

УДК 615.322:582. 579.2:581.192

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРЬЯ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ И АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА БИОМАССЫ *IRIS SPURIA* L. (ART AND SOUL) *

© Л.И. Тихомирова^{1**}, Л.В. Щербакова¹, Я.В. Пономарёва¹, Е.А. Дробышева¹, А.Н. Чукубаева²

¹ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул,
656049 (Россия), e-mail: L-Tichomirova@yandex.ru

² Усть-Каменогорский стоматологический колледж, пр. Независимости,
101, Усть-Каменогорск (Республика Казахстан)

Гидропонные технологии, совмещенные с клональным микроразмножением, имеют потенциал для выращивания растений и производства вторичных метаболитов. Целью данного исследования являлось получение сырья *Iris spuria* L. (Art And Soul) в условиях гидропонии, сопряженной с клональным микроразмножением, и его первичный фармакогно-стический анализ.

При получении сырья *Iris spuria* L. (Art And Soul) на этапе собственно микроразмножения наиболее оптимальным являлось содержание в питательной среде 2.5–5.0 мкМ БАП. Для более полной реализации морфогенетических потенциалов необходимо чередовать среды с содержанием фитогормонов и безгормональные. При этом в безгормональные среды следует добавить L-глутамин и аденин сульфат в количестве 100 мг/л (MS+100мг/л L-глутамин+100мг/л аденин сульфат). Для адаптации растений-регенерантов к нестерильным условиям и при выращивании сырья может быть использована трехъярусная универсальная аэропонная установка, разработанная в ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва (Россия) (Ю.Ц. Мартиросян).

Полученное биотехнологическое сырье (трава) идентифицировано по макроскопическим (внешним) и микроскопическим (анатомическим) признакам (в соответствии с требованием Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV. 2018). В результате качественного анализа сырья на содержание основных групп биологически активных веществ выявили: фенолы, флавоноиды, дубильные вещества, алкалоиды, гликозиды, ксантоны. Для травы *Iris spuria* L. разработана методика количественного определения флавоноидов в пересчете на кверцетин.

Доказана зависимость накопления кверцетина и дубильных веществ от гормонального состава питательных сред, что дает возможность у *Iris spuria* L. (Art And Soul) регулировать накопление данных полифенолов при производстве растительного сырья.

Ключевые слова: *Iris spuria* L., вторичные метаболиты, растения-регенеранты, гидропонные растения, биотехнология получения лекарственного растительного сырья.

Введение

Использование методов культивирования растительных клеток и тканей в качестве средства производства лекарственных метаболитов имеет долгую историю. На сегодняшний день культура клеток и тканей

Тихомирова Людмила Ивановна – заведующая отделом биотехнологии растений, e-mail: l-tichomirova@yandex.ru

Щербакова Людмила Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры техносферной безопасности и аналитической химии, e-mail: l.v.sch.1970@mail.ru

Пonomарёва Ярослава Викторовна – магистрант, e-mail: l-tichomirova@yandex.ru

Дробышева Екатерина Александровна – студент, e-mail: l-tichomirova@yandex.ru

Чукубаева Алмаи Нурнагимовна – заведующая кафедрой фармации, e-mail: chukubaeva@mail.ru

растений сформировалась как дисциплина в биологии растений и направление в науке (фундаментальное и прикладное). Исследователи практики стремятся использовать биосинтетические возможности растительных организмов для получения полезных продуктов на основе знаний в области морфогенеза *in vitro* [1–4]. Конечной целью биотехнологии лекарственных растений является промышленное производство полезных натуральных продуктов.

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprtm.2019046322s

** Автор, с которым следует вести переписку.

В настоящее время существует ряд промышленных производств на основе культур клеток высших растений: в США (ESC genetic), в Корею (Samyang Genex). Тем не менее большинство опубликованных работ посвящено лабораторным экспериментам в малом масштабе. На протяжении многих лет исследователи изучают культуру растительных клеток для производства различных фитохимических веществ. Однако несмотря на десятилетия интенсивной работы, успешных примеров относительно немного. Причины, по которым эта технология практически не применяется в промышленности, – низкий выход растительных метаболитов, нестабильная продуцирующая способность культивируемых клеток и медленные темпы их роста. По мнению ряда ученых, в настоящее время культура растительных клеток не является экономически эффективной технологией [5–8].

Гидропоника используется человечеством на протяжении веков для выращивания овощей и декоративных растений. В последнее время многие исследователи используют гидроponику для производства лекарственных растений и контроля накопления ими вторичных метаболитов. Гидропоника позволяет регулировать качество и количество вторичных метаболитов. Кроме того, генетически модифицированные растения или микроклонально размноженные растения могут быть массово выращены данным методом [9–13]. В связи с этим гидропонные технологии, совмещенные с клональным микроразмножением, имеют потенциал для крупномасштабного выращивания растений и производства вторичных метаболитов [14–17].

Iris spuria L. (ирис ложный) – многолетние травянистые растения 30–90 см высоты. Цветонос слегка уплощенный, мощный, округлый, коленчатый, маловетвистый, несущие от трех до восьми цветков. Листья 30–40 см длины, 1–2 см ширины, прямостояче-распростертые, широколинейные или линейно-мечевидные, постепенно суженные, плотные, при растирании с неприятным запахом. Листочки обертки острокилеватые, плотнокожистые. Цветки 4–5 см длиной и 6–8 см диаметром, сиреневые или голубовато-фиолетовые, с темными жилками, без аромата, сидячие или почти сидячие. Цветет в мае-июне. Плодоносит в июле-августе. Корневища 1–1.5 см толщиной. Влаголюбив, но засухоустойчив. Произрастает в Центральной и Восточной Европе, в Азии [18].

Перспективное декоративное и лекарственное многолетнее растение *Iris spuria* синтезирует широкий спектр биологически активных веществ, таких как изофлавоны: текторигенин, иристоригенин А, 5,7-дигидрокси-6,2'-диметоксиизофлавоны; гликозиды изофлавонов: текторидин, 4'-О-β-D-глюкопиранозид текторигенина, 4'-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозид] текторигенина, 7-О-β-D-глюкопиранозил-4'-О-β-D-глюкопиранозид текторигенина, 7-О-β-D-глюкопиранозил-4'-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозид] текторигенина, 7-О-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-глюкопиранозид текторигенина, иристоригенин А, иристоригенин В, 4'-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозид] иристоригенина В, 7-О-β-D-глюкопиранозид генистеина, 6-О-β-D-глюкопиранозид маесопсина, 1,11-дигидрокси-9,10-метилендиокси-12а-дегидроротенон; флавоны и гликозиды флавонов: 5,7,3'-тригидрокси-6,4'-диметоксифлавоны и 6-С-β-D-глюкопиранозид изоскутелларина, а также другие полифенолы: 4-О-β-D-глюкопиранозид ванилиновой кислоты, 4-О-β-D-глюкопиранозид сиреневой кислоты, Е-кониферин, тенуифодион [19–23].

Изофлавоноиды текторигенин (см. электронное приложение, рис. 1) и текторидин и их гликозидированные формы имеют противовоспалительную, противоопухолевую, гепатопротекторную активность. Текторигенин обладает антипролиферативной активностью, а также может играть определенную роль в профилактике и лечении диабетических осложнений [24–27].

Цель данного исследования – получение сырья *Iris spuria* L. (Art And Soul) в условиях гидроponики сопряженной с клональным микроразмножением и его первичный фармакогностический анализ.

Экспериментальная часть

Культура ткани. Для введения в культуру ткани в качестве эксплантов использовали нераскрывшиеся бутоны *Iris spuria* сорт Art And Soul, предоставленные З.В. Долгановой, доктором с.-х. наук, главным научным сотрудником отдела «НИИСС имени М.А. Лисавенко» ФГБНУ ФАНЦА, Барнаул. Растения-регенеранты и гидропонные растения получали и выращивали в Отделе биотехнологии Алтайского государственного университета в соответствии с разработанными рекомендациями [17, 28].

На этапе введения в культуру *in vitro* в питательную среду вводили следующие фитогормоны:

- а) цитокининового типа действия: 6-бензиламинопури́н (БАП) Sigma, США 1–20 мкМ;
- б) ауксинового типа действия: α-нафтилуксусную кислоту (НУК) Sigma, США 3–5 мкМ.

Фитогормоны вводили в питательную среду на основе MS [29] в соответствующих концентрациях (табл. 1).

В качестве основного углевода для культивирования органов и тканей была использована сахароза в концентрации 30 г/л рН среды доводили с помощью 0.1 н HCl и 0.1 н KOH до 5.0–5.8 перед автоклавированием (условия автоклавирования питательных сред: давление 1.0 атм., температура 105–110 °С в течение 20 мин).

Экспланты выращивали в культуральной комнате, где поддерживалась температура 26–30 °С в течение 16 ч при интенсивности освещения 2000–4000 лк. Субкультивирование побегов проводили через 30 сут. Каждый эксперимент был поставлен в 10-кратной повторности.

Аэропонное выращивание. В работе использована трехъярусная универсальная аэропонная установка, разработанная ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Ю.Ц. Мартиросян). Установка построена по принципу модульности и может быть использована для научно-исследовательских работ по селекции картофеля, а также для размножения и выращивания различных сельскохозяйственных и лекарственных растений [16].

Таблица 1. Гормональный состав питательных сред для введения в культуру *in vitro* эксплантов фрагментов цветка

Фитогормоны	Соотношение фитогормонов в питательной среде								
	4			6			8		
БАП, мкМ									
НУК, мкМ	3	4	5	3	4	5	3	4	5
Цитокинин : ауксин	1.3 : 1	1 : 1	1 : 1.25	2 : 1	1.5 : 1	1.2 : 1	2.6 : 1	2 : 1	1.6 : 1

Фармакогностический анализ проводили в соответствии с ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» ГФ РФ XIV. 2018 г.

Микропрепараты готовили в соответствии с ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Для анализа брали цельные листья или фрагменты пластинки листа с краем и жилкой, части стебля, помещали в 5% раствор натрия гидроксида на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и осторожно нагревали над пламенем горелки до полного просветления. После охлаждения микропрепарата с левой стороны покровного стекла помещали фильтровальную бумагу, а с правой начинали понемногу вводить пипеткой 33% раствор глицерина до получения препарата с бесцветной включающей жидкостью. Полученный микропрепарат изучали под микроскопом [30].

Методы фитохимического анализа. Воздушно-сухую аналитическую пробу растительного сырья измельчали до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 1 мм. Экстракцию проводили в аппарате Сокслета, последовательно извлекая биологически активные соединения петролейным эфиром, 96% этанолом, 60% этанолом, водой.

Качественные реакции экстрактов проведены в соответствии с методическими рекомендациями Р.А. Музычкиной и коллег (2011) [31].

Количественное определение дубильных веществ проводили двумя методами:

1. Путем окисления перманганатом калия в присутствии индигокармина [32].
2. Спектрофотометрическим методом [33].

4 мл водного экстракта биотехнологического сырья *Iris spuria* помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки водой. Измеряли оптическую плотность раствора А на спектрофотометре при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду. Общее количество дубильных веществ X₁ в пересчете на кислоту галловую (%) рассчитывали по формуле:

$$X_1 = \frac{A_1 * 250 * 50 * 100}{m * V * 508 * (100 - W)}$$

где X₁ – общее количество дубильных веществ (%); A₁ – значение оптической плотности раствора А; 250 – количество общего объема раствора (мл); 50 – объем анализируемого раствора А; m – масса навески сырья (г); V – объем пробы (мл); 508 – удельный показатель поглощения, т.е. оптическая плотность раствора кислоты галловой; W – значение влажности сырья.

Определение осаждаемых дубильных веществ: 30 мл водного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 10 мл реактива осаждения (1% раствор желатина в 10% растворе натрия хлорида), взбалтывали 30 мин, отстаивали, фильтровали. При добавлении наблюдалось помутнение. 4 мл

полученного фильтрата переносили в колбу вместимостью 50 мл, доводя раствор водой до метки. Получали раствор Б. Измеряли оптическую плотность раствора Б при длине волны 277 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду. Содержание дубильных веществ X_2 , осаждаемых с помощью раствора осаждения, рассчитывали по формуле:

$$X_2 = \frac{(A_1 - A_2) * 250 * 50 * 100}{m * V * 508 * (100 - W)},$$

где X_2 – количество дубильных веществ, осаждаемых с помощью раствора осаждения (%); A_1 – значение оптической плотности раствора А; A_2 – значение оптической плотности раствора Б; 250 – количество общего объема раствора (мл); 50 – объем анализируемого раствора Б; m – масса навески сырья (г); V – объем пробы (мл); 508 – удельный показатель поглощения, т.е. оптическая плотность раствора кислоты галловой; W – значение влажности сырья.

Содержание экстрактивных веществ в извлечениях [34]. Расчет проводили с учетом влажности. Влажность определяли на анализаторе влажности МХ-50 при температуре 105 °С. Экстрактивные вещества выпаривали в фарфоровой чашке (предварительно доведенной до постоянной массы).

Для количественного определения содержания флавоноидов в экстрактах использована методика, основанная на их способности образовать окрашенный комплекс с раствором $AlCl_3$ [35].

Около 1 г (точная навеска) сырья помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, приливали 30 мл 70% этилового спирта, нагревали до кипения и кипятили в течение 30 мин. Затем полученный экстракт фильтровали через беззольный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Процедуру повторяли 2 раза с тем же сырьем, первый раз – с нагреванием, второй раз – без нагревания. Экстракт разбавляли до метки этиловым спиртом 70%.

Аликвоту полученного раствора переносили в мерную пробирку, прибавляли 1 мл спирта этилового 70%, 0.1 мл 10% водного раствора хлорида алюминия, 0.1 мл ацетатной буферной смеси с рН 5.8 и разбавляли дистиллированной водой до отметки 5 мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин, затем измеряли оптическую плотность относительно 10% водного раствора хлорида алюминия при длине волны 400 нм.

В качестве стандарта использовали раствор кверцетина в 70% этиловом спирте.

Для построения градуировочного графика серию аликвот с установленным шагом помещали в мерные пробирки, прибавляли в каждую 1 мл этилового спирта 70%, 0.1 мл 10% раствора хлорида алюминия, 0.1 мл ацетатной буферной смеси с рН 5.8, разбавляли дистиллированную воду до отметки 5 мл. Смеси инкубировали в течение 30 мин, затем измеряли оптическую плотность относительно 10% водного раствора хлорида алюминия при длине волны 400 нм.

Расчет содержания производили, путем пересчета оптической плотности отдельных аликвот экстракта на концентрацию согласно градуировочного графика для раствора кверцетина по следующей формуле:

$$\omega = \frac{C_{\text{кверц}} \cdot 1000}{m_{\text{нав}} \cdot V_a},$$

где ω – содержание по массе в воздушно-сухом сырье, %; $C_{\text{кверц}}$ – содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин; $m_{\text{нав}}$ – масса навески для анализа; V_a – объем аликвоты экстракта.

Статистическая обработка. Все измерения проведены не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов измерений, вычисление коэффициента корреляции проводили с помощью программы SigmaPlot 12.5.

Обсуждение результатов

Получение биотехнологического сырья Iris spuria. Для культуры *Iris spuria* на этапе собственно микро-размножения использовали питательные среды, содержащие 2.5, 5.0, 7.5 и 10.0, мкм БАП, а также среды, содержащие такое же количество цитокинина, дополненные ауксинами 1.0 мкМ НУК и 0.1 мкМ ИМК (3-индолмасляная кислота), всего девять вариантов опыта. В качестве контроля использована питательная среда, содержащая 1 мкМ БАП. Без введения фитогормонов растения не растут в культуре ткани. При культивировании *Iris spuria* определяли число образовавшихся микропобегов и высоту растения. В отличие от *Iris sibirica* [16], ирис ложный менее требователен к содержанию БАП. Наиболее оптимальным являлось содержание БАП

2.5–5.0 мкМ. Для более полной реализации морфогенетических потенций *Iris spuria* на этапе собственно микроразмножения необходимо чередовать среды с содержанием фитогормонов и безгормональные. При этом в безгормональные среды следует добавить L-глутамин и аденин сульфат в количестве 100 мг/л (MS+100 мг/л L-глутамин+100 мг/л аденин сульфат). Такая схема культивирования позволяет регенерантам закладывать адвентивные и пазушные почки при высоких концентрациях, а в следующем пассаже при снижении гормональной нагрузки почки имеют возможность развиваться в побеги. Содержание негормональных стимуляторов роста L-глутамин и аденин сульфата в питательной среде оказывает положительное влияние на качество развивающихся побегов и способности их к укоренению. Необходимо четко соблюдать чередование сред, в противном случае происходит накопление избыточного количества БАП в тканях регенерантов, что приводит к снижению коэффициента размножения, остановке роста побегов и в конечном итоге – к гибели растения (см. электронное приложение, рис. 2). Для укоренения *Iris spuria* использовали средосодержащие 3 мкМ НУК.

Растения вынимали из агаровых сред, отмывали остатки агара под проточной водой и помещали в кассеты для адаптации к нестерильным условиям на 30 сут. в аэропонную установку. Адаптированные и подросшие до 30 см растения переводили на следующий ярус установки с менее плотной густотой посадки (см. электронное приложение, рис. 3). Выращивание растений на аэропонной установке проводили в культивационном помещении, оборудованном контрольным климатическим блоком. Водообеспечение и минеральное питание растений осуществлялось путем периодического впрыскивания питательного раствора (под давлением 3 атм.), орошающего корневую систему растений. В промежутках между подачей раствора происходила аэрация корней.

Растительное сырье, полученное на основе микроклонального размножения и выращивания в условиях аэропоники, позволяет избежать ряда проблем. Сырье в условиях аэропонного выращивания не подвержено влиянию пестицидов, тяжелых металлов, загрязнению микроорганизмами. Исключена преднамеренная или ошибочная видовая фальсификация. Постоянные условия выращивания не влекут за собой изменения химического состава, что дает возможность стандартизировать данный вид сырья.

Фармакогностический анализ биотехнологического сырья Iris spuria. Лекарственное растительное сырье идентифицируют по макроскопическим (внешним) и микроскопическим (анатомическим) признакам (в соответствии с требованием ОФС [36] и ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [30]), а также определяют наличие в анализируемом сырье основных групп биологически активных веществ, подтверждающих его подлинность.

По макроскопическим признакам *Iris spuria*, выращенный в культуре ткани и аэропонике, практически ничем не отличается от интактных растений [18]. Единственное отличие, которое необходимо отметить, малые размеры в культуре *in vitro* и отсутствие цветоносов. Листья имеют унифациальную пластинку, уплощенную не тангентально по отношению к оси, а перпендикулярно к ней.

При микроскопическом анализе листьев растений-регенерантов *Iris spuria* были отмечены следующие анатомические признаки. Клетки эпидермиса верхней и нижней стороны листа однородны, с утолщенными тангентальными стенками полигональной формы с прямыми в очертании стенками. Длинные имели в среднем ширину 160 мкм и длину 478 мкм. Кутикула ровная, хорошо выражена. Устьица располагаются по всей поверхности листовой пластинки продольными рядами. Круглые, многочисленные, окружены 4 симметрично расположенными околустьичными клетками эпидермиса: две клетки параллельны устьичной щели, а две другие примыкают к полюсам замыкающих клеток (тетрацитный тип). Устьица погружены в эпидермис. На верхнем и нижнем эпидермисе волосков не обнаружено, отмечено наличие запасных питательных веществ (см. электронное приложение, рис. 4).

Под эпидермисом с обеих сторон листа располагается недифференцированный мезофилл, состоящий из одинаковых округлых клеток, плотно прилегающих друг к другу. В массе мезофилла располагаются закрытые коллатеральные пучки со склеренхимной обкладкой со стороны флоэмы. Центральная часть органа занята тонкостенной облитерированной паренхимой. Морфологическое подразделение на влагалищеобразное основание и листовую пластинку отражается на анатомическом строении органа. В срединной части листовой пластинки проводящие пучки проходят частично в виде одного ряда, частично – в виде двух близкосомкнутых рядов. С обеих сторон листа очень редко расположены эфиромасличные железки, содержащие одну выделительную клетку, в центре видна круглая ножка железки. Железки окружены клетками эпидермиса (см. электронное приложение, рис. 5).

Лист *Iris spuria*, являясь наиболее лабильным органом растения, своим внутренним строением отражает признаки ксерофитов: наличие толстого слоя кутикулы, многочисленные погруженные устьица, утолщение стенок эпидермальных клеток, мелкоклеточность мезофилла и отсутствие крупных межклетников, наличие склеренхимной обкладки вокруг пучка, а также механической ткани по краю листовой пластинки, характерны для всех видов *Iris L.*

Содержание экстрактивных веществ в лекарственном сырье – важный числовой показатель, определяющий его доброкачественность. В результате последовательной экстракции биотехнологического сырья *Iris spuria* в аппарате Сокслета различными растворителями установлено, что сырье содержало незначительное количество веществ, извлекаемых петролейным эфиром (4.8%), гораздо больше – 60% этанолом (27.9%) и водой (25.6%), доминирующей является фракция, извлекаемая 96% этанолом (46.5%).

В зависимости от химического состава лекарственного сырья и используемого растворителя в извлечение переходят те или иные действующие и сопутствующие вещества. В результате качественного анализа на основные группы БАВ полученных фракций выявили следующие особенности: петролейный эфир – фенолы, конденсированные дубильные вещества, алкалоиды; 96% этанол – фенолы, дубильные конденсированные и гидролизуемые, алкалоиды, гликозиды; 60% этанол – фенолы, дубильные конденсированные и гидролизуемые, ксантоны, алкалоиды, гликозиды; вода – фенолы, дубильные конденсированные и гидролизуемые, алкалоиды.

Основными группами биологически активных веществ, подтверждающих подлинность сырья *Iris spuria*, нами количественно определены сумма флавоноидов в пересчете на рутин и сумма дубильных веществ (рис. 1).

Кверцетин и его гликозид рутин являются известными и хорошо изученными флавонолами, которые широко распространены в растительном мире.

Наиболее богаты флавоноидами молодые, растущие органы. Накоплению флавоноидов способствует среда, богатая азотом, калием и фосфором. В южных и высокогорных районах под влиянием света и на почвах, богатых микроэлементами, увеличивается содержание флавоноидов [37]. Среда MS содержит полный, сбалансированный набор макро- и микроэлементов. В контейнерах при выращивании растений сохранялась повышенная влажность при оптимальной температуре и освещенности. В нашей работе проведена оценка влияния концентрации БАП и присутствие ауксинов как необходимых факторов успешного накопления кверцетина в тканях растений-регенерантов *I. spuria*. В результате проведенного исследования выявлена зависимость накопления кверцетина от количества содержания БАП. С увеличением концентрации фитогормона от 1.0 до 10.0 мкМ содержание кверцетина увеличивалось. Введение ауксинов оказывало отрицательное влияние на накопление флавонола (табл. 2).

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. Для подтверждения пригодности методики проводили ее валидационную оценку по параметрам: линейность, приемлемость и прецизионность на уровне повторяемости (сходимости).

Определение прецизионности (на уровне повторяемости) проводили на одном образце сырья по шести параллельным измерениям (табл. 3). Относительное стандартное отклонение равное 1.19% свидетельствует о том, что методика позволяет получить удовлетворительные по сходимости результаты.

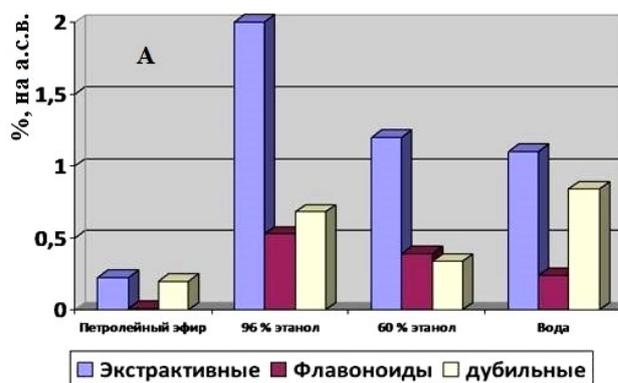


Рис. 1. Содержание БАВ в биотехнологическом сырье *Iris spuria*

Таблица 2. Зависимость содержания кверцетина в биотехнологическом сырье *I. spuria* от гормонального состава питательных сред

№ опыта	Гормональный состав питательной среды на основе MS	Содержание кверцетина на сухую массу, %
Контроль	1.0 мкМ БАП	0.26±0.06
2/1	2.5 мкМ БАП	0.30±0.08*
2/2	2.5 мкМ БАП+1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК	0.18±0.04*
3/1	5.0 мкМ БАП	0.30±0.03*
3/2	5.0 мкМ БАП+1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК	0.26±0.02
4/1	7.5 мкМ БАП	0.39±0.06*
4/2	7.5 мкМ БАП+1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК	0.35±0.05*
5/1	10.0 мкМ БАП	0.34±0.04*
5/2	10.0 мкМ БАП+1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК	0.25±0.03

Примечание. * – разность с контролем существенна при 5%-ном уровне значимости.

Таблица 3. Результаты установления прецизионности на уровне повторяемости (сходимости) валидируемой методики (n=6, P=0.90)

№ опыта	Навеска сырья, г	\bar{C}_i^*	$(c_i - \bar{c})$	$(c_i - \bar{c})^2$	Метрологические характеристики
1	1.0098	0.145	0.028	0.000784	Среднеквадратичная ошибка среднего $S_c=0.02$ RSD=1.19%
2	1.0033	0.199	0.026	0.000676	
3	1.0070	0.190	0.017	0.000289	
4	1.0053	0.172	0.001	0.000001	
5	1.0094	0.179	0.006	0.000036	
6	1.0054	0.156	0.017	0.000289	
Среднее значение \bar{c}		0.173			
Сумма значений $\sum (c_i - \bar{c})^2$				0.002075	

Примечание. * – содержание (%) в пересчете на абсолютно сухое сырье (n = 3).

Для разработки оптимальной методики была установлена область линейной зависимости оптической плотности от концентрации анализируемого вещества (суммы флавоноидов). Определение линейности проводили на 6 уровнях концентраций анализируемого извлечения (рис. 2). Растворы готовили путем разбавления и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы флавоноидов в сырье. Из полученной зависимости (рис. 2) следует, что почти все экспериментальные точки (за исключением пятой) лежат на линии тренда. Следовательно, область линейной зависимости наблюдается при концентрациях 0.0010–0.0070 г/мл. Величина коэффициента корреляции составила 0.99, что считается удовлетворительной корреляцией.

Для проверки применяемой методики выяснили влияние рН-ацетатного буферного раствора на извлечение флавоноидов в растительном сырье. Для этого готовили растворы с постоянной концентрацией кверцетина, но разным значением рН в интервале ацетатного буферного раствора от 3.8 до 6.3. рН регулировали ионоселективным электродом на иономере И-160. Измеряли оптическую плотность по вышеизложенной методике. Проводили пересчет содержания кверцетина (табл. 4) по градуировочному графику. Исходя из полученных данных, сделали вывод о том, что значение рН от 4 до 6.3 соответствует погрешности метода определения, но все же рН, равное 5.8, при котором происходило определение оптической плотности анализируемого растительного сырья ириса, является оптимальным для данной методики, так как дает наименьшую погрешность измерения.

Отсутствие систематической ошибки данной методики подтверждается «опытами с добавкой» стандартного образца кверцетина к навеске растительного сырья *Iris spuria*. Добавку брали равную 0.005 г кверцетина. Навеска сырья – 1.0014 г (табл. 5).

Критерий приемлемости – средний процент открываемости, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 98–102% (согласно рекомендациям американской ассоциацией аналитической химии [34]). В применяемой методике средний процент открываемости составил 99.9%, а относительное стандартное отклонение не превышает 5%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа.

Спектрофотометрическим методом определяли сумму дубильных веществ в растительном сырье ириса в пересчете на галловую кислоту. По результатам исследований дубильные вещества в биотехнологическом сырье *Iris spuria* накапливаются от 0.85 до 2.57%. Содержание осаждаемых дубильных веществ

меньше, в пределах от 0.11 до 0.31%. Необходимо отметить негативное влияние 6-бензилламинопурина в составе питательных сред на накопление дубильных веществ. Чем больше концентрация БАП, тем меньше содержание дубильных веществ. При этом осаждаемые дубильные вещества накапливались в гораздо большем количестве при добавлении в питательные среды ауксинов (1.0 мкМ НУК+0.1 мкМ ИМК) (рис. 3).

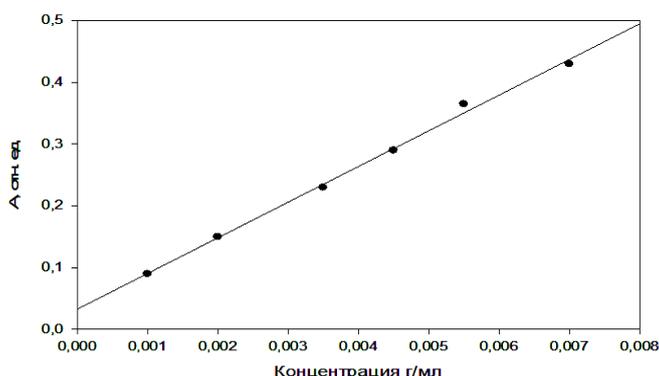


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов в извлечении из травы *Iris spuria*

Таблица 4. Влияние pH на содержание флавоноидов

№ опыта	Значение pH	Введенное содержание кверцетина, мг	Найденное содержание кверцетина, мг	ϵ , %
1	3.8	0.03018	0.0323	-6.95
2	4.0	0.03018	0.0315	-4.30
3	5.5	0.03018	0.0306	-1.32
4	5.8	0.03018	0.0299	0.993
5	6.0	0.03018	0.0297	1.66
6	6.3	0.03018	0.0287	4.97

Таблица 5. Определение правильности методики (результаты опытов с добавкой)

№ п/п	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность А, отн. ед.	Содержание*, %		R, %	Метрологические характеристики
			расчетное	полученное		
1	0.40	0.100	0.26	0.23	99.88	R _{ср} =99.90 RSD=4.16%
2	0.50	0.110	0.28	0.26	99.92	
3	0.60	0.120	0.30	0.27	99.90	

Примечание. * – содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье, R – открываемость.

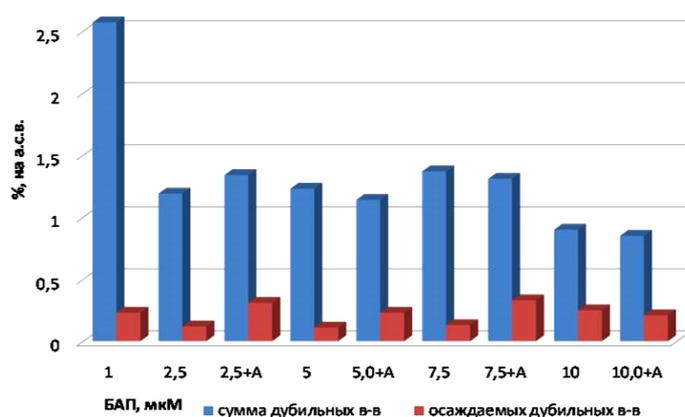


Рис. 3. Накопление суммы и % осаждаемых дубильных веществ в биотехнологическом сырье *Iris spuria* в зависимости от гормонального состава питательных сред

Заключение

В производстве лекарственного растительного сырья преследуют две цели: получение максимального количества биомассы и накопление биологически активных веществ.

Впервые в результате проведенных исследований для получения сырья *Iris spuria* L. (Art And Soul) разработаны питательные среды и схемы культивирования. На этапе собственно микроразмножения наиболее оптимальным являлось содержание в питательной среде 2.5–5.0 мкМ БАП. Для более полной реализации

морфогенетических потенциалов необходимо чередовать среды с содержанием фитогормонов и безгормональные. При этом в безгормональные среды следует добавить L-глутамин и аденин сульфат в количестве 100 мг/л (MS+100мг/л L-глутамин+100мг/л аденин сульфат). Для адаптации растений-регенерантов к нестерильным условиям и при выращивании сырья может быть использована трехъярусная универсальная аэропонная установка, разработанная ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Ю.Ц. Мартиросян).

Полученное биотехнологическое сырье (трава) идентифицировано по макроскопическим (внешним) и микроскопическим (анатомическим) признакам (в соответствии с требованием ОФС ГФ РФ XIV. 2018). В результате качественного анализа сырья на содержание основных групп БАВ выявили: фенолы, флавоноиды, дубильные вещества, алкалоиды, гликозиды, ксантоны.

Для травы *Iris spuria* L. разработана методика количественного определения флавоноидов в пересчете на кверцетин. Методика позволяет определить содержание суммы флавоноидов в растительном сырье *Iris spuria* в присутствии других соединений, проста в исполнении и не требует дорогостоящей аппаратуры. А проведенная валидационная оценка методики свидетельствует об ее пригодности для контроля качества сырья *Iris spuria*.

Доказана зависимость накопления кверцетина и дубильных веществ от гормонального состава питательных сред, что дает возможность регулировать накопление данных полифенолов при производстве растительного сырья *Iris spuria* L. (Art And Soul).

Список литературы

1. Misawa M. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite. FAO Agricultural Services Bulletin No. 108. Roma, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1994. URL: <http://www.fao.org/docrep/t0831e/t0831e00.htm>.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999. 152 с.
3. Rout G.R., Samantaray S., Das P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants // Biotechnol Adv. 2000. Vol. 18. Pp. 91–120.
4. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // Phytochem Rev. 2002. Vol. 1. Pp. 13–25. DOI: 10.1023/A:1015871916833.
5. Bulgakov V.P., Kozyrenko M.M., Fedoreyev S.A., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Zvereva L.V. Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon* // Fitoterapia. 2001. Vol. 72. Pp. 394–401. DOI: 10.1016/S0367-326X(00)00343-9.
6. Sivakumar G., Bacchetta L., Gatti R., Zappa G. HPLC screening of natural vitamin E from Mediterranean plant biofactories – a basic tool for pilot-scale bioreactors production of alpha-tocopherol // J Plant Physiol. 2005. Vol. 162. Pp. 1280–1283. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.04.018.
7. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review // Biotechnology Advances. 2008. Vol. 26. Pp. 548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
8. Носов А.М. Клеточные технологии: настоящее и перспективы // Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере. Якутск, 2018. С. 17–18.
9. Economakis C., Skaltsa H., Demetzos C., Sokovic M., Thanos C.A. Effect of phosphorus concentration on the volatile constituents of leaves and bracts of *Origanum dictamnus* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. Vol. 50. Pp. 6276–6280.
10. Stewart C.L., Lovett-Doust L. Effect of phosphorus treatment on growth and yield in medicinal plant herb *Calendula officinalis* L. (Standard Pacific) under hydroponic cultivation // Canadian Journal of Plant Science. 2003. Pp. 611–617. DOI: 10.4141/P02-132.
11. Hassanpouraghdam M.B., Gohari G.R., Tabatabaei S.J., Dadpour M.R. Inflorescence and leaves essential oil composition of hydroponically grown *Ocimum basilicum* L. // Journal of the Serbian Chemical Society. 2010. Vol. 75(10). Pp. 1361–1368. DOI: 10.2298/jsc100311113h.
12. Kiferle C., Lucchesini M., Mensuali-Sodi A., Maggini R., Raffaell, A., Pardossi A. Rosmarinic acid content in basil plants grown *in vitro* and in hydroponics // Central European Journal of Botany. 2011. Vol. 6. Pp. 946–957. DOI: 10.2478/s11535-011-0057-1.
13. Sugumaran P., Kowsalya N., Karthic R., Seshadri S. Biomass production and antibacterial activity of *Justicia gendarussa*: A valuable medicinal plant // The Journal of Tropical Life Science. 2013. Vol. 3. Pp. 8–13. DOI: 10.11594/jtls.03.01.02.
14. Тихомирова Л.И., Ильичёва Т.Н., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Способ получения лекарственного растительного сырья лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) в условиях гидропонии // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2016031228.
15. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Сысоева А.В. Фитохимический анализ биотехнологического сырья представителей рода *Potentilla* L. // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 145–154. DOI: 10.14258/jcprm.2018012734.

16. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичева Т.Н., Мартиросян Ю.Ц. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris sibirica* L.) методами биотехнологии // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 235–245. DOI: 10.14258/jcprn.2018043887.
17. Антипова Е.А., Кудрикова Л.Е., Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Чепрасова М.Ю., Харнутова Е.П. Оценка содержания полифенолов в биотехнологическом сырье *Iris sibirica* L. сорт Стерх в сравнении с интактными растениями // Химия растительного сырья. 2019. №2. С. 239–250. DOI: 10.14258/jcprn.2019024799.
18. Мамонтова Е.Н. Коллекция ирисов природной флоры, интродуцируемых в ботаническом саду Самарского государственного университета // Самарская Лука. 2007. Т. 16. №3(21). С. 518–531.
19. Shawl A.S., Vishwapaul, Zaman A., Kalla A.K. Isoflavones of *Iris spuria* // Phytochemistry. 1984. Vol. 23. N10. Pp. 2405–2406.
20. Singab A.N. Flavonoids from *Iris spuria* (Zeal) cultivated in Egypt // Arch. Pharm. Res. 2004. Vol. 27(10). Pp. 1023–1028.
21. Farag S.F., Kimura Y., Ito H., Takayasu J., Tokuda H., Hatano T. New isoflavone glycosides from *Iris spuria* L. (California) cultivated in Egypt // J. Nat. Med. 2009. Vol. 63(1). Pp. 91–95. DOI: 10.1007/s11418-008-0291-7.
22. Bhat G., Shawl A.S., Shah Z., Tantry M. HPLC-DAD-ESI-MS/MS identification and characterization of major constituents of *Iris crocea*, *Iris germanica* and *Iris spuria* growing in Kashmir Himalayas, India // J. Anal. Bioanal. Tech. 2014. Vol. 5(6). Pp. 1–10.
23. Тарбеева Д.В. Полифенольные метаболиты *Iris pseudacorus* L. и его клеточной культуры: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 2016. 126 с.
24. Akther N., Andrabi K., Nissar A., Ganaie S., Chandan B.K., Gupta A.P., Khuswant M., Sultana S., Shawl A.S. Hepatoprotective activity of LC-ESI-MS standardized *Iris spuria* rhizome extract on its main bioactive constituents // Phytomedicine. 2014. Vol. 21(10). Pp. 1202–1207. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.04.007.
25. Thelen P., Scharf J., Burfeind P., Hemmerlein B., Wuttke W., Spengler B., Christoffel V., Ringert R., Seidlová-Wuttke D. Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer // Carcinogenesis. 2005. Vol. 26(8). Pp. 1360–1367. DOI: 10.1093/carcin/bgi092.
26. Wu J.-H., Wang Y.-R., Huang W.-Y., Tan R.-X. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of tectorigenin on hepatic stellate cells // World J. Gastroenterol. 2010. Vol. 16(31). Pp. 3911–3918. DOI: 10.3748/wjg.v16.i31.3911.
27. Choi J., Shin M.H., Park K.Y., Lee K.T., Jung H.J., Park H.J. Effect of tectorigenin obtained from *Pueraria thunbergiana* flowers on phase I and –II enzyme activities in the streptozotocin-induced diabetic rat // Nat. Prod. Sci. 2003. Vol. 9(4). Pp. 235–240.
28. Tikhomirova L. Morphogenesis and histology of cultures of *Iris ensata* Thunb. Generative organs // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2017. Pp. 270–273. DOI: 10.1007/s11627-017-9817-6.
29. Murashige T., Skoog F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N4. P. 473.
30. ОФС.1.5.3.0003.15. Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. М., 2015. 22 с.
31. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Технология производства и анализ фитопрепаратов. Алматы, 2011. 360 с.
32. ОФС.1.5.3.0008.18. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. М., 2018. 4 с.
33. Казеева А.Р. Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L.) и перспективы ее использования в медицине: дис. ... канд. фарм. наук. Уфа, 2016. 204 с.
34. ОФС.1.5.3.0006.15. Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. М., 2015. 5 с.
35. Коновалов Д.А., Коновалова Д.С. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве пиретрума девичьего и ее валидация // Научные ведомости. Медицина. Фармация. 2012. №16(135). С. 165–159.
36. ОФС.1.5.1.0002.15. Травы. М., 2015. 8 с.
37. Коренская И.М., Ивановская Н.П., Измалкова И.Е. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды. Воронеж, 2007. 81 с.

Поступила в редакцию 19 августа 2019 г.

После переработки 14 октября 2019 г.

Принята к публикации 20 октября 2019 г.

Для цитирования: Тихомирова Л.И., Щербакова Л.В., Пономарёва Я.В., Дробышева Е.А., Чукубаева А.Н. Перспективы получения сырья методами биотехнологии и анализ химического состава биомассы *Iris spuria* L. (Art And Soul) // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 315–326. DOI: 10.14258/jcprn.2019046322.

Tikhomirova L.I.^{1*}, Shcherbakova L.V.¹, Ponomareva Ya.V.¹, Drobysheva E.A.¹, Chukubaeva A.N.² PROSPECTS OF OBTAINING RAW MATERIALS BY METHODS OF BIOTECHNOLOGY AND SCREENING OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF BIOMASS *IRIS SPURIA* L. (ART AND SOUL)

¹Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: l-tikhomirova@yandex.ru

²Ust-Kamenogorsk Dental College, 101 Nezavisimosti Ave., Ust-Kamenogorsk (Republic of Kazakhstan)

Hydroponic technologies combined with clonal micropropagation have the potential for large-scale plant growth and production of secondary metabolites. The aim of this study was to obtain raw materials *Iris spuria* L. (Art And Soul) in hydroponics coupled with clonal micropropagation, and its primary pharmacognostic analysis.

When receiving the raw material *Iris spuria* L. (Art And Soul) at the stage of micro-multiplication itself, the most optimal content in the nutrient medium was 2.5-5.0 µm BAP. For a more complete realization of morphogenetic potentials it is necessary to alternate media with the content of phytohormones and hormone-free. At the same time, l-glutamine and adenine sulfate in an amount of 100 mg/l (MS+100mg/l L-glutamine+100mg/l adenine sulfate) should be added to the hormone-free media. For the adaptation of regenerated plants to non-sterile conditions and in the cultivation of raw materials can be used universal three-tiered aeroponic system, developed by All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow (Russia) (Iu.Ts. Martirosian).

The obtained biotechnological raw materials (grass) were identified by macroscopic (external) and microscopic (anatomical) features (in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV. 2018). As a result of the qualitative analysis of raw materials for the content of the main groups of biologically active substances, the following were revealed: phenols, flavonoids, tannins, alkaloids, glycosides, xanthenes. For the herb *Iris spuria* L. the method of quantitative determination of flavonoids in terms of quercetin is developed.

The dependence of the accumulation of quercetin and tannins on the hormonal composition of nutrient media, which makes it possible for *Iris spuria* L. (Art And Soul) to regulate the accumulation of these polyphenols in the production of plant raw materials.

Keywords: *Iris spuria* L., secondary metabolites, regenerated plants, hydroponic plants, biotechnology for the production of medicinal plants.

References

- Misawa M. *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite. FAO Agricultural Services Bulletin No. 108.* Roma, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1994, URL: <http://www.fao.org/docrep/t0831e/t0831e00.htm>
- Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ikh osnove.* [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology based on them]. Moscow, 1999, 152 p. (in Russ.).
- Rout G.R., Samantaray S., Das P. *Biotechnol Adv.*, 2000, vol. 18, pp. 91–120.
- Verpoorte R., Contin A., Memelink J. *Phytochem Rev.*, 2002, vol. 1, pp. 13–25, DOI: 10.1023/A:1015871916833.
- Bulgakov V.P., Kozyrenko M.M., Fedoreyev S.A., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Zvereva L.V. *Fitoterapia*, 2001, vol. 72, pp. 394–401, DOI: 10.1016/S0367-326X(00)00343-9.
- Sivakumar G., Bacchetta L., Gatti R., Zappa G. *J Plant Physiol.*, 2005, vol. 162, pp. 1280–1283, DOI: 10.1016/j.jplph.2005.04.018.
- Matkowski A. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, pp. 548–560, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
- Nosov A.M. *Perspektivy fitobiotekhnologii dlya uluchsheniya kachestva zhizni na Severe.* [Prospects for phytobiotechnology to improve the quality of life in the North]. Yakutsk, 2018, pp. 17–18. (in Russ.).
- Economakis C., Skaltsa H., Demetzos C., Sokovic M., Thanos C.A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, pp. 6276–6280.
- Stewart C.L., Lovett-Doust L. *Canadian Journal of Plant Science*, 2003, pp. 611–617, DOI: 10.4141/P02-132.
- Hassanpouraghdam M.B., Gohari G.R., Tabatabaei S.J., Dadpour M.R. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2010, vol. 75(10), pp. 1361–1368, DOI: 10.2298/jsc100311113h.
- Kiferle C., Lucchesini M., Mensuali-Sodi A., Maggini R., Raffaell, A., Pardossi A. *Central European Journal of Botany*, 2011, vol. 6, pp. 946–957, DOI: 10.2478/s11535-011-0057-1.
- Sugumar P., Kowsalya N., Karthic R., Seshadri S. *The Journal of Tropical Life Science*, 2013, vol. 3, pp. 8–13, DOI: 10.11594/jtls.03.01.02.
- Tikhomirova L.I., Il'ichova T.N., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 59–66, DOI: 10.14258/jcprm.2016031228. (in Russ.).
- Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sysoyeva A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 145–154, DOI: 10.14258/jcprm.2018012734. (in Russ.).
- Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'ichova T.N., Martirosyan Yu.Ts. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 235–245, DOI: 10.14258/jcprm.2018043887. (in Russ.).
- Antipova Ye.A., Kudrikova L.Ye., Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Cheprasova M.Yu., Kharhutova Ye.P. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 2, pp. 239–250, DOI: 10.14258/jcprm.2019024799. (in Russ.).
- Mamontova Ye.N. *Samarskaya Luka*, 2007, vol. 16, no. 3(21), pp. 518–531. (in Russ.).
- Shawl A.S., Vishwapaul, Zaman A., Kalla A.K. *Phytochemistry*, 1984, vol. 23, no. 10, pp. 2405–2406.
- Singab A.N. *Arch. Pharm. Res.*, 2004, vol. 27(10), pp. 1023–1028.

* Corresponding author.

21. Farag S.F., Kimura Y., Ito H., Takayasu J., Tokuda H., Hatano T. *J. Nat. Med.*, 2009, vol. 63(1), pp. 91–95, DOI: 10.1007/s11418-008-0291-7.
22. Bhat G., Shawl A.S., Shah Z., Tantry M. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, 2014, vol. 5(6), pp. 1–10.
23. Tarbeyeva D.V. *Polifenol'nyye metabolity Iris pseudacorus L. i yego kletchnoy kul'tury: dis. ... kand. khim. nauk.* [Polyphenolic metabolites of *Iris pseudacorus* L. and its cell culture: dis. ... cand. chem. sciences]. Vladivostok, 2016, 126 p. (in Russ.).
24. Akther N., Andrabi K., Nissar A., Ganaie S., Chandan B.K., Gupta A.P., Khuswant M., Sultana S., Shawl A.S. *Phyto-medicine*, 2014, vol. 21(10), pp. 1202–1207, DOI: 10.1016/j.phymed.2014.04.007.
25. Thelen P., Scharf J., Burfeind P., Hemmerlein B., Wuttke W., Spengler B., Christoffel V., Ringert R., Seidlová-Wuttke D. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26(8), pp. 1360–1367, DOI: 10.1093/carcin/bgi092.
26. Wu J.-H., Wang Y.-R., Huang W.-Y., Tan R.-X. *World J. Gastroenterol.*, 2010, vol. 16(31), pp. 3911–3918, DOI: 10.3748/wjg.v16.i31.3911.
27. Choi J., Shin M.H., Park K.Y., Lee K.T., Jung H.J., Park H.J. *Nat. Prod. Sci.*, 2003, vol. 9(4), pp. 235–240.
28. Tikhomirova L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 2017, pp. 270–273, DOI: 10.1007/s11627-017-9817-6.
29. Murashige T., Skoog F.A. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, no. 4, p. 473.
30. OFS.1.5.3.0003.15. *Tekhnika mikroskopicheskogo i mikrokhimicheskogo issledovaniya lekarstvennogo rastitel'-nogo syr'ya i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatov.* [OFS.1.5.3.0003.15. The technique of microscopic and microchemical studies of medicinal plant materials and herbal medicines]. Moscow, 2015, 22 p. (in Russ.).
31. Muzychkina R.A., Korul'kin D.Yu., Abilov Zh.A. *Tekhnologiya proizvodstva i analiz fitopreparatov.* [Production technology and analysis of herbal remedies.]. Almaty, 2011, 360 p. (in Russ.).
32. OFS.1.5.3.0008.18. *Opredeleniye sodержaniya dubil'nykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'ye i le-karstvennykh rastitel'nykh preparatakh.* [OFS.1.5.3.0008.18. Determination of the content of tannins in medicinal plant materials and medicinal herbal preparations]. Moscow, 2018, 4 p. (in Russ.).
33. Kazeyeva A.R. *Farmakognosticheskoye izucheniye krovokhlobki lekarstvennoy (Sanguisorba officinalis L.) i per-spektivnyyeyo ispol'zovaniye v meditsine: dis. ... kand. farm. nauk.* [Pharmacognostic study of drug hemorrhage (*Sanguisorba officinalis* L.) and prospects for its use in medicine: dis. ... cand. farm. sciences.]. Ufa, 2016, 204 p. (in Russ.).
34. OFS.1.5.3.0006.15. *Opredeleniye sodержaniya ekstraktivnykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'ye i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh.* [OFS.1.5.3.0006.15. Determination of the content of extractives in medicinal plant materials and herbal preparations]. Moscow, 2015, 5 p. (in Russ.).
35. Kononov D.A., Kononova D.S. *Nauchnyye vedomosti. Meditsina. Farmatsiya*, 2012, no. 16(135), pp. 165–159. (in Russ.).
36. OFS.1.5.1.0002.15. *Travy.* [OFS.1.5.1.0002.15. Herbs]. Moscow, 2015, 8 p. (in Russ.).
37. Korenskaya I.M., Ivanovskaya N.P., Izmalkova I.Ye. *Lekarstvennyye rasteniya i lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye, sodержashchiye flavonoidy.* [Medicinal plants and medicinal plant materials containing flavonoids.]. Voronezh, 2007, 81 p. (in Russ.).

Received August 19, 2019

Revised October 14, 2019

Accepted October 20, 2019

For citing: Tikhomirova L.I., Shcherbakova L.V., Ponomareva Ya.V., Drobysheva E.A., Chukubaeva A.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 315–326. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019046322.