , корень	Dc-h2	микроволновая экстракция	гидромодуль 1:5, мощность излучения 500 Вт, продолжительность 40 мин
<i>D. communis</i> , корневая культура	Dc-a2	микроволновая экстракция	
<i>S. divaricata</i> , стебель	Sd-s1	перколяция	гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч
<i>S. divaricata</i> , корневая культура	Sd-a1	перколяция	гидромодуль 1:20, продолжительность 2 ч
<i>S. divaricata</i> , стебель	Sd-s2	микроволновая экстракция	гидромодуль 1:20, мощность излучения 300 Вт, продолжительность 20 мин
<i>S. divaricata</i> , корневая культура	Sd-a2	микроволновая экстракция	

Таблица 5.1.2 – Содержание вторичных метаболитов в экстрактах левзеи сафлоровидной

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Rc-r1	Rc-a1	Rc-r2	Rc-a2
β-ситостерин	4,29±0,21	9,54±0,48	5,86±0,28	11,40±0,56
Стигмастерин	6,12±0,33	11,09±0,53	7,11±0,34	12,88±0,67
20-гидроксиэкдизон	11,34±0,54	27,66±1,40	12,15±0,59	29,20±1,41
Изофраксидин	5,55±0,28	12,57±0,63	7,18±0,36	13,30±0,65
β-амирин	3,15±1,58	4,44±0,23	3,69±0,18	5,16±0,25
α-амирин	2,98±0,14	5,09±0,26	3,22±0,15	7,04±0,36
Рутин	14,59±0,74	26,01±1,27	15,57±0,78	28,04±1,37
Мангиферин	4,18±0,21	6,66±0,33	5,12±0,26	10,09±0,50
Кверцетин	16,13±0,81	28,55±1,43	18,07±0,87	31,26±1,56
Апигенин	24,90±1,25	47,12±2,36	26,08±1,30	53,15±2,55
Хлорогеновая кислота	12,78±0,64	24,07±1,18	13,11±0,66	28,47±1,42
Кофейная кислота	18,23±0,91	32,15±1,54	21,09±0,98	45,44±2,23
Феруловая кислота	2,18±0,11	3,45±0,17	2,77±0,13	4,15±0,20
Эллаговая кислота	0,65±0,03	2,11±0,10	0,78±0,04	3,06±0,15
Салициловая кислота	1,98±0,09	2,67±0,13	2,15±0,10	3,95±0,19

Согласно данным, представленным в таблице 5.1.2, в экстрактах *R. carthamoides* установлено высокое содержание флавоноидов апигенина (24,9–53,15 мг/мл), кверцетина (16,13–31,26 мг/мл), рутина (14,59–28,04 мг/мл), представителя экдистероидов – 20-гидроксиэкдизона (11,34–29,20 мг/мл) и фенольных кислот – кофейной (18,23–45,44 мг/мл), хлорогеновой (12,78–28,47 мг/мл). Следует отметить, что максимальное содержание целевых БАВ отмечено в экстрактах культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной, полученных методом микроволновой экстракции, минимальное – в экстрактах корневища растения, полученных перколяцией.

Данные таблицы 5.1.3 свидетельствуют о доминировании в составе экстрактов *P. ginseng* тритерпеновых гликозидов панаксозида (10,99–

27,37 мг/мл), гинзенозида RB<sub>1</sub> (6,34–15,65 мг/мл), а также сиреневой кислоты (3,88–11,48 мг/мл). Максимальные концентрации данных соединений накапливаются в экстрактах каллусной культуры женьшеня обыкновенного, полученных микроволновым воздействием, минимальные – в экстрактах корня женьшеня обыкновенного, полученных в результате перколяции.

Таблица 5.1.3 – Содержание вторичных метаболитов в экстрактах женьшеня обыкновенного

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Pg-r1	Pg-c1	Pg-r2	Pg-c2
Гинзенозид LC <sub>1</sub>	4,12±0,20	7,89±0,39	4,32±0,21	9,36±0,45
Панаксен	0,23±0,01	0,68±0,03	0,48±0,02	0,92±0,06
Гинзенозид RB <sub>1</sub>	6,34±0,30	13,45±0,67	7,05±0,35	16,65±0,83
Панаксозид	10,99±0,55	24,31±1,22	13,02±0,64	27,37±1,37
Гомизин А	0,45±0,02	1,02±0,07	0,77±0,04	1,59±0,08
Гомизин В	0,87±0,04	2,16±0,11	1,12±0,06	2,31±0,11
Экдизон	0,70±0,03	2,38±0,12	1,46±0,07	3,09±0,15
Рутин	0,98±0,05	3,22±0,16	1,77±0,09	3,76±0,19
Кверцетин	1,66±0,08	3,69±0,18	2,31±0,11	5,13±0,25
Мангиферин	0,44±0,02	1,03±0,07	0,95±0,05	1,89±0,09
Кемпферол	0,30±0,02	1,23±0,06	0,67±0,03	1,55±0,07
Сиреневая кислота	3,88±0,19	8,56±0,41	5,22±0,26	11,48±0,57
Кофейная кислота	0,55±0,03	1,87±0,17	1,11±0,06	2,23±0,11
Синапиновая кислота	0,34±0,02	1,09±0,05	0,72±0,04	1,45±0,07
Салициловая кислота	0,47±0,02	1,74±0,09	1,05±0,06	2,07±0,10
Ванилиновая кислота	0,21±0,01	0,76±0,04	0,53±0,03	1,34±0,09
<i>n</i> -кумаровая кислота	0,18±0,01	1,22±0,06	0,49±0,03	1,35±0,08
Феруловая кислота	0,33±0,02	1,44±0,07	1,37±0,08	2,88±0,14

Экстракты *E. senticosus* богаты кофейной кислотой (5,86–13,34 мг/мл), элеутерозидами (7,24–14,05 мг/мл), гиперозидом (4,22–8,52 мг/мл), эритро-гваяцилглицерол- $\beta$ -кониферилловым альдегидным эфиром (4,15–7,41 мг/мл). Наибольшие концентрации целевых БАВ зафиксированы в экстрактах корневой культуры элеутерококка колючего, полученных микроволновой экстракцией, минимальные – в экстрактах корневища растения, полученных перколяцией (таблица 5.1.4).

Таблица 5.1.4 – Содержание вторичных метаболитов в экстрактах элеутерококка колючего

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Es-r1	Es-a1	Es-r2	Es-a2
Сумма элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В (сирингин)	7,24±0,35	11,93±0,61	9,26±0,44	14,05±0,67
2-ацетил-3-гидроксифуран-О- $\alpha$ -D-глюкопиранозид	3,55±0,17	5,74±0,28	4,37±0,21	5,83±0,29
1,6-Бис(3,4,5-тригидроксифенил)-1,6-гександион	2,87±0,14	5,32±0,27	3,65±0,18	4,73±0,22
7,9':7'9-диэпокси-8,8'-лигнан-3,3',4,4',5,5'-гексанол	3,09±0,15	6,11±0,31	4,02±0,20	6,32±0,32
Эритро-гваяцилглицерол- $\beta$ -кониферилловый альдегидный эфир	4,15±0,21	7,64±0,03	5,40±0,27	7,41±0,37
1,3-пропандиол-2-О-4'-синапильный эфир	3,69±0,18	6,09±0,30	4,75±0,24	6,53±0,33
Изофраксидин	1,78±0,09	3,55±0,17	2,31±0,12	3,63±0,18
Сесамин	1,34±0,07	2,49±0,12	1,74±0,09	2,63±0,13
Рутин	3,77±0,19	6,54±0,33	4,86±0,24	6,62±0,33
Гиперозид	4,22±0,20	8,02±0,40	5,43±0,27	8,52±0,43
Кверцитрин	1,08±0,07	1,95±0,09	1,35±0,07	2,09±0,10
Кофейная кислота	5,86±0,29	11,33±0,57	7,68±0,38	13,34±0,67
<i>n</i> -кумаровая кислота	2,99±0,14	5,79±0,29	3,95±0,21	6,79±0,34
Феруловая кислота	3,06±0,15	5,44±0,27	4,04±0,20	6,37±0,32
Олеаноловая кислота	2,80±0,13	5,33±0,27	3,62±0,18	5,70±0,29
Урсоловая кислота	2,74±0,13	4,46±0,21	3,53±0,18	5,36±0,27



Таблица 5.1.5 – Содержание вторичных метаболитов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Dm-t1	Dm-c1	Dm-t2	Dm-c2
Кверцетин	10,45±0,51	18,77±0,92	11,65±0,58	21,47±1,07
Кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозид	7,61±0,38	13,22±0,63	8,43±0,42	14,66±0,73
Рутин	12,34±0,60	23,44±1,17	13,55±0,68	24,06±1,20
Апигенин	6,45±0,32	11,70±0,56	7,17±0,36	12,12±0,61
Колеофолид	4,18±0,21	7,66±0,37	4,67±0,22	8,11±0,41
γ-ситостерол	3,98±0,19	7,55±0,38	4,48±0,22	7,72±0,39
Кофейная кислота	1,87±0,09	3,62±0,18	2,05±0,10	3,51±0,18
Галловая кислота	3,56±0,17	6,12±0,31	4,07±0,20	7,07±0,36
Сиреневая кислота	3,41±0,17	6,54±0,32	3,75±0,19	6,54±0,33
Хлорогеновая кислота	3,32±0,17	6,10±0,30	3,54±0,18	6,07±0,30

Из таблицы 5.1.5 следует, что экстракты *D. maculata* характеризуются высоким содержанием таких флавоноидов, как рутин (12,34–24,06 мг/мл), кверцетин (10,45–21,47), кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозид (7,61–14,66 мг/мл), апигенин (6,45–12,12 мг/мл). Микроволновая экстракция каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого позволяет извлечь максимальное содержание данных БАВ. Минимальная концентрация вторичных метаболитов содержится в экстрактах клубней растения, полученных циркуляционным экстрагированием.

Доминирующие вторичные метаболиты в экстрактах *D. communis* – это диосцин (5,43–15,04 мг/мл), спиростенол А (5,12–14,94 мг/мл), кверцетин (4,87–13,12 мг/мл), рутин (4,09–11,65 мг/мл). Наиболее полное извлечение БАВ достигается при микроволновой экстракции культуры адвентивных корней диоскореи обыкновенной, минимальное – при циркуляционном экстрагировании корня растения (таблица 5.1.6).

Таблица 5.1.6 – Содержание вторичных метаболитов в экстрактах диоскореи обыкновенной

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Dc-h1	Dc-a1	Dc-h2	Dc-a2
Апигенин-гликозид	3,66±0,18	7,64±0,38	4,85±0,24	10,43±0,52
Рутин	4,09±0,21	9,11±0,46	5,59±0,27	11,65±0,58
Кверцетин	4,87±0,24	10,98±0,55	6,54±0,33	13,12±0,63
Спиростенол А	5,12±0,25	11,40±0,57	6,77±0,33	14,94±0,75
Спиростенол Б	3,40±0,17	7,11±0,34	4,66±0,23	9,33±0,47
Диосцин	5,43±0,27	11,32±0,57	7,43±0,37	15,04±0,76
Диосгенин	2,98±0,14	6,34±0,30	4,02±0,20	8,42±0,42
Лузиантридин	1,55±0,07	3,43±0,17	2,12±0,11	4,23±0,21
Орхинол	1,87±0,09	4,09±0,21	2,49±0,12	5,56±0,28
Кофейная кислота	1,30±0,06	2,75±0,14	1,83±0,09	3,65±0,18
Розмариновая кислота	0,85±0,04	2,36±0,12	1,15±0,06	2,27±0,12
Хлорогеновая кислота	0,94±0,06	2,22±0,11	1,32±0,07	2,89±0,14
Сиреневая кислота	1,48±0,07	3,12±0,16	1,80±0,09	4,02±0,19

Согласно данным таблицы 5.1.7, в экстрактах *S. divaricata* отмечено максимальное содержание хромонов перв-*O*-глюкозилцимифугина (12,23–42,54 мг/мл), 4'-*O*-β-*D*-глюкозил-5-*O*-метилвисамминола (10,56–37,78 мг/мл), гамаудола (9,22–32,41 мг/мл) и цимифугина (7,12–23,26 мг/мл). Наиболее эффективным способом экстракции с точки зрения максимального извлечения вторичных метаболитов является микроволновая экстракция корневой культуры *in vitro* сапожниковии растопыренной. Наименьшие концентрации БАВ накапливаются в экстрактах стебля растения, полученных перколяцией.

Таблица 5.1.7 – Содержание вторичных метаболитов в экстрактах сапожниковии растопыренной

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Sd-s1	Sd-a1	Sd-s2	Sd-a2
Цимифугин	7,12±0,34	18,56±0,91	9,20±0,46	23,26±1,16
Гамаудол	9,22±0,45	24,33±1,22	11,88±0,59	32,41±1,62
Перв-О-глюкозилцимифугин	12,23±0,61	32,09±1,60	16,08±0,77	42,54±2,13
4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол	10,56±0,51	28,55±1,43	13,66±0,68	37,78±1,90
Вогонин	1,67±0,08	4,23±0,21	2,17±0,10	5,15±0,26
Фраксидин	3,94±0,19	10,09±0,48	5,14±0,26	12,70±0,64
Изофраксидин	3,78±0,18	9,76±0,49	4,83±0,24	12,34±0,62
Скополетин	3,31±0,17	8,54±0,43	4,36±0,22	11,08±0,55
Бергаптен	5,32±0,28	13,65±0,68	6,92±0,35	17,11±0,86
Мармезин	1,55±0,08	3,90±0,20	2,03±0,11	4,98±0,25
Умбеллиферон	4,17±0,21	10,75±0,52	5,47±0,26	13,56±0,68
Астрагалин	3,21±0,16	8,21±0,41	4,16±0,21	10,30±0,52
Монохаетин	1,85±0,09	4,58±0,23	2,76±0,14	5,74±0,29
Кверцетин-3,7-дигликозид	3,56±0,18	9,31±0,47	4,69±0,23	11,88±0,59

Таким образом, разнообразный состав вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности в экстрактах клеточных культур *in vitro* изучаемых растений (*R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. divaricata*) позволяет рассматривать их в качестве перспективного сырья для получения продуктов питания функциональной направленности.

## 5.2 Оценка физико-химических свойств и показателей токсичности экстрактов, полученных разными методами

Для растительных экстрактов, полученных разными методами, определяли такие физико-химические показатели, как сухой остаток и содержание экстрагента – этилового спирта. Полученные результаты отражены в таблице 5.2.1.

Согласно полученным результатам, массовая доля сухого остатка в изучаемых экстрактах варьируется в диапазоне от 4,27 % (экстракт корневища элеутерококка колючего, полученный методом микроволновой экстракции) до 6,22 % (экстракт культуры адвентивных корней сапожниковии растопыренной, полученный циркуляционным экстрагированием). Содержание экстрагента в тестируемых экстрактах принимает значения в диапазоне от 61,4 % (экстракт корневища элеутерококка колючего, полученный методом перколяции) до 68,0 % (экстракт корня женьшеня обыкновенного, полученный микроволновой экстракцией). В целом, полученные значения согласуются с литературными данными и требованиями фармакопейных статей. Так, согласно проекту фармакопейной статьи на настойку женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.F. Mey) содержание этилового спирта в ней не должно быть менее 67,0 %, сухой остаток – не менее 2,0 %. В соответствии с проектом фармакопейной статьи на жидкий экстракт левзеи сафлоровидной (*Raponticum carthamoides* (Willd.)) содержание этилового спирта в нем должно быть 62,0 % и более, сухой остаток – 3,6 % и более.

Согласно ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» и ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», в растительных экстрактах нормируется содержание таких тяжелых металлов, как свинец, кадмий, ртуть и мышьяк, поэтому в изучаемых экстрактах определяли содержание данных токсикантов. Полученные результаты отражены на рисунках 5.2.1–5.2.6.

Таблица 5.2.1 – Физико-химические показатели качества растительных экстрактов

Обозначение образца	Сухой остаток, %	Содержание этилового спирта, %
Rc-r1	5,45±0,55	62,5±3,1
Rc-a1	5,09±0,51	64,0±3,2
Rc-r2	5,13±0,51	61,8±3,0
Rc-a2	5,67±0,57	65,2±3,1
Pg-r1	6,12±0,61	65,9±3,2
Pg-c1	6,08±0,61	67,4±3,4
Pg-r2	5,78±0,58	68,0±3,4
Pg-c2	5,90±0,59	67,3±3,4
Es-r1	4,53±0,45	61,4±3,1
Es-a1	4,33±0,43	63,9±3,2
Es-r2	4,27±0,43	62,5±3,1
Es-a2	4,61±0,46	62,0±3,1
Dm-t1	5,88±0,59	66,0±3,3
Dm-c1	6,10±0,61	64,3±3,1
Dm-t2	6,05±0,61	62,5±3,1
Dm-c2	5,94±0,59	63,2±3,2
Dc-h1	4,99±0,50	59,7±2,3
Dc-a1	5,16±0,52	63,4±3,2
Dc-h2	5,34±0,53	62,5±3,1
Dc-a2	5,05±0,50	62,8±3,1
Sd-s1	6,10±0,61	66,5±3,3
Sd-a1	6,22±0,62	65,8±3,3
Sd-s2	6,08±0,61	66,2±3,3
Sd-a2	6,15±0,62	67,0±3,4

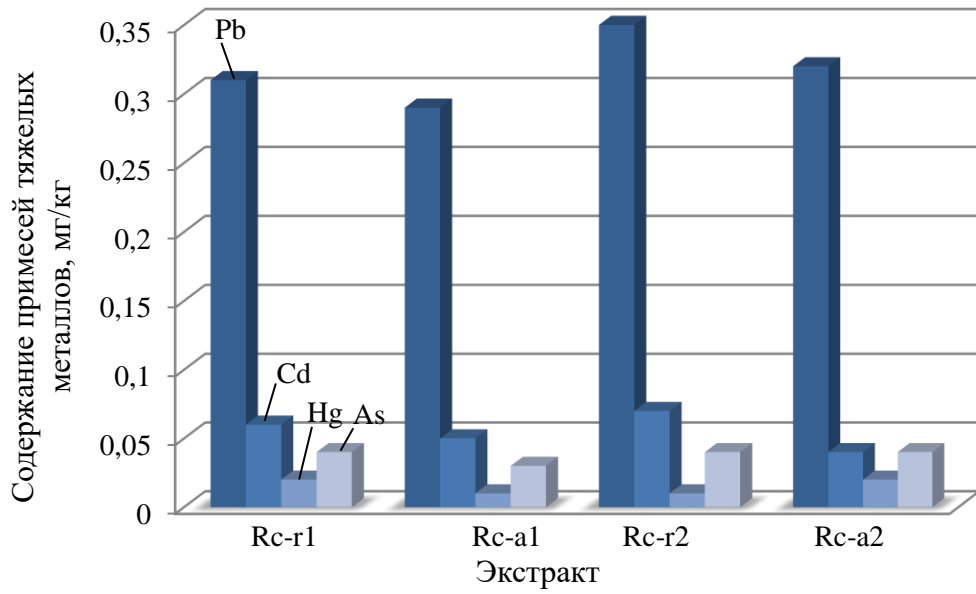


Рисунок 5.2.1 – Содержание тяжелых металлов в экстрактах левзеи сафлоровидной

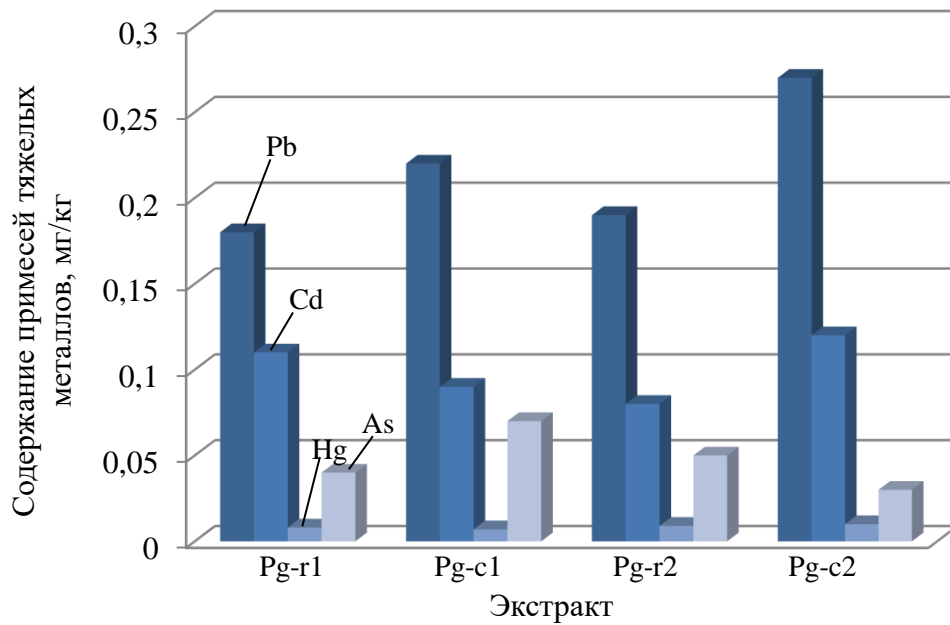


Рисунок 5.2.2 – Содержание тяжелых металлов в экстрактах женьшеня обыкновенного

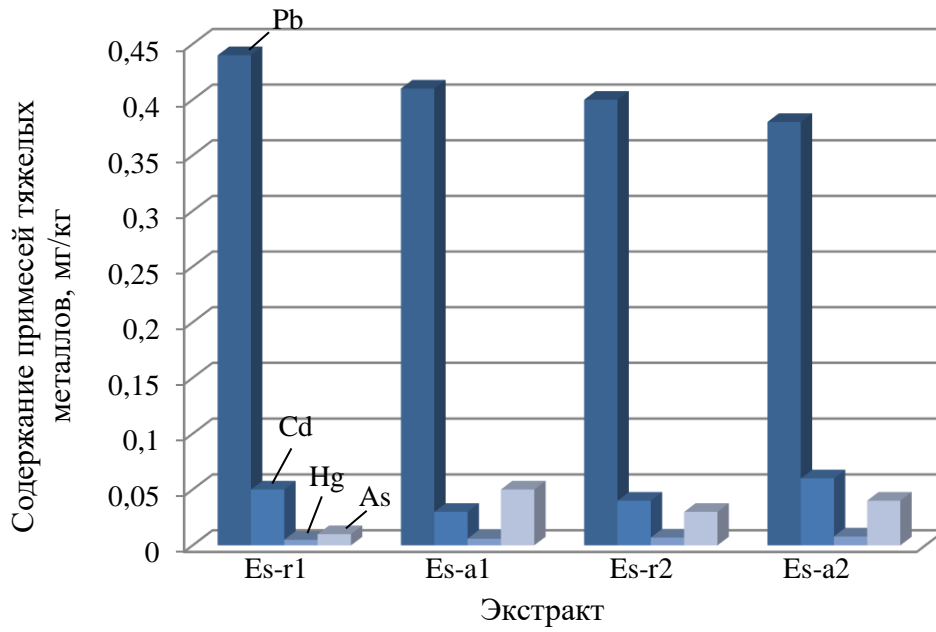


Рисунок 5.2.3 – Содержание тяжелых металлов в экстрактах элеутерококка колючего

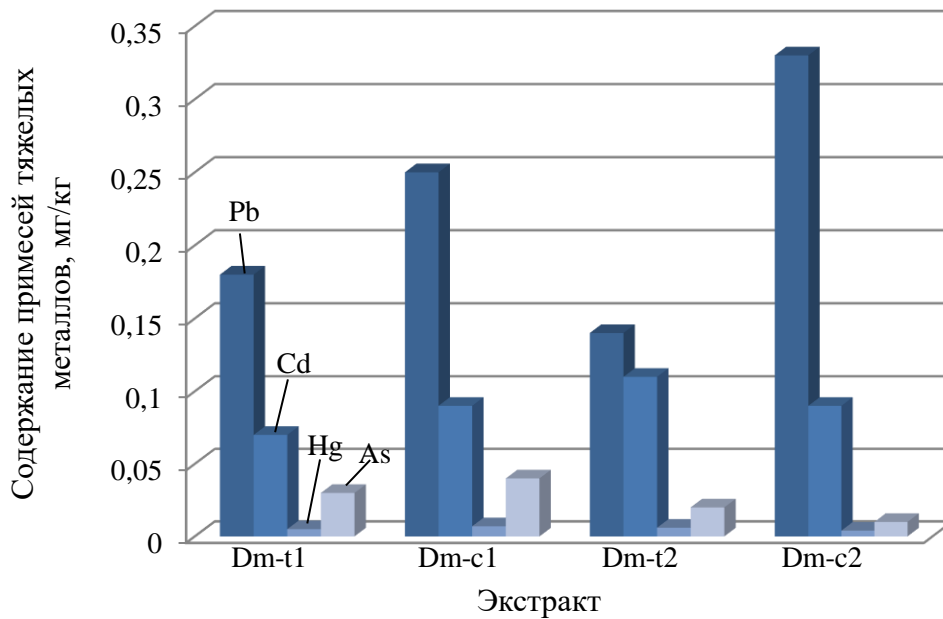


Рисунок 5.2.4 – Содержание тяжелых металлов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого

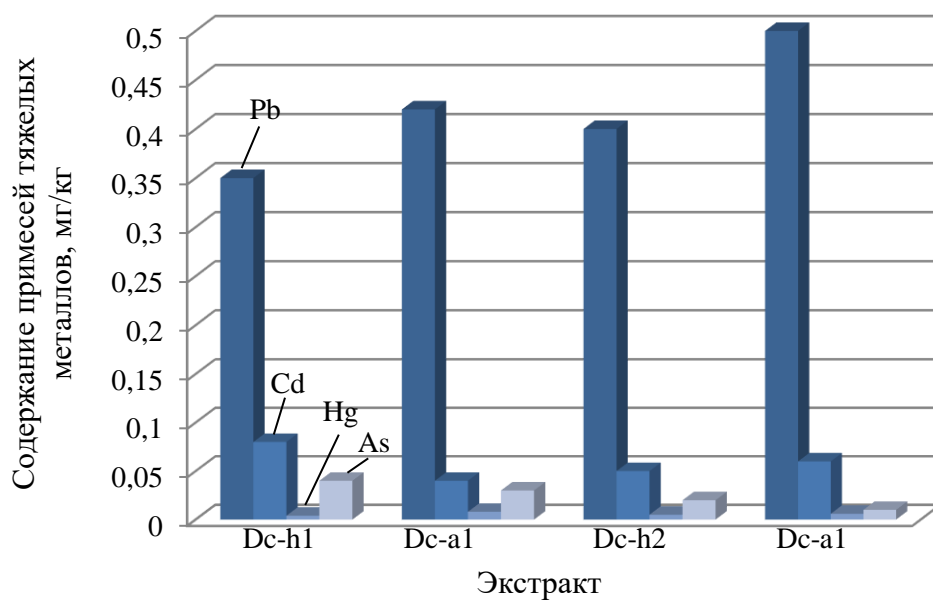


Рисунок 5.2.5 – Содержание тяжелых металлов в экстрактах диоскореи обыкновенной

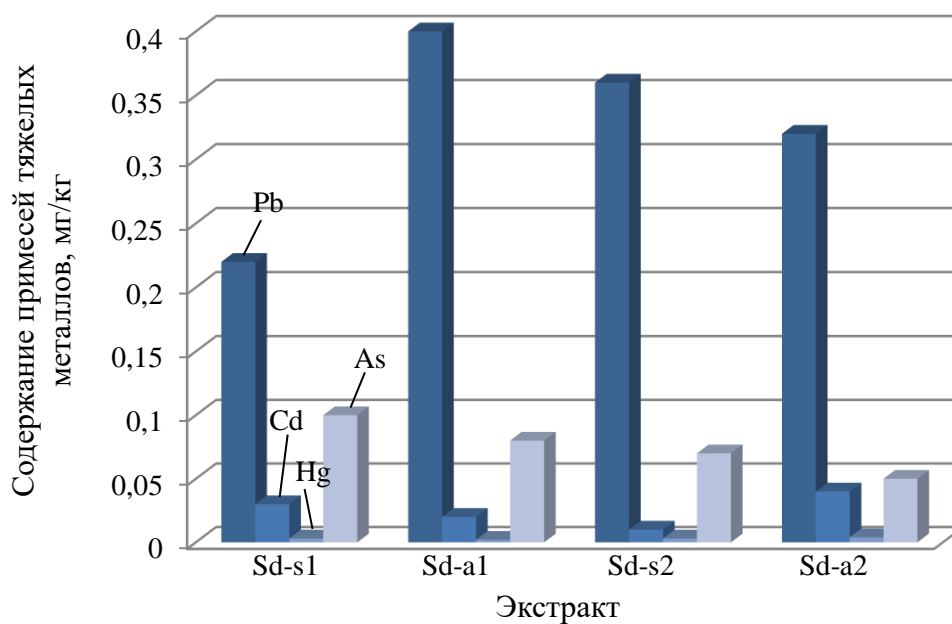


Рисунок 5.2.6 – Содержание тяжелых металлов в экстрактах сапожниковии растопыренной



В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», предельно допустимое содержание свинца в растительных экстрактах составляет 6,0 мг/кг, кадмия – 1,0 мг/кг, ртути – 0,1 мг/кг, мышьяка – 0,5 мг/кг. Согласно рисункам 5.2.1–5.2.6, все исследуемые образцы экстрактов по содержанию тяжелых металлов соответствуют требованиям нормативной документации, следовательно, могут быть использованы в технологиях пищевых продуктов и напитков.

Одним из современных методов контроля содержания в объектах окружающей среды токсических веществ является биотестирование. Его основными достоинствами являются простота и доступность приемов постановки, высокая чувствительность тест-организмов к минимальным концентрациям токсических агентов [39, 5]. Методы биотестирования приобретают все большую популярность и внедряются повсеместно.

В настоящее время в экологическом мониторинге используются биотесты на токсичность с использованием различных организмов, включая клеточные линии, животных, микроорганизмы [47, 98, 371, 92]. Наиболее перспективен анализ с использованием биосенсоров, в том числе на основе светящихся бактерий [283, 157, 196, 23, 27, 6, 102].

Для бактериальной биолюминесценции широко используются бактерии родов *Photobacterium* и *Vibrio* (*P. phosphoreum*, *P. leiognathi*, *V. fisheri*, *V. harveyi*). Эти бактерии используются для изготовления биолюминесцентных тестов для оценки загрязнения природных источников. Биотесты на светящихся бактериях дают количественную меру токсичности и часто превосходят известные биотесты по быстродействию, точности, чувствительности и простоте, позволяют контролировать одновременно большое количество токсикантов [25].

В данной работе оценивали токсичность растительных экстрактов с использованием биолюминесцентных бактерий *Vibrio fischeri*. Полученные результаты приведены в таблице 5.2.2. Денситограммы образцов экстрактов

Rc-a1, Es-a1, Dm-c1 и Dc-a1 после обработки бактериями *V. fischeri* представлены на рисунках 5.2.7–5.2.10. В качестве стандарта токсичности использовали *n*-аминофенол.

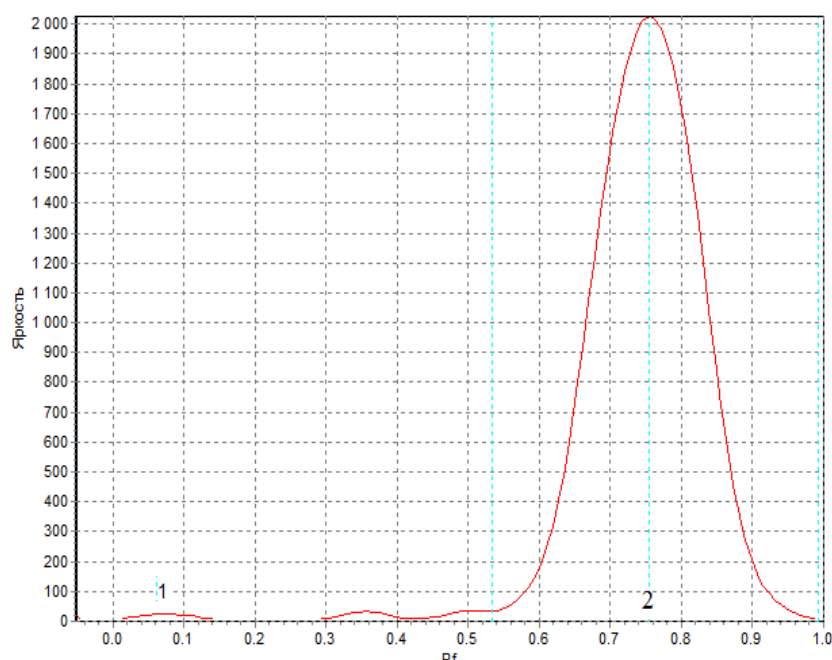


Рисунок 5.2.7 – Денситограмма увеличения хемилюминесценции тест-культуры *V. fischeri*: 1 – *n*-аминофенол; 2 – экстракт Rc-a1

Таблица 5.2.2 – Интенсивность свечения (выживания) тест-культуры *V. fischeri* по сравнению с неподавленным контролем (%)

Обозначение образца	Интенсивность сигнала	Обозначение образца	Интенсивность сигнала
Rc-r1	88,5±4,4	Dm-t1	90,0±4,5
Rc-a1	100,0±5,0	Dm-c1	100,0±5,0
Rc-r2	90,4±4,5	Dm-t2	83,5±4,2
Rc-a2	98,7±4,9	Dm-c2	97,7±4,9
Pg-r1	88,0±4,4	Dc-h1	85,6±4,3
Pg-c1	96,4±4,8	Dc-a1	100,0±5,0
Pg-r2	85,2±4,3	Dc-h2	87,0±4,35
Pg-c2	99,8±5,0	Dc-a2	99,7±5,0
Es-r1	83,6±4,2	Sd-s1	84,2±4,2
Es-a1	100,0±5,0	Sd-a1	98,4±4,9
Es-r2	91,7±4,6	Sd-s2	83,7±4,1
Es-a2	95,4±4,8	Sd-a2	99,0±4,9

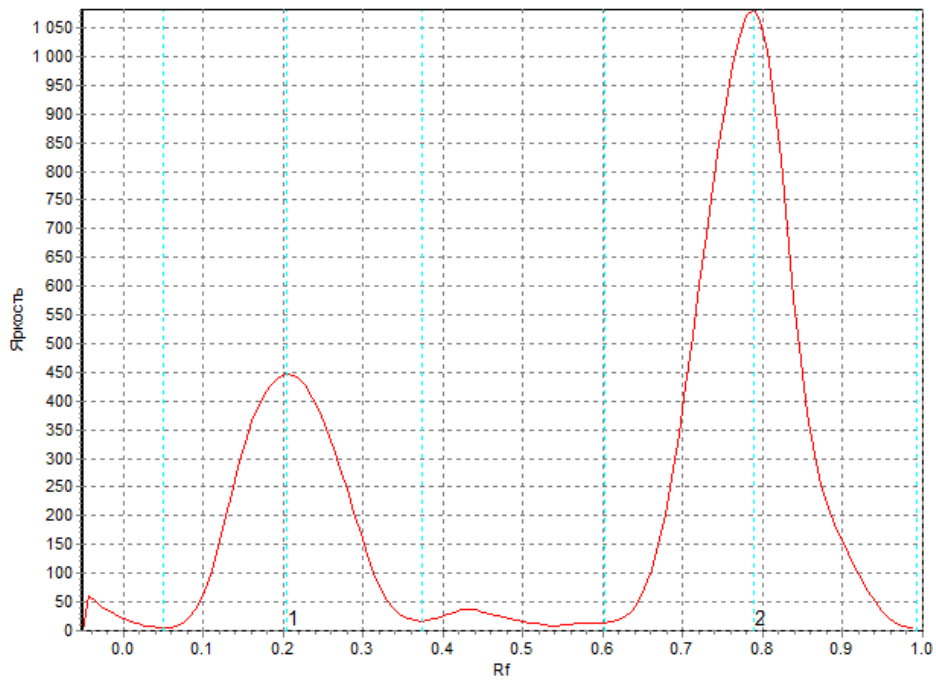


Рисунок 5.2.8 – Денситограмма увеличения хемилюминесценции тест-культуры *V. fischeri*: 1 – *n*-аминофенол; 2 – экстракт Es-a1

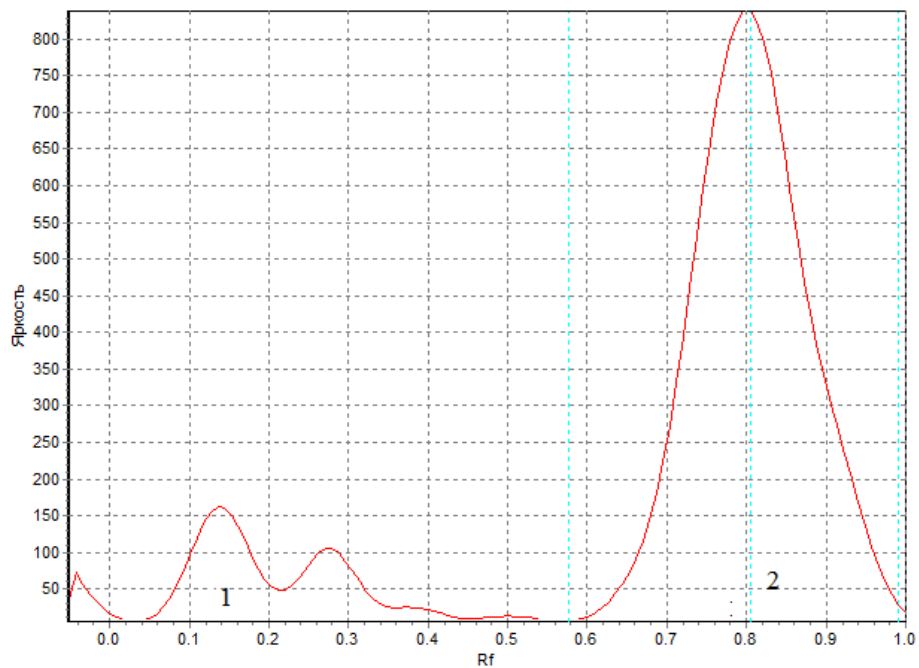


Рисунок 5.2.9 – Денситограмма увеличения хемилюминесценции тест-культуры *V. fischeri*: 1 – *n*-аминофенол; 2 – экстракт Dm-c1

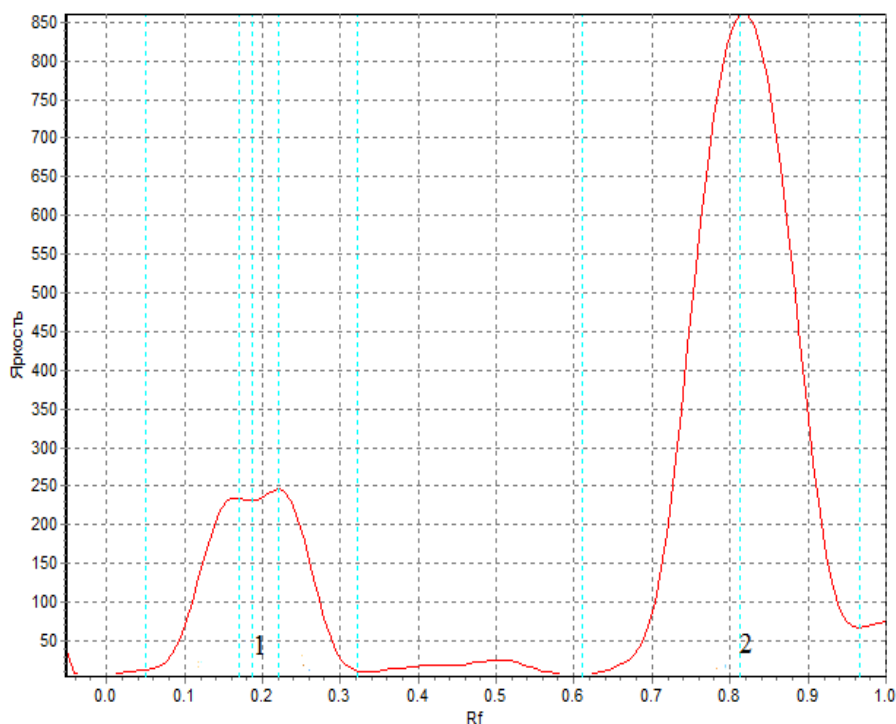


Рисунок 5.2.10 – Денситограмма увеличения хемилюминесценции тест-культуры *V. fischeri*: 1 – *n*-аминофенол; 2 – экстракт Dc-a1

Результаты (рисунки 5.2.7–5.2.10, таблица 5.2.2) показали, что все тестируемые экстракты не подавляют в значительной степени хемилюминесценцию тест-штамма *V. fischeri*. Для пяти тестируемых экстрактов (Rc-a1, Es-a1, Dm-c1 и Dc-a1) интенсивность сигнала составляет 100 %. Для других экстрактов интенсивность сигнала находится в диапазоне от 83,5 % (Dm-t2) до 99,8 % (Pg-c2). Ни один из исследуемых экстрактов не проявил 50 %-ной ингибирующей активности по отношению к хемилюминесценции *V. fischeri*. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсичности у изучаемых экстрактов.

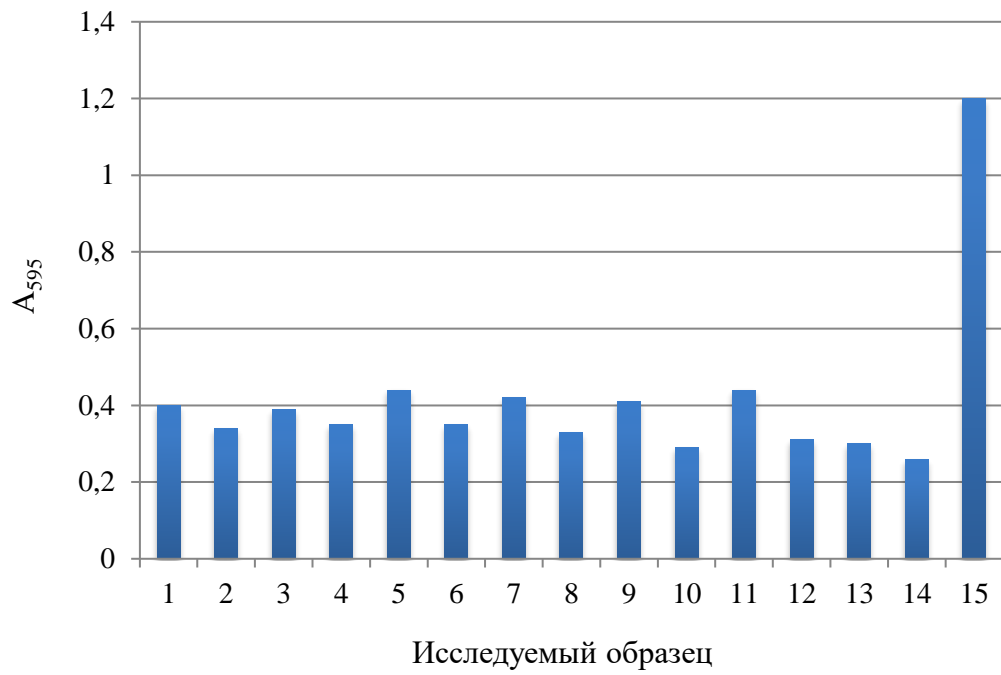
### 5.3 Изучение биологической активности *in vitro* экстрактов, полученных разными методами

Учитывая богатый состав изучаемых экстрактов, целесообразно ожидать у них широкого спектра биологической активности. В данной работе особый интерес представляет антимикробная и антиоксидантная активность тестируемых образцов. Для оценки антимикробных свойств растительных экстрактов по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus viridans*, *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Penicillium citrinum* использовали два подхода: диско-диффузионный метод в соответствии с требованиями МУК 4.2.1890-04 и метод, основанный на измерении оптической плотности [15].

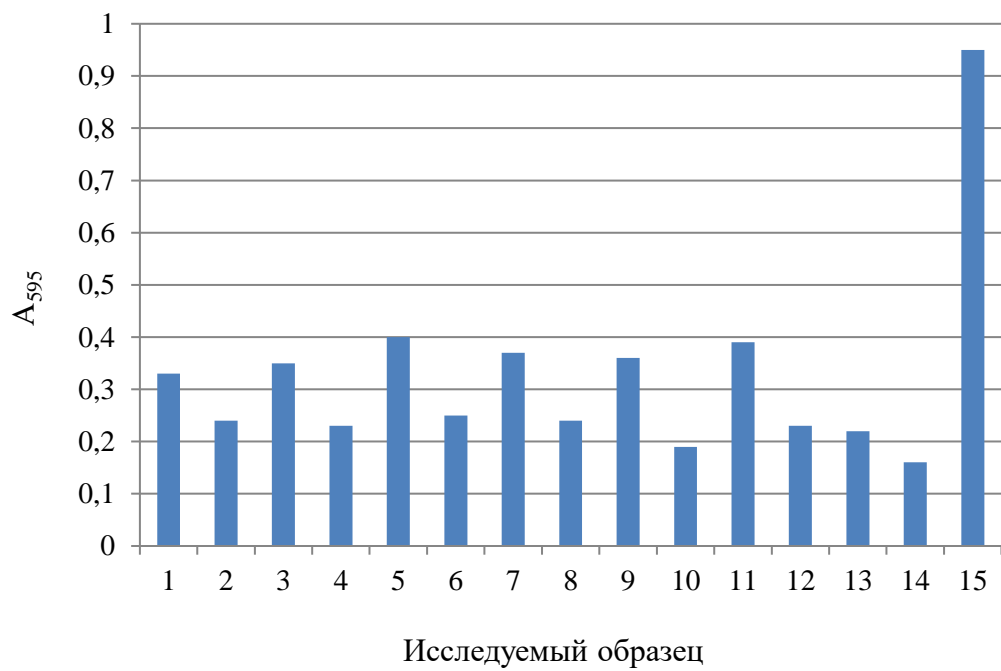
Результаты изучения антимикробных свойств растительных экстрактов диско-диффузионным методом приведены в таблице 5.3.1, результаты изучения антимикробных свойств растительных экстрактов методом, основанным на измерении оптической плотности, приведены на рисунках 5.3.1–5.3.2.

Таблица 5.3.1 – Результаты изучения антимикробных свойств растительных экстрактов диско-диффузионным методом

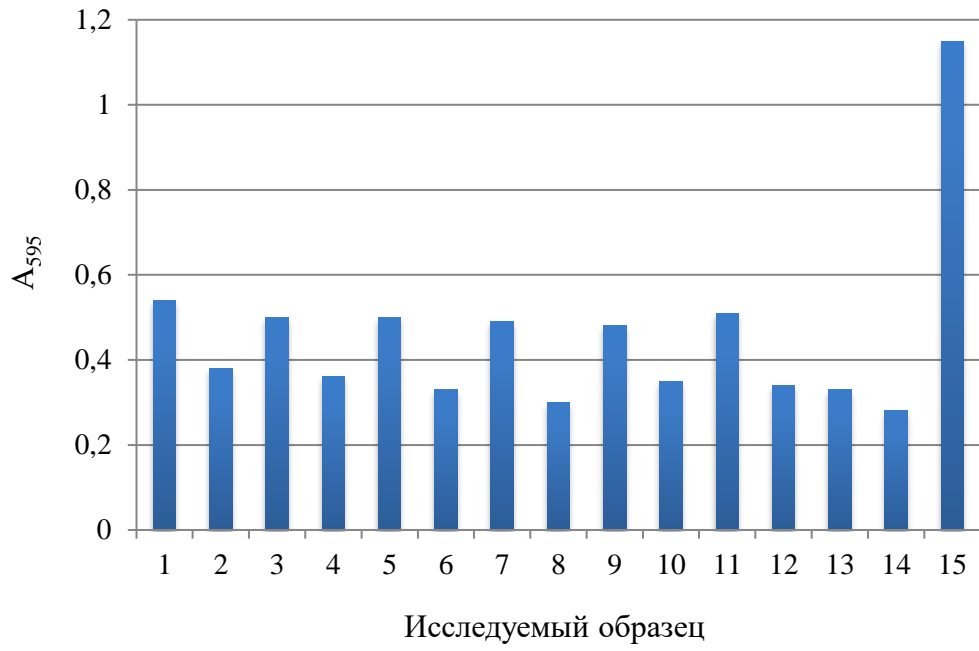
Образец экстракта	Диаметр зоны лизиса тест-штаммов, мм								
	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. viridans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>	<i>P. citrinum</i>
Rc-r1	12,10±0,61	11,80±0,58	12,00±0,60	12,60±0,57	11,90±0,60	12,20±0,61	12,30±0,62	10,90±0,54	11,50±0,53
Rc-a1	14,30±0,70	13,80±0,69	14,10±0,71	14,00±0,68	13,70±0,66	14,50±0,73	14,90±0,75	13,60±0,68	13,40±0,64
Rc-r2	11,90±0,60	12,70±0,64	11,80±0,59	12,30±0,66	13,10±0,63	11,60±0,58	12,40±0,57	12,60±0,57	11,70±0,59
Rc-a2	14,60±0,73	14,20±0,71	14,40±0,69	14,50±0,67	13,60±0,64	13,90±0,65	14,00±0,72	13,50±0,68	14,30±0,72
Pg-r1	11,30±0,57	10,80±0,54	12,00±0,59	11,50±0,55	12,30±0,62	11,90±0,60	11,70±0,56	12,30±0,62	10,70±0,54
Pg-c1	13,80±0,66	13,60±0,67	14,50±0,73	14,30±0,67	13,50±0,68	14,00±0,71	14,10±0,73	12,80±0,64	13,40±0,67
Pg-r2	10,60±0,53	10,90±0,55	11,00±0,55	11,30±0,57	10,80±0,54	10,50±0,53	11,30±0,55	10,50±0,53	11,70±0,59
Pg-c2	15,10±0,71	13,90±0,67	14,40±0,72	14,50±0,74	13,80±0,69	15,00±0,76	14,60±0,66	14,50±0,73	14,30±0,72
Es-r1	8,90±0,41	8,50±0,43	9,20±0,46	9,50±0,48	8,80±0,42	9,40±0,47	9,10±0,46	8,40±0,42	8,00±0,41
Es-a1	13,00±0,65	12,90±0,64	13,60±0,65	13,90±0,70	12,80±0,64	13,40±0,63	13,50±0,68	12,70±0,64	13,00±0,65
Es-r2	9,50±0,44	8,90±0,45	11,40±0,57	11,00±0,55	10,60±0,53	10,30±0,52	9,80±0,47	9,90±0,50	10,50±0,53
Es-a2	14,10±0,71	13,40±0,67	13,20±0,63	12,80±0,63	13,00±0,65	12,70±0,62	12,50±0,63	13,20±0,63	13,30±0,64
Dm-t1	11,50±0,53	11,90±0,60	10,80±0,52	12,30±0,62	12,50±0,63	11,40±0,57	11,80±0,57	12,30±0,62	12,20±0,59
Dm-c1	15,10±0,68	13,90±0,70	14,50±0,73	14,20±0,71	13,80±0,69	14,80±0,70	14,60±0,67	13,70±0,66	13,50±0,68
Dm-t2	10,60±0,53	9,90±0,49	11,20±0,56	10,90±0,52	11,40±0,55	11,50±0,58	10,50±0,52	9,70±0,49	9,80±0,49
Dm-c2	14,10±0,65	13,80±0,65	13,50±0,68	14,30±0,72	14,80±0,74	13,40±0,67	14,00±0,71	12,90±0,64	13,00±0,66
Dc-h1	8,80±0,41	9,40±0,47	9,70±0,49	8,90±0,44	10,10±0,53	10,60±0,58	9,50±0,43	10,30±0,52	9,90±0,50
Dc-a1	12,00±0,62	13,40±0,67	12,50±0,63	13,00±0,65	12,10±0,59	12,50±0,63	12,20±0,61	11,90±0,60	12,60±0,68
Dc-h2	9,00±0,45	10,20±0,51	10,00±0,51	9,50±0,48	9,70±0,43	10,20±0,47	8,90±0,44	9,30±0,46	9,50±0,46
Dc-a2	13,00±0,65	12,40±0,63	12,70±0,61	12,50±0,60	11,80±0,54	12,30±0,62	11,70±0,53	12,20±0,61	12,50±0,63
Sd-s1	14,10±0,71	14,70±0,74	13,90±0,70	15,30±0,77	15,00±0,75	14,00±0,71	14,80±0,71	15,10±0,76	14,90±0,75
Sd-a1	9,90±0,49	10,40±0,52	9,60±0,48	10,10±0,51	9,40±0,47	9,50±0,48	10,50±0,48	9,80±0,47	10,70±0,54
Sd-s2	13,80±0,66	14,60±0,73	15,20±0,73	14,80±0,71	15,10±0,76	14,90±0,67	14,40±0,72	15,00±0,75	14,60±0,73
Sd-a2	8,80±0,40	9,30±0,47	8,90±0,44	9,00±0,45	9,50±0,46	9,10±0,46	9,30±0,47	9,80±0,47	10,30±0,52
Ампициллин	15,20±0,74	15,40±0,77	14,90±0,75	15,50±0,78	15,70±0,79	15,60±0,75	15,30±0,76	15,40±0,77	15,00±0,75
Ванкомицин	15,80±0,79	16,20±0,79	15,90±0,80	16,00±0,80	15,70±0,79	16,10±0,81	16,40±0,82	16,50±0,83	16,30±0,82



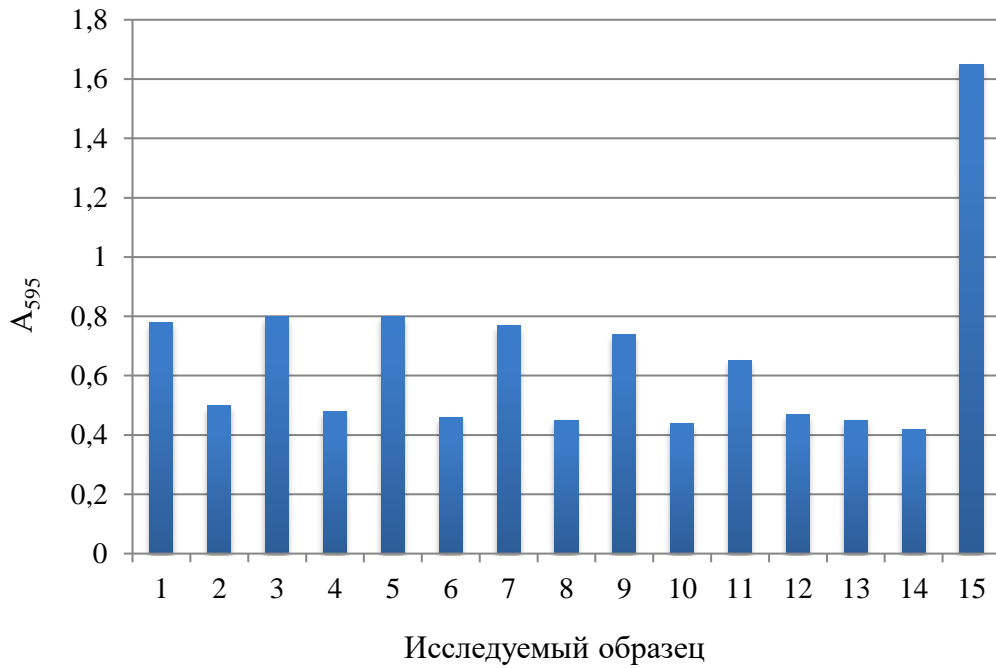
*E. coli*



*P. vulgaris*

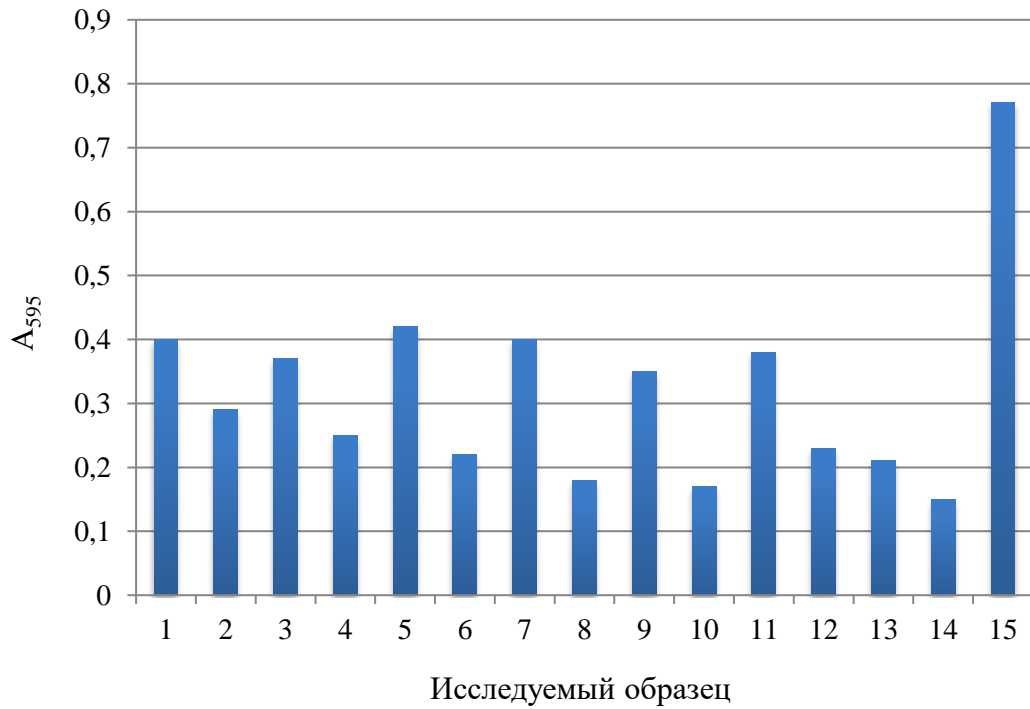


*P. aeruginosa*

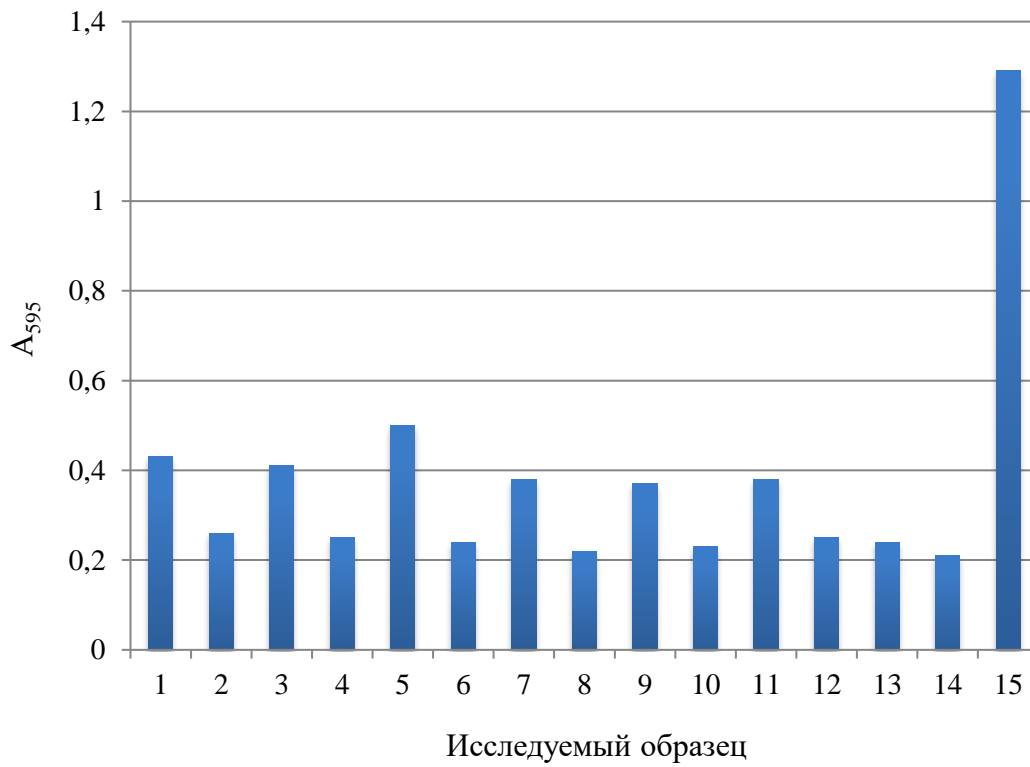


*L. mesenteroides*

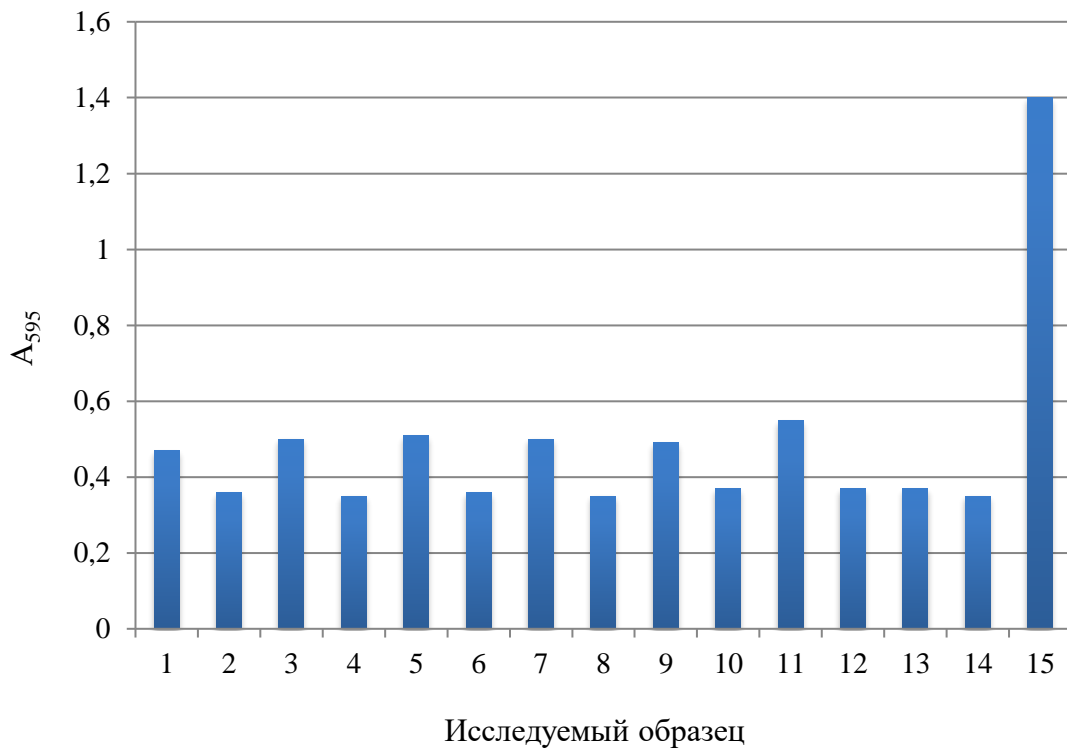




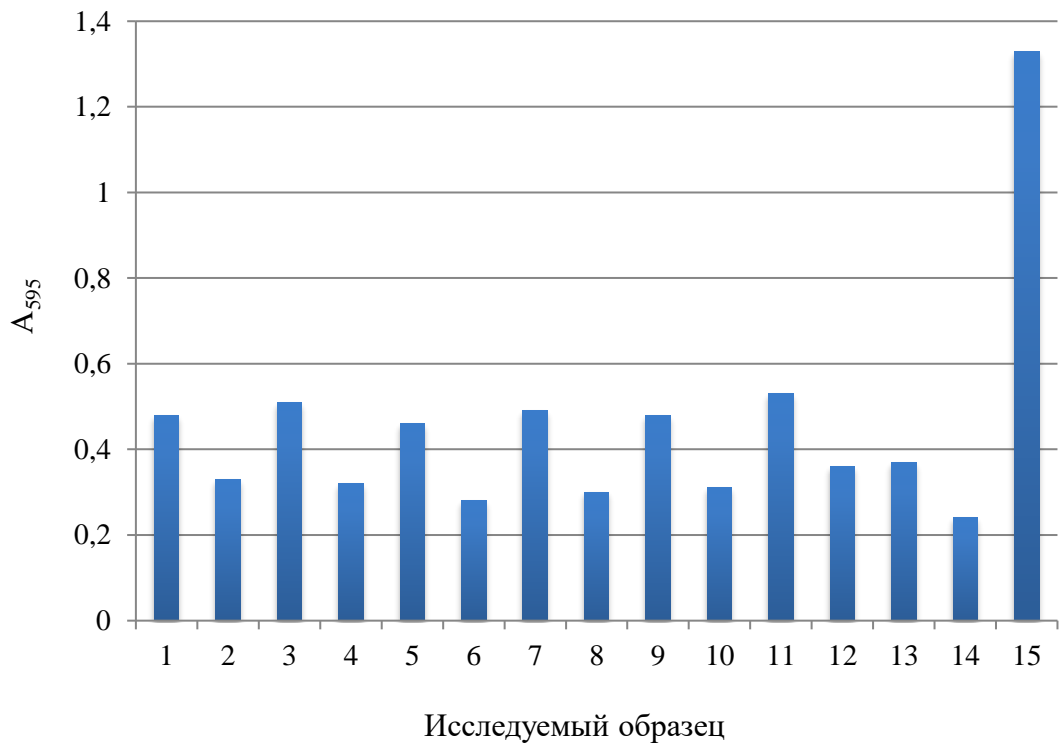
*B. cereus*



*S. viridans*



*C. albicans*



*M. canis*

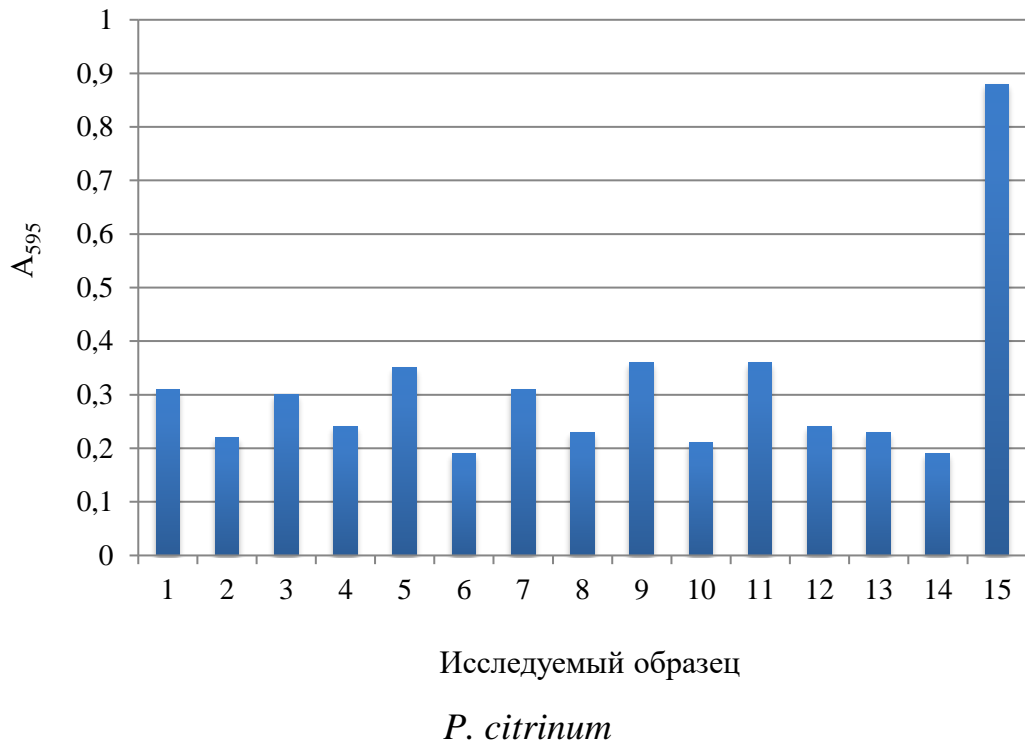
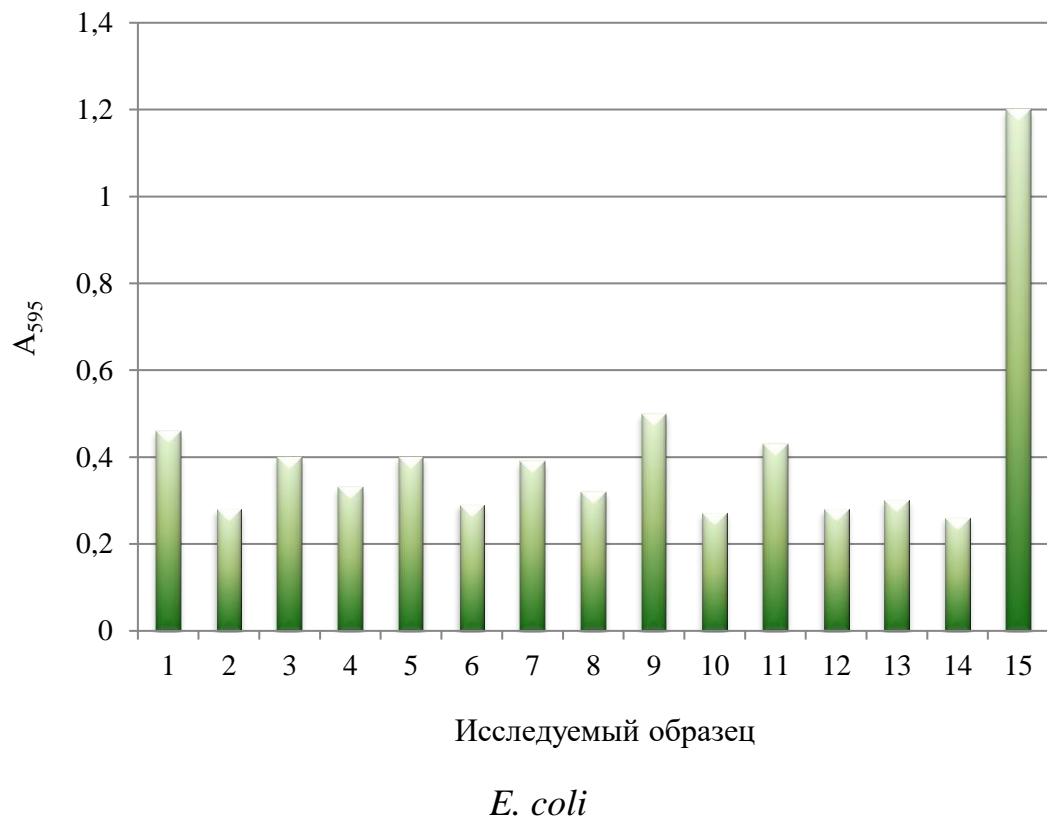
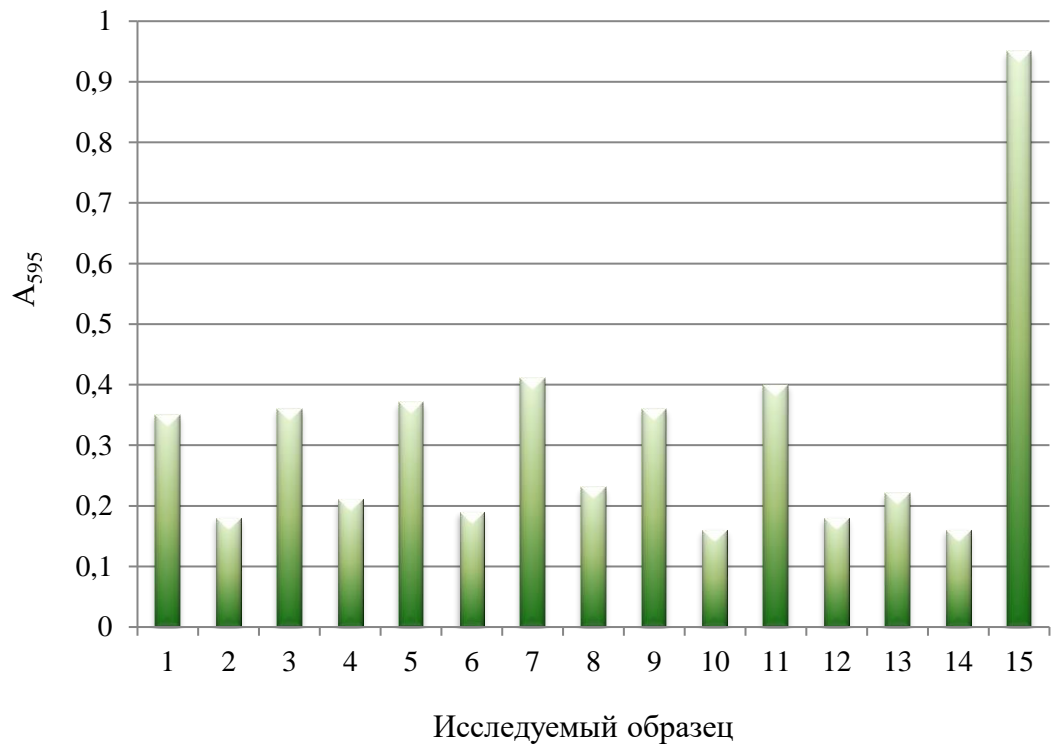


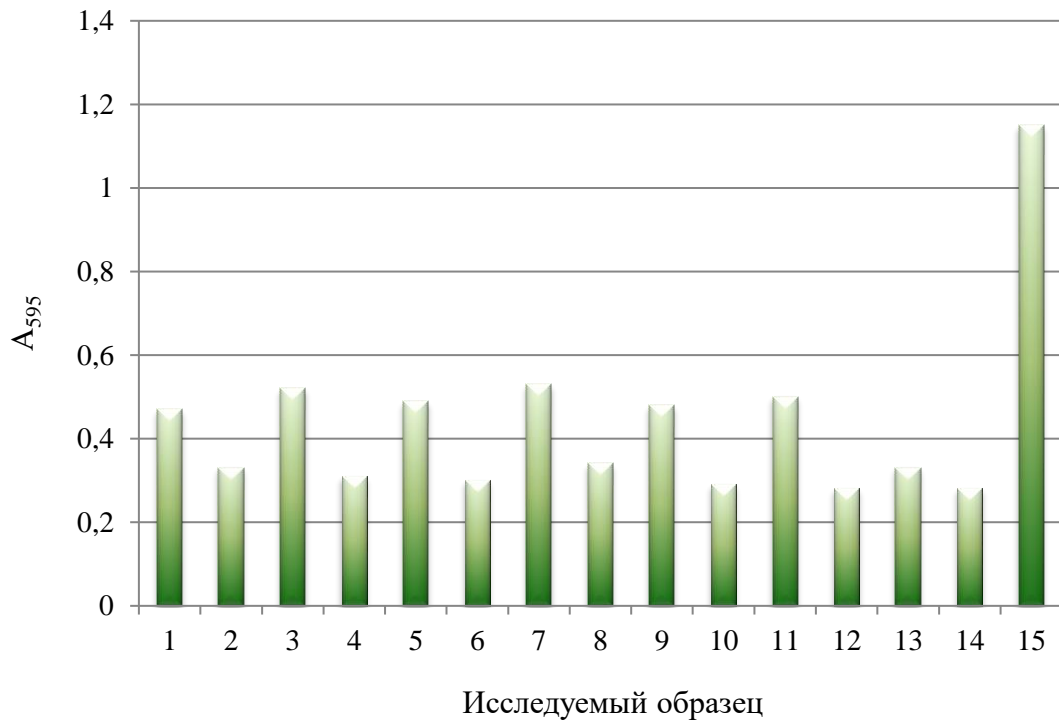
Рисунок 5.3.1 – Результаты изучения антимикробных свойств растительных экстрактов методом, основанным на измерении оптической плотности:

- 1 – Rc-r1, 2 – Rc-a1, 3 – Rc-r2, 4 – Rc-a2, 5 – Pg-r1, 6 – Pg-c1,  
 7 – Pg-r2, 8 – Pg-c2, 9 – Es-r1, 10 – Es-a1, 11 – Es-r2, 12 – Es-a2,  
 13 – ампициллин, 14 – ванкомицин, 15 – контроль

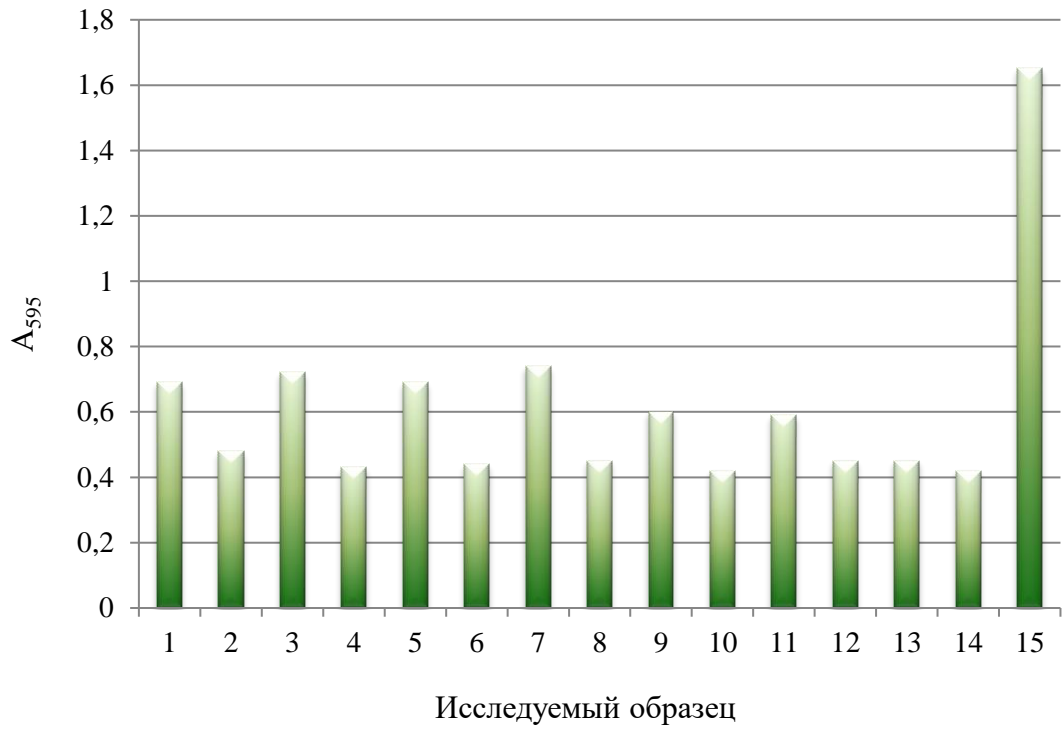




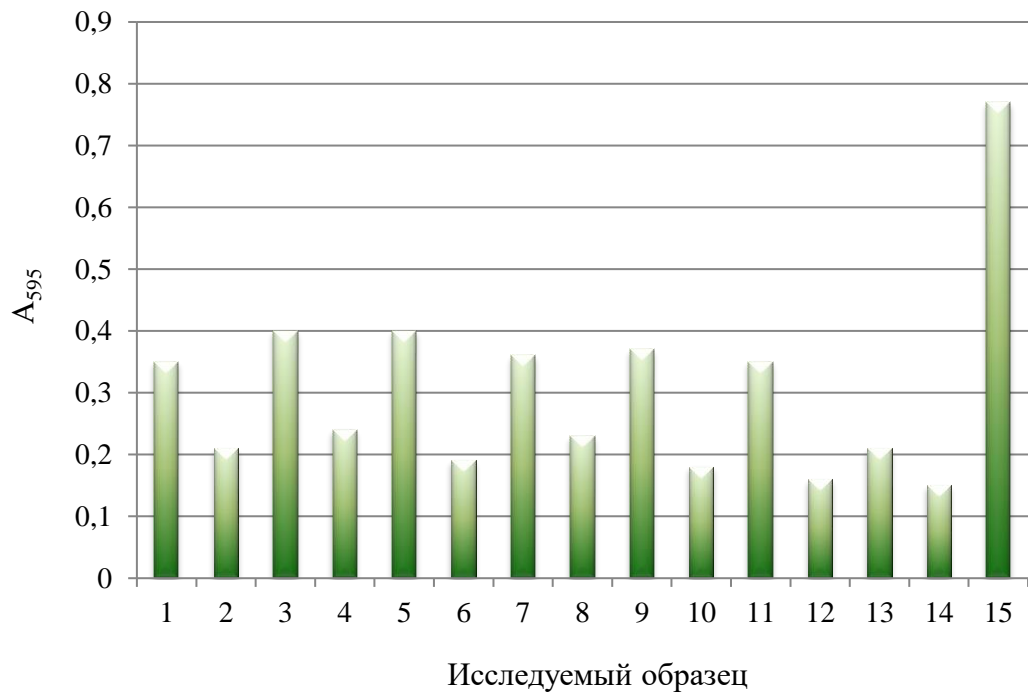
*P. vulgaris*



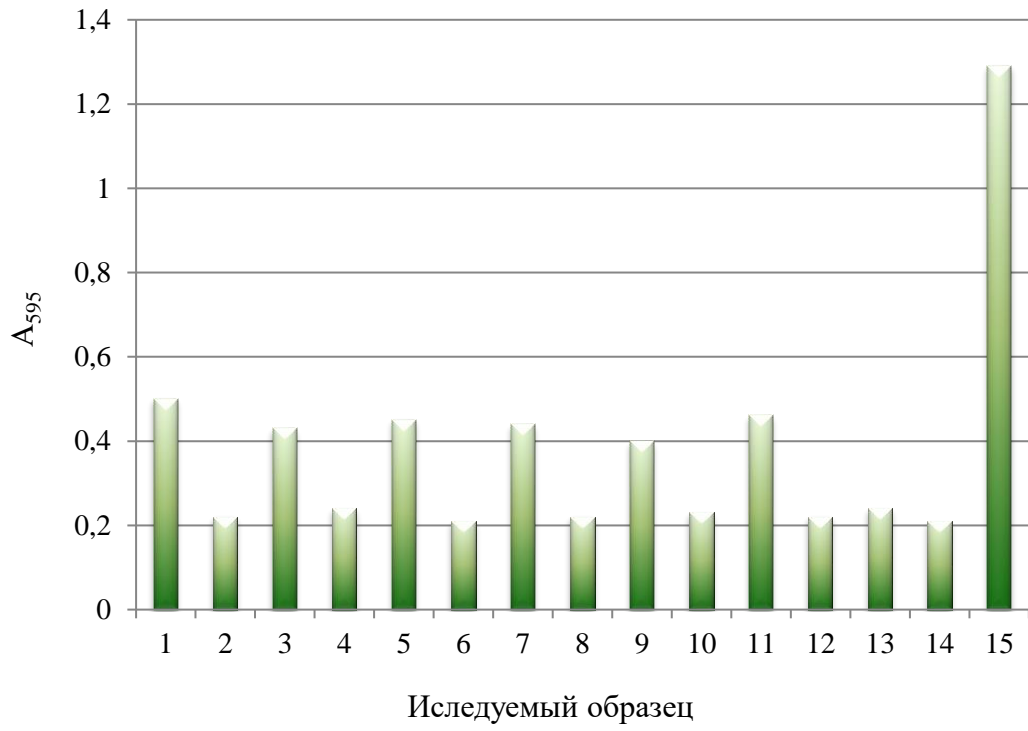
*P. aeruginosa*



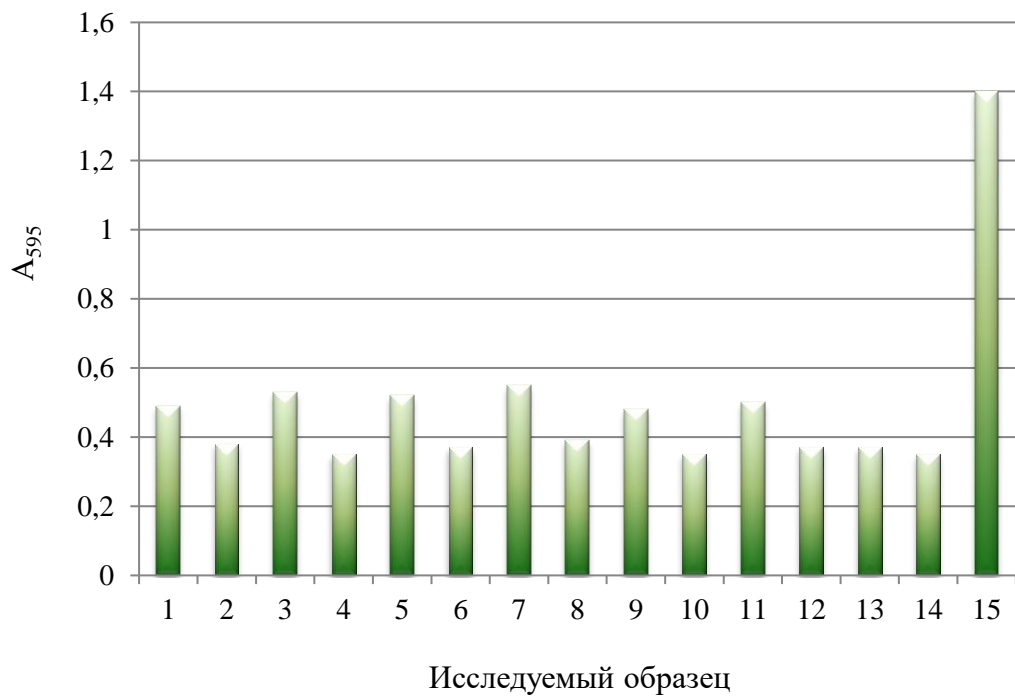
*L. mesenteroides*



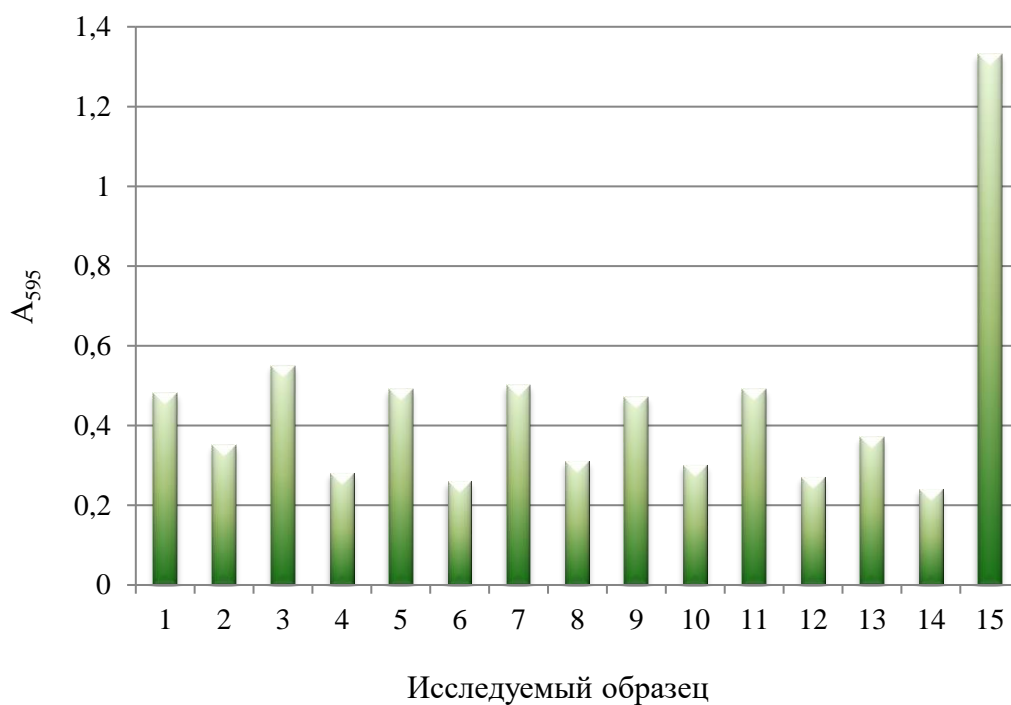
*B. cereus*



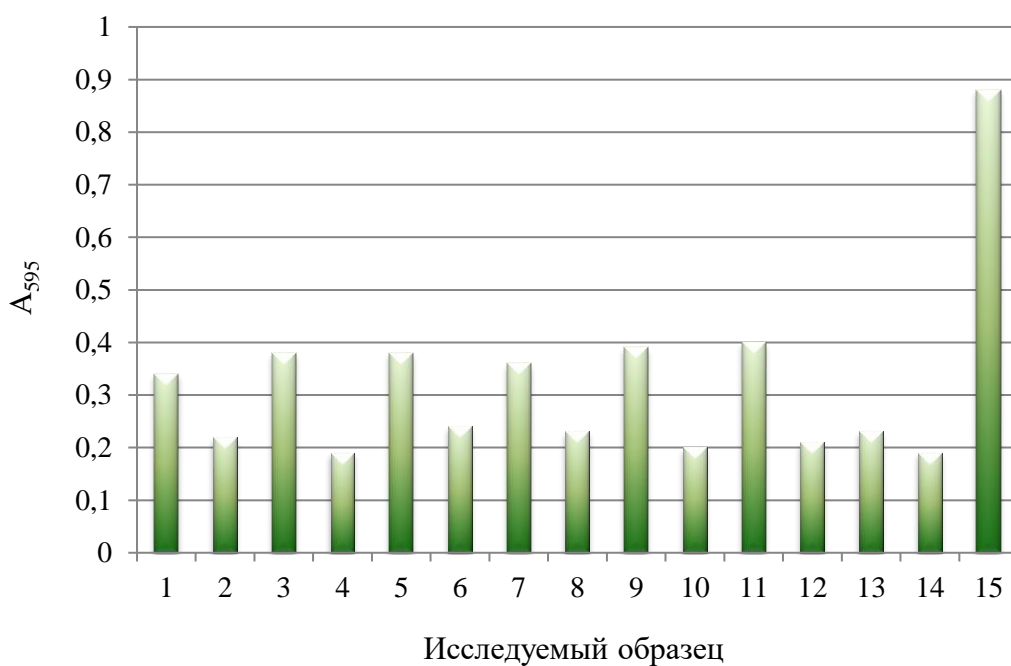
*S. viridans*



*C. albicans*



*M. canis*



*P. citrinum*

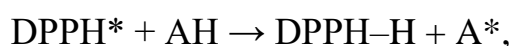
Рисунок 5.3.2 – Результаты изучения антимикробных свойств растительных экстрактов методом, основанным на измерении оптической плотности:

1 – Dm-t1, 2 – Dm-c1, 3 – Dm-t2, 4 – Dm-c2, 5 – Dc-h1, 6 – Dc-a1,  
 7 – Dc-h2, 8 – Dc-a2, 9 – Sd-s1, 10 – Sd-a1, 11 – Sd-s2, 12 – Sd-a2,  
 13 – ампициллин, 14 – ванкомицин, 15 – контроль

Совокупный анализ результатов, представленных в таблице 5.3.1 и на рисунках 5.3.1–5.3.2, демонстрирует наличие антимикробных свойств у всех изучаемых экстрактов по отношению ко всем тест-штаммам. Выявлена тенденция: в случае левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной максимальную антимикробную активность проявляют экстракты, полученные из клеточных культур растений *in vitro*. Полученные данные коррелируют с результатами оценки содержания вторичных метаболитов в экстрактах: все экстракты, полученные из клеточных культур растений *in vitro*, демонстрируют более высокие концентрации вторичных метаболитов по сравнению с экстрактами надземных и подземных частей растений (таблицы 5.1.2–5.1.7).

Для оценки антиоксидантной активности растительных экстрактов использовали два метода: спектрофотометрический метод, основанный на измерении их способности улавливать радикал АВТС, и метод, основанный на способности антиоксидантов восстанавливать радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH).

Реакция взаимодействия антиоксидантов с DPPH-радикалом протекает по схеме:



В результате восстановления DPPH-радикала антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности обычными методами спектрофотометрии при длине волны 517 нм. В качестве стандартных растворов использовали растворы аскорбиновой кислоты (АК) известной концентрации. Результаты анализов выражали в мг эквивалента АК на грамм сухой массы растительного экстракта (мг АК/г).

Результаты определения полумаксимальной эффективной концентрации растительных экстрактов, полученные методом, основанным



на измерении их способности улавливать радикал АВТС, приведены в таблице 5.3.2. Результаты определения антиоксидантной активности растительных экстрактов методом, основанным на их способности восстанавливать радикал DPPH, представлены в таблице 5.3.3.

Таблица 5.3.2 – Результаты определения полумаксимальной эффективной концентрации экстрактов (метод с использованием АВТС)

Обозначение экстракта	EC <sub>50</sub> , масс. %	Обозначение экстракта	EC <sub>50</sub> , масс. %
Rc-r1	10,5±0,5	Dm-t1	9,0±0,5
Rc-a1	8,0±0,4	Dm-c1	5,0±0,3
Rc-r2	11,0±0,6	Dm-t2	10,5±0,5
Rc-a2	7,5±0,4	Dm-c2	4,0±0,2
Pg-r1	14,0±0,7	Dc-h1	12,5±0,6
Pg-c1	7,0±0,4	Dc-a1	6,5±0,4
Pg-r2	13,0±0,7	Dc-h2	12,0±0,6
Pg-c2	8,0±0,4	Dc-a2	7,0±0,4
Es-r1	15,0±0,8	Sd-s1	10,0±0,5
Es-a1	6,0±0,3	Sd-a1	4,5±0,2
Es-r2	14,0±0,7	Sd-s2	12,0±0,6
Es-a2	5,5±0,3	Sd-a2	5,5±0,3

Таблица 5.3.3 – Результаты определения антиоксидантной активности растительных экстрактов методом, основанным на их способности восстанавливать радикал DPPH

Обозначение экстракта	Антиоксидантная активность, мг АК/г	Обозначение экстракта	Антиоксидантная активность, мг АК/г
Rc-r1	95,14±4,76	Dm-t1	113,25±5,66
Rc-a1	115,30±5,65	Dm-c1	136,77±6,56
Rc-r2	110,56±5,31	Dm-t2	121,07±5,81
Rc-a2	123,33±6,12	Dm-c2	<b>148,80±7,44</b>
Pg-r1	74,68±3,73	Dc-h1	134,53±6,73

## Окончание таблицы 5.3.3

Pg-c1	111,15±5,33	Dc-a1	177,38±8,87
Pg-r2	83,42±4,17	Dc-h2	142,81±7,14
Pg-c2	<b>136,90±6,85</b>	Dc-a2	<b>183,50±9,18</b>
Es-r1	65,87±3,44	Sd-s1	87,53±4,38
Es-a1	92,18±4,61	Sd-a1	98,69±4,93
Es-r2	75,33±3,77	Sd-s2	94,09±4,52
Es-a2	105,44±5,17	Sd-a2	103,12±4,95

Согласно таблице 5.3.2, все тестируемые экстракты проявляют высокую способность улавливать радикал ABTS, значения полумаксимальной эффективной концентрации EC<sub>50</sub> образцов находятся в диапазоне

от 4,0 масс. % (образец Dm-c2) до 15,0 масс. % (образец Es-r1).

Метод, основанный на способности экстрактов восстанавливать радикал DPPH, также продемонстрировал высокую антиоксидантную активность изучаемых образцов (65,87–195,44 мг АК/г). При этом максимальные антиокислительные свойства отмечены для образцов Dc-a2 (экстракт культуры адвентивных корней диоскореи обыкновенной, полученный микроволновой экстракцией, 183,50 мг АК/г), Dm-c2 (экстракт каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого, полученный микроволновой экстракцией, 148,80 мг АК/г) и Pg-c2 (экстракт каллусной культуры женьшеня обыкновенного, полученный микроволновой экстракцией, 136,90 мг АК/г).

Для образцов экстрактов, продемонстрировавших максимальные антиоксидантные свойства (с использованием метода, основанного на восстановлении радикала DPPH), на рисунках 5.3.3–5.3.5 приведены кривые, отражающие кинетику реакции восстановления радикала DPPH. В качестве контроля использовали раствор аскорбиновой кислоты. Концентрация аскорбиновой кислоты и экстрактов, используемых в кинетическом

эксперименте, составляла  $EC_{50}$  – концентрации антиоксидантов, при которой наблюдается ингибирование 50 % от первоначального количества DPPH-радикалов.

Из представленных рисунков видно, что экстракты Dc-a2, Dm-c2 и Pg-c2 характеризуются высокой скоростью подавления активности радикалов DPPH, что сопоставимо со способностью аскорбиновой кислоты. Данное наблюдение объясняется высоким содержанием в тестируемых экстрактах вторичных метаболитов.

Согласно таблице 5.3.3, минимальная антиоксидантная активность отмечена для образцов растительных экстрактов Es-a2 (105,44 мг АК/г) и Sd-a2 (103,12 мг АК/г). Согласно литературным данным, пониженная антиоксидантная активность растительных экстрактов может быть обусловлена присутствием в них большого количества соединений, характеризующихся низкой скоростью восстановления: в экстрактах сапожниковии растопыренной такими соединениями могут быть хромоны и полисахариды.

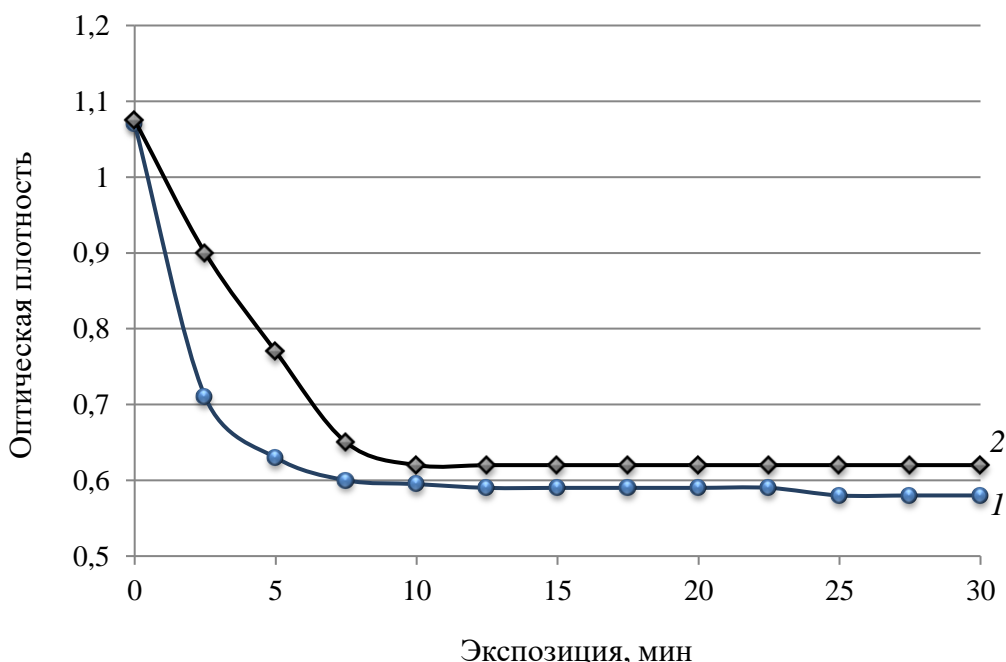


Рисунок 5.3.3 – Кинетические кривые падения оптической плотности DPPH при  $\lambda=517$  нм в ходе взаимодействия с антиоксидантами:

1 – аскорбиновая кислота, 2 – экстракт Dc-a2

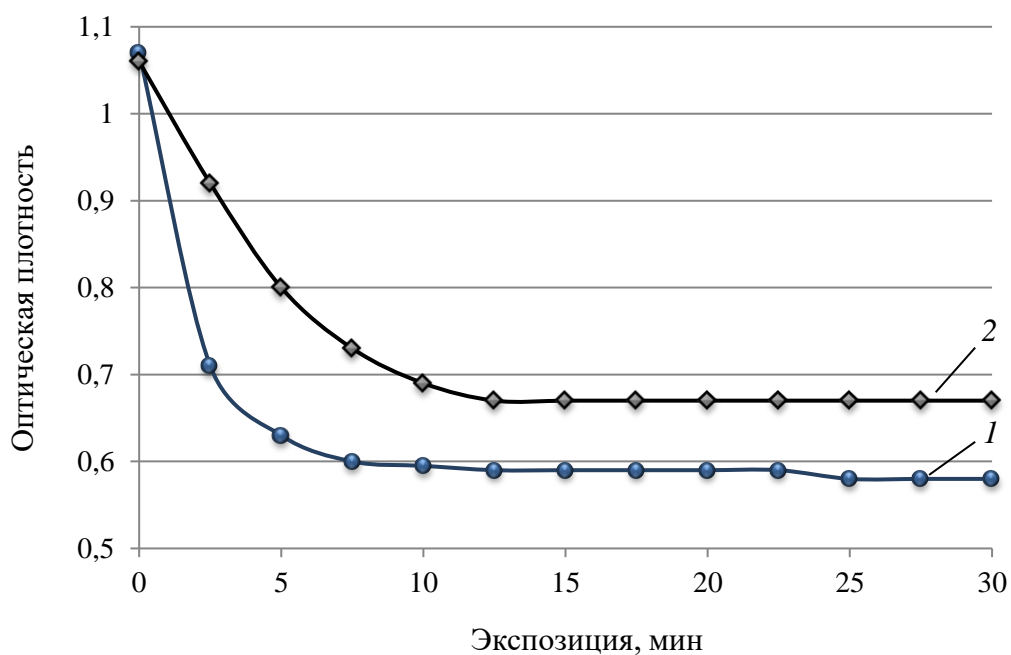


Рисунок 5.3.4 – Кинетические кривые падения оптической плотности DPPH при  $\lambda=517$  нм в ходе взаимодействия с антиоксидантами:  
1 – аскорбиновая кислота, 2 – экстракт Dm-c2

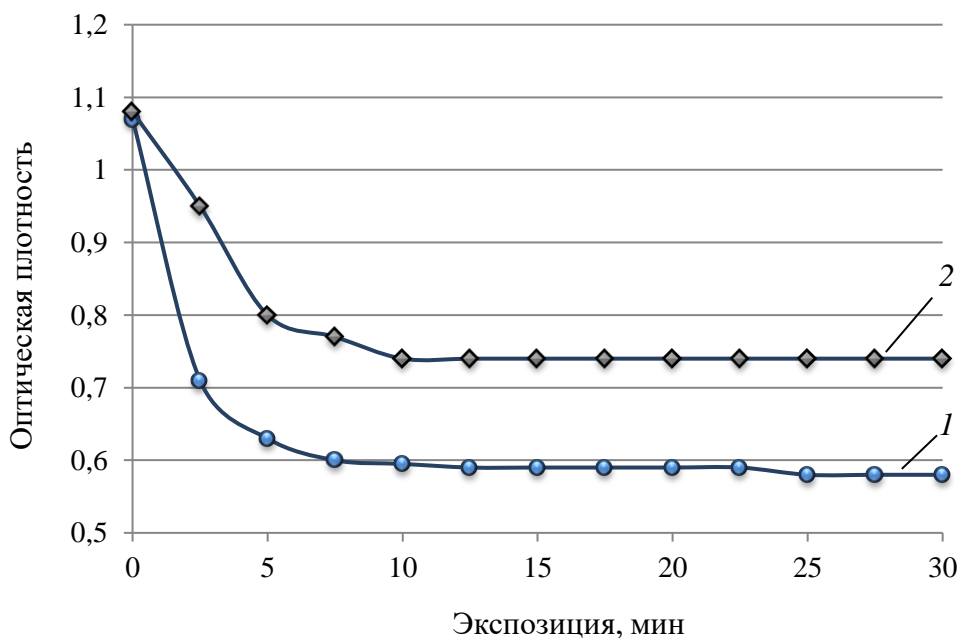


Рисунок 5.3.5 – Кинетические кривые падения оптической плотности DPPH при  $\lambda=517$  нм в ходе взаимодействия с антиоксидантами:  
1 – аскорбиновая кислота, 2 – экстракт Pg-c2

В целом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования полученных экстрактов растений в качестве источника антиоксидантов.

#### 5.4 Заключение по пятой главе

Изучен компонентный состав экстрактов природного сырья и клеточных культур растений, полученных разными методами. Для экстрактов левзеи сафлоровидной зафиксировано высокое содержание флавоноидов апигенина (24,9–53,15 мг/мл), кверцетина (16,13–31,26 мг/мл), рутина (14,59–28,04 мг/мл), представителя экдистероидов – 20-гидроксиэкдизона (11,34–29,20 мг/мл) и фенольных кислот – кофейной (18,23–45,44 мг/мл), хлорогеновой (12,78–28,47 мг/мл).

В экстрактах женьшеня обыкновенного доминируют тритерпеновые гликозиды: панаксозид (10,99–27,37 мг/мл), гинзенозид RB<sub>1</sub> (6,34–15,65 мг/мл), а также сиреневая кислота (3,88–11,48 мг/мл). Экстракты элеутерококка колючего богаты кофейной кислотой (5,86–13,34 мг/мл), элеутерозидами (7,24–14,05 мг/мл), гиперозидом (4,22–8,52 мг/мл), эритрогваяцилглицерол- $\beta$ -кониферилловым альдегидным эфиром (4,15–7,41 мг/мл). Для экстрактов пальчатокоренника пятнистого характерно высокое содержание таких флавоноидов, как рутин (12,34–24,06 мг/мл), кверцетин (10,45–21,47), кверцетин-3,7-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид (7,61–14,66 мг/мл), апигенин (6,45–12,12 мг/мл).

В экстрактах диоскореи обыкновенной преобладают диосцин (5,43–15,04 мг/мл), спиростенол А (5,12–14,94 мг/мл), кверцетин (4,87–13,12 мг/мл), рутин (4,09–11,65 мг/мл). В экстрактах сапожниковии растопыренной отмечено максимальное содержание хромонов перв-О-глюкозилцимифугина

(12,23–42,54 мг/мл), 4'-*O*-β-D-глюкозил-5-*O*-метилвисамминола (10,56–37,78 мг/мл), гамаудола (9,22–32,41 мг/мл) и цимифугина (7,12–23,26 мг/мл).

Для всех изученных экстрактов выявлена закономерность: максимальные концентрации целевых БАВ накапливаются в экстрактах клеточных культур (каллусных или корневых) растений, полученных в микроволновом варианте экстракции.

Проведена оценка физико-химических свойств и показателей токсичности экстрактов, полученных разными методами. Выявлено, что массовая доля сухого остатка в изучаемых экстрактах варьируется в диапазоне от 4,27 % (экстракт корневища элеутерококка колючего, полученный методом микроволновой экстракции) до 6,22 % (экстракт культуры адвентивных корней сапожниковии растопыренной, полученный циркуляционным экстрагированием). Содержание экстрагента в тестируемых экстрактах принимает значения в диапазоне от 61,4 % (экстракт корневища элеутерококка колючего, полученный методом перколяции) до 68,0 % (экстракт корня женьшеня обыкновенного, полученный микроволновой экстракцией). Полученные значения согласуются с литературными данными и требованиями фармакопейных статей.

Установлено соответствие всех исследуемых образцов экстрактов требованиям нормативной документации по содержанию тяжелых металлов: свинца, кадмия, ртути и мышьяка. В результате оценки токсичности экстрактов с использованием биолюминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* показано, что все тестируемые экстракты не подавляют в значительной степени хемилюминесценцию тест-штамма *V. Fischeri* (интенсивность сигнала 83,5–100 %), что свидетельствует об их низкой токсичности и возможности использования в технологиях пищевых продуктов и напитков.

Изучена биологическая (антимикробная и антиоксидантная) активность *in vitro* экстрактов, полученных разными методами. Совокупный анализ результатов оценки антагонистической активности экстрактов двумя методами (на твердой и в жидкой питательных средах) показал высокий

антимикробный потенциал изучаемых объектов по отношению к тест-штаммам: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus viridans*, *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Penicillium citrinum*.

Два метода установления антиоксидантной активности экстрактов (спектрофотометрический метод, основанный на измерении способности антиоксидантов улавливать радикал ABTS, и метод, основанный на способности антиоксидантов восстанавливать радикал DPPH) продемонстрировали высокий антиоксидантный потенциал объектов исследования. Согласно данным первого метода, значения полумаксимальной эффективной концентрации  $EC_{50}$  образцов находятся в диапазоне от 4,0 масс. % до 15,0 масс. %. Согласно данным второго метода, антиоксидантная активность тестируемых экстрактов находится в диапазоне от 65,87 до 195,44 мг АК/г.

Полученные результаты – доказательство перспективности использования полученных экстрактов растений в качестве источника антиоксидантов в разных областях промышленности, например, в производстве продуктов питания и напитков функциональной направленности.

## **ГЛАВА 6. ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ ОЧИСТКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР**

Глава содержит результаты подбора параметров очистки спиртовых экстрактов, полученных из надземных и подземных частей растений, а также из биомассы их клеточных культур, выращенных *in vitro*: каллусных и корневых. Рассмотрены два метода очистки экстрактов от балластных веществ: ультрафильтрационный и хроматографический. Также в данной главе представлены результаты оценки показателей качества, безопасности и биологической активности экстрактов, очищенных разными методами.

### **6.1 Подбор параметров очистки ультрафильтрационным методом растительных экстрактов, полученных из природного сырья и клеточных культур**

Важнейшей стадией получения растительных препаратов является очистка экстрактов от балластных веществ, позволяющая в значительной степени повысить эффективность действующих компонентов препарата. С медико-фармацевтической и технологической точек зрения химические вещества растений условно подразделяют на действующие, сопутствующие и балластные [14]. Действующие (или биологически активные) вещества – это соединения, обуславливающие терапевтическую ценность данного вида сырья для организма человека или животного. Растения, разрешенные для лечебного применения уполномоченными органами соответствующих стран, называются официальными, главнейшие из которых включаются в «Государственную фармакопею». К действующим веществам растений



относят различные группы алкалоидов и гликозидов, кумарины, витамины, эфирные масла, фенолы и другие группы веществ [391, 2].

Сопутствующими веществами называют вещества, обладающие определенной фармакологической активностью, но непосредственно не влияющие на достижение конечного терапевтического результата. К ним относятся продукты первичного и / или вторичного метаболизма, например, сапонины, часто встречающиеся в растениях, содержащих сердечные гликозиды, ускоряют всасывание последних в кишечнике, обеспечивая тем самым более быстрый терапевтический эффект; аскорбиновая кислота потенцирует действие флавоноидов, регулирующих сосудистую проницаемость. Дубильные вещества могут препятствовать качественному приготовлению ряда лекарственных форм. От таких сопутствующих веществ, как правило, стремятся освободиться.

Балластные вещества в растениях представлены преимущественно продуктами вторичного синтеза, наиболее часто – производными углеводов. В достижении терапевтического эффекта их роль незначительна или сводится к нулю [12].

В этой связи растительные препараты классифицируют на 4 группы: галеновые (суммарные извлечения), новогаленовые (с высокой степенью очистки от сопутствующих и балластных веществ), препараты индивидуальных веществ (на основе биологически активных веществ направленного действия) и комплексные фитопрепараты, содержащие соединения, выделенные из растений, и вещества нерастительного происхождения. Галеновые препараты представляют собой группу лекарственных средств, получаемых из растительного сырья путем вытяжки (экстракции). Принимаются почти исключительно внутрь (перорально), что отличает их от неогаленовых (новогаленовых) препаратов. Новогаленовые препараты (*Praeparata neogalenica*) – максимально очищенные экстракционные препараты, содержащие в своем составе исключительно комплекс действующих веществ в их природном состоянии. Новогаленовые

препараты более устойчивы при хранении по сравнению с галеновыми, обладают постоянством действия на основе более строгой стандартизации, не вызывают побочных эффектов, обусловленных наличием балластных веществ, их можно применять парентерально. Их выпускают в виде консервированных и стандартных жидких продуктов, предназначенных для перорального, наружного или инъекционного применения, или в виде твердых таблетированных препаратов [12, 192, 357].

Для очистки растительных экстрактов применяют различные методы: фильтрация, диализ и электродиализ, высаливание, спиртоочистка, денатурация (для очистки от белковых примесей), хроматография (адсорбционная, ионообменная). В каждом отдельном случае в зависимости от количества и свойств балластных веществ пользуются индивидуальным методом очистки.

В данной работе рассматривали два метода очистки растительных экстрактов: ультрафильтрационный и хроматографический.

Метод ультрафильтрационной очистки растительных экстрактов имеет ряд очевидных преимуществ перед другими методами, к которым относятся использование низкотемпературных режимов (температура окружающей среды), отсутствие фазовых переходов в разделяемой системе, возможность очистки экстрактов от высокомолекулярных примесей (например, полисахаридов).

Ультрафильтрацию экстрактов осуществляли на установке МФУ-Р-45-300 (Россия) при использовании мембран с диаметром пор 5, 10, 15 кДа и давления 0,25 и 0,5 МПа.

Предварительно подбирали рациональные значения диаметра пор мембран и давления при однократной очистке. Контролируемыми параметрами являлись содержание действующих БАВ (экистероидов в экстрактах левзеи сафлоровидной, флавоноидов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого, тритерпеновых гликозидов в экстрактах женьшеня обыкновенного, фенилпропаноидов в экстрактах элеутерококка

колючего, гликозидов в экстрактах диоскореи обыкновенной, хромонов в экстрактах сапожниковии растопыренной) и содержание балластных веществ углеводной природы в ультрапермеате. Полученные результаты для 28-ми экстрактов приведены в таблице 6.1.1.

Проанализировав данные таблицы 6.1.1, пришли к выводу, что при обоих тестируемых значениях давления (0,25 МПа и 0,5 МПа) ультрафильтрация экстрактов левзеи сафлоровидной и элеутерококка колючего наиболее эффективно позволяет очистить их от балластных веществ при использовании мембран с диаметром пор 10 кДа, в случае экстрактов пальчатокоренника пятнистого – при использовании мембран с диаметром пор 5 кДа, для экстрактов женьшеня обыкновенного, диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной данное значение составляет 15 кДа. Диаметр пор мембран выбирали на основе максимального значения повышения выхода действующих БАВ и максимального значения снижения выхода балластных веществ в полученном ультрапермеате. Выбор мембран с различным диаметром пор обусловлен отличающимся составом балластных БАВ в экстрактах рассматриваемых растений.

Таблица 6.1.1 – Результаты подбора рациональных параметров ультрафильтрации растительных экстрактов

Образец экстракта	Содержание действующих БАВ в ультрапермеате, %, в зависимости от диаметра пор мембран, кДа				Содержание балластных веществ в ультрапермеате, %, в зависимости от диаметра пор мембран, кДа			
	5	10	15	до очистки	5	10	15	до очистки
давление 0,25 МПа								
Rc-r1	13,7±0,7	<b>16,4±0,8</b>	16,5±0,8	12,9±0,7	1,52±0,08	<b>1,18±0,06</b>	1,19±0,06	1,54±0,08
Rc-a1	24,8±1,2	<b>31,0±1,6</b>	31,2±1,6	24,3±1,2	1,45±0,07	<b>1,05±0,05</b>	1,03±0,05	1,46±0,07
Rc-r2	15,1±0,8	<b>18,5±0,9</b>	18,5±0,9	14,4±0,7	1,53±0,08	<b>1,10±0,06</b>	1,12±0,06	1,57±0,08
Rc-a2	29,3±1,5	<b>36,6±1,8</b>	36,8±1,8	28,7±1,4	1,42±0,07	<b>1,11±0,06</b>	1,09±0,05	1,44±0,07
Pg-r1	3,6±0,2	3,8±0,2	<b>5,2±0,3</b>	3,3±0,2	2,11±0,11	2,08±0,10	<b>1,32±0,07</b>	2,12±0,11
Pg-c1	7,8±0,4	8,1±0,4	<b>11,4±0,6</b>	7,8±0,4	2,05±0,10	1,96±0,10	<b>1,35±0,07</b>	2,08±0,10
Pg-r2	4,5±0,3	4,6±0,3	<b>6,3±0,3</b>	4,4±0,2	2,15±0,11	2,04±0,10	<b>1,29±0,06</b>	2,17±0,11

Продолжение таблицы 6.1.1

Образец экстракта	Содержание действующих БАВ в ультрапермеате, %, в зависимости от диаметра пор мембран, кДа				Содержание балластных веществ в ультрапермеате, %, в зависимости от диаметра пор мембран, кДа			
	5	10	15	до очистки	5	10	15	до очистки
Pg-c2	9,8±0,5	9,9±0,5	<b>14,7±0,8</b>	9,6±0,5	1,74±0,09	1,65±0,08	<b>1,11±0,06</b>	1,76±0,09
Es-r1	5,5±0,3	<b>7,1±0,4</b>	7,2±0,4	5,4±0,3	1,26±0,06	<b>0,74±0,04</b>	0,72±0,04	1,33±0,07
Es-a1	10,0±0,5	<b>16,5±0,8</b>	16,7±0,8	9,8±0,5	1,18±0,06	<b>0,67±0,03</b>	0,65±0,03	1,21±0,06
Es-r2	7,2±0,4	<b>11,0±0,6</b>	11,2±0,6	7,0±0,4	1,45±0,07	<b>0,81±0,04</b>	0,79±0,04	1,48±0,07
Es-a2	10,7±0,5	<b>15,5±0,8</b>	15,7±0,8	10,6±0,6	1,14±0,06	<b>0,59±0,03</b>	0,61±0,03	1,17±0,06
Dm-t1	<b>7,9±0,4</b>	8,0±0,4	7,9±0,4	5,7±0,3	<b>0,64±0,03</b>	0,65±0,03	0,63±0,03	1,08±0,05
Dm-c1	<b>14,8±0,8</b>	15,0±0,8	15,0±0,8	10,5±0,5	<b>0,58±0,03</b>	0,55±0,03	0,59±0,03	0,94±0,05
Dm-t2	<b>9,5±0,5</b>	9,7±0,5	9,6±0,5	6,3±0,3	<b>0,61±0,03</b>	0,59±0,03	0,62±0,03	1,15±0,06
Dm-c2	<b>16,2±0,8</b>	16,5±0,8	16,7±0,8	11,1±0,5	<b>0,55±0,03</b>	0,53±0,03	0,54±0,03	1,03±0,05
Dc-h1	3,8±0,2	3,9±0,2	<b>4,7±0,3</b>	3,7±0,2	1,20±0,06	1,18±0,06	<b>0,83±0,04</b>	1,24±0,06
Dc-a1	8,4±0,4	8,5±0,4	<b>12,1±0,6</b>	8,2±0,4	1,12±0,06	1,10±0,06	<b>0,75±0,04</b>	1,16±0,06
Dc-h2	5,2±0,3	5,3±0,3	<b>8,4±0,4</b>	5,1±0,3	1,24±0,06	1,15±0,06	<b>0,87±0,04</b>	1,30±0,07
Dc-a2	10,7±0,5	10,7±0,6	<b>16,9±0,9</b>	10,6±0,6	1,16±0,06	1,11±0,05	<b>0,75±0,04</b>	1,19±0,06
Sd-s1	7,3±0,4	7,5±0,4	<b>12,6±0,7</b>	7,1±0,4	2,30±0,12	2,31±0,12	<b>1,66±0,08</b>	2,34±0,12
Sd-a1	18,8±0,9	19,0±1,0	<b>29,4±1,5</b>	18,7±0,9	2,37±0,12	2,35±0,12	<b>1,54±0,08</b>	2,41±0,12
Sd-s2	9,5±0,5	9,5±0,5	<b>14,0±0,7</b>	9,3±0,5	2,22±0,11	2,19±0,11	<b>1,45±0,07</b>	2,25±0,11
Sd-a2	24,3±1,2	24,5±1,2	<b>33,2±1,7</b>	24,1±1,2	2,25±0,11	2,21±0,11	<b>1,44±0,07</b>	2,29±0,11
давление 0,5 МПа								
Rc-r1	14,1±0,7	<b>18,4±0,9</b>	18,5±1,0	12,9±0,7	1,51±0,08	<b>1,02±0,05</b>	1,01±0,05	1,54±0,08
Rc-a1	24,8±1,2	<b>33,4±1,7</b>	33,5±1,7	24,3±1,2	1,44±0,07	<b>0,93±0,05</b>	0,92±0,05	1,46±0,08
Rc-r2	15,1±0,8	<b>19,7±1,0</b>	19,8±1,0	14,4±0,7	1,55±0,08	<b>0,96±0,05</b>	0,95±0,05	1,57±0,08
Rc-a2	29,3±1,5	<b>38,4±1,9</b>	38,5±1,9	28,7±1,5	1,42±0,07	<b>1,04±0,05</b>	1,05±0,05	1,44±0,07
Pg-r1	3,6±0,2	4,1±0,2	<b>6,2±0,3</b>	3,3±0,2	2,10±0,10	2,05±0,10	<b>1,24±0,06</b>	2,12±0,11
Pg-c1	7,9±0,4	8,5±0,4	<b>12,1±0,6</b>	7,8±0,4	2,04±0,10	1,90±0,10	<b>1,21±0,06</b>	2,08±0,10
Pg-r2	4,7±0,3	5,1±0,3	<b>7,3±0,4</b>	4,4±0,2	2,14±0,11	2,01±0,10	<b>1,15±0,06</b>	2,17±0,11
Pg-c2	9,9±0,5	10,3±0,5	<b>15,1±0,8</b>	9,6±0,5	1,72±0,09	1,61±0,08	<b>0,95±0,05</b>	1,76±0,09
Es-r1	5,7±0,3	<b>7,9±0,4</b>	8,0±0,4	5,4±0,3	1,24±0,06	<b>0,61±0,03</b>	0,60±0,03	1,33±0,07
Es-a1	10,2±0,5	<b>17,4±0,9</b>	17,5±0,9	9,8±0,5	1,15±0,06	<b>0,54±0,03</b>	0,53±0,03	1,21±0,06
Es-r2	7,5±0,4	<b>11,8±0,6</b>	11,9±0,6	7,0±0,4	1,40±0,07	<b>0,72±0,04</b>	0,71±0,04	1,48±0,07
Es-a2	10,9±0,6	<b>16,6±0,9</b>	16,7±0,9	10,6±0,5	1,11±0,06	<b>0,51±0,03</b>	0,51±0,03	1,17±0,06

Окончание таблицы 6.1.1

Образец экстракта	Содержание действующих БАВ в ультрапермеате, %, в зависимости от диаметра пор мембран, кДа				Содержание балластных веществ в ультрапермеате, %, в зависимости от диаметра пор мембран, кДа			
	5	10	15	до очистки	5	10	15	до очистки
Dm-t1	<b>8,7±0,5</b>	8,8±0,5	8,9±0,5	5,7±0,3	<b>0,53±0,03</b>	0,53±0,03	0,51±0,03	1,08±0,05
Dm-c1	<b>15,3±0,8</b>	15,4±0,8	15,4±0,8	10,5±0,5	<b>0,47±0,03</b>	0,45±0,02	0,48±0,03	0,94±0,05
Dm-t2	<b>10,6±0,6</b>	10,7±0,6	10,6±0,5	6,3±0,3	<b>0,52±0,03</b>	0,51±0,03	0,52±0,03	1,15±0,06
Dm-c2	<b>16,9±0,8</b>	16,9±0,8	17,0±0,9	11,1±0,6	<b>0,46±0,02</b>	0,45±0,02	0,44±0,02	1,03±0,05
Dc-h1	3,8±0,2	3,8±0,2	<b>5,4±0,3</b>	3,7±0,2	1,21±0,06	1,19±0,06	<b>0,73±0,04</b>	1,24±0,06
Dc-a1	8,2±0,4	8,4±0,4	<b>12,8±0,6</b>	8,2±0,4	1,12±0,06	1,10±0,05	<b>0,62±0,03</b>	1,16±0,06
Dc-h2	5,1±0,3	5,2±0,3	<b>9,5±0,5</b>	5,1±0,3	1,24±0,06	1,12±0,06	<b>0,73±0,04</b>	1,30±0,06
Dc-a2	10,7±0,5	10,6±0,6	<b>17,5±0,9</b>	10,6±0,5	1,16±0,06	1,13±0,06	<b>0,66±0,03</b>	1,19±0,06
Sd-s1	7,2±0,4	7,4±0,4	<b>13,8±0,7</b>	7,1±0,4	2,32±0,12	2,28±0,11	<b>1,41±0,07</b>	2,34±0,12
Sd-a1	18,7±1,0	18,9±1,0	<b>32,1±1,6</b>	18,7±0,9	2,36±0,12	2,33±0,12	<b>1,39±0,07</b>	2,41±0,12
Sd-s2	9,4±0,5	9,7±0,5	<b>15,2±0,8</b>	9,3±0,5	2,20±0,11	2,17±0,11	<b>1,35±0,07</b>	2,25±0,12
Sd-a2	24,2±1,2	24,3±1,2	<b>33,9±1,7</b>	24,1±1,2	2,25±0,11	2,15±0,11	<b>1,33±0,07</b>	2,29±0,12

Так, к основным балластным биологически активным веществам в экстрактах *R. carthamoides* относятся эфирные масла и полисахариды, в экстрактах *P. ginseng* – сапонины, эфирные масла и полисахариды. Экстракты *E. senticosus* содержат такие балластные компоненты, как смолы, камеди, дубильные вещества; экстракты *D. maculata* – сапонины, дубильные вещества; экстракты *D. communis* – сапонины, фенантрены. Наконец, для экстрактов

*S. divaricata* характерно наличие таких балластных БАВ, как эфирные масла и полисахариды.

Также, исходя из анализа результатов, представленных в таблице 6.1.1, очевидно, что во всех рассмотренных вариантах эксперимента наиболее эффективная очистка спиртовых экстрактов достигается при использовании давления 0,5 МПа. Например, содержание действующих БАВ в ультрапермеате для экстрактов левзеи сафлоровидной в процессе их ультрафильтрации при 0,5 МПа и использовании мембран с диаметром пор

10 кДа превышает таковое для аналогичных экстрактов, полученных при 0,25 МПа, на 4,9–12,2 %. Одновременно содержание балластных веществ в пермеате, полученном при давлении 0,25 МПа, превышает таковое для пермеата, полученного при 0,5 МПа, на 6,7–15,7 %. Аналогичные значения превышения содержания действующих веществ выявлены в экстрактах женьшеня обыкновенного – 2,7–19,2 % и 6,4–16,8 % (мембраны с диаметром пор 15 кДа); для экстрактов элеутерококка колючего – 5,5–11,3 % и 12,5–24,1 % (мембраны с диаметром пор 10 кДа); для экстрактов пальчатокоренника пятнистого – 3,4–11,6 % и 11,5–20,8 % (мембраны с диаметром пор 5 кДа); для экстрактов диоскорей обыкновенной – 3,6–14,9 % и 13,6–21,0 % (мембраны с диаметром пор 15 кДа); для экстрактов сапожниковии растопыренной – 2,1–9,2 % и 7,4–17,7 % (мембраны с диаметром пор 15 кДа), соответственно.

Таким образом, подобраны рациональные параметры однократной ультрафильтрационной очистки водно-этанольных растительных экстрактов от балластных веществ:

- для экстрактов левзеи сафлоровидной и элеутерококка колючего – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 10 кДа;
- для экстрактов пальчатокоренника пятнистого – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 5 кДа;
- для экстрактов женьшеня обыкновенного, диоскорей обыкновенной и сапожниковии растопыренной – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа.

Интерес представляет также изучение возможности многократной очистки экстрактов ультрафильтрацией при выбранных параметрах с целью повышения эффективности удаления балластных компонентов. Полученные результаты представлены на рисунках 6.1.1–6.1.6.

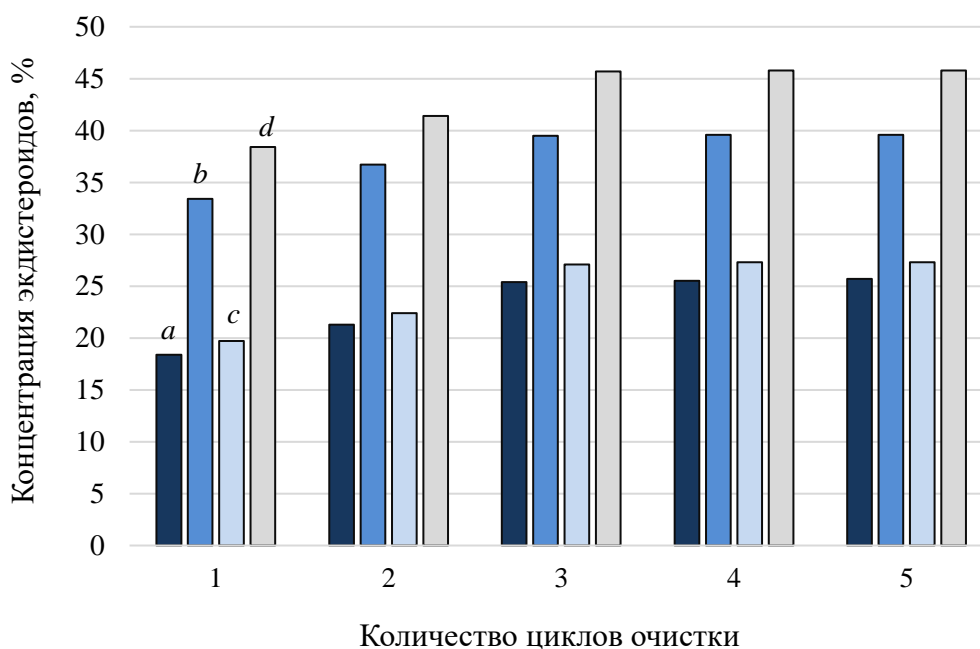


Рисунок 6.1.1 – Результаты изучения эффективности многократной очистки экстрактов *R. carthamoides* ультрафильтрацией (давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 10 кДа): а – Rc-r1, б – Rc-a1, с – Rc-r2, d – Rc-a2

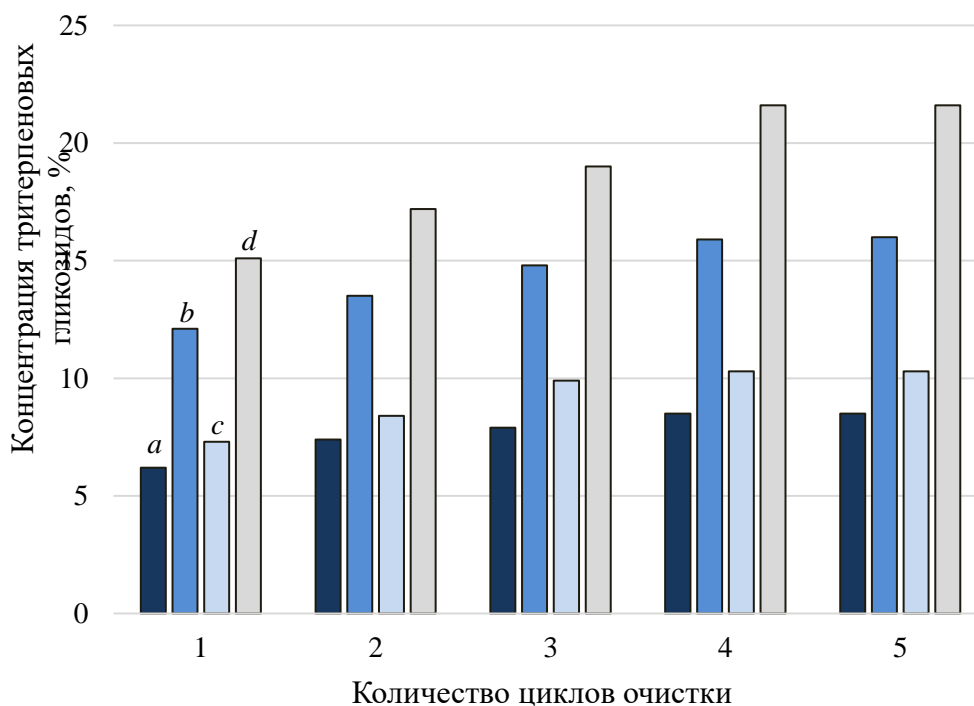


Рисунок 6.1.2 – Результаты изучения эффективности многократной очистки экстрактов *P. ginseng* ультрафильтрацией (давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа): а – Pg-r1, б – Pg-c1, с – Pg-r2, d – Pg-c2

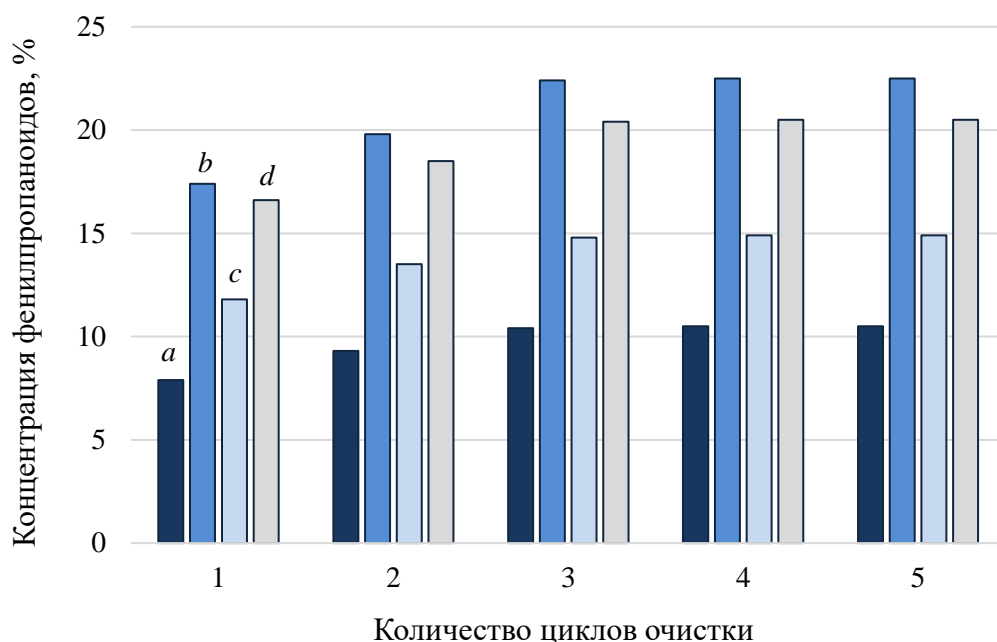


Рисунок 6.1.3 – Результаты изучения эффективности многократной очистки экстрактов *E. senticosus* ультрафильтрацией (давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 10 кДа): а – Es-r1, b – Es-a1, c – Es-r2, d – Es-a2

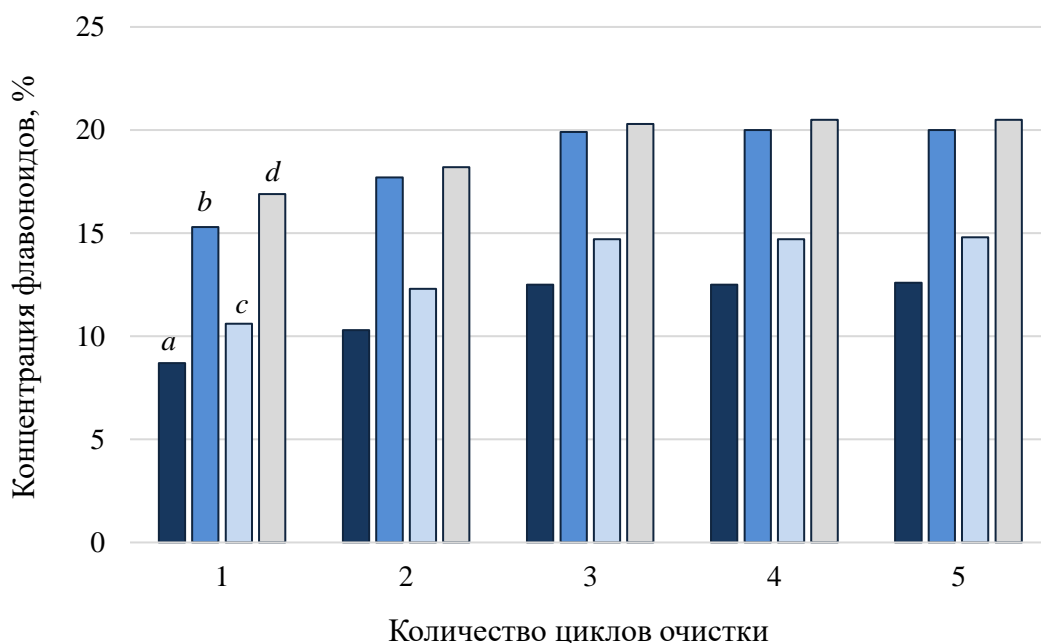


Рисунок 6.1.4 – Результаты изучения эффективности многократной очистки экстрактов *D. maculata* ультрафильтрацией (давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 5 кДа): а – Dm-t1, b – Dm-c1, c – Dm-t2, d – Dm-c2



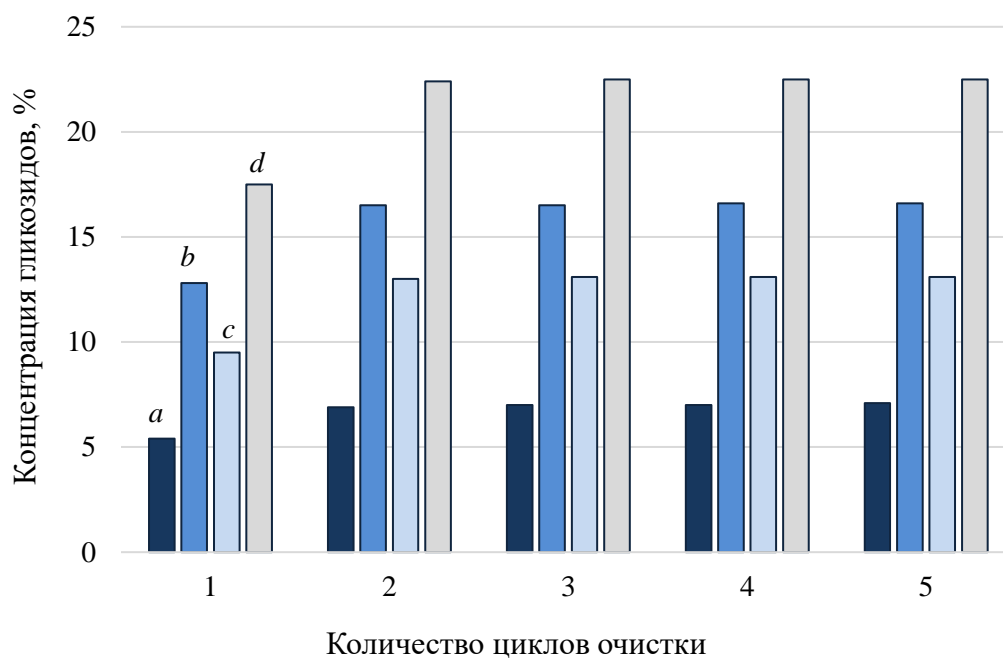


Рисунок 6.1.5 – Результаты изучения эффективности многократной очистки экстрактов *D. complanis* ультрафильтрацией (давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа): а – Dc-h1, b – Dc-a1, c – Dc-h2, d – Dc-a2

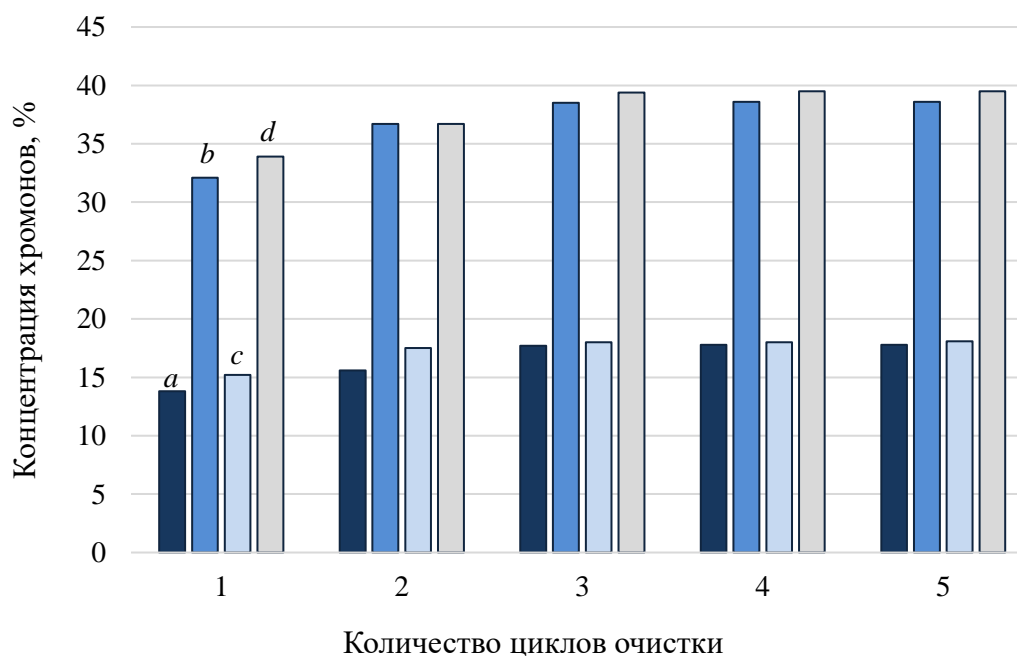


Рисунок 6.1.6 – Результаты изучения эффективности многократной очистки экстрактов *S. divaricata* ультрафильтрацией (давление 0,5 Мпа, диаметр пор мембран 15 кДа): а – Sd-s1, b – Sd-a1, c – Sd-s2, d – Sd-a2

Полученные результаты показали, что во всех рассмотренных вариантах целесообразно проводить несколько циклов ультрафильтрационной очистки экстрактов: 2 цикла для экстрактов диоскореи обыкновенной, 3 цикла для экстрактов левзеи сафлоровидной, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, сапожниковии растопыренной, 4 цикла для экстрактов женьшеня обыкновенного. В данных условиях содержание экидистероидов в экстрактах *R. carthamoides* увеличивается на 18,6–38,6 % по сравнению с однократной ультрафильтрацией; содержание тритерпеноидных гликозидов в экстрактах *P. ginseng* возрастает на 32,2–43,0 %. В экстрактах *E. senticosus* содержание фенилпропаноидов увеличивается на 23,5–32,9 % по сравнению с однократной очисткой; в экстрактах *D. maculata* содержание флавоноидов увеличивается на 21,3–44,8 %; в экстрактах *D. communis* возрастает концентрация гликозидов на 28,6–37,9 %; в экстрактах *S. divaricata* увеличивается содержание хромонов на 16,5–29,0 %.

В результате проведенных исследований подобраны рациональные параметры ультрафильтрационной очистки растительных экстрактов, полученных из природного растительного сырья и клеточных культур:

- для экстрактов левзеи сафлоровидной и элеутерококка колючего – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 10 кДа, 3 цикла очистки;
- для экстрактов женьшеня обыкновенного – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа, 4 цикла очистки;
- для экстрактов пальчатокоренника пятнистого – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 5 кДа, 3 цикла очистки;
- для экстрактов диоскореи обыкновенной – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа, 2 цикла очистки;
- для экстрактов сапожниковии растопыренной – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа, 3 цикла очистки.

## **6.2 Подбор параметров очистки хроматографическим методом растительных экстрактов, полученных из природного сырья и клеточных культур**

Перспективным методом очистки биологических объектов и систем является хроматография, в основе которой лежит ряд важных физико-химических принципов. Хроматография классифицируется на аффинную, ионообменную, тонкослойную, гель-хроматографию и другие варианты. Выбор метода в каждом конкретном случае определяется природой и химическими свойствами разделяемых соединений.

Важное внимание при подборе параметров хроматографического разделения уделяется выбору неподвижной (стационарной) фазы. Для разделения полярных компонентов активно применяются силикагель (не модифицированный и модифицированный), оксид алюминия и диоксид кремния. Силикагель рекомендуется использовать преимущественно для разделения основных соединений, а оксид алюминия – кислых соединений. Помимо кислотности, полярности и заряда, важную роль в успешном разделении соединений играет размер частиц стационарной фазы.

В настоящей работе очистку растительных экстрактов осуществляли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, жидкостный хроматограф LC-20, Shimadzu, Япония). В качестве стационарной фазы рассматривали:

- силикагель 60 для колоночной хроматографии, размер частиц 40–63 мкм (Panreac, Испания);
- микрокристаллическую целлюлозу для колоночной хроматографии (Merck, Германия);
- сефарозу CL-6B, средний размер частиц 90 мкм (GE Healthcare, США);

- силикагель с октадецильной группой  $C_{18}$  со средним размером частиц 2,5; 3,5; 15,0 мкм (Nacalai Tesque, Inc., Япония);
- силикагель  $C_8$ , эндкепированный, средний размер частиц 5 мкм (Sigma-Aldrich, США).

Для очистки экстрактов хроматографию вели при следующих параметрах: скорость элюции 5 мл/мин; колонка, заполненная силикагелем 60 / или микрокристаллической целлюлозой / или сефарозой CL-6B / или силикагелем  $C_{18}$  (3,5 мкм) / или силикагелем  $C_8$ ; диаметр колонки 100 мм, длина колонки 150 мм; подвижная фаза – ацетонитрил / вода с градиентом ацетонитрила от 1 % до 80 % за 60 мин; детектор – диодная матрица, длина волны детектирования 250 нм; сбор фракций – со 2 по 30 минуты.

Для растительных экстрактов после хроматографирования определяли степень очистки и концентрацию действующих биологически активных веществ (экистероидов в экстрактах левзеи сафлоровидной, флавоноидов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого, тритерпеновых гликозидов в экстрактах женьшеня обыкновенного, фенилпропаноидов в экстрактах элеутерококка колючего, гликозидов в экстрактах диоскореи обыкновенной, хромонов в экстрактах сапожниковии растопыренной). Полученные результаты представлены в таблице 6.2.1.

Согласно данным таблицы 6.2.1, наиболее эффективная очистка растительных экстрактов достигается при использовании в качестве стационарной фазы силикагеля с октадецильной группой  $C_{18}$ . В данном случае степень очистки экстрактов находится в диапазоне от 83,9 до 96,0 %. Кроме того, данный метод очистки позволяет повысить содержание действующих БАВ в экстрактах по сравнению с ультрафильтрационным методом очистки и хроматографией с использованием других неподвижных фаз. Так, концентрация экистероидов в экстрактах левзеи сафлоровидной, очищенных хроматографией при использовании силикагеля  $C_{18}$ , составляет 38,7–61,4 % (для сравнения в экстрактах, очищенных ультрафильтрацией, концентрация действующих БАВ равна 25,7–45,8 %).

Таблица 6.2.1 – Результаты определения степени очистки растительных экстрактов и концентрации действующих БАВ после хроматографирования

Образец экстракта	Степень очистки экстракта, %, в зависимости от используемой стационарной фазы					Содержание действующих БАВ в экстракте, %, в зависимости от используемой стационарной фазы				
	1	2	3	4	5*	1	2	3	4	5
Rc-r1	72,3±6,4	67,5±3,4	45,8±2,3	<b>88,5±4,4</b>	79,4±4,0	32,5±1,6	27,6±1,4	25,3±1,3	<b>38,7±2,0</b>	35,2±1,8
Rc-a1	75,0±3,8	59,7±3,0	44,3±2,2	<b>94,3±4,7</b>	81,6±4,1	48,7±2,4	44,8±2,2	39,0±2,0	<b>54,6±2,7</b>	51,0±2,6
Rc-r2	74,8±3,7	64,3±3,2	46,0±2,3	<b>83,9±4,2</b>	80,6±4,0	35,0±1,8	31,2±1,6	27,8±1,4	<b>42,0±2,1</b>	38,7±1,9
Rc-a2	72,0±3,6	68,9±3,4	51,6±2,6	<b>95,2±4,8</b>	79,0±4,0	55,3±2,8	49,0±2,4	46,3±2,3	<b>61,4±3,1</b>	58,0±2,9
Pg-r1	76,2±3,8	59,0±3,0	48,0±2,4	<b>95,6±4,8</b>	84,5±4,2	16,7±0,8	12,4±0,6	9,2±0,5	<b>21,7±1,1</b>	19,0±1,0
Pg-c1	73,8±3,7	65,4±3,3	45,3±2,3	<b>93,0±4,7</b>	80,5±4,0	24,5±1,2	19,3±1,0	16,4±0,8	<b>31,0±1,6</b>	28,5±1,4
Pg-r2	74,0±3,7	54,6±2,7	46,6±2,3	<b>94,7±4,7</b>	78,6±3,9	19,0±1,0	14,8±0,8	11,4±0,6	<b>25,6±1,3</b>	23,3±1,2
Pg-c2	71,5±3,6	57,8±2,9	52,7±2,6	<b>95,2±4,8</b>	80,3±4,0	31,8±1,6	26,8±1,3	23,5±1,2	<b>38,9±2,0</b>	36,0±1,8
Es-r1	72,0±3,6	70,4±3,5	48,9±2,4	<b>90,6±4,5</b>	81,7±4,1	16,7±0,8	14,6±0,7	10,9±0,5	<b>22,2±1,1</b>	19,0±1,0
Es-a1	76,8±3,8	55,3±2,8	44,5±2,2	<b>91,7±4,6</b>	83,6±4,2	30,5±1,5	26,7±1,4	22,8±1,1	<b>39,4±2,0</b>	36,7±2,2
Es-r2	77,0±3,9	60,6±3,0	49,0±2,5	<b>94,4±4,7</b>	84,9±4,2	22,4±1,1	18,0±0,9	15,6±0,8	<b>28,7±1,4</b>	26,7±1,3

Окончание таблицы 6.2.1

Образец экстракта	Степень очистки экстракта, %, в зависимости от используемой стационарной фазы					Содержание действующих БАВ в экстракте, %, в зависимости от используемой стационарной фазы				
	1	2	3	4	5*	1	2	3	4	5
Es-a2	74,3±3,7	53,6±2,7	53,4±2,7	<b>95,3±4,8</b>	85,1±4,2	28,9±1,4	25,7±1,3	21,6±1,1	<b>35,6±1,8</b>	33,5±1,7
Dm-t1	73,5±3,7	61,8±3,1	55,2±2,8	<b>95,0±4,8</b>	80,7±4,0	19,7±1,0	16,0±0,8	13,5±0,7	<b>26,2±1,3</b>	22,6±1,1
Dm-c1	73,8±3,7	63,3±3,2	44,9±2,2	<b>96,0±4,8</b>	78,5±3,9	29,8±1,5	25,4±1,3	21,7±1,1	<b>37,8±1,9</b>	34,7±1,8
Dm-t2	75,2±3,8	55,0±2,8	43,7±2,2	<b>94,7±4,8</b>	84,6±4,2	21,3±1,1	17,8±0,9	14,5±0,7	<b>28,4±1,4</b>	25,0±1,3
Dm-c2	76,1±3,8	68,8±3,4	48,5±2,4	<b>93,8±4,7</b>	83,7±4,2	35,6±1,8	31,4±1,6	26,6±1,3	<b>41,5±2,1</b>	38,5±1,9
Dc-h1	72,8±3,7	65,7±3,3	47,6±2,4	<b>92,7±4,6</b>	86,2±4,3	14,7±0,8	10,9±0,5	7,5±0,4	<b>19,0±1,0</b>	16,8±0,8
Dc-a1	74,5±3,7	67,0±3,4	43,0±2,2	<b>93,7±4,7</b>	85,0±4,3	25,6±1,3	21,3±1,1	17,8±0,9	<b>31,4±1,6</b>	28,4±1,4
Dc-h2	74,0±3,7	54,3±2,7	44,9±2,3	<b>94,5±4,7</b>	84,2±4,2	18,5±1,0	16,9±0,8	13,7±0,7	<b>24,7±1,2</b>	21,0±1,1
Dc-a2	72,2±3,6	53,7±2,7	51,0±2,6	<b>96,0±4,8</b>	83,3±4,2	33,7±1,7	26,4±1,3	23,0±1,2	<b>42,4±2,1</b>	37,8±1,9
Sd-s1	73,4±3,7	51,8±2,6	55,4±2,8	<b>95,4±4,8</b>	82,2±4,1	26,4±1,3	22,2±1,1	18,9±1,0	<b>34,5±1,7</b>	29,5±1,5
Sd-a1	69,8±3,5	64,0±3,2	43,8±2,2	<b>94,6±4,8</b>	84,0±4,2	56,0±2,8	47,8±2,4	41,4±2,1	<b>66,7±3,3</b>	63,2±3,2
Sd-s2	70,7±3,5	59,3±3,0	42,9±2,2	<b>93,3±4,7</b>	86,0±4,3	27,0±1,4	24,3±1,2	18,7±0,9	<b>33,2±1,7</b>	29,4±1,5
Sd-a2	75,2±3,8	66,2±3,3	44,0±2,2	<b>90,8±4,5</b>	79,9±4,0	58,6±2,9	50,5±2,5	43,5±2,2	<b>67,8±3,4</b>	64,8±3,2

\* 1 – силикагель 60, 2 – микрокристаллическая целлюлоза, 3 – сефароза CL-6B, 4 – силикагель C18, 5 – силикагель C8

Концентрация тритерпеновых гликозидов в экстрактах женьшеня обыкновенного, очищенных хроматографией при использовании силикагеля  $C_{18}$ , составляет 21,7–38,9 % (для сравнения в экстрактах, очищенных ультрафильтрацией, концентрация действующих БАВ равна 8,5–21,6 %). Концентрация фенилпропаноидов в экстрактах элеутерококка колючего, очищенных хроматографией при использовании силикагеля  $C_{18}$ , составляет 22,2–39,4 % (для сравнения в экстрактах, очищенных ультрафильтрацией, концентрация действующих БАВ равна 10,5–22,5 %).

Концентрация флавоноидов в экстрактах пальчатокоренника пятнистого, очищенных хроматографией при использовании силикагеля  $C_{18}$ , составляет 26,2–41,5 % (для сравнения в экстрактах, очищенных ультрафильтрацией, концентрация действующих БАВ равна 12,6–20,5 %). Концентрация гликозидов в экстрактах диоскореи обыкновенной, очищенных хроматографией при использовании силикагеля  $C_{18}$ , составляет 19,0–42,4 % (для сравнения в экстрактах, очищенных ультрафильтрацией, концентрация действующих БАВ равна 7,1–22,5 %). Наконец, концентрация хромонов в экстрактах сапожниковии растопыренной, очищенных хроматографией при использовании силикагеля  $C_{18}$ , составляет 33,2–67,8 % (для сравнения в экстрактах, очищенных ультрафильтрацией, концентрация действующих БАВ равна 17,8–39,5 %).

Наименьшую активность в очистке растительных экстрактов показала сефароза CL-6B, степень очистки не превышает 55,7 %.

Далее для выбранной неподвижной фазы подбирали такие параметры, как размер частиц и скорость элюирования. Исследовали модифицированный силикагель  $C_{18}$  с разным размером частиц 2,5; 3,5 и 15 мкм. Скорость элюции составляла 2, 5, 10, 15 мл/мин. Для экстрактов контролировали степень очистки. Полученные результаты для экстрактов каждого растения с максимальным содержанием действующих БАВ (Rc-a2, Pg-c2, Es-a1, Dm-c2, Dc-a2, Sd-a2) приведены на рисунках 6.2.1–6.2.6.

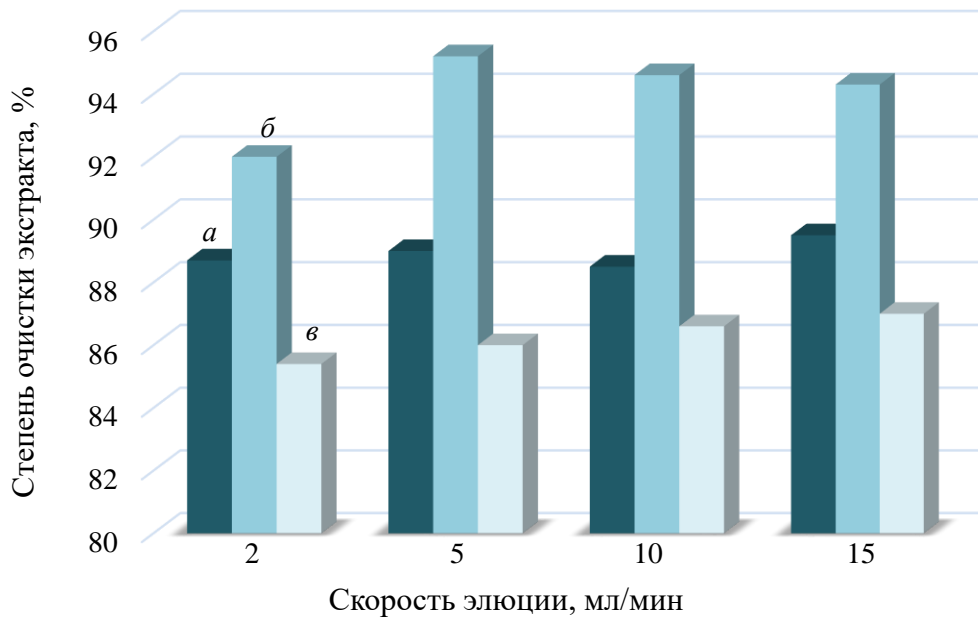


Рисунок 6.2.1 – Зависимость степени очистки экстракта Rс-a2 от скорости элюции и размера частиц модифицированного силикагеля С<sub>18</sub>: а – размер частиц 2,5 мкм, б – 3,5 мкм, в – 15 мкм

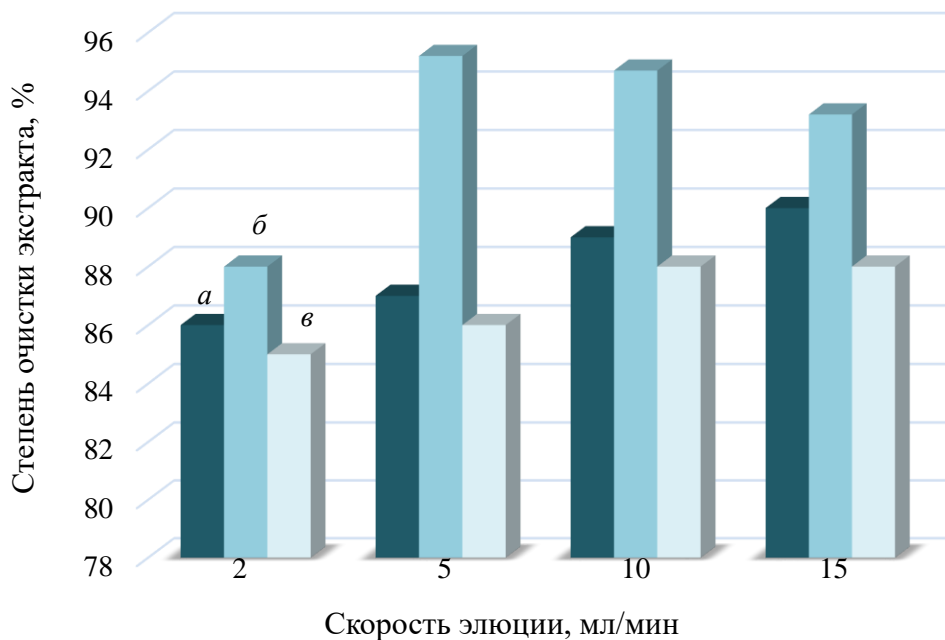


Рисунок 6.2.2 – Зависимость степени очистки экстракта Rg-c2 от скорости элюции и размера частиц модифицированного силикагеля С<sub>18</sub>: а – размер частиц 2,5 мкм, б – 3,5 мкм, в – 15 мкм



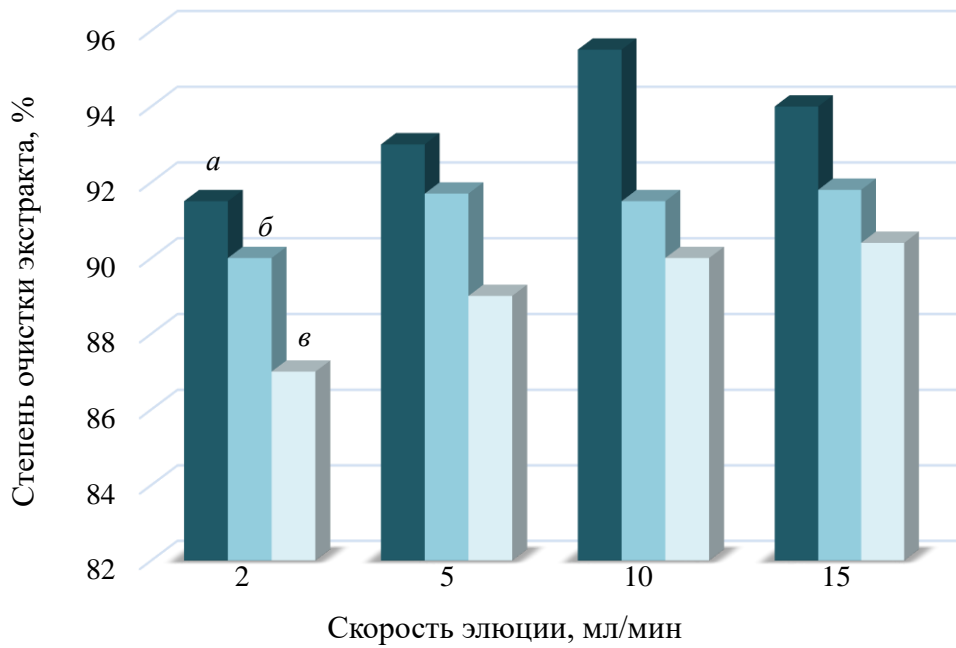


Рисунок 6.2.3 – Зависимость степени очистки экстракта Es-a1 от скорости элюции и размера частиц модифицированного силикагеля  $C_{18}$ :  
 а – размер частиц 2,5 мкм, б – 3,5 мкм, в – 15 мкм

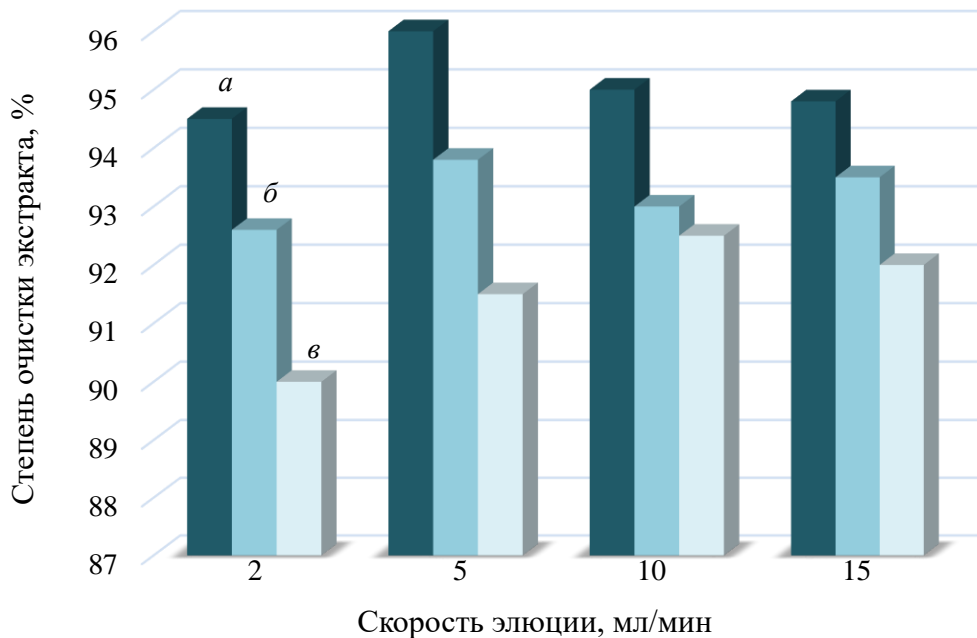


Рисунок 6.2.4 – Зависимость степени очистки экстракта Dm-c2 от скорости элюции и размера частиц модифицированного силикагеля  $C_{18}$ :  
 а – размер частиц 2,5 мкм, б – 3,5 мкм, в – 15 мкм

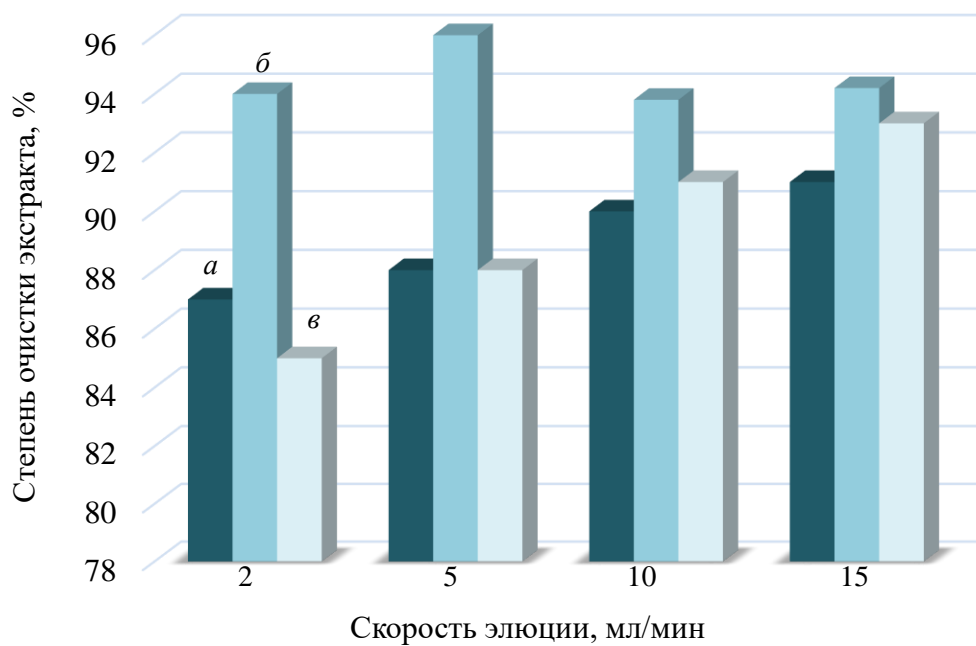


Рисунок 6.2.5 – Зависимость степени очистки экстракта Dc-a2 от скорости элюции и размера частиц модифицированного силикагеля C<sub>18</sub>:  
а – размер частиц 2,5 мкм, б – 3,5 мкм, в – 15 мкм

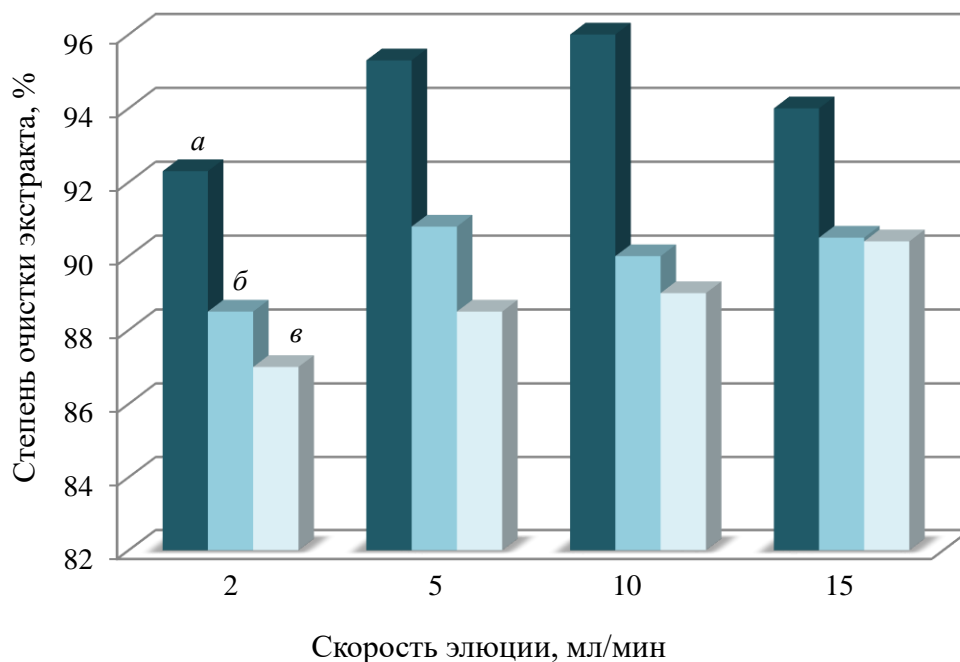


Рисунок 6.2.6 – Зависимость степени очистки экстракта Sd-a2 от скорости элюции и размера частиц модифицированного силикагеля C<sub>18</sub>:  
а – размер частиц 2,5 мкм, б – 3,5 мкм, в – 15 мкм

Согласно рисунку 6.2.1, максимальная степень очистки (95,2 %) экстракта культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной, полученного микроволновым способом, достигается при использовании силикагеля  $S_{18}$  с размером частиц 3,5 мкм и скорости элюции 5 мл/мин. Что касается экстракта каллусной культуры женьшеня обыкновенного, полученного под действием микроволнового излучения, наибольшая степень очистки (95,2 %) достигается при скорости элюирования 5 мл/мин и диаметре частиц силикагеля  $S_{18}$  3,5 мкм (рисунок 6.2.2). Рациональными параметрами хроматографической очистки экстракта корневой культуры элеутерококка колючего, полученного в результате перколяции, на модифицированном силикагеле  $S_{18}$  являются размер частиц неподвижной фазы 2,5 мкм и скорость потока 10 мл/мин. В данном случае степень очистки экстракта максимальная и составляет 95,5 % (рисунок 6.2.3).

Из рисунка 6.2.4 следует, что наиболее эффективная очистка экстракта каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого (степень очистки 96,0 %), полученного микроволновой экстракцией, достигается при размере частиц стационарной фазы 2,5 мкм и скорости элюции 5 мл/мин. Хроматографическую очистку экстракта корневой культуры диоскореи обыкновенной, полученного микроволновым способом, целесообразно вести при скорости потока 5 мл/мин и диаметре частиц силикагеля  $S_{18}$  3,5 мкм. Данные условия позволяют достичь степени очистки экстракта 96,0 % (рисунок 6.2.5). В соответствии с рисунком 6.2.6, рациональными параметрами хроматографической очистки экстракта корневой культуры сапожниковии растопыренной, полученного микроволновым способом, на модифицированном силикагеле  $S_{18}$  являются размер частиц неподвижной фазы 2,5 мкм и скорость элюирования 10 мл/мин.

Таким образом, общие параметры хроматографической очистки экстрактов, полученных из надземных / подземных частей растений и биомассы их клеточных культур, следующие: колонка, заполненная модифицированным силикагелем  $S_{18}$ ; диаметр колонки 100 мм, длина

колонки 150 мм; подвижная фаза – ацетонитрил / вода с градиентом ацетонитрила от 1 % до 80 % за 60 мин; детектор – диодная матрица, длина волны детектирования 250 нм; сбор фракций – со 2 по 30 минуты. Для экстрактов установлены индивидуальные параметры хроматографирования, обеспечивающие их максимальную очистку:

- для экстрактов левзеи сафлоровидной – размер частиц стационарной фазы 3,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин;
- для экстрактов женьшеня обыкновенного – размер частиц стационарной фазы 3,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин;
- для экстрактов элеутерококка колючего – размер частиц стационарной фазы 2,5 мкм, скорость элюции 10 мл/мин;
- для экстрактов пальчатокоренника пятнистого – размер частиц стационарной фазы 2,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин;
- для экстрактов диоскореи обыкновенной – размер частиц стационарной фазы 3,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин;
- для экстрактов сапожниковии растопыренной – размер частиц стационарной фазы 2,5 мкм, скорость элюции 10 мл/мин.

### **6.3 Заключение по шестой главе**

Подобраны рациональные параметры ультрафильтрационной очистки растительных экстрактов, полученных из природного растительного сырья и клеточных культур:

– для экстрактов левзеи сафлоровидной и элеутерококка колючего – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 10 кДа, 3 цикла очистки;

– для экстрактов женьшеня обыкновенного – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа, 4 цикла очистки;

- для экстрактов пальчатокоренника пятнистого – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 5 кДа, 3 цикла очистки;
- для экстрактов диоскореи обыкновенной – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа, 2 цикла очистки;
- для экстрактов сапожниковии растопыренной – давление 0,5 МПа, диаметр пор мембран 15 кДа, 3 цикла очистки.

Выбранные параметры позволяют увеличить содержание действующих БАВ в экстрактах: концентрация экистероидов составляет 25,5–45,7 % в экстрактах левзеи сафлоровидной; концентрация тритерпеновых гликозидов 8,5–21,6 % в экстрактах женьшеня обыкновенного; концентрация фенилпропаноидов 10,4–22,4 % в экстрактах элеутерококка колючего; концентрация флавоноидов 12,5–20,3 % в экстрактах пальчатокоренника пятнистого; концентрация гликозидов 7,0–22,4 % в экстрактах диоскореи обыкновенной; концентрация хромонов 17,7–39,4 % в экстрактах сапожниковии растопыренной.

Предложены параметры хроматографической очистки растительных экстрактов: колонка, заполненная модифицированным силикагелем  $C_{18}$ ; диаметр колонки 100 мм, длина колонки 150 мм; подвижная фаза – ацетонитрил / вода с градиентом ацетонитрила от 1 % до 80 % за 60 мин; детектор – диодная матрица, длина волны детектирования 250 нм; сбор фракций – со 2 по 30 минуты. Размер частиц стационарной фазы и скорость элюирования для каждого экстракта подобраны индивидуально: для экстрактов левзеи сафлоровидной – размер частиц стационарной фазы 3,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин; для экстрактов женьшеня обыкновенного – размер частиц стационарной фазы 3,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин; для экстрактов элеутерококка колючего – размер частиц стационарной фазы 2,5 мкм, скорость элюции 10 мл/мин; для экстрактов пальчатокоренника пятнистого – размер частиц стационарной фазы 2,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин; для экстрактов диоскореи обыкновенной – размер частиц стационарной фазы 3,5 мкм, скорость элюции 5 мл/мин; для экстрактов

сапожниковии растопыренной – размер частиц стационарной фазы 2,5 мкм, скорость элюции 10 мл/мин.

Установлено, что хроматографический метод очистки является более эффективным по сравнению с ультрафильтрационным.

## ГЛАВА 7. ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И СУШКИ ОЧИЩЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

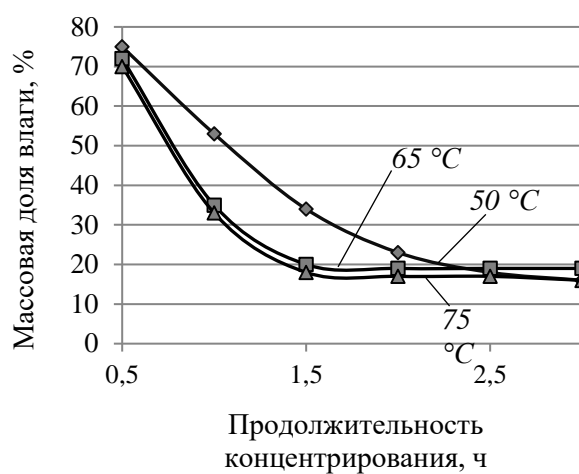
Глава посвящена подбору рациональных параметров получения густых экстрактов из природного растительного сырья и клеточных культур левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной. Также глава содержит результаты подбора рациональных параметров сушки экстрактов распылительным и лиофильным способами, оценки компонентного состава и показателей качества высушенных экстрактов.

### 7.1 Подбор рациональных параметров концентрирования растительных экстрактов

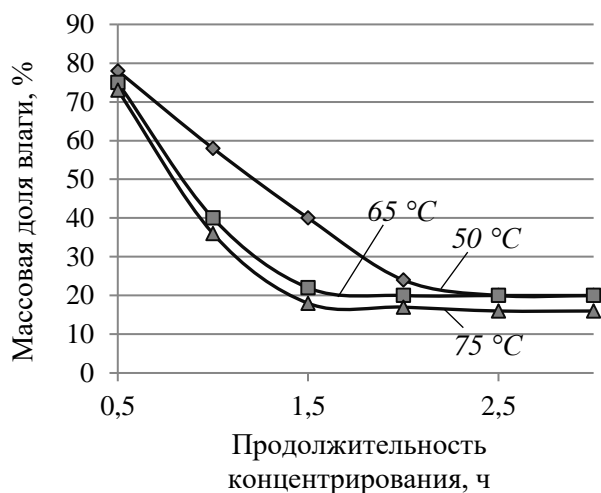
Густые экстракты – это концентрированные извлечения из растительного сырья, представляющие собой вязкие массы с содержанием влаги не более 25 % (в соответствии с ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты»). Густые экстракты вследствие высокой вязкости могут быть использованы как связывающие и формообразующие вещества при изготовлении функциональных продуктов питания и напитков.

Для получения густых экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур *R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis* и *S. divaricata* жидкие спиртовые очищенные экстракты, полученные на предыдущем этапе исследования, выпаривали в вакуум-выпарной установке (роторный испаритель) при глубине вакуума 75 кПа до остаточной влажности не более 25 %. Варьировали температуру

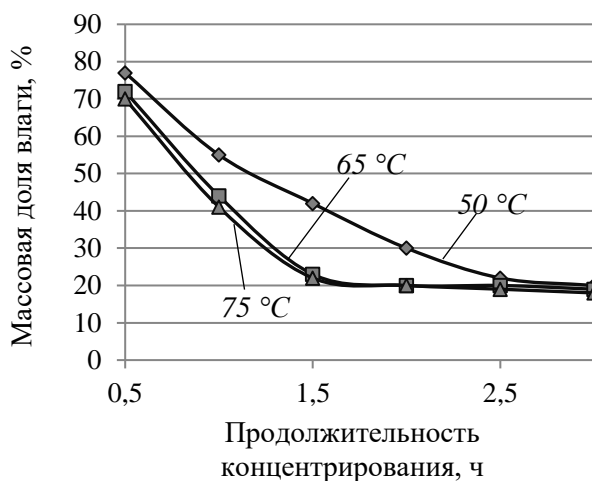
выпаривания (50 °С, 65 °С, 75 °С) и устанавливали рациональную продолжительность процесса (рисунок 7.1.1).



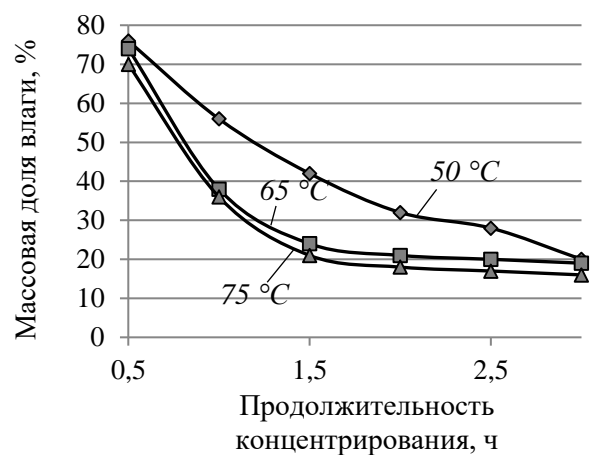
Rc-r1



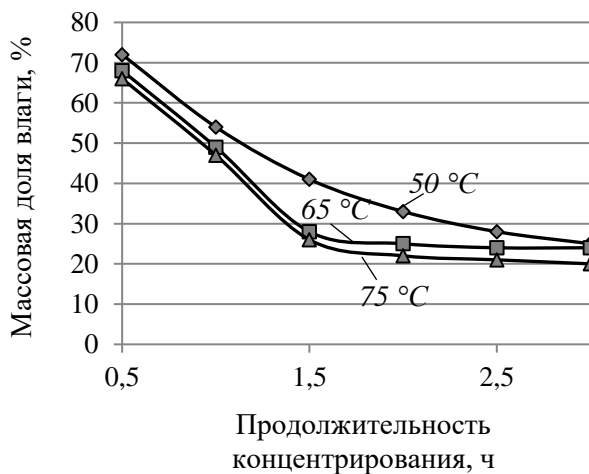
Rc-a1



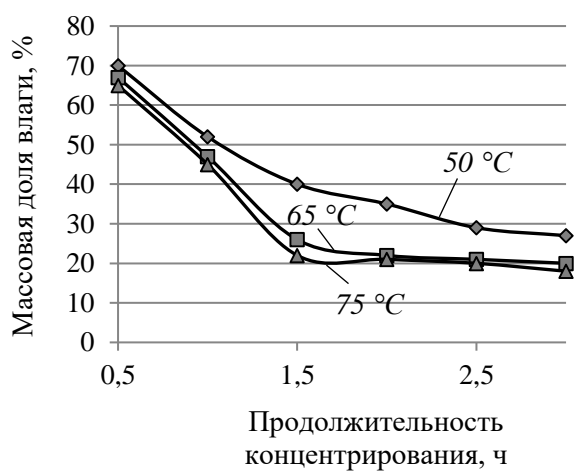
Rc-r2



Rc-a2

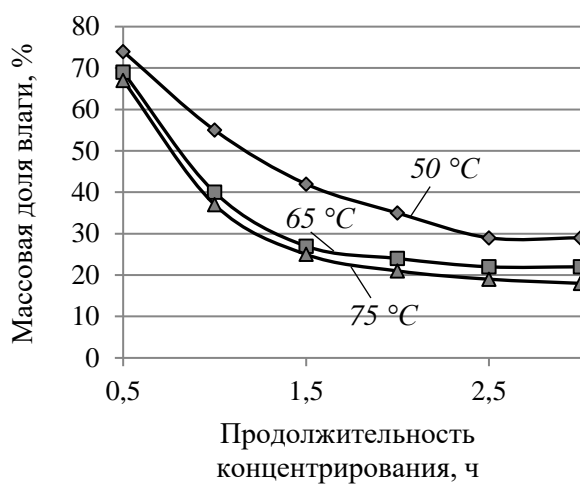


Pg-r1

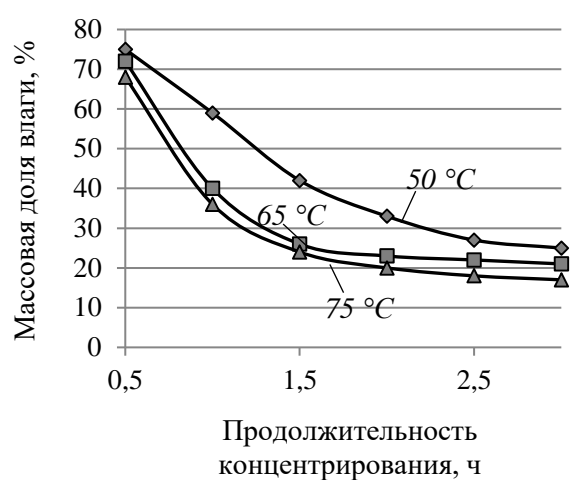


Pg-c1

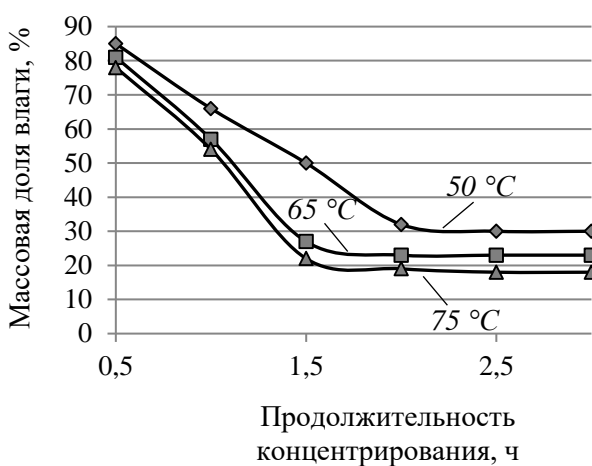




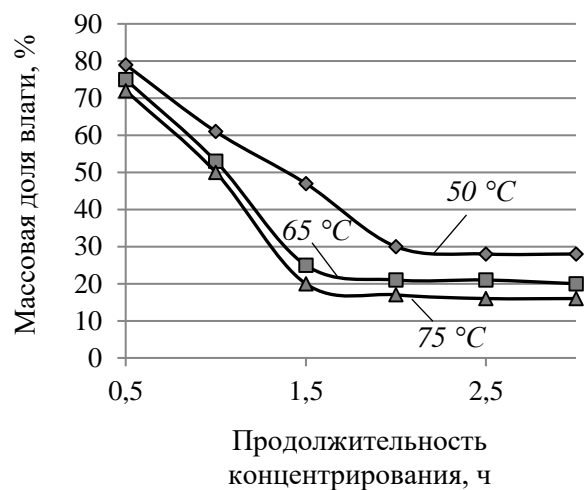
Pg-r2



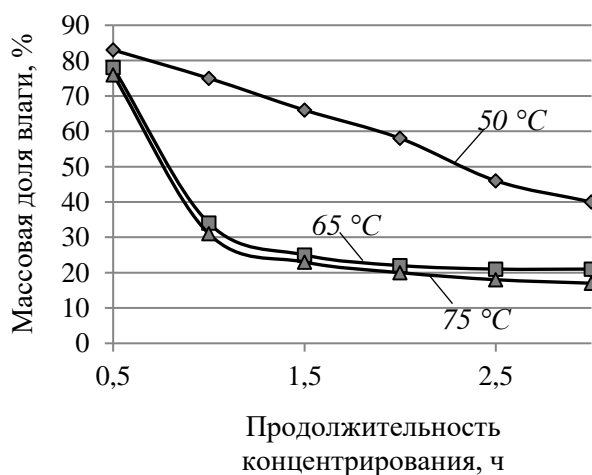
Pg-c2



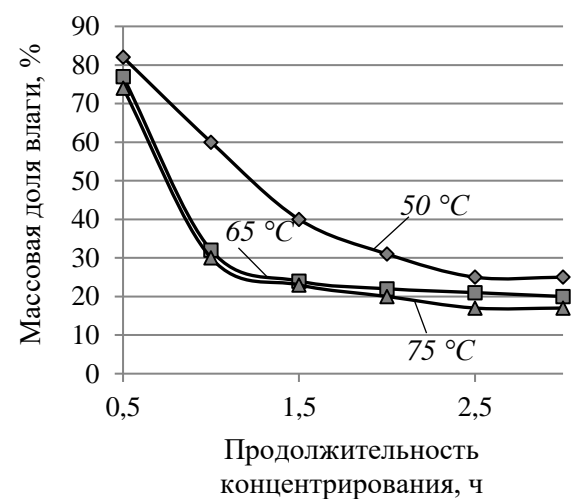
Es-r1



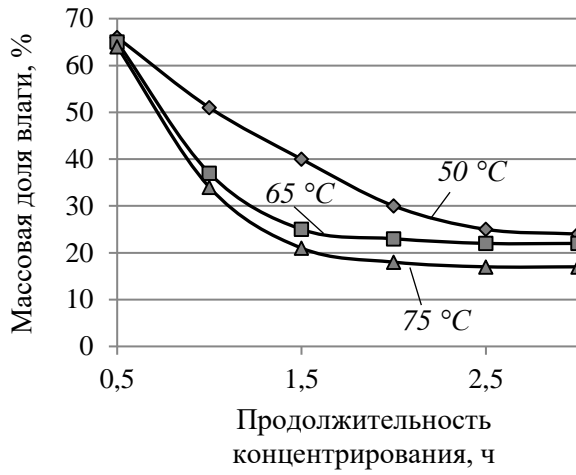
Es-a1



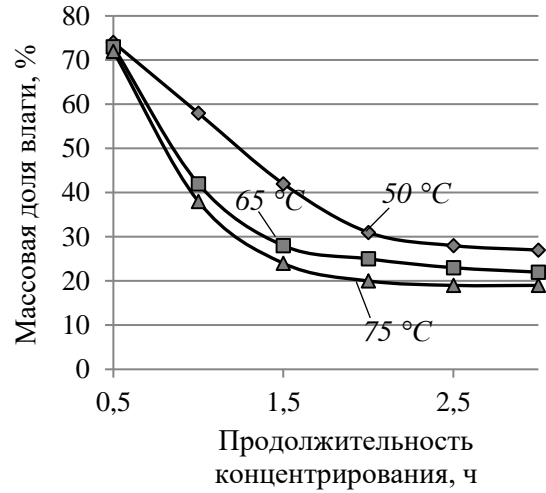
Es-r2



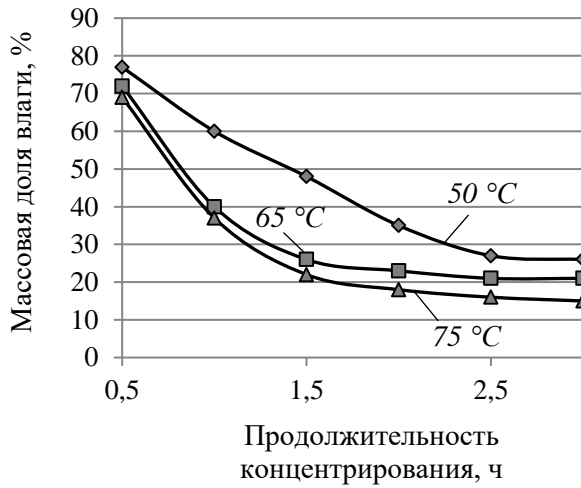
Es-a2



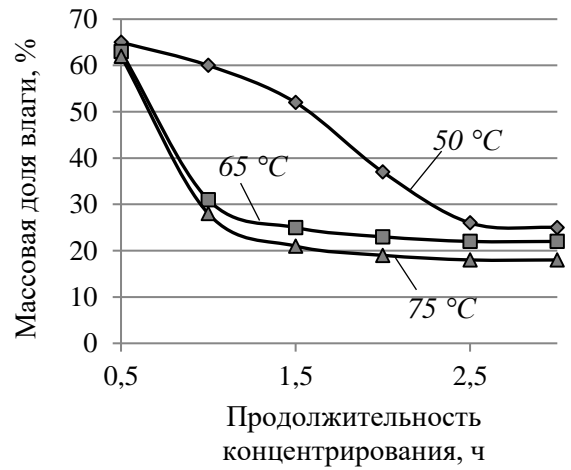
Dm-t1



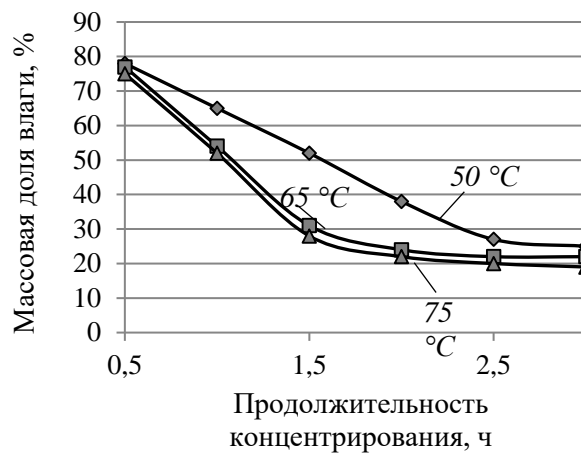
Dm-c1



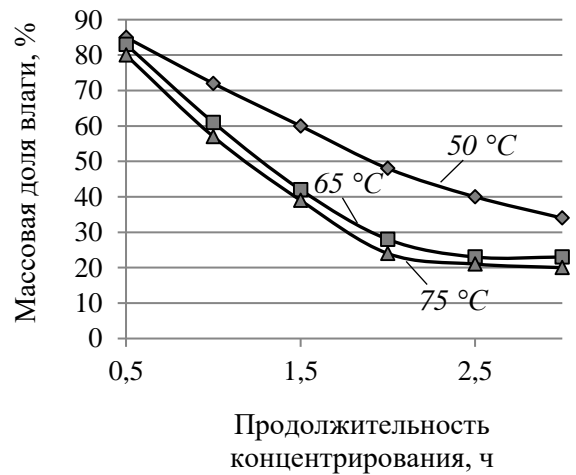
Dm-t2



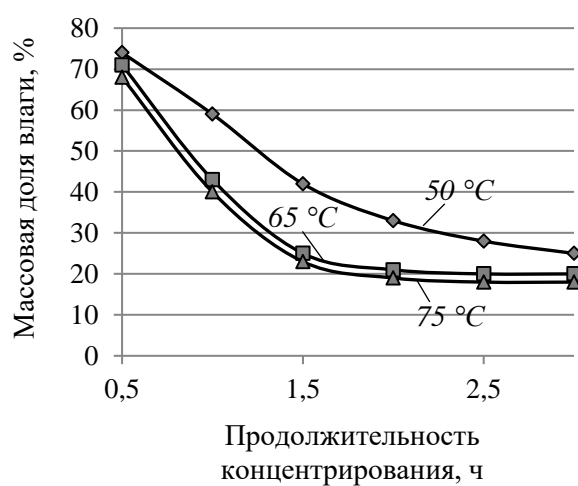
Dm-c2



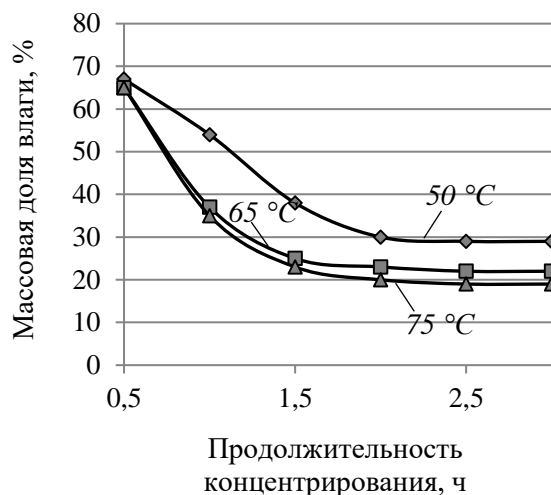
Dc-h1



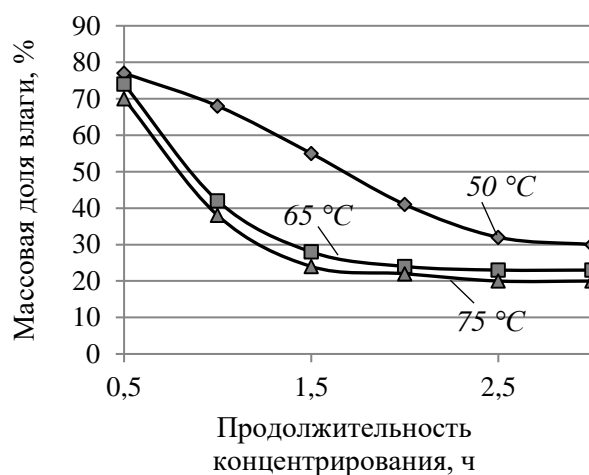
Dc-a1



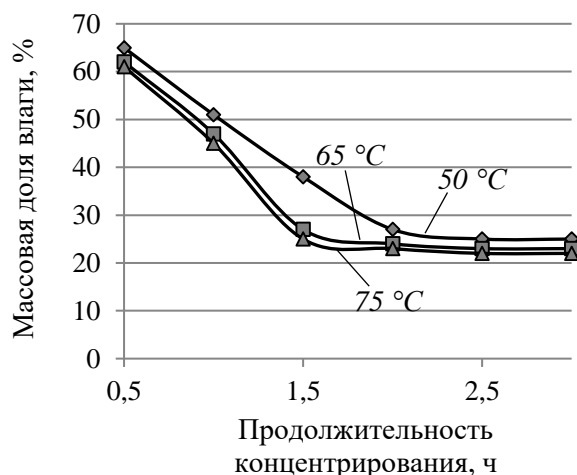
Dc-h2



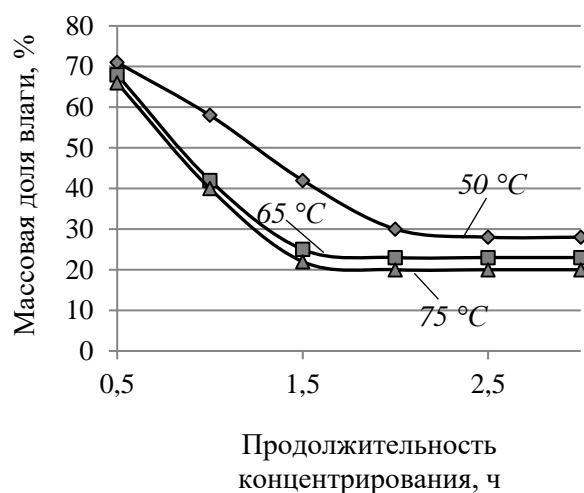
Dc-a2



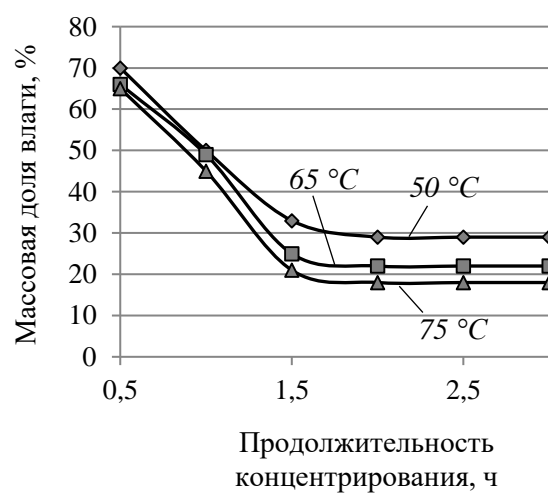
Sd-s1



Sd-a1



Sd-s2



Sd-a2

Рисунок 7.1.1 – Зависимость содержания остаточной влаги в растительных экстрактах от продолжительности выпаривания растворителя при разных температурах

Основываясь на полученных результатах, представленных на рисунке 7.1.1, установили рациональные значения температуры и продолжительности выпаривания растворителя из жидких спиртовых экстрактов при глубине вакуума 75 кПа (таблица 7.1.1).

Таблица 7.1.1 – Рациональные параметры концентрирования растительных экстрактов (глубина вакуума 0,75 бар)

Образец экстракта	Температура выпаривания растворителя, °С	Продолжительность выпаривания, ч	Массовая доля влаги в густом экстракте, %
Rc-r1	65,0	1,5	20,0
Rc-a1	65,0	1,5	22,0
Rc-r2	65,0–75,0	1,5	22,0–23,0
Rc-a2	65,0	1,5	24,0
Pg-r1	65,0	2,0	25,0
Pg-c1	65,0	1,5	25,0
Pg-r2	65,0	2,0	24,0
Pg-c2	65,0	2,0	23,0
Es-r1	65,0	2,0	23,0
Es-a1	65,0	1,5	25,0
Es-r2	65,0	1,5	25,0
Es-a2	65,0–75,0	1,5	23,0–24,0
Dm-t1	65,0	1,5	25,0
Dm-c1	65,0	2,0	25,0
Dm-t2	65,0	2,0	23,0
Dm-c2	65,0	1,5	25,0
Dc-h1	65,0	2,0	24,0
Dc-a1	75,0	2,0	24,0
Dc-h2	65,0	1,5	25,0
Dc-a2	65,0	1,5	25,0
Sd-s1	65,0	2,0	24,0
Sd-a1	65,0	2,0	24,0
Sd-s2	65,0	1,5	25,0
Sd-a2	65,0	1,5	25,0

Для полученных густых экстрактов изучили количественный состав БАВ (таблицы 7.1.2–7.1.7).

Таблица 7.1.2 – Концентрация биологически активных веществ в густых экстрактах левзеи сафлоровидной

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/мл			
	Rc-r1	Rc-a1	Rc-r2	Rc-a2
β-ситостерин	15,44±0,74	34,34±1,72	20,51±1,03	39,90±1,88
Стигмастерин	21,42±1,08	38,82±1,78	24,89±1,17	45,08±2,12
20-гидроксиэкдизон	36,29±1,78	102,34±5,12	43,74±2,19	102,20±5,01
Изофраксидин	21,09±0,99	45,25±2,26	25,13±1,21	45,22±2,26
β-амирин	11,03±0,55	16,43±0,82	12,55±0,63	18,06±0,90
α-амирин	10,73±0,52	17,82±0,84	11,27±0,54	24,64±1,18
Рутин	49,61±2,48	85,83±4,29	59,17±2,78	103,75±5,08
Мангиферин	13,79±0,68	22,64±1,13	17,41±0,85	35,32±1,77
Кверцетин	56,45±2,82	97,97±4,70	63,24±3,10	109,41±5,47
Апигенин	97,11±4,66	164,92±7,92	91,28±4,56	180,71±9,04
Хлорогеновая кислота	46,01±2,30	86,65±4,33	45,89±2,29	93,95±4,70
Кофейная кислота	61,98±2,91	118,96±5,83	73,82±3,47	159,04±7,63
Феруловая кислота	8,28±0,41	12,08±0,60	9,42±0,46	13,28±0,64
Эллаговая кислота	2,47±0,12	7,38±0,37	2,73±0,14	10,71±0,52
Салициловая кислота	6,73±0,34	9,34±0,45	7,74±0,39	13,83±0,69

Таблица 7.1.3 – Концентрация биологически активных веществ в густых экстрактах женьшеня обыкновенного

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/мл			
	Pg-r1	Pg-c1	Pg-r2	Pg-c2
Гинзенозид LC <sub>1</sub>	14,83±0,73	25,25±1,21	14,69±0,73	32,76±1,61
Панаксен	0,81±0,04	2,52±0,13	1,68±0,08	2,94±0,15
Гинзенозид RB <sub>1</sub>	20,29±0,99	47,08±2,35	22,56±1,13	54,94±2,75
Панаксозид	37,37±1,87	82,69±4,13	49,48±2,47	87,58±4,29
Гомизин А	1,48±0,07	3,37±0,16	2,62±0,13	5,57±0,28

## Окончание таблицы 7.1.3

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/мл			
	Pg-r1	Pg-c1	Pg-r2	Pg-c2
Гомизин В	3,04±0,15	7,56±0,38	3,92±0,20	7,85±0,38
Экдизон	2,31±0,12	7,62±0,37	5,40±0,27	9,89±0,49
Рутин	3,63±0,17	11,59±0,58	6,37±0,31	13,16±0,66
Кверцетин	5,48±0,26	12,55±0,60	8,32±0,42	16,42±0,82
Мангиферин	1,63±0,08	3,61±0,18	3,33±0,16	6,62±0,32
Кемпферол	1,07±0,05	4,18±0,20	2,28±0,11	5,58±0,28
Сиреневая кислота	13,19±0,63	27,39±1,34	17,23±0,86	37,88±1,82
Кофейная кислота	1,76±0,09	6,36±0,32	3,66±0,18	7,36±0,37
Синапиновая кислота	1,12±0,06	3,82±0,19	2,52±0,13	5,08±0,25
Салициловая кислота	1,52±0,07	6,26±0,30	3,78±0,19	6,62±0,32
Ванилиновая кислота	0,76±0,04	2,66±0,13	1,64±0,08	4,29±0,21
<i>n</i> -кумаровая кислота	0,63±0,03	4,03±0,19	1,72±0,09	4,73±0,24
Феруловая кислота	1,06±0,05	5,04±0,24	4,52±0,23	9,50±0,48

Таблица 7.1.4 – Концентрация биологически активных веществ в густых экстрактах элеутерококка колючего

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Es-r1	Es-a1	Es-r2	Es-a2
Сумма элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В (сирингин)	25,34±1,22	39,37±1,97	29,63±1,45	49,18±2,46
2-ацетил-3-гидроксифуран-О-α-D-глюкопиранозид	11,72±0,59	18,37±0,90	15,30±0,77	18,66±0,93
1,6-Бис(3,4,5-тригидроксифенил)-1,6-гександион	10,05±0,51	19,15±0,96	12,78±0,61	15,61±0,76
7,9':7'9-диэпокси-8,8'-лигнан-3,3',4,4',5,5'-гексанол	9,89±0,47	20,16±1,10	13,27±0,66	22,75±1,09
Эритро-гваяцилглицерол-β-кониферилловый альдегидный эфир	14,94±0,75	25,21±1,21	18,90±0,91	25,94±1,22
1,3-пропандиол-2-О-4'-синапиловый эфир	12,18±0,61	20,71±1,04	16,15±0,81	21,55±1,08

## Окончание таблицы 7.1.4

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/мл			
	Es-r1	Es-a1	Es-r2	Es-a2
Изофраксидин	5,87±0,29	11,72±0,56	8,09±0,40	12,71±0,61
Сесамин	4,82±0,23	8,72±0,42	6,09±0,31	8,94±0,45
Рутин	13,95±0,71	22,24±1,11	16,52±0,83	23,17±1,11
Гиперозид	13,93±0,68	28,07±1,38	19,00±0,95	29,82±1,49
Кверцитрин	3,89±0,19	6,63±0,33	4,86±0,24	8,02±0,40
Кофейная кислота	20,51±0,98	39,66±1,90	24,58±1,20	44,02±2,11
<i>n</i> -кумаровая кислота	9,57±0,48	19,69±0,94	15,01±0,75	23,77±1,19
Феруловая кислота	10,71±0,52	17,41±0,87	15,40±0,74	20,38±1,02
Олеаноловая кислота	9,80±0,47	18,66±0,91	11,58±0,58	19,95±0,96
Урсоловая кислота	9,32±0,45	15,61±0,78	12,36±0,61	18,76±0,94

Таблица 7.1.5 – Концентрация биологически активных веществ в густых экстрактах пальчатокоренника пятнистого

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/мл			
	Dm-t1	Dm-c1	Dm-t2	Dm-c2
Кверцетин	34,48±1,69	63,82±3,06	40,78±2,04	75,14±3,76
Кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозид	26,64±1,32	46,27±2,31	29,51±1,42	48,38±2,42
Рутин	41,96±2,06	77,35±3,87	44,72±2,24	81,80±4,09
Апигенин	20,64±1,03	40,95±2,05	23,66±1,16	42,37±2,08
Колеофолит	14,63±0,69	26,81±1,31	15,88±0,76	28,36±1,42
γ-ситостерол	13,93±0,71	26,43±1,32	14,35±0,72	26,25±1,31
Кофейная кислота	6,92±0,35	12,67±0,63	6,77±0,33	12,29±0,60
Галловая кислота	12,46±0,62	20,81±1,04	14,25±0,68	25,45±1,27
Сиреневая кислота	11,59±0,58	22,24±1,07	13,12±0,66	22,24±1,07
Хлорогеновая кислота	11,95±0,59	21,96±1,10	12,74±0,61	21,24±1,06

Таблица 7.1.6 – Концентрация биологически активных веществ в густых экстрактах диоскореи обыкновенной

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/мл			
	Dc-h1	Dc-a1	Dc-h2	Dc-a2
Апигенин-гликозид	12,08±0,58	25,21±1,23	16,98±0,83	37,55±1,84
Рутин	14,32±0,72	31,89±1,59	20,12±1,10	40,78±2,04
Кверцетин	15,58±0,73	37,33±1,87	22,24±1,09	45,92±2,20
Спиростенол А	17,92±0,86	39,90±2,02	22,34±1,07	47,81±2,39
Спиростенол Б	10,88±0,53	22,75±1,14	16,31±0,82	31,72±1,59
Диосцин	17,92±0,86	40,75±2,01	26,00±1,29	51,14±2,51
Диосгенин	10,12±0,51	22,19±1,11	13,67±0,67	27,79±1,33
Лузиантридин	4,96±0,25	12,02±0,56	7,42±0,37	14,81±0,74
Орхинол	6,55±0,33	14,72±0,72	8,47±0,41	19,46±0,93
Кофейная кислота	4,55±0,23	8,80±0,43	6,41±0,32	12,78±0,64
Розмариновая кислота	2,98±0,15	8,02±0,39	4,14±0,20	7,72±0,38
Хлорогеновая кислота	3,38±0,17	7,78±0,38	4,62±0,23	10,11±0,51
Сиреневая кислота	5,18±0,25	11,23±0,55	6,66±0,33	14,07±0,69

Таблица 7.1.7 – Концентрация биологически активных веществ в густых экстрактах сапожниковии растопыренной

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/мл			
	Sd-s1	Sd-a1	Sd-s2	Sd-a2
Цимифугин	23,50±1,15	59,39±2,91	31,28±1,56	81,41±3,99
Гамаудол	32,27±1,55	85,16±4,26	39,20±1,96	106,95±5,35
Перв- <i>O</i> -глюкозилцимифугин	41,58±2,08	102,69±5,13	54,67±2,73	144,64±7,23
4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -глюкозил-5- <i>O</i> -метилвисамминол	38,02±1,82	94,22±4,62	43,72±2,14	132,23±6,61
Вогонин	5,51±0,28	14,81±0,74	7,81±0,39	17,04±0,85
Фраксидин	13,79±0,66	34,31±1,65	16,45±0,79	43,18±2,12
Изофраксидин	12,10±0,58	35,14±1,76	16,91±0,81	41,96±2,10
Скополетин	11,59±0,58	28,18±1,41	15,26±0,	36,56±1,83
Бергаптен	19,15±0,94	43,68±2,18	23,53±0,76	59,89±2,99



## Окончание таблицы 7.1.7

Мармезин	5,12±0,26	13,65±0,68	6,50±0,33	15,94±0,77
Умбеллиферон	14,18±0,71	36,55±1,82	17,50±0,84	44,75±2,15
Астрагалин	11,24±0,55	27,09±1,30	14,56±0,73	37,08±4,00
Монохаетин	6,11±0,31	16,03±0,80	9,94±0,50	18,37±0,92
Кверцетин-3,7-дигликозид	11,39±0,57	33,52±1,64	15,48±0,77	39,20±1,96

Результаты, представленные в таблицах 7.1.2–7.1.7, свидетельствуют о том, что выпаривание растворителя позволяет сконцентрировать действующие БАВ в экстрактах. Так, в густых экстрактах левзеи сафлоровидной концентрация действующих биологически активных веществ (экдистероидов) превышает данное значение для жидких очищенных экстрактов в 3,00–4,67 раз. Для густых экстрактов женьшеня обыкновенного – 3,70–5,68 раз (тритепеновые гликозиды), для густых экстрактов элеутерококка колючего – 4,15–4,93 раз (фенилпропаноиды), для густых экстрактов пальчатокоренника пятнистого – 5,28–6,75 раз (флавоноиды), для густых экстрактов диоскореи обыкновенной – 2,99–4,00 раз (гликозиды), для густых экстрактов сапожниковии растопыренной – 3,92–6,86 раз (хромоны).

Тем не менее густые растительные экстракты характеризуются рядом недостатков. В частности, невысокие сроки хранения и неудобство транспортирования. В этой связи дальнейшие исследования направлены на подбор рациональных параметров сушки рассматриваемых экстрактов.

## **7.2 Подбор рациональных параметров высушивания растительных экстрактов методом распыления**

Согласно ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты», сухие экстракты представляют собой порошкообразные массы, обладающие свойством сыпучести, с содержанием влаги не более 5 %. В качестве одного из методов

высушивания экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур выбрали распылительную сушку.

Метод распылительной сушки зарекомендовал себя как экономичный, воспроизводимый, масштабируемый процесс для производства порошкообразной продукции и успешно применяется в пищевой, фармацевтической, химической промышленности. Распылительная сушка широко используется при получении продуктов с заданными структурными, дисперсными характеристиками. При распылении жидких экстрактов образуется большое количество полидисперсных капель, имеющих большую поверхность, вследствие чего происходит интенсивный тепло- и массообмен с сушильным агентом. При быстрой потере влаги капель образуются сферические пористые гранулы. В результате получают порошкообразный продукт, не требующий дополнительного измельчения, обладающий хорошей сыпучестью и прессуемостью, а также легкой растворимостью. Благодаря минимальной продолжительности распылительной сушки (15–30 с) не происходит развития окислительных, денатурационных процессов, что позволяет сохранить биохимический состав продукции и является преимуществом этого вида сушки [35, 21].

Режимными параметрами распылительного высушивания экстрактов, которые необходимо подбирать в каждом конкретном случае, являются температура сушки, скорость подачи раствора, скорость потока воздуха, обеспечиваемая аспиратором. Контролируемым параметром при распылительном высушивании являлась массовая доля влаги в растительных экстрактах, которая не должна превышать 5 %. Температуру сушки экстрактов варьировали в диапазоне от 40 °С до 100 °С с шагом 10 °С, дальнейшее повышение температуры нецелесообразно, поскольку высокие температуры могут привести к разрушению термолабильных БАВ. Другие параметры сушки оставались постоянными: скорость подачи раствора 10 мл/мин, скорость потока воздуха 20 м<sup>3</sup>/ч. Кривые зависимости массовой доли влаги в экстрактах от температуры распылительного высушивания приведены на рисунках 7.2.1–7.2.6.

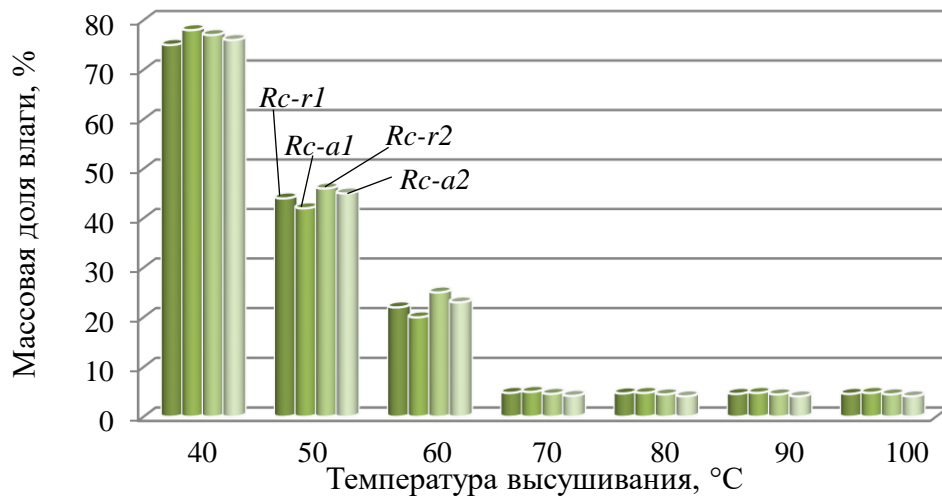


Рисунок 7.2.1 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах *R. carthamoides* левзеи сафлоровидной в зависимости от температуры высушивания

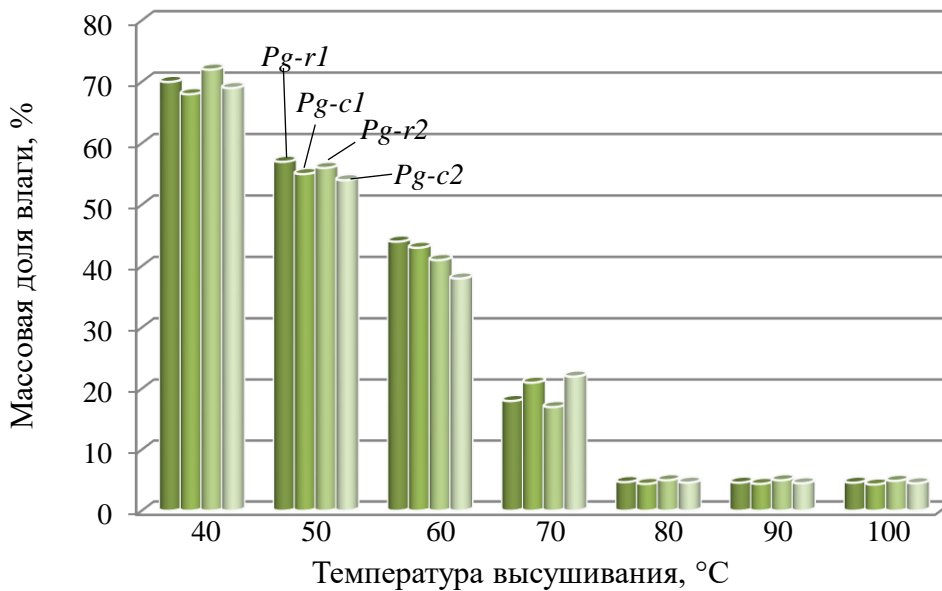


Рисунок 7.2.2 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах *P. ginseng* женьшеня обыкновенного в зависимости от температуры высушивания

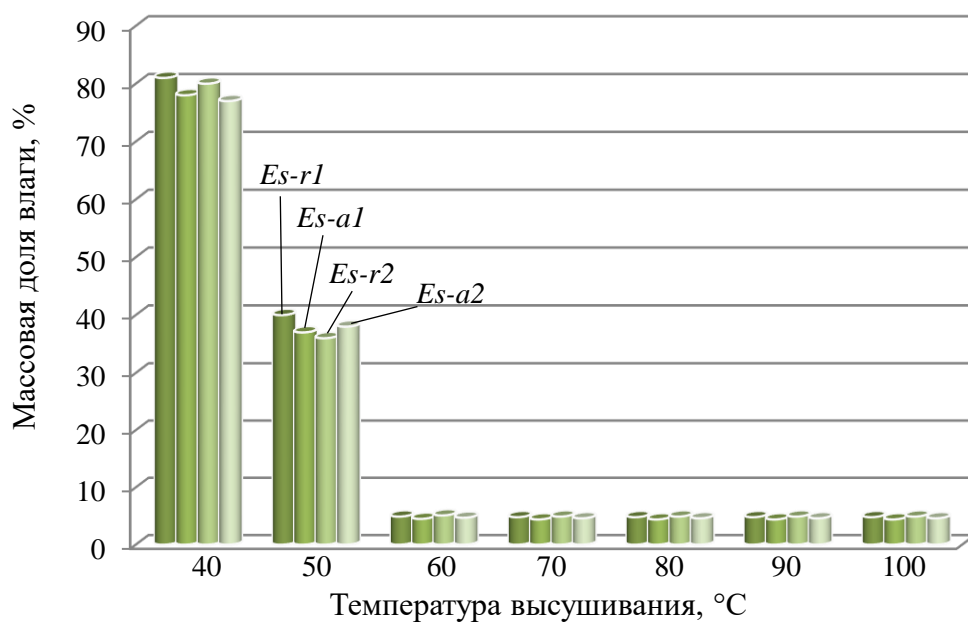


Рисунок 7.2.3 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах *E. senticosus* элеутерококка колючего в зависимости от температуры высушивания

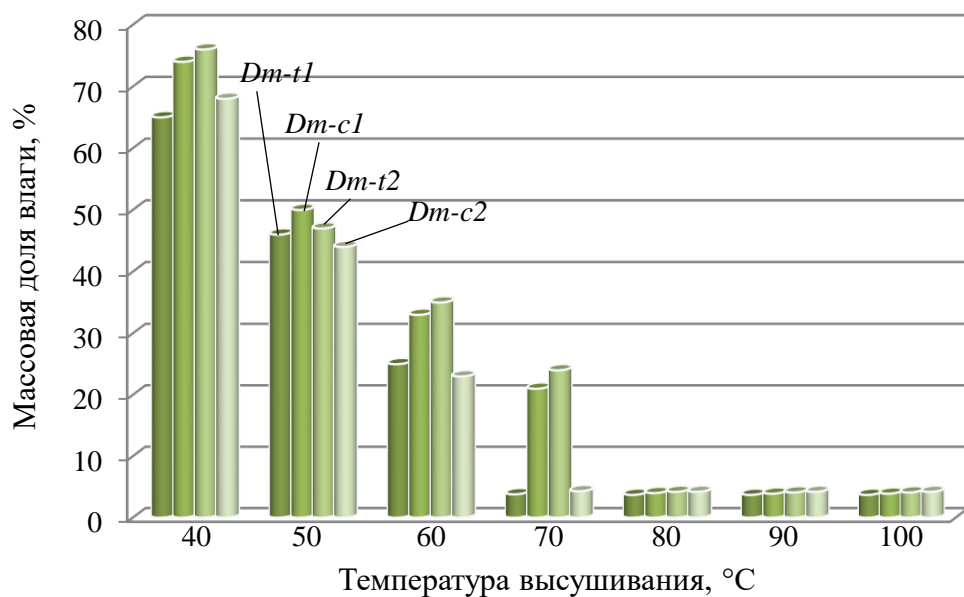


Рисунок 7.2.4 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах *D. maculata* пальчатокоренника пятнистого в зависимости от температуры высушивания

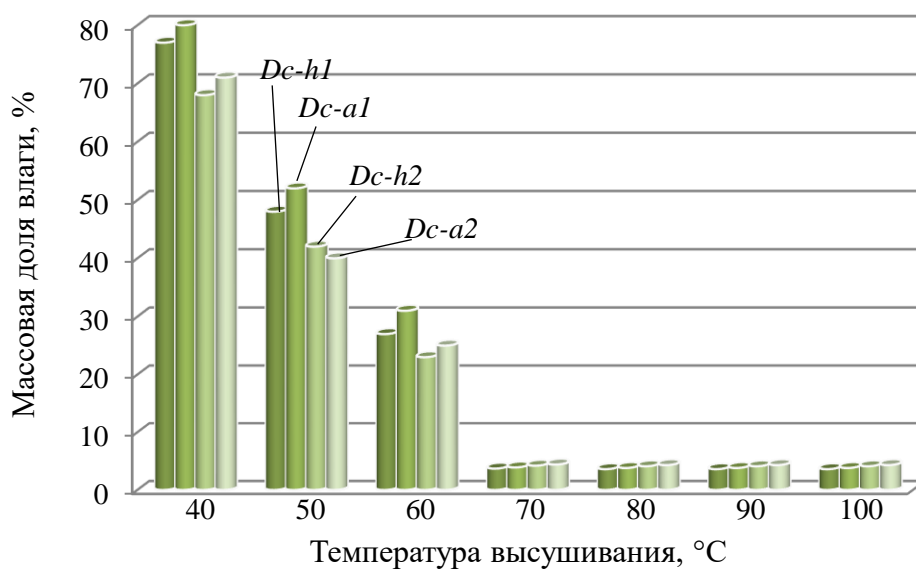


Рисунок 7.2.5 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах *D. communis* диоскореи обыкновенной в зависимости от температуры высушивания

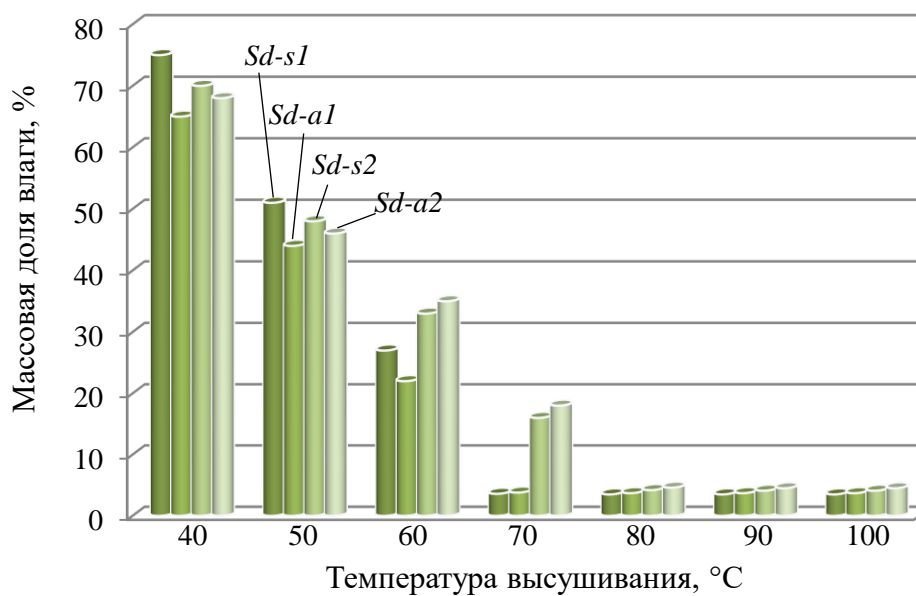
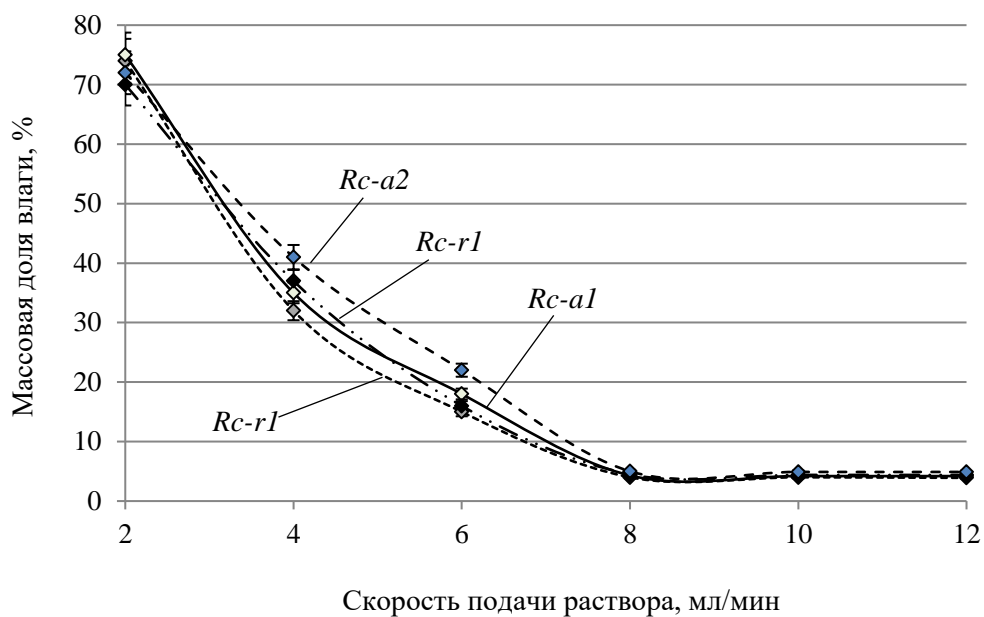


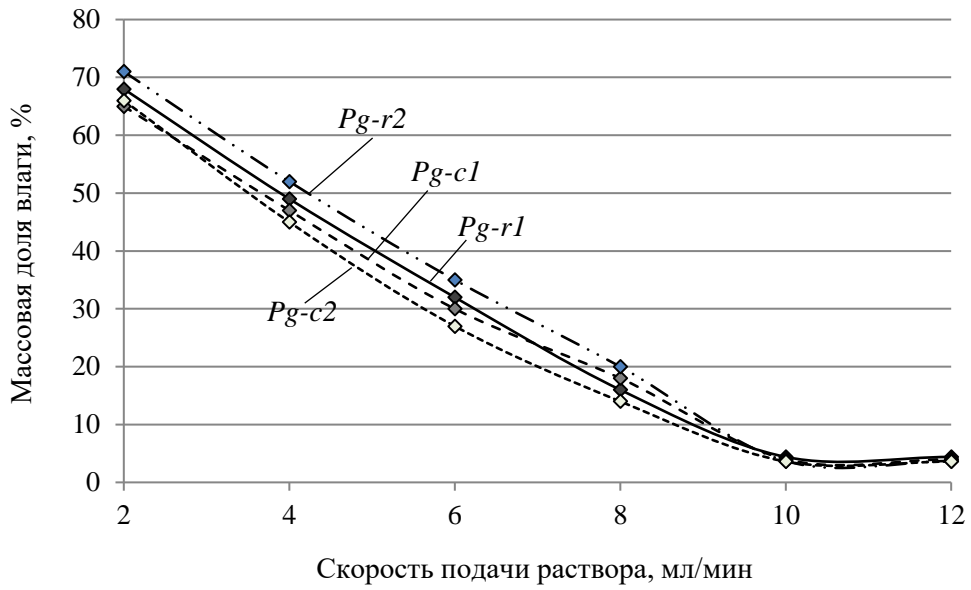
Рисунок 7.2.6 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах *S. Divaricata* сапожниковии растопыренной в зависимости от температуры высушивания

Как следует из рисунков 7.2.1–7.2.6, исследуемые экстракты целесообразно сушить распылением при температуре от 60 до 80 °С в зависимости от экстракта, так как при данных температурах содержание влаги в экстрактах не превышает 5 %.

Далее подбирали рациональное значение скорости подачи раствора в распылительную сушилку. Для этого использовали скорость подачи раствора от 2 мл/мин до 12 мл/мин с шагом 2 мл/мин и измеряли влажность полученных экстрактов (рисунок 7.2.7). Температура сушки при этом составляла 70 °С, скорость потока воздуха 20 м<sup>3</sup>/ч.



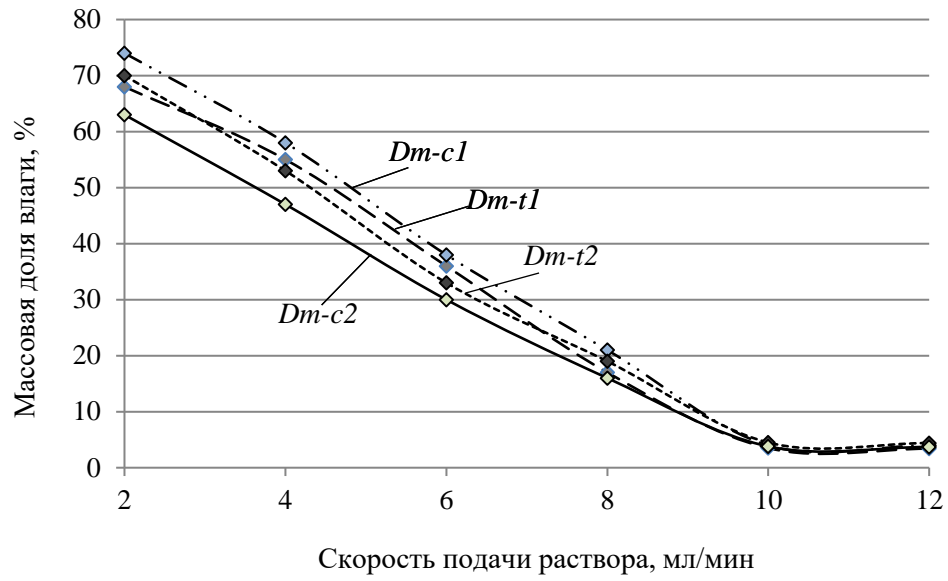
экстракты *R. carthamoides* левзеи сафлоровидной



экстракты *P. ginseng* женьшеня обыкновенного



экстракты *E. senticosus* элеутерококка колючего



экстракты *D. maculata* пальчатокоренника пятнистого



экстракты *D. communis* диоскорей обыкновенной





экстракты *S. divaricata* сапожниковии растопыренной

Рисунок 7.2.7 – Динамика массовой доли влаги в экстрактах в зависимости от скорости подачи раствора в распылительную установку

На основании анализа рисунка 7.2.7 сделали вывод о том, что рекомендуемой скоростью подачи раствора в распылительную сушилку является скорость от 6 до 10 мл/мин в зависимости от вида экстракта.

Подбор скорости потока воздуха проводили, варьируя значение данного параметра от 5 м<sup>3</sup>/ч до 35 м<sup>3</sup>/ч (предельно возможное значение для распылительной сушилки) с шагом 5 м<sup>3</sup>/ч и измеряя массовую долю влаги в высушенных экстрактах. Экстракты высушивали при температуре 70 °С и скорости подачи раствора 8 мл/мин. Полученные результаты приведены в таблице 7.2.1.

Таблица 7.2.1 – Массовая доля влаги в образцах высушенных экстрактов при разных значениях скорости потока воздуха

Обозначение экстракта	Массовая доля влаги в экстракте, %, при скорости потока воздуха, м <sup>3</sup> /ч						
	5	10	15	20	25	30	35
Rc-r1	68,0±3,4	54,0±2,7	35,5±1,8	15,6±0,8	<b>4,2±0,2</b>	4,1±0,2	4,1±0,2
Rc-a1	72,0±3,6	50,0±2,5	33,2±1,7	14,5±0,7	<b>3,5±0,2</b>	3,4±0,2	3,4±0,2
Rc-r2	65,5±3,3	47,5±2,4	28,0±1,4	12,0±0,6	<b>5,0±0,2</b>	4,8±0,2	4,8±0,3
Rc-a2	70,0±3,4	52,5±2,6	36,0±1,8	16,6±0,8	<b>4,5±0,2</b>	4,5±0,2	4,4±0,2
Pg-r1	58,5±2,9	34,0±1,7	16,5±0,8	<b>3,5±0,2</b>	3,5±0,2	3,4±0,2	3,4±0,2
Pg-c1	62,0±3,1	36,0±1,8	18,0±0,9	<b>4,2±0,2</b>	4,2±0,2	4,1±0,2	4,1±0,2
Pg-r2	64,0±3,2	33,5±1,7	19,0±0,9	<b>3,3±0,2</b>	3,3±0,2	3,3±0,2	3,2±0,2
Pg-c2	59,0±3,0	35,0±1,8	15,0±0,8	<b>4,5±0,2</b>	4,5±0,2	4,4±0,2	4,4±0,2
Es-r1	71,5±3,6	53,4±2,7	37,0±1,9	21,5±1,1	<b>4,7±0,3</b>	4,7±0,3	4,7±0,3
Es-a1	69,0±3,4	52,0±2,6	34,4±1,7	18,5±0,9	<b>4,1±0,2</b>	4,0±0,2	4,0±0,2
Es-r2	70,5±3,5	48,5±2,4	35,0±1,8	17,0±0,9	<b>4,4±0,2</b>	4,4±0,2	4,3±0,2
Es-a2	66,0±3,3	47,0±2,4	33,2±1,7	16,5±0,8	<b>3,9±0,2</b>	3,8±0,2	3,8±0,2
Dm-t1	74,0±3,7	39,0±1,9	22,5±1,1	15,6±0,8	<b>4,0±0,2</b>	4,0±0,2	3,9±0,2
Dm-c1	72,5±3,6	41,0±2,1	24,0±1,2	17,0±0,9	<b>3,5±0,2</b>	3,5±0,2	3,5±0,2
Dm-t2	67,5±3,4	36,0±1,8	21,0±1,1	14,5±0,7	<b>3,8±0,2</b>	3,8±0,2	3,7±0,2
Dm-c2	70,5±3,5	38,0±1,9	23,0±1,2	18,0±0,9	<b>4,5±0,2</b>	4,5±0,2	4,5±0,2
Dc-h1	76,0±3,8	45,7±2,3	21,8±1,1	<b>3,7±0,2</b>	3,7±0,2	3,6±0,2	3,6±0,2
Dc-a1	72,5±3,6	48,0±2,4	25,6±1,3	<b>3,9±0,2</b>	3,8±0,2	3,8±0,2	3,7±0,2
Dc-h2	69,0±3,4	44,3±2,2	23,0±1,2	<b>4,5±0,2</b>	4,5±0,2	4,4±0,2	4,3±0,2
Dc-a2	74,5±3,7	42,7±2,1	24,0±1,2	<b>4,2±0,2</b>	4,2±0,2	4,1±0,2	4,1±0,2
Sd-s1	71,5±3,6	51,0±2,6	37,5±1,9	23,5±1,2	14,5±0,7	<b>5,0±0,3</b>	4,9±0,3
Sd-a1	73,6±3,7	53,5±2,7	39,0±2,0	21,0±1,1	16,0±0,8	<b>4,3±0,2</b>	4,3±0,2
Sd-s2	69,0±3,4	52,0±2,6	36,0±1,8	22,5±1,1	17,5±0,9	<b>3,8±0,2</b>	3,7±0,2
Sd-a2	72,5±3,6	47,8±2,4	35,5±1,8	25,0±1,3	18,0±0,9	<b>4,5±0,2</b>	4,5±0,2

На основании полученных результатов в качестве рациональных значений скорости потока воздуха для распылительного высушивания

экстрактов выбрали значения от 20 м<sup>3</sup>/ч до 30 м<sup>3</sup>/ч в зависимости от вида экстракта.

Рациональные параметры распылительного высушивания растительных экстрактов обобщены в таблице 7.2.2.

Таблица 7.2.2 – Рациональные параметры распылительного высушивания растительных экстрактов

Обозначение экстракта	Температура высушивания, °С	Скорость подачи раствора, мл/мин	Скорость потока воздуха, м <sup>3</sup> /ч
Rc-r1	70	8	25
Rc-a1	70	8	25
Rc-r2	70	8	25
Rc-a2	70	8	25
Pg-r1	80	10	20
Pg-c1	80	10	20
Pg-r2	80	10	20
Pg-c2	80	10	20
Es-r1	60	8	25
Es-a1	60	8	25
Es-r2	60	8	25
Es-a2	60	8	25
Dm-t1	70	10	25
Dm-c1	80	10	25
Dm-t2	80	10	25
Dm-c2	70	10	25
Dc-h1	70	6	20
Dc-a1	70	6	20
Dc-h2	70	6	20
Dc-a2	70	6	20
Sd-s1	70	8	30
Sd-a1	70	8	30
Sd-s2	80	8	30
Sd-a2	80	8	30

Согласно таблице 7.2.2, обобщенные режимные параметры распылительного высушивания экстрактов на основе природного сырья, каллусных и корневых культур растений (*R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. divaricata*) следующие: температура 60–80 °С, скорость подачи раствора в установку 6–10 мл/мин, скорость воздушного потока 20–30 м<sup>3</sup>/ч.

### **7.3 Подбор рациональных параметров лиофильного высушивания растительных экстрактов**

Ллиофильная сушка (лиофилизация, сублимационная сушка) представляет собой наиболее бережную и мягкую технологию и широко используется в разных сферах пищевых производств. В фармацевтической и медицинской практике данный способ сушки востребован при производстве лечебных, профилактических и диагностических препаратов (вакцин, антибиотиков), консервировании препаратов плазмы, сыворотки крови, кровезаменителей, при создании «банков» сухих препаратов [11].

Основной целью лиофильной сушки является получение материала с минимально низкой остаточной влажностью, являющейся основным благоприятным фактором для развития микрофлоры. В основе метода лежит процесс сублимации – переход вещества из твердого состояния в газообразное, минуя жидкое [28]. При этом целевой продукт предварительно замораживают, а затем подвергают сублимационному высушиванию при пониженном давлении для удаления свободной воды и последующему досушиванию в вакууме или на воздухе при температуре не выше 50–60 °С с целью извлечения связанной воды, которая при минусовых температурах не удаляется. Преимуществом такого способа сушки является отсутствие воздействия высоких температур, приводящих к нарушению структурной

целостности объекта и его биологической активности. В пищевых производствах лиофилизация сохраняет значительное количество полезных веществ, форму, вкус, аромат, цвет и пищевую ценность продукта, что позволяет продукту храниться в течение длительного периода.

Важнейшим параметром сублимационной сушки растительных экстрактов является температура. В эксперименте использовали давление 0,05 мбар, температура охладителя составляла минус 80 °С. Лиофильную сушку жидких спиртовых экстрактов осуществляли при температурах от минус 20 °С до минус 40 °С с шагом 10 °С без дополнительной сушки при положительных температурах в течение 24 ч и контролировали влажность высушенных экстрактов. Полученные результаты представлены в таблицах 7.3.1–7.3.6.

На основании анализа данных таблицы 7.3.1 пришли к выводу, что лиофильную сушку экстрактов левзеи сафлоровидной Rc-r1, Rc-a1, Rc-r2, Rc-a2 целесообразно проводить при температуре минус 30 °С в течение 12 ч, поскольку при данных параметрах массовая доля влаги в образцах не превышает 5 %. Увеличивать продолжительность процесса лиофилизации нет необходимости, так как при дальнейшей сушке влажность экстрактов не претерпевает существенных изменений.

Аналогичный анализ таблиц 7.3.2–7.3.6 позволил установить рациональные параметры лиофильной сушки других изучаемых экстрактов:

- женьшеня обыкновенного (Pg-r1, Pg-c1, Pg-r2, Pg-c2) – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч;
- элеутерококка колючего (Es-r1, Es-a1, Es-r2, Es-a2) – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч;
- пальчатокоренника пятнистого (Dm-t1, Dm-c1, Dm-t2, Dm-c2) – температура лиофилизации минус 20 °С, продолжительность процесса 12 ч;
- диоскореи обыкновенной (Dc-h1, Dc-a1, Dc-h2, Dc-a2) – температура лиофилизации минус 20 °С, продолжительность процесса 8 ч;

- сапожниковии растопыренной (Sd-s1, Sd-a1, Sd-s2, Sd-a2) – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч.

Таблица 7.3.1 – Влияние температуры лиофильного высушивания на массовую долю влаги в экстрактах левзеи сафлоровидной

Продолжительность высушивания, ч	Массовая доля влаги в экстракте, %			
	Rc-r1	Rc-a1	Rc-r2	Rc-a2
Температура минус 20 °С				
4	59,5±3,0	57,6±2,9	55,0±2,8	60,7±3,0
8	33,4±1,7	32,8±1,6	31,5±1,6	35,4±1,8
12	21,7±1,1	20,9±1,1	19,0±1,0	22,7±1,1
16	15,5±0,8	17,5±0,9	14,3±0,7	16,0±0,8
20	9,8±0,5	10,4±0,5	9,2±0,5	11,4±0,6
24	7,7±0,4	6,4±0,3	7,0±0,4	8,3±0,4
Температура минус 30 °С				
4	35,6±1,8	33,7±1,7	37,0±1,9	32,9±1,6
8	20,5±1,0	18,9±0,9	21,6±1,1	19,0±1,0
12	4,8±0,3	4,3±0,2	4,0±0,2	4,5±0,2
16	4,7±0,3	4,3±0,2	4,0±0,2	4,5±0,2
20	4,7±0,3	4,2±0,2	3,9±0,2	4,5±0,2
24	4,7±0,3	4,2±0,2	3,9±0,2	4,5±0,2
Температура минус 40 °С				
4	61,4±3,1	62,0±3,1	59,8±3,0	63,0±3,2
8	55,2±2,8	53,7±2,7	51,7±2,6	54,6±2,7
12	34,0±1,7	33,5±1,7	34,0±1,7	31,9±1,6
16	27,8±1,4	25,4±1,3	22,8±1,2	24,5±1,2
20	12,5±0,6	11,7±0,6	10,9±0,5	13,7±0,7
24	12,7±0,6	11,6±0,6	11,0±0,6	13,7±0,7

Таблица 7.3.2 – Влияние температуры лиофильного высушивания на массовую долю влаги в экстрактах женьшеня обыкновенного

Продолжительность высушивания, ч	Массовая доля влаги в экстракте, %			
	Pg-r1	Pg-c1	Pg-r2	Pg-c2
Температура минус 20 °С				
4	48,0±2,4	45,7±2,3	49,0±2,4	46,9±2,3
8	37,6±1,9	33,4±1,7	35,6±1,8	31,7±1,6
12	22,5±1,1	21,0±1,1	23,4±1,2	19,8±1,0
16	16,5±0,8	15,8±0,8	16,9±0,8	14,6±0,7
20	11,4±0,6	12,0±0,6	11,8±0,6	12,5±0,6
24	9,9±0,5	10,6±0,5	8,8±0,5	9,5±0,5
Температура минус 30 °С				
4	26,6±1,3	25,9±1,3	24,8±1,3	27,0±1,4
8	14,0±0,7	13,4±0,7	12,7±0,6	15,4±0,8
12	5,0±0,3	4,5±0,3	4,7±0,3	4,8±0,3
16	4,9±0,3	4,5±0,3	4,7±0,3	4,8±0,3
20	4,9±0,3	4,4±0,2	4,6±0,3	4,8±0,3
24	4,8±0,3	4,4±0,2	4,5±0,3	4,7±0,3
Температура минус 40 °С				
4	37,8±1,9	39,0±2,0	36,7±1,8	40,2±2,0
8	28,9±1,4	28,5±1,4	26,5±1,3	25,5±1,3
12	17,6±0,9	18,3±0,9	19,0±1,0	18,5±0,9
16	11,2±0,6	11,6±0,6	12,3±0,6	13,0±0,7
20	8,5±0,4	9,3±0,5	9,0±0,5	9,6±0,5
24	4,8±0,3	5,0±0,3	4,7±0,3	4,9±0,3

Таблица 7.3.3 – Влияние температуры лиофильного высушивания на массовую долю влаги в экстрактах элеутерококка колючего

Продолжительность высушивания, ч	Массовая доля влаги в экстракте, %			
	Es-r1	Es-a1	Es-r2	Es-a2
Температура минус 20 °С				
4	54,0±2,7	53,7±2,7	55,2±2,8	52,9±2,6
8	32,8±1,6	31,5±1,6	33,4±1,7	32,0±1,6
12	24,5±1,2	23,0±1,2	22,8±1,1	21,9±1,1
16	16,7±0,8	15,9±0,8	15,5±0,8	14,7±0,7
20	13,2±0,7	12,8±0,6	13,4±0,7	11,9±0,6
24	10,5±0,5	9,8±0,5	10,7±0,5	9,4±0,5
Температура минус 30 °С				
4	33,9±1,7	31,6±1,6	34,2±1,7	30,8±1,5
8	17,8±0,9	15,5±0,8	16,7±0,8	14,8±0,8
12	4,9±0,3	4,2±0,2	4,0±0,2	3,9±0,2
16	4,8±0,3	4,1±0,2	4,0±0,2	3,9±0,2
20	4,8±0,3	4,1±0,2	3,9±0,2	3,8±0,2
24	4,7±0,3	4,1±0,2	3,9±0,2	3,8±0,2
Температура минус 40 °С				
4	48,9±2,4	47,7±2,4	46,5±2,3	50,5±2,5
8	32,2±1,6	31,5±1,6	34,3±1,7	34,0±1,7
12	26,5±1,4	23,4±1,2	24,7±1,3	22,8±1,2
16	17,0±0,9	16,2±0,8	15,5±0,8	16,0±0,8
20	11,2±0,6	10,8±0,5	11,7±0,6	12,3±0,6
24	6,7±0,3	5,9±0,3	5,5±0,3	5,4±0,3



Таблица 7.3.4 – Влияние температуры лиофильного высушивания на массовую долю влаги в экстрактах пальчатокоренника пятнистого

Продолжительность высушивания, ч	Массовая доля влаги в экстракте, %			
	Dm-t1	Dm-c1	Dm-t2	Dm-c2
Температура минус 20 °С				
4	27,7±1,4	29,4±1,5	30,7±1,5	28,6±1,4
8	12,4±0,6	13,7±0,7	13,0±0,7	14,5±0,7
12	4,4±0,2	4,9±0,3	4,7±0,3	4,3±0,2
16	4,3±0,2	4,9±0,3	4,7±0,3	4,3±0,2
20	4,3±0,2	4,8±0,3	4,5±0,3	4,2±0,2
24	4,2±0,2	4,8±0,3	4,5±0,3	4,2±0,2
Температура минус 30 °С				
4	36,5±1,8	38,9±2,0	37,3±1,9	35,9±1,8
8	24,5±1,2	25,6±1,3	23,7±1,2	22,8±1,1
12	17,7±0,9	18,5±0,9	19,0±1,0	16,5±0,8
16	11,2±0,6	12,4±0,6	13,0±0,7	12,7±0,6
20	5,0±0,3	4,8±0,3	4,5±0,3	3,9±0,2
24	4,9±0,3	4,7±0,3	4,5±0,3	3,8±0,2
Температура минус 40 °С				
4	45,6±2,3	47,0±2,4	46,8±2,3	44,3±2,2
8	31,0±1,6	30,7±1,6	29,5±1,5	28,0±1,4
12	20,8±1,1	19,8±1,0	18,8±0,9	17,5±0,9
16	13,6±0,7	14,0±0,7	12,7±0,6	13,0±0,7
20	8,7±0,5	9,0±0,5	8,3±0,4	10,0±0,5
24	5,0±0,3	4,4±0,2	4,2±0,2	5,0±0,3

Таблица 7.3.5 – Влияние температуры лиофильного высушивания на массовую долю влаги в экстрактах диоскореи обыкновенной

Продолжительность высушивания, ч	Массовая доля влаги в экстракте, %			
	Dc-h1	Dc-a1	Dc-h2	Dc-a2
Температура минус 20 °С				
4	18,9±1,0	21,3±1,1	17,5±0,9	19,0±1,0
8	4,9±0,3	5,0±0,3	4,5±0,3	4,7±0,3
12	4,9±0,3	5,0±0,3	4,6±0,3	4,7±0,3
16	4,8±0,3	4,9±0,3	4,5±0,3	4,8±0,3
20	4,8±0,3	4,9±0,3	4,6±0,3	4,7±0,3
24	4,7±0,3	5,0±0,3	4,6±0,3	4,7±0,3
Температура минус 30 °С				
4	28,9±1,4	30,3±1,5	29,5±1,5	27,7±1,4
8	18,6±0,9	19,0±1,0	18,3±0,9	17,7±0,9
12	12,4±0,6	13,5±0,7	13,0±0,7	11,9±0,6
16	9,8±0,5	10,6±0,5	9,0±0,5	9,3±0,5
20	5,1±0,3	5,4±0,3	4,9±0,3	4,7±0,3
24	4,7±0,3	5,0±0,3	4,4±0,2	4,8±0,3
Температура минус 40 °С				
4	37,6±1,9	39,9±2,0	35,7±1,8	40,5±2,0
8	25,6±1,3	24,7±1,2	23,0±1,2	22,6±1,1
12	19,6±1,0	21,0±1,1	18,3±0,9	17,8±0,9
16	10,4±0,5	11,5±0,6	11,0±0,6	12,3±0,6
20	7,7±0,4	8,4±0,4	9,2±0,5	9,4±0,5
24	4,5±0,2	4,7±0,3	5,0±0,3	4,8±0,3

Таблица 7.3.6 – Влияние температуры лиофильного высушивания на массовую долю влаги в экстрактах сапожниковии растопыренной

Продолжительность высушивания, ч	Массовая доля влаги в экстракте, %			
	Sd-s1	Sd-a1	Sd-s2	Sd-a2
Температура минус 20 °С				
4	49,0±2,5	47,6±2,4	46,3±2,3	45,8±2,3
8	33,2±1,7	31,2±1,6	32,0±1,6	29,8±1,5
12	26,5±1,3	25,0±1,3	27,9±1,4	24,3±1,2
16	18,0±0,9	19,3±1,0	17,6±0,9	16,8±0,8
20	12,3±0,6	14,5±0,7	11,8±0,6	13,2±0,7
24	9,0±0,5	8,7±0,4	8,3±0,4	9,4±0,5
Температура минус 30 °С				
4	25,4±1,3	23,7±1,2	24,0±1,2	22,6±1,2
8	12,6±0,6	13,0±0,7	12,0±0,6	14,5±0,7
12	4,5±0,3	4,8±0,3	5,0±0,3	3,9±0,2
16	4,5±0,3	4,7±0,3	5,0±0,3	3,9±0,2
20	4,4±0,2	4,7±0,3	4,9±0,3	3,8±0,2
24	4,4±0,2	4,6±0,3	4,9±0,3	3,8±0,2
Температура минус 40 °С				
4	53,4±2,7	55,0±2,8	55,6±2,8	52,8±2,7
8	42,1±2,1	41,6±2,1	43,0±2,2	44,2±2,2
12	33,0±1,7	31,8±1,6	30,9±1,6	31,0±1,6
16	21,4±1,1	20,9±1,0	21,7±1,1	22,3±1,1
20	15,6±0,8	14,7±0,8	13,8±0,7	14,0±0,7
24	12,0±0,6	11,5±0,6	10,8±0,6	11,7±0,6

## 7.4 Изучение компонентного состава и показателей качества сухих растительных экстрактов

Для растительных экстрактов, высушенных распылительным и сублимационным способами, изучали содержание вторичных метаболитов – действующих БАВ (таблицы 7.4.1–7.4.6).

Таблица 7.4.1 – Концентрация биологически активных веществ в сухих экстрактах левзеи сафлоровидной

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/г			
	Rc-r1	Rc-a1	Rc-r2	Rc-a2
β-ситостерин	9,31±0,47/ 9,78±0,48*	11,48±0,57/ 12,08±0,60	11,03±0,55/ 10,76±0,53	13,34±0,67/ 13,55±0,68
Стигмастерин	12,95±0,65/ 13,06±0,63	12,92±0,63/ 13,11±0,66	13,32±0,67/ 13,07±0,65	15,09±0,75/ 14,84±0,74
20-гидроксиэкдизон	21,91±1,09/ 22,27±1,11	34,55±1,73/ 35,06±1,68	23,46±1,80/ 23,16±1,16	34,22±1,71/ 34,37±1,68
Изофраксидин	12,74±0,64/ 13,05±0,63	15,05±0,75/ 14,78±0,71	13,47±0,66/ 13,66±0,68	15,44±0,77/ 15,80±0,79
β-амирин	6,65±0,33/ 6,42±0,31	5,44±0,27/ 5,21±0,25	6,66±0,33/ 7,04±0,35	6,07±0,30/ 6,15±0,30
α-амирин	6,51±0,33/ 6,83±0,33	5,95±0,29/ 6,09±0,30	6,07±0,29/ 5,80±0,29	8,28±0,40/ 8,44±0,42
Рутин	26,12±1,31/ 26,58±1,33	36,09±1,73/ 35,84±1,79	27,13±1,36/ 27,03±1,35	38,90±1,94/ 39,24±1,92
Кверцетин	31,09±1,55/ 30,75±1,51	42,59±2,13/ 42,70±2,14	34,66±1,73/ 35,11±1,76	45,60±2,28/ 45,72±2,29
Апигенин	51,87±2,59/ 52,06±2,50	83,40±4,09/ 83,65±4,18	72,34±3,62/ 72,58±3,56	85,12±4,26/ 85,33±4,27
Хлорогеновая кислота	25,12±1,26/ 24,76±1,24	34,10±1,71/ 33,96±1,66	26,09±1,30/ 25,81±1,29	36,23±1,81/ 36,47±1,82
Кофейная кислота	36,40±1,82/ 36,68±1,76	44,77±2,24/ 48,04±2,40	37,80±1,89/ 38,03±1,86	48,10±2,40/ 47,90±2,39

\* числитель – распылительная сушка, знаменатель – лиофилизация

Таблица 7.4.2 – Концентрация биологически активных веществ в сухих экстрактах женьшеня обыкновенного

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/г			
	Pg-r1	Pg-c1	Pg-r2	Pg-c2
Гинзенозид LC <sub>1</sub>	12,76±0,64/ 13,05±0,65	10,56±0,53/ 10,33±0,52	9,74±0,49/ 9,98±0,50	12,81±0,64/ 13,14±0,66
Гинзенозид RB <sub>1</sub>	17,42±0,87/ 17,65±0,88	19,87±0,99/ 20,06±1,00	14,92±0,75/ 15,15±0,76	21,42±1,07/ 21,65±1,08
Панаксозид	31,12±1,52/ 31,24±1,56	34,84±1,74/ 35,11±1,77	32,76±1,64/ 32,80±1,64	34,23±1,71/ 34,36±1,72
Гомизин А	1,23±0,06/ 1,45±0,07	1,44±0,07/ 1,68±1,63	1,73±0,09/ 1,92±0,10	2,21±0,11/ 2,45±0,12
Гомизин В	2,64±0,13/ 2,78±0,14	3,17±0,16/ 3,34±0,17	2,64±0,13/ 2,77±0,14	3,05±0,15/ 2,84±0,14
Экдизон	2,02±0,10/ 1,90±0,09	3,26±0,16/ 3,55±0,18	3,55±0,18/ 3,70±0,19	3,89±0,19/ 4,15±0,21
Рутин	3,08±0,15/ 2,87±0,14	4,90±0,24/ 5,12±0,26	4,19±0,21/ 4,27±0,21	5,14±0,26/ 5,26±0,26
Кверцетин	4,66±0,23/ 4,83±0,24	5,28±0,26/ 5,55±0,28	5,55±0,28/ 5,71±0,29	6,40±0,32/ 6,72±0,34
Сиреневая кислота	11,35±0,57/ 11,56±0,58	11,52±0,58/ 11,68±0,58	11,47±0,57/ 11,62±0,58	14,81±0,74/ 15,03±0,75

Таблица 7.4.3 – Концентрация биологически активных веществ в сухих экстрактах элеутерококка колючего

Наименование вещества	Содержание вещества в экстракте, мг/г			
	Es-r1	Es-a1	Es-r2	Es-a2
Сумма элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В (сирингин)	8,98±0,45/ 9,13±0,46	9,80±0,49/ 9,73±0,49	9,43±0,47/ 9,22±0,46	12,94±0,65/ 13,22±0,66
2-ацетил-3-гидроксифуран-О-α-D-глюкопиранозид	4,14±0,21/ 4,26±0,21	4,58±0,23/ 4,74±0,24	4,88±0,24/ 5,34±0,27	4,88±0,24/ 5,23±0,26
1,6-Бис(3,4,5-тригидроксифенил)-1,6-гександион	3,57±0,18/ 3,70±0,19	4,76±0,24/ 5,04±0,25	4,08±0,20/ 3,84±0,19	4,09±0,20/ 3,92±0,19
7,9':7'9-диэпокси-8,8'-лигнан-3,3',4,4',5,5'-гексанол	3,49±0,17/ 3,61±0,18	5,05±0,25/ 5,22±0,26	4,24±0,21/ 4,50±0,22	6,00±0,30/ 5,78±0,29
Эритро-гваяцилглицерол-β-кониферилловый альдегидный эфир	5,31±0,26/ 5,55±0,28	6,26±0,31/ 6,40±0,32	6,04±0,30/ 5,90±0,29	6,80±0,34/ 7,11±0,36
1,3-пропандиол-2-О-4'-синапиловый эфир	4,32±0,22/ 4,65±0,23	5,16±0,26/ 5,23±0,26	5,14±0,26/ 5,21±0,26	5,68±0,28/ 5,90±0,30
Рутин	4,94±0,25/ 5,20±0,26	5,51±0,27/ 5,66±0,28	5,25±0,26/ 5,10±0,26	6,07±0,30/ 5,80±0,29
Гиперозид	4,84±0,24/ 5,03±0,25	7,02±0,35/ 6,98±0,35	6,04±0,30/ 5,76±0,29	7,85±0,39/ 7,64±0,38
Кофейная кислота	7,29±0,36/ 7,44±0,37	9,86±0,49/ 10,13±0,51	7,84±0,39/ 8,12±0,41	11,62±0,58/ 12,03±0,60

Таблица 7.4.4 – Концентрация биологически активных веществ в сухих экстрактах пальчатокоренника пятнистого

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/г			
	Dm-t1	Dm-c1	Dm-t2	Dm-c2
Кверцетин	15,94±0,80/ 16,12±0,81	18,75±0,94/ 19,21±0,96	18,22±0,91/ 18,34±0,92	22,30±1,11/ 22,44±1,12
Кверцетин-3,7-О-β-D-глюкопиранозид	12,35±0,62/ 12,56±0,63	13,58±0,68/ 13,62±0,68	13,18±0,66/ 13,33±0,67	14,35±0,72/ 14,42±0,72
Рутин	19,39±1,00/ 19,43±0,97	22,73±1,14/ 22,55±1,13	19,94±1,00/ 20,14±1,10	38,70±1,94/ 38,47±1,92
Апигенин	9,54±0,48/ 9,32±0,47	12,04±0,60/ 11,87±0,59	10,56±0,53/ 10,28±0,51	12,55±0,63/ 12,66±0,63
Колеофолид	6,78±0,34/ 7,02±0,35	7,88±0,39/ 8,07±0,40	7,11±0,35/ 7,16±0,36	8,45±0,42/ 8,61±0,43

Таблица 7.4.5 – Концентрация биологически активных веществ в сухих экстрактах диоскореи обыкновенной

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/г			
	Dc-h1	Dc-a1	Dc-h2	Dc-a2
Апигенин-гликозид	9,88±0,49/ 10,10±0,50	10,93±0,54/ 11,09±0,55	10,58±0,53/ 10,32±0,52	13,83±0,69/ 14,05±0,70
Рутин	11,75±0,59/ 11,90±0,60	13,78±0,69/ 13,54±0,68	12,56±0,63/ 12,74±0,64	14,98±0,75/ 15,17±0,76
Кверцетин	13,03±0,65/ 13,20±0,66	16,15±0,81/ 16,22±0,81	13,93±0,70/ 14,08±0,70	16,85±0,84/ 17,11±0,86
Спиростенол А	14,66±0,73/ 14,42±0,72	17,11±0,86/ 17,34±0,87	14,19±0,71/ 14,08±0,70	17,58±0,88/ 17,30±0,87
Спиростенол Б	8,91±0,44/ 9,13±0,46	9,79±0,49/ 10,03±0,50	10,15±0,51/ 10,11±0,50	11,65±0,58/ 11,33±0,57
Диосцин	14,66±0,73/ 14,88±0,74	17,58±0,88/ 17,67±0,88	16,25±0,81/ 16,34±0,82	18,82±0,94/ 19,20±0,96
Диосгенин	8,26±0,41/ 8,45±0,42	9,64±0,48/ 9,90±0,49	8,51±0,43/ 8,64±0,43	10,19±0,51/ 10,32±0,52

Таблица 7.4.6 – Концентрация биологически активных веществ в сухих экстрактах сапожниковии растопыренной

Наименование вещества	Концентрация вещества в экстракте, мг/г			
	Sd-s1	Sd-a1	Sd-s2	Sd-a2
Цимифугин	9,57±0,48/ 10,12±0,51	11,83±0,59/ 12,06±0,60	10,92±0,55/ 11,23±0,56	12,95±0,65/ 13,19±0,66
Гамаудол	13,09±0,65/ 13,22±0,66	16,93±0,85/ 17,12±0,86	15,78±0,79/ 15,65±0,78	17,02±0,85/ 16,77±0,84
Перв-О-глюкозилцимифугин	16,88±0,84/ 17,15±0,86	20,40±1,02/ 20,54±1,03	19,12±0,96/ 19,34±0,97	23,01±1,15/ 23,25±1,16
4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол	15,45±0,77/ 15,72±0,79	18,77±0,94/ 18,94±0,95	15,28±0,76/ 15,34±0,77	20,72±1,04/ 20,90±1,05

Полученные результаты (таблицы 7.4.1–7.4.6) показали, что высушенные экстракты левзеи сафлоровидной демонстрируют высокое содержание целевых БАВ – экистероидов (70,07–92,44 мг/г в случае распылительной сушки, 71,41–93,15 мг/г в случае сублимационной сушки), флавоноидов (149,99–169,62 мг/г в случае распылительной сушки, 109,39–170,29 мг/г в случае сублимационной сушки) и фенольных кислот (61,52–84,33 мг/г в случае распылительной сушки, 61,44–84,37 мг/г в случае сублимационной сушки). Высушенные экстракты женьшеня обыкновенного обогащены тритерпеновыми гликозидами (67,19–77,61 мг/г в случае распылительной сушки, 68,07–78,59 мг/г в случае сублимационной сушки) и флавоноидами (7,74–11,54 мг/г в случае распылительной сушки, 7,70–11,98 мг/г в случае сублимационной сушки). Доминирующие вторичные метаболиты в сухих экстрактах элеутерококка колючего – это фенилпропаноиды (29,81–40,39 мг/г для экстрактов, высушенных распылительным способом, 30,90–41,16 мг/г для экстрактов, высушенных сублимационным способом).

Что касается сухих экстрактов пальчатокоренника пятнистого, в них преобладают флавоноиды – 64,00–96,35 мг/г для экстрактов, высушенных распылительным способом, 64,45–96,60 мг/г для экстрактов, высушенных лиофильным способом. Высушенные экстракты диоскореи обыкновенной характеризуются высоким содержанием гликозидов (56,37–72,07 мг/г для экстрактов, высушенных распылительным способом, 56,98–72,20 мг/г для экстрактов, высушенных сублимационным способом) и флавоноидов (24,78–31,83 мг/г для экстрактов, высушенных распылительным способом, 25,10–32,28 мг/г для экстрактов, высушенных сублимационным способом). Доминирующие БАВ сухих экстрактов сапожниковии растопыренной – хромоны (54,99–73,70 мг/г в случае распылительной сушки и 56,21–74,11 мг/г в случае лиофилизации).

Следует отметить, что способ высушивания экстрактов не оказывает влияния на уровень содержания в них целевых биологически активных

веществ: содержание вторичных метаболитов в экстрактах, высушенных распылительным и сублимационным способом, отличается незначительно (в пределах статистической погрешности).

Важными характеристиками сухих растительных экстрактов, определяющими их функционально-технологические свойства, являются гранулометрический состав, насыпная плотность (до и после уплотнения) и гигроскопичность. Результаты определения данных показателей для рассматриваемых экстрактов приведены в таблице 7.4.7.

Доказано, сухие растительные экстракты, полученные методом распылительного высушивания, характеризуются более высоким содержанием мелкодисперсных фракций ( $1 \leq d \leq 2$  мм и  $0,25 \leq d \leq 1$  мм), по сравнению с экстрактами, произведенными в результате лиофилизации. Так, содержание крупной фракции ( $1 \leq d \leq 2$  мм) во втором случае в 2,06 раз больше содержания данной фракции в первом случае. Кроме того, отмечено, что насыпная плотность и гигроскопичность экстрактов, полученных сублимационным высушиванием, превышают данные показатели для экстрактов, изготовленных в результате распылительной сушки, в среднем в 1,5–2,0 раза. Высокие значения насыпной плотности и гигроскопичности сухих экстрактов могут оказать негативное влияние на сроки их хранения и возможности использования в технологии функциональных продуктов питания и напитков. Для минимизации данных последствий целесообразно смешивание порошкообразных экстрактов с вспомогательными компонентами.



Таблица 7.4.7 – Гранулометрический состав, насыпная плотность и гигроскопичность сухих растительных экстрактов

Обозначение экстракта	Гранулометрический состав (содержание частиц, %, фракции, мм)						Насыпная плотность после уплотнения, г/мл		Гигроскопичность через 24 ч, %	
	р			с			с	р	с	р*
	1≤d≤2	0,25≤d≤1	d≤0,25	1≤d≤2	0,25≤d≤1	d≤0,25				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rc-r1	3,2	72,3	24,5	5,5	73,4	21,1	0,58±0,03	0,43±0,02	10,5±0,7	5,6±0,3
Rc-a1	2,8	73,4	23,8	5,8	74,0	20,2	0,55±0,03	0,39±0,02	11,7±0,7	6,4±0,3
Rc-r2	4,9	72,5	22,6	5,4	73,2	21,42	0,57±0,03	0,40±0,02	11,0±0,6	5,8±0,3
Rc-a2	4,6	72,0	23,4	5,5	73,1	26,4	0,62±0,03	0,42±0,02	10,9±0,6	6,0±0,3
Pg-r1	5,5	70,9	23,6	5,6	74,5	19,9	0,64±0,03	0,42±0,02	11,3±0,7	5,8±0,3
Pg-c1	4,5	71,4	24,1	5,9	73,8	20,3	0,62±0,03	0,45±0,02	12,1±0,8	5,6±0,3
Pg-r2	5,0	71,0	24,0	5,2	74,2	20,6	0,59±0,03	0,44±0,02	11,5±0,7	6,3±0,3
Pg-c2	4,8	70,8	24,4	5,5	74,6	19,9	0,61±0,03	0,45±0,02	10,9±0,6	6,5±0,3
Es-r1	2,3	72,7	25,0	4,9	75,5	19,6	0,63±0,03	0,36±0,02	10,5±0,6	6,3±0,3

Окончание таблицы 7.4.7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Es-a1	1,2	73,2	25,6	4,5	76,0	19,5	0,61±0,03	0,38±0,02	10,2±0,5	5,7±0,3
Es-r2	2,3	73,0	24,7	5,1	74,9	20,0	0,65±0,03	0,35±0,02	11,0±0,6	6,2±0,3
Es-a2	2,6	72,9	24,5	5,0	75,3	19,7	0,62±0,03	0,39±0,02	10,7±0,6	5,9±0,3
Dm-t1	3,9	70,9	25,2	6,5	76,3	17,2	0,55±0,03	0,44±0,02	10,4±0,5	5,7±0,3
Dm-c1	3,4	71,6	25,0	6,1	77,0	16,9	0,62±0,03	0,42±0,02	11,6±0,7	5,9±0,3
Dm-t2	2,1	72,3	25,6	6,3	75,8	17,9	0,57±0,03	0,45±0,02	11,1±0,6	6,5±0,3
Dm-c2	2,8	71,4	25,8	6,4	76,0	17,6	0,59±0,03	0,41±0,02	12,3±0,8	6,3±0,3
Dc-h1	2,7	74,4	22,9	5,5	75,5	19,0	0,64±0,03	0,40±0,02	11,5±0,7	5,7±0,3
Dc-a1	1,3	75,3	23,4	5,7	75,8	18,5	0,66±0,03	0,37±0,02	10,7±0,6	4,8±0,3
Dc-h2	3,1	73,9	23,0	5,9	76,2	17,0	0,61±0,03	0,35±0,02	11,3±0,7	5,2±0,3
Dc-a2	2,7	74,7	22,6	5,4	76,4	18,2	0,62±0,03	0,36±0,02	11,1±0,7	5,4±0,3
Sd-s1	3,0	73,4	23,6	4,6	75,9	19,5	0,59±0,03	0,41±0,02	10,9±0,7	5,8±0,3
Sd-a1	1,2	74,5	24,3	5,6	74,5	19,9	0,62±0,03	0,35±0,02	11,3±0,7	5,6±0,3
Sd-s2	1,9	74,1	24,0	5,2	74,2	20,6	0,61±0,03	0,34±0,02	11,5±0,6	6,3±0,3
Sd-a2	1,1	73,7	25,2	5,7	75,0	19,3	0,60±0,03	0,39±0,02	11,6±0,7	6,0±0,3

\*p – экстракт, полученный методом распылительного высушивания; с – экстракт, полученный методом сублимационного высушивания

### 7.5 Заключение по седьмой главе

Подобраны рациональные параметры концентрирования спиртовых экстрактов, полученных из надземных и подземных частей, каллусных и корневых культур левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной, позволяющие снизить массовую долю влаги в них до 25 % и менее, путем выпаривания растворителя:

- для экстрактов *R. carthamoides* – температура 65,0–75,0 °С, продолжительность 1,5 ч;
- для экстрактов *P. ginseng* – температура 65,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *E. senticosus* – температура 65,0–75,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *D. maculata* – температура 65,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *D. communis* – температура 65,0–75,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *S. divaricata* – температура 65,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч.

Предложен метод распылительного высушивания растительных экстрактов при следующих параметрах:

- ✓ для экстрактов *R. carthamoides* – температура 70 °С, скорость подачи раствора 8 мл/мин, скорость потока воздуха 25 м<sup>3</sup>/ч;
- ✓ для экстрактов *P. ginseng* – температура 80 °С, скорость подачи раствора 10 мл/мин, скорость потока воздуха 20 м<sup>3</sup>/ч;
- ✓ для экстрактов *E. senticosus* – температура 60 °С, скорость подачи раствора 8 мл/мин, скорость потока воздуха 25 м<sup>3</sup>/ч;
- ✓ для экстрактов *D. maculata* – температура 70–80 °С, скорость подачи раствора 10 мл/мин, скорость потока воздуха 25 м<sup>3</sup>/ч;

- ✓ для экстрактов *D. communis* – температура 70 °С, скорость подачи раствора 6 мл/мин, скорость потока воздуха 20 м<sup>3</sup>/ч;
- ✓ для экстрактов *S. divaricata* – температура 70–80 °С, скорость подачи раствора 8 мл/мин, скорость потока воздуха 30 м<sup>3</sup>/ч.

Экспериментально обоснованы рациональные параметры сублимационной сушки спиртовых растительных экстрактов:

– для экстрактов *R. carthamoides* – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч;

– для экстрактов *P. ginseng* – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч;

– для экстрактов *E. senticosus* – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч;

– для экстрактов *D. maculata* – температура лиофилизации минус 20 °С, продолжительность процесса 12 ч;

– для экстрактов *D. communis* – температура лиофилизации минус 20 °С, продолжительность процесса 8 ч;

– для экстрактов *S. divaricata* – температура лиофилизации минус 30 °С, продолжительность процесса 12 ч.

Проведена оценка компонентного состава растительных экстрактов, полученных в результате распылительного и сублимационного высушивания. Установлено, что высушенные экстракты левзеи сафлоровидной демонстрируют высокое содержание целевых БАВ – экидистероидов (70,07–93,15 мг/г), флавоноидов (109,39–170,29 мг/г) и фенольных кислот (61,44–84,37 мг/г). Высушенные экстракты женьшеня обыкновенного обогащены тритерпеновыми гликозидами (67,19–78,59 мг/г) и флавоноидами (7,70–11,98 мг/г). Доминирующие вторичные метаболиты в сухих экстрактах элеутерококка колючего – это фенилпропаноиды (29,81–41,16 мг/г). В сухих

экстрактах пальчатокоренника пятнистого преобладают флавоноиды – 64,00–96,60 мг/г. Высушенные экстракты диоскорей обыкновенной характеризуются высоким содержанием гликозидов (56,37–72,20 мг/г) и флавоноидов (24,78–32,28 мг/г). Доминирующие БАВ сухих экстрактов сапожниковии растопыренной – хромоны (54,99–74,11 мг/г).

Не выявлено влияния способа высушивания экстрактов на уровень содержания в них целевых биологически активных веществ: содержание вторичных метаболитов в экстрактах, высушенных распылительным и сублимационным способом, отличается незначительно (в пределах статистической погрешности).

Изучены показатели качества сухих экстрактов: гранулометрический состав, насыпная плотность, гигроскопичность. Показано, что экстракты, полученные методом распылительного высушивания, характеризуются более высоким содержанием мелкодисперсных фракций ( $1 \leq d \leq 2$  мм и  $0,25 \leq d \leq 1$  мм), по сравнению с экстрактами, полученными в результате лиофилизации. Установлено, что насыпная плотность и гигроскопичность экстрактов, полученных сублимационным высушиванием, превышают данные показатели для экстрактов, полученных в результате распылительной сушки, в среднем в 1,5–2,0 раза.

## ГЛАВА 8. ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава посвящена разработке процессуальных схем производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений: левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*), женьшень обыкновенный (*Panax ginseng*), элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*), пальчатокоренник пятнистый (*Dactylorhiza maculata*), диоскорея обыкновенная (*Dioscorea communis*), сапожниковия растопыренная (*Saposhnikovia divaricata*), разработке рецептур и процессуальных схем производства напитков функциональной направленности на основе густых и сухих экстрактов. Также глава содержит результаты изучения показателей качества и функциональных характеристик разработанных продуктов, рекомендации по их применению. Глава завершается оценкой экономической эффективности внедрения предлагаемых технологий и расчетом себестоимости разработанных напитков.

### **8.1 Технологические схемы производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*, установление сроков хранения**

Технологические (процессуальные) схемы производства густых и сухих растительных экстрактов разрабатывались на основании результатов собственных исследований, направленных на подбор составов питательных сред и параметров культивирования клеточных культур *in vitro* растений (левзеи сафлоровидной, женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего,

пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной), оценку их ростовых характеристик, подбор параметров спиртовой экстракции природного растительного сырья (надземных и подземных частей) и клеточных культур растений методами мацерации, циркуляционного и микроволнового экстрагирования, анализ компонентного состава, свойств и биологической активности полученных разными методами экстрактов, разработку методов очистки растительных экстрактов ультрафильтрацией и хроматографией, подбор рациональных параметров концентрирования и сушки (распылительной, сублимационной) спиртовых экстрактов.

Высокую степень экстрагирования комплекса биологически активных веществ продемонстрировали метод микроволновой экстракции и метод циркуляционного экстрагирования надземных / подземных частей растений и клеточных культур *in vitro* (калусных культур и культур адвентивных корней). В этой связи данные подходы целесообразно использовать при разработке технологии густых и сухих экстрактов.

Технологические схемы производства густых экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* приведены на рисунках 8.1.1–8.1.2, технологические схемы производства сухих экстрактов – на рисунках 8.1.3–8.1.4 (во всех процессуальных схемах: Кт – контроль технологический, Кх – контроль химический, Кмб – контроль микробиологический).

Технологический процесс производства как густых, так и сухих растительных экстрактов начинается с санитарной подготовки производства: помещения, оборудования, персонала (**BP 1 – санитарная подготовка производства**) в соответствии со стандартами GMP.

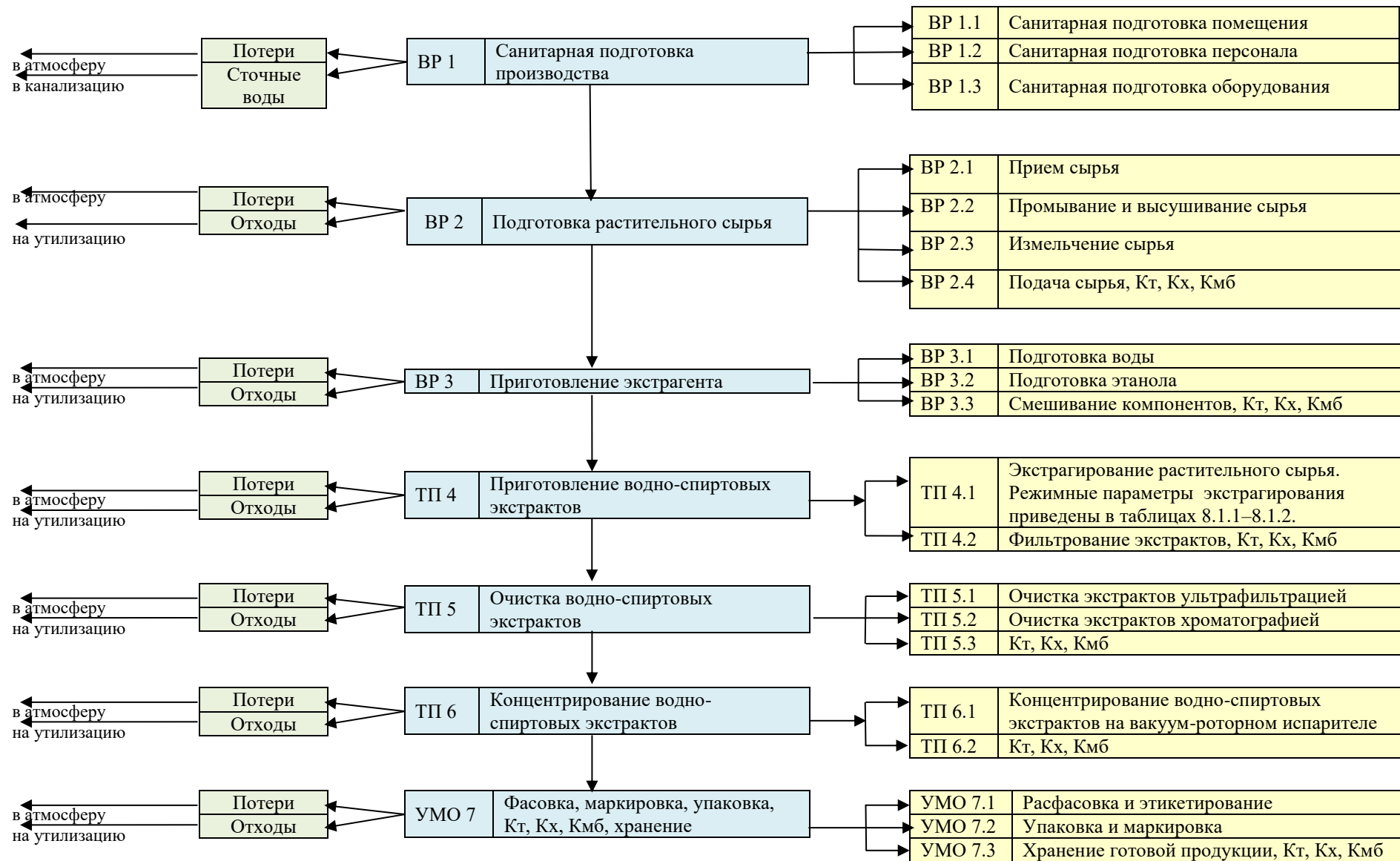


Рисунок 8.1.1 – Процессуальная схема производства густых экстрактов на основе природного растительного сырья



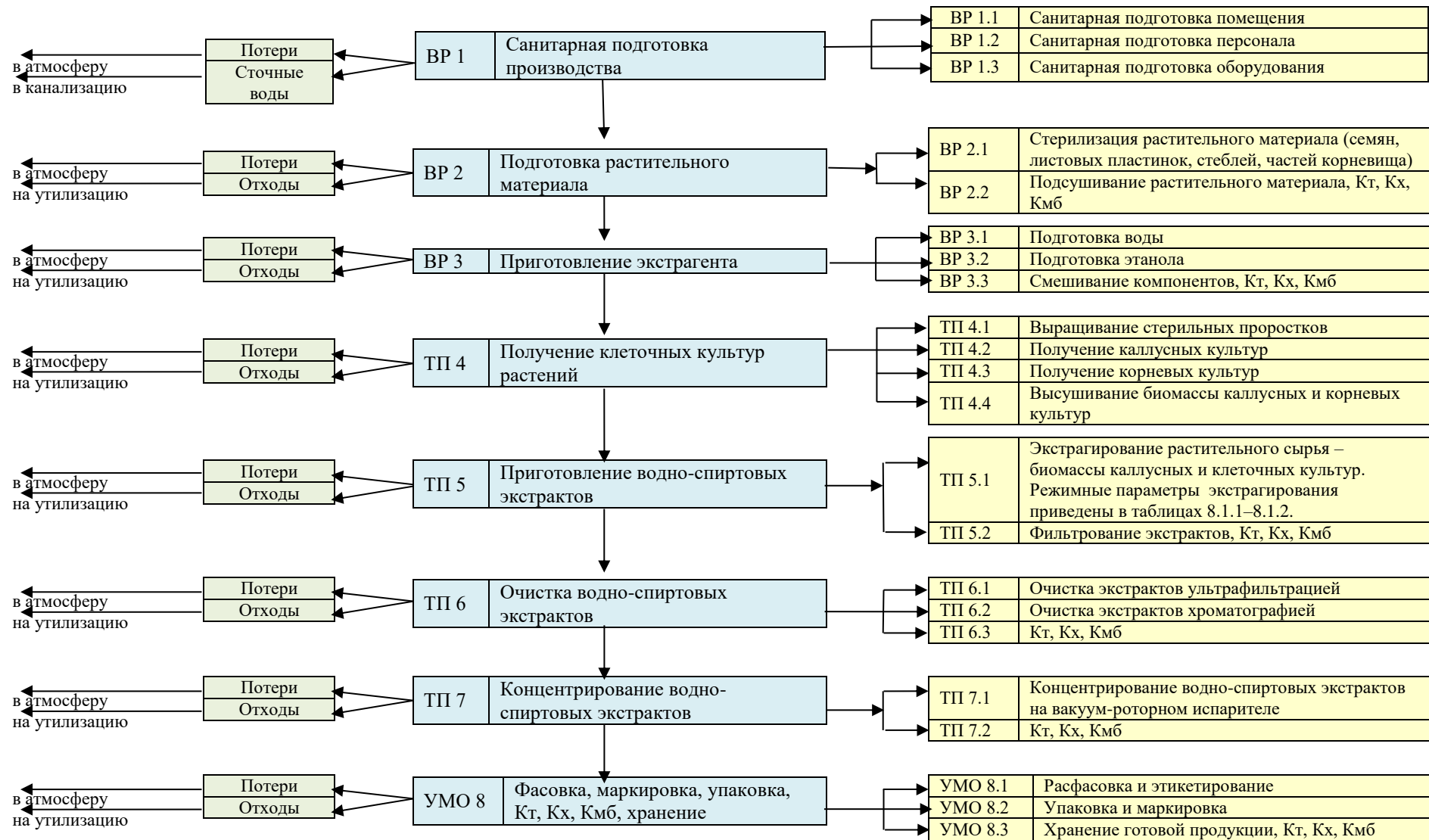


Рисунок 8.1.2 – Процессуальная схема производства густых экстрактов на основе клеточных культур растений

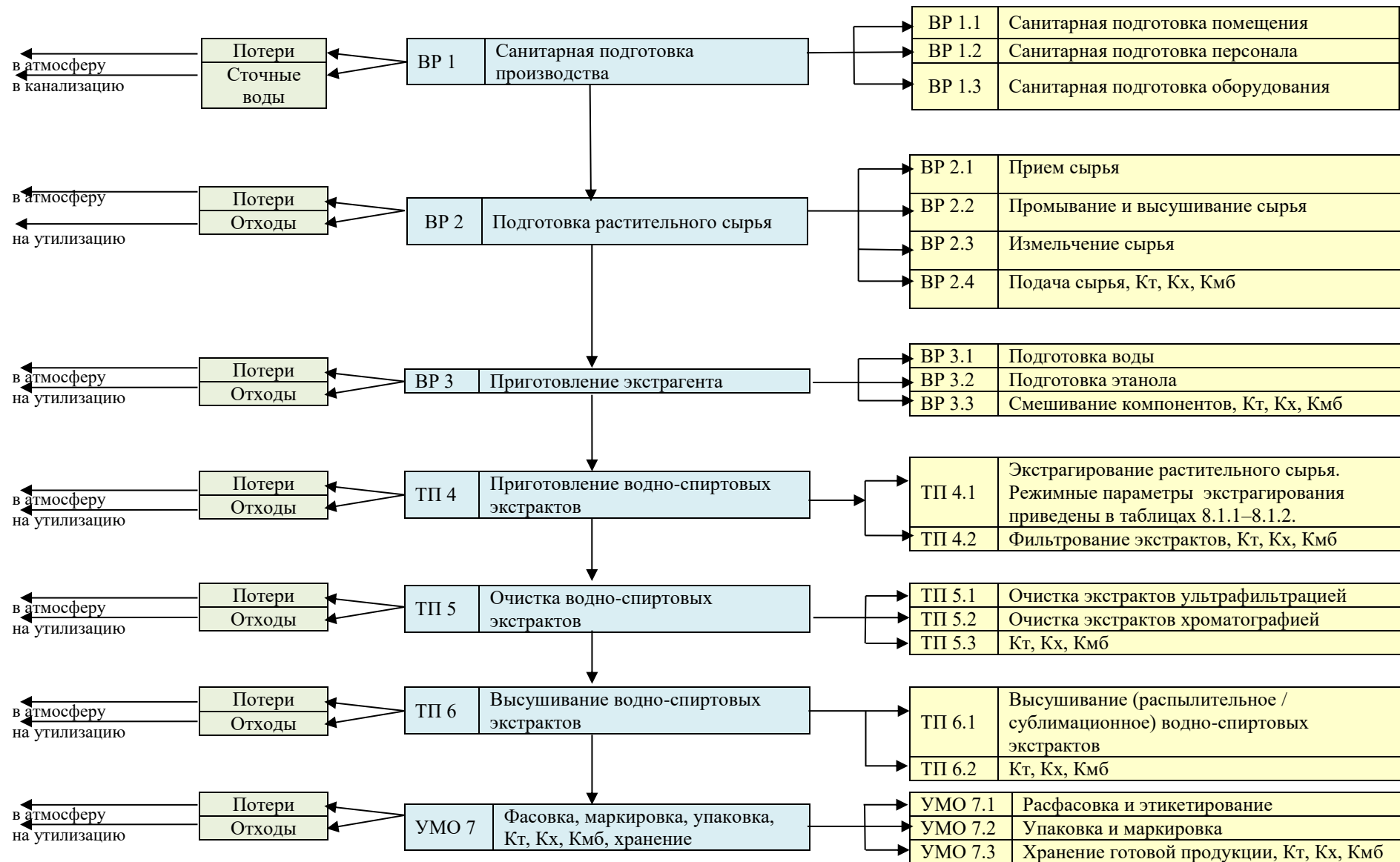


Рисунок 8.1.3 – Процессуальная схема производства сухих экстрактов на основе природного растительного сырья

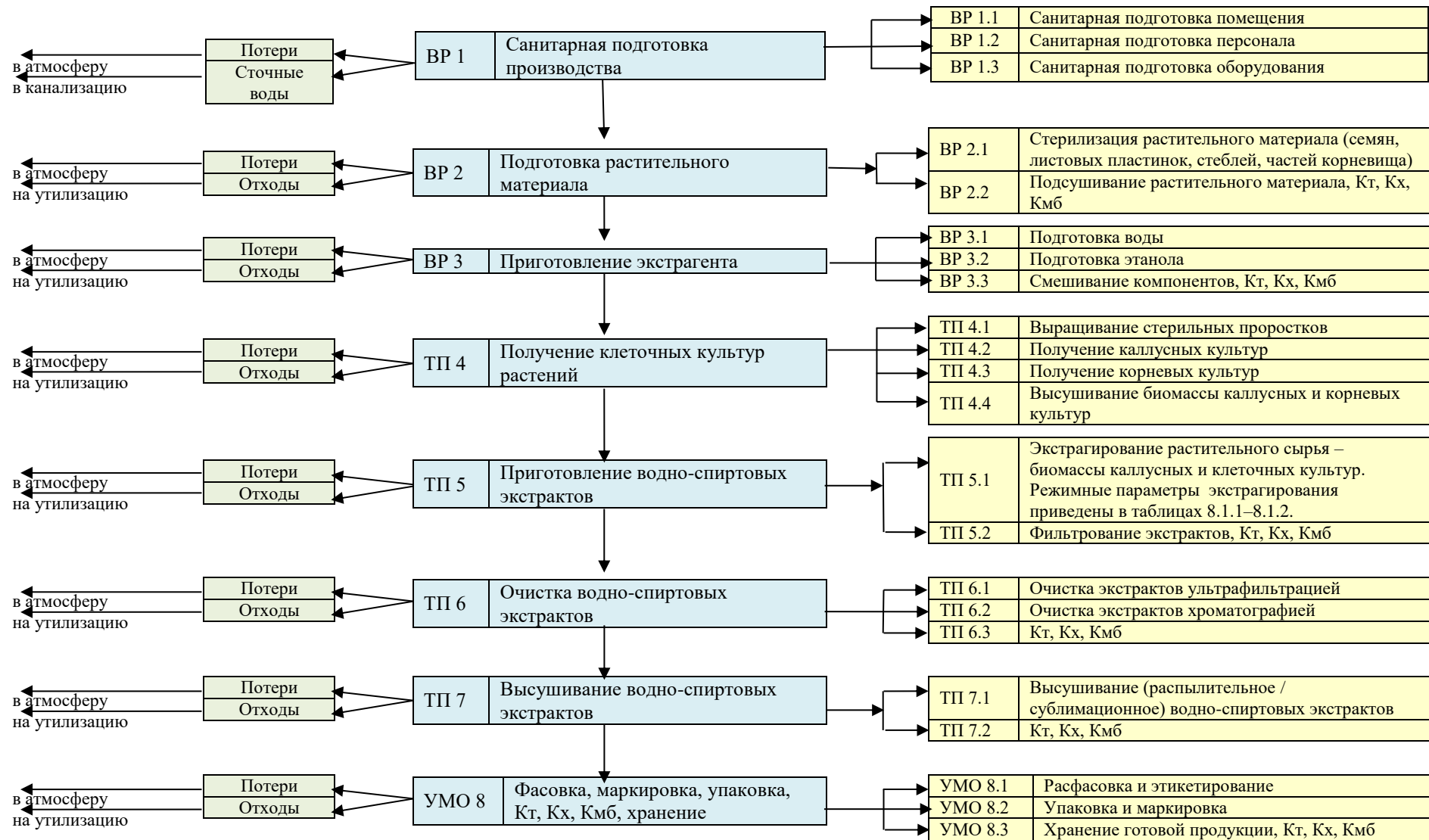


Рисунок 8.1.4 – Процессуальная схема производства сухих экстрактов на основе клеточных культур растений

При осуществлении технологического процесса производства растительных экстрактов соблюдение правил производственной и личной гигиены обслуживающего персонала должно обеспечить выпуск высококачественного готового продукта, охрану здоровья работающего персонала, безопасные условия труда, исключить микробное обсеменение экстрактов во время производства, хранения и транспортирования.

#### Подготовка производственных помещений

Производственное помещение должно отвечать требованиям ГОСТ Р 54762–2011/ISO/TS 22002-1:2009. Вход в производственное помещение лиц, не имеющих отношения к технологическому процессу, строго ограничен. Ограничено перемещение персонала без производственной необходимости. В производственных помещениях запрещается курение и прием пищи. Ежедневно после чистки оборудования и складирования остатков сырья полы и стены моют одним из дезинфицирующих растворов (перекись водорода, гипохлорит натрия, аламинол, Ника-дез, тридез, полисепт, хлорамин Б, хлормисепт и др.). Бутыли с дезинфицирующими растворами хранят в специально отведенном закрывающемся помещении. Дезинфицирующие растворы рекомендовано менять еженедельно во избежание появления устойчивых штаммов микроорганизмов. Уборочный материал и инвентарь хранят в специальном шкафу. Все емкости и инвентарь должны быть промаркированы несмываемой надписью «Стены», «Пол».

#### Подготовка оборудования

Перед началом работы мастер смены проверяет готовность оборудования к работе: отсутствие остатков сырья и полупродуктов, чистоты рабочих частей, исправность пускателей и наличие этикетки с указанием наименования, серии, даты выпуска, фамилии и инициалов оператора. По окончании работы оператор производит полную уборку согласно инструкции. Используемое в производстве оборудование, промежуточную тару и инвентарь необходимо периодически подвергать мойке, чистке, дезинфекции с использованием дезинфицирующих растворов.

### Подготовка персонала

В соответствии с ГОСТ Р 54762–2011/ISO/TS 22002-1:2009 персонал должен быть одет в спецодежду (халат, куртка, брюки или комбинезон, головной убор, полностью закрывающий волосы), необходим респиратор или маска, перчатки резиновые, обувь или бахилы. В гардеробе верхней одежды персонал снимает уличную одежду, обувь, надевает тапочки и переходит в гардероб технологической одежды. Личные вещи персонал размещает в индивидуальных шкафчиках. Технологическую одежду хранят в отдельных шкафах. Надев технологическую одежду, персонал обязан провести обработку рук. Не реже 1 раза в год проводится инструктаж по правилам личной гигиены и медицинское обследование персонала.

Следующая стадия технологического процесса – **подготовка растительного сырья (ВР 2)**. Она включает разные технологические операции в зависимости от используемого вида растительного сырья – подземных / надземных частей растений (рисунки 8.1.1, 8.1.3) или клеточных культур (рисунки 8.1.2, 8.1.4).

### Подготовка надземных / подземных частей растений, выращенных в природной среде

Данная технологическая операция включает 4 стадии: ВР 2.1 – прием сырья, ВР 2.2 – промывание и высушивание сырья, ВР 2.3 – измельчение сырья, ВР 2.4 – подача сырья, контроль технологический, химический, микробиологический.

Растительное сырье (стебель сапожниковии растопыренной, клубни пальчатокоренника пятнистого, корень женьшеня обыкновенного и диоскореи обыкновенной, корневище левзеи сафлоровидной и элеутерококка колючего) принимают партиями, руководствуясь требованиями ГОСТ Р 59425-2021. До первичной переработки органическое дикорастущее сырье не должно подвергаться воздействию прямых солнечных лучей. Сырье должно быть защищено от воздействия чрезмерной влажности и осадков, не должно соприкасаться с почвой. Поступающее на переработку сырье проверяют на

качество по степени засоренности, зрелости, повреждения. Некачественное сырье отбраковывают. Отобранное органическое сырье идентифицируют и хранят в специально отведенных местах. В случае отсутствия информации о применяемых на участках сбора веществах и загрязнении в органическом дикорастущем сырье определяют содержание пестицидов, тяжелых металлов и / или радионуклидов (в соответствии с ТР ТС 021/2011).

Промывание растительного сырья от посторонних примесей осуществляют путем многократной обработки проточной водой. Сырье сушат воздушным или другими физическими способами, включая использование нагревателей. При сушке сырье распределяют тонким слоем. Продукты сгорания топлива не должны загрязнять сырье. Помещение для сушки должно быть оборудовано принудительной приточно-вытяжной вентиляцией.

Измельчение высушенного растительного сырья осуществляется в измельчителях (траворезки, корнерезки) до размера частиц 0,5–1,0 мм. Просеивание не производят, для экстракции используют сырье с разным размером частиц, чтобы минимизировать потери биологически активных веществ.

Измельченное сырье направляется на контроль физико-химических (массовая доля воды, массовая доля золы, содержание вторичных метаболитов, содержание тяжелых металлов, пестицидов, удельная активность радионуклидов) и микробиологических (КМАФАнМ, БГКП, дрожжи, плесени) показателей качества и безопасности и оценку их соответствия требованиям ТР ТС 021/2011. Также проводится технологический контроль сырья (степень измельчения).

Подготовка растительного материала для получения клеточных культур растений: каллусов и культур адвентивных корней

Данная технологическая операция включает 2 стадии: ВР 2.1 – стерилизация растительного материала (семян, листовых пластинок, частей

корневища), ВР 2.2 – подсушивание растительного материала, контроль технологический, химический, микробиологический.

Перед стерилизацией растительный материал (семена левзеи сафлоровидной, пальчатокоренника пятнистого, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной, части корневища женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего) принимают партиями с соблюдением требований ГОСТ Р 59425-2021.

Для стерилизации (ВР 2.1) семян растений их ополаскивают детергентом, смешивают 3 %-ную перекись водорода и 96 %-ный этанол (1:1), проводят инкубацию семян в полученном стерилизующем растворе в 5 мл в течение 1–3 мин.

Стерилизацию частей корневища женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего проводят следующим образом: растительный материал промывают детергентом и помещают в 0,1 %-ный раствор сулемы на 1 мин. После стерилизации материал трехкратно отмывают в течение 20 мин в дистиллированной стерильной воде. Листовые пластинки и части корневища разрезают скальпелем на сегменты размером 5×5 мм и используют в качестве эксплантов для получения каллусных культур.

Подсушивание (ВР 2.2) стерильного растительного материала (семян, листовых пластинок, частей корневища) осуществляется в потоке стерильного воздуха на стерильной фильтровальной бумаге. Подготовленный для получения клеточных культур материал подвергают технологическому, химическому и микробиологическому контролю аналогично данной стадии при использовании надземных / подземных частей растений.

Следующая стадия **ВР 3 – подготовка экстрагента** включает подготовку воды (ВР 3.1), подготовку этилового спирта (ВР 3.2) и смешивание компонентов при предварительно рассчитанном соотношении (ВР 3.3). Для приготовления экстрагента используют воду очищенную, по физико-химическим и микробиологическим показателям удовлетворяющую

требованиям ГОСТ Р 51232-98, и этиловый спирт ректифицированный, удовлетворяющий требованиям ГОСТ Р 56389-2015. Расчетное количество этилового спирта (96 %) загружают в мерник-смеситель и затем добавляют расчетное количество очищенной воды из мерника, в результате разности плотностей происходит самопроизвольное перемешивание растворителей. Для более быстрого и равномерного смешения возможно использование мерника-смесителя с мешалками.

На процессуальных схемах, представленных на рисунках 8.1.2, 8.1.4, следующей технологической операцией является **ТП 4 – получение клеточных культур растений**, включающая стадии: ТП 4.1 – выращивание стерильных проростков, ТП 4.2 – получение каллусных культур (для женьшеня обыкновенного, пальчатокоренника пятнистого), ТП 4.3 – выращивание корневых культур растений (для левзеи сафлоровидной, элеутерококка колючего, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной), ТП 4.4 – высушивание биомассы каллусных и корневых культур.

Все каллусные культуры выращивают при следующих параметрах: световой режим – в темноте, температура 23 °С, продолжительность культивирования 28 суток.

Составы питательных сред отличаются для разных видов растительного материала. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры женьшеня обыкновенного (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 1,0 мг, пиридоксин – 1,0 мг, кальция пантотенат – 10 мг, кинетин – 0,05 мг, НУК – 0,1 мг, 2,4-Д – 0,5 мг. Состав питательной среды для выращивания каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, БАП – 0,3 мг, НУК – 2,0 мг.

Стадиям ТП 4.2 и ТП 4.3 предшествует стадия ТП 4.1 – получение стерильных проростков. Для получения стерильных проростков женьшеня



обыкновенного, пальчатокоренника пятнистого применяют составы питательных сред, аналогичные таковым для выращивания каллусных культур.

Состав среды для получения стерильных проростков левзеи сафлоровидной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, кинетин – 0,3 мг, 2,4-Д – 1,0 мг. Состав среды для получения стерильных проростков элеутерококка колючего (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, гидролизат казеина – 500 мг, инозит – 100 мг, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, кинетин – 1,0 мг, НУК – 2,0 мг.

Состав среды для получения стерильных проростков диоскореи обыкновенной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Мурасиге-Скугу, сахара – 30 г, тиамин – 0,1 мг, пиридоксин – 0,1 мг, никотиновая кислота – 0,5 мг, БАП – 1,0 мг, 2,4-Д – 2,0 мг. Состав питательной среды для получения стерильных проростков сапожниковии растопыренной (на 1 дм<sup>3</sup> среды): минеральная основа по Гамборгу, сахара – 30 г, инозит – 100 мг, тиамин – 1,0 мг, пиридоксин – 1,0 мг, кальция пантотенат – 10 мг, БАП – 0,05 мг, аденин – 1,0 мг, ИУК – 1,0 мг.

Параметры выращивания культур адвентивных корней левзеи сафлоровидной, элеутерококка колючего, диоскореи обыкновенной, сапожниковии растопыренной следующие: штамм для трансформации – *Agrobacterium rhizogenes* A4, классическая среда Гамборга, не содержащая гормоны, содержащая антибиотик цефотаксим, температура культивирования 23 °С в течение 5 недель при перемешивании (100 об/мин), в темноте.

Для трансформации используют проростки растений: листья 14–28 дневных проростков, а также корневище женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего. Бактерии *A. rhizogenes* A4 культивируют на агаризованной питательной среде YEB (5 г/л пептона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л сахарозы, 0,5 г/л хлористого магния) в течение 24 ч в

темноте, при 23 °С на качалке с круговым вращением (скорость вращения 90 об/мин). Для трансформации растительных эксплантов их протыкают стерильной иглой и помещают на питательную среду Гамборга В5, содержащую суспензию ( $OD_{600}=0,4$ ) агробактерии.

После 12–48 ч выдерживания в бактериальной суспензии экспланты промывают стерильной водой, удаляют с них влагу (насухо) стерильной фильтровальной бумагой и помещают на твёрдую среду В5, содержащую 500 мг/л цефотаксима. Через 30 суток культивирования оценивают частоту трансформации (количество трансформированных эксплантов к их общему количеству). Отбирают трансформированные экспланты, опираясь на фенотипические признаки (латеральное ветвление, отсутствие геотропизма, способность расти в среде без гормонов).

Далее осуществляют высушивание биомассы каллусных и корневых культур растений при температуре 55–60 °С в течение суток. Высушенную биомассу направляют на **стадию экстрагирования – ТП 5** (рисунки 8.1.1–8.1.4). Для получения водно-спиртовых экстрактов используют 40 %-ный этиловый спирт. Реализуют два возможных способа экстрагирования: микроволновое или циркуляционное. Режимные параметры экстракции приведены в таблицах 8.1.1–8.1.2.

Таблица 8.1.1 – Режимные параметры циркуляционного экстрагирования природного растительного сырья и клеточных культур растений (при температуре кипения растворителя)

Растительный объект	Гидромодуль	Продолжительность, ч
Корневище и культура адвентивных корней <i>R. Carthamoides</i>	1:10	4
Корень и каллусная культура <i>P. Ginseng</i>	1:10	4
Корневище и культура адвентивных корней <i>E. Senticosus</i>	1:20	2
Клубни и каллусная культура <i>D. Maculata</i>	1:10	4
Корень и культура адвентивных корней <i>D. Communis</i>	1:5	4
Стебель и культура адвентивных корней <i>S. Divaricata</i>	1:20	2

Таблица 8.1.2 – Режимные параметры микроволнового экстрагирования природного растительного сырья и клеточных культур растений

Растительный объект	Гидромодуль	Мощность излучения, Вт	Продолжительность, мин
Корневище и культура адвентивных корней <i>R. Carthamoides</i>	1:10	400	30
Корень и каллусная культура <i>P. Ginseng</i>	1:10	200	30
Корневище и культура адвентивных корней <i>E. Senticosus</i>	1:20	400	20
Клубни и каллусная культура <i>D. Maculata</i>	1:10	300	20
Корень и культура адвентивных корней <i>D. Communis</i>	1:5	500	40
Стебель и культура адвентивных корней <i>S. Divaricata</i>	1:20	300	20

По окончании экстрагирования экстракты подвергаются предварительной очистке – фильтрованию, и направляются на следующую стадию процесса – **очистку (ТП 6)**. Для отделения балластных веществ от комплекса БАВ вторичных метаболитов используют либо ультрафильтрационный способ (таблица 8.1.3), либо хроматографическую очистку (таблица 8.1.4). Максимальная степень очистки экстрактов достигается при использовании хроматографического метода.

Таблица 8.1.3 – Параметры ультрафильтрационной очистки растительных экстрактов

Экстракты	Давление, МПа	Диаметр пор мембран, кДа	Количество циклов очистки
<i>R. carthamoides</i>	0,5	10	3
<i>P. ginseng</i>	0,5	15	4
<i>E. senticosus</i>	0,5	10	3
<i>D. maculata</i>	0,5	5	3
<i>D. communis</i>	0,5	15	2
<i>S. divaricata</i>	0,5	15	3

Таблица 8.1.4 – Параметры хроматографической очистки растительных экстрактов

Экстракты	Неподвижная фаза (НФ), подвижная фаза (ПФ), детектор	Размер частиц стационарной фазы, мкм	Скорость элюции, мл/мин
<i>R. carthamoides</i>	НФ – модифицированный силикагель С <sub>18</sub> ; диаметр колонки 100 мм, длина колонки 150 мм; ПФ – ацетонитрил / вода с градиентом ацетонитрила от 1 % до 80 % за 60 мин;	3,5	5,0
<i>P. ginseng</i>	детектор – диодная матрица, длина волны детектирования 250 нм; сбор фракций – со 2 по 30 минуты	3,5	5,0
<i>E. senticosus</i>		2,5	10,0
<i>D. maculata</i>		2,5	5,0
<i>D. communis</i>		3,5	5,0
<i>S. divaricata</i>		2,5	10,0

Очищенные экстракты направляются на контроль физико-химических (сухой остаток, содержание растворителя, содержание вторичных метаболитов, содержание тяжелых металлов) и микробиологических (КМАФАнМ, БГКП, дрожжи, плесени) показателей качества и безопасности и оценку их соответствия требованиям ТР ТС 021/2011.

Следующей технологической операцией в процессуальной схеме производства густых экстрактов растений (рисунки 8.1.1, 8.1.2) является **концентрирование водно-спиртовых экстрактов (ТП 7)** до массовой доли влаги не более 25 %, осуществляемое путем выпаривания экстрагента на вакуум-роторном испарителе при следующих параметрах:

- для экстрактов *R. carthamoides* – температура 65,0–75,0 °С, продолжительность 1,5 ч;
- для экстрактов *P. ginseng* – температура 65,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *E. senticosus* – температура 65,0–75,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *D. maculata* – температура 65,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;
- для экстрактов *D. communis* – температура 65,0–75,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч;

- для экстрактов *S. divaricata* – температура 65,0 °С, продолжительность 1,5–2 ч.

В технологических схемах производства сухих экстрактов растений (рисунки 8.1.3, 8.1.4) за стадией очистки следует **ТП 7 – высушивание водно-спиртовых экстрактов** до массовой доли влаги не более 5 %. Высушивание экстрактов может реализовываться как в распылительном, так и в сублимационном вариантах. Соответствующие параметры высушивания представлены в таблицах 8.1.5–8.1.6.

Таблица 8.1.5 – Параметры распылительного высушивания экстрактов растений

Экстракты	Температура сушки, °С	Скорость подачи раствора, мл/мин	Скорость потока воздуха, м <sup>3</sup> /ч
<i>R. carthamoides</i>	70	8,0	25
<i>P. ginseng</i>	80	10,0	20
<i>E. senticosus</i>	60	8,0	25
<i>D. maculata</i>	70–80	10,0	25
<i>D. communis</i>	70	6,0	20
<i>S. divaricata</i>	70–80	8,0	30

Таблица 8.1.6 – Параметры сублимационного высушивания экстрактов растений

Экстракты	Температура, °С	Продолжительность, ч
<i>R. carthamoides</i>	минус 30	12
<i>P. ginseng</i>	минус 30	12
<i>E. senticosus</i>	минус 30	12
<i>D. maculata</i>	минус 20	12
<i>D. communis</i>	минус 20	8
<i>S. divaricata</i>	минус 30	12

Метод распылительного высушивания позволяет получить сухие экстракты растений с более высоким содержанием мелкодисперсных

фракций и меньшими значениями насыпной плотности и гигроскопичности по сравнению с методом сублимационного высушивания.

Заключительная стадия – **УМО 7 – фасовка, маркировка, упаковка**, включающая: УМО 7.1 – расфасовка и этикетирование, УМО 7.2 – упаковка и маркировка, УМО 7.3 – хранение готовой продукции.

Густые экстракты **расфасовывают** в бутылки емкостью 100, 500 и 1000 мл из темного стекла, которые укупоривают герметично. Сухие экстракты расфасовывают в герметично укупоренные стеклянные или полиэтиленовые банки по 100, 500 и 1000 г.

По химической стойкости, механическим и санитарно-гигиеническим показателям стеклянная и полимерная упаковка должна соответствовать требованиям ТР ТС 005/2011. Применяемые укупорочные средства по герметичности, химической стойкости, безопасному вскрытию, физико-механическим и санитарно-гигиеническим показателям также должны соответствовать требованиям ТР ТС 005/2011.

На каждую упаковочную единицу наклеивают **этикетку** на русском языке, согласно ТР ТС 022/2011 содержащую информацию:

- наименование экстракта;
- состав экстракта;
- количество экстракта (г, кг);
- дата изготовления экстракта;
- срок годности экстракта;
- условия хранения экстракта, установленные изготовителем;
- наименование и место нахождения изготовителя экстракта;
- рекомендации и (или) ограничения по использованию экстракта;
- показатели пищевой и биологической ценности экстракта;
- сведения о наличии в экстракте компонентов, полученных с применением генно-модифицированных организмов;
- сведения о документе, в соответствии с которым произведен экстракт;

- товарный знак изготовителя (при наличии);
- знаки систем добровольной сертификации.

**Условия хранения** густых и сухих экстрактов должны обеспечивать стабильность их состава и свойств в течение всего установленного срока годности в заявленном виде упаковки.

Густые экстракты хранят в затемненных помещениях при температуре окружающего воздуха 15–25 °С и влажности, не превышающей 75 %, не более 1 года.

Сухие экстракты хранят в затемненных помещениях при температуре окружающего воздуха 15–25 °С и влажности, не превышающей 75 %, не более 2 лет.

Организации, занимающиеся хранением густых и сухих растительных экстрактов, должны быть оснащены в зависимости от ассортимента:

- ✓ стеллажами, поддонами, шкафами для хранения экстрактов;
- ✓ холодильными камерами (шкафами) для хранения термолабильных экстрактов;
- ✓ средствами механизации для погрузочно-разгрузочных работ (при необходимости);
- ✓ приборами для регистрации параметров воздуха (термометры, психрометры, гигрометры).

Термометры, гигрометры или психрометры размещаются вдали от нагревательных приборов, на высоте 1,5–1,7 м от пола и на расстоянии не менее 3 м от двери. Показатели этих приборов ежедневно регистрируются в специальном журнале. Контролирующие приборы должны проходить метрологическую поверку в установленные сроки.

Каждое наименование и каждая партия (серия) экстрактов хранятся на отдельных поддонах.

На стеллажах, шкафах, полках прикрепляется стеллажная карта с указанием наименования экстракта, партии (серии), срока годности, количества единиц хранения.

В случае если при хранении, транспортировке экстрактов допущено нарушение, приведшее к утрате экстрактом соответствующего качества и приобретению им опасных свойств, они не подлежат хранению и реализации.

Для установления сроков хранения густых и сухих экстрактов осуществляли их хранение в течение 30 месяцев в затемненных помещениях с влажностью воздуха не более 75 % при разных температурах (4 °С, 15 °С, 25 °С) и контролировали массовую долю влаги и микробиологические показатели (КМАФАнМ, БГКП, *S. aureus*, плесени, дрожжи, *B. cereus*) каждые 3 месяца. Для эксперимента использовали экстракты всех исследуемых видов растений, полученные микроволновой экстракцией из их клеточных культур (Rc-a2, Pg-c2, Es-a2, Dm-c2, Dc-a2, Sd-a2). Полученные результаты представлены в таблице 8.1.7 и на рисунках 8.1.5–8.1.10.

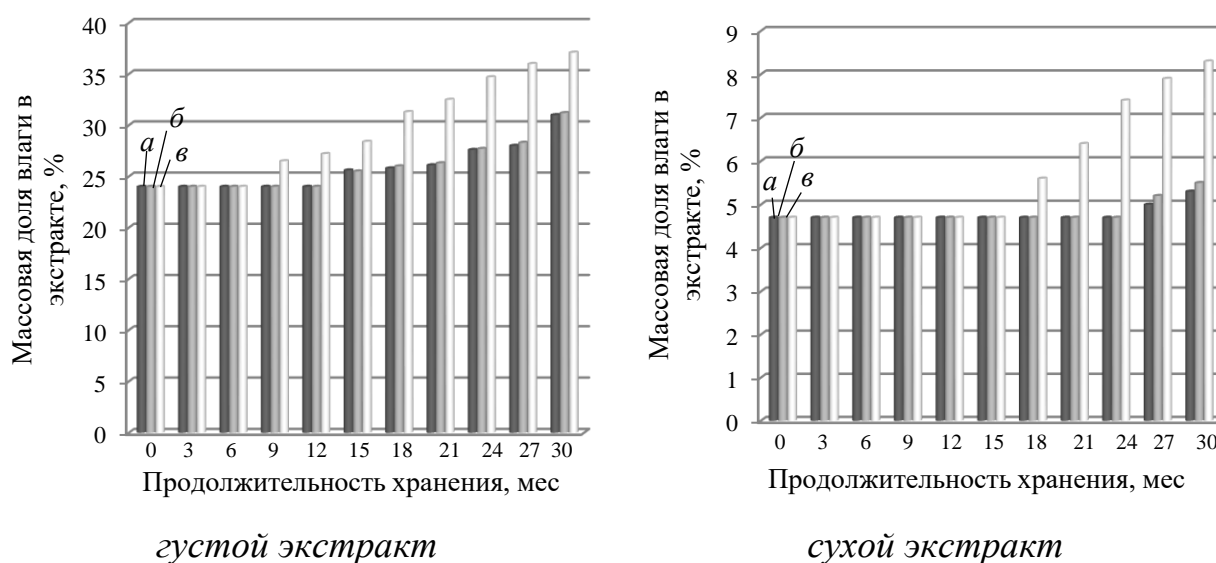


Рисунок 8.1.5 – Динамика массовой доли влаги в экстракте левзеи сафлоровидной Rc-a2 в процессе хранения при разных температурах:

а – 4 °С, б – 15 °С, в – 25 °С



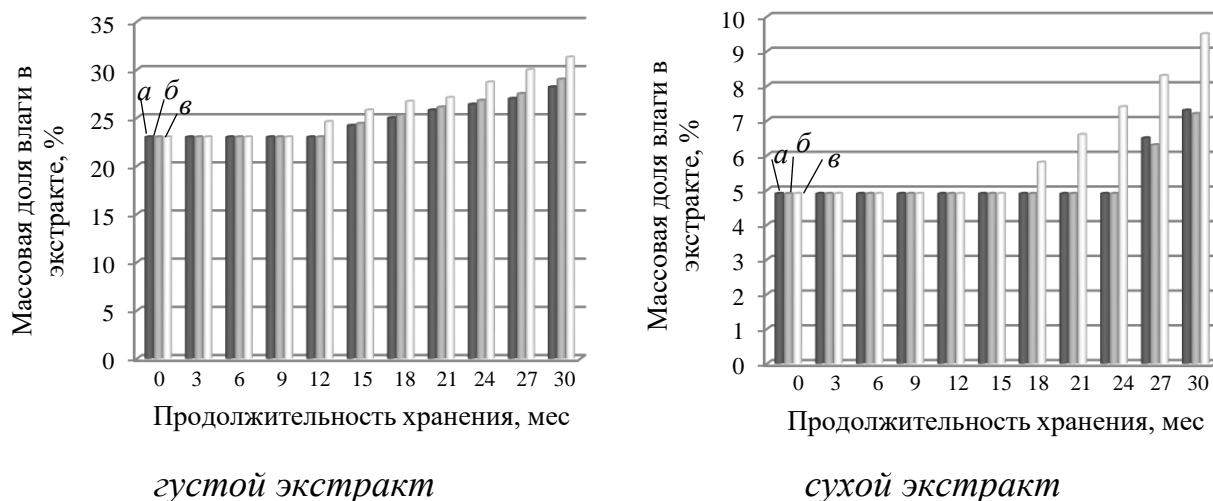


Рисунок 8.1.6 – Динамика массовой доли влаги в экстракте женьшеня обыкновенного Рg-с2 в процессе хранения при разных температурах:  
а – 4 °С, б – 15 °С, в – 25 °С

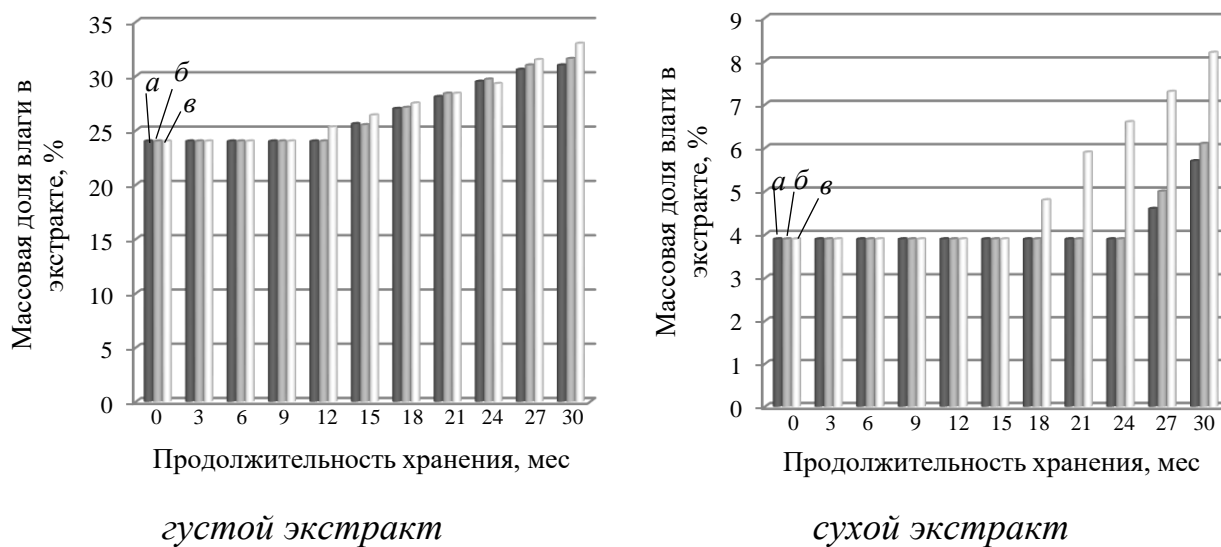


Рисунок 8.1.7 – Динамика массовой доли влаги в экстракте элеутерококка колючего Es-а2 в процессе хранения при разных температурах:  
а – 4 °С, б – 15 °С, в – 25 °С

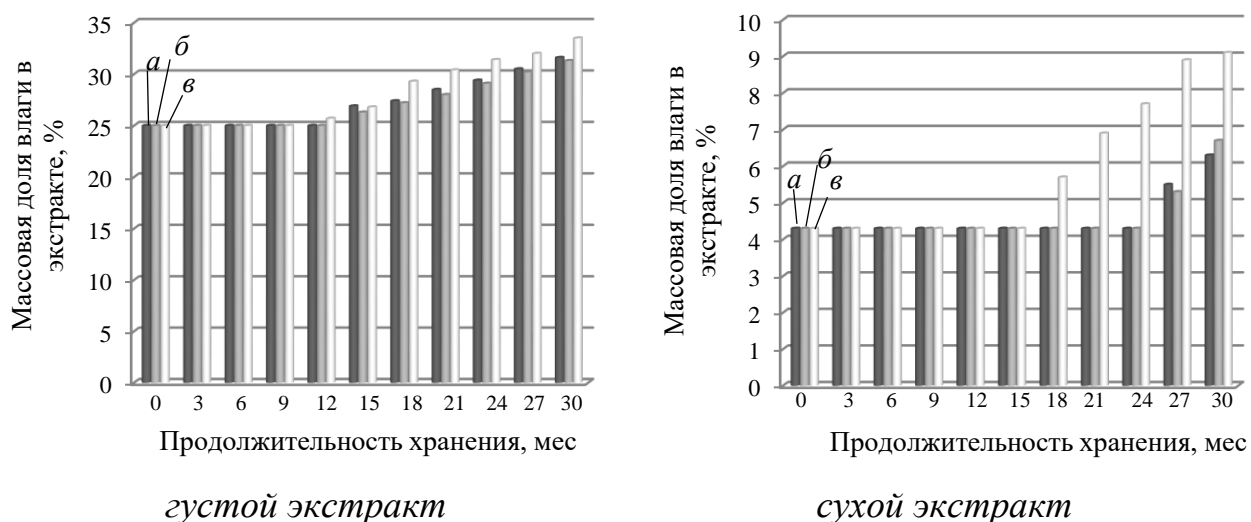


Рисунок 8.1.8 – Динамика массовой доли влаги в экстракте пальчатокоренника пятнистого Dm-c2 в процессе хранения при разных температурах: а – 4 °С, б – 15 °С, в – 25 °С

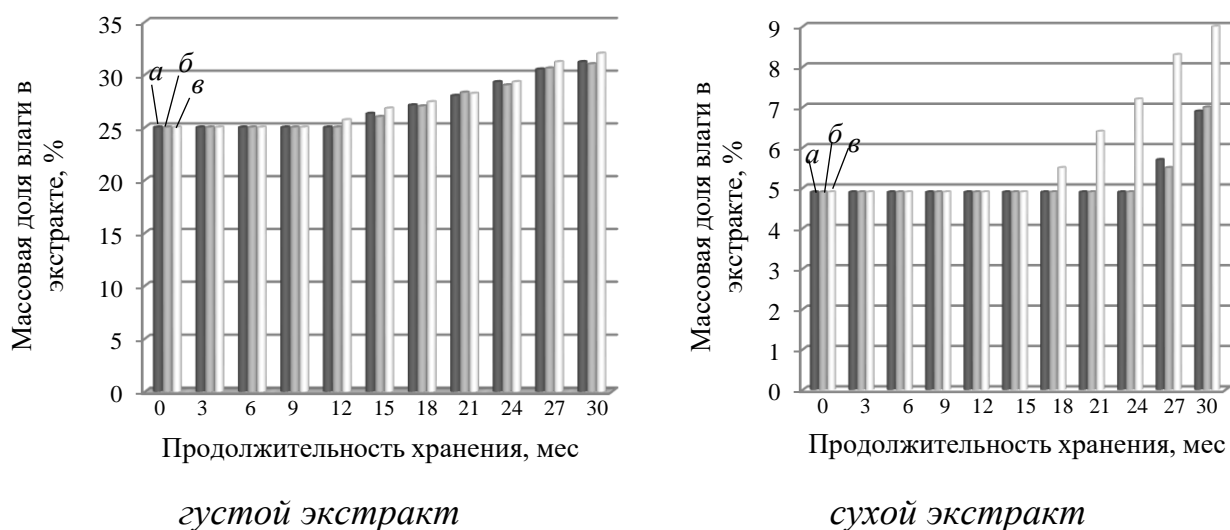


Рисунок 8.1.9 – Динамика массовой доли влаги в экстракте диоскореи обыкновенной Dc-a2 в процессе хранения при разных температурах: а – 4 °С, б – 15 °С, в – 25 °С

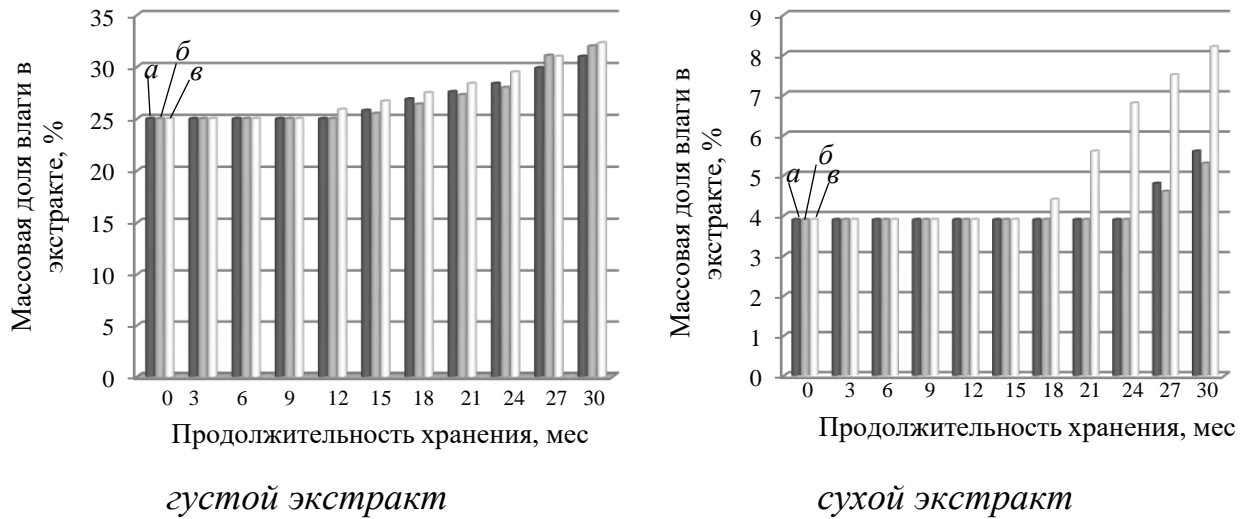


Рисунок 8.1.10 – Динамика массовой доли влаги в экстракте сапожниковии растопыренной Sd-a2 в процессе хранения при разных температурах:  
 а – 4 °С, б – 15 °С, в – 25 °С

Таблица 8.1.7 – Динамика микробиологических показателей густых и сухих экстрактов в процессе хранения (температура хранения 25 °С)

Продолжительность хранения, месяцы	Микробиологические показатели*					
	КМАФАнМ, КОЕ/г	БГКП, масса (г) продукта, в которой не обнаружены	<i>S. aureus</i> , масса (г) продукта, в которой не обнаружены	Дрожжи, КОЕ/г	Плесени, КОЕ/г	<i>B. cereus</i> , масса (г) продукта, в которой не обнаружены
1	2	3	4	5	6	7
Экстракт Rc-a2						
0	1,4·10 <sup>1</sup> /1,8·10 <sup>1</sup> **	0,1/0,1	1,0/1,0	0/0	0/0	200/200
3	5,8·10 <sup>1</sup> /4,4·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	2/3	2/2	200/200
6	2,2·10 <sup>2</sup> /1,5·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	5/3	4/2	200/200
9	5,6·10 <sup>2</sup> /4,7·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	16/13	12/10	200/200
12	7,7·10 <sup>3</sup> /8,3·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	22/17	25/22	200/200
15	1,8·10 <sup>4</sup> /9,3·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	110/33	108/38	200/200
18	3,3·10 <sup>4</sup> /2,7·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	117/55	116/67	200/200
21	7,0·10 <sup>4</sup> /4,7·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	124/67	132/75	200/200
24	8,2·10 <sup>4</sup> /6,1·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	135/85	140/87	200/200
27	1,5·10 <sup>5</sup> /2,6·10 <sup>4</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	142/111	154/109	200/200
30	3,5·10 <sup>5</sup> /6,2·10 <sup>4</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	155/134	164/122	200/200
Экстракт Pg-c2						
0	1,8·10 <sup>1</sup> /1,3·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	0/0	0/0	200/200
3	3,3·10 <sup>1</sup> /2,7·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	7/6	5/4	200/200
6	6,8·10 <sup>1</sup> /5,5·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	16/12	13/11	200/200
9	2,2·10 <sup>2</sup> /1,7·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	27/21	24/20	200/200
12	7,4·10 <sup>2</sup> /4,4·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	43/16	35/27	200/200
15	3,2·10 <sup>4</sup> /7,9·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	105/44	107/42	200/200
18	5,7·10 <sup>4</sup> /2,6·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	123/56	123/65	200/200
21	1,0·10 <sup>5</sup> /6,2·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	130/70	138/78	200/200
24	3,4·10 <sup>5</sup> /7,9·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	146/84	152/90	200/200
27	7,6·10 <sup>5</sup> /4,1·10 <sup>4</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	158/115	116/126	200/200
30	9,3·10 <sup>5</sup> /1,2·10 <sup>5</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	169/132	140/137	200/200
Экстракт Es-a2						
0	1,1·10 <sup>1</sup> /1,0·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	0/0	0/0	200/200
3	3,2·10 <sup>1</sup> /2,4·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	4/3	4/4	200/200
6	5,5·10 <sup>1</sup> /3,8·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	15/11	11/9	200/200
9	4,6·10 <sup>2</sup> /4,4·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	27/23	15/13	200/200
12	3,7·10 <sup>3</sup> /8,3·10 <sup>2</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	38/30	36/20	200/200
15	5,4·10 <sup>4</sup> /1,2·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	108/49	107/39	200/200
18	7,0·10 <sup>4</sup> /3,9·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	119/68	125/60	200/200
21	1,1·10 <sup>5</sup> /5,5·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	134/74	138/79	200/200
24	3,4·10 <sup>5</sup> /8,6·10 <sup>3</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	146/89	150/83	200/200
27	7,3·10 <sup>5</sup> /2,7·10 <sup>4</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	160/111	162/114	200/200
30	8,5·10 <sup>5</sup> /6,0·10 <sup>4</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	175/124	175/128	200/200
Экстракт Dm-c2						
0	1,3·10 <sup>1</sup> /0,7·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	0/0	0/0	200/200
3	3,4·10 <sup>1</sup> /2,2·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	10/8	7/4	200/200
6	7,3·10 <sup>1</sup> /4,5·10 <sup>1</sup>	0,1/0,1	1,0/1,0	25/17	15/10	200/200

Окончание таблицы 8.1.7

1	2	3	4	5	6	7
9	3,5·102/2,8·102	0,1/0,1	1,0/1,0	37/24	22/16	200/200
12	7,1·102/5,5·102	0,1/0,1	1,0/1,0	56/37	40/32	200/200
15	3,2·104/5,6·103	0,1/0,1	1,0/1,0	104/56	105/54	200/200
18	7,6·104/6,3·103	0,1/0,1	1,0/1,0	117/70	126/67	200/200
21	9,0·104/7,7·103	0,1/0,1	1,0/1,0	131/84	140/77	200/200
24	2,5·105/8,3·103	0,1/0,1	1,0/1,0	148/95	162/89	200/200
27	4,6·105/3,5·104	0,1/0,1	1,0/1,0	156/122	180/120	200/200
30	6,8·105/8,6·104	0,1/0,1	1,0/1,0	170/141	204/134	200/200
Экстракт Dc-a2						
0	2,2·101/1,4·101	0,1/0,1	1,0/1,0	0/0	0/0	200/200
3	5,0·101/3,8·101	0,1/0,1	1,0/1,0	12/9	8/5	200/200
6	3,3·102/1,4·102	0,1/0,1	1,0/1,0	31/23	17/13	200/200
9	8,0·102/4,7·102	0,1/0,1	1,0/1,0	55/43	29/20	200/200
12	6,0·103/8,8·102	0,1/0,1	1,0/1,0	78/65	40/33	200/200
15	2,0·104/1,9·103	0,1/0,1	1,0/1,0	111/73	107/55	200/200
18	4,6·104/3,3·103	0,1/0,1	1,0/1,0	124/86	124/72	200/200
21	9,4·104/5,2·103	0,1/0,1	1,0/1,0	140/94	135/80	200/200
24	2,3·105/7,9·103	0,1/0,1	1,0/1,0	167/98	153/94	200/200
27	5,7·105/1,5·104	0,1/0,1	1,0/1,0	179/104	167/111	200/200
30	7,0·105/3,6·104	0,1/0,1	1,0/1,0	186/126	180/134	200/200
Экстракт Sd-a2						
0	3,4·101/2,2·101	0,1/0,1	1,0/1,0	0/0	0/0	200/200
3	7,6·101/5,3·101	0,1/0,1	1,0/1,0	15/11	13/10	200/200
6	1,4·102/7,6·101	0,1/0,1	1,0/1,0	26/19	20/18	200/200
9	4,0·102/3,5·102	0,1/0,1	1,0/1,0	47/32	35/29	200/200
12	7,3·102/5,6·102	0,1/0,1	1,0/1,0	63/47	51/40	200/200
15	3,2·104/7,7·102	0,1/0,1	1,0/1,0	109/64	102/56	200/200
18	5,6·104/2,2·103	0,1/0,1	1,0/1,0	122/77	118/68	200/200
21	8,8·104/5,7·103	0,1/0,1	1,0/1,0	136/84	135/79	200/200
24	1,6·105/7,9·103	0,1/0,1	1,0/1,0	148/92	156/93	200/200
27	4,4·105/2,5·104	0,1/0,1	1,0/1,0	157/117	175/114	200/200
30	7,2·105/6,7·104	0,1/0,1	1,0/1,0	170/132	200/135	200/200

\* В соответствии с ТР ТС 021/2011 КМАФАНМ в густых и сухих экстрактах не должно превышать 1·104 КОЕ/г; БГКП не допускаются в 0,1 г густых и сухих экстрактов; *S. aureus* не допускаются в 1,0 г густых и сухих экстрактов; дрожжи не должны превышать 100 КОЕ/г в густых и сухих экстрактах; плесени не должны превышать 100 КОЕ/г в густых и сухих экстрактах; *B. cereus* не допускаются в 200 г густых и сухих экстрактов

\*\* числитель – густой экстракт, знаменатель – сухой экстракт

Анализ рисунков 8.1.5–8.1.10 и таблицы 8.1.7 показал, что густые экстракты целесообразно хранить при температуре до 25 °С не более года, сухие экстракты – не более двух лет. Понижение температуры хранения до 4 °С не оказывает существенного влияния на продолжительность хранения экстрактов.

## 8.2 Проектирование рецептур и разработка процессуальных схем производства напитков функциональной направленности на основе растительных экстрактов

Современные тенденции рационального питания диктуют необходимость использования наряду с традиционной пищей пищевых продуктов, напитков с заданными свойствами (функциональных, специализированных) и биологически активных добавок к пище (БАД). Особенно это актуально для населения, проживающего в неблагоприятных экологических условиях.

Экстракты, полученные в настоящей работе из природного растительного сырья и клеточных культур растений *R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. divaricate*, являются перспективными объектами для производства напитков функциональной направленности. На их основе спроектированы рецептуры и разработаны процессуальные схемы производства напитков с широким спектром биологического действия:

- на основе густых экстрактов – напиток на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами; тонизирующий чайный напиток (на основе черного, зеленого чая и фиточая); концентрат – основа морсов иммуномодулирующего действия;

- на основе сухих экстрактов – растворимый сухой безалкогольный напиток антиоксидантного действия; гранулированный ягодный кисель профилактической направленности.

Подбор и обоснование рецептурного состава напитков осуществлялись с учетом содержания в исходном сырье и компонентах биологически активных соединений.

Рецептуры разработанных напитков функционального действия представлены в таблицах 8.2.1–8.2.5, процессуальные схемы производства напитков – на рисунках 8.2.1–8.2.5.

Таблица 8.2.1 – Рецептура напитка на основе молочной сыворотки, обогащенного вторичными метаболитами

Наименование сырья	Нормы расхода сырья, кг/100 кг		
	напиток с калиной	напиток с брусникой	напиток с ежевикой
Сыворотка творожная	65,45	65,95	66,45
Пюре из калины	25,00	–	–
Пюре из брусники	–	25,00	–
Пюре из ежевики	–	–	25,00
Густой экстракт женьшеня обыкновенного	3,50	3,50	3,50
Густой экстракт пальчатокоренника пятнистого*	4,50	4,50	4,50
Эритрит	1,50	1,00	0,50
Лимонная кислота	0,05	0,05	0,05
Итого	100,00	100,00	100,00

\* густые экстракты женьшеня обыкновенного и пальчатокоренника пятнистого могут быть получены как из подземных органов растений (корня и клубней, соответственно), так и из их клеточных культур (каллусов) методом микроволновой экстракции

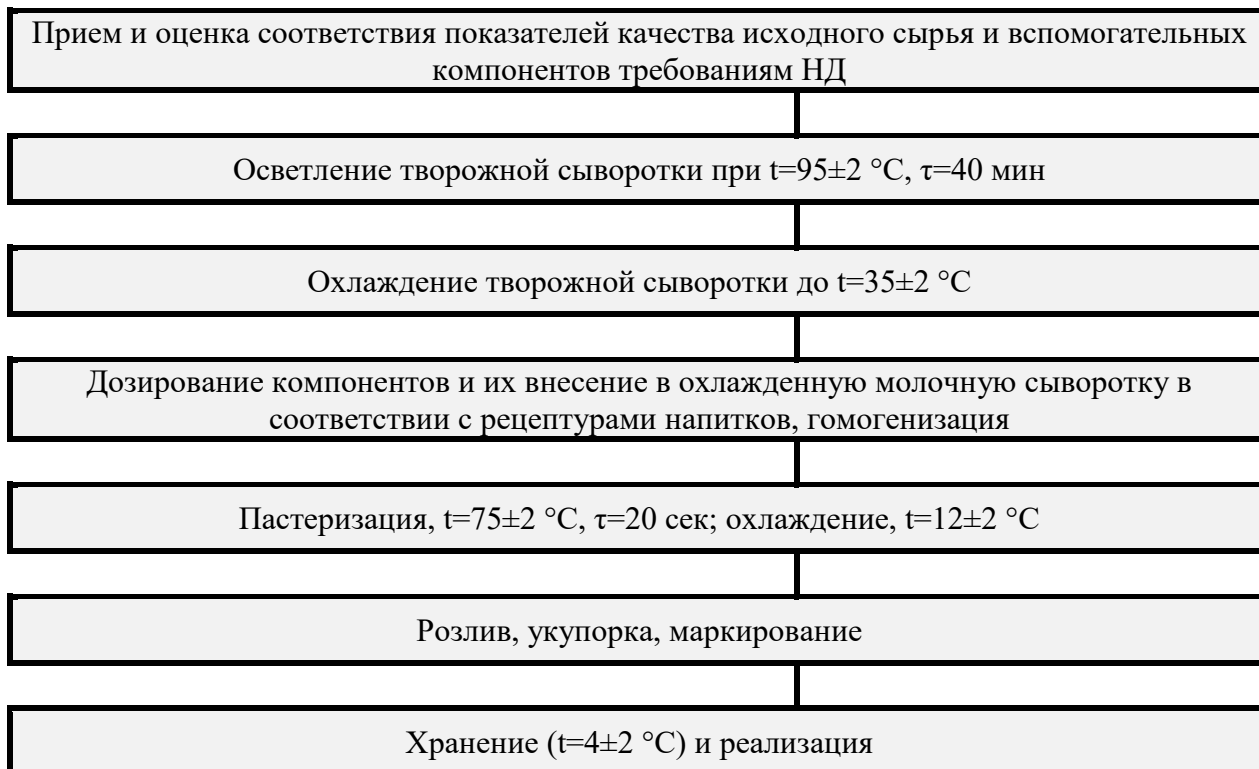


Рисунок 8.2.1 – Процессуальная схема производства напитка на основе молочной сыворотки, обогащенного вторичными метаболитами

В соответствии с процессуальной схемой, представленной на рисунке 8.2.1, принимают творожную сыворотку и другие компоненты напитка (пюре из ягод, эритрит, лимонная кислота, густые экстракты), проводят оценку их качества в соответствии с действующей нормативной документацией. Затем творожную сыворотку осветляют путем фильтрования, сепарирования и пастеризации при температуре  $95\pm 2$  °С с выдержкой 40 мин.

После осаждения белка сыворотку охлаждают до  $35\pm 2$  °С и сливают в резервуар для приготовления напитка, в который подают пюре из ягод (калины, брусники или ежевики в зависимости от рецептуры), густые экстракты пальчатокоренника пятнистого и женьшеня обыкновенного, эритрит и лимонную кислоту. Смесь гомогенизируют и пастеризуют при температуре  $75\pm 2$  °С с выдержкой 20 секунд, после чего охлаждают до  $12\pm 2$  °С. Осуществляют розлив в бутылки из полимерного материала объемом 250 мл, упаковывание, маркирование, после чего готовый продукт отправляют на хранение ( $t=4\pm 2$  °С) и реализацию.

Тонизирующий чайный напиток получают следующим образом. Принимают чайное сырье и другие компоненты напитка (густые экстракты, эритрит, аскорбиновая кислота, вода), проводят оценку их качества в соответствии с действующей нормативной документацией. Затем для получения чайного экстракта листья кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium*) / листья зеленого чая (*Camellia sinensis*) / смесь травы чабреца (*Thymus vulgaris*), листьев мяты перечной (*Mentha piperita*), листьев брусники (*Vaccinium vitis-idaea*) и цветов липы сердцевидной (*Tilia cordata*) (в зависимости от рецептуры) заливают водой, предварительно прошедшей стадию очистки, и подвергают мацерации в течение 20 мин при температуре  $95\pm 2$  °С для черного чая и фиточая и  $75\pm 2$  °С для зеленого чая. По окончании экстрагирования чайный экстракт охлаждают до  $20\pm 2$  °С, фильтруют и вносят компоненты чайного напитка в соответствии с рецептурами (таблица 8.2.2). Полученную смесь подвергают гомогенизации и пастеризации при температуре  $75\pm 2$  °С с выдержкой 20 сек, затем охлаждают до температуры



12±2 °С, после чего направляют на стадии розлива (в бутылки из полимерного материала объемом 250 мл), укупорки, маркирования, хранения (t=4±2 °С) и реализации.

Таблица 8.2.2 – Рецептúra тонизирующего чайного напитка

Наименование сырья	Нормы расходы сырья, кг/100 кг		
	на основе черного чая	на основе зеленого чая	на основе фиточая
Вода	90,95	88,45	90,65
Листья кипрея узколистного (РФ)	2,50	–	–
Листья зеленого чая / камелии китайской (Вьетнам)	–	5,00	–
Трава чабреца / тимьяна обыкновенного (РФ)	–	–	0,70
Листья мяты перечной (РФ)	–	–	0,70
Листья брусники (РФ)	–	–	0,70
Цветы липы (РФ)	–	–	0,70
Густой экстракт женьшеня обыкновенного	2,50	2,50	2,50
Густой экстракт элеутерококка колючего*	2,50	2,50	2,50
Эритрит	1,50	1,50	1,50
Аскорбиновая кислота	0,05	0,05	0,05
Итого	100,00	100,00	100,00

\* густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего могут быть получены как из подземных органов растений (корня и корневища, соответственно), так и из их клеточных культур (калусных и корневых, соответственно) методом микроволновой экстракции

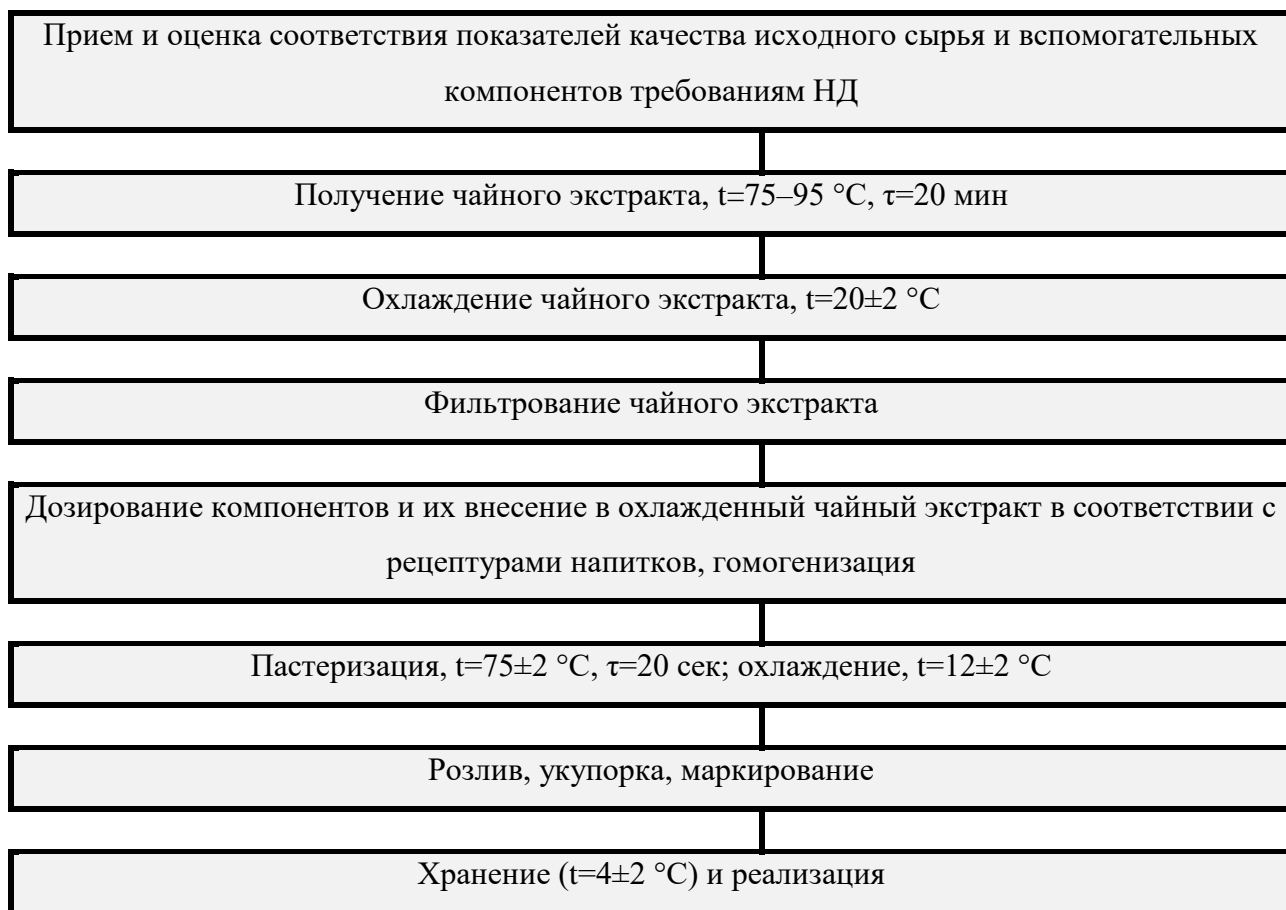


Рисунок 8.2.2 – Процессуальная схема производства  
тонизирующего чайного напитка

Процесс получения концентрата – основы морсов иммуномодулирующего действия, начинается с приема и оценки соответствия показателей качества исходного сырья и вспомогательных компонентов (вода, пюре из ягод, густой экстракт, лимонная кислота) требованиям нормативной документации.

Воду, предварительно подготовленную на стадии очистки, смешивают с пюре из облепихи / пюре из клюквы / пюре из черной смородины (в зависимости от рецептуры), добавляют густой экстракт левзеи сафлоровидной и лимонную кислоту, после чего полученную смесь гомогенизируют, пастеризуют при температуре  $75\pm 2$  °C с выдержкой 20 секунд и охлаждают до  $12\pm 2$  °C. Заключительная стадия процесса – розлив полученного концентрата в

бутыли из полимерного материала объемом 1, 3 или 5 л, укупорка, маркирование, хранение при температуре  $4\pm 2$  °С и реализация.

Таблица 8.2.3 – Рецептура концентрата – основы морсов иммуномодулирующего действия

Наименование сырья	Нормы расходы сырья, кг/100 кг		
	концентрат – основа облепихового морса	концентрат – основа клюквенного морса	концентрат – основа черносмородинового морса
Вода	37,90	37,90	37,90
Пюре из облепихи	50,00	–	–
Пюре из клюквы	–	50,00	–
Пюре из черной смородины	–	–	50,00
Густой экстракт левзеи сафлоровидной*	12,0	12,0	12,0
Лимонная кислота	0,10	0,10	0,10
Итого	100,0	100,0	100

\* густой экстракт левзеи сафлоровидной может быть получен как из корневища растения, так и из культуры его адвентивных корней методом микроволновой экстракции



Рисунок 8.2.3 – Процессуальная схема производства концентрата – основы морсов иммуномодулирующего действия

Таблица 8.2.4 – Рецептура растворимого сухого безалкогольного напитка антиоксидантного действия

Наименование сырья	Нормы расходы сырья, кг/100 кг		
	напиток на основе кофе	напиток на основе цикория	напиток на основе топинамбура
Кофе сублимированный	65,00	–	–
Порошок цикория	–	65,00	–
Порошок топинамбура	–	–	65,00
Сублимированные ягоды боярышника	–	20,50	–
Сублимированные ягоды вишни	–	–	25,00
Ядро кедрового ореха сушеное	22,50	–	–
Сухой экстракт диоскореи обыкновенной	5,00	8,00	4,50
Сухой экстракт сапожниковии растопыренной*	7,00	6,00	5,00
Лимонная кислота	0,50	0,50	0,50
Итого	100,00	100,00	100,00

\* сухие экстракты диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной могут быть получены как из подземных и надземных органов растений (корня и стебля, соответственно), так и из их корневых культур методом микроволновой экстракции

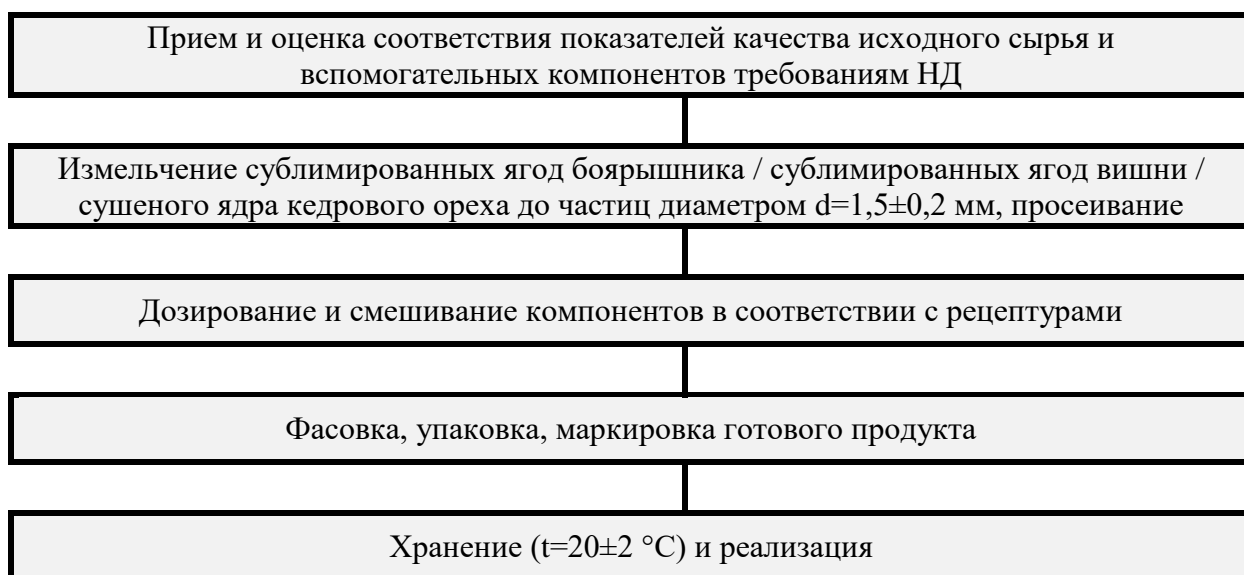


Рисунок 8.2.4 – Процессуальная схема производства растворимого сухого безалкогольного напитка антиоксидантного действия

Растворимый сухой безалкогольный напиток антиоксидантного действия получают следующим образом. Осуществляют прием исходного сырья и вспомогательных компонентов (кофе сублимированного, порошка цикория, порошка топинамбура, сублимированных ягод боярышника и вишни, сушеного ядра кедрового ореха, сухих экстрактов диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной, лимонной кислоты), проводят оценку соответствия их показателей качества требованиям нормативной документации.

Следующая стадия процесса – измельчение сублимированных ягод боярышника / сублимированных ягод вишни / сушеного ядра кедрового ореха до частиц диаметром  $d=1,5\pm 0,2$  мм. Данная технологическая операция производится в вибрационной шаровой мельнице. Далее осуществляют просеивание, дозирование и смешивание компонентов в соответствии с рецептурами, после чего полученные композиции направляют на стадии фасовки, упаковки (в фольгированные Zip пакеты, масса нетто одной упаковки 100 г), маркировки, хранения ( $t=20\pm 2$  °C) и реализации готового продукта.

В соответствии с рисунком 8.2.5, процесс производства гранулированного ягодного киселя профилактической направленности начинается с приема исходного сырья и вспомогательных компонентов (крахмал картофельный, сублимированные ягоды черники / земляники / красной смородины, сухой экстракт женьшеня обыкновенного, сухой экстракт левзеи сафлоровидной, эритрит, лимонная кислота) и оценки соответствия показателей их качества требованиям нормативной документации. Далее осуществляют измельчение сублимированных ягод черники / земляники / красной смородины в вибрационной шаровой мельнице до частиц диаметром  $d=1,0\pm 0,2$  мм с последующим просеиванием.

Таблица 8.2.5 – Рецептура гранулированного ягодного киселя профилактической направленности

Наименование сырья	Нормы расходы сырья, кг/100 кг		
	черничный	земляничный	красносмородиновый
Крахмал картофельный	35,00	35,00	35,00
Сублимированные ягоды черники	40,00	–	–
Сублимированные ягоды земляники	–	40,00	–
Сублимированные ягоды красной смородины	–	–	40,00
Сухой экстракт женьшеня обыкновенного	10,00	10,00	10,00
Сухой экстракт левзеи сафлоровидной *	9,75	9,75	9,75
Эритрит	4,75	4,75	4,75
Лимонная кислота	0,50	0,50	0,50
Итого	100,00	100,00	100,00

\* сухие экстракты женьшеня обыкновенного и левзеи сафлоровидной могут быть получены как из подземных органов растений (корней), так и из их каллусных культур методом микроволновой экстракции

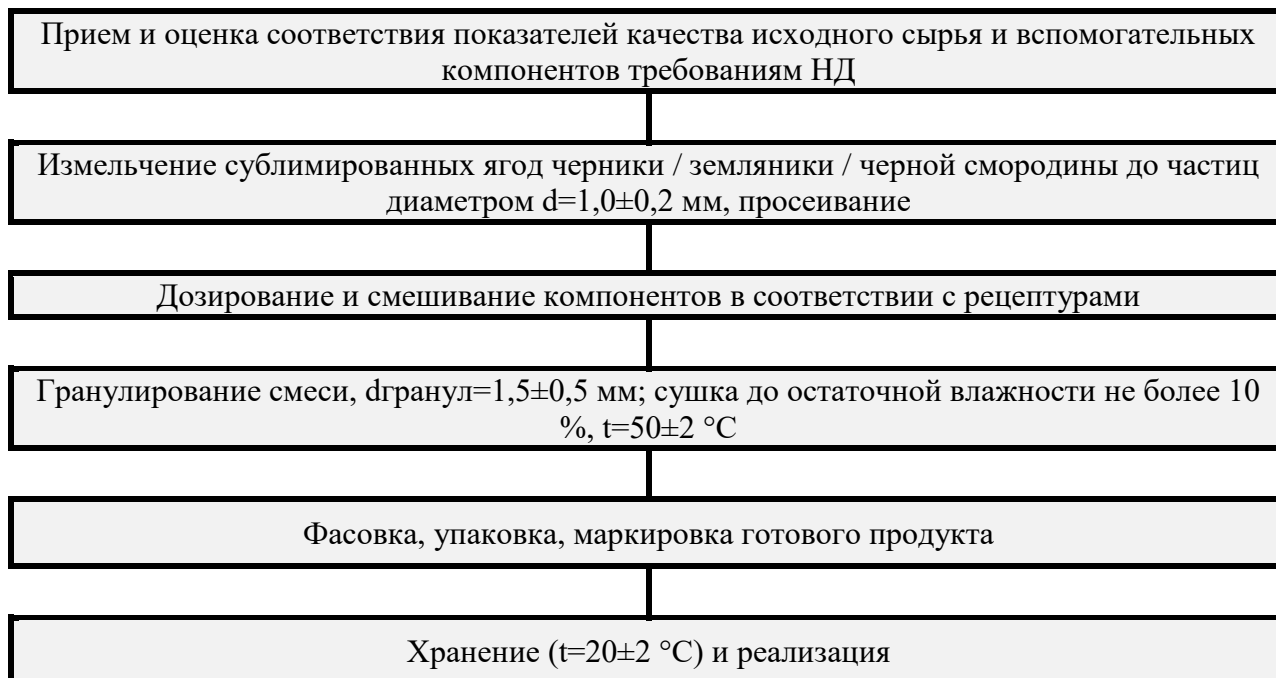


Рисунок 8.2.5 – Процессуальная схема производства гранулированного ягодного киселя профилактической направленности

Следующая стадия процесса – дозирование и смешивание компонентов киселя в соответствии с рецептурами. Смесь гранулируют в тарельчатом грануляторе и направляют на сушку при температуре  $50 \pm 2$  °С до остаточной влажности не более 10 %. Полученные гранулы размером от 1,0 мм до 2,0 мм направляют на стадии фасовки, упаковки (в фольгированные Zip пакеты, масса нетто одной упаковки 250 г), маркировки, хранения ( $t=20 \pm 2$  °С) и реализации готового продукта.

### 8.3 Оценка показателей качества и функциональных характеристик напитков на основе растительных экстрактов, разработка рекомендаций по их применению

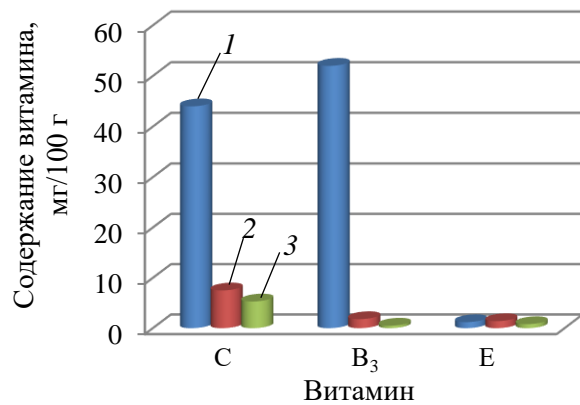
Для разработанных напитков, в рецептуры которых включены экстракты на основе надземных и подземных органов растений, а также их клеточных культур (калусных и корневых), изучили органолептические, физико-химические свойства и микронутриентный (витамины, минералы) состав. Полученные результаты представлены в таблицах 8.3.1–8.3.10 и на рисунках 8.3.1–8.3.5.

Таблица 8.3.1 – Органолептические показатели напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами

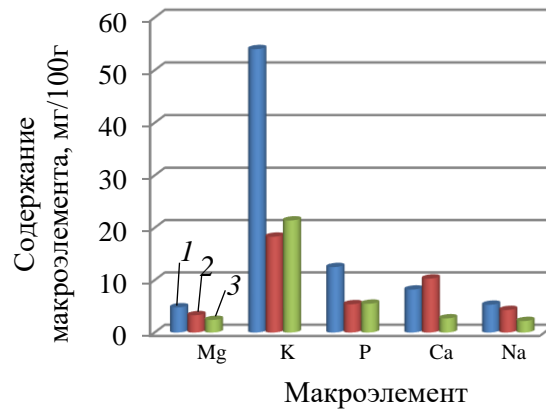
Наименование показателя	Значение показателя для напитков		
	с калиной	с брусникой	с ежевикой
Внешний вид и консистенция	Непрозрачная, однородная, в меру вязкая жидкость, с ощущаемыми растительными компонентами, в процессе хранения возможно выпадение осадка, обусловленного особенностями используемого сырья		
Цвет	Светло-красный, с молочным оттенком, равномерный по всей массе	Светло-розовый, с молочным оттенком, равномерный по всей массе	Светло-фиолетовый, с молочным оттенком, равномерный по всей массе
Запах и вкус	Ярко выраженный, сладко-кислый с привкусом молока и калины, освежающий	Ярко выраженный, сладко-кислый с привкусом молока и брусники, освежающий	Ярко выраженный, сладко-кислый с привкусом молока и ежевики, освежающий

Таблица 8.3.2 – Физико-химические показатели напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами

Наименование показателя	Значение показателя для напитков		
	с калиной	с брусникой	с ежевикой
Титруемая кислотность, °Т	77,0±3,9	74,0±3,7	73,0±3,7
Массовая доля сухих веществ, %	22,5±1,1	21,7±1,1	23,4±1,2
Массовая доля лактозы, %	4,25±0,21	4,31±0,22	4,18±0,21
Массовая доля белка, %	0,75±0,04	0,69±0,03	0,72±0,04
Содержание флавоноидов, мг/100 г	134,56±6,73	142,06±7,10	136,75±6,84



а



б

Рисунок 8.3.1 – Витаминный (а) и макроэлементный (б) состав напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами: 1 – напиток на основе калины, 2 – напиток на основе брусники, 3 – напиток на основе ежевики



Таблица 8.3.3 – Органолептические показатели тонизирующих чайных напитков

Наименование показателя	Значение показателя для напитков		
	напиток на основе черного чая	напиток на основе зеленого чая	напиток на основе фиточая
Внешний вид и консистенция	Прозрачная жидкость без осадка и опалесценции		
Цвет	Яркий, темно-коричневый, прозрачный	Яркий, золотисто-зеленый, прозрачный	Яркий, светло-коричневый с оттенком зеленого, прозрачный
Запах и вкус	Запах и вкус классического черного чая	Запах и вкус классического зеленого чая	Насыщенный запах и вкус с выраженным травным тоном и нотками мяты и липы

Таблица 8.3.4 – Физико-химические показатели тонизирующих чайных напитков

Наименование показателя	Значение показателя для напитков		
	напиток на основе черного чая	напиток на основе зеленого чая	напиток на основе фиточая
Массовая доля сухих веществ, %	17,3±0,9	18,5±0,9	19,2±1,0
Массовая доля водорастворимых экстрактивных веществ, %	36,1±1,8	45,7±2,3	46,4±2,3
Содержание дубильных веществ, мг/100 г	27,23±1,36	44,56±2,23	29,05±1,45
Содержание флавоноидов, мг/100 г	110,36±5,52	114,39±5,72	119,22±5,96
Содержание алкалоидов, мг/100 г	27,12±1,36	34,56±1,73	8,45±0,42

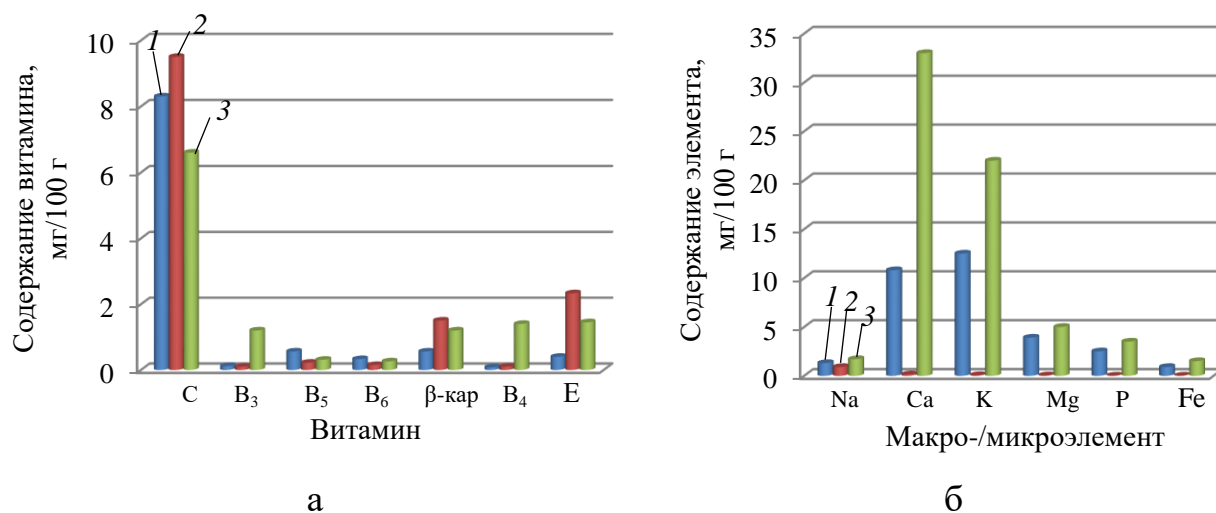


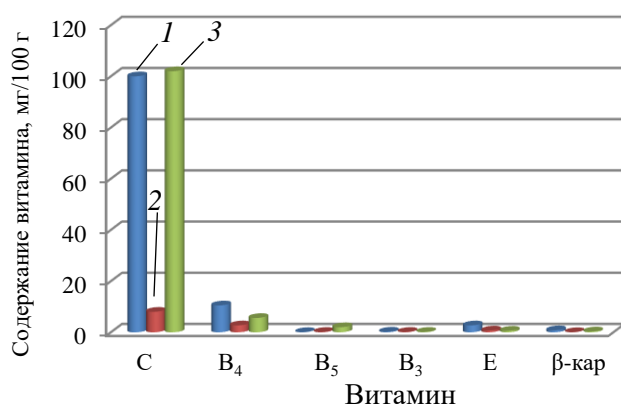
Рисунок 8.3.2 – Витаминный (а) и макро-/микроэлементный (б) состав тонизирующих чайных напитков: 1 – на основе черного чая, 2 – на основе зеленого чая, 3 – на основе фиточая

Таблица 8.3.5 – Органолептические показатели концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия

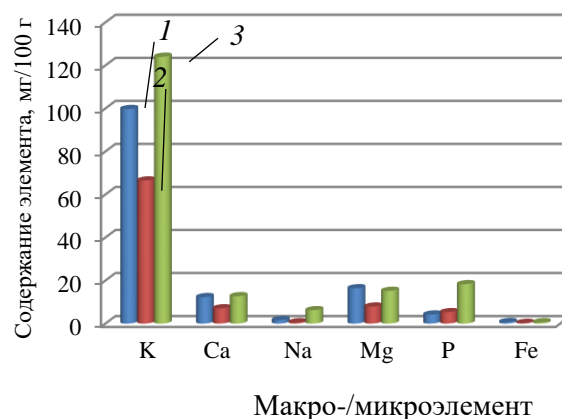
Наименование показателя	Значение показателя для концентратов		
	концентрат – основа облепихового морса	концентрат – основа клюквенного морса	концентрат – основа черносмородинного морса
Внешний вид и консистенция	Непрозрачная, однородная, в меру вязкая жидкость, с ощущаемыми растительными компонентами, без осадка		
Цвет	Ярко-оранжевый	Темно-красный	Красно-фиолетовый
Запах и вкус	Насыщенный, кисло-горький, свойственный свежей облепихе	Насыщенный, терпкий, с горчинкой, свойственный свежей клюкве	Насыщенный, кисло-сладкий вкус, свойственный свежей черной смородине

Таблица 8.3.6 – Физико-химические показатели концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия

Наименование показателя	Значение показателя для концентратов		
	концентрат – основа облепихового морса	концентрат – основа клюквенного морса	концентрат – основа черносмородинного морса
Массовая доля сухих веществ, %	40,0±2,0	41,3±2,1	39,6±2,0
Содержание дубильных веществ, мг/100 г	234,88±11,74	276,10±13,81	115,26±5,76
Содержание флавоноидов, мг/100 г	435,67±21,78	412,09±20,60	340,97±17,05
Содержание антоцианов, мг/100 г	55,12±2,76	76,33±3,82	32,44±1,62



а



б

Рисунок 8.3.3 – Витаминный (а) и макро-/микроэлементный (б) состав основ морсов иммуномодулирующего действия: 1 – облепихового морса, 2 – клюквенного морса, 3 – черносмородинного морса

Таблица 8.3.7 – Органолептические показатели растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия

Наименование показателя	Значение показателя для напитков		
	на основе кофе	на основе цикория	на основе топинамбура
Внешний вид сухого напитка	Мелкодисперсный порошок однородного состава, наличие комков не допускается		
Цвет сухого напитка	Коричневый, однородный по интенсивности	Коричневый, с вкраплениями красного, обусловленного измельченными ягодами боярышника	Светло-коричневый, с вкраплениями красного, обусловленного измельченными ягодами вишни
Аромат сухого напитка	Выразительный, свойственный кофе натурального происхождения, слегка горьковатый, без посторонних запахов	Выразительный, свойственный цикорию натурального происхождения, без посторонних запахов	Выразительный, свойственный топинамбуру натурального происхождения, без посторонних запахов
Аромат напитка после растворения в воде	Выраженный, свойственный кофе натурального происхождения, с легким ароматом кедрового ореха	Выраженный, свойственный цикорию натурального происхождения, с легким ароматом боярышника	Выраженный, свойственный топинамбуру натурального происхождения, с легким ароматом вишни
Вкус напитка после растворения в воде	Слегка сладковатый, с мягкой горчинкой и привкусом кедрового ореха	Слегка сладковатый, с мягкой горчинкой и привкусом боярышника	Слегка сладковатый, с мягкой горчинкой и привкусом вишни

Таблица 8.3.8 – Физико-химические показатели растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия

Наименование показателя	Значение показателя для напитков		
	напиток на основе кофе	напиток на основе цикория	напиток на основе топинамбура
Массовая доля влаги, %	5,6±0,3	5,3±0,3	4,8±0,3
Массовая доля экстрактивных веществ, %	31,5±1,6	29,8±1,5	32,7±1,6
Содержание вторичных метаболитов, мг/100 г	122,09±6,10	234,56±11,73	412,88±20,64
Содержание дубильных веществ, мг/100 г	12,34±0,62	51,70±2,59	42,05±2,10
Содержание алкалоидов, мг/100 г	5,41±0,27	0,33±0,02	0,25±0,01
Продолжительность растворения в горячей воде (96°C – 98°C), с	0,4±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1

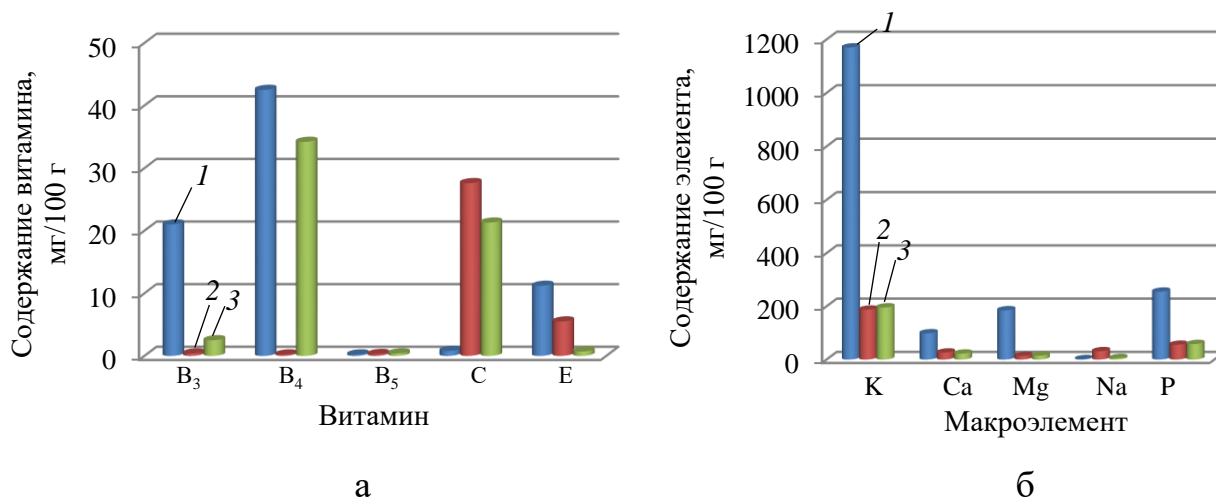


Рисунок 8.3.4 – Витаминный (а) и макроэлементный (б) состав растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия:

1 – на основе кофе, 2 – на основе цикория, 3 – на основе топинамбура

Таблица 8.3.9 – Органолептические показатели гранулированных ягодных киселей профилактической направленности

Наименование показателя	Значение показателя для киселей		
	черничный	земляничный	красносмородиновый
Внешний вид	Однородные по размеру гранулы диаметром не более 2 мм		
Цвет	Синий, однородный по интенсивности	Розовый, однородный по интенсивности	Красный, однородный по интенсивности
Запах и вкус	Выраженный, сладкий, свойственный свежей чернике	Выраженный, сладкий, свойственный свежей землянике	Выраженный, сладкий, свойственный свежей красной смородине

Таблица 8.3.10 – Физико-химические показатели гранулированных ягодных киселей профилактической направленности

Наименование показателя	Значение показателя для киселей		
	черничный	земляничный	красносмородиновый
Массовая доля влаги, %	6,7±0,3	6,5±0,3	6,2±0,3
Массовая доля титруемых кислот (в пересчете на лимонную кислоту), %	1,7±0,1	2,3±0,1	2,1±0,1
Содержание флавоноидов, мг/100 г	115,23±5,76	122,09±6,10	176,88±8,84
Содержание дубильных веществ, мг/100 г	82,67±4,13	105,54±5,28	44,07±2,20
Содержание антоцианов, мг/100 г	83,44±4,17	85,02±4,25	55,11±2,76
Продолжительность растворения в горячей воде (96 °С – 98 °С), с	0,5±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1

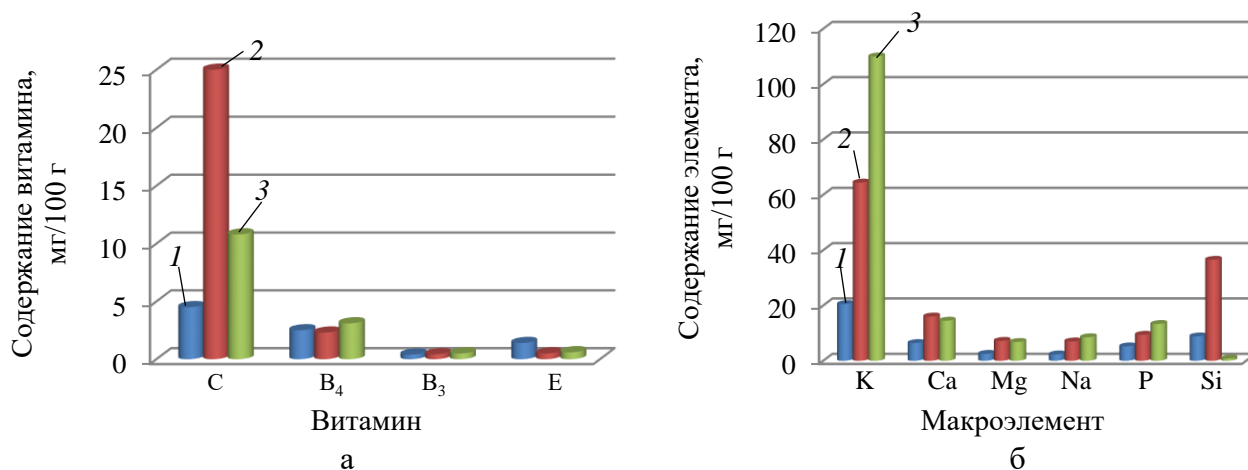


Рисунок 8.3.5 – Витаминный (а) и макроэлементный (б) состав гранулированных ягодных киселей профилактической направленности: 1 – черничный, 2 – земляничный, 3 – красносмородиновый

Анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы. Напитки на основе молочной сыворотки характеризуются высоким содержанием флавоноидов: от 134,56 мг/100 г (для напитка с калиной) до 142,06 мг/100 г (для напитка с брусникой). Таким образом, употребление в сутки 200 мл такого напитка позволит удовлетворить физиологическую потребность организма (250 мг/сутки согласно МР 2.3.1.0253-21) в данной группе полифенолов.

Основными представителями витаминов в напитках на основе молочной сыворотки являются витамины С, В<sub>3</sub> и Е. Лидером по содержанию витаминов С (44 мг/100 г) и В<sub>3</sub> (52 мг/100 г) является напиток, включающий в состав калину. По содержанию витамина Е напитки различаются незначительно (от 0,8 до 1,4 мг/100 г). Доминирующие макроэлементы напитков на основе молочной сыворотки – это калий, кальций, магний, натрий и фосфор. Максимальное содержание калия (54 мг/100 г) и фосфора (12,5 мг/100 г) отмечено в напитке, на основе калины. Лидер по содержанию кальция (10,3 мг/100 г) – напиток на основе брусники. Наименьшая концентрация среди макроэлементов во всех трех напитках зафиксирована для натрия (2,2–5,3 мг/100 г) и магния (2,4–4,8 мг/100 г).

Доминирующие биологически активные вещества чайных напитков – это флавоноиды (110,36–119,22 мг/100 г), дубильные вещества и алкалоиды. Употребление в сутки 200 мл тонизирующего чайного напитка позволит удовлетворить физиологическую потребность организма (250 мг/сутки согласно МР 2.3.1.0253-21) в БАВ, относящихся к группе флавоноидов.

Более высоким содержанием дубильных веществ (44,56 мг/100 г) отличается чайный напиток на основе зеленого чая, минимальным – напиток на основе черного чая (27,23 мг/100 г). Наименьшая концентрация алкалоидов (8,45 мг/100 г) зафиксирована в напитке на основе фиточая, наибольшая (34,56 мг/100 г) – в напитке на основе зеленого чая. В тонизирующих чайных напитках выявлено наиболее высокое содержание витаминов С, Е и  $\beta$ -каротина (предшественника витамина А), меньшее содержание – витаминов В<sub>3</sub>, В<sub>4</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>. Лидер по содержанию витаминов С, Е и  $\beta$ -каротина – напиток на основе зеленого чая (9,5; 2,3 и 1,5 мг/100 г, соответственно). Преобладающими макроэлементами чайных напитков являются кальций, калий, магний и фосфор, доминирующим микроэлементом – железо. По содержанию всех этих элементов лидирует тонизирующий чайный напиток на основе фиточая (33,0; 22,0; 5,0; 3,5 и 1,5 мг/100 г, соответственно).

Концентраты для приготовления морсов иммуномодулирующего действия демонстрируют высокое содержание таких групп биологически активных веществ, как флавоноиды (340,97–435,67 мг/100 г), дубильные вещества (115,26–276,10 мг/100 г) и антоцианы (32,44–76,33 мг/100 г). Среди витаминов отмечена высокая концентрация аскорбиновой кислоты, холина (витамин В<sub>4</sub>), токоферолов (витамин Е) и  $\beta$ -каротина, основными представителями макроэлементов являются калий, магний, кальций, фосфор, основной микроэлемент – железо. Лидер по содержанию витаминов С (102 мг/100 г), В<sub>5</sub> (2,1 мг/100 г), калия (124,1 мг/100 г), кальция (12,7 мг/100 г), магния (15,2 мг/100 г) и фосфора (18,3 мг/100 г) – черносмородиновый концентрат. Облепиховый концентрат для приготовления морсов отличается

высоким содержанием витаминов С (100 мг/100 г), В<sub>4</sub> (10,5 мг/100 г), Е (2,7 мг/100 г), β-каротина (0,78 мг/100 г), калия (99,7 мг/100 г) и магния (16,4 мг/100 г). Концентрация железа в облепиховом, клюквенном и черносмородиновом концентратах варьируется в диапазоне от 0,3 до 0,7 мг/100 г.

Для растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия отмечено преобладание таких БАВ, как полифенолы – от 122,09 мг/100 г в напитке на основе кофе до 412,88 мг/100 г в напитке на основе топинамбура. В напитке на основе кофе зафиксировано содержание алкалоидов на уровне 5,41 мг/100 г, тогда как в напитках на основе цикория и топинамбура концентрация данной группы БАВ не превышает 0,33 мг/100 г. Витаминный состав безалкогольных напитков представлен холином, аскорбиновой кислотой, ниацином (В<sub>3</sub>) и токоферолами. При этом лидером по содержанию холина (42,5 мг/100 г), ниацина (21,0 мг/100 г) и токоферолов (11,2 мг/100 г) является напиток с кофе. Максимальное содержание витамина С зафиксировано в напитке на основе цикория – 27,6 мг/100 г. Среди макроэлементов в составе безалкогольных напитков доминируют калий, магний, фосфор, кальций, натрий. Для напитка с кофе, установлено максимальное содержание калия (1170,0 мг/100 г), фосфора (255,0 мг/100 г), кальция (98,5 мг/100 г) и магния (185,0 мг/100 г) по сравнению с напитками на основе цикория и топинамбура. По содержанию натрия лидирует напиток на основе цикория – 31,4 мг/100 г.

Гранулированные ягодные кисели – источник флавоноидов (115,23–176,88 мг/100 г), дубильных веществ (44,07–105,54 мг/100 г) и антоцианов (55,11–85,02 мг/100 г) для организма. Преобладающие витамины в киселях – С, Е, В<sub>4</sub> и В<sub>3</sub>. Наибольшей концентрацией характеризуются:

- аскорбиновой кислоты – кисель на основе ягод земляники (25,0 мг/100 г);
- витамина Е – кисель на основе ягод черники (1,4 мг/100 г);
- витамина В<sub>4</sub> – кисель, содержащий ягоды красной смородины (3,1 мг/100 г).



Из группы макроэлементов в гранулированных киселях преобладают калий, кальций, магний, фосфор, кремний, натрий. По содержанию калия (110,0 мг/100 г), натрия (8,5 мг/100 г) и фосфора (13,3 мг/100 г) лидирует кисель на основе красной смородины. Наибольшее содержание кальция (16,0 мг/100 г), магния (7,2 мг/100 г) и кремния (36,5 мг/100 г) отмечено в киселях на основе земляники.

Установленный витаминный и макро-/микроэлементный состав разработанных напитков свидетельствует о высоком потенциале их использования в качестве функционального питания. Для подтверждения функциональных свойств напитков изучили их антиоксидантные свойства с использованием метода, основанного на способности целевых БАВ восстанавливать радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). Полученные результаты отражены в таблице 8.3.11.

Таблица 8.3.11 – Результаты определения антиоксидантной активности напитков, содержащих растительные экстракты

Наименование напитка	Антиоксидантная активность, мг АК/г	Наименование напитка	Антиоксидантная активность, мг АК/г
Напиток на основе молочной сыворотки с калиной	144,66±7,23	Концентрат – основа черносмородинового морса	186,12±8,31
Напиток на основе молочной сыворотки с брусникой	153,09±7,65	Растворимый сухой безалкогольный напиток (кофе)	118,10±5,91
Напиток на основе молочной сыворотки с ежевикой	137,90±6,90	Растворимый сухой безалкогольный напиток (цикорий)	123,54±6,18
Тонизирующий чайный напиток (черный чай)	115,58±5,78	Растворимый сухой безалкогольный напиток (топинамбур)	120,95±6,05
Тонизирующий чайный напиток (зеленый чай)	133,22±6,66	Гранулированный черничный кисель	151,28±7,56
Тонизирующий чайный напиток (фиточай)	167,05±8,35	Гранулированный земляничный кисель	155,08±7,75
Концентрат – основа облепихового морса	173,80±8,69	Гранулированный красносмородиновый кисель	161,22±8,06
Концентрат – основа клюквенного морса	157,01±7,85		

Согласно данным, представленным в таблице 8.3.11, все протестированные образцы напитков, содержащих экстракты природного растительного сырья и их клеточных культур (каллусных и корневых), демонстрируют высокую способность восстанавливать радикал DPPH. С учетом вышеизложенного, а также доказанных ранее антимикробных свойств экстрактов, входящих в состав напитков, предложены основные направления их применения в функциональном питании (рисунок 8.3.6). Следует отметить, что данные напитки могут употребляться как здоровыми людьми в профилактических целях, так и лицами, страдающими теми или иными заболеваниями, в период восстановительной терапии и реабилитации.



Рисунок 8.3.6 – Возможные направления применения разработанных напитков на основе растительных экстрактов в функциональном питании

Помимо профилактики нейродегенеративных патологий (болезни Альцгеймера, Паркинсона, Вильсона, эпилептические энцефалопатии), заболеваний сердечно-сосудистой системы (атеросклероз, гипертония, ишемическая болезнь сердца), онкологических заболеваний различной локализации, заболеваний ЖКТ (колиты, дисбактериозы, холецистит),

напитки на основе растительных экстрактов с высоким содержанием БАВ рекомендуется применять для повышения общего иммунного статуса организма.

#### 8.4 Оценка экономической эффективности и расчет себестоимости функциональных напитков

С целью расчета себестоимости разработанных функциональных напитков предварительно рассчитали стоимость сырья, необходимого для получения густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений (таблицы 8.4.1–8.4.2). Использовали стоимость сырья, реактивов и материалов на момент 15.01.2023 г.

Таблица 8.4.1 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 кг экстракта на основе надземных / подземных частей растений

Сырье	Норма расхода на 1 л питательной среды (0,1 кг экстракта), г	Норма расхода на 10 л питательной среды (1,0 кг экстракта), г	Стоимость единицы сырья, руб./г	Общая стоимость, руб.
Растительный материал (высушенные корни, корневища, клубни, стебли)	10,0	100,0	5,250	525,000
Этанол, 96 %	37,0	370,0	0,330	122,100
Модифицированный силикагель С <sub>18</sub>	10,0	100,0	6,060	606,000
Ацетонитрил	10,0	100,0	2,736	273,600
<b>ИТОГО:</b>				<b>1526,700</b>

Таблица 8.4.2 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 кг экстракта на основе клеточных культур растений (на примере каллусных культур, среда MS)

Сырье	Норма расхода на 1 л питательной среды (0,1 кг экстракта), г	Норма расхода на 10 л питательной среды (1,0 кг экстракта), г	Стоимость единицы сырья, руб./г	Общая стоимость, руб.
Сахароза	30,0	300,0	1,707	512,100
Инозит	0,1	1,0	9,897	9,897

Продолжение таблицы 8.4.2

Сырье	Норма расхода на 1 л питательной среды (0,1 кг экстракта), г	Норма расхода на 10 л питательной среды (1,0 кг экстракта), г	Стоимость единицы сырья, руб./г	Общая стоимость, руб.
Тиамин	0,0001	0,001	1350,0	1,350
Пиридоксин	0,0001	0,001	1,390	0,001
Никотиновая кислота	0,0005	0,005	35,200	0,176
Кинетин	0,0003	0,003	627,200	1,882
А-нафтилукусная кислота	0,002	0,02	154,800	3,096
2, 4-дихлор-феноксид-уксусная кислота	0,001	0,01	749,196	7,492
6-бензила-минопурин	0,003	0,03	220,000	6,600
Индолилуксусная кислота	0,001	0,01	37,000	0,370
Аденин	0,001	0,01	118,960	1,190
Нитрат аммония	1,65	16,5	0,189	3,118
Хлорид кальция	0,44	4,4	0,255	1,122
Сульфат магния	0,37	3,7	1,950	7,215
Гидроортофосфат калия	0,17	1,7	0,700	1,190
Нитрат калия	1,9	19,0	0,775	14,725
Борная кислота	0,0062	0,062	1,100	0,068
Хлорид кобальта	0,000025	0,00025	7,281	0,002
Сульфат меди (II)	0,000025	0,00025	1,750	0,0004
Сульфат марганца (II)	0,0223	0,223	0,270	0,060
Иодид калия	0,00083	0,0083	3,194	0,026
Молибдат натрия	0,00025	0,0025	14,550	0,036
Сульфат цинка	0,0086	0,086	0,278	0,023
Сульфат железа	0,0278	0,278	1,500	0,417
Na <sub>2</sub> -ЭДТА	0,0373	0,373	1,200	0,448
Агар	20,0	200,0	12,540	2508,000
Этанол, 96 %	37,0	370,0	0,330	122,100
Модифицированный силикагель С <sub>18</sub>	10,0	100,0	6,060	606,000
Ацетонитрил	10,0	100,0	2,736	273,600
<b>ИТОГО:</b>				<b>4082,304</b>

Структура себестоимости напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами, приведена в таблице 8.4.3, затраты на сырье и материалы для производства 1 т готовой продукции (на примере напитка с калиной) – в таблице 8.4.4.

Таблица 8.4.3 – Структура себестоимости напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами (на 1 т напитка)

Статьи затрат	Удельный вес, %	Производственная себестоимость, %
Сырье и материалы	33,5	254626,0 / 458834,0*
Энергия на технологические цели	16,4	124652,7 / 224623,2
Заработная плата и отчисления на социальное страхование	20,1	152775,6 / 275300,4
Расходы на подготовку и освоение производства	3,5	26602,7 / 47937,9
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	8,0	60806,2 / 109572,3
Цеховые расходы	5,5	41804,3 / 75330,9
Общепроизводственные расходы	9,5	72207,4 / 130117,1
Прочие производственные расходы	1,5	11401,2 / 20544,8
Накладные расходы	2,0	15201,5 / 27393,1
<b>ИТОГО:</b>	<b>100,0</b>	<b>760077,6 / 1369653,7</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Структура себестоимости тонизирующих чайных напитков приведена в таблице 8.4.5, затраты на сырье и материалы для производства 1 т готовой продукции (на примере напитка на основе зеленого чая) – в таблице 8.4.6.

Структура себестоимости концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия приведена в таблице 8.4.7, затраты на сырье и материалы для производства 1 т готовой продукции (на примере концентрата на основе клюквы) – в таблице 8.4.8.

Таблица 8.4.4 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 т напитка на основе молочной сыворотки, обогащенного вторичными метаболитами (на примере напитка с калиной)

Наименование сырья и материалов	Цена за 1 кг, руб.	Нормы расхода на 1 т напитка, кг	Общая стоимость, руб.
Сыворотка творожная	58,0	654,5	37961,0
Пюре из калины	350,0	250,0	87500,0
Густые экстракты женьшеня обыкновенного и пальчатокоренника пятнистого	1526,7 / 4082,3*	80,0	122376,0 / 326584,0
Эритрит	440,0	15,0	6600,0
Лимонная кислота	378,0	0,5	189,0
<b>ИТОГО:</b>			<b>254626,0 / 458834,0</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Таблица 8.4.5 – Структура себестоимости тонизирующих чайных напитков (на 1 т напитка)

Статьи затрат	Удельный вес, %	Производственная себестоимость, %
Сырье и материалы	33,5	109998,0 / 237778,0
Энергия на технологические цели	16,4	53849,8 / 116404,8
Заработная плата и отчисления на социальное страхование	20,1	65998,8 / 142666,8
Расходы на подготовку и освоение производства	3,5	11492,3 / 24842,5
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	8,0	26268,2 / 56782,8
Цеховые расходы	5,5	18059,4 / 39038,2
Общепроизводственные расходы	9,5	31193,5 / 67429,6
Прочие производственные расходы	1,5	4925,3 / 10646,8
Накладные расходы	2,0	6567,0 / 14195,7
<b>ИТОГО:</b>	<b>100,0</b>	<b>328352,2 / 709785,1</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Таблица 8.4.6 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 т тонизирующего чайного напитка (на примере напитка на основе зеленого чая)

Наименование сырья и материалов	Цена за 1 кг, руб.	Нормы расхода на 1 т напитка, кг	Общая стоимость, руб.
Вода питьевая	12,5	884,5	11056,3
Листья зеленого чая/камелии китайской	315,0	50,0	15750,0
Густые экстракты жень-шеня обыкновенного и элеутерококка колючего	1526,7 / 4082,3*	50,0	76335,0 / 204115,0
Эритрит	440,0	15,0	6600,0
Аскорбиновая кислота	513,3	0,5	256,7
<b>ИТОГО:</b>			<b>109998,0 / 237778,0</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Таблица 8.4.7 – Структура себестоимости концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия (на 1 т продукта)

Статьи затрат	Удельный вес, %	Производственная себестоимость, %
Сырье и материалы	33,5	348319,5 / 654991,5
Энергия на технологические цели	16,4	170520,6 / 320652,5
Заработная плата и отчисления на социальное страхование	20,1	208991,7 / 392994,9
Расходы на подготовку и освоение производства	3,5	36391,6 / 68431,9
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	8,0	83180,8 / 156415,9
Цеховые расходы	5,5	57186,8 / 107535,9
Общепроизводственные расходы	9,5	98777,2 / 185743,9
Прочие производственные расходы	1,5	15596,4 / 29328,0
Накладные расходы	2,0	20795,2 / 39104,0
<b>ИТОГО:</b>	<b>100,0</b>	<b>1039759,7 / 1955198,5</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений



Таблица 8.4.8 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 т концентрата – основы морсов иммуномодулирующего действия (на примере концентрата на основе клюквы)

Наименование сырья и материалов	Цена за 1 кг, руб.	Нормы расхода на 1 т напитка, кг	Общая стоимость, руб.
Вода питьевая	12,5	379,0	4737,5
Пюре из клюквы	320,0	500,0	160000,0
Густой экстракт левзеи сафлоровидной	1526,7 / 4082,3*	120,0	183204,0 / 489876,0
Лимонная кислота	378,0	1,0	378,0
<b>ИТОГО:</b>			<b>348319,5 / 654991,5</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Структура себестоимости растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия приведена в таблице 8.4.9, затраты на сырье и материалы для производства 1 т готовой продукции (на примере сухого напитка на основе цикория) – в таблице 8.4.10.

Таблица 8.4.9 – Структура себестоимости растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия (на 1 т продукта)

Статьи затрат	Удельный вес, %	Производственная себестоимость, %
Сырье и материалы	33,5	433828,0 / 791612,0
Энергия на технологические цели	16,4	212381,5 / 387535,4
Заработная плата и отчисления на социальное страхование	20,1	260296,8 / 474967,2
Расходы на подготовку и освоение производства	3,5	45325,3 / 82705,7
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	8,0	103600,7 / 189041,7
Цеховые расходы	5,5	71225,5 / 129966,2
Общепроизводственные расходы	9,5	123025,9 / 224487,0
Прочие производственные расходы	1,5	19425,1 / 35445,3
Накладные расходы	2,0	25900,2 / 47260,4
<b>ИТОГО:</b>	<b>100,0</b>	<b>1295009,0 / 2363020,9</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Таблица 8.4.10 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 т растворимого сухого безалкогольного напитка антиоксидантного действия (на примере напитка на основе цикория)

Наименование сырья и материалов	Цена за 1 кг, руб.	Нормы расхода на 1 т напитка, кг	Общая стоимость, руб.
Порошок цикория	260,0	650,0	169000,0
Сублимированные ягоды боярышника	240,0	205,0	49200,0
Сухие экстракты диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной	1526,7 / 4082,3*	140,0	213738,0 / 571522,0
Лимонная кислота	378,0	5,0	1890,0
<b>ИТОГО:</b>			<b>433828,0 / 791612,0</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Структура себестоимости гранулированных ягодных киселей профилактической направленности приведена в таблице 8.4.11, затраты на сырье и материалы для производства 1 т готовой продукции (на примере гранулированного киселя на основе черники) – в таблице 8.4.12.

Таблица 8.4.11 – Структура себестоимости гранулированных ягодных киселей профилактической направленности (на 1 т продукта)

Статьи затрат	Удельный вес, %	Производственная себестоимость, %
Сырье и материалы	33,5	488763,3 / 993494,3
Энергия на технологические цели	16,4	239275,2 / 486367,4
Заработная плата и отчисления на социальное страхование	20,1	293258,0 / 596096,6
Расходы на подготовку и освоение производства	3,5	51064,8 / 103797,9
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	8,0	116719,6 / 237252,4
Цеховые расходы	5,5	80244,7 / 163111,0
Общепроизводственные расходы	9,5	138604,5 / 281737,2
Прочие производственные расходы	1,5	21884,9 / 44484,8
Накладные расходы	2,0	29179,9 / 59313,1
<b>ИТОГО:</b>	<b>100,0</b>	<b>1458994,9 / 2965654,6</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Таблица 8.4.12 – Затраты на сырье и материалы для производства 1 т гранулированного ягодного киселя профилактической направленности (на примере киселя на основе черники)

Наименование сырья и материалов	Цена за 1 кг, руб.	Нормы расхода на 1 т напитка, кг	Общая стоимость, руб.
Крахмал картофельный	47,0	350,0	16450,0
Сублимированные ягоды черники	370,0	400,0	148000,0
Сухие экстракты женьшеня обыкновенного и ливзеи сафлоровидной	1526,7 / 4082,3*	197,5	301523,3 / 806254,3
Эритрит	440,0	47,5	20900,0
Лимонная кислота	378,0	5,0	1890,0
<b>ИТОГО:</b>			<b>488763,3 / 993494,3</b>

\* числитель – экстракт на основе надземных / подземных частей растений, знаменатель – экстракт на основе клеточных культур растений

Данные по себестоимости функциональных напитков (за 1 кг) на основе густых и сухих растительных экстрактов, полученных из надземных / подземных частей природных растений и их клеточных культур, обобщены в таблице 8.4.13.

Таблица 8.4.13 – Себестоимость функциональных напитков на основе растительных экстрактов (в пересчете на 1 кг продукта)

Наименование напитка	Себестоимость напитка на основе экстрактов, руб./кг	
	полученных из природных растений	полученных из клеточных культур растений
Напиток на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами (калина)	760,08	1369,65
Тонизирующий чайный напиток (зеленый чай)	328,35	709,78
Концентрат – основа морсов иммуномодулирующего действия (клюква)	1039,76	1955,20
Растворимый сухой безалкогольный напиток антиоксидантного действия (цикорий)	1295,01	2363,02
Гранулированный ягодный кисель профилактической направленности (черника)	1458,99	2965,65

Из таблицы 8.4.13 следует, что использование в технологии приготовления функциональных напитков экстрактов, полученных из клеточных культур растений, увеличивает себестоимость готового продукта в среднем в 1,80–2,16 раза по сравнению с применением экстрактов, полученных из надземных / подземных частей природных растений. Данное явление обусловлено высокой стоимостью компонентов питательных сред, используемых для культивирования каллусных культур и культур адвентивных корней. Однако использование клеточных культур растений позволяет нивелировать такие недостатки применения природных объектов, как зависимость от климатических и погодных условий, риск микробной контаминации, обширные посевные площади и, наконец, принадлежность многих ценных с точки зрения содержащихся в них БАВ растений к редким и исчезающим видам. Таким образом, требуются дополнительные исследования, направленные на модернизацию технологий выращивания клеточных культур растений, в частности, на повышение их экономической эффективности.

В результате проведенных исследований разработаны и утверждены технические условия и технологические инструкции:

- «Экстракты на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*» ТУ 10.89.19-273-02068309-2020, ТИ 10.89.19-273-02068309-2020;
- «Концентрат – основа морсов иммуномодулирующего действия» ТУ 10.32.23-274-02068309-2021, ТИ 10.32.23-274-02068309-2021;
- «Тонизирующий чайный напиток» ТУ 10.83.14-275-02068309-2021, ТИ 10.83.14-275-02068309-2021;
- «Фиточай» ТУ 10.83.15-276-02068309-2021, ТИ 10.83.15-276-02068309-2021;
- «Гранулированный ягодный кисель» ТУ 10.89.19-277-02068309-2021, ТИ 10.89.19-277-02068309-2021;

- «Растворимый сухой напиток антиоксидантного действия» ТУ 10.83.12-278-02068309-2021, ТИ 10.83.12-278-02068309-2021;
- «Напиток на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами» ТУ 10.51.55-279-02068309-2021, ТИ 10.51.55-279-02068309-2021.

Копии ТУ и ТИ представлены в Приложении В.

### **8.5 Опытно-промышленная апробация и внедрение технологий в производство и учебный процесс**

Проведены опытно-промышленная апробация и внедрение готовой продукции в производство (в таблица 8.4.14) и учебный процесс ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».

На ООО «РУСЭКСТРАКТ» проведены испытания технологии получения растительных экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* с целью выявления причин возможных отклонений и доработки технологии. В результате проведенного контроля выявлено, что параметры технологического процесса (ТИ 10.89.19-273-02068309-2020) обеспечивают выход готового продукта, соответствующего требованиям качества и безопасности в соответствии с ТУ 10.89.19-273-02068309-2020. Проведена наработка 24 опытных образцов экстрактов (весом 25 кг каждый). Копия акта представлена в Приложении Г.1.

В производственных условиях ООО «РУСЭКСТРАКТ» с 01.02.2021 по 26.02.2021 г. была выработана промышленная партия экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* для использования в пищевой промышленности в соответствии с ТИ 10.89.19-273-02068309-2020 и ТУ 10.89.19-273-02068309-2020. Для производства промышленной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* проводились экстракция,

очистка, концентрирование или высушивание водно-спиртовых экстрактов, фасовка. Была выработана промышленная партия густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья (*Rhaponticum carthamoides*; *Panax ginseng*; *Eleutherococcus senticosus*; *Dactylorhiza maculata*; *Dioscorea communis*; *Saposhnikovia divaricata*) весом 150 кг каждая. Была выработана промышленная партия густых экстрактов на основе клеточных культур растений *in vitro* (*Rhaponticum carthamoides*; *Panax ginseng*; *Eleutherococcus senticosus*; *Dactylorhiza maculata*; *Dioscorea communis*; *Saposhnikovia divaricata*) весом 150 кг каждая. Была выработана промышленная партия сухих экстрактов на основе клеточных культур растений *in vitro* (*Rhaponticum carthamoides*; *Panax ginseng*; *Eleutherococcus senticosus*; *Dactylorhiza maculata*; *Dioscorea communis*; *Saposhnikovia divaricata*) весом 100 кг каждая. Установлено, что промышленная партия экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* по показателям качества и безопасности соответствует требованиям технических условий ТУ 10.89.19-273-02068309-2020 и рекомендуется к внедрению в производство. Копия акта представлена в Приложении Г. 2.

В производственных условиях ООО НПО «Сибирка» по проекту нормативно–технической документации, разработанной на кафедре бионанотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» была выработана опытно–промышленная партия тонизирующих чайных напитков: на основе черного чая, содержащий густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего объемом 500 литров; на основе зеленого чая, содержащий густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего объемом 500 литров. Проведена дегустация выработанных тонизирующих чайных напитков, содержащих густые экстракты на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*. Отмечены высокие показатели качества, соответствующие требованиям нормативно-технической документации. Выработанные напитки на основе черного и зеленого чая рекомендуется к внедрению в производство. Копия акта представлена в Приложении Г. 3.

Таблица 8.4.14 – Опытнo-промышленная апробация и внедрение готовой продукции в производство

Продукт	Нормативные документы	Организация внедрения	Подтверждение	Приложение
<p>Густой экстракт на основе природного растительного сырья левзеи сафлоровидной (<i>Rhaponticum carthamoides</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе природного растительного сырья женьшеня обыкновенного (<i>Panax ginseng</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе природного растительного сырья элеутерококка колючего (<i>Eleutherococcus senticosus</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе природного растительного сырья пальчатокоренника пятнистого (<i>Dactylorhiza maculat</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе природного растительного сырья диоскореи обыкновенной (<i>Dioscorea communis</i>).</p>	<p>«Экстракты на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i>»</p> <p>ТУ 10.89.19-273-02068309-2020, ТИ 10.89.19-273-02068309-2020</p>	<p>ООО «РУСЭКСТРАКТ»</p>	<p>Акт наработки опытных образцов экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i></p>	<p>Приложение Г. 1</p>
<p>Густой экстракт на основе природного растительного сырья сапожниковии растопыренной (<i>Saposhnikovia divaricata</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> левзеи сафлоровидной (<i>Rhaponticum carthamoides</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> женьшеня обыкновенного (<i>Panax ginseng</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> элеутерококка колючего (<i>Eleutherococcus senticosus</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> пальчатокоренника пятнистого (<i>Dactylorhiza maculat</i>).</p>			<p>ООО «РУСЭКСТРАКТ»</p>	<p>Акт выработки промышленной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i></p>

Продукт	Нормативные документы	Организация внедрения	Подтверждение	Приложение
<p>Густой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> диоскореи обыкновенной (<i>Dioscorea communis</i>).</p> <p>Густой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> сапожниковии растопыренной (<i>Saposhnikovia divaricata</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе природного растительного сырья левзеи сафлоровидной (<i>Rhaponticum carthamoides</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе природного растительного сырья женьшеня обыкновенного (<i>Panax ginseng</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе природного растительного сырья элеутерококка колючего (<i>Eleutherococcus senticosus</i>).</p>	<p>«Экстракты на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i>»</p> <p>ТУ 10.89.19-273-02068309-2020, ТИ 10.89.19-273-02068309-2020</p>	<p>ООО «РУСЭКСТРАКТ»</p>	<p>Акт наработки опытных образцов экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i></p>	<p>Приложение Г. 1</p>
<p>Сухой экстракт на основе природного растительного сырья пальчатокоренника пятнистого (<i>Dactylorhiza maculata</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе природного растительного сырья диоскореи обыкновенной (<i>Dioscorea communis</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе природного растительного сырья сапожниковии растопыренной (<i>Saposhnikovia divaricata</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> левзеи сафлоровидной (<i>Rhaponticum carthamoides</i>).</p> <p>Сухой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> женьшеня обыкновенного (<i>Panax ginseng</i>)</p>			<p>ООО «РУСЭКСТРАКТ»</p>	<p>Акт выработки промышленной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i></p>



Продукт	Нормативные документы	Организация внедрения	Подтверждение	Приложение
Сухой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> элеутерококка колючего ( <i>Eleutherococcus senticosus</i> ).	«Экстракты на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i> » ТУ 10.89.19-273-02068309-2020, ТИ 10.89.19-273-02068309-2020	ООО «РУСЭКСТРАКТ»	Акт наработки опытных образцов экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i>	Приложение Г. 1
Сухой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> пальчатокоренника пятнистого ( <i>Dactylorhiza maculata</i> ).		ООО «РУСЭКСТРАКТ»	Акт выработки промышленной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений <i>in vitro</i>	Приложение Г. 2
Сухой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> диоскореи обыкновенной ( <i>Dioscorea communis</i> ).		ООО «НПО Сибирка»	Акт выработки опытно-промышленной партии тонирующих чайных напитков	Приложение Г. 3
Сухой экстракт на основе клеточных культур растений <i>in vitro</i> сапожниковии растопыренной ( <i>Saposhnikovia divaricata</i> ).		ООО «НПО Сибирка»	Акт выработки опытной партии фиточая	Приложение Г. 4
Тонизирующий чайный напиток на основе черного чая. Тонизирующий чайный напиток на основе зеленого чая.	«Тонизирующий чайный напиток» ТУ 10.83.14-275-02068309-2021, ТИ 10.83.14-275-02068309-2021	ООО НПО «Здоровое питание»	Акт выработки опытно-промышленной партии концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия	Приложение Г. 5
Тонизирующий чайный напиток на основе фиточая.	«Фиточай» ТУ 10.83.15-276-02068309-2021, ТИ 10.83.15-276-02068309-2021	ООО НПО «Здоровое питание»	Акт выработки опытно-промышленной партии гранулированного ягодного киселя	Приложение Г. 6
Концентрат-основа облепихового морса. Концентрат-основа клюквенного морса. Концентрат-основа черносмородинового морса.	«Концентрат-основа морсов иммуномодулирующего действия» ТУ 10.32.23-274-02068309-2021, ТИ 10.32.23-274-02068309-2021	ООО НПО «Здоровое питание»		
Гранулированный черничный кисель. Гранулированный земляничный кисель. Гранулированный красносмородиновый кисель.	«Гранулированный ягодный кисель» ТУ 10.89.19-277-02068309-2021, ТИ 10.89.19-277-02068309-2021			

Продукт	Нормативные документы	Организация внедрения	Подтверждение	Приложение
Напиток на основе молочной сыворотки с калиной. Напиток на основе молочной сыворотки с брусникой. Напиток на основе молочной сыворотки с ежевикой.	«Напиток на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами» ТУ 10.51.55-279-02068309-2021, ТИ 10.51.55-279-02068309-2021	ООО «СибБарс»	Акт выработки опытной партии напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами	Приложение Г.7
Напиток на основе молочной сыворотки с калиной. Напиток на основе молочной сыворотки с брусникой. Напиток на основе молочной сыворотки с ежевикой.	«Напиток на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами» ТУ 10.51.55-279-02068309-2021, ТИ 10.51.55-279-02068309-2021	ООО «СибБарс»	Акт внедрения результатов исследования	Приложение Г.8
Растворимый сухой напиток на основе кофе. Растворимый сухой напиток на основе цикория. Растворимый сухой напиток на основе топинамбура.	«Растворимый сухой напиток антиоксидантного действия» ТУ 10.83.12-278-02068309-2021, ТИ 10.83.12-278-02068309-2021	ООО «СибБарс»	Акт выработки опытно-промышленной партии растворимого сухого напитка антиоксидантного действия	Приложение Г.9
Растворимый сухой напиток на основе кофе. Растворимый сухой напиток на основе цикория. Растворимый сухой напиток на основе топинамбура.	«Растворимый сухой напиток антиоксидантного действия» ТУ 10.83.12-278-02068309-2021, ТИ 10.83.12-278-02068309-2021	ООО «СибБарс»	Акт внедрения результатов исследования	Приложение Г.10

На технологической линии ООО НПО «Сибирка» была выработана опытно-промышленная партия тонирующего фиточая в соответствии с ТУ 10.83.15-276-02068309-2021. Для производства опытной партии фиточая использовали траву чабреца, листья мяты перечной, листья брусники, цветы липы, густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего. Используемое сырье соответствовало требованиям действующих нормативных документов и имело сопроводительные документы, подтверждающие их безопасность и качество. Установлено, что опытно-промышленная партия фиточая по показателям качества и безопасности соответствует требованиям ТУ 10.83.15-276-02068309-2021 и рекомендуется к внедрению в производство. Копия акта представлена в Приложении Г. 4.

В производственных условиях ООО НПО «Здоровое питание» выработана опытно-промышленная партия концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия: концентрат – основа морса из облепихи, содержащий густой экстракт левзеи сафлоровидной объемом 250 литров; концентрат – основа морса из клюквы, содержащий густой экстракт левзеи сафлоровидной объемом 250 литров; концентрат – основа морса из черной смородины, содержащий густой экстракт левзеи сафлоровидной объемом 250 литров. Проведена дегустация выработанных продуктов и отмечены высокие показатели качества, соответствующие требованиям нормативно-технической документации. Выработанные концентраты рекомендуются к внедрению в производство. Копия акта представлена в Приложении Г.5.

В период с 18 мая 2021 г. по 28 мая 2021 г. в производственных условиях ООО НПО «Здоровое питание» по проекту нормативно-технической документации, разработанной ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» кандидатом технических наук Лосевой А.И., кандидатом технических наук Милентьевой И.С., доктором технических наук Просеко-вым А.Ю. была выработана опытно-промышленная партия гранулированных ягодных киселей содержащих экстракты женьшеня обыкновенного и левзеи сафлоровидной: кисель черничный 250 кг; кисель

земляничный 250 кг; кисель красносмородиновый 250 кг. Показатели качества полностью соответствуют требованиям ТУ 10.89.19-277-02068309-2021. Все выработанные гранулированные ягодные кисели рекомендуется к внедрению в производство. Копия акта представлена в Приложении Г. 6

В производственных условиях ООО «СибБарс» была выработана партия напитков на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами в соответствии с ТУ 10.51.55-279-02068309-2021: напиток на основе молочной сыворотки с калиной, обогащенный вторичными метаболитами; напиток на основе молочной сыворотки с брусникой, обогащенный вторичными метаболитами; напиток на основе молочной сыворотки с ежевикой, обогащенный вторичными метаболитами. Для производства опытной партии напитков использовали сыворотку творожную, пюре из калины, пюре из брусники, пюре из ежевики, густой экстракт женьшеня обыкновенного, густой экстракт пальчатокоренника пятнистого, эритрит и лимонную кислоту. Установлено, что выработанные напитки отвечают требованиям ТУ 10.51.55-279-02068309-2021 и рекомендуется к внедрению в производство. Копия акта выработки от 30.08.2021 г. и акта внедрения от 13.06.2022 г. представлены в Приложениях Г. 7, Г. 8

На предприятии ООО «СибБарс» в период 15 по 31 октября 2021 г. были проведены испытания технологии получения растворимого сухого безалкогольного напитка антиоксидантного действия на основе сухих экстрактов с целью выявления причин возможных отклонений и доработки технологии. В результате проведенного контроля выявлено, что подбор параметров технологического процесса, обеспечивающих качество и выход готового продукта, выбраны правильно, согласно всем правилам и нормам. Была выработана партия сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия на основе сухих экстрактов в соответствии с ТУ и ТИ 10.83.12-278-02068309-2021: растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе кофе; растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе цикория; растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на

основе топинамбура. Для производства опытно-промышленной партии растворимых сухих напитков антиоксидантного действия использовали: кофе сублимированный, порошок цикория, порошок топинамбура, сублимированные ягоды боярышника и вишни, сушеные ядра кедрового ореха, сухие экстракты диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной, лимонную кислоту. Опытно-промышленная партия сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия на основе сухих экстрактов, выработана в количестве 150 кг каждого наименования. Установлено, что выработанные напитки отвечают требованиям ТУ 10.83.12-278-02068309-2021 и рекомендуется к внедрению в производство. Копия акта выработки от 01.11.2021 г. и акта внедрения от 20.05.2022 г. представлены в Приложениях Г. 9, Г. 10.

Материалы диссертационного исследования Лосевой А. И. внедрены в учебный процесс при реализации образовательных программ бакалавриата по направлениям 19.03.01 Биотехнология, 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья и программ магистратуры по направлениям 19.04.01 Биотехнология, 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья. Разработанные технологии напитков, полученные с использованием вторичных метаболитов растительного сырья, используются при проведении практических и лабораторных занятий, а также при выполнении и подготовке выпускных квалификационных работ. Приложение Г. 11.

## **8.6 Заключение по восьмой главе**

Разработаны технологические схемы производства густых и сухих экстрактов на основе природного растительного сырья *R. carthamoides*, *P. ginseng*, *E. senticosus*, *D. maculata*, *D. communis*, *S. divaricata* и клеточных культур растений *in vitro*. Процессуальная схема производства густых экстрактов включает основные стадии: санитарная подготовка производства;

подготовка растительного сырья; приготовление экстрагента; приготовление водно-спиртовых экстрактов; очистка и концентрирование водно-спиртовых экстрактов; фасовка, маркировка, упаковка, хранение.

Основные стадии процессуальной схемы производства сухих экстрактов: санитарная подготовка производства; подготовка растительного сырья; приготовление экстрагента; приготовление водно-спиртовых экстрактов; очистка и высушивание водно-спиртовых экстрактов; фасовка, маркировка, упаковка, хранение.

Экспериментально установлены сроки хранения растительных экстрактов: густых – не более года при температуре 15–25 °С, сухих – не более двух лет при аналогичных условиях.

Разработаны рецептуры и процессуальные схемы производства напитков функциональной направленности на основе растительных экстрактов:

- напитка на основе молочной сыворотки, обогащенного вторичными метаболитами (с калиной, брусникой, ежевикой);
- тонизирующего чайного напитка (на основе черного, зеленого чая и фиточая);
- концентрата – основы морса иммуномодулирующего действия (облепихового, клюквенного, черносмородинового);
- растворимого сухого безалкогольного напитка антиоксидантного действия (на основе кофе, цикория, топинамбура);
- гранулированного ягодного киселя профилактической направленности (черничного, земляничного, красносмородинового).

Проведена оценка показателей качества напитков на основе растительных экстрактов: органолептических, физико-химических характеристик, витаминного, макро- и микроэлементного состава. Установлено, что напитки на основе молочной сыворотки характеризуются высоким содержанием флавоноидов: от 134,56 мг/100 г до 142,06 мг/100 г. Основными представителями витаминов в напитках на основе молочной

сыворотки являются витамины С, В<sub>3</sub> и Е. Доминирующие макроэлементы напитков на основе молочной сыворотки – это калий, кальций, магний, натрий и фосфор.

Выявлено, что доминирующие биологически активные вещества чайных напитков – это флавоноиды (110,36–119,22 мг/100 г), дубильные вещества (27,23–44,56 мг/100 г) и алкалоиды (8,45–34,56 мг/100 г). В тонизирующих чайных напитках выявлено наиболее высокое содержание витаминов С, Е и β-каротина, меньшее содержание – витаминов В<sub>3</sub>, В<sub>4</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>. Преобладающими макроэлементами чайных напитков являются кальций, калий, магний и фосфор, доминирующим микроэлементом – железо.

Концентраты для приготовления морсов иммуномодулирующего действия продемонстрировали высокое содержание таких групп биологически активных веществ, как флавоноиды (340,97–435,67 мг/100 г), дубильные вещества (115,26–276,10 мг/100 г) и антоцианы (32,44–76,33 мг/100 г). Среди витаминов отмечена высокая концентрация аскорбиновой кислоты, холина, токоферолов и β-каротина, основными представителями макроэлементов являются калий, магний, кальций, фосфор, основной микроэлемент – железо.

Для растворимых сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия отмечено преобладание таких БАВ, как полифенолы – от 122,09 мг/100 г до 412,88 мг/100 г. Витаминный состав безалкогольных напитков представлен холином, аскорбиновой кислотой, ниацином (В<sub>3</sub>) и токоферолами. Среди макроэлементов в составе безалкогольных напитков доминируют калий, магний, фосфор, кальций, натрий.

Показано, что гранулированные ягодные кисели – источник флавоноидов (115,23–176,88 мг/100 г), дубильных веществ (44,07–105,54 мг/100 г) и антоцианов (55,11–85,02 мг/100 г). Преобладающие витамины в киселях – С, Е, В<sub>4</sub> и В<sub>3</sub>, макроэлементы – калий, кальций, магний, фосфор, кремний, натрий.

Все разработанные напитки продемонстрировали высокую способность восстанавливать радикал DPPH, что свидетельствует об их выраженных антиоксидантных свойствах.

Предложены возможные направления применения разработанных напитков на основе растительных экстрактов в функциональном питании: для профилактики нейродегенеративных заболеваний и преждевременного старения, онкологических заболеваний, патологий сердечно-сосудистой системы и ЖКТ и в целом для повышения иммунного статуса организма.

Рассчитана себестоимость функциональных напитков на основе растительных экстрактов. Выявлено, что использование в технологии приготовления функциональных напитков экстрактов, полученных из клеточных культур растений, увеличивает себестоимость готового продукта в среднем в 1,80–2,16 раза по сравнению с применением экстрактов, полученных из надземных / подземных частей природных растений, что обусловлено высокой стоимостью компонентов питательных сред, используемых для культивирования каллусных культур и культур адвентивных корней.

Проведена опытно-промышленная апробация и промышленные внедрения на предприятиях отрасли: ООО «РУСЭКСТРАКТ», ООО «НПО Сибирка», ООО НПО «Здоровое питание», ООО «СибБарс». Дана оценка экономической эффективности внедрения предлагаемых технологий.

Результаты исследований внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» при подготовке студентов бакалавриата и магистратуры, а также при организации научно-исследовательской и практической работы студентов.



## ВЫВОДЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Результаты проведенных исследований, направленных на развитие научных аспектов и практических решений получения клеточных культур растений биотехнологическими методами *in vitro*, извлечению из них комплекса вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности, а также создание технологий получения экстрактов и функциональных напитков на их основе, в рамках предложенной в работе концепции обеспечения доступности для потребителей БАД растительного происхождения, способствуют решению социальной задачи профилактики заболеваний и поддержания иммунного статуса организма россиян. Материалы собственных проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Проанализирован химический состав, показатели качества и безопасности нативного растительного сырья, установлено высокое содержание вторичных метаболитов. Корневище с корнями левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) богаты флавоноидами  $602,39 \pm 17,28$  мг/г сухой массы и фенольными кислотами  $124,94 \pm 2,61$  мг/г сухой массы; в корнях женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng*) доминировали гинзенозиды  $4,08 \pm 0,16$  мг/г сухой массы; корневище элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus*) содержало фенольные кислоты  $7,62 \pm 0,23$  мг/г сухой массы, среди которых преобладала кофейная кислота ( $4,62 \pm 0,23$  мг/г); клубни пальчатокоренника пятнистого (*Dactylorhiza maculata*) преимущественно содержали флавоноиды  $17,89 \pm 0,34$  мг/г сухой массы; корни диоскореи обыкновенной (*Dioscorea communis*) – сапонины ( $7,41 \pm 0,11$  мг/г); в корнях сапожниковии растопыренной (*Saposhnikovia divaricata*) преобладают хромоны  $13,17 \pm 0,26$  мг/г сухой массы. Показана антимикробная и антиоксидантная активность экстрактов.

2. Для культивирования каллусных культур каждого из растений были подобраны индивидуальные питательные среды, экспериментально обоснованы параметры культивирования *in vitro*: в темноте, при температуре 23 °С, в течение 28 суток. Для выращивания корневых культур рекомендуется использовать штамм почвенных агробактерий для трансформации – *Agrobacterium rhizogenes* A4, классическую среду Гамборга, культивирование вести в темноте при температуре 23 °С в течение 5 недель при перемешивании (100 об/мин).

3. Подобраны параметры экстракции природного растительного сырья и клеточных культур *in vitro* растений 40 %-ным этиловым спиртом методом мацерации: температура 40–60 °С, гидромодуль 1:5–20, продолжительность 2–4 ч в зависимости от растения; методом циркуляционного экстрагирования: гидромодуль 1:10–20, продолжительность 2–4 ч в зависимости от растения; методом микроволновой экстракции: гидромодуль 1:5–20, мощность излучения 200–500 Вт, продолжительность 20–40 мин в зависимости от растения. Полученные результаты показали, что микроволновая экстракция изучаемого растительного сырья позволяет достичь более высокого уровня извлечения целевых БАВ (6,0–34,2 %) при меньшей продолжительности процесса по сравнению с мацерацией и перколяцией.

4. Проанализирован компонентный состав изучаемых образцов. Максимальное содержание целевых БАВ отмечено в экстрактах полученных микроволновой экстракцией. Экстракты культуры адвентивных корней левзеи сафлоровидной (*R. Carthamoides*) содержали апигенин (53,15±2,55 мг/мл) и кофейную кислоту (45,44±2,23 мг/мл). В составе экстрактов каллусной культуры женьшеня (*P. Ginseng*) доминировали панаксозид (27,37±1,37 мг/мл) и гинзенозид RB1 (16,65±0,83 мг/мл). В экстрактах корневой культуры элеутерококка колючего (*E. Senticosus*) содержание кофейной кислоты составило (13,34±0,67 мг/мл), элеутерозидов – (14,05±0,67 мг/мл). Экстракты каллусной культуры пальчатокоренника пятнистого (*D. maculata*) содержали рутин (24,06±1,20 мг/мл) и кверцетин (21,47±1,07 мг/мл). Доминирующие

вторичные метаболиты диоскорей обыкновенной (*D. communis*) – это диосцин ( $15,04 \pm 0,76$  мг/мл) и спиростенол А ( $14,94 \pm 0,75$  мг/мл); для корневой культуры сапожниковии растопыренной (*S. Divaricata*) отмечено максимальное содержание перв-О-глюкозилцимифугина ( $42,54 \pm 2,13$  мг/мл), 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминола ( $37,78 \pm 1,90$  мг/мл) и гамаудола ( $32,41 \pm 1,62$  мг/мл). Все экстракты, полученные из клеточных культур растений *in vitro*, демонстрировали более высокие концентрации вторичных метаболитов по сравнению с экстрактами надземных и подземных частей растений. Согласно ОФС.1.4.1.0021.15 и ОФС.1.5.3.0009.15 все исследуемые образцы экстрактов по содержанию тяжелых металлов соответствуют требованиям нормативной документации, следовательно, могут быть использованы в технологиях пищевых продуктов и напитков. Получены результаты, свидетельствующие об отсутствии токсичности у изучаемых экстрактов по отношению к хемилюминесценции *V. fischeri*. В экспериментах *in vitro* доказано наличие у экстрактов, полученных из биомассы каллусных и корневых культур растений, антимикробных свойств по отношению к патогенным и условно патогенным тест-штаммам. Доказана антиоксидантная активности экстрактов двумя методами.

5. Подобраны рациональные параметры ультрафильтрационной очистки: давление 0,5 Мпа, диаметр пор мембран 5–15 кДа, 2–4 цикла очистки в зависимости от растения. Определены оптимальные параметры очистки растительных экстрактов хроматографическим методом с использованием в качестве стационарной фазы силикагеля с октадецильной группой С18 с размером 2,5 и 3,5 мкм и скоростью элюции 5 и 10 мл/мин. Доказано, что хроматографический метод очистки является более эффективным по сравнению с ультрафильтрационным методом и позволяет повысить содержание действующих БАВ в экстрактах в 1,34–2,49 раз. Подобраны параметры концентрирования растительных экстрактов в вакуум-выпарной установке при глубине вакуума 75 кПа, температуре 65 и 75 °С в течение 1,5–2,0 ч. Выпаривание растворителя позволяет повысить концентрацию

действующих БАВ в густых экстрактах в 2,99–6,75 раз. Подобраны рациональные параметры распылительного высушивания: температура 60–80 °С, скорость подачи раствора 6–10 мл/мин, скорость потока воздуха 20–30 м<sup>3</sup>/ч; сублимационной сушки при температуре минус 30 °С в течение 8–12 ч. Доказано, что способ высушивания экстрактов не оказывает влияния на уровень содержания в них целевых биологически активных веществ. Экстракты, полученные методом распылительного высушивания, характеризуются более высоким содержанием мелкодисперсных фракций, в то время как насыпная плотность и гигроскопичность экстрактов, полученных сублимационным высушиванием, превышают данные показатели для экстрактов, полученных в результате распылительной сушки, в среднем в 1,5–2,0 раза.

6. На основе полученных результатов собственных исследований разработаны технологические схемы производства: густых экстрактов на основе природного растительного сырья, густых экстрактов на основе клеточных культур растений *in vitro*, сухих экстрактов на основе природного растительного сырья и сухих экстрактов на основе клеточных культур растений *in vitro*. Обоснованы условия хранения.

7. На основе полученных экстрактов разработаны рецептуры и процессуальные схемы производства функциональных напитков. С применением густых экстрактов получали напиток на основе молочной сыворотки, обогащенный вторичными метаболитами; тонизирующий чайный напиток (на основе черного, зеленого чая и фиточая) и концентрат – основа морсов иммуномодулирующего действия. На основе сухих экстрактов – растворимый сухой напиток антиоксидантного действия и гранулированный ягодный кисель профилактической направленности. Дана оценка показателям качества, безопасности и функциональным характеристикам. На полученные продукты разработана техническая документация.

8. Дана оценка экономической эффективности внедрения предлагаемых технологий. Проведена опытно-промышленная апробация и промышленные

внедрения на предприятиях отрасли: ООО «РУСЭКСТРАКТ», ООО «НПО Сибирка», ООО НПО «Здоровое питание», ООО «СибБарс». Результаты исследований внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АК – аскорбиновая кислота

АОА – Оксид алюминия

АПК – Агропромышленный комплекс

АТФ – Аденозинтрифосфат

БАВ – Биологически активные вещества

БАД – Биологически активные добавки

БАП – 6-бензиламинопурин

БГКП – Бактерии группы кишечной палочки

В5 – Среда Гамборга

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВР – Стадии вспомогательных работ

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ – Государственный стандарт

ГХЦГ – Гексахлорциклогексан

ДДТ – Дихлордифенил трихлорметилметан

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК-спектроскопия – Инфракрасная спектроскопия

КМАФАнМ – Количество мезофильных аэробных и

факультативноанаэробных микроорганизмо

КОЕ – Колониеобразующие единицы

МУК – МУК 4.2.1890-2004 «Определение чувствительности

микроорганизмов к антибактериальным препаратам»

НИОКР – Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы

НУК – Нафтилуксусная кислота

ООО – Общество с ограниченной ответственностью

ОФС – Общая фармакопейная статья

РАН – Российская академия наук  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
РФ – Российская Федерация  
СССР – Союз Советских Социалистических Республик  
СФО – Сибирский федеральный округ  
США – Соединенные Штаты Америки  
ТИ – Технологическая инструкция  
ТП – Стадия основного технологического процесса  
ТР ТС 021/2011 – Технический регламент Таможенного союза  
«О безопасности пищевой продукции» от 09 декабря 2011 г.  
ТСХ – Тонкослойная хроматография  
ТУ – Технические условия  
УМО – Стадии упаковывания, маркирования и отгрузки готового продукта  
УФ – Ультрафиолетовое излучение  
ФГБОУ ВО – Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
*ФПП – функциональные продукты питания*  
ФЦП – Федеральная целевая программ  
100 М – Молярная концентрация вещества, соответствующая 100 моль/л  
100 мкМ – Микромольная концентрация вещества, соответствующая  
100 мкмоль/л  
2,4-Д – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота  
COVID-19 – Коронавирусная инфекция 2019 года (CORONAVIRUS  
DISEASE 2019)  
DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил  
GMP – Надлежащая производственная практика (good manufacturing practice)  
MS – Среда Мурасиге-Скуга  
SH – Среда Шенка и Хильдебрандта  
SOD – Супероксиддисмутаза

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Абрамчук, А. В. Культивируемые растения, применяемые при заболеваниях центральной нервной системы / А. В. Абрамчук // Аграрное образование и наука. – 2021. – № 2.
2. Анализ способов очистки экстрактов из дикорастущего сырья Сибирского федерального округа / Л. С. Дышлюк, Е. В. Каширских, С. Ю. Носкова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 43, № 4. – С. 12–21.
3. Антиоксидантная активность некоторых тонизирующих и гепатопротекторных фитопрепаратов, содержащих флавоноиды и фенилпропаноиды / В. А. Куркин, О. Л. Кулагин, Н. С. Додонов [и др.] // Растительные ресурсы. – 2008. – Т. 44, № 1. – С. 122–130.
4. Баймурадов, Р. Р. Перспективное лекарственное растение ятрышник / Р. Р. Баймурадов, Д. М. Ражабова, Р. Р. Баймурадов // Биология и интегративная медицина. – 2017. – № 11. – С. 161–167.
5. Бакаева, Е. Н. Динамика токсичности вод и донных отложений водного объекта рекреации / Е. Н. Бакаева, Н. А. Игнатова // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. – С. 243–243.
6. Биосенсорный анализ антропогенного загрязнения донных отложений Нижнего Дона / М. А. Сазыкина, И. С. Сазыкин, М. И. Хаммами [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова. – 2016. – Т. 12, № 1. С. 5–11.
7. Биотехнология выращивания каллусных культур ятрышника шлемовидного – перспективного источника биоактивных веществ / А. И. Лосева, А. В. Позднякова, А. Ю. Просеков [и др.] // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2021. – Т. 9, № 4. – С. 13–22.



8. Бойцова, Ю. С., Янова Е. А. Нормативно правовое обеспечение рынка функциональных продуктов питания в Соединенных Штатах Америки // Вестник Алтайской академии экономики и права. – 2020. – № 2 – С. 33–38.
9. Величко, Н. А., Смольникова Я. В. Влияние технологических параметров экстракции на выход экстрактивных веществ из левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) // Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 10 (133). – С. 73–78.
10. Величкович, Н. С. Анализ состава и свойств тонизирующих напитков на основе молочной сыворотки и биологически активных веществ растительного сырья сибирского региона / Н. С. Величкович, А. А. Лукин, О. В. Кригер // Актуальные вопросы индустрии напитков. – 2019. – № 3. – С. 45–48.
11. Влияние способа сушки на спектральные характеристики корня корневой петрушки / В. И. Филиппов, У. Ю. Нечипоренко, Р. Е. Кудинов [и др.] // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия Процессы и аппараты пищевых производств. – 2018. – № 2. – С. 44–54.
12. Дикорастущие лекарственные растения Урала / Е. С. Васфилова, А. С. Третьякова, Е. Н. Подгаевская [и др.]. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014. – 204 с.
13. Доступные метаболиты растений Сибири как источники инновационных препаратов для медицины / Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, Н. А. Жукова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2018. – Т. 26. – № 3. – С. 329–344.
14. Ивашев, М. Н. Биологическая активность соединений из растительных источников / М. Н. Ивашев, А. А. Круглая, И. А. Савенко // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10–7. – С. 1482–1484.
15. Иркитова, А. Н. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / А. Н. Иркитова, Я. Р. Каган, Г. Г. Соколова // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. – 2012. – № 3–1 (75). – С. 41–44.

16. Использование биологически активных веществ лекарственных растений Сибири в функциональных напитках на основе молочной сыворотки / С. А. Иванова, И. С. Милентьева, О. В. Кригер [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т. 49, № 1. – С. 14–22.
17. Коновалова, Т. Ю. Опыт интродукции и асимбиотического размножения *Orchis militaris* L // Материалы XI Международной конференции «Охрана и культивирование орхидей». – Нижний Новгород, 2018. – С. 20–21.
18. Куренкова, С. В. Продуктивность и химический состав *Rhaponticum Carthamoides* (Willd.) Pjin, выращиваемого в Республике Коми / С. В. Куренкова, Г. Н. Табаленкова // Растительные ресурсы. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 14.
19. Куркин, В. А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В. А. Куркин, А. В. Куркина, Е. В. Авдеева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (9). – С. 1897–1901.
20. Мингалев, С. К. Перспективы возделывания иммуностимулирующих растений на Среднем Урале / С. К. Мингалев // Аграрный вестник Урала. – 2019. – № 187. – С. 2.
21. Миневич, И. Э. Характеристика порошков белкового концентрата и полисахаридного экстракта, полученных из льняного сырья методом распылительной сушки / И. Э. Миневич, Т. Б. Цыганова, В. Я. Черных // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2020. – № 3. – С. 46–57.
22. Охраняемые орхидные в Кемеровском районе / Л. Н. Ковригина, А. В. Филиппова, Н. Г. Романова [и др.] // Вестник Кемеровского государственного университета. Серия: Биологические, технические науки и науки о Земле. – 2017. – № 4 (4). С. 4–8.
23. Оценка качества воды родников г. Ростова-на-Дону на основе микробиологических и токсикологических показателей / М. А. Сазыкина, З. С. Кхатаб, Е. М. Кудеевская [и др.] // Вода: химия и экология. – 2013. – № 1. – С. 102–107.

24. Перспективы развития функциональных продуктов питания / И. А. Евдокимов, В. В. Крючкова, В. Ю. Контарева, [и др.] // Молочная промышленность. – 2016. – № 7. – С. 36.
25. Родичева, Э. К. Биолюминесцентные биотесты на основе свяжющихся бактерий для экологического мониторинга / Э. К. Родичева, А. М. Кузнецов, С. Е. Медведева // Вестник ОГУ. – 2004. – № 5. – С. 96–100.
26. Рынок растительных экстрактов к 2026 году достигнет \$55,3 млрд. – URL: <https://pharmprom.ru/rynok-rastitelnykh-ekstraktov-k-2026-godu-dostignet-553-mlrd>
27. Сазыкина, М. А. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод / М. А. Сазыкина, Е. А. Мирина, И. С. Сазыкин // Вода: Химия и экология. – 2015. – № 10. – С. 67–79.
28. Семенов, Г. В. Современные направления научных исследований и технические решения по интенсификации процесса сублимационной сушки в пищевой промышленности, фармпроизводствах и прикладной биотехнологии (Часть 2) / Г. В. Семенов, М. С. Булкин, А. В. Кузнецов // Процессы и аппараты пищевых производств. – 2015. – № 2. – С. 112–124.
29. Тарун, Е. И. Сравнение антиоксидантной активности галловой, кофейной и хлорогеновой кислот / Е. И. Тарун, В. П. Курченко // Экологический вестник. – 2015. – № 1 (31). – С. 51–56.
30. Тимофеев, Н. П. Потенциал экистероид синтезирующих растений для фитобиотиков (обзор) / Н. П. Тимофеев // International Agricultural Journal. – 2021. – Т. 64, № 6. – С. 46–112.
31. Тимофеев, Н. П. Распределение 20-гидроксиэкидизона в структуре биомассы надземной части *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin / Н. П. Тимофеев, В. В. Володин, Ю. М. Фролов // Растительные ресурсы. – 1998. – Т. 34, № 3. – С. 63–69.
32. Фабрика здоровых продуктов. – URL: <https://madeintatarstan.ru/-node/356>

33. Фармакологическая активность кофейной кислоты / Р. И. Лукашов, Д. В. Моисеев, В. Н. Столярова [и др.] // Вестник фармации. – 2012. – Т. 57, № 3. – С. 61–65.
34. Функциональные продукты: как тренд на суперфуды захватил мир и добрался до России. – URL: <https://milknews.ru/longridy/funkcionalniye-produkty.html>
35. Хишова, О. М. Таблетирование лекарственного сырья. – Витебск, 2005. – С. 57–63.
36. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Verberidaceae / В. И. Дейнеко, В. А. Хлебников, В. Н. Сорокопудов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 57–61.
37. Хобракова, В. Б. Иммуномодулирующее действие экстракта сухого *Rharrhonicum uniflorum* (L.) DC. при экспериментальном иммунодефиците / В. Б. Хобракова, Н. К. Татарина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т. 21, № 2. – Р. 49–52.
38. Хромато-масс-спектрометрия этанольного экстракта ятрышника пятнистого (*Orchis maculata*, семейство орхидных) / А. А. Хадарцев, Г. Т. Сухих, М. В. Волочаева [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2019. – Т. 13, № 4. – С. 102–121.
39. Цыбульский, И. Е. Новые биосенсоры для мониторинга токсичности среды на основе морских люминесцентных бактерий / И. Е. Цыбульский, М. А. Сазыкина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46 (5). – С. 552–557.
40. Черная Книга флоры Сибири / А. Л. Эбель, А. Н. Куприянов, Т. О. Стрельникова [и др.]. – Новосибирск : Академическое издательство «Гео», 2016. – 440 с.
41. Чуклин, Р. Е. Биологическая активность кофейной и феруловой кислот / Р. Е. Чуклин, М. А. Оганова, М. Н. Ивашев // International Journal on Immunorehabilitation. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 141.

42. 20-Hydroxyecdysone ameliorates metabolic and cardiovascular dysfunction in high-fat-high-fructose-fed ovariectomized rats / J. Buniam, N. Chukijrunroat, Y. Rattanavichit [et al.] // BMC complementary medicine and therapies. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 1–12.
43. 20-Hydroxyecdysone, from plant extracts to clinical use: Therapeutic potential for the treatment of neuromuscular, cardio-metabolic and respiratory diseases / L. Dinan, W. Dioh, S. Veillet [et al.] // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9, № 5. – P. 492.
44. A comparative study on root and bark extracts of *Eleutherococcus senticosus* and their effects on human macrophages / L. Jin, M. Schmiech, M. El Gaafary [et al.] // Phytomedicine. – 2020. – Vol. 68. – P. 153181.
45. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies / T. Belwal, S. M. Ezzat, L. Rastrelli [et al.] // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2018. – Vol. 100. – P. 82–102.
46. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation / B. Bahramnejad, M. Najji, R. Bose [et al.] // Biotechnology Advances. – 2019. – Vol. 37, № 7. – P. 107405.
47. A new respirometric endpoint-based biosensor to assess the relative toxicity of chemicals on immobilized human cells / R. Dragone, C. Frazzoli, C. Grappelli [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2009. – Vol. 72 (1). – P. 273–279.
48. A novel salvialactomine from the callus culture of *Salvia santolinifolia* Boiss / T. Jan, R. Qadri, B. Naqvi [et al.] // Natural Product Research. – 2018. – Vol. 32, № 7. – P. 749–754.
49. A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide / L. Y. Liao, Y. F. He, L. Li [et al.] // Chinese Medicine. – 2018. – Vol. 13, № 1. – P. 1–12.
50. A review of *Acanthopanax senticosus* (Rupr and Maxim.) harms: From ethnopharmacological use to modern application / A. Jia, Y. Zhang, H. Gao [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2021. – Vol. 268. – P. 113586.

51. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products / F. Chemat, M. A. Vian, A. S. Fabiano-Tixier [et al.] // *Green Chemistry*. – 2020. – Vol. 22, № 8. – P. 2325–2353.
52. A review on the immunomodulatory activity of *Acanthopanax senticosus* and its active components / K. M. Lau, G. G. L. Yue, Y. Y. Chan [et al.] // *Chinese Medicine*. – 2019. – Vol. 14, № 1. – P. 1–6.
53. A study of glycaemic effects following acute anthocyanin-rich blueberry supplementation in healthy young adults / L. Bell, D. J. Lamport, L. T. Butler [et al.] // *Food and Function*. – 2017. – Vol. 8, № 9. – P. 3104–3110.
54. A suspension culture of the hormone autotrophic cell line of *Aralia elata* (Miq.) Seem. for production of oleanolic acid and flavonoids / Y. Sui, J. X. Liu, Y. Zhao [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2022. – Vol. 176. – P. 114368.
55. A UPLC/MS-based metabolomics investigation of the protective effect of ginsenosides Rg1 and Rg2 in mice with Alzheimer's disease / N. Li, Y. Liu, W. Li [et al.] // *Journal of Ginseng Research*. – 2016. – Vol. 40, № 1. – P. 9–17.
56. *Acanthopanax senticosus* polysaccharide suppressing proliferation and metastasis of the human non-small cell lung cancer NCI-H520 cells is associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling / D. Sun, J. Chen, H. Hu [et al.] // *Neoplasma*. – 2019. – Vol. 66, № 4. – P. 555–563.
57. *Acanthopanax senticosus* reduces brain injury in mice exposed to low linear energy transfer radiation / A. Y. Zhou, B. W. Song, C. Y. Fu [et al.] // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 99. – P. 781–790.
58. Acharya, K. Total phenolic contents and antioxidant effects of infusion and decoction from *Lepista sordida* (Schumach.) Singer / K. Acharya, S. Ghosh, R. Biswas // *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – Vol. 43, № 1. – P. 17–24.
59. Acikgoz, M. A. Effects of sorbitol on the production of phenolic compounds and terpenoids in the cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L / M. A. Acikgoz // *Biologia*. – 2021. – Vol. 76, № 1. – P. 395–409.

60. Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry / Y. Chen, W. Zhang, T. Zhao [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 194. – P. 712–722.
61. Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials / N. Srivastava, A. Singh, P. Kumari [et al.] // *Natural bioactive compounds. Technological advancements* / eds. R. Sinha, D.-P. Häder. Academic Press, 2021. – P. 409–433.
62. Advances in separation and purification of bioactive polysaccharides through high-speed counter-current chromatography / Y. Yang, B. M. Khan, X. Zhang [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2020. – Vol. 58, № 10. – P. 992–1000.
63. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review / C. Wen, J. Zhang, H. Zhang [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2018. – Vol. 48. – P. 538–549.
64. Advances of ionic liquids in analytical chemistry / M. J. Trujillo-Rodriguez, H. Nan, M. Varona [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 91, № 1. – P. 505–531.
65. Advances of supercritical fluid chromatography in lipid profiling / Y. Yang, Y. Liang, J. Yang [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1–8.
66. Al Juhaimi, F. Effect of cold press and soxhlet extraction systems on fatty acid, tocopherol contents, and phenolic compounds of various grape seed oils / F. Al Juhaimi, M. M. Özcan // *Journal of Food Processing and Preservation*. – 2018. – Vol. 42, № 1. – P. e13417.
67. Alara, O. R. Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Kinetic modelling and process intensification / O. R. Alara, N. H. Abdurahman // *Industrial Crops and Products*. – 2019. – Vol. 137. – P. 528–535.
68. Alara, O. R. Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity / O. R. Alara, N. H. Abdurahman,

C. I. Ukaegbu // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. – 2018. – Vol. 11. – P. 12–17.

69. An efficient hairy root system for withanolide production in *Withania somnifera* (L.) Dunal / A. Shajahan, C. Thilip, K. Faizal [et al.] // *Production of plant derived natural compounds through hairy root culture* / ed. S. Malik. – Cham : Springer, 2017. – P. 133–143.

70. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction / M. Maric, A. N. Grassino, Z. Zhu [et al.] // *Trends in Food Science and Technology*. – 2018. – Vol. 76. – P. 28–37.

71. Analgesic components of saposchnikovia root (*Saposhnikovia divaricata*) / E. Okuyama, T. Hasegawa, T. Matsushita [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2001. – Vol. 49, № 2. – P. 154–160.

72. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp / F. Pellati, S. Benvenuti, L. Magro [et al.] // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2004. – Vol. 35, № 2. – P. 289–301.

73. Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells / R. Caparica, A. Julio, M. E. M. Araujo [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 233.

74. Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona cherimola* miller and rutin on alloxan-induced diabetic rats / F. Calzada, J. I. Solares-Pascasio, R. M. Ordoñez-Razo [et al.] // *Pharmacognosy Research*. – 2017. – Vol. 9, № 1. – P. 1.

75. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids / Y. Zhao, J. Wang, O. Ballevre [et al.] // *Hypertension Research*. – 2012. – Vol. 35, № 4. – P. 370–375.

76. Anti-inflammatory and antioxidant effects of 2, 7-dihydroxy-4, 6-dimethoxy phenanthrene isolated from *Dioscorea batatas* Decne / J. S. Lim, D. Hahn, M. J. Gu [et al.] // *Applied Biological Chemistry*. – 2019. – Vol. 62, № 1. – P. 1–9.



77. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules / J. B. Calixto, M. M. Campos, M. F. Otuki [et al.] // *Planta Med.* – 2004. – № 70. – P. 93–103.
78. Anti-inflammatory constituents from the roots of *Saposhnikovia divaricate* / Y. W. Chin, Y. H. Jung, H. S. Chae [et al.] // *Bulletin of the Korean Chemical Society.* – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 2132–2134.
79. Antioxidant activity assessment of *Tamus communis* L. roots / F. Zerargui, A. Baghiani, S. Khennouf [et al.] // *Int J Pharm Pharm Sci.* – 2016. – Vol. 8, № 12. – P. 64–71.
80. Antioxidant activity of hydroxystilbene derivatives in homogeneous solution / R. Amorati, M. Lucarini, V. Mugnaini [et al.] // *J. Org. Chem.* – 2004. – № 69 (21). – P. 7101–7107.
81. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models / H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani [et al.] // *Phytother. Res.* – 2015. – Vol. 29, № 3. – P. 323–331.
82. Antioxidant and DNA repair stimulating effect of extracts from transformed and normal roots of *Rhaponticum carthamoides* against induced oxidative stress and DNA damage in CHO cells / E. Skala, P. Sitarek, M. Rozalski [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2016. – Vol. 2016.
83. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-arthritic activities of methanol extract of *Tamus communis* L. roots / N. Amraoui, N. Mayouf, N. Charef [et al.] // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* – 2019. – Vol. 18, № 7. – P. 1499–1506.
84. Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats / J. Wang, H. Zhu, Z. Yang [et al.] // *Indian J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 45, № 4. P. 395–398.
85. Antitumor activity of ginsenoside Rg3 in melanoma through downregulation of the ERK and Akt pathways / L. Meng, R. Ji, X. Dong [et al.] // *International Journal of Oncology.* – 2019. – Vol. 54, № 6. – P. 2069–2079.

86. Antitumor molecular mechanism of chlorogenic acid on inducing genes *gsk-3 $\beta$*  and *apc* and inhibiting gene  $\beta$ -catenin / R. Xu, Q. Kang, J. Ren [et al.] // *J. of Analytical Methods in Chemistry*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–7.
87. Anxiolytic effects of *Acanthopanax senticosus* HARMS occur via regulation of autonomic function and activate hippocampal BDNF–TrkB signaling / S. Miyazaki, H. Oikawa, H. Takekoshi [et al.] // *Molecules*. – 2018. – Vol. 24, № 1. – P. 132.
88. Application of response surface methodology to optimise ultrasonic-assisted extraction of four chromones in *Radix Saposhnikoviae* / W. Li, Z. Wang, Y. S. Sun [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 2011. – Vol. 22, № 4. – P. 313–321.
89. Application of UV-B radiation for enhancing the accumulation of bioactive phenolic compounds in pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] hairy root cultures / Q. Y. Gai, Y. Lu, J. Jiao [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2022. – Vol. 228. – P. 112406.
90. Ardalani, H. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent / H. Ardalani, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan // *Avicenna Journal of Phytomedicine*. – 2017. – Vol. 7, № 4. – P. 285.
91. Arvindekar, A. U. Assessment of conventional and novel extraction techniques on extraction efficiency of five anthraquinones from *Rheum emodi* / A. U. Arvindekar, G. R. Pereira, K. S. Laddha // *Journal of Food Science and Technology*. – 2015. – Vol. 52, № 10. – P. 6574–6582.
92. *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect the genotoxic effects of mercury fumes on eukaryotes / G. D. Sousa, T. D. Zucchi, F. D. Zucchi [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2009. – Vol. 8 (2). – P. 404–413.
93. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds / M. G. Pereira, F. Hamerski, E. F. Andrade [et al.] // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2017. – Vol. 128. – P. 338–348.
94. Atherogenic diet induced lipid accumulation induced NF $\kappa$ B level in heart, liver and brain of Wistar rat and diosgenin as an anti-inflammatory agent / A. Binesh,

S. N. Devaraj, D. Halagowder [et al.] // Life Sciences. – 2018. – Vol. 196. – P. 28–37.

95. Bacanlı, M. The antioxidant, cytotoxic, and antigenotoxic effects of galangin, puerarin, and ursolic acid in mammalian cells / M. Bacanlı, A. A. Başaran, N. Başaran // Drug and chemical toxicology. – 2017. – Vol. 40, № 3. – P. 256–262.

96. Bakhtiar, Z. Long-term cell suspension culture of *Thymus persicus* (Lamiaceae): A novel approach for the production of anti-cancer triterpenic acids / Z. Bakhtiar, M. H. Mirjalili // Industrial Crops and Products. – 2022. – Vol. 181. – P. 114818.

97. Bioactive compounds biosynthesis and metabolism in fruit and vegetables / A. Francini, M. Pintado, G. A. Manganaris [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2020. – № 11. – P. 129.

98. Biomonitoring the environmental impact of atmospheric emissions from the Avonmouth zinc smelter. United Kingdom / I. Sims, M. Crane, I. Johnson [et al.] // Ecotoxicology. – 2009. – Vol. 18 (7). – P. 961–970.

99. Biophysical and *in vivo* studies identify a new natural-based polyphenol, counteracting A $\beta$  oligomerization *in vitro* and A $\beta$  oligomer-mediated memory impairment and neuroinflammation in an acute mouse model of Alzheimer's disease / S. Tomaselli, P. La Vitola, K. Pagano [et al.] // ACS Chem. Neurosci. – 2019. – № 10. – P. 4452–4465.

100. Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: Biotechnological aspects / I. Süntar, S. Çetinkaya, Ü. S. Haydaroglu [et al.] // Biotechnology Advances. – 2021. – Vol. 50. – P. 107768.

101. Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects / A. Valdiani, O. K. Hansen, U. B. Nielsen [et al.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2019. – Vol. 39, № 1. – P. 20–34.

102. Biosensor-based comparison of the ecotoxicological contamination of the wastewaters of Southern Russia and Southern Germany / I. S. Sazykin,

M. A. Sazykina, L. E. Khmelevtsova [et al.] // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2016. – Vol. 13 (3). – P. 945–954.

103. Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia* / W. K. Kayani, B. H. Kiani, E. Dilshad [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 34, № 4. – P. 1–14.

104. Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview / L. Changxing, S. Galani, F. U. Hassan [et al.] // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2020. – Vol. 132. – P. 110918.

105. Biotic elicitors enhance diosgenin production in *Helicteres isora* L. suspension cultures via up-regulation of CAS and HMGR genes / S. Shaikh, V. Shriram, T. Khare [et al.] // Physiology and Molecular Biology of Plants. – 2020. – Vol. 26, № 3. – P. 593–604.

106. Biotic elicitors: A boon for the *in vitro* production of plant secondary metabolites / R. Bhaskar, L. S. E. Xavier, G. Udayakumaran [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2022. – Vol. 149. – P. 7–24.

107. Bonner, J. Plant tissue cultures from a hormone point of view / J. Bonner // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1936. – Vol. 22, № 6. – P. 426.

108. Braun, A. C. The physiology of plant tumors / A. C. Braun // Annual Review of Plant Physiology. – 1954. – Vol. 5, № 1. – P. 133–162.

109. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance / L. Bravo // Nutr. Rev. – 1998. – № 56. – P. 313–333.

110. Bulut-Solak, B. Composition, morphology and pasting properties of *Orchis anatolica* tuber gum / B. Bulut-Solak, L. Alonso-Miravalles, J. A. O'Mahony // Food Hydrocolloids. – 2017. – Vol. 69. – P. 483–490.

111. Camptothecine and methoxy camptothecine from callus cultures of *Miquelia dentata* Bedd. – A rare plant of the Western Ghats of India / H. N. Thriveni, G. Ravikanth, R. Vasudeva [et al.] // Indian Journal of Biotechnology. – 2015. – Vol. 14. – P. 123–126.

112. Capasso, F. Sterol constituents of *Tamus communis* L / F. Capasso, F. De Simone, F. Senatore // Journal of Ethnopharmacology. – 1983. – Vol. 8, № 3. – P. 327–329.

113. Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica* / T. Khan, B. H. Abbasi, A. Zeb [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2018. – Vol. 126. – P. 168–176.

114. Cell cultures and hairy roots as platform for production of high-value metabolites: Current approaches, limitations, and future prospects / P. I. Angulo-Bejarano, S. Paul, M. D. Donato-Capote [et al.] // Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications / eds. R. Sathishkumar, S. R. Kumar, J. Hema [et al.]. – Singapore : Springer, 2019. – P. 23–57.

115. Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production / U. Karki, H. Fang, W. Guo [et al.] // Plant Cell Reports. – 2021. – Vol. 40, № 7. – P. 1087–1099.

116. Chakraborty, S. Prevention and repair of DNA damage by selected phytochemicals as measured by single cell gel electrophoresis / S. Chakraborty, M. Roy, R. K. Bhattacharya // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. – 2004. – № 23 (3). – P. 215–226.

117. Characterization of metabolites in *Saposhnikovia divaricata* root from Mongolia / Z. Batsukh, K. Toume, B. Javzan [et al.] // Journal of Natural Medicines. – 2021. – Vol. 75, № 1. – P. 11–27.

118. Chemical constituents of *Panax ginseng* and *Panax notoginseng* explain why they differ in therapeutic efficacy / H. Liu, X. Lu, Y. Hu [et al.] // Pharmacological research. – 2020. – Vol. 161. – P. 105263.

119. Chemical constituents of the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata* and their cytotoxic activity / A. Yokosuka, S. Tatsuno, T. Komine [et al.] // Natural Product Communications. – 2017. – Vol. 12, № 2.

120. Chemical eustress elicits tailored responses and enhances the functional quality of novel food / Y. Roupael, M. C. Kyriacou, P. Carillo [et al.] // *Perilla frutescens*. *Molecules*. – 2019. – № 24 (1). – P. 185.

121. Chemical profile and antioxidant activity of sage herbal dust extracts obtained by supercritical fluid extraction / B. Pavlic, O. Bera, N. Teslic [et al.] // *Industrial crops and products*. – 2018. – Vol. 120. – P. 305–312.

122. Chitosan elicitation of saponin accumulation in *Psammosilene tunicoides* hairy roots by modulating antioxidant activity, nitric oxide production and differential gene expression / H. Qiu, L. Su, H. Wang [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2021. – Vol. 166. – P. 115–127.

123. Chromones and coumarins from *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. Growing in Buryatia and Mongolia and their cytotoxicity / B. M. Urbagarova, E. E. Shults, V. V. Taraskin [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2020. – Vol. 261. – P. 112517.

124. Chua, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities / L. S. Chua // *J. Ethnopharmacol.* – 2013. – Vol. 150, № 3. – P. 805–817.

125. Coffee and sweetened beverage consumption and the risk of type 2 diabetes mellitus (abstract) / N. P. Paynter, H. C. Yeh, S. Voutilainen [et al.] // *American Journal of Epidemiology*. – 2006. – Vol. 164, № 11. – P. 1075–1084.

126. Cognitive ameliorating effect of *acanthopanax koreanum* against scopolamine-induced memory impairment in mice / S. Lee, H. J. Park, S. J. Jeon [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2017. – Vol. 31, № 3. – P. 425–432.

127. Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds / L. Wen, Z. Zhang, D. W. Sun [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2020. – Vol. 60, № 11. – P. 1826–1841.

128. Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review / P. Putnik, Ž. Kresoja, T. Bosiljkov [et al.] // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 279. – P. 150–161.

129. Conidi, C. Membrane-based agro-food production processes for polyphenol separation, purification and concentration / C. Conidi, E. Drioli, A. Cassano // *Current Opinion in Food Science*. – 2018. – Vol. 23. – P. 149–164.

130. Conidi, C. Membrane diafiltration for enhanced purification of biologically active compounds from goji berries extracts / C. Conidi, A. Cassano, E. Drioli // *Separation and Purification Technology*. – 2022. – Vol. 282. – P. 119991.

131. Curcumin, a natural isolate from *Curcuma longa* (turmeric) with high  $\beta$ -hematin inhibitory potential / S. Abu-Lafi, M. Akkawi, Q. Abu-Remeleh [et al.] // *Pharmacy and Pharmacology International Journal*. – 2019. – № 7 (1). – P. 22–26.

132. Dairy products supplemented with chitosan and sodium alginate protect the stomachs of rats with aspirin-induced lesions / R. O. Budkevich, I. A. Evdokimov, Zh. V. Buchakhchyan [et al.] // *Agro Food Industry Hi-Tech*. 2015. Vol. 26, № 1. C. 42–44.

133. De Sotillo, D. R. Potato Peel Extract a Nonmutagenic Antioxidant with Potential Antimicrobial Activity / D. R. De Sotillo, M. Hadley, C. Wolf-Hall // *Journal of Food Science*. – 1998. – Vol. 63, № 5. – P. 907–910.

134. Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach / G. A. Tuskan, R. Mewalal, L. E. Gunter [et al.] // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13, № 8. – P. e0202519.

135. Determination of the Qualitative Composition of Biologically Active Substances of Extracts of in Vitro Callus, Cell Suspension, and Root Cultures of the Medicinal Plant *Rhaponticum Carthamoides* / L. Asyakina, L. Dyshlyuk, S. Sukhikh [et al.] // *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, № 6. P. 2555.

136. Development of hybrid solar distillation system for essential oil extraction / A. Afzal, A. Munir, A. Ghafoor [et al.] // *Renewable Energy*. – 2017. – Vol. 113. – P. 22–29.

137. Development of *Origanum vulgare* cell suspension culture to produce polyphenols and the stimulation effect of salicylic acid elicitation and phenylalanine

feeding / Y. P. Li, D. B. Tang, X. Q. Wang [et al.] // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2021. – Vol. 26, № 3. – P. 456–467.

138. Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) inhibition by furofuran lignans from stems of *Acanthopanax senticosus* / B. B. Li, J. L. Li, N. Li [et al.] // *Archives of Pharmacal Research*. – 2017. – Vol. 40, № 11. – P. 1271–1277.

139. Ding, J. Polysaccharides derived from *Saposhnikovia divaricata* may suppress breast cancer through activating macrophages / J. Ding, Y. Guo, X. Jiang // *OncoTargets and therapy*. – 2020. – Vol. 13. – P. 10749.

140. Dioscin induces gallbladder cancer apoptosis by inhibiting ROS-mediated PI3K/AKT signaling / X. Song, Z. Wang, H. Liang [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. – 2017. – Vol. 13, № 6. – P. 782.

141. Diosgenin inhibited the expression of TAZ in hepatocellular carcinoma / Z. Chen, J. Xu, Y. Wu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 503, № 3. – P. 1181–1185.

142. Diosgenin inhibits angiotensin II-induced extracellular matrix remodeling in cardiac fibroblasts through regulating the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway / H. T. Zhou, X. F. Yu, G. M. Zhou // *Molecular Medicine Reports*. – 2017. – Vol. 15, № 5. – P. 2823–2828.

143. Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: Effective therapies against different chronic diseases / D. Parama, M. Boruah, K. Yachna [et al.] // *Life Sciences*. – 2020. – Vol. 260. – P. 118182.

144. Ecdysterones from *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin reduce hippocampal excitotoxic cell loss and upregulate mTOR signaling in rats / J. Wu, L. Gao, L. Shang [et al.] // *Fitoterapia*. – 2017. – Vol. 119. – P. 158–167.

145. Effect of drought stress on physiological characteristics and quality of *Saposhnikovia divaricata* / Z. Han, Y. Wang, M. Xu [et al.] // *Journal of Northwest A and F University-Natural Science Edition*. – 2017. – Vol. 45, № 11. – P. 100–106.

146. Effect of gamma rays and colchicine on silymarin production in cell suspension cultures of *Silybum marianum*: a transcriptomic study of key genes



involved in the biosynthetic pathway / H. A. El-Garhy, H. S. Sherif, S. M. Soliman [et al.] // *Gene*. – 2021. – Vol. 790. – P. 145700.

147. Effect of *in vitro* morphogenesis on the production of podophyllotoxin derivatives in callus cultures of *Linum album* / L. Lalaleo, P. Testillano, M. C. Risueño [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2018. – Vol. 228. – P. 47–58.

148. Effect of light and mechanical stress in combination with chemical elicitors on the production of stilbene compounds and defensive responses in peanut hairy root culture / P. Wongshaya, P. Chayjarung, C. Tothong [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2020. – Vol. 157. – P. 93–104.

149. Effect of ultraviolet-C radiation and melatonin stress on biosynthesis of antioxidant and antidiabetic metabolites produced in *in vitro* callus cultures of *Lepidium sativum* L / M. A. Ullah, D. Tungmunnithum, L. Garros [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 7. – P. 1787.

150. Effects of anthocyanins on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / L. Yang, W. Ling, Z. Du [et al.] // *Advances in Nutrition*. – 2017. – Vol. 8, № 5. – P. 684–693.

151. Effects of drought stress on the antioxidant system, osmolytes and secondary metabolites of *Saposhnikovia divaricata* seedlings / Y. Men, D. Wang, B. Li [et al.] // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2018. – Vol. 40, № 11. – P. 1–14.

152. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring / Y. Nikaido, K. Yoshizawa, N. Danbara [et al.] // *Reprod. Toxicol.* – 2004. – № 18 (6). – P. 803–811.

153. Effects of pulsed electric field-assisted treatment on the extraction, antioxidant activity and structure of naringin / D. Niu, E. F. Ren, J. Li [et al.] // *Separation and Purification Technology*. – 2021. – Vol. 265. – P. 118480.

154. Effects of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on the lipid profile of perimenopausal and postmenopausal women – A systematic review and meta-analysis / W. Kanadys, A. Baranska, M. Jedrych [et al.] // *Maturitas*. – 2020. – Vol. 132. – P. 7–16.

155. Efferth, T. Biotechnology applications of plant callus cultures / T. Efferth // *Engineering*. – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 50–59.
156. Eisath, N. G. Supercritical fluid chromatography in natural product analysis—an update / N. G. Eisath, S. Sturm, H. Stuppner // *Planta Medica*. – 2018. – Vol. 84, № 06/07. – P. 361–371.
157. Elad, T. Broad spectrum detection and «barcoding» of water pollutants by a genome-wide bacterial sensor array / T. Elad, S. Belkin // *Water Res.* – 2013. – Vol. 47 (11). – P. 3782–3790.
158. Eliciting effect of foliar application of chitosan lactate on the phytochemical properties of *Ocimum basilicum* L. and *Melissa officinalis* L / B. Hawrylak-Nowak, S. Dresler, K. Rubinowska [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 342. – P. 128358.
159. Engineering considerations to produce bioactive compounds from plant cell suspension culture in bioreactors / E. A. Motolinia-Alcantara, C. O. Castillo-Araiza, M. Rodriguez-Monroy [et al.] // *Plants*. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 2762.
160. Enhanced production of camptothecin and biological preparation of N 1-acetylkynuramine in *Camptotheca acuminata* cell suspension cultures / Y. Yang, X. Pu, X. Qu [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 101, № 10. – P. 4053–4062.
161. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum* / M. Perassolo, A. B. Cardillo, M. L. Mugas [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2017. – Vol. 105. – P. 124–132.
162. Enhancing the secondary metabolite and anticancer activity of *Echinacea purpurea* callus extracts by treatment with biosynthesized ZnO nanoparticles / N. Karimi, M. Behbahani, G. Dini [et al.] // *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. – 2018. – Vol. 9, № 4. – P. 045009.
163. Enzyme-assisted extraction of polyphenol from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot: Ultra-filtration performance and HPLC-MS2 profile /

Z. Zhu, S. Li, J. He [et al.] // Food Research International. – 2018. – Vol. 111. – P. 291–298.

164. Enzyme-assisted optimized supercritical fluid extraction to improve *Medicago sativa* polyphenolics isolation / A. Krakowska, K. Rafinska, J. Walczak [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2018. – Vol. 124. – P. 931–940.

165. Erkoc, S. Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers / S. Erkoc, F. Erkoc, N. Keskin // J. Mol. Struct. – 2003. – № 631. – P. 141–146.

166. Ethanol extracts of *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC flowers attenuate doxorubicin-induced cardiotoxicity via alleviating apoptosis and regulating mitochondrial dynamics in H9c2 cells / B. Hu, D. Zhen, M. Bai [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2022. – P. 114936.

167. Evaluation of phenotypic diversity of the endangered orchid (*Orchis mascula*): Emphasizing on breeding, conservation and development / A. Ebrahimi, A. Asadi, S. R. Monfared [et al.] // South African Journal of Botany. – 2020. – Vol. 132. – P. 304–315.

168. Evaluation of the lifespan extension effects of several Turkish medicinal plants in *Caenorhabditis elegans* / N. Ergen, S. H. Coşkun, D. D. Orhan [et al.] // Turkish Journal of Biology. – 2018. – Vol. 42, № 2. – P. 163–173.

169. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress-and aging-related diseases / A. G. Panossian, T. Efferth, A. N. Shikov [et al.] // Medicinal Research Reviews. – 2021. – Vol. 41, №1. – P. 630–703.

170. Extraction and purification of anthocyanins: A review / J. Tan, Y. Han, B. Han [et al.] // Journal of Agriculture and Food Research. – 2022. – P. 100306.

171. Extraction of edible avocado oil using supercritical CO<sub>2</sub> and a CO<sub>2</sub>/ethanol mixture as solvents / S. C. Corzzini, H. D. Barros, R. Grimaldi [et al.] // Journal of Food Engineering. – 2017. – Vol. 194. – P. 40–45.

172. Extraction of pectin from the peels of pomelo by high-speed shearing homogenization and its characteristics / X. Guo, W. Zhao, X. Liao [et al.] // LWT-Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 79. – P. 640–646.

173. Extraction of rosmarinic acid from *Perilla* seeds using green protic ionic liquids / W. Li, Y. Fan, S. Zhang [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2021. – Vol. 170. – P. 106667.
174. Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves by high-speed shear homogenization extraction / S. Xu, G. Wang, R. Guo [et al.] // *Journal of Food Processing and Preservation*. – 2019. – Vol. 43, № 12. – P. e14250.
175. Extraction techniques for plant-based bio-active compounds / P. Yolci Omeroglu, B. Acoglu, T. Ozdal [et al.] // *Natural bio-active compounds* / eds. M. K. Swamy, M. S. Akhtar. – Singapore : Springer, 2019. – P. 465-49.
176. Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review / J. Cui, X. Duan, L. Ke [et al.] // *Fitoterapia*. – 2021. – V. 157. – P. 105106.
177. Fan, Y. Adsorption and purification of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi extract by ionic liquids (ILs) grafted silica / Y. Fan, D. Wu, S. Zhang // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 8. – P. 2322.
178. Filova, A. Improved taxanes production in callus cultures of *Taxus baccata* L / A. Filova, E. Krivosudska // *Research Journal of Agricultural Science*. – 2017. – Vol. 49, № 1. – P. 3–11.
179. Findings of Russian literature on the clinical application of *Eleutherococcus Senticosus* (Rupr. & Maxim.): A narrative review / S. Gerontakos, J. Wardle, A. Taylor [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2021. – Vol. 278. – P. 114274.
180. Flash extraction and physicochemical characterization of oil from *Elaeagnus mollis* Diels seeds / L. Kan, L. Wang, Q. Ding [et al.] // *Journal of Oleo Science*. – 2017. – Vol. 66, № 4. – P. 345–352.
181. Flash extraction optimization of low-temperature soluble pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and its soft gelation properties / Y. Lin, H. He, Q. Huang [et al.] // *Food and Bioproducts Processing*. – 2020. – Vol. 123. – P. 409–418.

182. Flavonoid epimers from custard apple leaves, a rapid screening and separation by HSCCC and their antioxidant and hypoglycaemic activities evaluation / H. Zhu, L. Chen, J. Yu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1–11.
183. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups / C. G. Heijen, G. R. M. M. Haenen, F. A. van Acker [et al.] // *Toxicol. In Vitro*. – 2001. – № 15. – P. 3–6.
184. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs / G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo [et al.] // *Life Sci*. – 1999. – № 65. – P. 337–353.
185. Formica, J. F. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids / J. F. Formica, W. Regelson // *Food Chem. Tox.* – 1995. – № 33. – P. 1061–1080.
186. Four new neolignans isolated from *Eleutherococcus senticosus* and their protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity (PTP1B) / L. Zhang, B. B. Li, H. Z. Li [et al.] // *Fitoterapia*. – 2017. – Vol. 121. – P. 58–63.
187. Four new polyacetylenes from the roots of *Saposhnikovia divaricata* / Y. Sun, Y. P. Sun, Y. Liu [et al.] // *Natural Product Research*. – 2020. – P. 1–8.
188. FPX is a novel chemical inducer that promotes callus formation and shoot regeneration in plants / T. Nakano, S. Tanaka, M. Ohtani [et al.] // *Plant and Cell Physiology*. – 2018. – Vol. 59, № 8. – P. 1555–1567.
189. Franzoni, G. Bioactive molecules as regulatory signals in plant responses to abiotic stresses / G. Franzoni, A. Trivellini, R. Bulgari // *Plant Signaling Molecules*. – 2019. – P. 169–182.
190. Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization / N. A. Sagar, S. Pareek, S. Sharma [et al.] // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2018. – Vol. 17, № 3. – P. 512–531.
191. Gantait, S. Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect / S. Gantait, E. Mukherjee // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 105, № 1. – P. 35–53.

192. Garmashov, S. Yu. Technological parameters of countercurrent extraction: deriving bioactive compounds from plant raw materials / S. Yu. Garmashov, A. V. Izgaryshev, E. V. Kashirskih // *Science Evolution*. – 2016. – № 1. – С. 8–15.

193. GC-MS analysis of steroids and triterpenoids occurring in leaves and tubers of *Tamus edulis* Lowe / A. Rogowska, M. Styczynski, C. Paczkowski [et al.] // *Phytochemistry Letters*. – 2019. – Vol. 30. – P. 231–234.

194. Gelvin, S. B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome / S. B. Gelvin // *Annual Review of Genetics*. – 2017. – Vol. 51. – P. 195–217.

195. Genetically modified crops: current status and future prospects / K. Kumar, G. Gambhir, A. Dass [et al.] // *Planta*. – 2020. – Vol. 251, № 4. – P. 1–27.

196. Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment / T. Xu, D. M. Close, C. S. Saylor [et al.] // *Ecological Indicators*. – 2013. – Vol. 28. – P. 125–141.

197. Georgiev, M. I. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds / M. I. Georgiev, J. Weber, A. Maciuk // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2009. – № 83 (5). – P. 809–823.

198. Ghimire, B.K. Identification of elicitors enhances the polyphenolic compounds and pharmacological potential in hairy root cultures of *Aster scaber* / B. K. Ghimire, M. Thiruvengadam, I. M. Chung // *South African Journal of Botany*. – 2019. – Vol. 125. – P. 92–101.

199. Ginsenoside compound K regulates amyloid  $\beta$  via the Nrf2/Keap1 signaling pathway in mice with scopolamine hydrobromide-induced memory impairments / Q. Yang, J. Lin, H. Zhang [et al.] // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 67, № 1. – P. 62–71.

200. Ginsenoside Rb1 inhibit apoptosis in rat model of Alzheimer's disease induced by A $\beta$ 1-40 / Y. Wang, Y. Li, W. Yang [et al.] // *American Journal of Translational Research*. – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 796.

201. Ginsenoside Rb1 retards aging process by regulating cell cycle, apoptotic pathway and metabolism of aging mice / S. Yu, H. Xia, Y. Guo [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2020. – Vol. 255. – P. 112746.

202. Ginsenoside Rc from *Panax ginseng* exerts anti-inflammatory activity by targeting TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor-3 and p38/ATF-2 / T. Yu, Y. Yang, Y. S. Kwak [et al.] // *Journal of Ginseng Research*. – 2017. – Vol. 41, № 2. – P. 127–133.

203. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 $\beta$ /tau signaling pathway and the A $\beta$  formation prevention in rats / X. Y. Song, J. F. Hu, S. F. Chu [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 710, № 1–3. – P. 29–38.

204. Ginsenoside Rg3 decreases NHE1 expression via inhibiting EGF-EGFR-ERK1/2-HIF-1  $\alpha$  pathway in hepatocellular carcinoma: a novel antitumor mechanism / X. Li, J. Tsauo, C. Geng [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2018. – Vol. 46, № 08. – P. 1915–1931.

205. Ginsenoside Rg3 prevents cognitive impairment by improving mitochondrial dysfunction in the rat model of alzheimer's disease / Y. Zhang, X. Yang, S. Wang [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 67, № 36. – P. 10048–10058.

206. Ginsenoside Rg3 targets cancer stem cells and tumor angiogenesis to inhibit colorectal cancer progression in vivo / Y. C. Tang, Y. Zhang, J. Zhou [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2018. – Vol. 52, № 1. – P. 127–138.

207. Ginsenoside Rh2 enhances the antitumor immunological response of a melanoma mice model / M. Wang, S. J. Yan, H. T. Zhang [et al.] // *Oncology Letters*. – 2017. – Vol. 13, № 2. – P. 681–685.

208. Glazowska, J. Chromatographic separation, determination and identification of ecdysteroids: Focus on Maral root (*Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*) / J. Glazowska, M. M. Kaminski, M. Kaminski // *Journal of Separation Science*. – 2018. – Vol. 41, № 23. – P. 4304–4314.

209. Global analysis of ginsenoside Rg1 protective effects in  $\beta$ -amyloid-treated neuronal cells / J. S. Shim, M. Y. Song, S. V. Yim [et al.] // *Journal of Ginseng Research*. – 2017. – Vol. 41, № 4. – P. 566–571.

210. Global Plant Extracts Market Report 2021: Market to Reach \$73.2 Billion by 2027 – Phytomedicines & Herbal Extracts to Account for \$34.8 Billion – ResearchAndMarkets.com. – URL: <https://www.businesswire.com/news/home/20210622005615/en/Global-Plant-Extracts-Market-Report-2021-Market-to-Reach-73.2-Billion-by-2027---Phytomedicines-Herbal-Extracts-to-Account-for-34.8-Billion---ResearchAndMarkets.com>

211. Goncalves, S. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools / S. Goncalves, A. Romano // *Secondary Metabolites-Sources and Applications*. – 2018. – Vol. 5. – P. 81–99.

212. Green extraction of essential oils, polyphenols, and pectins from orange peel employing solar energy: Toward a zero-waste biorefinery / S. Hilali, A. S. Fabiano-Tixier, K. Ruiz [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2019. – Vol. 7, № 13. – P. 11815–11822.

213. Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry / A. Agrawal, R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorpbeh [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 143. – P. 116383.

214. Grown to be blue–antioxidant properties and health effects of colored vegetables. Part II: Leafy, fruit, and other vegetables / F. Di Gioia, N. Tzortzakis, Y. Rouphael [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – № 9 (2). – P. 97.

215. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves / R. Kurata, M. Adachi, O. Yamakawa [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 55, № 1. – P. 185–190.

216. Hairy root culture: a biotechnological approach to produce valuable metabolites / H. Vaghari, H. Jafarizadeh-Malmiri, N. Anarjan [et al.] // *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture* / eds. V. S. Meena, P. K. Mishra, J. K. Bisht [et al.]. – Singapore: Springer, 2017. – P. 131–160.



217. Hairy root cultures – a versatile tool with multiple applications / N. Gutierrez-Valdes, S. T. Häkkinen, C. Lemasson [et al.] // *Frontiers in plant science*. – 2020. – P. 33.

218. Hanasaki, Y. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids / Y. Hanasaki, S. Ogawa, S. Fukui // *Free Radic. Boil. Med.* – 1994. – № 16. – P. 845–850.

219. Harborne, J. B. Advances in flavonoid research since 1992 / J. B. Harborne, Ch. A. Williams // *Phytochemistry*. – 2000. – № 55. – P. 481–504.

220. Health benefits and limitations of rutin-A natural flavonoid with high nutraceutical value / R. Semwal, S. K. Joshi, R. B. Semwal [et al.] // *Phytochemistry Letters*. – 2021. – Vol. 46. – P. 119–128.

221. Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms / M. Leri, M. Scuto, M. L. Ontario [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – № 21. – P. 1250.

222. Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage / S. Liu, W. Hou, P. Yao [et al.] // *Toxicol. In Vitro*. – 2012. – Vol. 26, № 1. – P 74–80.

223. Herbal Extracts Market Size, Growth. – URL: <https://dataintelo.com/-report/herbal-extractsmarket/#:~:text=The%20global%20herbal%20extracts%20market,various%20applications%20across%20various%20industries>

224. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats / K. M. Kamel, O. M. Abd El-Raouf, S. A. Metwally [et al.] // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2014. – Vol. 28, № 7. – P. 312–319.

225. High pressure intrusion of water and LiCl aqueous solutions in hydrophobic KIT-6 mesoporous silica: Influence of the grafted group nature / M. Pillot, B. Lebeau, H. Nouali [et al.] // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2019. – Vol. 280. – P. 248–255.

226. High-speed countercurrent chromatography as an efficient technique for large separation of plant polyphenols: a review / L. Li, J. Zhao, T. Yang [et al.] // *Food Research International*. – 2022. – P. 110956.

227. Histone acetylation orchestrates wound-induced transcriptional activation and cellular reprogramming in *Arabidopsis* / B. Rymen, A. Kawamura, A. Lambolez [et al.] // *Communications biology*. – 2019. – Vol. 2, № 1. – P. 1–15.

228. Holistic quality evaluation of *Saposhnikovia* Radix (*Saposhnikovia divaricata*) by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography coupled with ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based untargeted metabolomics / S. Wang, Y. Qian, M. Sun [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 13, № 12. – P. 8835–8847.

229. Herbal extracts on the Russian market decreased by 5.9% in 2017. – URL: <https://www.indexbox.ru/news/rossijskij-rynok-rastitelnyh-ehkstraktov-v-2017-godu-sokratilsya-na-5-9>

230. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia *Astragalus danicus* in different regions / O. Babich, A. Prosekov, A. Zaushintsena [et al.] // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5, № 8. – P. e02245.

231. Identification of secondary metabolites in *Tripterygium wilfordii* hairy roots and culture optimization for enhancing wilforgine and wilforine production / B. Zhang, M. Chen, S. Pu [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2020. – Vol. 148. – P. 112276.

232. Improvement in flavonoids and phenolic acids production and pharmaceutical quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by ultraviolet-B irradiation / A. Ghasemzadeh, S. Ashkani, A. Baghdadi [et al.] // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21, № 9. – P. 1203.

233. Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes / S. J. Marathe, S. B. Jadhav, S. B. Bankar [et al.] // *Current opinion in food science*. – 2019. – Vol. 25. – P. 62–72.

234. *In situ* and *de novo* biosynthesis of vitamin C in wild type and transgenic tomato hairy roots: a precursor feeding study / A. L. W. Oller, E. Agostini, S. R. Milrad [et al.] // *Plant science*. – 2009. – Vol. 177, № 1. – P. 28–34.

235. Induction of G2/M phase arrest by diosgenin via activation of Chk1 kinase and Cdc25C regulatory pathways to promote apoptosis in human breast cancer cells / W. L. Liao, J. Y. Lin, J. C. Shieh [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 21, № 1. – P. 172.

236. Influence of co-solvents on fucoxanthin and phlorotannin recovery from brown seaweed using supercritical CO<sub>2</sub> / P. S. Saravana, A. T. Getachew, Y. J. Cho [et al.] // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2017. – Vol. 120. – P. 295–303.

237. Influence of light on the accumulation of anthocyanins in callus culture of *Vaccinium corymbosum* L. cv. Sunt Blue Giant / G. R. Abou El-Dis, K. L. Zavdetovna, A. A. Nikolaevich [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 2021. – Vol. 8. – P. 100058.

238. Inhibition of human glioma cell proliferation by altered Bax/Bcl-2-p53 expression and apoptosis induction by *Rhaponticum carthamoides* extracts from transformed and normal roots / E. Skala, P. Sitarek, M. Toma [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2016. – Vol. 68, № 11. – P. 1454–1464.

239. Insight into polysaccharides from *Panax ginseng* CA Meyer in improving intestinal inflammation: modulating intestinal microbiota and autophagy / D. Wang, S. Shao, Y. Zhang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 683911.

240. Integrated process for extraction and formulation in emulsions of active molecules from fresh passion fruits (*Passiflora edulis* Sims) / A. Delvar, P. de Caro, L. Candy [et al.] // *Journal of Food Engineering*. – 2019. – Vol. 263. – P. 388–397.

241. Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. decoction and infusion / Z. Ozer, T. Kılıc, S. Carıkcı [et al.] // *Balıkesir Universitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. – 2018. – Vol. 20, № 1. – P. 212–218.

242. Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends / S. P. Ventura, F. A. e Silva,

M. V. Quental [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2017. – Vol. 117, № 10. – P. 6984–7052.

243. Iron and zinc oxide nanoparticles: An efficient elicitor to enhance trigonelline alkaloid production in hairy roots of fenugreek / N. Tariverdizadeh, M. Mohebodini, E. Chamani [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 162. – P. 113240.

244. Isoflavone production in hairy root cultures and plantlets of *Trifolium pratense* / A. Reis, S. Boutet-Mercey, S. Massot [et al.] // *Biotechnology letters*. – 2019. – Vol. 41, № 3. – P. 427–442.

245. Isolation and purification of anthocyanin from blueberry using macroporous resin combined Sephadex LH-20 techniques / H. Xue, L. Shen, X. Wang [et al.] // *Food Science and Technology Research*. – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 29–38.

246. Isolation of strawberry anthocyanins using high-speed counter-current chromatography and the copigmentation with catechin or epicatechin by high pressure processing / H. Zou, Y. Ma, Z. Xu [et al.] // *Food chemistry*. – 2018. – Vol. 247. – P. 81–88.

247. Ito, Y. High-speed preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge / Y. Ito, J. Sandlin, W. G. Bowers // *Journal of Chromatography A*. – 1982. – Vol. 244, № 2. – P. 247–258.

248. Jagetia, G. C. Radioprotection by mangiferin in DBAxC57BL mice: a preliminary study / G. C. Jagetia, M. S. Baliga // *Phytomedicine*. – 2005. – № 12. – P. 209–215.

249. Jagetia, G. C. Mangiferin protects human peripheral blood lymphocytes against  $\gamma$ -radiation-induced DNA strand breaks: a fluorescence analysis of DNA unwinding assay / G. C. Jagetia, V. A. Venkatesha // *Nutrition Research*. – 2006. – № 26. – P. 303–311.

250. Jassim, S. A. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective / S. A. A. Jassim, M. A. Naji // *J. of Applied Microbiology*. – 2003. – Vol. 95, № 3. – P. 412–427.

251. Jegal, J. A review of the different methods applied in ginsenoside extraction from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* roots / J. Jegal, E. J. Jeong, M. H. Yang // *Natural Product Communications*. – 2019. – Vol. 14, № 9.
252. Jha, A. K. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review / A. K. Jha, N. Sit // *Trends in Food Science and Technology*. – 2021. – Vol. 119. – P. 579–591.
253. Jiang, T. Extraction, purification and applications of curcumin from plant materials-A comprehensive review / T. Jiang, R. Ghosh, C. Charcosset // *Trends in Food Science and Technology*. – 2021. – Vol. 112. – P. 419–430.
254. Kamil Hussain, M. Techniques for extraction, isolation, and standardization of bio-active compounds from medicinal plants / M. Kamil Hussain, M. Saquib, M. Faheem Khan // *Natural bio-active compounds* / eds. M. K. Swamy, M. S. Akhtar. – Singapore : Springer, 2019. – P. 179–200.
255. Karuppaiya, P. Enhanced production of podophyllotoxin, kaempferol, and quercetin from callus culture of *Dyosma pleiantha* (Hance) Woodson: An endangered medicinal plant / P. Karuppaiya, H. S. Tsay // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2020. – Vol. 67, № 1. – P. 95–104.
256. Khan, S. Molecular mechanism of inflammatory signaling and predominant role of *Saposhnikovia divaricata* as anti-inflammatory potential / S. Khan, Y. S. Kim // *Natural Product Sciences*. – 2013. – Vol. 19, № 2. – P. 120–126.
257. Khezerluo, M. Sodium nitroprusside stimulated production of tropane alkaloids and antioxidant enzymes activity in hairy root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L / M. Khezerluo, B. Hosseini, J. Amiri // *Acta Biologica Hungarica*. – 2018. – Vol. 69, № 4. – P. 437–448.
258. Kim, H. S. Ultra-performance convergence chromatography method for the determination of four chromones and quality control of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk / H. S. Kim, G. Choi, A. Y. Lee // *Journal of Separation Science*. – 2018. – Vol. 41, № 7. – P. 1682–1690.

259. Kim, J. H. Pharmacological and medical applications of *Panax ginseng* and ginsenosides: a review for use in cardiovascular diseases / J. H. Kim // Journal of Ginseng Research. – 2018. – Vol. 42, № 3. – P. 264–269.
260. Kokoska, L. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review / L. Kokoska, D. Janovska // Phytochemistry. – 2009. – Vol. 70, №7. – P. 842–855.
261. Liu, S. L. Advance in study on chemical constituents of *Saposhnikovia divaricate* and their pharmacological effects / S. L. Liu // Chinese Traditional and Herbal Drugs. – 2017. – P. 2146–2152.
262. Liu, Y. Ginsenoside Rg5 induces apoptosis and autophagy via the inhibition of the PI3K/Akt pathway against breast cancer in a mouse model / Y. Liu, D. Fan // Food and Function. – 2018. – Vol. 9, № 11. – P. 5513–5527.
263. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.
264. Lo, H. H. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora / H. H. Lo, J. G. Chung // Anticancer Res. – 1999. – Vol. 19, № 1a. – P. 133–139.
265. Lotocka, B. Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae) / B. Lotocka, A. Geszprych // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2004. – Vol. 144, № 2. – P. 207–233.
266. Lung cancer inhibitory activity of dietary berries and berry polyphenolics / F. Aqil, J. Jeyabalan, H. Kausar [et al.] // Journal of Berry Research. – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 105–114.
267. Mao, X. M. Diosgenin suppresses cholangiocarcinoma cells via inducing cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis / X. M. Mao, P. Zhou, S. Y. Li // OncoTargets and therapy. – 2019. – Vol. 12. – P. 9093.

268. Martin, J. Recovery of anthocyanins using membrane technologies: A review / J. Martin, E. J. Diaz-Montana, A. G. Asuero // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 48, № 3. – P. 143–175.
269. Mas-Bargues, C. The multimodal action of genistein in Alzheimer's and other age-related diseases / C. Mas-Bargues, C. Borrás, J. Vina // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2022. – Vol. 183. – P. 127–137.
270. Mass spectrometry-based urinary metabolomics for the investigation on the mechanism of action of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. leaves against ischemic stroke in rats / R. Wang, L. Shi, S. Liu [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2019. – Vol. 241. – P. 111969.
271. Matveeva, T. V. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of plants for improvement of yields of secondary metabolites / T. V. Matveeva, S. V. Sokornova // *Bioprocessing of plant in vitro systems* / eds. A. Pavlov, T. Bley. – Cham : Springer, 2018. – P. 161–202.
272. Mechanochemical assisted extraction: A novel, efficient, eco-friendly technology / K. Wu, T. Ju, Y. Deng [et al.] // *Trends in Food Science and Technology*. – 2017. – Vol. 66. – P. 166–175.
273. Mechanochemical-assisted extraction and pharmacological study of triterpenoids from *Antrodia camphorata* / R. He, K. Wu, A. Zhang [et al.] // *Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 9, № 20. – P. 4281.
274. Medicinal plants from the 14<sup>th</sup> edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates / A. N. Shikov, I. A. Narkevich, E. V. Flisyuk [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2021. – Vol. 268. – P. 113685.
275. Medicinal plants to strengthen immunity during a pandemic / O. Babich, S. Sukhikh, A. Prosekov [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2020. – Vol. 13, № 10. – P. 1–18.
276. Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: A comprehensive review / R. Castro-Munoz, G. Boczka, E. Gontarek [et al.] // *Trends in Food Science and Technology*. – 2020. – Vol. 95. – P. 219–232.

277. Metabolites in plants and its classification / R. Irchhaiya, A. Kumar, A. Yadav [et al.] // World J Pharm Pharm Sci. – 2015. – № 4 (1). – P. 287–305.
278. Microwave-assisted extraction and membrane-based separation of biophenols from red wine lees / J. A. A. Meija, G. P. Parpinello, A. Versari [et al.] // Food and Bioproducts Processing. – 2019. – Vol. 117. – P. 74–83.
279. Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds / S. Pimentel-Moral, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 156. – P. 313–322.
280. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction / K. Kaderides, L. Papaoikonomou, M. Serafim [et al.] // Chemical Engineering and Processing-Process Intensification. – 2019. – Vol. 137. – P. 1–11.
281. Mirabella, N. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review / N. Mirabella, V. Castellani, S. Sala // J. Clean. Prod. – 2014. – № 65. – P. 28–41.
282. Mishra, J. N. An overview on *Panax ginseng* / J. N. Mishra, N. K. Verma // International J Pharma Chemical Res. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 516–522.
283. Modeling and measurement of a whole-cell bioluminescent biosensor based on a single photon avalanche diode / R. Daniel, R. Almog, A. Ron [et al.] // Biosens. Bioelectron. – 2008. – Vol. 24 (4). – P. 888–893.
284. Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes / N. Mahato, M. Sinha, K. Sharma [et al.] // Foods. – 2019. – Vol. 8, № 11. – P. 523.
285. Modified plant metabolites as nutraceuticals / O. N. Surendran, M. Haridas, G. Szakacs [et al.] // Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects. – 2020. – P. 167–180.
286. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases /



A. Roohbakhsh, H. Parhiz, F. Soltani [et al.] // *Life Sci.* – 2015. – Vol. 124. – P. 64–74.

287. Molecular mechanisms of plant regeneration / M. Ikeuchi, D. S. Favero, Y. Sakamoto [et al.] // *Annual Review of Plant Biology.* – 2019. – Vol. 70. – P. 377–406.

288. Morphological characterization of *Coelogyne spp* for germplasm conservation of orchids / S. Hartati, E. S. Muliawati, P. Pardono [et al.] // *Revista Ceres.* – 2019. – Vol. 66. – P. 265–270.

289. Multi-response optimization of enzyme-assisted maceration to enhance the yield and antioxidant activity of *Cassia fistula* pods extracts / W. Haider, B. Sultana, M. Mushtaq [et al.] // *Journal of Food Measurement and Characterization.* – 2018. – Vol. 12, № 4. – P. 2685–2694.

290. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia plantarum.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.

291. Murray, P. J. Macrophage polarization / P. J. Murray // *Annual Review of Physiology.* – 2017. – Vol. 79. – P. 541–566.

292. Muruganadan, S. Immunotherapeutic effect of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes neutrophils and macrophages / S. Muruganadan, J. Gupta, P. K. Lal // *Toxicology.* – 2005. – № 215. – P. 57–68.

293. Nag, S. Optimization of ultrasound assisted enzymatic extraction of polyphenols from pomegranate peels based on phytochemical content and antioxidant property / S. Nag, N. Sit // *Journal of Food Measurement and Characterization.* – 2018. – Vol. 12, № 3. – P. 1734–1743.

294. Narayani, M. Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production / M. Narayani, S. Srivastava // *Phytochemistry Reviews.* – 2017. – Vol. 16, № 6. – P. 1227–1252.

295. Natural deep eutectic solvents couple with integrative extraction technique as an effective approach for mulberry anthocyanin extraction / N. Guo, Y. W. Jiang, L. T. Wang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 296. – P. 78–85.

296. Natural polyphenols and their synthetic analogs as emerging anticancer agents / R. Colomer, A. Sarrats, R. Lupu [et al.] // *Curr. Drug Targets*. – 2017. – № 18. – P. 147–159.

297. Naturally present metal ions in plants could interfere with common antioxidant assays / T. Tomova, V. Petkov, I. Slavova [et al.] // *MethodsX*. – 2020. – Vol. 7. – P. 100995.

298. Nekratova, N. A. Medicinal plants in the Altai Mountains: reserves of raw materials and annual possible volumes of harvesting / N. A. Nekratova, M. N. Shurupova // *International Journal of Environmental Studies*. – 2015. – Vol. 72, № 3. – P. 490–500.

299. Neuroprotective effect of bilberry extract in a murine model of photo-stressed retina / H. Osada, T. Okamoto, H. Kawashima [et al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 6. – P. e0178627.

300. Neuroprotective effect of ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment induced by isoflurane anesthesia in aged rats via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects mediated by the PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway / Y. Zhang, Z. Zhang, H. Wang [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2016. – Vol. 14, № 3. – P. 2778–2784.

301. Neuroprotective effects of ginsenoside Rf on amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity in vitro and in vivo / Y. Du, M. Fu, Y. T. Wang [et al.] // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2018. – Vol. 64, № 1. – P. 309–322.

302. Olas, B. Berry phenolic antioxidants – implications for human health? / B. Olas // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – № 78.

303. Olas, B. Resveratrol reduces oxidative stress induced by platinum compounds in blood platelets / B. Olas, B. Wachowicz // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2004. – № 23 (3). – P. 315–326.

304. Oleanolic acid induces apoptosis and autophagy via the PI3K/AKT/mTOR pathway in AGS human gastric cancer cells / J. H. Lee, E. S. Yoo, S. H. Han [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2021. – Vol. 87. – P. 104854.

305. Olive mill wastewater polyphenol-enriched fractions by integrated membrane process: A promising source of antioxidant, hypolipidemic and hypoglycaemic compounds / R. Tundis, C. Conidi, M. R. Loizzo [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, № 7. – P. 602.

306. Opportunities for using biologically active substances *Rhodiola rosea* L. in the production of functional food with consideration for antimicrobial activity / A. Zaushintsena, O. Babich, E. Bryukhachev [et al.] // *E3S Web of Conferences*. 2020. – Vol. 176. – P. 01011.

307. Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains / W. Setyaningsih, I. E. Saputro, C. A. Carrera [et al.] // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 288. – P. 221–227.

308. Optimization of mechanochemical-assisted extraction of hesperidin from *Pericarpium citri Reticulatae* / T. Jin, M. Yu, M. Cao [et al.] // *Food Science and Technology*. – 2021.

309. Optimization of the enzyme-assisted extraction of fructans from the wild sotol plant (*Dasyilirion wheeleri*) / M. A. Sanchez-Madrigal, S. L. Viesca-Nevarez, A. Quintero-Ramos [et al.] // *Food Bioscience*. – 2018. – Vol. 22. – P. 59–68.

310. Optimization of the pulsed electric field-assisted extraction of functional compounds from cinnamon / B. Pashazadeh, A. H. Elhamirad, H. Hajnajari [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Vol. 23. – P. 101461.

311. Optimization of trans lutein from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peel by ultrasound-assisted extraction / J. Song, Q. Yang, W. Huang [et al.] // *Food and Bioproducts Processing*. – 2018. – Vol. 107. – P. 104–112.

312. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep) /

R. Nuerxiati, A. Abuduwaili, P. Mutailifu [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 141. – P. 431–443.

313. Optimized flash extraction and UPLC-MS analysis on antioxidant compositions of *Nitraria sibirica* fruit / Q. Song, X. Xia, C. Ji [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2019. – Vol. 172. – P. 379–387.

314. Pan, C. Preparative separation of quercetin, ombuin and kaempferide from *Gynostemma pentaphyllum* by high-speed countercurrent chromatography / C. Pan, H. Lu // Journal of chromatographic science. – 2019. – Vol. 57, № 3. – P. 265–271.

315. Panossian, A. Effects of anti-inflammatory and adaptogenic herbal extracts on gene expression of eicosanoids signaling pathways in isolated brain cells / A. Panossian, E. J. Seo, T. Efferth // Phytomedicine. – 2019. – Vol. 60. – P. 152881.

316. Pharmacognostic Evaluation and HPLC-PDA and HS-SPME/GC-MS Metabolomic Profiling of *Eleutherococcus Senticosus* Fruits / F. Graczyk, M. Balcerek, D. Załuski [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 7. – P. 1969.

317. Pharmacological effects of active saponins from *Panax ginseng* Meyer / S. J. Bae, J. S. Kang, G. J. Rho [et al.] // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2019. – Vol. 18, № 3. – P. 555–561.

318. Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides / Z. A. Ratan, M. F. Haidere, Y. H. Hong [et al.] // Journal of Ginseng Research. – 2021. – Vol. 45, № 2. – P. 199–210.

319. Phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives from *Dioscorea communis* with anticholinesterase, and antioxidant activities / A. Boudjada, A. Touil, C. Bensouici [et al.] // Natural Product Research. – 2019. – Vol. 33, № 22. – P. 3278–3282.

320. Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity / A. Kovacs, P. Forgo, I. Zupko [et al.] // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 68, № 5. – P. 687–691.

321. Phenanthrenes in Chinese yam peel exhibit anti-inflammatory activity, as shown by strong *in vitro* cyclooxygenase enzyme inhibition / Q. Li, C. R. Zhang, A. A. Dissanayake [et al.] // *Natural Product Communications*. – 2016. – Vol. 11, № 9.
322. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet / S. Gonçalves, E. Moreira, C. Grosso [et al.] // *Journal of Food Science and Technology*. – 2017. – Vol. 54, № 1. – P. 219–227.
323. Physical and ecological impacts of chromones of fresh root of *Saposhnikovia divaricata* exposure to high temperature / H. Jiang, J. M. Yang, G. Z. Jia [et al.] // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2018. – Vol. 65, № 5. – P. 680–687.
324. Physiological and pharmacological features of the non-saponin components in Korean Red Ginseng / S. H. Hyun, S. W. Kim, H. W. Seo [et al.] // *Journal of Ginseng Research*. – 2020. – Vol. 44, № 4. – P. 527–537.
325. Phytochemical characteristics of callus suspension culture of *Helicteres angustifolia* L. and its *in vitro* antioxidant, antidiabetic and immunomodulatory activities / X. Yang, Z. Lei, Y. Yu [et al.] // *South African Journal of Botany*. – 2019. – Vol. 121. – P. 178–185.
326. Phytochemical constituents and pharmacological potential of *Tamus communis* rhizomes / I. Slavova, T. Tomova, S. Kusovska [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 6. – P. 1851.
327. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts / K. P. Ingle, A. G. Deshmukh, D. A. Padole [et al.] // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 32–36.
328. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts / A. Altemimi, N. Lakhssassi, A. Baharlouei [et al.] // *Plants*. – 2017. – Vol. 6, № 4. – P. 42.

329. Phyto-factories of anti-cancer compounds: a tissue culture perspective / P. Patel, V. Patel, A. Modi [et al.] // Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 1–21.
330. Plant adaptogens – history and future perspectives / V. Todorova, K. Ivanov, C. Delattre [et al.] // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, № 8. – P. 2861.
331. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl, P. Meier, I. Stutz [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 102, № 20. – P. 8661–8675.
332. Plant cell cultures: An enzymatic tool for polyphenolic and flavonoid transformations / T. A. Mohamed, S. K. Ali, A. I. Elshamy [et al.] // Phytomedicine. – 2022. – P. 154019.
333. Plant Extracts Market by Product Type (Oleoresins, Essential Oils, Flavonoids, Alkaloids, Carotenoids), Application (Food & Beverages, Cosmetics, Pharmaceuticals, Dietary Supplements), Form, Source and Region – Global Forecast to 2027. – URL: [https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-extracts-market-942.html#utm\\_source=PRnewswire&utm\\_medium=Referral&utm\\_campaign=PaidPR](https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/plant-extracts-market-942.html#utm_source=PRnewswire&utm_medium=Referral&utm_campaign=PaidPR)
334. Plant Extracts Market worth \$55.3 billion by 2026 – Exclusive Report by MarketsandMarkets™. – URL: <https://www.prnewswire.com/news-releases/plant-extracts-market-worth-55-3-billion-by-2026--exclusive-report-by-marketsandmarkets-301290678.html>
335. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity / N. Shen, T. Wang, Q. Gan [et al.] // Food Chemistry. – 2022. – P. 132531.
336. Plants of the Russian Federation pharmacopeia: an unexhausted natural products research opportunity? / E. Chupakhin, O. Babich, M. Krasavin [et al.] // Natural Product Research. – 2021. – Vol. 35, № 21. – P. 3525–3527.
337. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? / J. L. Verdeil, L. Alemanno, N. Niemenak [et al.] // Trends in Plant Science. – 2007. – Vol. 12, № 6. – P. 245–252.

338. Polysaccharides from *Panax ginseng* CA Meyer alleviated DSS-induced IBD by inhibiting JAK2/STAT1/NLPR3 inflammasome signalling pathway in mice / Y. Li, P. Yu, W. Fu [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2022. – Vol. 91. – P. 105013.
339. Preparative separation of five polyphenols from the fruits of *Sorbus pohuashanensis* Hedl. by high-speed counter-current chromatography / S. Sun, X. Xin, L. Zhu [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2021. – Vol. 1172. – P. 122620.
340. Preparative separation of six compounds from *Salvia yunnanensis* Radix using pH-zone-refining counter-current chromatography / T. Ma, X. Wang, L. Li [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 2021. – Vol. 35, № 11. – P. e5182.
341. Pressurized hot water extraction of bioactive compounds from artichoke by-products / I. Pagano, A. L. Piccinelli, R. Celano [et al.] // *Electrophoresis*. – 2018. – Vol. 39, № 15. – P. 1899–1907.
342. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc / D. T. V. Pereira, A. G. Tarone, C. B. B. Cazarin [et al.] // *Journal of Food Engineering*. – 2019. – Vol. 240. – P. 105–113.
343. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent / D. C. Okiyama, I. D. Soares, M. S. Cuevas [et al.] // *Food Research International*. – 2018. – Vol. 114. – P. 20–29.
344. Prior, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage / R. L. Prior // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – № 78. – P. 570–578.
345. Production of flavonoids in callus cultures of *Sophora flavescens* Aiton / J. S. Park, Z. K. Seong, M. S. Kim [et al.] // *Plants*. – 2020. – Vol. 9, № 6. – P. 688.
346. Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms / N. Kallscheuer, T. Classen, T. Drepper [et al.] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2019. – № 56. – P. 7–17.
347. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells

/ C. F. Wu, A. Karioti, D. Rohr [et al.] // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 201. – P. 292–297.

348. Production of squalene with promising antioxidant properties in callus cultures of *Nilgirianthus ciliates* / R. Rameshkumar, L. Satish, S. Pandian [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2018. – Vol. 126. – P. 357–367.

349. Production of Verbascoside, Isoverbascoside and Phenolic acids in callus, suspension, and bioreactor cultures of *Verbena officinalis* and biological properties of biomass extracts / P. Kubica, A. Szopa, A. Kokotkiewicz [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 23. – P. 5609.

350. Productivity of a preparative high-performance liquid chromatography isolation of anacardic acids from cashew nut shell liquid / F. Oiram Filho, G. J. Zocolo, K. M. Canuto [et al.] // Separation Science Plus. – 2019. – Vol. 2, № 6. – P. 192–199.

351. Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity / A. Gokcimen, A. Cim, H. T. Tola [et al.] // Hum. and Exp. Toxicol. – 2007. – Vol. 26, № 6. – P. 519–525.

352. Protective effects of ginsenoside Rg1 against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice through inhibiting toll-like receptor 4 signaling pathway / C. Ning, X. Gao, C. Wang [et al.] // International Immunopharmacology. – 2018. – Vol. 61. – P. 266–276.

353. Protective effects of ginsenoside Rg1 on splenocytes and thymocytes in an aging rat model induced by d-galactose / J. Sun, L. Zhang, J. Zhang [et al.] // International Immunopharmacology. – 2018. – Vol. 58. – P. 94–102.

354. Protective effects of syringin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice / A. Zhang, Z. Liu, L. Sheng [et al.] // Journal of Surgical Research. – 2017. – Vol. 209. – P. 252–257.

355. Pulsed electric fields (PEF), pressurized liquid extraction (PLE) and combined PEF+ PLE process evaluation: Effects on *Spirulina* microstructure, biomolecules recovery and Triple TOF-LC-MS-MS polyphenol composition /



J. Zhou, M. Wang, H. Berrada [et al.] // Innovative Food Science and Emerging Technologies. – 2022. – Vol. 77. – P. 102989.

356. Purification, structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Saposhnikovia divaricata* / M. E. N. G. Yao, Y. I. Lin, C. H. E. N. Lei [et al.] // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2019. – Vol. 17, № 10. – P. 792–800.

357. Purugganan, M. D. The nature of selection during plant domestication / M. D. Purugganan, D. Q. Fuller // Nature. – 2010. – № 457. – P. 843–848.

358. Qin, D. Flash extraction: An ultra-rapid technique for acquiring bioactive compounds from plant materials / D. Qin, J. Xi // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 112. – P. 581–591.

359. Radioprotective effects of active compounds of *Acanthopanax senticosus* from the Lesser Khingan Mountain range in China / W. Song, J. Shi, D. Baranenko [et al.] // RSC advances. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 65–72.

360. Rapid characterisation and identification of compounds in *Saposhnikovia Radix* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation quadrupole time-of-flight mass spectrometry / L. Chen, X. Chen, L. Su [et al.] // Natural Product Research. – 2018. – Vol. 32, № 8. – P. 898–901.

361. Razavizadeh, R. Chitosan effects on the elevation of essential oils and antioxidant activity of *Carum copticum* L. seedlings and callus cultures under *in vitro* salt stress / R. Razavizadeh, F. Adabavazeh, S. Komatsu // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. – 2020. – Vol. 29, № 3. – P. 473–483.

362. Reactive oxygen species mediate the chemopreventive effects of syringin in breast cancer cells / C. H. Lee, C. W. Huang, P. C. Chang [et al.] // Phytomedicine. – 2019. – Vol. 61. – P. 152844.

363. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review / J. Zhang, C. Wen, H. Zhang [et al.] // Trends in Food Science and Technology. – 2020. – Vol. 95. – P. 183–195.

364. Recent advances in the pharmacological activities of dioscin / L. Yang, S. Ren, F. Xu [et al.] // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 2019.
365. Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins / W. Kalt, A. Cassidy, L. R. Howard [et al.] // *Advances in Nutrition*. – 2020. – Vol. 11, № 2. – P. 224–236.
366. Renard, C. Bioactives in fruit and vegetables and their extraction processes: State of the art and perspectives / C. Renard // *Bio2actives 2017*. – 2017.
367. Response of *Saponaria officinalis* L. hairy roots to the application of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in terms of production of valuable polyphenolic compounds and SO6 protein / A. Hedayati, F. Naseri, E. Nourozi [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2022. – Vol. 178. – P. 80–92.
368. *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract has potent anticancer activity in human leukemia and lung adenocarcinoma cell lines / E. Skala, E. Synowiec, T. Kowalczyk [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2018. – Vol. 2018.
369. *Rhaponticum carthamoides* transformed root extract inhibits human glioma cells viability, induces double strand DNA damage, H2A. X phosphorylation, and PARP1 cleavage / E. Skala, M. Toma, T. Kowalczyk [et al.] // *Cytotechnology*. – 2018. – Vol. 70, № 6. – P. 1585–1594.
370. Rhizogenic agrobacteria as an innovative tool for plant breeding: current achievements and limitations / S. Desmet, E. Dhooghe, E. De Keyser [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, № 6. – P. 2435–2451.
371. Riedel, K. Microbial sensors on a respiratory basis for wastewater monitoring / K. Riedel, G. Kunze, A. König // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 75. – P. 81–118.
372. Rigacci, S. Nutraceuticals and amyloid neurodegenerative diseases: A focus on natural polyphenols / S. Rigacci, M. Stefani // *Exp. Rev. Neurother.* – 2014. – № 15. – P. 41–52.

373. Roberts, D. P. Sustainable crop production systems and human nutrition / D. P. Roberts, A. K. Mattoo // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. – 2019. – № 3. – P. 72.
374. Rodsamran, P. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions / P. Rodsamran, R. Sothornvit // *Food Bioscience*. – 2019. – Vol. 28. – P. 66–73.
375. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases / J. H. Kim, Y. S. Yi, M. Y. Kim [et al.] // *Journal of Ginseng Research*. – 2017. – Vol. 41, № 4. – P. 435–443.
376. Role of mangiferin on biochemical alteration and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats / S. Prabhu, M. Jainu, K. E. Sabitha [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2006. – № 107. – P. 126–133.
377. Roles of rutin in cardiac remodeling / H. N. Siti, J. Jalil, A. Y. Asmadi [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2020. – Vol. 64. – P. 103606.
378. Rostami, H. Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Malva sylvestris*: Process optimization and potential functionalities / H. Rostami, S. M. T. Gharibzahedi // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 101. – P. 196–206.
379. Rutin alleviates hypoxia/reoxygenation-induced injury in myocardial cells by up-regulating SIRT1 expression / H. Yang, C. Wang, L. Zhang [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2019. – Vol. 297. – P. 44–49.
380. Rutin ameliorates inflammation and improves metabolic function: A comprehensive analysis of scientific literature / N. Muvhulawa, P. V. Dlodla, K. Ziqubu [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2022. – P. 106163.
381. Rutin ameliorates metabolic acidosis and fibrosis in alloxan induced diabetic nephropathy and cardiomyopathy in experimental rats / D. Ganesan, A. Albert, E. Paul [et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2020. – Vol. 471, № 1. – P. 41–50.

382. Rutin attenuates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide in an *in vitro* mouse muscle cell (C2C12) model / S. Liu, D. Adewole, L. Yu [et al.] // Poultry science. – 2019. – Vol. 98, № 7. – P. 2756–2764.

383. Rutin improves cardiac and erythrocyte membrane–Bound ATPase activities in male rats exposed to cadmium chloride and lead acetate / O. I. Oluranti, V. A. Adeyemo, E. O. Achile [et al.] // Biological Trace Element Research. – 2022. – Vol. 200, № 3. – P. 1181–1189.

384. Rutin mitigates hepatic fibrogenesis and inflammation through targeting TLR4 and P2X7 receptor signaling pathway *in vitro* and *in vivo* / L. S. Hou, Z. Y. Cui, P. Sun [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2020. – Vol. 64. – P. 103700.

385. Salehi, M. Synergistic effect of coronatine and sorbitol on artemisinin production in cell suspension culture of *Artemisia annua* L. cv. Anamed / M. Salehi, G. Karimzadeh, M. R. Naghavi // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2019. – Vol. 137, № 3. – P. 587–597.

386. Salehi, M. A novel medium for enhancing callus growth of hazel (*Corylus avellana* L.) / M. Salehi, A. Moieni, N. Safaie // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1–9.

387. Salve, R. R. Comprehensive study of different extraction methods of extracting bioactive compounds from Pineapple Waste – A Review / R. R. Salve, S. Ray // The Pharma Innovation International Journal. – 2020. – Vol. 9. – P. 327–340.

388. Salycilic acid induces exudation of crocin and phenolics in saffron suspension-cultured cells / A. Moradi, F. Zarinkamar, S. De Domenico [et al.] // Plants. – 2020. – Vol. 9, № 8. – P. 949.

389. *Saposhnikovia divaricata* – An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review / M. Yang, C. C. Wang, W. L. Wang [et al.] // Chinese Journal of Integrative Medicine. – 2020. – Vol. 26, № 11. – P. 873–880.

390. *Saposhnikovia divaricata*: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review / J. Kreiner, E. Pang, G. B. Lenon [et al.] // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2017. – Vol. 15, № 4. – P. 255–264.

391. Savithramma, N. Screening of medicinal plants for secondary metabolites / N. Savithramma, M. Linga Rao, D. Suhrulatha // Middle-East Journal of Scientific Research. – 2011. – № 8. – P. 579–584.

392. Screening the anti-allergic components in *Saposhnikovia Radix* using high-expression Mas-related G protein-coupled receptor X2 cell membrane chromatography online coupled with liquid chromatography and mass spectrometry / Q. Jia, W. Sun, L. Zhang [et al.] // Journal of Separation Science. – 2019. – Vol. 42, № 14. – P. 2351–2359.

393. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield / T. Isah, S. Umar, A. Mujib [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2018. – Vol. 132, № 2. – P. 239–265.

394. Secondary metabolites in *in vitro* cultures of Siberian medicinal plants: content, antioxidant properties, and antimicrobial characteristics / I. S. Milentyeva, V. M. Le, O. V. Kozlova [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 153–163.

395. Secondary metabolites of various eleuthero (*Eleutherococcus Senticosus*/Rupr. Et Maxim./Maxim) organs derived from plants obtained by somatic embryogenesis / K. Bączek, A. Pawełczak, J. L. Przybył [et al.] // Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites / eds. R. K. Gopal, E. H. Maria, G. Shaily. – Cham : Springer, 2019.

396. Sengul, E. Cardioprotective activities of quercetin and rutin in sprague dawley rats treated with 5-fluorouracil / E. Sengul, V. Gelen, S. Gedikli // JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences. – 2021. – Vol. 31, № 2. – P. 423–431.

397. Sharan, S. S. Elicitor-mediated enhanced accumulation of ursolic acid and eugenol in hairy root cultures of *Ocimum tenuiflorum* L. is age, dose, and duration

dependent / S. S. Sharan, N. B. Sarin, K. Mukhopadhyay // South African Journal of Botany. – 2019. – Vol. 124. – P. 199–210.

398. Sharma, M. Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques / M. Sharma, P. Kaushik // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2021. – Vol. 36. – P. 102149.

399. Simultaneous determination of six major constituents in the roots of *Saposhnikovia divaricata* by HPLC / B. Zhao, X. B. Yang, X. W. Yang [et al.] // Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2013. – Vol. 33, № 3. – P. 382–387.

400. Simultaneous quantification of three curcuminoids and three volatile components of curcuma longa using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography / I. C. Chao, C. M. Wang, S. P. Li [et al.] // Molecules. – 2018. – Vol. 23, № 7. – P. 1568.

401. Sirikantaramas, S. Cannabinoids: biosynthesis and biotechnological applications / S. Sirikantaramas, F. Taura // Cannabis sativa L. – Botany and biotechnology / eds. S. Chandra, H. Lata, M. A. ElSohly. – Cham : Springer, 2017. – P. 183–206.

402. Smetanska, I. Sustainable production of polyphenols and antioxidants by plant in vitro cultures / I. Smetanska // Bioprocessing of Plant In Vitro Systems. – 2018. – P. 1–45.

403. Smith, E. F. A plant-tumor of bacterial origin / E. F. Smith, C. O. Townsend // Science. – 1907. – Vol. 25, № 643. – P. 671–673.

404. Sodeifian, G. Supercritical fluid extraction of omega-3 from *Dracocephalum kotschyi* seed oil: Process optimization and oil properties / G. Sodeifian, S. A. Sajadian, N. S. Ardestani // The Journal of Supercritical Fluids. – 2017. – Vol. 119. – P. 139–149.

405. Soejarto, D. D. The correct name for Siberian ginseng / D. D. Soejarto, N. R. Farnsworth // Botanical Museum Leaflets, Harvard University. – 1978. – Vol. 26, № 9/10. – P. 339–343.

406. Soquetta, M. B. Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables / M. B. Soquetta, L. M. Terra, C. P. Bastos // *CyTA – Journal of Food*. – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 400–412.

407. Srivastava, R. K. Need of nutraceuticals / functional food products for health benefits to world-wide people / R. K. Srivastava // *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*. – 2018. – № 1 (4). – P. 1–13.

408. Statistical analysis of the relationship between antioxidant activity and the structure of flavonoid compounds / I. Glevitzky, G. A. Dumitrel, M. Glevitzky [et al.] // *Rev. Chim.* – 2019. – Vol. 70, № 9. – P. 3103–3107.

409. Stefani, M. Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation / M. Stefani, S. Rigacci // *BioFactors*. – 2014. – № 40. – P. 482–493.

410. Stickstoff-freie phenanthren-derivate aus dem rhizom von *Tamus communis* L / J. Reisch, M. Bathory, K. Szendrei [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 1969.

411. Stimulation of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by  $\beta$ -cyclodextrin-coated silver nanoparticles / Y. J. Ma, J. Xia, Y. Wang [et al.] // *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. – 2020. – Vol. 18. – P. 100271.

412. Structural characterisation of pectin obtained from cacao pod husk. Comparison of conventional and subcritical water extraction / N. Munoz-Almagro, L. Valadez-Carmona, J. A. Mendiola [et al.] // *Carbohydrate polymers*. – 2019. – Vol. 217. – P. 69–78.

413. Structural characterization and immunostimulatory activity of a novel polysaccharide isolated with subcritical water from *Sagittaria sagittifolia* L / J. Zhang, M. Chen, C. Wen [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 133. – P. 11–20.

414. Structural characterization of polysaccharides from *Saposhnikovia divaricata* and their antagonistic effects against the immunosuppression by the culture supernatants of melanoma cells on RAW264.7 macrophages / C. X. Dong,

L. Liu, C. Y. Wang [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 113. – P. 748–756.

415. Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin / M. T. Munir, H. Kheirkhah, S. Baroutian [et al.] // Journal of Cleaner Production. – 2018. – Vol. 183. – P. 487–494.

416. Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications – A review / T. Arumugham, K. Rambabu, S. W. Hasan [et al.] // Chemosphere. – 2021. – Vol. 271. – P. 129525.

417. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield, antioxidant capacity and cytotoxicity / R. Goyeneche, A. Fanovich, C. R. Rodrigues [et al.] // The Journal of Supercritical Fluids. – 2018. – Vol. 135. – P. 78–83.

418. Supercritical fluid extraction of Bulgarian *Achillea millefolium* / M. Varaee, M. Honarvar, M. H. Eikani [et al.] // The Journal of Supercritical Fluids. – 2017. – Vol. 119. – P. 283–288.

419. Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses / M. Varaee, M. Honarvar, M. H. Eikani [et al.] // The Journal of Supercritical Fluids. – 2019. – Vol. 144. – P. 48–55.

420. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal Plants based on the principles of Green Analytical Chemistry: A review / R. F. da Silva, C. N. Carneiro, C. B. D. C. de Sousa [et al.] // Microchemical Journal. – 2022. – Vol. 175. – P. 107184.

421. Synergistic effects of salicylic acid and light stress on bioactive metabolites in basil callus cultures / S. Nazir, H. Jan, G. Zaman [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2021. – Vol. 37. – P. 102176.

422. Systems-level mechanisms of action of *Panax Ginseng*: a network pharmacological approach / S.-Y. Park, J.-H. Park, H.-S. Kim [et al.] // Journal of Ginseng Research. – 2018. – Vol. 42, № 1. – P. 98–106.



423. Tai, S. Anti-proliferative and antioxidant activities of *Saposhnikovia divaricata* / S. Tai, J. Cheung // *Oncology Reports*. – 2007. – Vol. 18, № 1. – P. 227–234.

424. Takshak, S. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress / S. Takshak, S. B. Agrawal // *Journal of photochemistry and photo-biology b: biology*. – 2019. – Vol. 193. – P. 51–88.

425. Targeted expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* hairy roots / Z. Guo, H. Tan, Z. Lv [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1–12.

426. Tarkowska, D. Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones / D. Tarkowska, M. Strnad // *Planta*. – 2016. – Vol. 244, № 3. – P. 545–555.

427. Tepfer, D. DNA transfer to plants by *Agrobacterium rhizogenes*: A model for genetic communication between species and biospheres / D. Tepfer // *Transgenesis and secondary metabolism*. – 2017. – P. 3–43.

428. The applicability of high-speed counter current chromatography to the separation of natural antioxidants / Y. Gong, X. Y. Huang, D. Pei [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2020. – Vol. 1623. – P. 461150.

429. The complete chloroplast genome of *Saposhnikovia divaricate* / Z. Bao, Z. Zhu, H. Zhang [et al.] // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 360–361.

430. The effects of crocin on the symptoms of depression in subjects with metabolic syndrome / I. N. Jam, A. H. Sahebkar, S. Eslami [et al.] // *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. – 2017. – Vol. 26, № 6. – P. 925–930.

431. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture / M. Sarmadi, N. Karimi, J. Palazon [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 132. – P. 271–280.

432. The essential oils of *Rhaponticum carthamoides* hairy roots and roots of soil-grown plants: Chemical composition and antimicrobial, anti-inflammatory, and

antioxidant activities / E. Skala, P. Rijo, C. Garcia [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016.

433. The genus *Tripterygium*: A phytochemistry and pharmacological review / H. Lv, L. Jiang, M. Zhu [et al.] // *Fitoterapia*. – 2019. – Vol. 137. – P. 104190.

434. The intractum from the *Eleutherococcus senticosus* fruits affects the innate immunity in human leukocytes: From the ethnomedicinal use to contemporary evidence-based research / F. Graczyk, B. Orzechowska, D. Franz [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2021. – Vol. 268. – P. 113636.

435. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review / N. Das, S. K. Mishra, A. Bishayee [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – Vol. 11, № 7. – P. 1740–1766.

436. The regulating effect of light on the content of flavan-3-ols and derivatives of hydroxybenzoic acids in the callus culture of the tea plant, *Camellia sinensis* L / V. Ossipov, M. Zubova, T. Nechaeva [et al.] // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2022. – Vol. 101. – P. 104383.

437. The role of heating step in microwave-assisted extraction of polyphenols from spent coffee grounds / M. Pettinato, A. A. Casazza, P. Perego // *Food and Bioproducts Processing*. – 2019. – Vol. 114. – P. 227–234.

438. The studies of chlorogenic acid antitumor mechanism by gene chip detection: the immune pathway gene expression / T. Y. Kang, H. R. Yang, J. Zhang [et al.] // *J. of Analytical Methods in Chemistry*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 7.

439. Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties / F. M. Kandemir, S. Kucukler, C. Caglayan [et al.] // *Journal of Food Biochemistry*. – 2017. – Vol. 41, № 5. – P. e12398.

440. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes / L. Bai, J. Gao, F. Wei [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 423.

441. Todorova, V. Comparison between the biological active compounds in plants with adaptogenic properties (*Rhaponticum carthamoides*, *Lepidium meyenii*, *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng*) / V. Todorova, K. Ivanov, S. Ivanova // *Plants*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 64.

442. Toth, B. Phenanthrenes: A promising group of plant secondary metabolites / B. Toth, J. Hohmann, A. Vasas // *Journal of natural products*. – 2017. – Vol. 81, № 3. – P. 661–678.

443. Trigonelline protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury through activating the PI3K/Akt pathway / Z. Qiu, K. Wang, C. Jiang [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2020. – Vol. 317. – P. 108946.

444. Ultra-rapid, enhanced and eco-friendly extraction of four main flavonoids from the seeds of *Oroxylum indicum* by deep eutectic solvents combined with tissue-smashing extraction / X. S. Yin, Z. F. Zhong, G. L. Bian [et al.] // *Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 319. – P. 126555.

445. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel / P. Sharayei, E. Azarpazhooh, S. Zomorodi [et al.] // *LWT*. – 2019. – Vol. 101. – P. 342–350.

446. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review / F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2017. – Vol. 34. – P. 540–560.

447. United Nations. World Population Prospects 2019. – New York : United Nations, 2019.

448. Ursolic acid derivatives as potential antidiabetic agents: In vitro, in vivo, and in silico studies / R. Guzmán-Ávila, V. Flores-Morales, P. Paoli [et al.] // *Drug Development Research*. – 2018. – Vol. 79, № 2. – P. 70–80.

449. Use of caffeic acid phenethyl ester and cortisone may prevent proliferative vitreoretinopathy / Y. Turkoz, H. M. Borazan Er, H. Yılmaz [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2004. – Vol. 13, № 2. – P. 127–130.

450. Use of ionic liquids and deep eutectic solvents in polysaccharides dissolution and extraction processes towards sustainable biomass valorization / E. S. Morais, A. M. Lopes, M. G. Freire [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 16. – P. 3652.

451. Vahide, P. Bio nanoparticles as elicitors increase accumulation of betulin and betulinic acid in callus cultures / P. Vahide, K. Negar, J. H. Razieh // *South African Journal of Botany*. – 2021. – Vol. 141. – P. 431–439.

452. Valorisation of grape pomace: Fractionation of bioactive flavan-3-ols by membrane processing / U. T. Syed, C. Brazinha, J. G. Crespo [et al.] // *Separation and Purification Technology*. – 2017. – Vol. 172. – P. 404–414.

453. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds / L. Valadez-Carmona, A. Ortiz-Moreno, G. Ceballos-Reyes [et al.] // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2018. – Vol. 131. – P. 99–105.

454. Verardo, G. New triterpenic acids produced in callus culture from fruit pulp of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret / G. Verardo, A. Gorassini, D. Fraternali // *Food Research International*. – 2019. – Vol. 119. – P. 596–604.

455. *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique / O. R. Alara, N. H. Abdurahman, C. I. Ukaegbu [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2018. – Vol. 122. – P. 533–544.

456. Vignesh, A. Comparative LC-MS analysis of bioactive compounds, antioxidants and antibacterial activity from leaf and callus extracts of *Saraca asoca* / A. Vignesh, S. Selvakumar, K. Vasanth // *Phytomedicine Plus*. – 2022. – Vol. 2, № 1. – P. 100167.

457. Vinatoru, M. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials / M. Vinatoru, T. J. Mason, I. Calinescu // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 97. – P. 159–178.

458. Wang, H. Optimizing homogenate extraction process for alkaloids of *Ramulus uncariae* by uniform design / H. Wang, X. Di, C. Tan // Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine. – 2017.
459. Wang, X. Identification of anthocyanins isolated from black bean canning wastewater by macroporous resin using optimized conditions / X. Wang, C. Hansen, K. Allen // Food and Nutrition Sciences. – 2013. – Vol. 4, № 8A.
460. Water extraction of anthocyanins from black rice and purification using membrane separation and resin adsorption / S. He, Q. Lou, J. Shi [et al.] // Journal of Food Processing and Preservation. – 2017. – Vol. 41, № 4. – P. e13091.
461. Wetterauer, B. Production of the anticancer compound camptothecin in root and hairy root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L / B. Wetterauer, E. Wildi, M. Wink // Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants / ed. N. Kumar. – Singapore: Springer, 2018. – P. 303–341.
462. What a waste 2.0: A global snapshot of solid waste management to 2050; Urban Development / S. Kaza, L. Yao, P. Bhada-Tata [et al.]. – Washington : World Bank, 2018. – 168 p.
463. White, P. R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient / P. R. White // American Journal of Botany. – 1939. – P. 59–64.
464. Wianowska, D. Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants / D. Wianowska, M. Gil // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – Vol. 114. – P. 314–325.
465. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes / M. Ikeuchi, A. Iwase, B. Rymen [et al.] // Plant Physiology. – 2017. – Vol. 175, № 3. – P. 1158–1174.
466. Yang, J. *In vitro* antioxidant properties of rutin / J. Yang, J. Guo, J. Yuan // LWT Food Sci. Technol. – 2008. – Vol. 41. – P. 1060–1066.
467. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during de novo root organogenesis in Arabidopsis / L. Chen, J. Tong, L. Xiao [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2016. – Vol. 67, № 14. – P. 4273–4284.

468. Załuski, D. HPTLC-profiling of eleutherosides, mechanism of antioxidative action of eleutheroside E1, the PAMPA test with LC/MS detection and the structure–activity relationship / D. Załuski, R. Kuźniewski, Z. Janeczko // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 520–528.

469. Zhao, B. Natural occurring polysaccharides from *Panax ginseng* CA Meyer: A review of isolation, structures, and bioactivities / B. Zhao, C. Lv, J. Lu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 133. – P. 324–336.

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

**ПРИЛОЖЕНИЕ А****Копии соглашений ФЦП и государственных заданий на оказание  
государственных услуг**

**Соглашение (договор) о предоставлении  
из федерального бюджета субсидий юридическим лицам (за  
исключением казенных учреждений), индивидуальным  
предпринимателям, физическим лицам грантов в форме субсидий, в том  
числе предоставляемых на конкурсной основе  
г. Москва**

«26» ноября 2018 г.

№ 075-02-2018-223

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, которому как получателю средств федерального бюджета доведены лимиты бюджетных обязательств в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации, именуемое в дальнейшем «Минобрнауки России», в лице первого заместителя Министра Трубникова Григория Владимировича, действующего на основании Положения о Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 15 июня 2018 г. № 682, распоряжения Правительства Российской Федерации от 18 июня 2018 г. № 1210-р, приказа Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 16 августа 2018 г. № 645, с одной стороны, и ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", именуемое в дальнейшем «Получатель», в лице Ректора Просекова Александра Юрьевича, действующего на основании приказа Минобрнауки России №12-07-03/60 от 05.05.2017, с другой стороны, далее именуемые «Стороны», в соответствии с Бюджетным кодексом Российской Федерации, в соответствии Правилами предоставления грантов в форме субсидий в целях реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы» (далее – Программа), утвержденными постановлением Правительства Российской Федерации от 3 октября 2015 г. № 1060 (далее – Правила предоставления гранта в форме субсидий) и результатами конкурсного отбора организаций для предоставления грантов в форме субсидий из федерального бюджета в рамках реализации Программы (протокол от 11 мая 2018 г. № 2018-14-000-0001-3 заседания Конкурсной комиссии, созданной приказом Минобрнауки России от 23 января 2018 г. № 46) заключили настоящее Соглашение о нижеследующем.

**I. Предмет Соглашения**

1.1. Предметом настоящего Соглашения является предоставление Получателю из федерального бюджета в 2018 - 2020 годах гранта в форме



## Продолжение приложения А

субсидии на финансовое обеспечение реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 21 мая 2013 г. № 426 «О федеральной целевой программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы»

по лоту шифр № 2018-14-000-0001 по теме: «Получение биологически активных веществ лекарственных растений эндемиков Сибири с использованием культур клеток и органов высших растений» (далее – проект) (шифр заявки «2018-14-000-0001-162») (далее – грант).

Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57718X0285.

1.1.1. в целях реализации Получателем следующих проектов (мероприятий) :

Проведение прикладных научных исследований и разработок, направленных на создание продукции и технологий

1.1.2. Перечень работ изложен в Планах-графике исполнения обязательств при проведении прикладных исследований (выполнении проекта) (приложение 2 к настоящему Соглашению).

1.2. Грант предоставляется в соответствии с перечнем затрат, на финансовое обеспечение которых предоставляется грант, согласно приложению 7 к настоящему Соглашению, которое является неотъемлемой частью настоящего Соглашения.

## II. Финансовое обеспечение предоставления гранта

2.1. Грант предоставляется в соответствии с лимитами бюджетных обязательств, доведенными Минобрнауки России как получателю средств федерального бюджета, по кодам классификации расходов бюджетов Российской Федерации (далее – коды БК) на цель (и), указанную (ые) в разделе I настоящего Соглашения, в размере 135 000 000 (сто тридцать пять миллионов) рублей, том числе:

в 2018 году 50 000 000,00 (пятьдесят миллионов) рублей - по коду БК 075 0411 14 7 00 99998 612;

в 2019 году 45 000 000,00 (сорок пять миллионов) рублей - по коду БК 075 0411 14 7 00 99998 612;

в 2020 году 40 000 000,00 (сорок миллионов) рублей - по коду БК 075 0411 14 7 00 99998 612

## III. Условия предоставления гранта

3.1. Грант предоставляется в соответствии с Правилами предоставления гранта в форме субсидии:

Продолжение приложения А

**Дополнительное соглашение к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) (внутренний номер 075-ГЗ/Х4140/679/1)**

г. Москва

«2» марта 2020 г.

№ 075-03-2020-097/1

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, которому как получателю средств федерального бюджета доведены лимиты бюджетных обязательств на предоставление субсидий федеральным бюджетным и автономным учреждениям на финансовое обеспечение выполнения ими государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ), именуемый в дальнейшем «Учредитель», в лице заместителя директора Департамента финансов Русаковой Марины Александровны, действующего на основании приказа Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 25 декабря 2019 г. № 1418, с одной стороны и ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", именуемое в дальнейшем «Учреждение», в лице Ректора Просекова Александра Юрьевича, действующего на основании Устава, с другой стороны, далее именуемые «Стороны», в соответствии с пунктом 7.5 Соглашения о предоставлении субсидии из федерального бюджета федеральному бюджетному или автономному учреждению на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) от 27.12.2019 № 075-03-2020-097 (далее - Соглашение) заключили настоящее Дополнительное соглашение к Соглашению о нижеследующем.

1. Внести в Соглашение следующие изменения:

1.1. в разделе I «Предмет Соглашения»:

1.1.1. в пункте 1.1. слова «государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) № 075-00156-20-00 от 19.12.2019» заменить словами:

«государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) № 075-00156-20-01 от 21.02.2020»;

1.2. в разделе II «Порядок, условия предоставления Субсидии и финансовое обеспечение выполнения государственного задания»:

Страница 1 из 3 страниц

## Продолжение приложения А

1.2.1. пункт 2.2 изложить в следующей редакции:

«2.2. Субсидия предоставляется Учреждению в пределах лимитов бюджетных обязательств, доведенных Учредителю как получателю средств федерального бюджета по кодам классификации расходов бюджетов Российской Федерации (далее – коды БК), в следующем размере:

в 2020 году 48 215 900,00 (сорок восемь миллионов двести пятнадцать тысяч девятьсот) рублей - по коду БК 075 0704 02 1 02 90059 611;

в 2020 году 1 161 773 000,00 (один миллиард сто шестьдесят один миллион семьсот семьдесят три тысячи) рублей - по коду БК 075 0706 47 2 02 90059 611;

в 2020 году 40 796 000,00 (сорок миллионов семьсот девяносто шесть тысяч) рублей - по коду БК 075 0110 47 3 02 90059 611;

в 2021 году 42 021 900,00 (сорок два миллиона двадцать одна тысяча девятьсот) рублей - по коду БК 075 0110 47 3 02 90059 611;

в 2022 году 44 441 400,00 (сорок четыре миллиона четыреста сорок одна тысяча четыреста) рублей - по коду БК 075 0110 47 3 02 90059 611.»;

1.2.2. пункт 2.4. дополнить следующими словами:

«протоколом заседания Бюджетной комиссии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 11.02.2020 № 2, распределением бюджетных средств на 2020 год и плановый период 2021 - 2022 годы по учреждениям на предоставление субсидии на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ), утвержденным заместителем Министра науки и высшего образования Российской Федерации С.В. Кузьминым 26.02.2020 г.».

1.3. Внести изменения в приложение № 1 согласно приложению № 1 к настоящему Дополнительному соглашению, которое является его неотъемлемой частью.

2. Настоящее Дополнительное соглашение является неотъемлемой частью Соглашения.

3. Настоящее Дополнительное соглашение вступает в силу с даты его подписания лицами, имеющими право действовать от имени каждой из Сторон, и действует до полного исполнения Сторонами своих обязательств по настоящему Соглашению.

4. Условия Соглашения, не затронутые настоящим Дополнительным соглашением, остаются неизменными.

5. Настоящее Дополнительное соглашение заключено Сторонами в форме:

5.1. электронного документа в государственной интегрированной



Продолжение приложения А

**Соглашение о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ)**

г. Москва

«16» января 2023 г.

№ 075-03-2023-053

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, которому как получателю средств федерального бюджета доведены лимиты бюджетных обязательств на предоставление субсидий федеральным бюджетным и автономным учреждениям на финансовое обеспечение выполнения ими государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ), именуемый в дальнейшем «Учредитель», в лице заместителя директора Финансового департамента Русаковой Марины Александровны, действующего на основании приказа Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 25 июня 2021 г. № 539, с одной стороны и ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ", именуемое в дальнейшем «Учреждение», в лице Ректора ПРОСЕКОВА АЛЕКСАНДРА ЮРЬЕВИЧА, действующего на основании Устава, с другой стороны, далее именуемые «Стороны», в соответствии с Бюджетным кодексом Российской Федерации, Положением о формировании государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) в отношении федеральных государственных учреждений и финансовом обеспечении выполнения государственного задания, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 26 июня 2015 г. № 640 (далее - Положение), заключили настоящее Соглашение о нижеследующем.

**I. Предмет Соглашения**

1.1. Предметом настоящего Соглашения является предоставление Учреждению из федерального бюджета в 2023-2025 годах субсидии на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) № 075-01450-23-00 от 29.12.2022 (далее - Субсидия, государственное задание).

**II. Порядок, условия предоставления Субсидии и финансовое обеспечение выполнения государственного задания**

2.1. Субсидия предоставляется Учреждению на оказание государственных услуг (выполнение работ), установленных в государственном задании.

2.2. Субсидия предоставляется в пределах лимитов бюджетных обязательств,

## Продолжение приложения А

доведенных Учредителю как получателю средств федерального бюджета по кодам классификации расходов бюджетов Российской Федерации (далее – коды БК), в следующем размере:

в 2023 году 42 239 400,00 (сорок два миллиона двести тридцать девять тысяч четыреста) рублей - по коду БК 075 0110 47 4 01 92062 611;

в 2024 году 43 735 400,00 (сорок три миллиона семьсот тридцать пять тысяч четыреста) рублей - по коду БК 075 0110 47 4 01 92062 611;

в 2025 году 45 222 200,00 (сорок пять миллионов двести двадцать две тысячи двести) рублей - по коду БК 075 0110 47 4 01 92062 611;

в 2023 году 47 725 400,00 (сорок семь миллионов семьсот двадцать пять тысяч четыреста) рублей - по коду БК 075 0704 02 4 02 90059 611;

в 2024 году 48 130 800,00 (сорок восемь миллионов сто тридцать тысяч восемьсот) рублей - по коду БК 075 0704 02 4 02 90059 611;

в 2025 году 54 876 600,00 (пятьдесят четыре миллиона восемьсот семьдесят шесть тысяч шестьсот) рублей - по коду БК 075 0704 02 4 02 90059 611;

в 2023 году 1 342 944 400,00 (один миллиард триста сорок два миллиона девятьсот сорок четыре тысячи четыреста) рублей - по коду БК 075 0706 47 4 04 90059 611;

в 2024 году 1 331 334 700,00 (один миллиард триста тридцать один миллион триста тридцать четыре тысячи семьсот) рублей - по коду БК 075 0706 47 4 04 90059 611;

в 2025 году 1 003 558 700,00 (один миллиард три миллиона пятьсот пятьдесят восемь тысяч семьсот) рублей - по коду БК 075 0706 47 4 04 90059 611.

2.3. Размер Субсидии рассчитывается в соответствии с показателями государственного задания на основании нормативных затрат на оказание государственных услуг с применением базовых нормативов затрат и корректирующих коэффициентов к базовым нормативам затрат и нормативных затрат на выполнение работ, определенных в соответствии с Положением.

2.4. Субсидия предоставляется в целях финансового обеспечения выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) на основании материалов, представленных и одобренных в соответствии с пунктами 18, 20, 25 протокола заседания Бюджетной комиссии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 29.12.2022 № БК-П/40, распределений бюджетных средств на 2023 год и плановый период 2024 - 2025 годы по учреждениям на предоставление субсидии на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ), утвержденных Врио директора Финансового департамента Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Н.М. Деликовой 12.01.2023.

### III. Порядок перечисления Субсидии

3.1. Перечисление Субсидии осуществляется в соответствии с Положением:

3.1.1. на лицевой счет, открытый Учреждению в Управлении Федерального казначейства по Кемеровской области - Кузбассу.



## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

## Патенты и заявка на изобретения

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2783445**

**СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БАЙКАЛИНА  
ИЗ КОРНЕВЫХ КУЛЬТУР ШЛЕМНИКА  
БАЙКАЛЬСКОГО (SCUTELLARIA BAICALENSIS  
GEORGI)**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кемеровский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Просеков Александр Юрьевич (RU), Дышлюк Любовь Сергеевна (RU), Дмитриева Анастасия Игоревна (RU), Дроздова Маргарита Юрьевна (RU), Асякина Людмила Константиновна (RU), Федорова Анастасия Михайловна (RU), Ле Виолета Мироновна (RU), Позднякова Анна Владимировна (RU), Лосева Анна Ивановна (RU)*

Заявка № **2022112151**

Приоритет изобретения **05 мая 2022 г.**

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений  
Российской Федерации **14 ноября 2022 г.**

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает **05 мая 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*



ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат: 68b80077e14e40f0a94edbd24145d5c7  
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 20.03.2022 по 26.05.2023

*Ю.С. Зубов*



Продолжение приложения Б

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2792775

**Способ получения биологически активной добавки на основе молочной сыворотки и растительного экстракта**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кемеровский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Просеков Александр Юрьевич (RU), Дышлок Любовь Сергеевна (RU), Миленьева Ирина Сергеевна (RU), Асякина Людмила Константиновна (RU), Федорова Анастасия Михайловна (RU), Лосева Анна Ивановна (RU)*

Заявка № 2022112230

Приоритет изобретения **05 мая 2022 г.**  
 Дата государственной регистрации  
 в Государственном реестре изобретений  
 Российской Федерации **24 марта 2023 г.**  
 Срок действия исключительного права  
 на изобретение истекает **05 мая 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
 по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
 Сертификат 68b80077e14e40f0a94eedbd24145dc7  
 Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
 Действителен с 20.03.2022 по 26.05.2023

*Ю.С. Зубов*





## Продолжение приложения Б

Форма № 94 ИЗ,ПМ,ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности  
Федеральное государственное бюджетное учреждение



«Федеральный институт промышленной собственности»  
(ФИПС)

Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП - 3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

## УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

<b>10.03.2023</b>	<b>W23011978</b>	<b>2023105526</b>
<i>Дата поступления (дата регистрации)</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

<b>ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ</b> (дата регистрации) оригиналов документов заявки	<b>(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №</b>	<b>ВХОДЯЩИЙ №</b>
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (86) государственный номер международной заявки и дата международной заявки, установившие подчиненные ведомости	<b>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ</b> (полный адрес, включая и выделенные адреса) 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6, Кемеровский государственный университет, Научно-инновационное управление (650000, g. Kemerovo, ul. Krasnaya, d. 6)	
<input type="checkbox"/> (87) (номер и дата международной публикации международной заявки)	Телефон: 83842583252 Факс: 83842583885 Адрес электронной почты: patent@kemsu.ru	
<input type="checkbox"/> (96) (номер сурживской заявки и дата ее подачи)	<b>АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ</b> (указывается при подаче заявки на секретное изобретение)	
<input type="checkbox"/> (97) (номер и дата публикации сурживской заявки)		
<b>ЗАЯВЛЕНИЕ</b> о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация
<b>(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ</b> ГЕРОНЕЙПРОТЕКТОР НА ОСНОВЕ БАЙКАЛИНА		
<b>(71) ЗАЯВИТЕЛЬ</b> (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно учредительным документам), место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет» (Federalnoe gosudarstvennoe budzhetnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya «Kemerovskii gosudarstvennyi universitet») (650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6 (650000, Rossiya, g. Kemerovo, ul. Krasnaya, 6)	<b>ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ</b> ОГРН 1 03 42 05 00580 1 КПП 42 05 01 001 ИНН 42 07 01753 7 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен) RU	
<input checked="" type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование) <input checked="" type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input checked="" type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту заказчик работ (указать наименование) Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Контракт от 16.01.2023 № Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Полифенолы растений СФО: оценка молекулярной и пространственной структуры веществ, характеристика биофункциональных свойств и токсикологических показателей безопасности на модельных системах in vivo» (проект FZSR-2023-0002) Соглашение № 075-03-2023-053		
<b>(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ</b> (указывается фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, назначенного заявителем своим представителем для ведения дела)	<input type="checkbox"/> патентный поверенный <input type="checkbox"/> представитель по доверенности	

Общее количество документов в листах	36	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)		Автоматизированная система
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: <a href="http://www.fips.ru/registers-web">www.fips.ru/registers-web</a>		





## Продолжение приложения В


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.89.19.210

ОКС 67.040

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ



Журавлев Ю.Н.

«26» июня 2020 г.

**ЭКСТРАКТЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ВТОРИЧНЫХ  
МЕТАБОЛИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ  
И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЙ *IN VITRO***  
Технологическая инструкция  
ТИ 10.89.19-273-02068309-2020

Дата введения в действие – 26.06.2020 г.

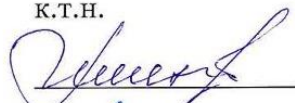
РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нутрицевтиков, к.т.н.



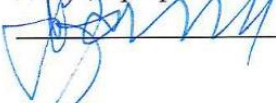
А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.



И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.



А.Ю. Просеков

Кемерово 2020

## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.32.23

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ

Журавлев Ю.Н.

«10» февраля 2021 г.




**КОНЦЕНТРАТ-ОСНОВА МОРСОВ  
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ**

**Технические условия  
ТУ 10.32.23-274-02068309-2021**

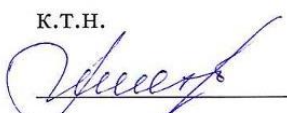
Дата введения в действие – 10.02.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нутрицевтиков, к.т.н.

 А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.

 И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.

 А.Ю. Просеков

Кемерово 2021

## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
 высшего образования  
 «Кемеровский государственный университет»  
 (ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.32.23

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
 развитию ФГБОУ ВО КемГУ

Журавлев Ю.Н.

«10» февраля 2021 г.



**КОНЦЕНТРАТ-ОСНОВА МОРСОВ  
 ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ**

**Технологическая инструкция  
 ТИ 10.32.23-274-02068309-2021**

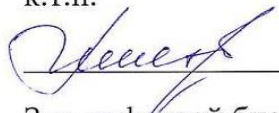
Дата введения в действие – 10.02.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

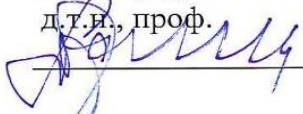
Научный сотрудник Лаборатории  
 биотестирования природных  
 нутрицевтиков, к.т.н.

 А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
 к.т.н.

 И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
 д.т.н., проф.

 А.Ю. Просеков

Кемерово 2021





## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 11.07.19.133

ОКС 67.140.10

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ

Журавлев Ю.Н.

«10» февраля 2021 г.

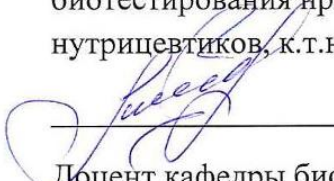
**ТОНИЗИРУЮЩИЙ ЧАЙНЫЙ НАПИТОК**

**Технологическая инструкция**  
**ТИ 10.83.14-275-02068309-2021**

Дата введения в действие – 10.02.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нугрицевтиков, к.т.н.

  
\_\_\_\_\_ А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.

  
\_\_\_\_\_ И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.

  
\_\_\_\_\_ А.Ю. Просеков

Кемерово 2021

## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.83.15

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ

\_\_\_\_\_ Журавлев Ю.Н.

«24» февраля 2021 г.

**ФИТОЧАЙ**

**Технические условия**  
**ТУ 10.83.15-276-02068309-2021**

Дата введения в действие – 24.02. 2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нутрицевтиков, к.т.н.

\_\_\_\_\_ А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.

\_\_\_\_\_ И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.

\_\_\_\_\_ А.Ю. Просеков

Кемерово 2021

## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.83.15

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

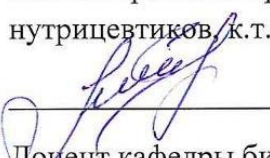
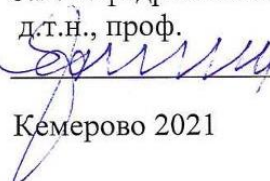
Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУЖуравлев Ю.Н.

«24» февраля 2021 г.

**ФИТОЧАЙ****Технологическая инструкция  
ТИ 10.83.15-276-02068309-2021**

Дата введения в действие – 24.02. 2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нугрицевтиков, к.т.н.А.И. ЛосеваДоцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.И.С. МилентьеваЗав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.А.Ю. Просеков

Кемерово 2021



## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.89.19.231

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ  
Журавлев Ю.Н.


«26» февраля 2021 г.

**ГРАНУЛИРОВАННЫЙ ЯГОДНЫЙ КИСЕЛЬ**

**Технические условия**  
**ТУ 10.89.19-277-02068309-2021**

Дата введения в действие – 26.02.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нугрицевиков, к.т.н.  
\_\_\_\_\_ А.И. ЛосеваДоцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.  
\_\_\_\_\_ И.С. МилентьеваЗав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.  
\_\_\_\_\_ А.Ю. Просеков

Кемерово 2021



## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 11.07.19.133

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ

\_\_\_\_\_ Журавлев Ю.Н.

«26» февраля 2021 г.



**РАСТВОРИМЫЙ СУХОЙ НАПИТОК  
АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ**

**Технические условия  
ТУ 10.83.12-278-02068309-2021**

Дата введения в действие – 26.02.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нугрицевтиков, к.т.н.

\_\_\_\_\_ А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.

\_\_\_\_\_ И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.

\_\_\_\_\_ А.Ю. Просеков

Кемерово 2021

## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 11.07.19.133

ОКС 67.160.20

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ

\_\_\_\_\_  
Журавлев Ю.Н.

«26» февраля 2021 г.



**РАСТВОРИМЫЙ СУХОЙ НАПИТОК  
АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ**

**Технологическая инструкция  
ТИ 10.83.12-278-02068309-2021**

Дата введения в действие – 26.02.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нутрицевтиков, к.т.н.

\_\_\_\_\_  
А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.

\_\_\_\_\_  
И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.

\_\_\_\_\_  
А.Ю. Просеков

Кемерово 2021



## Продолжение приложения В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Кемеровский государственный университет»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.51.55.121

ОКС 67.100.99

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому  
развитию ФГБОУ ВО КемГУ  
\_\_\_\_\_ Журавлев Ю.Н.

«03» марта 2021 г.

**НАПИТОК НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ,  
ОБОГАЩЕННЫЙ ВТОРИЧНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ**

**Технологическая инструкция  
ТИ 10.51.55-279-02068309-2021**

Дата введения в действие – 03.03.2021 г.

РАЗРАБОТАНО

Научный сотрудник Лаборатории  
биотестирования природных  
нутрицевтиков, к.т.н.

  
\_\_\_\_\_ А.И. Лосева

Доцент кафедры бионанотехнологии,  
к.т.н.

  
\_\_\_\_\_ И.С. Милентьева

Зав. кафедрой бионанотехнологии,  
д.т.н., проф.

  
\_\_\_\_\_ А.Ю. Просеков

Кемерово 2021



## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Опытно-промышленная апробация и внедрение технологий

#### Приложение Г. 1



#### АКТ

наработки опытных образцов экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*

Комиссия в составе:

Председатель	Главный технолог	Кузьмина Л.В.
члены комиссии	Аппаратчик	Райс А.В.
	Аппаратчик	Кондратьева Е.А.

назначенная приказом от «07» 09 2020 г. № 312, в период с «07» сентября 2020 г. по «18» сентября 2020 г. проверила факт наработки объектов испытаний.

Для производства опытной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* проводились экстракция, очистка, концентрирование или высушивание водно-спиртовых экстрактов, фасовка.

#### 1. Комиссии предъявлены:

1.1. Опытные образцы экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*: левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*), женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng*), элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus*), пальчатокоренника пятнистого (*Dactylorhiza maculata*), диоскореи обыкновенной (*Dioscorea communis*), сапожниковии растопыренной (*Saposhnikovia divaricata*) (далее – Объекты испытаний) в количестве 24 шт. весом 25 кг каждый №№ 1–24.

1.2. Техническая документация на объект испытаний в составе:

Технические условия (ТУ 10.89.19-273-02068309-2020) и технологическая инструкция (ТИ 10.89.19-273-02068309-2020) по производству экстрактов на основе комплекса вторичных метаболитов, выделенных из растительного сырья и клеточных культур *in vitro*.

#### 2. В результате проверки установлено:

2.1. Объекты испытаний наработаны ООО «РУСЭКСТРАКТ» в период с «07» сентября 2020 г. по «18» сентября 2020 г. в соответствии с Техническими условиями и Технологической инструкцией по производству экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*.

#### 3. Вывод

Объекты испытаний пригодны для проведения исследовательских испытаний, соответствуют требованиям качества и безопасности.

Председатель

члены комиссии

Кузьмина Л.В.

Райс А.В.

Кондратьева Е.А.



## Приложение Г. 2



## АКТ

выработки промышленной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*

Комиссия в составе:

Председатель	Главный технолог	Кузьмина Л.В.
члены комиссии	Аппаратчик	Райс А.В.
	Аппаратчик	Кондратьева Е.А.

назначенная приказом от « 01 » 02 2021 г. № 86

Настоящий акт составлен о том, что 01.02.2021 по 26.02.2021 г. на технологической линии ООО «РУСЭКСТРАКТ» в соответствии с Техническими условиями (ТУ 10.89.19-273-02068309-2020) и Технологической инструкцией (ТИ 10.89.19-273-02068309-2020) была выработана промышленная партия экстрактов на основе природного растительного сырья весом 150 кг каждый:

- 1) густой экстракт на основе природного растительного сырья (*Rhaponticum carthamoides*);
- 2) густой экстракт на основе природного растительного сырья *Panax ginseng*;
- 3) густой экстракт на основе природного растительного сырья *Eleutherococcus senticosus*;
- 4) густой экстракт на основе природного растительного сырья *Dactylorhiza maculat*;
- 5) густой экстракт на основе природного растительного сырья *Dioscorea communis*;
- 6) густой экстракт на основе природного растительного сырья *Saposhnikovia divaricata*;
- 7) густой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Rhaponticum carthamoides*;
- 8) густой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Panax ginseng*;
- 9) густой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Eleutherococcus senticosus*;
- 10) густой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Dactylorhiza maculat*;
- 11) густой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Dioscorea communis*;
- 12) густой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Saposhnikovia divaricata*;
- 13) сухой экстракт на основе природного растительного сырья *Rhaponticum carthamoides*;
- 14) сухой экстракт на основе природного растительного сырья *Panax ginseng*;
- 15) сухой экстракт на основе природного растительного сырья *Eleutherococcus senticosus*;
- 16) сухой экстракт на основе природного растительного сырья *Dactylorhiza maculat*;
- 17) сухой экстракт на основе природного растительного сырья *Dioscorea communis*;
- 18) сухой экстракт на основе природного растительного сырья *Saposhnikovia divaricata*.

промышленная партия экстрактов на основе клеточных культур растений *in vitro* весом 100 кг каждый:

- 19) сухой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Rhaponticum carthamoides*;
- 20) сухой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Panax ginseng*;



## Продолжение приложения Г. 2

- 21) сухой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Eleutherococcus senticosus*;
- 22) сухой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Dactylorhiza maculata*;
- 23) сухой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Dioscorea communis*;
- 24) сухой экстракт на основе клеточных культур растений *in vitro* *Saposhnikovia divaricata*.

Выработка осуществлялась по технологии, разработанной ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» к.т.н. Лосевой А.И., к.т.н. Милентьевой И.С., проф., д.т.н. Просековым А.Ю.

Для производства промышленной партии экстрактов на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro* проводились экстракция, очистка, концентрирование или высушивание водно-спиртовых экстрактов, фасовка.

Полученные экстракты отвечают требованиям ТУ 10.89.19-273-02068309-2020 по показателям качества и безопасности, что позволяет рекомендовать их к внедрению в производство.

Председатель

члены комиссии



Кузьмина Л.В.

Райс А.В.

Кондратьева Е.А.

## Приложение Г. 3

УТВЕРЖДАЮ



Директор ООО «НПО Сибирка»  
 Беляков Евгений Александрович  
 22 марта 2021 г.

**выработки опытно–промышленной партии  
 тонизирующих чайных напитков**

Мы, нижеподписавшиеся, председатель: заместитель директора по производству Осипов Максим Геннадьевич, научный руководитель Дягилев Денис Владимирович составили настоящий акт о том, что в период с 01.03.2021 г. по 20.03.2021 г. в производственных условиях ООО «НПО Сибирка» по проекту нормативно–технической документации, разработанной на кафедре бионанотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» к.т.н. Лосевой А.И., к.т.н. Милентьевой И.С. была выработана опытно–промышленная партия тонизирующих чайных напитков:

- На основе черного чая, содержащий густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего объемом 500 литров;
- На основе зеленого чая, содержащий густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего объемом 500 литров.

Проведена дегустация выработанных тонизирующих чайных напитков содержащих густые экстракты на основе природного растительного сырья и клеточных культур растений *in vitro*. Отмечены высокие показатели качества, соответствующие требованиям нормативно–технической документации.

Выработанные напитки на основе черного и зеленого чая рекомендуется к внедрению в производство.

Заместитель директора

М.Г.Осипов

Научный руководитель

Д.В.Дягилев

## Приложение Г. 4

УТВЕРЖДАЮ



Директор НПО «Сибирка»

Беляков Евгений Александрович

20 апреля 2021 г.

АКТ

## выработки опытно–промышленной партии фиточая

Мы, нижеподписавшиеся, председатель заместитель директора по производству Осипов Максим Геннадьевич, научный руководитель Дягилев Денис Владимирович составили настоящий акт о том, что в период с 01.03.2021 г. по 20.03.2021 г. в производственных условиях ООО «НПО Сибирка» по проекту нормативно–технической документации, разработанной на кафедре бионанотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» к.т.н. Лосевой А.И., к.т.н. Милентьевой И.С. была выработана опытно–промышленная партия фиточая:

Для производства опытно-промышленной партии фиточая использовалась трава чабреца, листья мяты перечной, листья брусники, цветы липы, густые экстракты женьшеня обыкновенного и элеутерококка колючего. Количество выработанной партии – 500 литров.

Установлено, что опытная партия фиточая по показателям качества и безопасности соответствует требованиям технических условий ТУ 10.83.15-276-02068309-2021 и рекомендуется к внедрению в производство.

Заместитель директора

М.Г.Осипов

Научный руководитель

Д.В.Дягилев

## Приложение Г. 5



## АКТ

**выработки опытно–промышленной партии  
 концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия**

Настоящий акт составлен о том, что в период с 05 по 15 апреля 2021 г. в производственных условиях ООО НПО «Здоровое питание» по проекту нормативно–технической документации, разработанной ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» кандидатом технических наук Лосевой А.И., кандидатом технических наук Милентьевой И.С., доктором технических наук Пресековым А.Ю. была выработана опытно–промышленная партия концентратов – основ морсов иммуномодулирующего действия:

- концентрат – основа морса из облепихи содержащий густой экстракт левзеи сафлоровидной объемом 250 литров;
- концентрат – основа морса из клюквы содержащий густой экстракт левзеи сафлоровидной объемом 250 литров;
- концентрат – основа морса из черной смородины содержащий густой экстракт левзеи сафлоровидной объемом 250 литров.

Проведена дегустация выработанных концентратов – основ морсов. Отмечены высокие показатели качества, соответствующие требованиям нормативно–технической документации.

Выработанные концентраты рекомендуется к внедрению в производство.

Заместитель директора

Кравченко С.Н.

Главный технолог

Петухова Е.Е.



## Приложение Г. 6



**АКТ**

**выработки опытно–промышленной партии  
 гранулированного ягодного киселя**

Настоящий акт составлен о том, что в период с 18 мая 2021 г. по 28 мая 2021 г. в производственных условиях ООО НПО «Здоровое питание» по проекту нормативно–технической документации, разработанной ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» кандидатом технических наук Лосевой А.И., кандидатом технических наук Милентьевой И.С., доктором технических наук Просековым А.Ю. была выработана опытно–промышленная партия гранулированного ягодного киселя содержащая экстракты женьшеня обыкновенного и левзеи сафлоровидной:

- кисель черничный 250 кг;
- кисель земляничный 250 кг;
- кисель красносмородиновый 250 кг.

Проведена дегустация выработанных продуктов питания. Показатели качества полностью соответствуют требованиям нормативно–технической документации.

Все выработанные гранулированные ягодные кисели рекомендуется к внедрению в производство.

Заместитель директора

Кравченко С.Н.

Главный технолог

Петухова Е.Е.

## Приложение Г. 7

УТВЕРЖДАЮ  
 Начальник ЦПМ ООО «СибБарС»  
 30.08.2021 г.



**АКТ ВЫРАБОТКИ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ПАРТИИ  
 НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ,  
 ОБОГАЩЕННЫХ ВТОРИЧНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ**

Настоящий акт составлен о том, что в производственных условиях ООО «СибБарС» в период 16 по 30 августа 2021 г. была выработана партия напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами в соответствии с ТУ 10.51.55-279-02068309-2021: напиток на основе молочной сыворотки с калиной, обогащенный вторичными метаболитами; напиток на основе молочной сыворотки с брусникой, обогащенный вторичными метаболитами; напиток на основе молочной сыворотки с ежевикой, обогащенный вторичными метаболитами.

Для производства опытно-промышленной партии напитков использовали сыворотку творожную, пюре из калины, пюре из брусники, пюре из ежевики, густой экстракт женьшеня обыкновенного, густой экстракт пальчатокоренника пятнистого, эритрит и лимонную кислоту. Опытно-промышленная партия напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами, выработана в количестве 100 литров каждого наименования.

Установлено, что выработанные напитки отвечают требованиям ТУ 10.51.55-279-02068309-2021 и рекомендуется к внедрению в производство после проведения испытаний.

Начальник ЦПМ

 Холкин И.В.

Главный технолог

 Темникова Е.В.

## Приложение Г. 8

УТВЕРЖДАЮ  
 Начальник ЦПМ ООО «СибБарС»  
 Холкин И.В.  
 13.06.2022 г.



### АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Комиссия в составе:** Темникова Елена Владимировна – инженер-технолог, Холкин Игорь Владимирович – начальник цеха переработки молока, зав. лабораторией биотестирования природных нутрицевтиков КемГУ Милентьева Ирина Сергеевна, научный сотрудник лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков КемГУ Лосева Анна Ивановна.

**Место проведения:** ООО «СибБарС».

На предприятии ООО «СибБарС» были проведены испытания технологии получения напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами с целью выявления причин возможных отклонений и доработки технологии.

Была произведена опытно-промышленная партия напитков на основе молочной сыворотки, обогащенных вторичными метаболитами по ТУ 10.51.55-279-02068309-2021 (акт выработки от 30.08.2021 г.) в количестве 100 литров каждого наименования и проведена оценка качественных показателей готовой продукции:

- напиток на основе молочной сыворотки с калиной, обогащенный вторичными метаболитами;
- напиток на основе молочной сыворотки с брусникой, обогащенный вторичными метаболитами;
- напиток на основе молочной сыворотки с ежевикой, обогащенный вторичными метаболитами.


В результате проведенного контроля выявлено, что подбор параметров технологического процесса, обеспечивающих качество и выход готового продукта, выбраны правильно, согласно всем правилам и нормам. Полученные напитки отвечают требованиям ТУ 10.51.55-279-02068309-2022 по показателям качества и безопасности, что позволяет рекомендовать их к внедрению в производство.

Начальник ЦПМ

Главный технолог

Зав. лабораторией

Научный сотрудник

 – Холкин И.В.

Темникова Е.В.

Милентьева И.С.

Лосева А.И.

## Приложение Г. 9

УТВЕРЖДАЮ

Начальник ЦПМ ООО «СибБарС»

 Холкин И.В.

01.11.2021 г.



**АКТ ВЫРАБОТКИ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ПАРТИИ  
РАСТВОРИМОГО СУХОГО НАПИТКА  
АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ**

Настоящий акт составлен о том, что в производственных условиях ООО «СибБарС» в период 15 по 31 октября 2021 г. была выработана партия сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия на основе сухих экстрактов в соответствии с ТУ и ТИ 10.83.12-278-02068309-2021: растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе кофе; растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе цикория; растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе топинамбура.

Для производства опытно-промышленной партии растворимых сухих напитков антиоксидантного действия использовали: кофе сублимированный, порошок цикория, порошок топинамбура, сублимированные ягоды боярышника и вишни, сушеные ядра кедрового ореха, сухие экстракты диоскореи обыкновенной и сапожниковии растопыренной, лимонную кислоту. Опытно-промышленная партия сухих безалкогольных напитков антиоксидантного действия на основе сухих экстрактов, выработана в количестве 150 кг каждого наименования.

Установлено, что выработанные напитки отвечают требованиям 10.83.12-278-02068309-2021 и рекомендуется к внедрению в производство после проведения испытаний.

Начальник ЦПМ



Холкин И.В.

Главный технолог



Темникова Е.В.



## Приложение Г. 10

УТВЕРЖДАЮ

Начальник ЦПМ ООО «СибБарС»

Холкин И.В.  
20.05.2022 г.

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Комиссия в составе:** начальник ЦПМ Холкин Игорь Владимирович, ведущий инженер-технолог Темникова Елена Владимировна, зав. лабораторией биотестирования природных нутрицевтиков КемГУ Милентьева Ирина Сергеевна, научный сотрудник лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков КемГУ Лосева Анна Ивановна.

**Место проведения:** ООО «СибБарС».

На предприятии ООО «СибБарС» были проведены испытания технологии получения растворимого сухого безалкогольного напитка антиоксидантного действия на основе сухих экстрактов с целью выявления причин возможных отклонений и доработки технологии.

Была произведена опытно-промышленная партия растворимого сухого напитка антиоксидантного действия по ТУ 10.83.12-278-02068309-2021 (акт выработки от 01.11.2021 г.) в количестве 150 кг каждого наименования и проведена оценка качественных показателей готовой продукции:

- растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе кофе;
- растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе цикория;
- растворимый сухой напиток антиоксидантного действия на основе топинамбура.

В результате проведенного контроля выявлено, что подбор параметров технологического процесса, обеспечивающих качество и выход готового продукта, выбраны правильно, согласно всем правилам и нормам. Полученные напитки отвечают требованиям ТУ 10.83.12-278-02068309-2021 по показателям качества и безопасности, что позволяет рекомендовать их к внедрению в производство.

Начальник ЦПМ

Главный технолог

Зав. лабораторией

Научный сотрудник

Холкин И.В.

Темникова Е.В.

Милентьева И.С.

Лосева А.И.

## Приложение Г. 11

**АКТ**

**внедрения в учебный процесс материалов диссертационного  
 исследования Лосевой А.И.**

Мы, нижеподписавшиеся, заведующий кафедрой технологии продуктов питания из растительного сырья, доктор технических наук, доцент Сергеева И. Ю.; профессор кафедры бионанотехнологии, доктор технических наук Асякина Л. К., начальник методического отдела УМУ, кандидат технических наук, доцент Румянцева Е. Е. составили настоящий акт о том, что материалы диссертационного исследования Лосевой А. И. внедрены в учебный процесс при реализации образовательных программ бакалавриата по направлениям 19.03.01 Биотехнология, 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья и программ магистратуры по направлениям 19.04.01 Биотехнология, 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья. Разработанные технологии напитков, полученные с использованием вторичных метаболитов растительного сырья, будут использованы при проведении практических и лабораторных занятий, а так же при выполнении и подготовке выпускных квалификационных работ.

Зав. кафедрой технологии  
 продуктов питания из растительного  
 сырья, д.т.н.

Сергеева И. Ю.

Профессор кафедры  
 бионанотехнологии, д.т.н.

Асякина Л. К.

Начальник методического отдела  
 Учебно-методического управления, к.т.н.

Румянцева Е. Е.