

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М.СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

Попова Татьяна Сергеевна
ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И
СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЧЕК И ЛИСТЬЕВ
СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM L.*)

14.04.02. – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель –
доктор фармацевтических наук,
Терёшина Н.С.

Москва 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОГО, ФИТОХИМИЧЕСКОГО И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ПОЧЕК И ЛИСТЬЕВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ.....	10
1.1. Ботаническая характеристика	10
1.2. Места обитания, ареал, заготовка сырья	11
1.3. Химический состав	12
1.4. Фармакологические свойства	15
1.5. Применение в аллопатической, гомеопатической и народной медицине.....	16
1.6. Современные аспекты стандартизации сырья и настойки го- меопатической матричной смородины черной.....	17
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	26
ЧАСТЬ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	27
Глава 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДО- ВАНИЯ.....	27
2.1. Объекты исследования.....	27
2.2. Материалы и методы исследования.....	27
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ И ПОЧЕК ЧЕРНОЙ СМОРОДИНЫ.....	31
3.1 Изучение анатомического строения листьев черной сморо- дины.....	31
3.2 Изучение анатомического строения почек смородины чер- ной.....	40
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	45
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕ- СКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ И ПОЧКАХ СМОРОДИ- НЫ ЧЕРНОЙ (<i>RIBES NIGRUM</i> L.).....	46

4.1. Определение основных групп БАВ в сырье качественными реакциями и методом ТСХ	46
4.2. Изучение углеводов в почках и листьях.....	51
4.3. Изучение аминокислот в почках и листьях	57
4.4. Количественное содержание тритерпеноидов в почках и листьях	61
4.5. Определение аскорбиновой кислоты в почках и листьях	66
4.6. Изучение катехинов в почках и листьях	72
4.7. Изучение состава эфирного масла почек черной смородины.	77
4.8. Изучение качественного состава флавоноидов почек и листьев.....	91
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	96
Глава 5. РАЗРАБОТКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА СЫРЬЯ И НАСТОЕК ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ.....	98
5.1. Стандартизация сырья и разработка проектов НД на свежие и высушенные листья смородины черной.....	98
5.1.1. Определение числовых показателей и подлинности.....	98
5.1.2. Количественное определение флавоноидов.....	102
5.1.3. Установление сроков годности сырья	107
5.2. Получение и стандартизация настоек гомеопатических матричных из свежих и высушенных листьев смородины черной	110
5.2.1. Технология приготовления НГМ из свежих листьев смородины черной.....	110
5.2.2. Технология приготовления НГМ из высушенных листьев смородины черной.....	112
5.2.3. Исследование эфирного масла в НГМ.....	113
5.2.4. Установление показателей качества настоек гомеопатических матричных.....	122
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	128
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	148

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ – государственный отраслевой стандарт

ГФ – Государственная Фармакопея

ГФ – газовая хроматография

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МС – масс-спектрометрия

НГМ – настойка гомеопатическая матричная

НД – нормативный документ

ОФС - общая фармакопейная статья

РСО – рабочий стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

ФС – фармакопейная статья

R_f – расстояние от линии старта до середины пятна, отнесенное к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Традиционно, растения являются одним из основных источников получения лекарственных средств. Популярность фитотерапии и гомеопатического метода лечения в последнее время значительно возросли в связи с такими преимуществами, как малая токсичность, низкая частота побочных эффектов, высокая эффективность и доступность.

Одним из важных лекарственных растений является смородина черная (*Ribes nigrum* L.), которая широко используется в официальной медицине, гомеопатии и народной медицине. Листья и плоды смородины входят в состав витаминных сборов. В народной медицине почки и листья смородины чёрной используются в народной медицине в виде водных извлечений – настоев, отваров, чаёв, их назначают для лечения ревматизма, хронических кожных болезней, подагры, болезнях печени и почек. Фармакопейным сырьем смородины являются ягоды, которые входят в состав фитопрепаратов. Почки и листья смородины являются исходным сырьем для изготовления гомеопатических матричных настоек, которые служат субстанцией для лекарственных средств, применяемых для лечения мочекаменной болезни, подагры, суставного ревматизма, циститов, воспалительных процессов пищеварительной системы [109, 116, 138, 144, 149]. Листья и настойка гомеопатическая матричная (НГМ) смородины черной описаны в Гомеопатических Фармакопеях Франции и США [148, 157].

Отечественная нормативная документация на сырье и настойку гомеопатическую матричную смородины черной в настоящее время отсутствует.

Все изложенное выше позволяет заключить, что сравнительное фармакогностическое исследование почек и листьев смородины, а также стандартизация сырья и настоек гомеопатических матричных, направленные на разработку нормативной документации, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что листья и почки чёрной смородины широко используются в гомеопатической практике и входят в состав фитопрепаратов, отечественные нормативные доку-

менты на сырьё и настойки гомеопатические матричные не разработаны в связи с отсутствием данных о подробном составе биологически активных веществ сырья и методах их анализа. Не установлен количественный состав биологически активных веществ данного сырья.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является сравнительное фармакогностическое исследование почек и листьев смородины черной, получение НГМ на основе листьев и стандартизация.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- провести анализ отечественной и зарубежной научной литературы и нормативной документации, регламентирующей качество сырья и гомеопатических матричных настоек;
- изучить морфолого-анатомическое строение листьев и почек чёрной смородины и выявить диагностические признаки для идентификации сырья;
- исследовать состав биологически активных веществ сырья;
- разработать НГМ из свежих и высушенных листьев чёрной смородины, и показатели их качества;
- разработать проекты фармакопейных статей на высушенные и свежие листья смородины черной и НГМ из данных видов сырья.

Научная новизна работы. Изучено морфолого-анатомическое строение листьев и почек чёрной смородины и выявлены диагностические признаки для идентификации сырья.

Впервые проведено сравнительное изучение биологически активных веществ почек и листьев черной смородины. С использованием современных методов исследования (ТСХ, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС) выявлены различия качественного состава и количественного содержания БАВ почек и листьев (флавоноидов, катехинов, аминокислот, углеводов).

Впервые из почек чёрной смородины выделено и установлено строение четырех флавоноидов (производных кверцетина и мирицетина) и семи катехи-

нов, установлено количественное содержание эфирного масла (2,77%) и определён его компонентный состав.

Разработаны методы получения НГМ из свежих и высушенных листьев черной смородины; подобраны оптимальные условия качественного и количественного анализа БАВ и разработаны методики контроля качества сырья и НГМ на основе современных физико-химических методов.

Теоретическая значимость работы. Экспериментально-практический материал, представленный в работе, может служить теоретической базой для исследования и создания лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья «почки и листья чёрной смородины», использование современных физико-химических методов позволяет установить оптимальные теоретические параметры процесса экстракции биологически активных веществ из листьев чёрной смородины.

Практическая значимость работы. На основе проведенных исследований разработаны проекты Фармакопейных статей:

- «Смородина черная листья свежие *Ribes nigrum folia recens*»;
- «Смородина черная листья *Ribes nigrum folia*»;
- «*Ribes nigrum* Настойка гомеопатическая матричная из свежих листьев»;
- «*Ribes nigrum* Настойка гомеопатическая матричная из высушенных листьев».

Методология и методы исследования. Объектами исследования служили почки и листья чёрной смородины и НГМ из свежих и высушенных листьев. При выполнении работы были использованы физико-химические методы: ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ, хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрия. Статистическую обработку результатов исследования производили в соответствии с ГФ XI. Микроскопический анализ сырья проводили в соответствии с техникой и требованиями, описанными в ГФ XI.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных статей, полностью отражающих содержание диссертации: из них 5 статей в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ.

Степень достоверности результатов. Для получения результатов по качественному составу и количественному содержанию основных биологически активных веществ были проведены исследования по анализу девяти серий лекарственного растительного сырья. Сопоставление полученных результатов с применением методов статистической обработки позволяет считать их достоверными.

Апробация диссертации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на XXIV, XXV Московских международных гомеопатических конференциях «Развитие гомеопатического метода в современной медицине» (Москва, 2014–2015), На научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2014, 2015), Московской международной конференции, посвященной «Дню Татьяны» (24-25 января 2015, Москва). Апробация диссертации состоялась на заседании Научного совета НИИ фармации и кафедры фармакогнозии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М Сеченова Минздрава России (Москва, 2015).

Личный вклад автора. При непосредственном участии автора были определены цель и задачи работы, разработаны методологические подходы к их выполнению; был проведен сбор, обобщение и анализ литературных данных. Диссертант принимал непосредственное участие при разработке методик качественного и количественного определения БАВ в исследуемых объектах. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов, написании публикаций и нормативной документации. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 –

«фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 6 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом: «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» №012012616553.

Основные положения, вынесенные на защиту:

- Результаты морфолого-анатомического изучения и выявление диагностических признаков почек и листьев чёрной смородины.
- Результаты изучения качественного состава и количественного содержания БАВ (флавоноидов, катехинов, аминокислот, углеводов, эфирного масла, аскорбиновой кислоты) почек и листьев чёрной смородины.
- Результаты стандартизации сырья (высушенных и свежих листьев) смородины черной и НГМ из данных видов сырья.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 29 таблиц и 39 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего 165 источников, в том числе 71 на иностранных языках.

Полученные результаты обработаны статистически, обобщены в таблицах, выражены в соответствующих формулах, которые приведены в работе.

ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОГО, ФИТОХИМИЧЕСКОГО И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ПОЧЕК И ЛИСТЬЕВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

1.1. Ботаническая характеристика

Сморóдина чёрная (*Ribes nígrum* L.) относится к монотипному семейству Крыжовниковые (*Grossulariaceae*) - семейство двудольных цветковых растений порядка Камнеломкоцветные. Род Смородина (*Ribes*) содержит около 190 видов, в России имеется свыше 30 сортов.



Рис. 1. Внешний вид листьев, плодов и цветков *Ribes nigrum* L.
[<http://mag.org.ua/rast/trava508.html>]

Смородина представляет собой многолетний кустарник высотой 1-2 м. Побеги желтовато-серые, опушенные. Ветви покрыты темно-бурой или красно-коричневой корой. Почки бледно-зеленые. Листья очередные, черешковые, по краю пильчатые или зубчатые, 3-5 пальчато-лопастные, с 3-5 острыми лопастями до 10 см ширины, средняя доля более крупная. Листья с верхней стороны темно-зеленые, с нижней стороны светлее, с опушением по жилкам, имеют

ароматный специфический запах. Цветки мелкие, обоеполые, лилового или розовато-серого цвета, 7-9 мм длины, ширококолокольчатые с 5 отогнутыми чашелистиками, 5 тычинок, венчиком из 3 лепестков, пестика с нижней 1 - гнездной завязью. Цветки собраны по 5-10 в поникшие кисти, цветоножке колокольчатое. Плод - сферическая многосеменная голая ягода, черного, темно-лилового, темно-красного или буроватого цвета до 10 мм. Цветет в мае-июне, плодоносит в июле-августе [5, 9, 16, 18, 20, 28, 39, 40, 44, 82, 88].

1.2. Места обитания, ареал, заготовка сырья

Как дикорастущее растение смородина черная распространена в европейской части России, на Урале, в Западной и Восточной Сибири [25], в Западной Европе, Казахстане, Украине, Белоруссии [26], Монголии, Китае. Кусты смородины предпочитают увлажненные места по берегам рек и озер, могут образовывать большие заросли.

Смородина черная введена в культуру как ягодное растение еще в средние века. В настоящее время она широко культивируется как в нашей стране [24], так и на Украине, в Белоруссии, Прибалтике, а также странах Западной Европы и Северной Америке, это одна из самых распространенных ягодных культур как в промышленных садах, так на приусадебных участках.

Размножается смородина вегетативно, в том числе делением куста, укоренением пригнутых к почве ветвей и корневыми отпрысками. Семенное размножение применяется только при селекции.

Лекарственным сырьем черной смородины служат плоды, листья и почки. Плоды созревают в июле-августе, их собирают в сухую погоду по мере созревания. Ягоды сортируют, очищают от примесей и сушат, расстилая тонким слоем на подстилке или рамах, обтянутых марлей или при температуре 35-40°C, затем 55-60°C.

Листья заготавливают летом с начала цветения до листопада, сушат на воздухе в тени. Почки заготавливают зимой или ранней весной. Ягоды и листья хранят в мешочках или деревянной таре. Почки консервируют этанолом. Срок хранения сырья - 1 год [9, 44, 48, 53, 88, 89, 92].

1.3. Химический состав

Плоды

Официальным сырьем черной смородины являются плоды, используемые в качестве поливитаминного средства. Химический состав плодов изучен достаточно хорошо. Плоды содержат витамины, в том числе: аскорбиновую кислоту (в зрелых плодах до 50 мг%), витамины Р, В₁, В₂, В₆, каротины, токоферолы, витамины группы К. Содержание витамина Р в ягодах черной смородины часто превышает 1%. [44, 87, 89, 94, 151].

В плодах содержатся сахара (от 4,5 до 16,8 мг/%, в основном глюкоза и фруктоза) и органические кислоты (до 4%, яблочная, винная, янтарная, лимонная, никотиновая - 2,28%), содержат калий 365 мг в 100 г, железо - 10,9 мг в 100 г, соли кальция, магния, фосфора и натрия, микроэлементы (В, Мп, Zn, Мо, Со, Си, Fe, Y) [11], белки - 1% [59], пектиновые вещества - 0,38-1,5% [59], дубильные - 0,39-0,43%, гликозиды, эфирное масло [53, 58, 83]. В плодах смородины присутствуют антоцианы [140, 141], основные из которых: дельфинидин-3-О-глюкозид, дельфинидин-3-О-рутинозид, цианидин-3-О-глюкозид и цианидин-3-О-рутинозид [126].

В спелых ягодах черной смородины найдены флавоноиды. Основными флавоноидными гликозидами являются: мирицетин 3-β-D-глюкопиранозид, рутин и изокверцитрин, также доказано 3-рутинозидов и 3-глюкозидов цианидина и дельфинидина. Выделены также сложные эфиры гидроксикоричные кислот: 1-О-каффеил-β-D-глюкопираноз, 1-О-феруил- и 1-О-п-кумарил-β-D-глюкопираноза, гидроксициннамил-D-глюкоза [118, 121, 129, 155].

Семена черной смородины содержат жирное масло, в его составе триглицериды двух октадекатриеновых кислот: α- и γ-линолевых, которые составляют 11-16% от всего количества жирных кислот, и тетраеновой кислоты - стеариновой [94]

Листья и почки

По литературным данным листья черной смородины содержат несколько классов биологически активных веществ: эфирное масло, дитерпены, протоанто-

цианидины, углеводы, витамины (аскорбиновую кислоту), флавоноиды [54, 127].

Особый аромат листьев обусловлен наличием эфирного масла, содержание которого составляет 0,02%. В различных публикациях приводятся несколько отличающиеся данные, как по качественному, так и количественному составу масла. Это обусловлено, по-видимому, различными источниками получения сырья. В составе эфирного масла найдены: Δ^3 -карен (18,7%), β -кариофиллен (12,9-17,7%), сабинен (11,6%), α -терпинолен (10,6%), *цис*- β -оцимен (10,6%), α -пинен (1,5%), Δ^2 -карен, *n*-цимен-8-ол, линалоол, гераниол, лимонен, α -фелландрен, β -фелландрен, метилсалицилат, бензальдегид, метилэтилбензоат, *цис*-сабинен гидрат, *цис*- β -оцимен, *транс*- β -оцимен, *алло*-оцимен, 1-октен-3-ол, β -мирцен, α -терпинен, γ -терпинен, *n*-цимен, *о*-цимен, ундекан, *транс, транс*-2,6-диметил-1,3,5,7-октатераен, *транс*-эпокси-оцимен, терпинен-4-ол, α -терпинеол, нерол, борнилацетат, δ -элемен, β -элемен, γ -элемен, α -терпинил ацетат, β -бурбонен, α -гумулен (10,2%), аллоаромадендрен, γ -мууролен, α -мууролен, гермакрен D, гермакрен B, гермакрен D-4-ол, β -селинен, бициклогермакрен, *транс, транс*- α -фарнезен, δ -кадинен, гедикариол, кариофиллен оксид (10,6%), гумулен эпоксид-II, гелифолен-12-ал, τ -кадинол, α -кадинол, 14-гидрокси-*цис*-кариофиллен, эудесма-4(15),7-диен-1 β -ол, аморфа-4,9-диен-2-ол, фитол, 4-метокси-2-метилбутан-2-тиол, 2-цианобутан-3-ол, 2-циано-(Z)-2-бутен-1-ол, 2-циано-(E)-2-бутен-1-ол [54, 95, 110, 128, 131].

Листья содержат несколько групп полифенольных соединений, в том числе проантоцианидины и цианидины [144]. Найдены: катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин, галлокатехин -(4a->8)-галлокатехин, галлокатехин -(4a->8) эпигаллокатехин, галлокатехин -(4a->8)-катехин, галлокатехин -(4a->6)-галлокатехин, галлокатехин-(4a->8)-галлокатехин -(4a->8)-галлокатехин; дельфинидин-3-О- β -D-глюкозид, дельфинидин-3-О-рутинозид, цианидин-3-О- β -D-глюкозид, цианидин-3-О-рутинозид [158, 159].

Основным классом биологически активных соединений листьев черной смородины являются флавоноиды. Флавоноиды используются в контроле каче-

ства сырья для качественного и количественного определения [148]. В листьях содержатся гликозиды кверцетина, кемпферола, мирицетина, и изорамнетина [100, 115, 123, 143, 152, 165].

Флавоноиды содержатся во всех частях растения. В листьях найдены и идентифицированы флавоноиды: кемпферол-3-О-(6''-О-малонил)-6-О-глюкопиранозид, кемпферол-3-О-галактозид, кемпферол-3-О-глюкозид, гиперозид, изокверцитрин [152], мирицетин малонилглюкозид, мирицетин малонилглюкозид (изомер), кверцетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-малонил-глюкозид, кемпферол-3-О-рутинозид, кемпферол-3-О-глюкозид, изорамнетин-3-О-рутинозид, изорамнетин-3-О-глюкозид, кемпферол-малонилглюкозид, кемпферол-малонилглюкозид (изомер) [161.], кемпферол-3-О-глюкозил-6''-ацетат, кемпферол-3-О-галактозид [102].

Имеются данные, что содержание отдельных соединений из группы полифенолов зависит от времени сбора листьев. Например, содержание нескольких соединений было самой высокой в июне, в то время как кверцетин-глюкозид, кемпферол-глюкозид и общее содержание фенолов, увеличилась к концу сезона. Вне зависимости от даты сбора листьев содержание таких соединений, как кверцетин-малонил-глюкозид, кемпферол-малонил-глюкозид и изомер кемпферол-малонил-глюкозид было выше, чем у других фенольных соединений, в то время как эпигаллокатехин был самым низким [160].

Состав БАВ почек смородины близок к химическому составу листьев. Листья, почки и плоды содержат по 2 оксикоричные кислоты: хлорогеновую и неохлорогеновую [161]. Почки также содержат флавоноиды и антоцианидины: дельфинидин-3-О-глюкозид, дельфинидин-3-О-рутозид, мирицетин малонилглюкозид и его изомер [161].

В листьях содержится аскорбиновая кислота, количество которой по разным источникам может составлять от 100 до 400мг/100г.) [97, 145, 159].

1.4. Фармакологические свойства

Как было показано, все части черной смородины имеют богатый химический состав. Поскольку черная смородина широко используется для лечения различных заболеваний, основное внимание исследователей в последние десятилетия было обращено на исследование фармакологического действия отдельных групп БАВ.

Было установлено, что сумма флавоноидов листьев ингибирует биосинтез и высвобождение простагландинов [109].

При изучение фармакологического действия БАВ черной смородины основным классом для исследования служили полифенольные соединения, проявляющие антиоксидантные, антимикробные и противовирусные свойства [103? 130, 136, 154, 156]. Благодаря этим свойствам, полифенольные соединения служат для защиты и поддержки многих функций органов и систем, в том числе системы кровообращения [112, 132], органов пищеварения [135, 154], нервной системы [153.].

Антоцианы плодов (производные цианидина и дельфинидина) используются при лечении заболеваний глаз [133, 134].

Проведенные на ряде объектов исследования показали, что полифенолы смородины проявляют противораковую активность, подавляя размножение и рост раковых клеток, индуцируя в них апоптоз [14, 99, 122]. Исследованиями, проведенными L. Kansanen и сотр., было установлено, что плоды черной смородины содержат ингибиторы каталитической активности канцероген-активирующего фермента CYP1A1 и более активны в отношении этого фермента, чем содержащиеся во многих других ягодах [124, 125].

Полифенольные соединения, в том числе производные кверцетина содержащиеся в листьях черной смородины, проявляют противовоспалительное, антимикробное, противовирусное, антитоксическое, антиоксидантное действие, и вследствие этого могут использоваться при лечении рака [38, 98, 139].

Важным местом атаки свободных радикалов являются клеточные мембраны. Окисление ее компонентов, в том числе мембранных липидов под дей-

ствием свободных радикалов ведет к нарушению структуры и функции клеточной мембраны. Это приводит к патологическим изменениям в организме. Развитие многих опасных заболеваний, связанных напрямую с пероксидацией мембранных липидов могут быть предотвращены путем доставки в организм натуральных антиоксидантов. Их защитные эффекты, как поглотители свободных радикалов, зависят как от числа гидроксильных групп в молекуле полифенольных соединений, так и от числа молекул, связанных с мембраной. Полифенолы защищают клетки крови от окисления мембраны и гемолиза. Авторы многих работ рассматривают эффективную защиту биологических мембран от окисления возможностью связывания полифенольных веществ с мембранами. [96, 105, 108].

Установлено высокое антиоксидантное действие кверцетин-3-О-глюкозида в отношении биологических мембран [101, 111].

Исследование, проведенное на мембране эритроцитов, используемой в качестве модели биологической мембраны, была изучена антиоксидантная активность экстрактов из плодов и листьев черной смородины. Установлен защитный эффект экстрактов по отношению к изменениям в мембране эритроцитов, вызванных воздействием УФ-облучения. [102]. Высокую противовоспалительную активность показал водно-спиртовой экстракт из листьев черной смородины на модели каррагинан-индуцированного отека лапы крысы. Показано значительное противовоспалительное действие сравнимое с эталонными веществами - индометацином и нифлумовой кислотой, но без их ulcerогенного действия, даже при высоких дозах в течение продолжительного лечения [114].

1.5. Применение в аллопатической, гомеопатической и народной медицине

В качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) в аллопатии используются ягоды. Листья и почки, проявляющие противовоспалительное и диуретическое действие, применяются в основном в народной медицине и гомеопатической практике.

В народной медицине листья и плоды применяются при лечении почечнокаменной болезни, подагры, цистита, уретрита, остеохондроза, ревматизма, мышечных и суставных болей, экссудативного диатеза, экземы, фурункулеза и новообразований. Листья смородины применяют также в составе витаминных сборов с листьями малины, брусники и плодов шиповника.

В Тибетской медицине отвар корней используют при ревматизме: отвар почек и плодов при туберкулезе лимфатических желез; листья вместо чая при заболеваниях кожи и золотухи. В Сибири корни применяют как вяжущее средство; во Франции листья как диуретическое средство; в Польше при ревматизме, болезнях почек, мочевого пузыря и почечнокаменной болезни; в Якутии - побегов с листьями используют для лечения ревматизма; настоев веточек при туберкулезе легких, простудах, золотухе, болезнях мочевого пузыря, кожных и венерических болезнях. [56, 164]. Почки и листья черной смородины применяют как мочегонные средства при мочекаменной болезни, циститах. Для лечения гастритов, холециститов, кишечных дисбактериозов, эктероколитов с выраженными гнилостными процессами в кишечнике в качестве дополнительного средства применяют ягоды черной смородины, содержащие органические кислоты и пектиновые вещества [89].

По данным Макаровой В.Г. плоды смородины черной обладают иммуностимулирующим, противовоспалительным действием и применяются при гиповитаминозах, гастрите, энтероколите, гипохромной анемии, атеросклерозе, кардионеврозе, ларингите, трахеите, бронхите [42.].

Смородина черная используется в составе комплексных препаратов фитотерапии и входит в состав биологически активных добавок [137]. Плоды черной смородины входят в состав комплексных фитопрепаратов: настойки «Герботон» и эликсира «Травохол» (ООО «Гиппократ», РФ). Экстракт черной смородины зарегистрирован в Реестре лекарственных средств (РЛС) в качестве сырья для биологически активных добавок [18]. Плоды черной смородины входят в состав поливитаминных сборов для экспедиций, диету космонавтов, как противовоспалительное, витаминное, противорадиационное средство.

В гомеопатии препараты из почек черной смородины применяют при заболеваниях надпочечников, они усиливают сопротивляемость стрессу, проявляют иммуностимулирующее действие и способствуют дренированию лимфы [109, 116, 117, 13].

Гомеопатические препараты *Ribes nigrum* могут быть как монокомпонентными, так и входить в состав комплексных лекарственных средств (табл. 1). В качестве сырья для настоек гомеопатических матричных используются почки, листья и зрелые ягоды [19]. Однако, чаще всего используются листья черной смородины [148]. Отечественными фирмами производятся монокомпонентные препараты в десятичных и сотенных разведениях [49, 55].

Таблица 1

Гомеопатические препараты смородины черной

<i>Название препарата</i>	<i>Состав</i>	<i>Действие, показания</i>	<i>Ссылка</i>
Ribes-Manganese (Рибес-Манганезе) (фирма “Di Leo”, Италия)	<i>Ribes nigrum</i> 4 DH, <i>Manganum gluconicum</i> 4 DH по 1 мл, физ раствор q.s.	<i>Действие:</i> антиаллергическое и кортизоноподобное, стимулирует функцию надпочечников. <i>Показания:</i> поллиноз, бронхиальная астма, экзема, стресс, необходимость стимуляции функции надпочечников.	84
Endotox (Эндотокс 14 (Испания))	Alfalfa D1, China D3, <i>Echinacea purpurea</i> D6, <i>Kalium phosphoricum</i> D8, <i>Glandulae suprarenales</i> 4CH, <i>Medulla ossium</i> 4CH, <i>Ribes nigrum gemmae</i> D1, <i>Scrophularia nodosa</i> D3, <i>Thymus</i> 4, 7, 9, 12, 15CH, <i>Thymus vulgaris</i> D1, <i>Thymus serpyllum</i> D1	Для выведения токсинов. Применяется при физической перегрузке, избыточном потреблении белка, при вакцинациях и стрессе.	12
Мигралгин (Migralgин) (фирма «Адонис», РФ)	АконитумС12, Роза канина D3, Альнус ГлютинозаД3, Рибес Нигрум Д3, Тилия Д3, Симицифуга С6, Танацетум Д3, Ориганум Майорана Д3, Лавандуля Д3, Гинкго Билоба Д3, Розмаринум Д3, Мелисса Д3, Спирея Д3, Мента Д3, Гиперикум Д3, Циция Д3 в равных частях, этанол 30%.	Для профилактики и лечения головных болей	43
Allergy Plex (Аллергоплекс) (Испания)	<i>Ribes nigrum Gemmae</i> D1, D3 и др.	Аллергия нарушения пищеварения, астения	77

В последние годы получило направление фитотерапии и гомеопатии, использующее в качестве источника сырья почки растений, это так называемая «геммотерапия». Например, приводятся данные по исследованию фармакологического действия почек черной смородины. Установлено, что препараты из почек стимулируют и поддерживают надпочечники, стимулирует секрецию противовоспалительных гормонов. Это оказывает выраженное противоаллергическое действие. Препараты показаны при всех формах воспаления, независимо от их клинических проявлений: ринит, бронхит, астма, гастрит, мигрени, крапивница, ангионевротический отек, аллергический и ревматизма [149].

1.6. Современные аспекты стандартизации сырья и настойки гомеопатической матричной смородины черной

В настоящее время документов, регламентирующих качество сырья и настойки гомеопатической матричной в нашей стране нет. В связи с этим, для разработки методов стандартизации необходимо исследовать основные классы БАВ сырья и разработать их методы анализа.

Углеводы

Углеводы имеют большое значение для жизни растительных и животных организмов. Сахара являются основным питательным и главным опорным материалом растительных клеток и тканей. Они делятся на две группы – монозы (моносахариды) и полиозы (полисахариды) и находят разнообразное применение в медицине [37]. В литературе приводятся методы определения углеводов в лекарственном растительном сырье различными физико-химическими методами. Качественной реакцией на свободные углеводы является реакция Бертрана (с реактивом Фелинга), связанные сахара определяются после гидролиза [79]. Состав углеводов определяется методом ТСХ с использованием подвижных фаз: н-бутанол–пиридин–вода (6:4:3); этилацетат–кислота уксусная –кислота муравьиная–вода (18:3:1:4); н-бутанол – пиридин - вода (6:4:3); н-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:5) [6, 10, 45, 79].

Для количественного определения полисахаридов используется гравиметрический метод [10, 45, 79], спектрофотометрический метод с применением раствора пикриновой кислоты [30, 60].

При количественном определении свободных сахаров используется метод прямофазной ВЭЖХ, связанных углеводов - метод капиллярного электрофореза. Нейтральные сахара определяются спектрофотометрически по продуктам взаимодействия с пикриновой кислотой, и кислые сахара - карбозольным методом [35, 45].

Для обнаружения аминокислот используют физические, химические и физико-химические методы: цветные реакции (чаще всего с нингидрином), метод ТСХ. В настоящее время наиболее информативным является метод с использованием автоматических аминокислотных анализаторов, при использовании в качестве внутреннего стандарта смеси стандартных образцов аминокислот. Метод позволяет устанавливать как качественный, так и количественный состав аминокислот ЛРС [2, 22, 31].

Дубильные вещества

Для качественного определения дубильных веществ по литературным данным известны следующие качественные реакции: на *гидролизуемые* вещества: с ацетатом свинца, в результате которой образуется осадок желтого цвета, осаждение дубильных веществ аммония сульфатом; с железо-аммониевыми квасцами - черно-синее окрашивание или осадок; на *конденсированные* дубильные вещества: осаждение при нагревании с раствором формалина и кислотой хлористоводородной концентрированной - красный творожистый осадок (флабифен); с железо-аммониевыми квасцами - черно-зеленое окрашивание; с 1% раствором ванилина в кислоте хлористоводородной концентрированной - красное, малиновое или розовое окрашивание, с натрия ацетатом в среде кислоты уксусной ледяной при добавлении железо-аммониевых квасцов - черно-зеленое окрашивание. Известны также общие реакции на дубильные вещества: с раствором желатина - характерная муть или белый осадок, исчезающий при добавлении избытка желатина; с 1% раствором хинина хлорида - аморфный осадок; с

0,1 N раствором натра едкого окраска раствора постепенно изменяется от желтой до коричневой. [79, 91].

Для определения качественного состава дубильных веществ часто используется метод ТСХ. В качестве систем растворителей используют: н-бутанол-кислота уксусная ледяная–вода в различных соотношениях - (40:12:28), (4:1:2), (4:1:5); бензол-метанол-кислота уксусная ледяная (48:8:4), (45:8:15). Выявление зон осуществляют 1% раствором ванилина в кислоте хлористоводородной концентрированной [13, 34, 47]. Tits, M. и соотр. исследованы проантоцианидины листьев смородины методом ТСХ в подвижной фазе этилацетат-вода-кислота муравьиная-кислота уксусная (70:20:3:2), обнаружение зон – раствором ванилина в метанольном растворе кислоты хлористоводородной. Со стандартными образцами идентифицированы 10 соединений, в том числе: 4 мономера (катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин), 4 димера (2 основных продельфинидина: галлокатехин-(4а->8)-галлокатехин, галлокатехин-(4а->8)-эпигаллокатехин; и 2 минорных: галлокатехин-(4а->8)-катехин, галлокатехин-(4а->6)-галлокатехин); 2 тримера (галлокатехин-(4а->8)- галлокатехин-(4а->8)-галлокатехин [158].

Способы количественного определения дубильных веществ можно подразделить на следующие основные группы: 1. гравиметрические – основаны на количественном осаждении дубильных веществ желатином, ионами, тяжелых металлов или адсорбцией тольевым порошком. До 1961 года являлся основным методом определения; 2. титриметрические – в основе лежит окислительно – восстановительная реакция с применением калия перманганата (метод ГФ XI изд.); 3. фотоколориметрические – основаны на реакции с солями железа (II), кислотой фосфорновольфрамовой и др.; 3. методы нефлометрические, спектрофотометрические, рефрактометрия, полярография. 4. метод ВЭЖХ. Методы первых четырех групп являются достаточно трудоемки, гравиметрия и титриметрия (перманганатометрия) дают завышенные результаты [21].

Часто для количественного определения дубильных веществ используется спектрофотометрический метод [7, 21].

Для оценки содержания дубильных веществ также используется метод ВЭЖХ. Например, данным методом определено в плодах бархата амурского содержание галловой кислоты и галлатонинов [47], в листьях чая определен качественный состав катехинов и установлено количественное содержание [163].

Сапонины

Общих химических методов определения сапонинов не существует, так как структура сапонинов очень разнообразна. Из водных растворов сапонины осаждаются гидроксидом бария и магния, солями меди и ацетатом свинца. Стероидные сапонины дают реакцию Либермана-Бурхарда. Большинство сапонинов вызывает гемолиз эритроцитов крови [91].

Метод ТСХ в настоящее время является наиболее универсальным для предварительного изучения состава БАВ, в том числе сапонинов. В литературе описаны методики определения групп сапонинов с использованием различных подвижных фаз и проявляющих реактивов. Например, аралозиды в корнях араллии разделяли в системе растворителей: безводный хлороформ-метанол-вода (61:32:7), зоны адсорбции проявляли 20% раствором серной кислоты [80]. Для определения тритерпеновых сапонинов используют системы растворителей: 1. этилацетат-метанол-диэтиламин (70:20:1), зоны адсорбции выявляют раствором ванилина; 2. уксусная кислота ледяная–вода–н-бутанол (10:40:50), зоны адсорбции выявляют в УФ – свете при длине волны 254 нм; 3. н-бутанол–уксусная кислота ледяная–вода (50:40:10), детектирующий реагент 10% раствор серной кислоты в 40% этаноле [79, 104].

Для количественного определения тритерпеновых сапонинов применяются гравиметрические, титриметрические [91], фотометрические и спектрофотометрические методы. Для спектрофотометрического определения сапонинов используется реакция тритерпеноидов с концентрированной серной кислотой [29, 79, 80].

Аскорбиновая кислота

Для определения аскорбиновой кислоты широко используется титриметрический метод. В качестве титранта используются различные титранты, каж-

дый из которых имеет свои особенности и недостатки. Например, 2,6 – дихлорфенолиндофенолят натрия в зависимости от сопутствующих веществ в сырье может давать, как завышенные, та и заниженные результаты [1, 104], данный метод предложен в основу количественного определения аскорбиновой кислоты в плодах шиповника, включенный в ГФ СССР XI изд. [16]. Используется также метод йодометрического титрования [16], однако йод в кислой среде восстанавливает кроме аскорбиновой кислоты танины, эфирные масла, пектины, жиры и др. и, следовательно, не может быть использован для анализа аскорбиновой кислоты в сырье и фитопрепаратах. Для определения аскорбиновой кислоты используются методы потенциометрического [33, 142, 162] и амперометрического титрования [81].

Метод ВЭЖХ используется при стандартизации содержания аскорбиновой кислоты в ЛРС и препаратах [8, 15, 150].

Флавоноиды

Основным классом БАВ почек и листьев черной смородины являются флавоноиды. Исследованию данного класса соединений в сырье смородины посвящено наибольшее количество публикаций.

Для качественного обнаружения флавоноидов в ЛРС в литературе приводятся несколько качественных реакций. Специфической реакцией на флавоноиды является цианидиновая проба с концентрированной хлористоводородной кислотой и металлическим магнием или цинком образуют красное окрашивание. Реакция очень чувствительна, основана на восстановлении карбонильной группы с образованием антоцианидина [78, 91]. Флавоноиды образуют с основным ацетатом свинца соли или комплексы, окрашенные в ярко-желтый цвет, при этом обнаруживаются соединения, содержащие о-диоксигруппировку. Наличие данной группировки дает окрашивание с алюминием, цирконием, что используется при исследовании флавоноидных соединений методом хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента ТСХ. С реактивом Вильюна (борная и лимонная кислоты в безводном ацетате) флавоноиды образуются комплексы, имеющие желтую окраску [78].

Для анализа флавоноидов широко используют методы ТСХ, при этом применяют различные системы растворителей: н-бутаная–уксусная кислота–вода (4:1:5); 2% уксусная кислота; 15% уксусная кислота; хлороформ-метанол (9:1); кислота уксусная ледяная-кислота муравьиная безводная-вода-этилацетат (11: 11: 27: 100) [23, 148]. В работе Коерпен В.Н. приведено исследование флавоноидов в плодах черной смородины методом ТСХ [129].

Для количественного определения флавоноидов в последние годы предпочтение отдается спектрофотометрическому методу анализа. Определение суммы флавоноидов проводится после реакций комплексообразования с такими реагентами как: соли циркония [86, 90], цинк-уранил-ацетат, алюминия хлорид [36, 93]. Спектрофотометрический метод по реакции комплексообразования с алюминия хлоридом используется широко для анализа флавоноидов в сырье и фитопрепаратах [90], в том числе для анализа в сырье смородины черной - листьях [148] и плодах [106].

Основным методом исследования качественного и количественного состава флавоноидов смородины в настоящее время является метод ВЭЖХ. [102, 106, 143, 152].

Сырье и настойка гомеопатическая матричная (НГМ) смородины черной описаны в Фармакопее Франции [148]. Сырьем для получения настойки служат свежие листья *Ribes nigrum* L., получение настойки осуществляется согласно методу, приведенному в Фармакопее. Монография на настойку нормирует для сырья: описание, включая микроскопию, влажность. Для НГМ определяется подлинность методом ТСХ, также нормируется количество суммы флавоноидом (не менее 0,1% в пересчете на рутин), определенное спектрофотометрическим методом.

Гомеопатические фармакопее Германии, США, Великобритании и Индии не содержат монографий на сырье и настойки гомеопатические матричные *Ribes nigrum* [41, 119, 157].

Наряду с черной смородиной в гомеопатии применяются также препараты из листьев красной смородины *Ribes rubrum* L. [41, 146].

Смородина черная входят в перечень гомеопатических препаратов, разрешенных к применению в соответствии с приказом Минздравмедпрома № 335 [57]. Однако отечественная нормативная документация на сырье и гомеопатическую настойку смородины черной в настоящее время отсутствует.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по вопросу изученности лекарственного растительного сырья смородины черной и нормативной документации, регламентирующей качество гомеопатических лекарственных средств.

2. Выявлены условия местообитания, заготовки и сушки сырья смородины черной, однако недостаточно сведений по морфолого-анатомическому строению почек и листьев смородины и установлению диагностических признаков, необходимых для идентификации сырья.

3. Приведены сведения об изученности химического состава смородины черной, но мало данных о сравнительном изучении качественного состава и количественного содержания БАВ в листьях и почках черной смородины.

4. На основании данных литературы установлено, что недостаточно изучен вопрос стандартизации лекарственного растительного сырья и настоек гомеопатических матричных, разработки показателей подлинности и качества.

5. Учитывая вышесказанное, разработка отечественной нормативной документации на сырье и настойки гомеопатические матричные из двух видов сырья (высушенных и свежих листьев) является актуальной проблемой и представляет интерес для фармации.

ЧАСТЬ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования служили почки, собранные в апреле, листья, собранные в июле-августе свежие или высушенные дикорастущего или культивируемого растения смородина черная - *Ribes nigrum* L., семейство камнеломковые – *Saxifragaceae* (крыжовниковые – *Grossulariaceae*). Были использованы образцы сырья, собранные в различных регионах Европейской части России, как более северных, таких как Вологодская область, так и более южных, таких как Рязанская область (табл. 2).

Таблица 2

Опытные образцы почек и листьев черной смородины (*Ribes nigrum* L.)

Сырье	Место сбора (области)	Сорта	Время сбора (2010/2014 гг)
Почки	Вологодская Московская Тамбовская Рязанская Пермская	Дикорастущие Культурные: «Память Мичурина» «Тамбовская» «Голубка» «Кент»	Апрель
Листья	-»-	-»-	Июль- август

2.2. Материалы и методы исследования

В работе использованы реактивы, растворители, стандарты, отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации.

Исследования макроскопических и микроскопических признаков сырья выполнялись в соответствии с требованиями фармакопейных статей ГФ XI «Листья» и «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья [16]. Готовые препараты изучали под микроскопом МБН-3 (при увеличении x105; x104; x200; x210; x225; x300;

х450). Результаты документировали с помощью фотоаппарата «Зенит» с микронасадкой МФН-12 в виде фотографий.

Получение НГМ проводилось в соответствии с ОФС 42-0027-05 «Настойки гомеопатические матричные» из высушенных листьев по методу 4а и из свежих листьев смородины черной по методу 3 [52]. Определение числовых показателей матричных настоек (плотность, сухой остаток, микробиологическая чистота) проводили в соответствии с ГФ XI, ГФ XII [16, 17].

Для стандартизации сырья и НГМ проведена разработка соответствующих методик идентификации и количественного определения активных компонентов на основе анализа данных литературы и нормативной документации [51, 52].

Идентификацию биологически активных веществ проводили качественными реакциями и методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» (Россия) в системах растворителей: 1) изопропанол–вода (40:10); 2) спирт н-бутиловый -кислота уксусная ледяная-вода (40:10:20); 3); бензол-этилацетат (20:10); 4) бензол-этилацетат-ацетон (96:8:1); 5) хлороформ-метанол-вода (20:10 до насыщения); 6) бензол-диоксан-кислота уксусная (90:25:4); хлороформ-метанол (90:10).

Качественный и количественный анализ аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе фирмы «Хитачи», модель 835 на стальной колонке (0,4 x 15 см), заполненной катионообменной смолой марки 2619 (Hitachi Custom Ion-Exchange Resin) [2, 22, 63].

Свободные углеводы анализировали методом прямофазной ВЭЖХ на колонке Luna 100 - 5 NH₂ 4,6 x 250 mm (5 мм) с подвижной фазой: ацетонитрил - вода (70:30) при скорости потока 1 мл/мин, при комнатной температуре с рефрактометрической детекцией. Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273 T. [35, 45, 62].

Определение тритерпеновых сапонинов проводили спектрофотометрическим методом на регистрирующем спектрофотометре Cary 50 [73, 74, 80].

Количественное определение аскорбиновой кислоты проводили методом ВЭЖХ на хроматографе, укомплектованном системой градиентной подачи элюента, в условиях: колонка $250 \times 4,6$ мм, сорбент Kromosil 100 – $5C_{18}$ с размером частиц 5 мкм; температура термостата $38^{\circ}C$; длина волны детектирования 280 нм; подвижная фаза: ацетонитрил (А) / 0,01 % раствор фосфорной кислоты (В); режим элюирования скорость элюирования – 1000 мкл/мин; время регистрации хроматограммы 5 минут [8, 15, 150].

Определение качественного состава флавоноидов проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Waters Acquility с тандемным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters), подвижная фаза А: вода – ацетонитрил (95 : 5) с муравьиной кислотой., подвижная фаза В: ацетонитрил с муравьиной кислотой. Количественное определение флавоноидов проводили методом спектрофотометрии на спектрофотометре Cary 50 Scan после реакции с алюминия хлоридом [64, 143, 152].

Качественное и количественное определение катехинов в почках и листьях черной смородины проводили методом ВЭЖХ-МС на приборе Agilent 1100, использовали колонку Protocol C18 ($4,6 \times 250$ мм, 5 мкм), октадецилсиликагель. Раствор А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты, раствор В: ацетонитрил. Скорость подачи подвижной фазы – 0,5 мл/мин, разделение проводили в режиме градиента: 4 – 20 % В – 25 мин; 20 % В – 30 мин; 20 – 50 % В – 50 мин. Масс-спектрометрическое детектирование проводили на времяпролетном масс-анализаторе Agilent 6230 в режиме регистрации положительных ионов, поток газосушителя – 9 л/мин, диапазон регистрируемых масс – 100 - 1000 Да. [47, 75, 163].

Компонентный состав полученных образцов эфирного масла изучали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Исследование проводили на приборе фирмы Agilent Technologies, состоящем из: 1) газового хроматографа 7890 (колонка HP-5, 50 м x 320 мкм x 1.05 мкм) и 2) масс-селективного детектора 5975 С с квадрупольным масс-анализатором. Температурная программа хроматографирования: при $40^{\circ}C$ – изотерма 2 мин; далее программируемый нагрев

до 250°C со скоростью 5 °C/мин; при 250 °C – изотерма 15 мин; далее программируемый нагрев до 320°C со скоростью 25 °C/мин; при 320 °C - изотерма 5 мин. Инжектор с делением потока 1:50. Температура инжектора 250 °C. Температура интерфейса 280 °C. Газ носитель – гелий; скорость потока - 1 мл/мин. Хроматограмма образцов – по полному ионному току. Условия масс-спектрометрического анализа: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров в положительных ионах в диапазоне (m/z) от 20 до 450 со скоростью 2.5 скан/сек. Программное обеспечение – ChemStation E 02.00. Качественный анализ проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических линейных индексов удерживания (I). Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычисляли из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простой нормировки) [76, 128].

При разработке методик качественного и количественного определения основных групп БАВ были использованы стандарты: рутин (ФС 42-2508-87), кемпферол (CAS N 520-18-3); кислота галловая ([149-91-7] Merck); эпигаллокатехин (CAS N 970-74-1, Sigma-Aldrich); катехин (CAS N 154-23-4); эпикатехин (CAS N 490-46-0, Alfa Aesar); эпигаллокатехин галлат (CAS N 989-51-5, Alfa Aesar); галлокатехин (CAS N 3371-27-5, Sigma); эпикатехин галлат (CAS N 1257-08-5, Alfa Aesar); кверцетин (CAS 117-39-5); кислота олеаноловая (CAS N 508-02-1); кислота хлорогеновая (Sigma, Lot 56 H7700); кислота коричная (CAS N 140-10-3, Acros); глюкоза (CAS N 50-99-7); фруктоза (CAS N 57-48-7); арабиноза (CAS N 10323-20-3); ксилоза (CAS N 58-86-6); галактоза (CAS N 59-23-4); эсцин (CAS N 11072-93-8); кислота аскорбиновая (ФС 42-2668-95, CAS N 50-81-7, Sigma A-59 G0).

При обработке полученных результатов применяли метод вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту в соответствии с требованиями ОФС 42-0111-09 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [17].

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ И ПОЧЕК ЧЕРНОЙ СМОРОДИНЫ

3.1 Изучение анатомического строения листьев черной смородины

Свежие листья смородины черной

Внешние признаки. Листья цельные или частично измельченные длинночерешковые, 3 – 5 – лопастные, с двояковильчатым краем, сверху голые тусклые, снизу – серые, по жилкам пушистые и усажены точечными золотистыми железками, издающими специфический запах. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопия. При рассмотрении листа с поверхности видны с верхней стороны клетки эпидермиса с сильноизвилистыми, извилистыми и слабоизвилистыми стенками, длиной 21-62 мкм, шириной 12-33 мкм; с нижней стороны – со слабоизвилистыми, извилистыми и сильноизвилистыми, длиной 8-71 мкм, шириной 6-38 мкм (рис. 1, 2). Стенки клеток с обеих сторон местами четковидно утолщенные (чаще вдоль жилок и по краю листа). Клетки эпидермиса вдоль жилок вытянутые прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы, крупнее, чем на всей поверхности листа. Кутикула с обеих сторон листа ровная. Устьица аномоцитного типа расположены с нижней стороны листа (длиной 17-25 мкм, шириной 8-25 мкм) расположены с частотой 137-431 на 1 мм². С верхней стороны листа встречаются крупные водяные устьица с округлой зияющей щелью на концах лопастей и зубцах листа (длиной 25-62 мкм, шириной 29-75 мкм), как правило, одно устьице более крупное и 2-4 более мелких. С нижней стороны листа по жилкам, близко к краю и по краю видны простые остроконусовидные одноклеточные волоски длиной 115-793 мкм с бородавчатой кутикулой, по краю они прижаты по направлению к вершине листа (рис. 3). С верхней стороны листа волоски редко встречаются по всей пластинке с частотой 0-9 на 1 мм². С обеих сторон листа видны щитковидные железки (диаметром 133-250 мкм) с частотой встречаемости с верхней стороны листа 0-9 на 1 мм², с нижней – 0-13 на 1 мм² (рис. 4). Среди клеток эпидермиса встречаются пигментные

клетки, а вдоль жилки просвечивают секреторные ходы. В паренхиме листа имеются идиобласты, содержащие друзы оксалата кальция диаметром 2-15 мкм. Лист дорсовентрального строения. Сосудисто-волокнистый пучок включает сетчатые и лестничные сосуды и спиральные трахеиды.

Эпидермис черешка представлен вытянутыми по длине черешка клетками многоугольной (ближе к основанию листа) (рис. 6), прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы с ровными или слабоизвилистыми четко-видно утолщенными стенками. Кутикула ровная. На эпидермисе черешка встречаются железки и простые волоски такие же, как на листе (рис. 5).

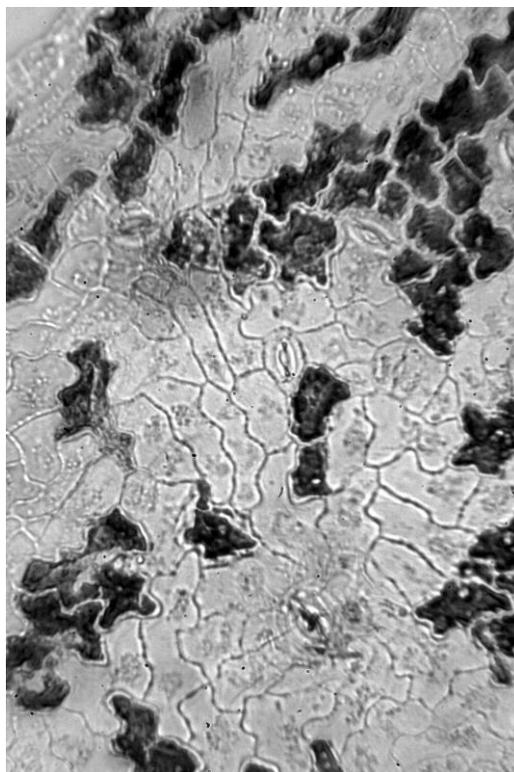


Рис. 1. Смородины черной листья свежие.
Нижний эпидермис листа с устьицами (ув. $\times 250$)



Рис. 2. Смородины черной листья свежие.
Друзы в паренхиме. Ув. $\times 250$.

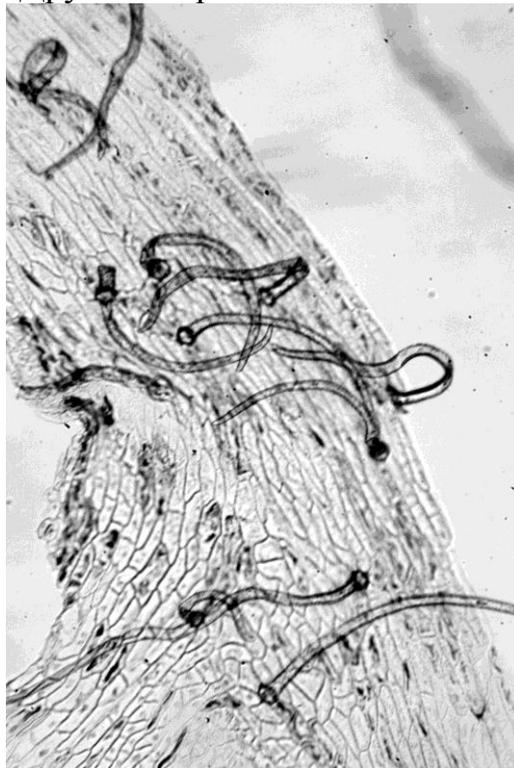


Рис. 3. Смородины черной листья свежие. Простые волоски по
жилкам с нижней стороны листа. Ув. $\times 70$

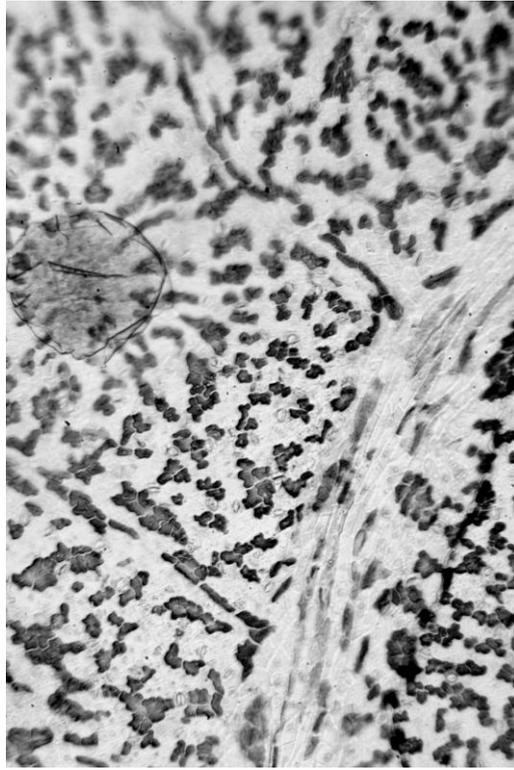


Рис. 4. Смородины черной листья свежие.
Нижний эпидермис листа с железками. Ув. $\times 70$

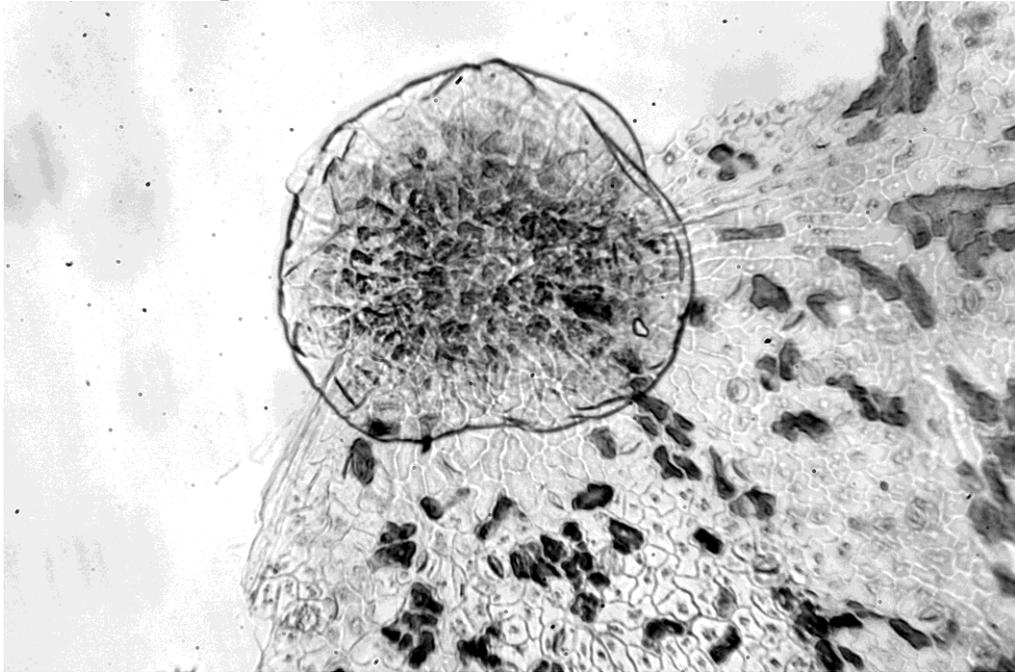


Рис. 5. Смородины черной листья свежие.
Нижний эпидермис с железкой (ув. $\times 100$)

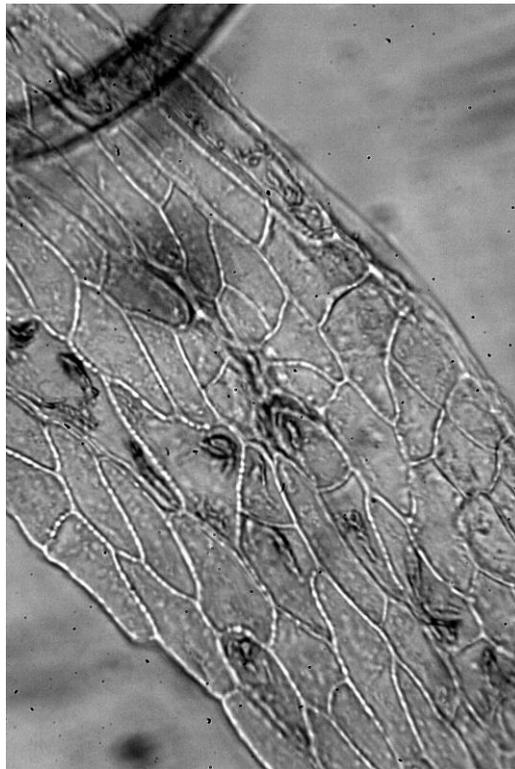


Рис. 6. Смородины черной листья свежие.
Нижний эпидермис над жилкой листа с вытянутыми клетками с четковидно-утолщенными стенками (ув. X 250)

Высушенные листья смородины черной

Внешние признаки. Листья цельные или частично измельченные длинночерешковые, 3 – 5 – лопастные, с двояковильчатым краем, сверху голые тусклые, снизу – серые, по жилкам пушистые и усажены точечными золотистыми железками, издающими специфический запах. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопия.

Цельное сырье. При рассмотрении листа с поверхности видны с верхней стороны клетки эпидермиса с сильноизвилистыми, извилистыми и слабоизвилистыми стенками, длиной 21-62 мкм, шириной 12-33 мкм; с нижней стороны – со слабоизвилистыми, извилистыми и сильноизвилистыми, длиной 8-71 мкм, шириной 6-38 мкм. Стенки клеток с обеих сторон местами четковидно утолщенные (чаще вдоль жилок и по краю листа). Клетки эпидермиса вдоль жилок вытянутые прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы, крупнее, чем на всей поверхности листа. Кутикула с обеих сторон листа ровная. Устьица аномоцитного типа расположены с нижней стороны листа (длиной 17-25 мкм, шириной 8-25 мкм) расположены с частотой 137-431 на 1 мм². С верхней стороны листа встречаются крупные водяные устьица с округлой зияющей щелью на концах лопастей и зубцах листа (длиной 25-62 мкм, шириной 29-75 мкм), как правило одно устьице более крупное и 2-4 более мелких. С нижней стороны листа по жилкам, близко к краю и по краю видны простые остроконусовидные одноклеточные волоски длиной 115-793 мкм с бородавчатой кутикулой, по краю они прижаты по направлению к вершине листа. С верхней стороны листа волоски редко встречаются по всей пластинке с частотой 0-9 на 1 мм². С обеих сторон листа видны щитковидные железки (диаметром 133-250 мкм) с частотой встречаемости с верхней стороны листа 0-9 на 1 мм², с нижней – 0-13 на 1 мм². Среди клеток эпидермиса встречаются пигментные клетки, а вдоль жилки просвечивают секреторные ходы. В паренхиме листа имеются идиобласты, содержащие друзы оксалата кальция диаметром 2-15 мкм. Лист дорсовен-

трального строения. Сосудисто-волокнистый пучок включает сетчатые и лестничные сосуды и спиральные трахеиды.

Эпидермис черешка представлен вытянутыми по длине черешка клетками многоугольной (ближе к основанию листа), прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы с ровными или слабоизвилистыми четковидно утолщенными стенками. Кутикула ровная. На эпидермисе черешка встречаются железки и простые волоски такие же, как на листе.

Порошок. Микропрепараты порошкованного лекарственного сырья под микроскопом представляют собой смесь из различных частиц:

- обрывков эпидермиса листа с клетками со слабоизвилистыми, извилистыми и сильноизвилистыми стенками иногда четковидно утолщенными, с пигментными клетками (и без них), с устьицами аномоцитного типа (и без них), с щитковидными железками (и без них), с простыми конусовидными одноклеточными бородавчатыми волосками (и без них);

- обрывков эпидермиса черешка с многоугольными, прямоугольными, веретеновидными и комбинированной формы клетками с прямыми или слабоизвилистыми стенками четковидно утолщенными, с щитковидными железками (и без них), с простыми конусовидными одноклеточными бородавчатыми волосками (и без них).

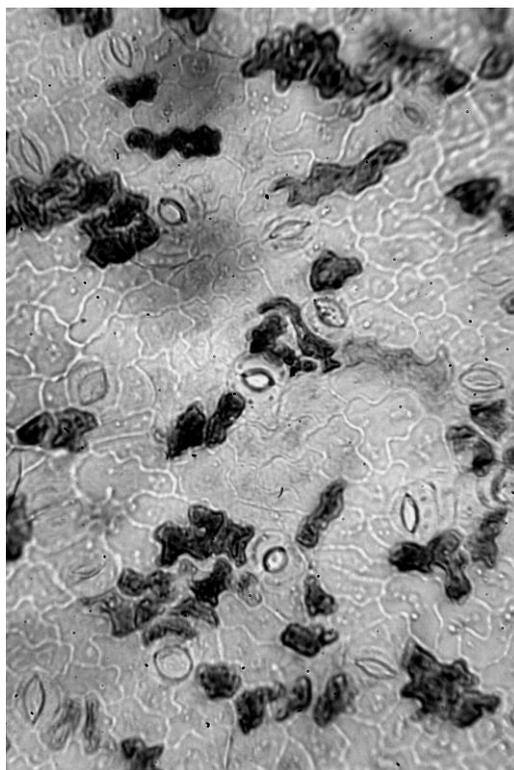


Рис. 7. Листья смородины черной высушенные
Нижний эпидермис с устьицами (ув. $\times 250$)



Рис. 8. Листья смородины черной высушенные
Друзы в паренхиме (ув. $\times 250$)

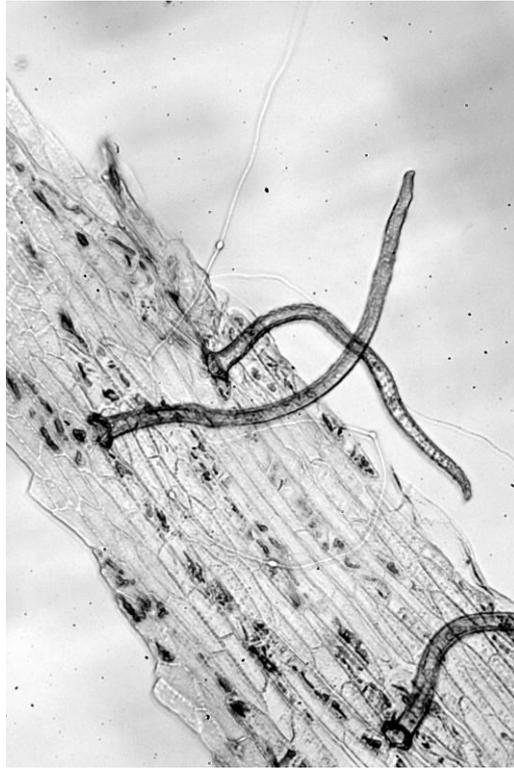


Рис. 9. Листья смородины черной высушенные
Простые волоски по жилкам с нижней стороны листа (ув. $\times 100$)

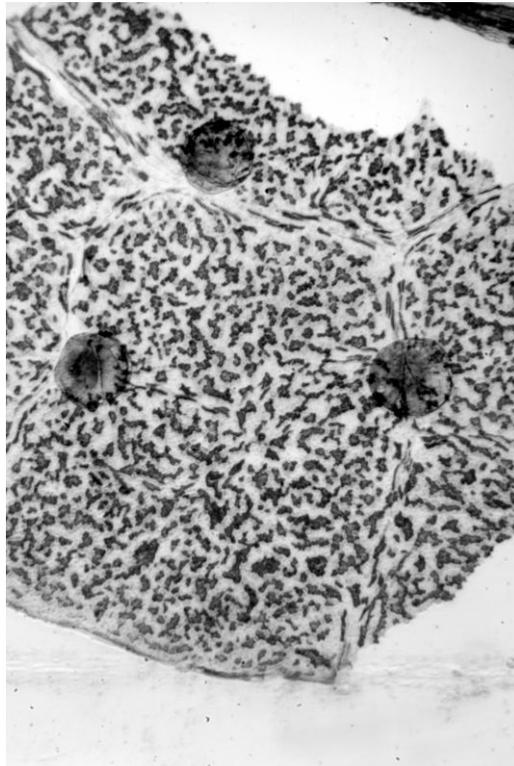


Рис. 10. Листья смородины черной высушенные.
Нижний эпидермис с железками (ув. $\times 31,25$)

3.2 Исследование анатомического строения почек смородины черной

Внешние признаки. Почки черной смородины продолговатые иногда заостренным концом, длиной 3 – 7 мм, в поперечнике 1,5 – 3 мм, покрытые черепицеобразными плотно прижатыми по краям, слегка реснитчатыми чешуйками (рис.11). Цвет желтовато – коричневый, иногда зеленоватый, запах ароматный. Вкус пряный, горький.



Рис.11. Почки черной смородины

Цельное сырье. При рассмотрении чешуи почки с верхней и нижней стороны видны клетки эпидермиса с прямыми и слабоизвилистыми четковидно-утолщенными стенками (длиной 15-65 мкм, шириной 4-25 мкм), к краю чешуи и у ее основания - клетки вытянутые (рис. 12, 17). Кутикула с обеих сторон чешуи ровная. Устьица аномоцитного типа расположены с нижней стороны (длиной 8-25 мкм, шириной 6-17 мкм). Край чешуи обильно опушен простыми остроконусовидными одноклеточными волосками длиной до 375 мкм с бородавчатой кутикулой (рис. 13). С нижней стороны чешуи простые остроконусовидные одноклеточные бородавчатые волоски встречаются с частотой 35-830 на 1 мм² (рис. 14), а также наблюдаются щитковидные железки диаметром 80-250 мкм и

с частотой встречаемости 0-110 на 1 мм², при этом обилие железок отмечается у вершины чешуи, к основанию они реже встречаются (рис. 18). В мезофилле видны многочисленные друзы оксалата кальция диаметром 2-20 мкм. Внутренние чешуи сохраняют многие признаки внешних чешуй, однако стенки клеток сильноутолщенные, местами четковидноутолщенные, устьица отсутствуют с обеих сторон. Листовые зачатки обильно содержат простые волоски и щитковидные железки (намного обильнее, чем на поверхности чешуй), которые чаще не вполне развиты. В мезофилле листового зачатка также просвечивают сквозь эпидермис друзы оксалата кальция (рис. 15, 16).

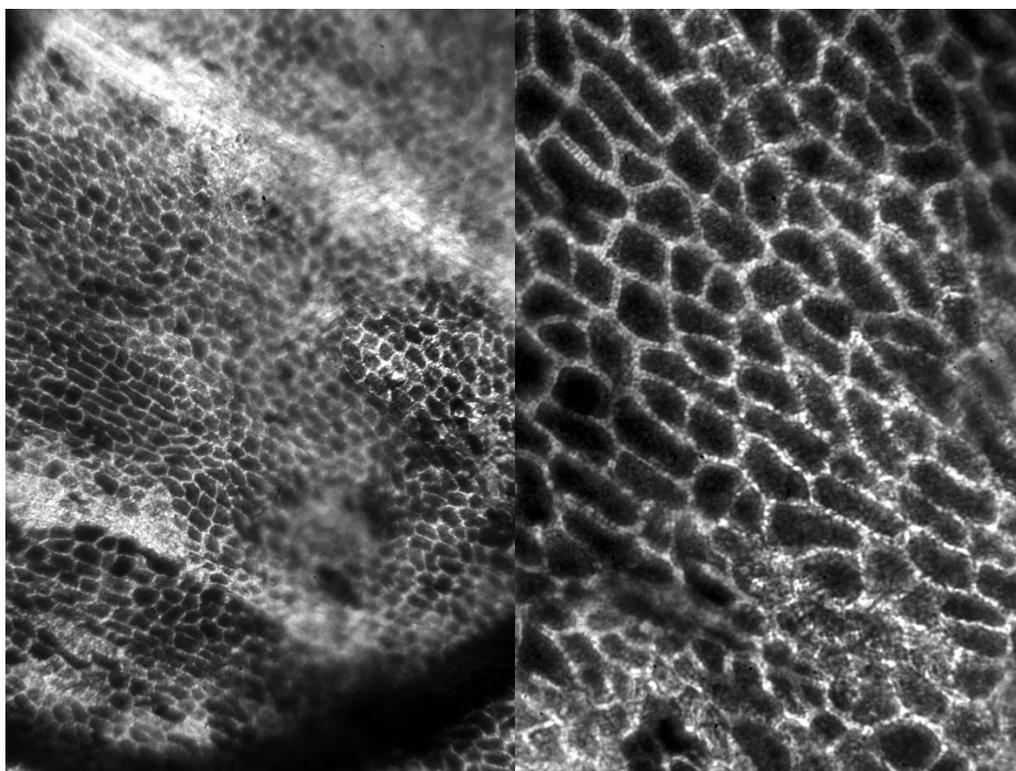


Рис.12. Смородины черной почки. Верхний эпидермис. Слева: Ув. x 70; справа: Ув. x 250.

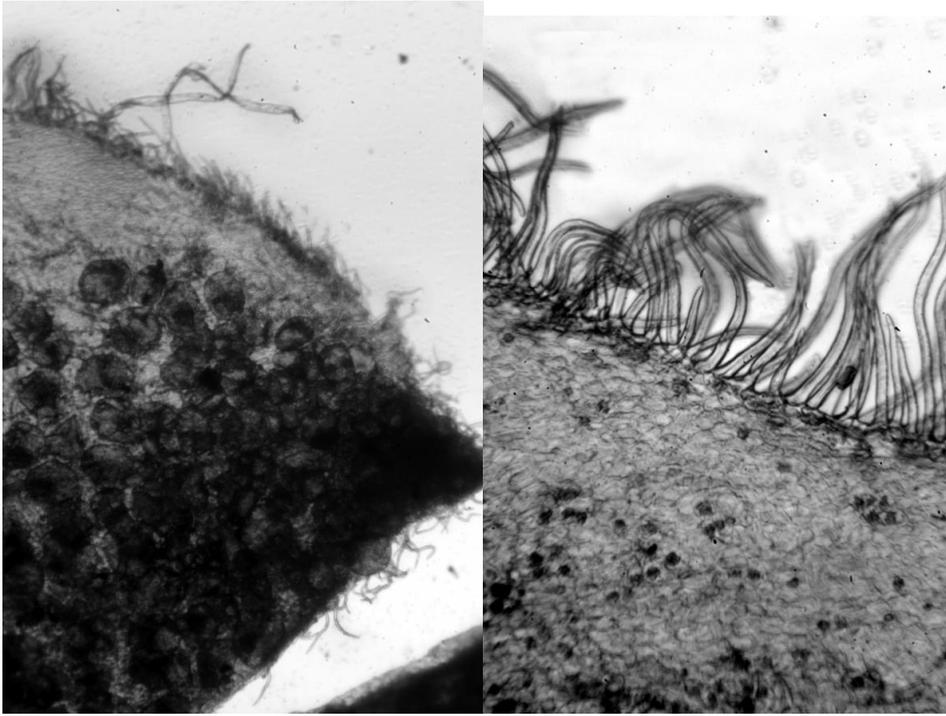


Рис.13. Смородины черной почки. Слева: простые волоски по краю чешуи, обилие железок (Ув. x 25). Справа: простые волоски по краю чешуи, друзы оксалата кальция, просвечивающие сквозь эпидермис (ув. x 70).

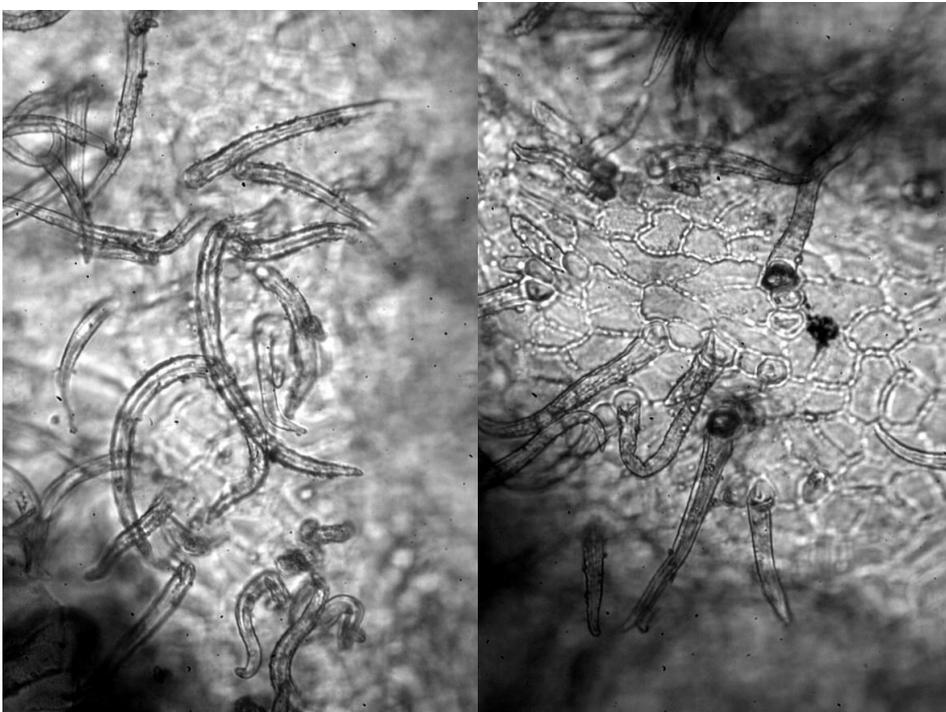


Рис.14. Смородины черной почки. Нижний эпидермис с простыми волосками (ув. x 100)

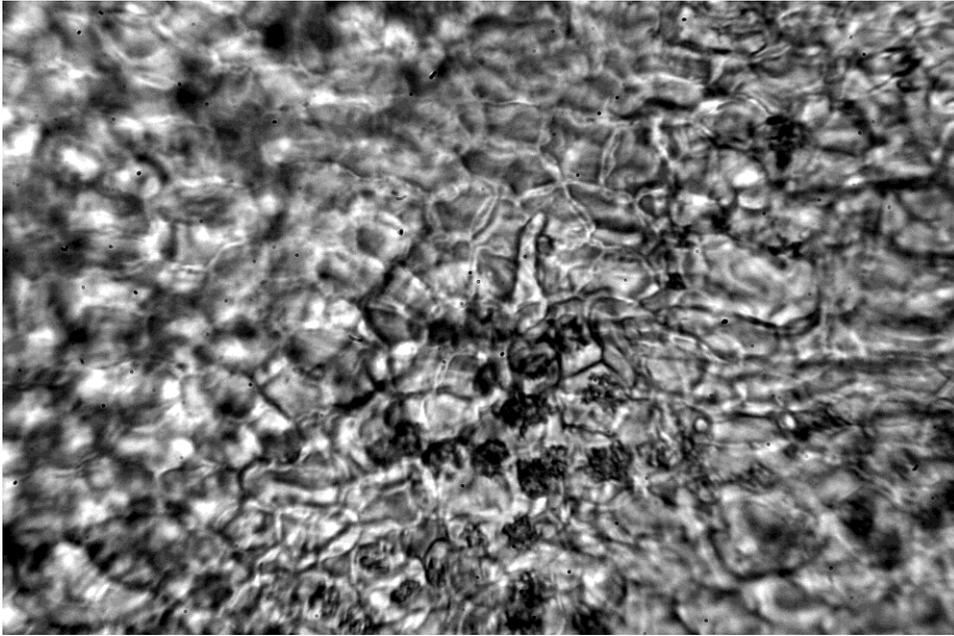


Рис.15. Смородины черной почки. Друзы оксалата кальция, просвечивающие сквозь эпидермис; простой одноклеточный волосок на эпидермисе. Ув. х 250.

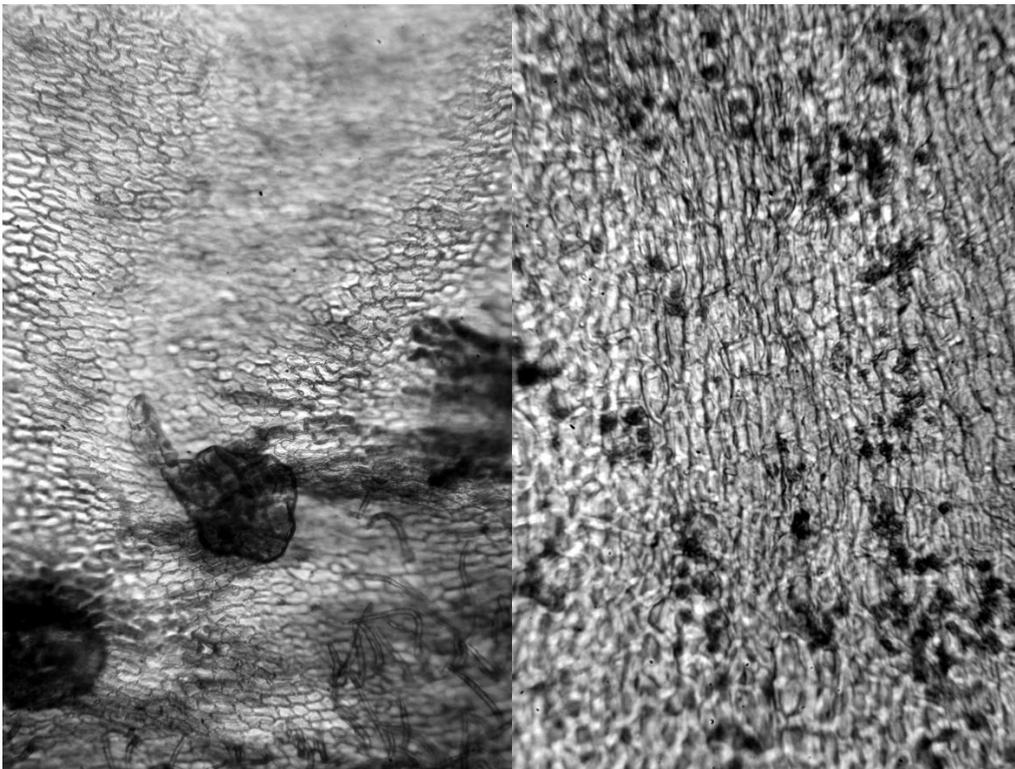


Рис.16. Смородины черной почки. Слева: железки на нижней стороне чешуи. Ув. х 70. Справа: друзы оксалата кальция, просвечивающие сквозь эпидермис (ув. х 125)

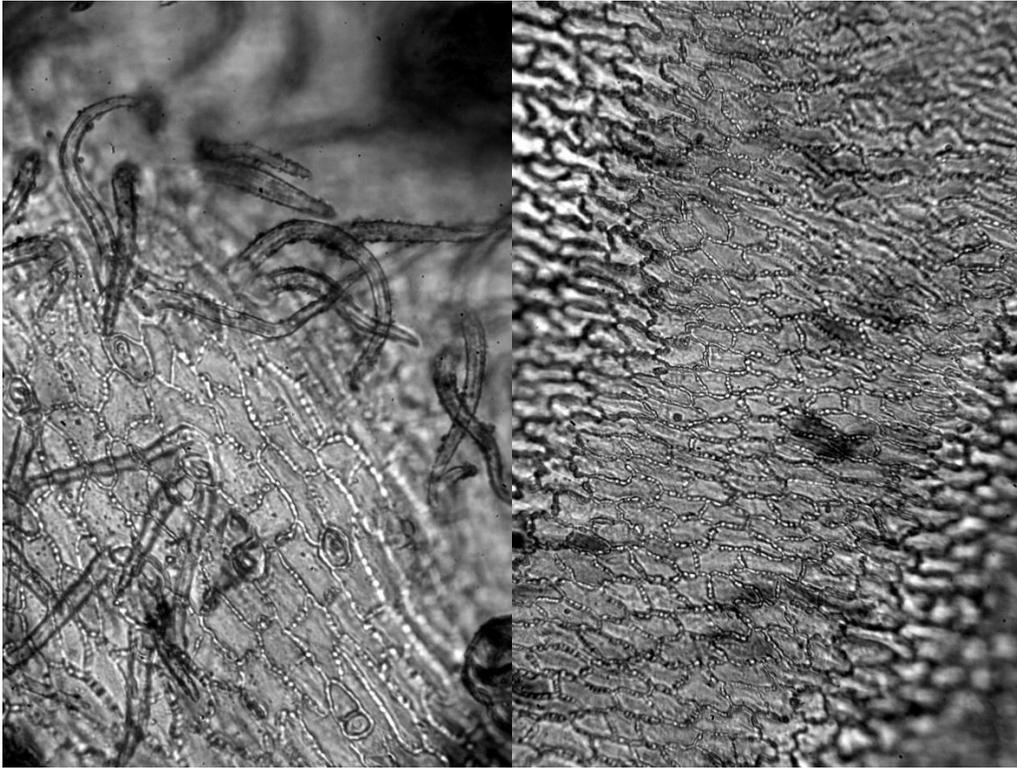


Рис.17. Смородины черной почки. Слева: нижний эпидермис с четковидноутолщенными стенками клеток и с простыми волосками. Справа: верхний эпидермис с четковидноутолщенными стенками клеток (ув. x 100)

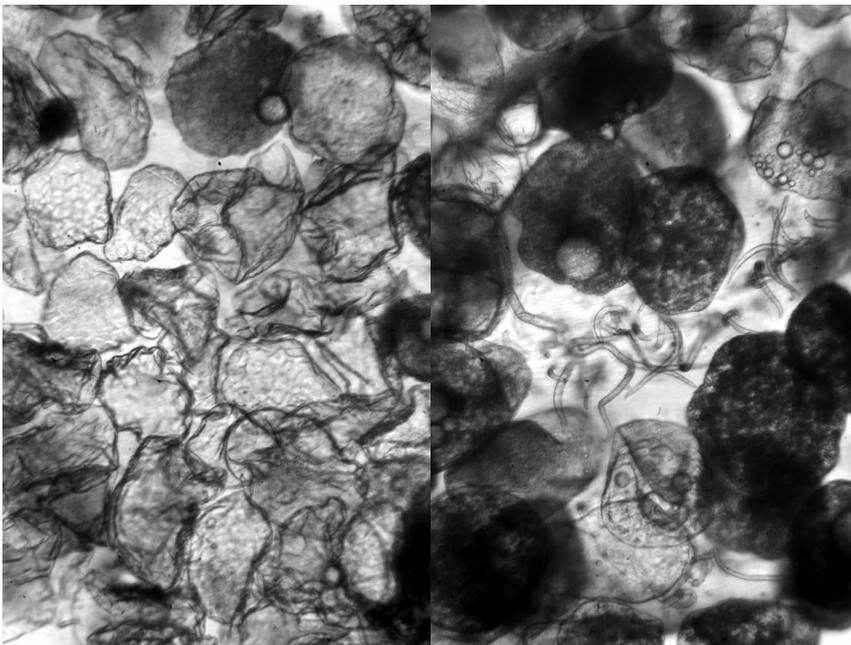


Рис.18. Смородины черной почки. Обилие щитковидных железок.

Слева: Ув. x 100. Справа: Ув. x 125.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Проведено морфологическое изучение внешних признаков почек и листьев черной смородины, выявлены характерные макродиагностические признаки по форме, размерам, окраске наружной поверхности сырья.

2. Определены и выделены анатомо-диагностические признаки почек и листьев черной смородины, которые охарактеризованы количественно (определены размеры клеток, устьиц, волосков, железок, друз).

3. Основными анатомо-диагностическими признаками почек черной смородины являются: четковидно утолщенные стенки клеток эпидермиса внешних чешуи; сильно утолщенные стенки клеток эпидермиса внутренних чешуй; устьица аномоцитного типа с нижней стороны внешней чешуи; простые остроконусовидные одноклеточные волоски с бородавчатой поверхностью по краю и с нижней стороны чешуи; щитковидные железки с нижней стороны чешуи; друзы оксалата кальция в мезофилле чешуи; обилие не вполне развитых простых волосков и железок на листовых зачатках.

4. Основными анатомо-диагностическими признаками листьев черной смородины являются: клетки эпидермиса с верхней и нижней стороны с сильноизвилистыми, извилистыми и слабоизвилистыми стенками, вдоль жилок вытянуты прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы, стенки клеток местами утолщены, среди клеток эпидермиса пигментные клетки; устьица аномоцитного типа с нижней стороны листа; с нижней стороны листа по жилкам, близко к краю и по краю - простые остроконусовидные одноклеточные волоски с бородавчатой кутикулой; с обеих сторон листа - щитковидные железки; в паренхиме имеются идиобласты, содержащие друзы оксалата кальция.

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ И ПОЧКАХ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM* L.)

4.1. Определение основных групп БАВ в сырье качественными реакциями и методом ТСХ

Исследование качественного состава почек и листьев черной смородины проводили в несколько этапов: приготовление спирто – водного извлечения, фракционирование природных соединений, качественная идентификация веществ. Извлечение биологически активных веществ из почек смородины проводили путем нагревания на водяной бане с обратным холодильником с 40% спирта этилового при соотношении 1:50.

На втором этапе проводили фракционирование биологически активных соединений, для чего водно-спиртовое извлечение переводили в водное путем отгона этанола под вакуумом. Хлороформную фракцию получали путем извлечения БАВ из водной фракции в делительной воронке хлороформом. Затем водное извлечение обрабатывали этилацетатом аналогичным способом, получая этилацетатную фракцию. Эту же водную фракцию использовали для получения бутанольной фракции по методу, описанному выше. Водный остаток упаривали под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяли в воде.

Для очистки водного извлечения от полифенольных соединений его пропускали через колонку с алюминия оксидом. Получали очищенное водное извлечение. В очищенном водном извлечении определяли углеводы и аминокислоты, в неочищенном водном извлечении – дубильные вещества, в хлороформной фракции – стероиды, кумарины, в этилацетатной и бутанольной фракциях – фенольные соединения.

Таблица 3

Определение основных групп БАВ в сырье качественными реакциями и методом ТСХ

<i>Группа БАВ</i>	<i>Метод: 1. Качественные реакции; 2. Метод ТСХ (ПФ, обнаружение, зоны)</i>
1	2
Углеводы (своб. и связ. сахара, полисахариды)	<p>1. Реактив Фелинга: красно-оранжевый осадок. Водное извлечение + 95 % этанол: отсутствие белого осадка.</p> <p>2. ПФ: изопропанол – вода (4:1); дифениламинный и резорциновый реактив.</p> <p><i>Раствор сравнения:</i> желтая (фруктоза), $R_f \sim 0,75$; розовая (глюкоза), $R_f \sim 0,66$</p> <p><i>Исследуемый раствор:</i> желтая, $R_f \sim 0,75$; розовая, $R_f \sim 0,66$</p>
Аминокислоты	<p>1. Раствор нингидрина: сине-фиолетовое окрашивание.</p> <p>2. н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).; нингидриновый реактив.</p> <p><i>Раствор сравнения:</i> зоны сине-фиолетовые :$R_f \sim 0,13$ (глицин), $R_f \sim 0,19$ (аланин), $R_f \sim 0,25$ (глутаминовая кислота), $R_f \sim 0,35$ (метианин)</p> <p><i>Исследуемый раствор:</i> : зоны сине-фиолетовые :$R_f \sim 0,13$, $R_f \sim 0,19$, $R_f \sim 0,25$, $R_f \sim 0,35$</p>

1	2
Кумарины	<p>1. 10% спиртовый р-р калия гидроксида: желтое окрашивание; р-р диазотированной сульфаниловой кислоты: красное окрашивание.</p> <p>2. бензол-этилацетат (2:1); УФ-свет; р-р калия гидроксида УФ – свет, 360 нм: <i>Исследуемый раствор</i>: желто-зеленая, с $R_f \sim 0,04$, зеленая, $R_f \sim 0,59$, зеленая, $R_f \sim 0,87$, голубая, $R_f \sim 0,92$;</p> <p>10 % спиртовый раствор едкого кали: <i>Исследуемый раствор</i>: зоны желтого цвета с $R_f \sim 0,35$, $R_f \sim 0,45$ и $R_f \sim 0,51$.</p>
Стероиды	<p>1. Реакция Либермана-Бурхарда (уксусный ангидрид +и концентрированная серная кислота): образуется красно-фиолетовое кольцо.</p> <p>2. ПФ: бензол-этилацетат-ацетон (98:8:1); 10 % спиртовый р-р серной кислоты. <i>Раствор сравнения</i>: фиолетовая, $R_f \sim 0,30$ (β- ситостерол) <i>Исследуемый раствор</i>: фиолетовая, $R_f \sim 0,07$; фиолетовая, $R_f \sim 0,12$; синяя, $R_f \sim 0,18$; фиолетовая, $R_f \sim 0,25$; фиолетовая, $R_f \sim 0,30$; светло-зеленая, $R_f \sim 0,35$.</p>

1	2
Тритерпеноиды	<p>1. Формальдегид в серной кислоте: грязно-красно-коричневое окрашивание на границе слоев и зеленое окрашивание верхнего слоя.</p> <p>2. ПФ: хлороформ-метанол-вода (2:1:вода до насыщения); 10 % спиртовый раствор серной кислоты <i>Раствор сравнения:</i> красная, $R_f \sim 0,40$ (олеаноловая кислота) <i>Исследуемый раствор:</i> зоны красного цвета с $R_f \sim 0,67$; $R_f \sim 0,70$; $R_f \sim 0,85$; $R_f \sim 0,92$.</p>
Флавоноиды	<p>1. Цианидиновая проба (цинк + конц. хлористоводородная к-та): малиновое окрашивание. С раствором аммиака: темно-желтое окрашивание.</p> <p>2. ПФ: н-бутанол –кислота уксусная –вода (4:1:2); спиртовый р-р алюминия хлорида. <i>Раствор сравнения:</i> зоны желтого цвета с $R_f \sim 0,57$ (кемпферол), $R_f \sim 0,64$ (мирицетин), $R_f \sim 0,74$ (кверцетин) <i>Исследуемый раствор:</i> зоны желтого цвета с $R_f \sim 0,37$; $R_f \sim 0,57$; $R_f \sim 0,64$; $R_f \sim 0,74$.</p>

1	2
Фенолкарбоновые кислоты	<p>1. Общая реакция на фенольные соединения с железа (III) оксидом.</p> <p>2. ПФ: бензол-диоксан- кислота уксусная (90:25:4); 1 % р-р калия перманганата.</p> <p><i>Раствор сравнения:</i> зоны желтого цвета с Rf ~ 0,46 (коричная кислота), с Rf ~ 0,67 (хлорогеновая кислота).</p> <p><i>Исследуемый раствор:</i> зоны желтого цвета с Rf ~0,09; Rf ~0,17; Rf ~0,46; Rf ~0,67.</p>
Иридоиды	<p>1. Гидроксиламин + хлорид железа (III): красное окрашивание.</p> <p>2. ПФ: хлороформ-метанол (9:1); реактив Шталя (5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, и 1 г п-диметиламинобензальдегида, 95 мл 95% спирта)</p> <p><i>Исследуемый раствор:</i> зоны сине-зеленого цвета с Rf ~0,11; Rf ~0,40; Rf ~0,46; Rf ~0,71.</p>
Дубильные вещества	<p>2. ПФ: хлороформ-метанол (9:1); реактив Шталя.</p> <p><i>Исследуемый раствор:</i> зоны красно-малинового цвета с Rf ~0,22; Rf ~0,55; Rf ~0,78; Rf ~0,81.</p>
Аскорбиновая кислота	<p>2. ПФ: вода; обнаружение - 5 % р-р кислоты фосфорномолибденовой.</p> <p><i>Исследуемый раствор:</i> зоны синего цвета Rf ~ 0,85.</p>

Качественный состав БАВ определяли цветными реакциями, приведенными в литературе, и методом ТСХ [23, 50, 79, 91, 129, 148, 158]. При использовании метода ТСХ в качестве сорбента применяли «Сорбфил», в качестве систем растворителей и детектирующих реагентов были использованы компоненты соответствующие классу исследуемых соединений (табл. 3).

Определение фенольных соединений. Предварительный анализ состоит из комплекса цветных реакций. Общей реакцией на фенольные соединения является взаимодействие извлечений с железа окисного хлоридом. Реакция положительна. Качественной реакцией на флавоноиды является цианидиновая проба: при добавлении к этилацетатной и бутанольной фракции концентрированной хлористоводородной кислоты и кристаллического цинка, при нагревании образуется малиновое окрашивание. Реакция положительна. Реакция с раствором аммиака на оксикоричные кислоты и флавоноиды дает темно-желтое окрашивание, что свидетельствует о присутствии этих соединений. Реакция на оксикоричные кислоты с диазотированным бензидином дает желтое окрашивание. Оксикоричные кислоты присутствуют.

Таким образом, проведенное скрининговое исследование основных групп БАВ качественными реакциями и методом ТСХ, позволило установить в почках и листьях черной смородины наличие углеводов (в том числе свободных и связанных сахаров при отсутствии полисахаридов), аминокислот, кумаринов, стероидов, тритерпеноидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, иридоидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты.

Дальнейшее более детальное исследование было проведено по нескольким классам соединений.

4.2. Определение углеводов в почках и листьях

В качестве объектов служили листья и почки черной смородины.

В сырье определяли качественный и количественный состав углеводов поэтапно: на первом этапе идентифицировали сахара с помощью качественных реакций; на втором этапе определяли сахара с помощью хроматографии в тон-

ком слое сорбента (ТСХ); на третьем этапе определяли качественный и количественный состав углеводов с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Методика. В круглодонную колбу вместимостью 250 мл помещают 5 г почек или листьев, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, прибавляют 60 мл 40 % этанола и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через ватный тампон в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют с 40 мл 40 % этанола в течение 15 мин и после охлаждения фильтруют в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 40% этанолом до метки и перемешивают. Извлечение упаривают под вакуумом до 30 мл (раствор А).

Для очистки от полифенольных соединений 15 мл раствора А пропускают через колонку диаметром 1 см с 3 г алюминия оксида для хроматографии (II степени активности) – получают очищенное водное извлечение (раствор Б).

Свободные сахара определяют реакцией Бертрана с реактивом Фелинга. К 1 мл раствора Б прибавляют 1 мл жидкости Фелинга (смесь реактива 1 и реактива 2) и нагревают на кипящей водяной бане. Реакция положительна – выпадает красно – оранжевый осадок (I) меди оксида.

К 1 мл раствора Б прибавляют 1 мл кислоты серной разведенной и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин (Раствор В). После охлаждения к 1 мл гидролизата добавляют 1 мл реактива Фелинга и нагревают на кипящей водяной бане; наблюдается выпадения красно- оранжевого осадка, объем которого превышает объем осадка до проведения гидролиза. Таким образом, в почках и листьях черной смородины содержатся как свободные, так и связанные сахара.

Отсутствие белого осадка при добавлении трехкратного объема 95 % этанола к водному извлечению свидетельствуют об отсутствии в почках смородины полисахаридов.

Полученные данные подтверждены методом ТСХ на пластинках Сорбфил ПТСХ – АФ – УФ. Хроматографирование проводили в системах растворителей: 95 % этанол; 70 % этанол; вода; изопропанол – вода (3:1); изопропаноол – вода (4:1).

На линию старта хроматографической пластинки наносили по 0,001 мл раствора Б и 5 % раствора фруктозы. На линию старта второй хроматографической пластинки наносили по 0,001 мл раствора В и 5 % раствора глюкозы. После прохождения фронтом растворителей 12 см пластинки вынимали из камеры, высушивали на воздухе. Пластинку обрабатывали детектирующими реагентами: антроновым, резорциновым и дифениламиновым реактивами. Хроматограмму первой пластинки погружают в реактив 1 антронового реактива, высушивали на воздухе, затем опрыскивали реактивом 2 антронового реактива и нагревают в сушильном шкафу при температуре 108 °С в течение 6 мин. Реактив специфичен на кетозы и пентозы (моно-, ди-, три- полисахариды, содержащие кетогексозы дают желтую окраску, кетопентозы - пурпурную, кетогептозы – оранжево – желтую). Наилучшее разделение наблюдалось при использовании системы растворителей изопропанол - вода (4:1) - извлечение из сырья дает пятно желтого цвета, совпадающее по значению Rf с пятном фруктозы.

При опрыскивании хроматограммы резорциновым реактивом, также специфичным на кетозы, с последующим нагреванием при температуре 90 °С в течение 10 мин, наблюдалось пятно розового цвета аналогичной формы и расположения.

При опрыскивании хроматограммы второй пластинки дифениламиновым реактивом, специфичным для альдоз (альдогексозы дают коричневое окрашивание, альдопентозы – пурпурное), извлечение из сырья дало пятно серо - коричневого цвета, совпадающее по значению с пятном глюкозы.

Таким образом, в почках и листьях черной смородины обнаружены свободные и связанные сахара: фруктоза и глюкоза.

На следующем этапе изучали качественный и количественный состав углеводов в почках и листьях черной смородины методом ВЭЖХ.

Свободные сахара определяли по следующей методике: к 100 мг измельченного сырья добавляют 1 мл воды в пробирку с завинчивающейся пробкой, нагревают при 90 °С до набухания сырья и экстрагируют углеводы в течение 1 часа при температуре 25 °С при встряхивании. Полученное извлечение центрифугируют в течение 10 минут при 14000 об/мин, добавляют активированный уголь, встряхивают и снова центрифугируют 10 мин при 14000 об/мин. Аликвоту 20 мкл супернатанта анализируют методом прямофазной ВЭЖХ на колонке Liena NH₂ 4,6×250 мм (5мкм) с подвижной фазой: ацетонитрил – вода (70:30) при скорости потока 1 мл/мин, при комнатной температуре с рефрактометрической детекцией. Отнесение пиков и расчет концентраций углеводов проводят по внешнему стандарту, содержащему смесь двух анализируемых углеводов и глицерина в концентрации 10 г/л.

Качественный состав свободных углеводов в почках черной смородины приведен на рис. 19. Как видно свободные сахара в почках черной смородины представлены глюкозой и фруктозой. Аналогичная хроматограмма получена при анализе листьев черной смородины.

Количественное содержание свободных сахаров приведено в табл. 4. Содержание свободных сахаров в почках черной смородины в 5 раз выше, чем в листьях. Содержание свободных сахаров в почках колеблется глюкозы от 3,41 % до 3,80 %, фруктозы от 3,15 до 3,77 %; в листьях глюкозы от 0,61 до 0,75 %, фруктозы – от 0,55 до 0,75 %.

Таблица 4

Содержание свободных сахаров в почках и листьях черной смородины

Наименование объектов	Содержание углеводов, %		
	фруктоза	глюкоза	сумма
Почки	3,15	3,80	6,65
	3,23	3,50	7,03
	3,77	3,41	7,15
	Среднее содержание углеводов		6,92
Листья	0,55	0,62	1,17
	0,76	0,61	1,37
	0,63	0,75	1,38
	Среднее содержание углеводов		1,31

Для анализа связанных сахаров водные извлечения гидролизовали 1 М раствором кислоты хлористоводородной при 100 °С в течение 2,5 часов. После исчерпывающего гидролиза центрифугируют 10 мин при 14000 об/мин. К 0,8 мл супернатанта добавляют 7,2 мл воды, раствор пропускают через прямофазный концентрирующий патрон (Диасорб С₁₆), отбрасывают первые 3 мл и собирают следующий 1 мл. К 20 мкл раствора смеси стандартов в концентрации 1 г/л каждого углевода (внешний стандарт) и исследуемого раствора добавляют 20 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор глюкозамина) и упаривали на вакуумированном центрифужном испарителе типа Speedvac с подогревом в полипропиленовой пробирке. К высушенной пробе добавляли 20 мкл 0,5 М растворе РМР (1-фенил-3-метил-5-пирозолона) в метаноле и 20 мкл 0,3 М раствора гидроксида натрия, тщательно встряхивали на Vortex и термостатировали при 70 °С в течение 2 часов. Пробу нейтрализовали 20 мкл 0,3 М раствором кислоты хлористоводородной и дважды экстрагировали избыток реагента РМР 50 мкл бензола. Остаток упаривали на Speedvac с подогревом и растворяли в 500 мкл смеси ацетонитрил – вода в соотношении 1:9.

Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273 Т. Обработку электрофореграмм осуществляли с помощью той же программы, что и свободных сахаров. Отношение пиков и расчет концентраций углеводов проводили по внутреннему (гликозамин) и внешнему стандарту: смесь пяти анализируемых углеводов в концентрации 1 г/л.

Качественный состав связанных сахаров в почках черной смородины приведены на рис. 20. Связанные сахара в почках черной смородины представлены арабинозой, глюкозой и галактозой. При анализе связанных сахаров в листьях черной смородины получена хроматограмма, из которой следует, что в листьях черной смородины содержится арабиноза, глюкоза, ксилоза и галактоза (табл. 5). Связанных сахаров в почках черной смородины больше, чем в листьях почти в два раза. В почках черной смородины содержание связанных сахаров: арабинозы от 4,93 до 5,73 %, глюкозы от 0,70 до 0,85 %, галактозы от 2,88

до 3,90 %, в листьях арабинозы от 0,57 до 0,65 %, глюкозы от 3,13 до 3,17 %, ксилозы от 0,61 до 0,70 %, галактозы от 1,12 до 1,20 %.

Таблица 5

Содержание связанных сахаров в почках и листьях черной смородины

Наименование объектов	Содержание углеводов, %				
	Пентозы	Гексозы			
	арабиноза	глюкоза	ксилоза	галактоза	сумма
Почки	5,72	0,85	-	2,98	9,55
	4,93	0,79	-	3,90	9,62
	5,73	0,81	-	2,88	9,42
	Среднее содержание углеводов				9,53
Листья	0,60	3,15	0,68	1,12	5,55
	0,65	3,17	0,61	1,20	5,63
	0,57	3,13	0,70	1,13	5,43
	Среднее содержание углеводов				5,53

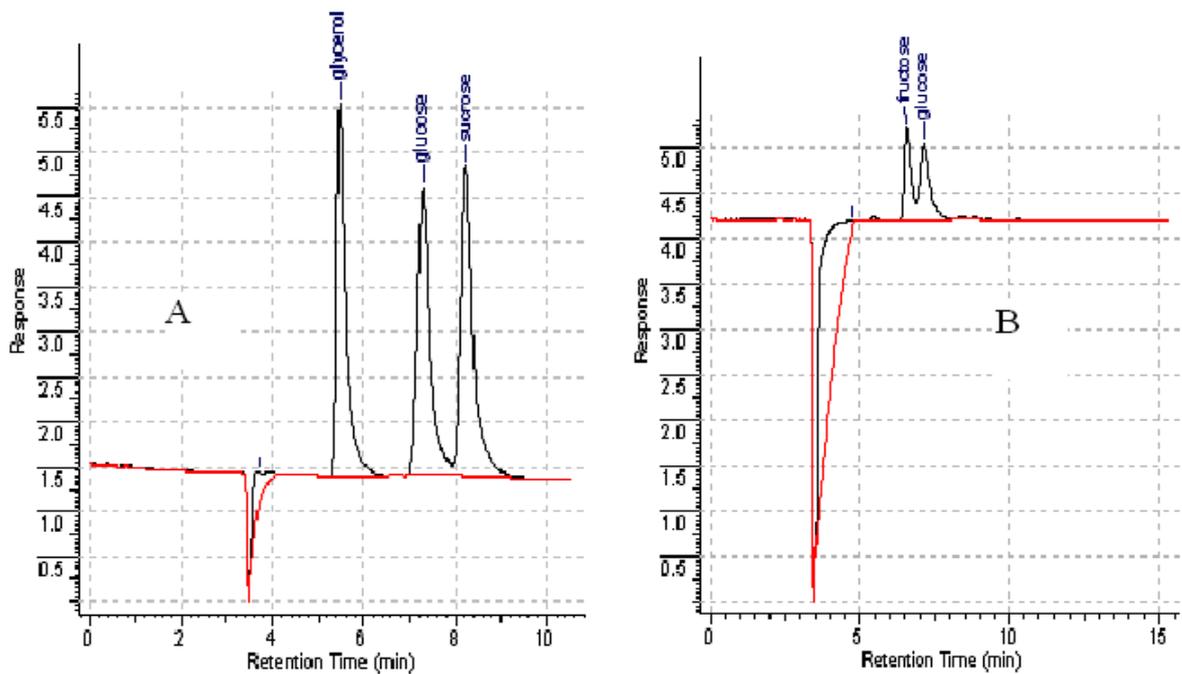


Рис. 19. ВЭЖХ углеводов черной смородины. А. смесь стандартов 10 г/л; В. водное извлечение из почек черной смородины

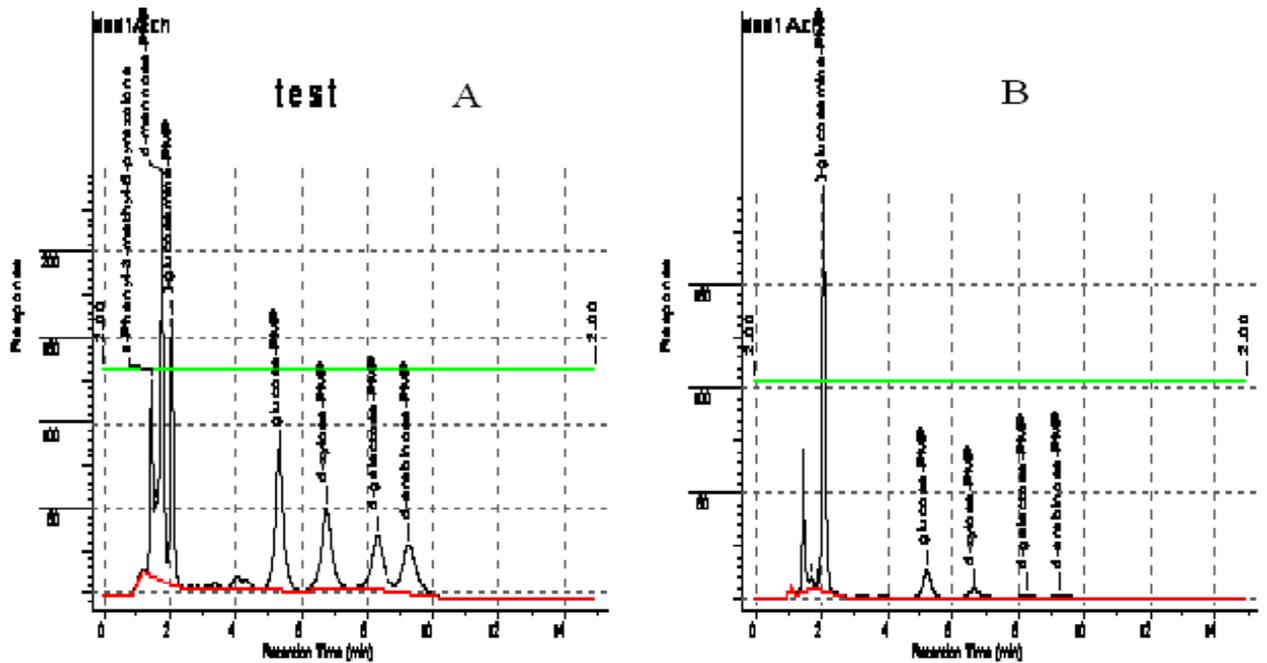


Рис. 20. ВЭЖХ углеводов черной смородины. А. смесь стандартов 1 г/л; В. продукты гидролиза водных извлечений из почек черной смородины

4.3. Определение аминокислот в почках и листьях

В последние годы большое внимание уделяется изучению аминокислот в различных растительных источниках [32, 46, 61, 107], поскольку они являются компонентами белков, являются исходными веществами при биосинтезе ряда биологически активных соединений. Аминокислоты проявляют широкий спектр фармакологического действия, участвуют в процессах нервной регуляции функций организма, они необходимы для нормальной работы головного мозга, являясь предшественниками нейромедиаторов [3, 4].

Почки смородины содержат аминокислоты, т.к. реакция со спиртовым реактивом нингидрина положительна. С помощью ТСХ на пластинках «Сорбфил» в системе растворителей н-бутанол-уксусная кислота–вода (4:1:2) и проявителя спиртового раствора нингидрина установлены аминокислоты: глицин, аланин, глютаминовая кислота, метианин.

Более детальное сравнительное изучение состава и количества аминокислот почек и листьев черной смородины проведено методом ВЭЖХ.

Подготовка образцов: Аналитическую пробу сырья почек или листьев смородины измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отвер-

ствиями размером 0,5 мм. Пробу массой 1,0 г (точная навеска) помещали круглодонную колбу со шлифом, прибавляли 20 мл 70 % этанола, взвешивали с точностью $\pm 0,01$ г и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Затем охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и доводили 70 % этанолом до первоначальной массы. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Первые 10 мл фильтрата отбрасывали. Из последующей порции элюата отбирали 50 мкл и упаривали досуха в вакуумном испарителе фирмы «Servanta» (США). Сухой остаток растворяли в 200 мкл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной, нагревали на водяной бане в течение 15 мин при температуре 60 °С, перемешивали и центрифугировали в течение 3 мин при 4000 оборотах. Для анализа использовали 50 мкл полученного гидролизата.

Определение качественного состава и количественного содержания аминокислот проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на аминокислотном анализаторе Hitachi 835 (Япония) на стальной колонке (0,4x 15 см), заполненной катиообменной смолой марки 2619 (Hitachi Custom Ion-Exchange Resin). Разделение аминокислот проводилось в трех буферных системах натрий – цитратных буферных растворов: 0,18 Н рН 3,25; 0,3 Н рН 3,9; 1,6 Н рН 4,75. Нингидриновый реактив приготовили с использованием метилового эфира этиленгликоля. Цитратные буферные растворы подавали в колонку по стандартной программе со скоростью 32 мл/час. Нингидриновый реактив подавали со скоростью 20 мл/час. После выхода из аналитической колонки разделенные аминокислоты смешивались нингидриновым реактивом в смесительном блоке в соотношении 2:1. Реакция аминокислот с нингидриновым реактивом проходила за 4 мин при 100⁰С в реакционной бане. Колориметрическое измерение окрашенных комплексов, образующихся в результате реакции с нингидрином, проводилось непрерывно и одновременно при двух длинах волн. Первичные амины образовывали пурпурную окраску, измеряемую при длине волны 570 нм, а вторичные (пролин и оксипролин) - желтую окраски, измеряемую при длине волны 440 нм.

Как следует из экспериментальных данных, в почках смородины содержится 19 аминокислот, в листьях – 18 аминокислот. В листьях отсутствует аминокислота оксипролин (рис. 21, 22).

Общее содержание аминокислот в почках немного выше, чем в листьях и составляет 12,13 % и 10,65 % соответственно. Преобладающими аминокислотами являются: аспарагиновая кислота (в почках - 11,23 %, в листьях – 11,17 %); глутаминовая кислота (в почках - 15,90 %, в листьях – 11,36 %); глицин (в почках - 6,64 %, в листьях – 6,39 %); лейцин (в почках - 6,89 %, в листьях – 10,59 %); лизин (в почках - 6,80 %, в листьях – 6,48 %); (в почках - 9,75 %, в листьях – 5,92 %) (табл. 6).

Таблица 6

Содержание аминокислот в почках и листьях черной смородины

Аминокислоты	Почки		Листья	
	Содержание аминокислот, %	Содержание от суммы свободных кислот, %	Содержание аминокислот, %	Содержание от суммы свободных кислот, %
1	2	3	4	5
<i>Заменимые аминокислоты</i>				
Пролин	0,64	5,25	0,60	5,63
Аспарагиновая кислота	1,37	11,23	1,19	11,17
Глутаминовая кислота	1,94	15,90	1,21	11,36
Серин	0,74	6,06	0,37	3,47
Глицин	0,81	6,64	0,68	6,39
Аланин	0,65	5,33	0,72	6,76
Оксилизин	0,01	0,74	0,17	1,60
Аргинин	1,19	9,75	0,63	5,92
Гистидин	0,45	3,69	0,24	2,95
Цистин	0,03	0,25	0,02	0,19
Тирозин	0,42	3,44	0,41	3,87
Оксипролин	0,02	0,16	-	-
<i>Сумма</i>	<i>8,27</i>	<i>68,18</i>	<i>6,24</i>	<i>58,60</i>

1	2	3	4	5
<i>Незаменимые аминокислоты</i>				
Треонин	0,52	4,26	0,46	4,32
Валин	0,60	4,92	0,70	6,57
Лизин	0,83	6,80	0,69	6,48
Метионин	0,16	1,31	0,17	1,59
Изолейцин	0,44	3,61	0,63	5,92
Лейцин	0,84	6,89	1,12	10,52
Фенилаланин	0,47	3,85	0,64	6,01
Сумма	3,86	31,82	4,41	41,40
Общая сумма	12,13		10,65	

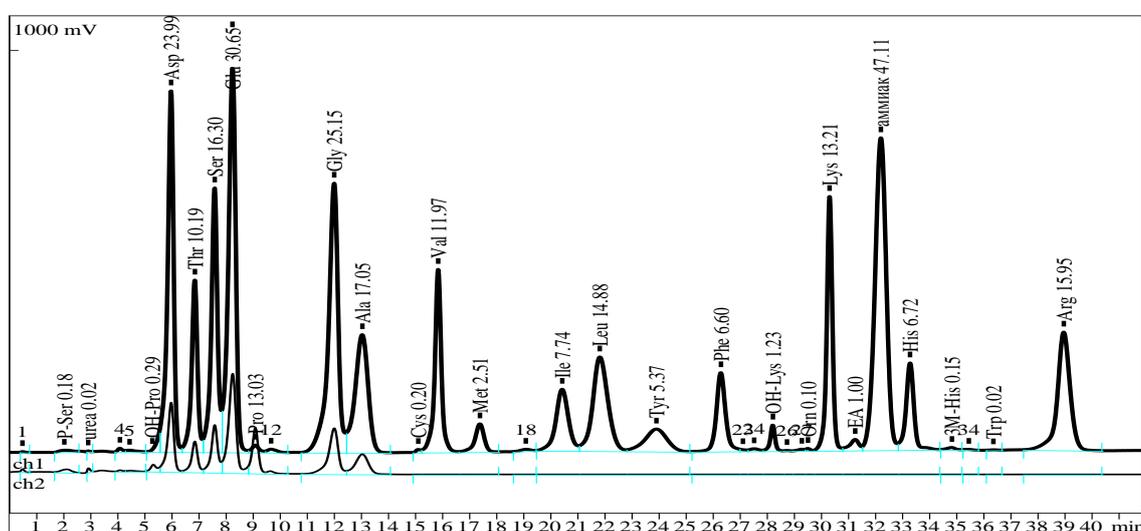


Рис. 21. Хроматограмма аминокислот почек черной смородины

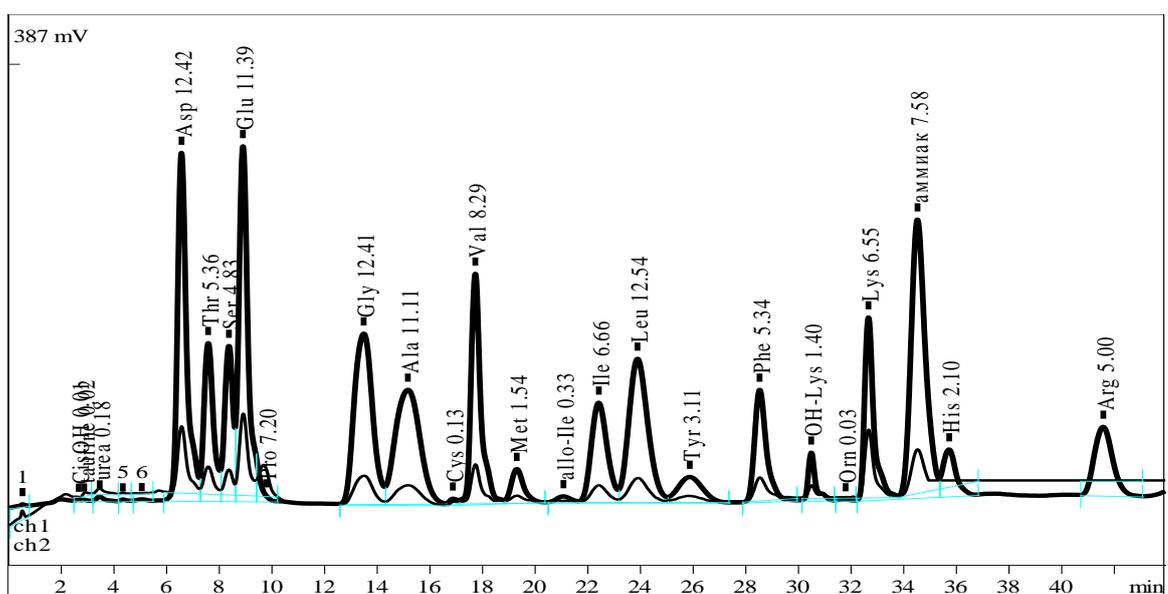


Рис. 22. Хроматограмма аминокислот листьев смородины черной

Идентифицировано 7 незаменимых аминокислот, качественный состав которых одинаков для листьев и почек. Содержание аминокислот по качественному составу и по количественному содержанию в почках и листьях черной смородины имеют незначительные отличия.

Следует отметить достаточно высокое содержание аспарагиновой кислоты, которая в совокупности с глутаминовой кислотой и глицином служит нейромедиатором, она стабилизирует процессы нервной регуляции, обладает психостимулирующей активностью [4]. Присутствие ее в сырье подтверждает иммуностимулирующее действие гомеопатических препаратов смородины.

4.4. Количественное содержание тритерпеноидов в почках и листьях

При исследовании качественного состава почек и листьев смородины черной с помощью реакции с формальдегидом в серной кислоте установлено наличие тритерпеновых сапонинов, что было подтверждено методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Для количественного определения тритерпеноидов нами был выбран хроматоспектрофотометрический метод. В его основе лежит свойство сапонинов давать окрашивание при взаимодействии с кислотой серной концентрированной.

В качестве стандарта был выбран эсцин. Были исследованы спектры поглощения продуктов реакции эсцина и извлечения из сырья смородины с кислотой серной концентрированной. Измерение проводили с помощью регистрирующего спектрофотометра Cary 50. Спектры поглощения стандартного раствора и извлечения из почек смородины представлены на рис. 23. Как видно, максимумы поглощения раствора эсцина и извлечения из сырья совпадают и находятся при длине волны 325 ± 3 нм.

При изучении зависимости оптической плотности от концентрации эсцина установлено, что калибровочная кривая зависимости между оптической плотностью и концентрацией эсцина носит линейный характер в интервале концентраций от 0,0005 до 0,004%. Чувствительность определения 0,05 мг/мл

эсцина. Для расчета количества сапонинов был использован удельный показатель поглощения 222,45 [7].

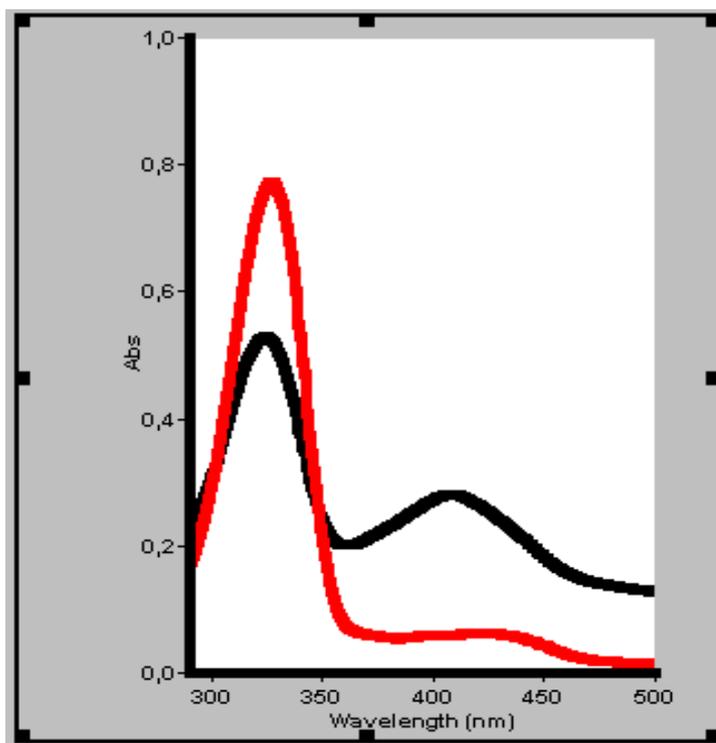


Рис. 23. Спектры поглощения продуктов реакции сапонинов с кислотой серной концентрированной: 1-0,005% раствор эсцина, 95% этанол; 2-извлечение из почек смородины

Для установления максимального извлечения сапонинов из сырья нами были изучены условия экстракции. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7

Зависимость извлечения сапонинов из сырья смородины в зависимости от условий экстракции

<i>Условия экстракции</i>	<i>Содержание сапонинов, %</i>	
	<i>почки</i>	<i>листья</i>
1	2	3
Измельченность мм 5	1,87	1,87
3	2,17	2,31
2	2,42	2,81
1	2,42	2,80

1	2	3
Экстрагент		
25% этанол, подкисленный HCl	1,91	1,90
40% этанол, подкисленный HCl	2,25	2,31
70% этанол, подкисленный HCl	2,37	2,39
96% этанол, подкисленный HCl	2,45	2,85
Соотношение сырье - экстрагент		
1:50	2,47	2,87
1:100	2,41	2,43
1:200	1,95	1,91
1:250	1,83	1,81
Время экстракции, мин. 15	1,77	1,79
30	2,34	2,35
60	2,48	2,84
90	2,47	2,75
Температурный режим		
Без нагревания	1,57	1,49
Нагревание 30°C	2,17	2,47
Нагревание 70°C	2,31	2,83
Нагревание 100°C	2,49	2,54
Кратность экстракции: двухкратная	2,43	2,85
трехкратная	2,41	2,87

Оптимальными условиями экстракции являются: измельченность сырья 2 мм, экстрагент - 95% этанол, подкисленный кислотой хлористоводородной, соотношение сырье–экстрагент (1:50), экстракция на водяной бане при 100°C, время экстракции 60 мин (двухкратная 45 и 15 мин).

Полученные результаты были использованы при разработке методики.

Методика. Около 2,0 г (точная навеска) почек или листьев черной смородины измельчают до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в круглодонную колбу, прибавляют 60 мл 95% этанола, подкисленного кислотой хлористоводородной, и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Затем охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, так чтобы сырье не по-

пало на фильтр. К шроту в круглодонной колбе прибавляют 40 мл 95% этанола, подкисленного кислотой хлористоводородной, и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 минут. Охлаждают под струей холодной воды и фильтруют в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 95% этанолом, подкисленным кислотой хлористоводородной до метки, перемешивают (раствор А).

2 мл раствора А выпаривают на водяной бане досуха. После охлаждения осадок растворяют в 5 мл воды и помещают в колонку диаметром 1 см с 3 г алюминия оксида для хроматографии II степени активности. Выпарительную чашку, в которой проводилось выпаривание, промывают 5 мл воды и промывную воду помещают в ту же колонку.

Водный элюат выпаривают на водяной бане досуха. Осадок после охлаждения количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл 95% этанолом, доводят объем раствора до метки, перемешивают (раствор Б).

В две пробирки с притертой пробкой помещают: в первую пробирку 2 мл 95% этанола, во вторую - 2 мл раствора Б. В обе пробирки прибавляют по 8 мл кислоты серной концентрированной, закрывают пробкой и тщательно перемешивают.

Через 30 минут измеряют оптическую плотность содержимого второй пробирки при длине волны 325 ± 3 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения содержимое первой пробирки.

Содержание суммы сапонинов в почках или листьях в процентах (x) вычисляют по формуле (1):

$$x = \frac{D \times 100 \times 25 \times 10 \times 100}{222,45 \times a \times 2 \times (100 - W)} = \frac{D \times 25 \times 100}{222,45 \times a \times 2 \times (100 - W)}, \quad (1)$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

a – навеска сырья, в граммах;

W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах

Проведена валидация методики определения суммы сапонинов в сырье. Для установления точности и воспроизводимости методики были проанализированы образцы почек смородины черной и проведена статистическая обработка результатов. Полученные результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8

Метрологические характеристики методики количественного определения сапонинов в почках смородины

f	\bar{X} , мг	$S_{\bar{X}}$	P, %	T(p,f)	$\Delta_{\bar{X}}$	$A \pm \%$
9	2,42	0,041	95	2,26	0,093	3,84

Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает $\pm 4,0\%$.

Отсутствие систематической ошибки доказано методом добавок стандарта эсцина. Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9

Результаты количественного определения сапонинов в почках смородины с использованием методов добавок

№ образца	Найдено сапонинов, г/100г сырья	Добавлено эсцина, г	Должна быть найдена сумма эсцина и сапонинов г/100г сырья	Найдена сумма эсцина и сапонинов г/100г сырья	Относительная ошибка, %
1	2,01	1,50	3,51	2,60	+2,56
2	2,42	2,21	4,63	4,55	-1,73
3	2,44	2,22	4,66	4,50	-3,43
4	2,84	0,71	3,55	3,65	+2,81

С помощью разработанной методики были проанализированы образцы листьев и почек смородины черной. Результаты представлены в табл. 10.

Содержание сапонинов в почках и листьях смородины черной

<i>№ образца</i>	<i>Содержание сапонинов, %</i>	
	<i>Почки</i>	<i>Листья</i>
1	2,01	2,81
2	2,42	2,94
3	2,44	3,04
4	2,84	3,17
5	2,92	3,39

Содержание сапонинов в почках смородины колеблется от 2,01 до 2,92%; в листьях от 2,81 до 3,39%.

4.5. Определение аскорбиновой кислоты в почках и листьях

Согласно данным литературы в плодах черной смородины аскорбиновая кислота содержится до 500 мг/%, в листьях аскорбиновой кислоты – до 400 мг/%, в почках до 100 мг/г свежего сырья [147].

Целью данного исследования было: разработка методики количественного определения аскорбиновой кислоты и установление содержания ее в почках и листьях черной смородины и сравнения полученных результатов.

Количественное определение аскорбиновой кислоты в плодах шиповника проводят методом титрования раствором 2,6 - дихлорфенолиндофенолята натрия. Однако, применение этого титранта приводит к получению недостаточно воспроизводимых и точных результатов, что вызвано неустойчивой окраской в оттитрованном растворе [16]. Из физико–химических методов используют фотоколориметрические, экстракционно-фотометрические с хроматографией в тонком слое сорбента.

Наше внимание привлекли методики количественного определения аскорбиновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) [8, 15].

В качестве стандарта, при определении, использована аскорбиновая кислота фирмы (Sigma A-5960). Объектами исследования служили почки черной смородины, собранные ранней весной, высушенные в проветриваемом помещении в защищенном от света месте. Исследованиями при подборе оптимальных условий экстракции аскорбиновой кислоты из почек черной смородины установлено, что оптимальный выход аскорбиновой кислоты наблюдается при измельчении сырья до 2 мм, экстрагент – 70 % этанол, соотношение сырья и экстрагента 1:50, время экстракции 1 час 30 минут при комнатной температуре.

Полученные результаты были использованы при составлении методики.

Методика. Около 2,0 г (точная навеска) почек, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют 60 мл 70 % этанола и взбалтывают на вибрационном аппарате в течение 60 мин. Затем фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, следя за тем, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. В колбу со шротом добавляют 40 мл 70 % этанола и извлекают на вибрационном аппарате в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Шрот и фильтр промывают 10 мл 70 % этанола и доводят объем раствора в колбе 70 % этанолом до метки (испытуемый раствор А).

5 мл испытуемого раствора А фильтруют через микропористый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывают первые 2 мл фильтрата. Фильтрат (испытуемый раствор Б) хроматографируют с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа не менее 5 повторностей при условиях описанных ниже:

По 10 мкл испытуемого раствора Б и раствора РСО аскорбиновой кислоты по отдельности вводят в жидкостной хроматограф высокого давления, укомплектованного системой градиентной подачи элюэнта, УФ диодноматричным детектором или с переменной длиной волны, а так же компьютерной системой сборки и обработки данных.

Получают не менее 5 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях:

- колонка 250 × 4,6 мм, сорбент Kromosil 100 – 5C₁₈ с размером частиц 5 мкм;
- температура термостата 38° С;
- длина волны детектирования 280нм;
- подвижная фаза: ацетонитрил (А) / 0,01 % раствор фосфорной кислоты (В);
- режим элюирования:

Этап №	Продолжительность этапа, мин	Раствор А %	Раствор В %	Режим
0	10	5	95	Изократ.
1	40	85	15	К = 1
2	5	85	15	Изократ.

- скорость элюирования – 1000 мкл/мин;
- время регистрации хроматограммы 5 минут.

Содержание аскорбиновой кислоты в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле (2):

$$X = \frac{S_{обр} \times 100 \times m \times 1 \times 100 \times 100}{S_{ст} \times a \times 50 \times 50 \times (100 - W)} = \frac{S_{обр} \times m \times 400}{S_{ст} \times a \times (100 - W)}, \quad (2)$$

где: $S_{обр}$ - среднее значение площадей пика на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{ст}$ - среднее значение площадей пика на хроматограмме РСО аскорбиновой кислоты;

a – навеска препарата в граммах;

m – навеска стандартного образца аскорбиновой кислоты;

W – потеря в массе при высушивании сырья в граммах.

Содержание аскорбиновой кислоты должно быть не менее 0,02 %.

Примечание. 1. Приготовление подвижной фазы. Используют ацетонитрил для жидкостной хроматографии. Ацетонитрил используют как раствор А. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды очищенной (ФС 42-2119-96), прибавляют 1мл фосфорной кислоты концентрированной (о.с.ч.), доводят объем раствора водой очищенной до метки и фильтруют через микропористый фильтр, при необходимости дегазируют вакуумом в течение 1 - 2 мин при 15 мм атмосферного давления (раствор В). Водную фазу используют свежеприготовленной.

2. *Приготовление раствора стандартного образца (PCO) аскорбиновой кислоты.* Около 0,01 г (точная навеска) аскорбиновой кислоты (Sigma A-59 GO) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл метанола, перемешивают до растворения. Затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

3. *Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографируют PCO аскорбиновой кислоты, получая не менее 5 хроматограмм в условиях описанных выше.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки по техническому паспорту должна быть не менее 300 теоретических тарелок (ГФ XI, вып. 1, с. 105);

- степень разделения пиков, рассчитанная для пиков на хроматограмме PCO аскорбиновой кислоты должна быть не менее 0,63 (ГФ XI, вып. 1, с. 105);

- относительно стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме PCO должно быть не более 3 % (ГФ XI, вып. 1, с. 199);

- коэффициент асимметрии, рассчитанный по пику аскорбиновой кислоты на хроматограмме PCO должен быть не менее 1,0 и не более 1,5;

- коэффициент асимметрии пика (Т) рассчитывают по формуле 3:

$$T = h_{0,05} / 2 \times f, (3)$$

где: $h_{0,05}$ – ширина пика на высоте 5 % от базовой линии, в мин;

f – расстояние от начала пика на высоте 5 % от базовой линии до перпендикуляра, проведенного из его вершины, в мин.

ВЭЖХ и УФ-спектр аскорбиновой кислоты представлены на рис. 24.

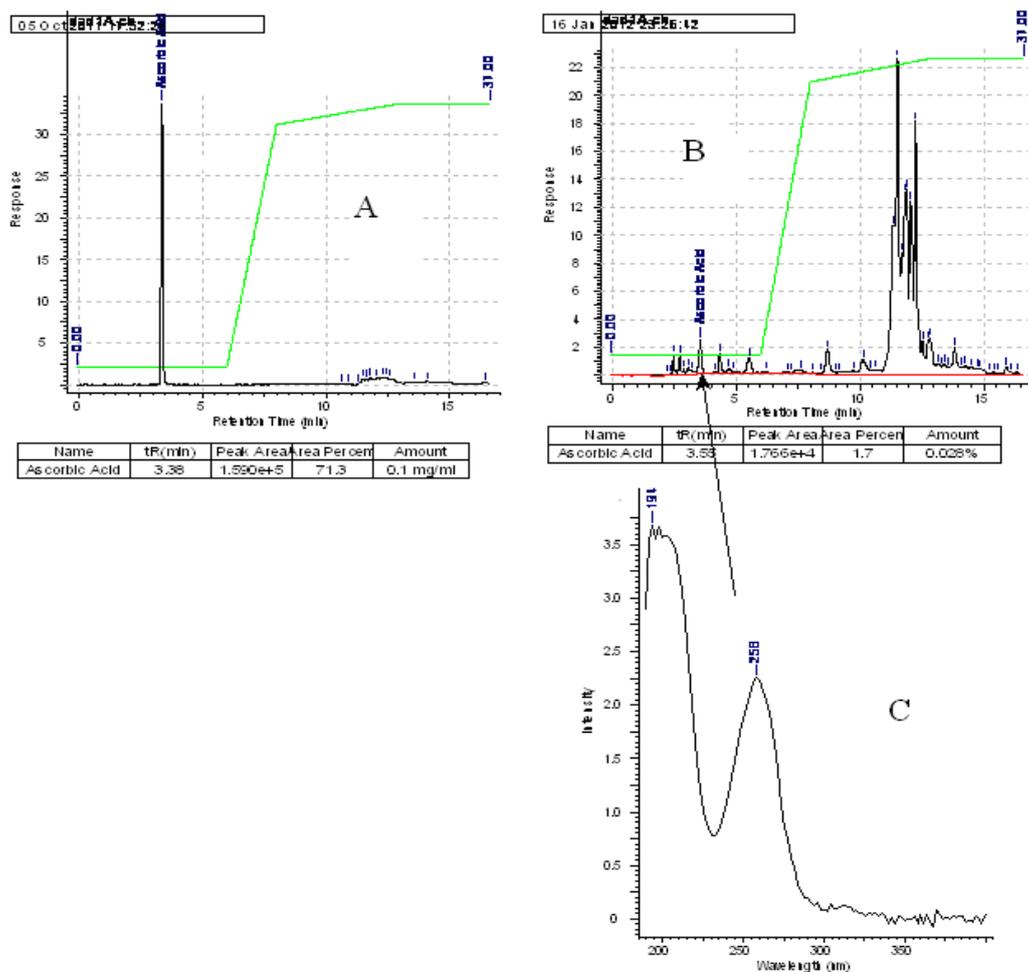


Рис. 24. Хроматограммы и УФ - спектр аскорбиновой кислоты
 А.- стандартного раствора;
 В – извлечение из почек черной смородины;
 С – УФ – спектр

Методика была апробирована с целью её воспроизводимости и точности. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11

Метрологические характеристики методики количественного определения аскорбиновой кислоты

f	\bar{X} , мг	$S_{\bar{x}}$	P, %	T(p,f)	$\Delta_{\bar{x}}$	A \pm %
9	55,4	1,008	95	2,26	2,277	4,11

Ошибка единичного определения составляет $\pm 4,11$ %.

Отсутствие систематической ошибки доказано проведением опытов с добавкой аскорбиновой кислоты. Результаты анализа представлены в таблице 12.

Таблица 12

**Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты
с использованием метода добавок**

№ образца	Найдено аскорбиновой кислоты, мг/100г сырья	Добавлено аскорбиновой кислоты, мг	Должна быть найдена сумма аскорбиновой кислоты, мг/100г сырья	Найдена сумма аскорбиновой кислоты, мг/100г сырья	Относительная ошибка, %
1	55,4	27,7	83,1	85,3	+ 2,6
2	47,4	35,5	82,9	85,5	+ 3,1
3	71,2	17,8	89,0	87,0	- 2,3

Результаты показывают отсутствие систематической ошибки, т.к. относительная ошибка метода добавок меньше относительной ошибки единичного определения.

На основании разработанной методики проведено сравнительное изучение содержания аскорбиновой кислоты в почках и листьях черной смородины. Установлены существенные колебания в содержании в различных образцах сырья. Содержание аскорбиновой кислоты в почках черной смородины колеблется от 22,5 до 71,2 мг/%; в листьях от 60,4 до 191,2 мг/%. Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13

**Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты
в листьях и почках черной смородины**

№ партии	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/%	
	листья	почки
1	60,4	22,5
2	77,6	28,9
3	148,8	55,4
4	127,3	47,4
5	191,2	71,2

4.6. Изучение катехинов в почках и листьях

Для количественного определения дубильных веществ используются различные методы: титриметрические, фотокалориметрические, спектрометрические методы и другие. Наиболее перспективным методом в настоящее время является метод ВЭЖХ, позволяющий оценить качественный и количественный состав катехинов исследуемого сырья [47].

В связи изложенным выше, задачей данного исследования являлось разработка методики определения катехинов в сырье черной смородины, а также сравнительное изучение состава катехинов и их количественного содержания в почках и листьях черной смородины.

Методика. Около 2,0 г (точная навеска) почек (или листьев) черной смородины, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в круглодонную колбу с притертой пробкой, прибавляют 60 мл 70 % этанола, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения под струей холодной воды, фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. К шроту в круглодонную колбу прибавляют 40 мл 70 % этанола и повторяют извлечение в течение 15 мин. Затем охлаждают под струей холодной воды и фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Круглодонную колбу, в которой проводили извлечение, и шрот на фильтре промывают 5 мл 70 % этанола. Доводят объем извлечения в колбе 70 % этанолом до метки и перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А фильтруют через микропористый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл. Последующий фильтрат является испытуемым раствором.

Условия ВЭЖХ-МС анализа: для разделения на ВЭЖХ системе Agilent 1100 использовали колонку Protecol C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм), октадецилсили-

кагель. Раствор А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты, раствор В: ацетонитрил. Скорость подачи подвижной фазы – 0,5 мл/мин, разделение проводили в режиме градиента: 4 – 20 % В – 25 мин; 20 % В – 30 мин; 20 – 50 % В – 50 мин. Масс - спектрометрическое детектирование проводили на времяпролетном масс - анализаторе Agilent 6230 в режиме регистрации положительных ионов, поток газа-осушителя – 9 л/мин, диапазон регистрируемых масс – 100 - 1000 Да.

Режим градиентного элюирования катехинов

Время, мин	А,%	В,%
0	96	4
25	80	20
30	80	20
50	50	50

Полученные результаты определения катехинов в почках и листьях черной смородины представлены на хроматограммах (рис. 25 и 26).

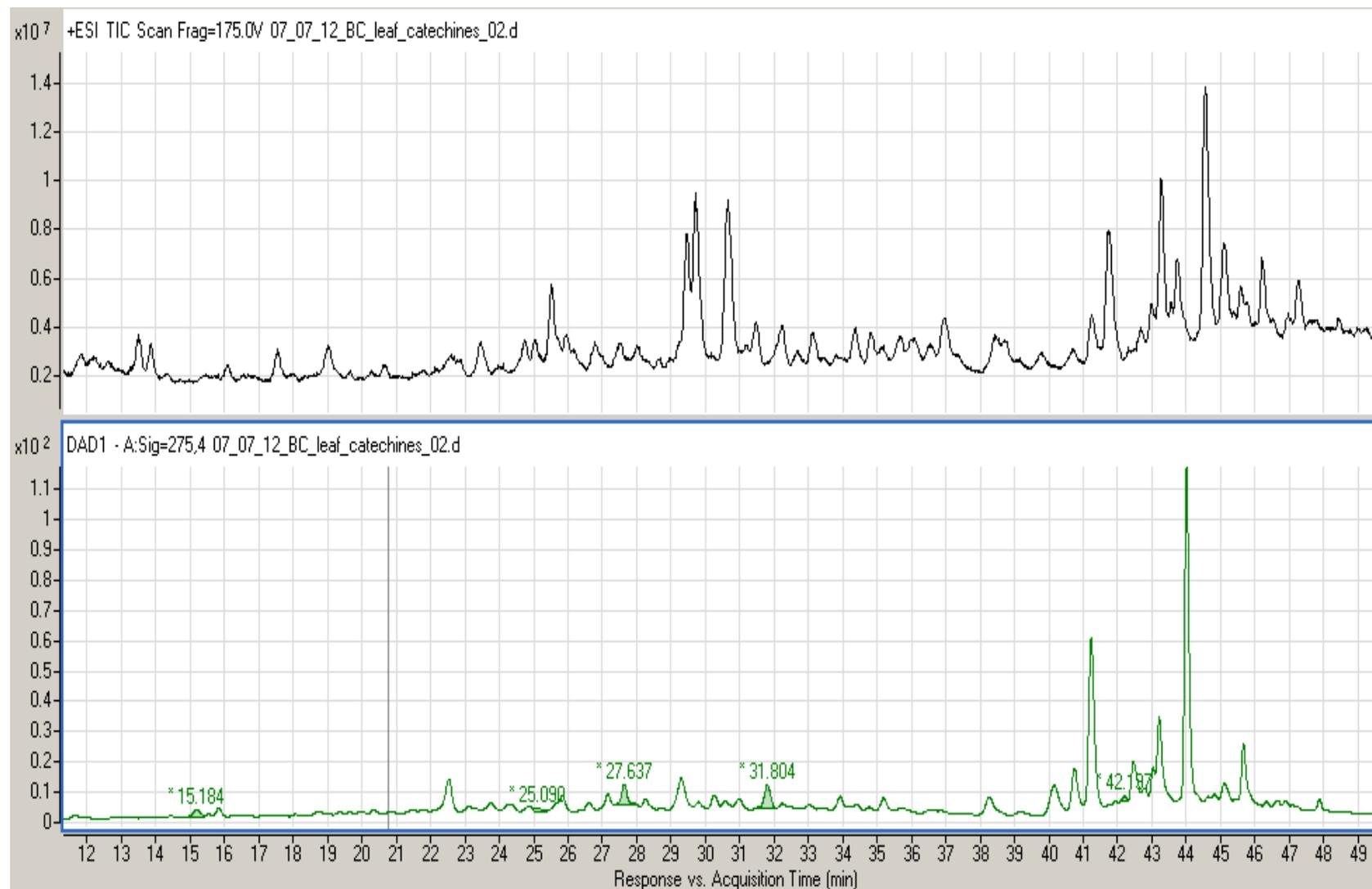


Рис. 25. ВЭЖХ почек черной смородины: по полному ионному току (верхняя) и УФ – спектру (нижняя)

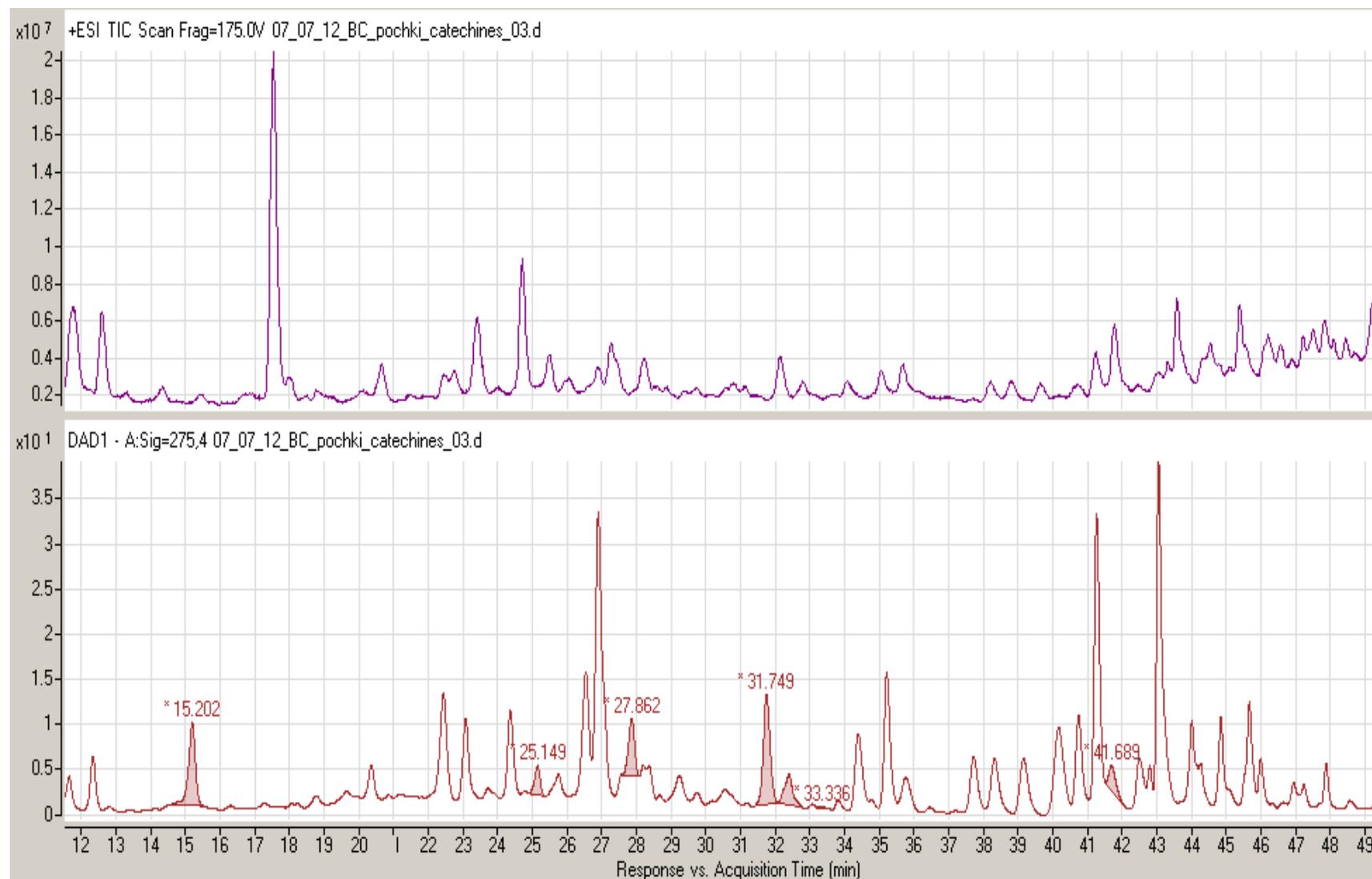


Рис. 26. ВЭЖХ листьев черной смородины: по полному ионному току (верхняя) и УФ – спектру (нижняя)

Качественный состав катехинов устанавливали по времени удерживания и УФ – спектрам стандартных образцов катехинов. В почках черной смородины идентифицировано 7 катехинов, в листьях – 6 катехинов. Почки и листья черной смородины содержат одни те же катехины, в листьях отсутствует галлокатехин.

Количественное содержание катехинов рассчитывали относительно стандартных образцов катехинов. Полученные результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14

**Результаты определения катехинов в почках и листьях
черной смородины**

<i>Компонент</i>	<i>Почки, мг/г</i>	<i>Листья, мг/г</i>
Галловая кислота	0,51	0,13
Эпилгаллокатехин	0,14	0,08
Катехин	0,67	0,30
Эпикатехин	0,63	0,32
Эпигаллокатехин галлат	0,22	0,09
Галлокатехин	0,01	-
Эпикатехин галлат	0,016	0,05
Всего	2,34	0,97

Таким образом, катехины почек черной смородины отличаются не только качественным составом, но и количественным содержанием. Катехинов в почках в два раза выше, чем в листьях черной смородины.

4.7. Изучение состава эфирного масла почек черной смородины

Выделение эфирного масла из сырья проводили перегонкой с водяным паром. Вместо воды использовали насыщенный раствор натрия хлорида. При использовании насыщенного раствора соли температура кипения жидкой фазы возрастает, в результате чего увеличивается парциальное давление паров летучих компонентов при сохранении парциального давления паров воды, при этом увеличивается соотношение органической фазы в водной фазе в дистилляте и увеличивается выход масла [27].

Выход эфирного масла из почек черной смородины составил 2,74%. Полученное эфирное масло растворимо в эфире, хлороформе, петролейном эфире, бензоле и этаноле.

Компонентный состав полученных образцов эфирного масла изучали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Исследование проводили на приборе фирмы Agilent Technologies, состоящем из: 1) газового хроматографа 7890 (колонка HP-5, 50 м x 320 мкм x 1.05 мкм) и 2) масс-селективного детектора 5975 С с квадрупольным масс-анализатором. Температурная программа хроматографирования: при 40 °С – изотерма 2 мин; далее программируемый нагрев до 250°С со скоростью 5 °С/мин; при 250 °С – изотерма 15 мин; далее программируемый нагрев до 320°С со скоростью 25 °С/мин; при 320 °С - изотерма 5 мин. Инжектор с делением потока 1:50. Температура инжектора 250 °С. Температура интерфейса 280 °С. Газ носитель – гелий; скорость потока - 1 мл/мин. Хроматограмма образцов – по полному ионному току. Условия масс-спектрометрического анализа: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров в положительных ионах в диапазоне (m/z) от 20 до 450 со скоростью 2.5 скан/сек. Программное обеспечение – ChemStation E 02.00. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических линейных индексов удерживания (I). Относительное содержание (%) компонентов смеси (коли-

чественный анализ) вычисляли из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простой нормировки).

Совокупность идентифицированных компонентов эфирного масла условно разбита на две группы: группа I – соединения, относящиеся к определённому биосинтетическому типу терпеноидов (изопреноидов); группа II – соединения, которые не относятся к классу терпеноидов (неизопреноидные компоненты) (таблица 15).

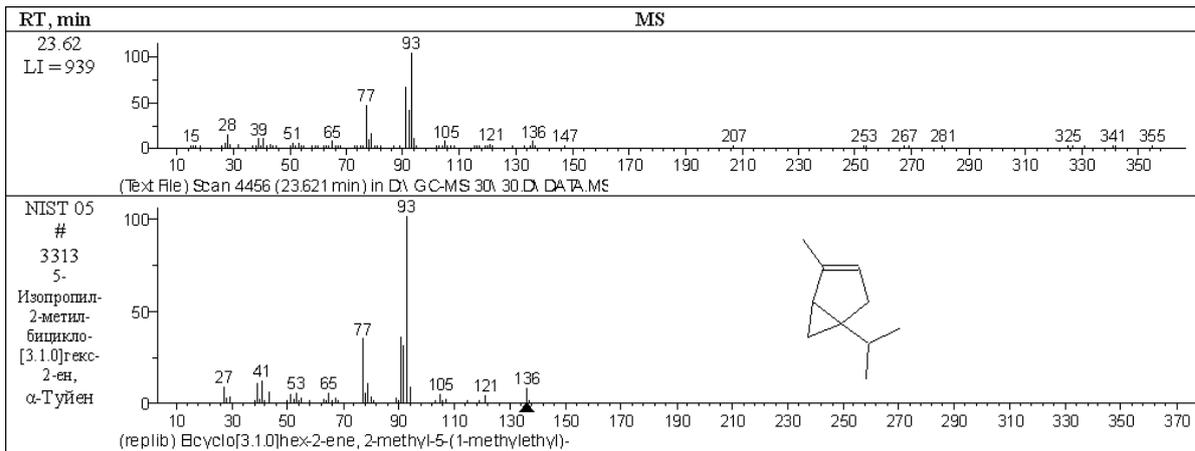
В частности, из класса терпеноидов (группа I) в составе эфирного масла почек смородины идентифицированы следующие компоненты:

монотерпеноиды представлены компонентами, относящимися к биосинтетическим типам туйона, карена, пинена, камфена и изокамфена, ментана и ациклических;

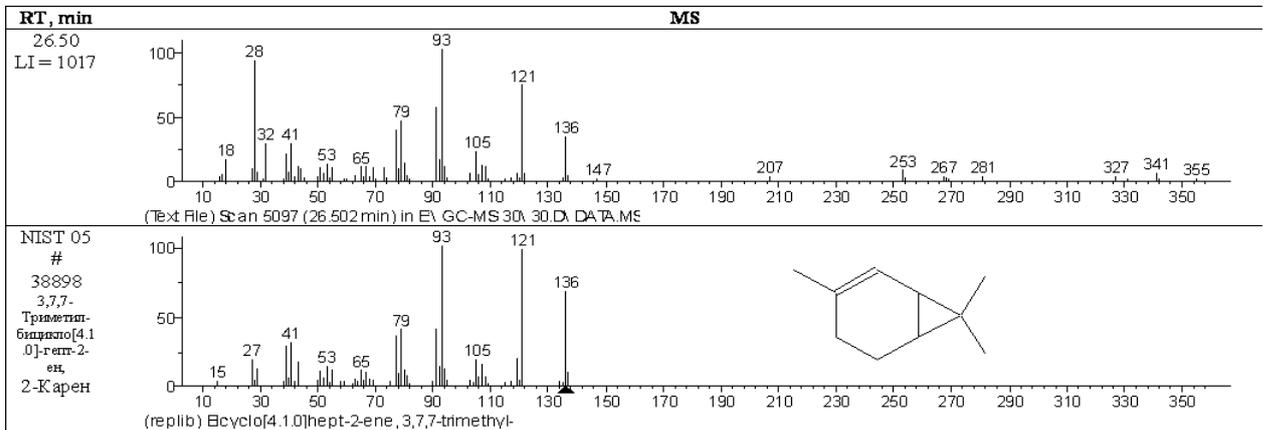
сесквитерпеноиды представлены компонентами, входящими в биогенетическое древо гумулана и биогенетическое древо гермакрана, и относящимися к биосинтетическим типам элемана, гермакрана и эудесмана, кадинана, аромадендрана, гваяна и биосинтетического типа бисаболана, а также компонентами ациклического строения.

Наличие и строение тритерпеноидов устанавливали методом ВЭЖХ по масс – спектрам, результаты представлены на рисунках 27, 28.

Биосинтетический тип туйона



Биосинтетический тип карена



Биосинтетический тип пинена

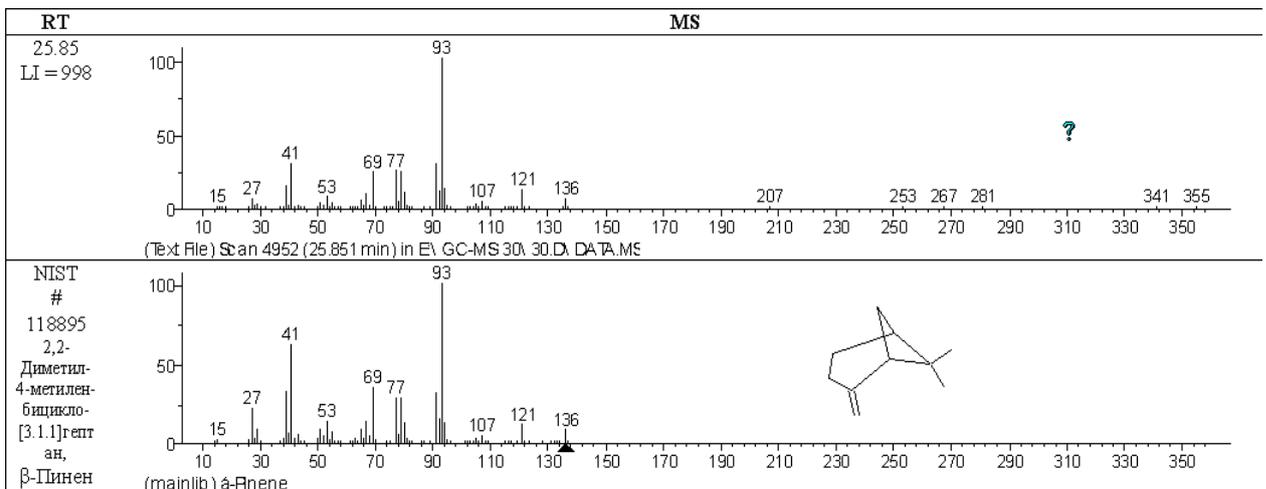


Рис. 27. Установление строения монотерпиноидов по масс – спектрам (биосинтетический тип туйона, карена и пинана)

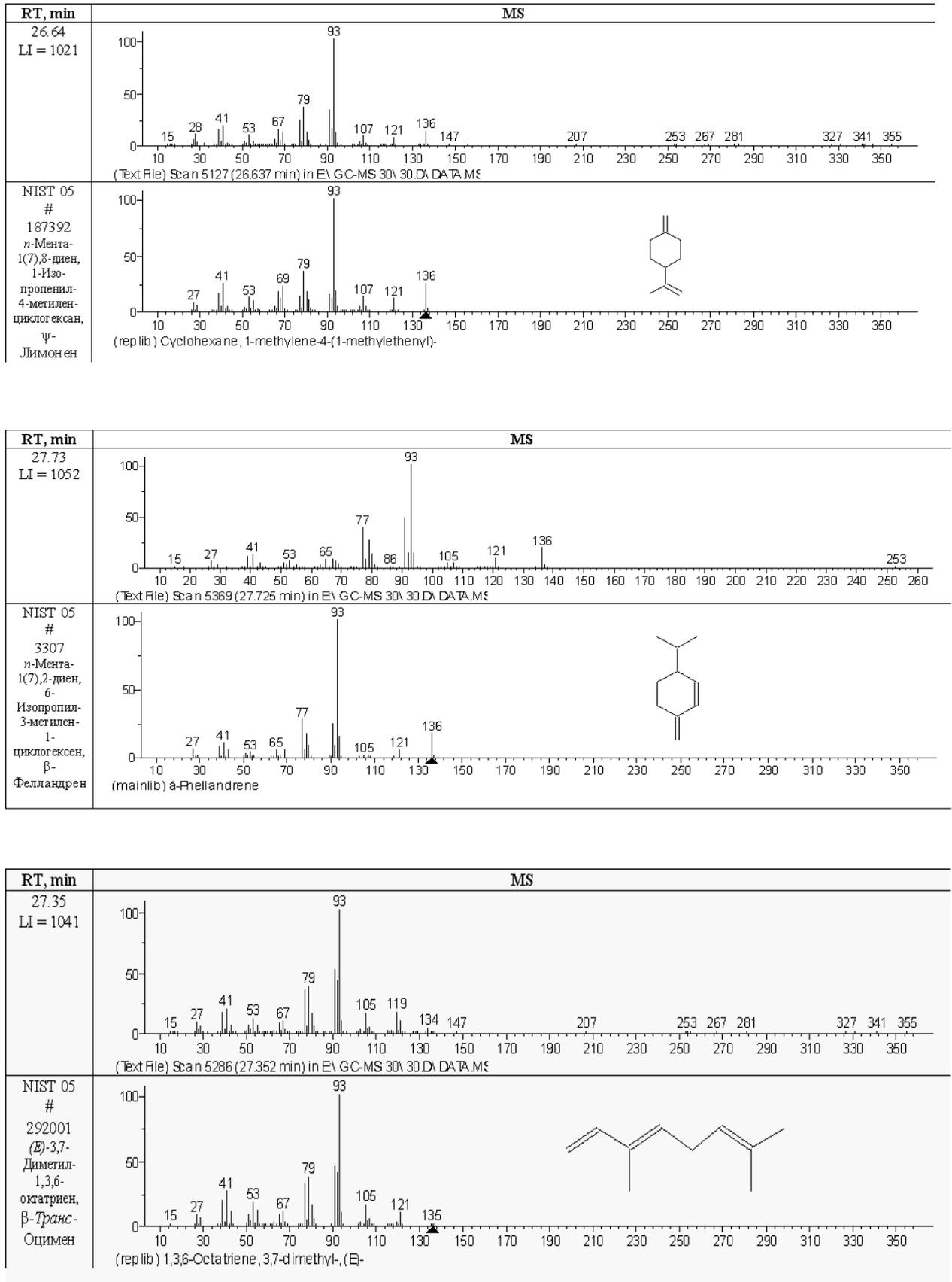
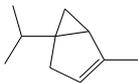
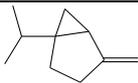
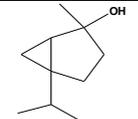
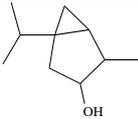
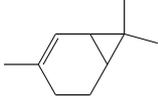
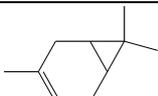
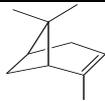
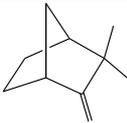
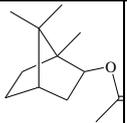
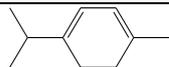
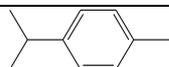
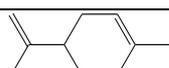


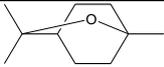
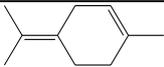
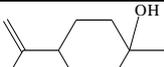
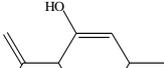
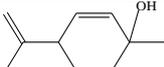
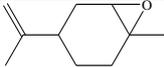
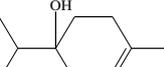
Рис. 28. Установление строения монотерпеноидов по масс-спектрам (биосинтетический тип камфана и изокамфана)

Состав эфирного масла почек черной смородины

Соединение	Структурная формула	Хроматографический индекс удерживания (линейный), I_{lin}	Содержание, %	Масс-спектр, m/z (I, %)
1	2	3	4	5
МОНОТЕРПЕНОИДЫ				
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП ТУЙАНА				
5-Изопропил- 2-метилбицикло-[3.1.0]гекс-2-ен, (α -туйен)		939	0,39	M^{++} 136(7), 121(4), 105(7), 93(100), 77(44), 65(7), 53(6), 41(11)
1-Изопропил- 4-метиленбицикло-ло[3.1.0]гексан, (сабинен)		989	1,53	M^{++} 136(12), 121(6), 105(3), 93(100), 77(40), 69(8), 53(7), 41(18)
5-Изопропил-2-метилбицикло-[3.1.0]гексан-2-ол		1085	0,28	M^{++} 154(4), 139(17), 136(21), 121(42), 111(30), 93(100), 81(41), 71(63), 55(29), 43(69)
1-Изопропил-4-метилбицикло-[3.1.0]гексан-3-ол, (изотуйол)		1164	0,10	M^{++} 154(1), 136(6), 121(8), 110(56), 93(40), 79(100), 67(32), 53(13), 41(19)
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП КАРАНА				
3,7,7-Триметил- бицикло[4.1.0]гепт-2-ен, (2-карен)		1017	0,05	M^{++} 136(34), 121(73), 105(23), 93(100), 79(45), 65(11), 53(12), 41(28)
3,7,7-Триметил- бицикло[4.1.0]гепт-3-ен, (3-карен)		1028	3,21	M^{++} 136(12), 121(20), 105(14), 93(100), 77(37), 67(9), 53(8), 41(15)

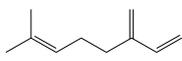
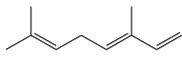
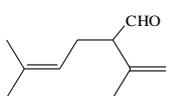
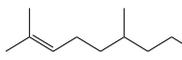
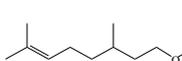
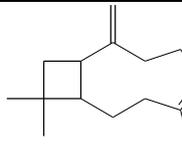
1	2	3	4	5
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП ПИНАНА				
2,6,6-Триметил-бицикло[3.1.1]гепт-2-ен, (α -пинен)		951	6,47	M^{+} 136(5), 121(12), 105(11), 93(100), 77(31), 67(8), 53(7), 41(13)
2,2-Диметил-4-метилен-бицикло[3.1.1]гептан, (β -пинен)		998	3,11	M^{+} 136(7), 121(13), 107(6), 93(100), 79(25), 69(25), 53(9), 41(30)
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ТИПЫ КАМФАНА И ИЗОКАМФАНА				
3,3-Диметил-2-метилен-бицикло[2.2.1]гептан, (камфен)		970	0,86	M^{+} 136(11), 121(63), 107(29), 93(100), 79(37), 67(26), 53(11), 41(21)
1,7,7-Триметил-бицикло[2.2.1]гепт-2-илацетат, (борнилацетат)		1313	2,59	154(9), 136(31), 121(41), 108(17), 95(100), 80(16), 67(14), 55(14), 43(51)
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП МЕНТАНА				
<i>n</i> -Мента-1(7),8-диен; 1-Изопропенил-4-метилен-циклогексан, (ψ -лимонен)		1021	0,52	M^{+} 136(14), 121(8), 107(9), 93(100), 79(36), 69(12), 53(10), 41(19)
<i>n</i> -Мента-1,3-диен; 4-Изопропил-1-метил-1,3-циклогексадиен, (α -терпинен)		1032	0,10	M^{+} 136(45), 121(73), 105(18), 93(100), 77(41), 65(9), 51(8), 41(20)
4-Изопропил-1-метилбензол, (<i>n</i> -цимол)		1036	0,08	M^{+} 134(30), 119(100), 103(5), 91(37), 77(20), 65(8), 51(5), 39(11)
<i>n</i> -Мента-1,8-диен; 4-Изопропенил-1-метил-1-циклогексен (Лимонен)		1049	49,75	M^{+} 136(20), 121(33), 107(32), 93(90), 79(49), 68(100), 53(29), 39(29)
<i>n</i> -Мента-1(7),2-диен; 6-Изопропил-3-метилен-1-циклогексен, (β -фелландрен)		1052	6,24	M^{+} 136(19), 121(9), 105(5), 93(100), 77(38), 65(8), 53(7), 41(12)

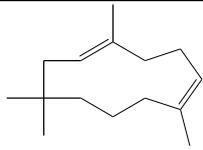
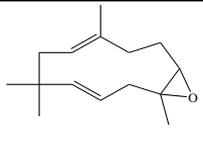
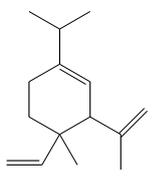
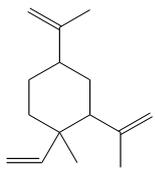
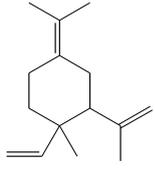
Продолжение табл. 15

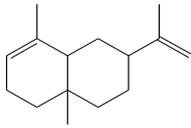
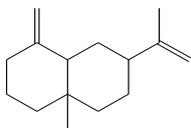
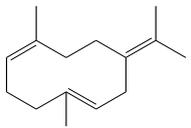
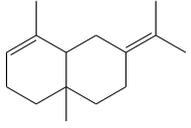
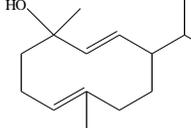
1	2	3	4	5
1,8-Эпокси- <i>n</i> -ментан; 1,3,3-Триметил-2-окса- бицикло[2.2.2]октан, (1,8-цинеол)		1054	0,54	M ⁺ 154(13), 139(16), 125(4), 111(18), 108(24), 93(100), 81(35), 71(20), 59(7), 55(18), 43(40)
<i>n</i> -Мента-3,8-диен; 1- Изопропенил-4-метил- 1-циклогексен		1073	0,14	M ⁺ 136(27), 121(28), 107(15), 93(100), 79(34), 68(44), 53(16), 39(20)
<i>n</i> -Мента-1,4(8)-диен, 1- Метил-4- изопропилиден-1- циклогексен, (α - терпинолен)		1105	1,82	M ⁺ 136(79), 121(92), 105(27), 93(100), 79(45), 67(15), 53(14), 41(21)
<i>n</i> -Мент-8-ен-1-ол; 4- Изопропенил-1- метилциклогексан-1-ол, (<i>цис</i> - β -терпинеол)		1119	0,06	M ⁺ 154(5), 139(16), 136(21), 121(37), 111(23), 93(100), 81(57), 79(58), 71(44), 55(24), 43(56)
<i>транс</i> - <i>n</i> -Мента- 2,8- диен-3-ол; 6- Изопропенил-3-метил- 1-циклогексен-1-ол		1140	0,21	M ⁺ 152(3), 137(40), 121(61), 109(85), 94(88), 79(100), 67(54), 55(24), 43(64)
<i>цис</i> - <i>n</i> -Мента-2,8-диен- 1-ол; 4-Изопропенил-1- метил-2-циклогексен-1- ол		1155	0,21	M ⁺ 152(3), 137(58), 134(68), 119(46), 109(99), 93(72), 79(84), 67(80), 55(30), 43(100)
1,2-Эпокси- <i>n</i> -мент-8- ен; 4-Изопропенил-1- метил-7-окса-бицикло [4.1.0] гептан, (лимонен эпоксид)		1159	0,07	137(13), 119(15), 108(43), 94(69), 79(68), 67(100), 55(31), 43(88)
<i>n</i> -Мент-1-ен-4-ол; 1- Изопропил-4-метил- 3- циклогексен-1-ол, (4- терпинеол)		1203	0,52	M ⁺ 154(7), 136(14), 121(4), 111(26), 93(35), 86(9), 77(15), 71(47), 55(14), 43(100)

Продолжение табл. 15

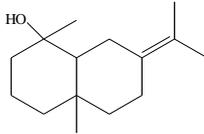
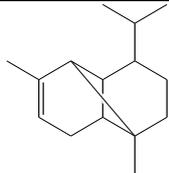
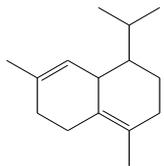
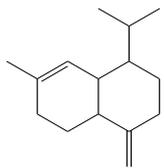
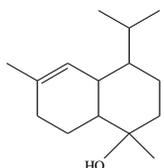
1	2	3	4	5
<i>n</i> -Мент-1-ен-8-ол; 2-(4-Метил-3-циклогексен-1-ил)-2-пропанол (α -Терпинеол)		1214	0,38	M ⁺ 154(1), 136(53), 121(64), 107(15), 93(85), 81(52), 67(35), 59(100), 55(18), 43(45)
<i>n</i> -Мент-8(10)-ен-9-ол; 2-(4-Метилциклогексил)-2-пропен-1-ол		1217	0,19	M ⁺ 154(2), 136(11), 121(16), 107(14), 95(100), 81(32), 67(50), 59(8), 55(19), 41(44)
<i>цис-n</i> -Мента-6,8-диен-2-ол; <i>цис</i> -5-Изопропенил-2-метил-2-цикло-гексен-1-ол (<i>цис</i> -Карвеол)		1240	0,31	M ⁺ 152(6), 137(10), 119(18), 109(100), 91(39), 84(46), 69(29), 55(31), 41(38)
<i>транс-n</i> -Мента-6,8-диен-2-ол; <i>транс</i> -5-Изопропенил-2-метил-2-цикло-гексен-1-ол (<i>транс</i> -Карвеол)		1253	0,18	M ⁺ 152(3), 134(55), 119(37), 109(71), 91(54), 84(100), 69(47), 55(54), 41(60)
<i>n</i> -Мента-6,8-диен-2-он; 5-Изопропенил-2-метил-2-циклогексен-1-он, (карвон)		1271	0,35	M ⁺ 150(9), 135(8), 121(5), 108(36), 93(46), 82(100), 67(14), 58(9), 54(37), 39(31)
1,2:8,9-Диэпокси- <i>n</i> -ментан; 1-Метил-4-(2-метил-2-оксиранил)-7-оксабицикло[4.1.0]гептан(Лимонена диэпоксид)		1288	0,02	135(27), 121(30), 107(33), 95(100), 79(57), 67(75), 55(36), 43(78)
<i>n</i> -Мента-1,8-диен-3-он; 6-Изопропенил-3-метил-2-циклогексен-1-он		1302	0,04	M ⁺ 150(15), 135(39), 122(8), 107(14), 91(21), 82(100), 67(27), 54(16), 39(31)

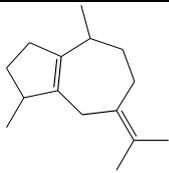
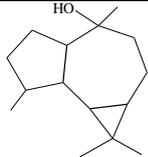
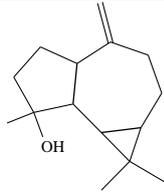
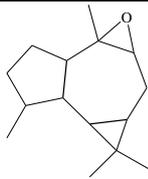
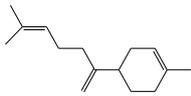
1	2	3	4	5
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП АЦИКЛИЧЕСКИХ				
7-Метил-3-метилен-1,6-октадиен (β -Мирцен)		994	3,40	M ⁺ 136(4), 121(5), 107(4), 93(100), 79(17), 69(56), 53(11), 41(70)
(E)-3,7-Диметил-1,3,6-октатриен (β -Транс-Оцимен)		1041	2,57	M ⁺ 136(2), 121(10), 105(17), 93(100), 79(38), 67(11), 53(12), 41(20)
2-Изопропенил-5-метилгекс-4-еналь		1200	0,10	M ⁺ 152(7), 137(19), 123(28), 109(42), 95(54), 84(63), 69(100), 55(24), 41(54)
3,7-Диметил-6-октен-1-ол (β -Цитронеллол)		1231	1,41	M ⁺ 156(4), 138(8), 123(24), 109(19), 95(50), 81(61), 69(92), 55(57), 41(100)
3,7-Диметил-6-октен-1-илацетат (Цитронеллилацетат)		1354	0,26	138(27), 123(49), 109(27), 95(85), 81(86), 69(74), 55(45), 43(100)
СЕСКВИТЕРПЕНОИДЫ				
БИОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДРЕВО ГУМУЛАНА				
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП ГУМУЛАНА				
8-Метилен-4,11,11-триметилбицикло-[7.2.0]ундец-4-ен (β -Кариофиллен)		1475	0,49	M ⁺ 204(5), 189(19), 175(9), 161(32), 147(24), 133(73), 121(50), 105(57), 93(100), 79(73), 69(55), 55(31), 41(73)

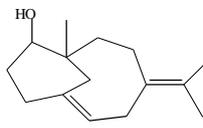
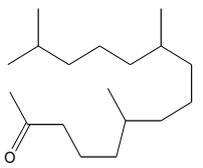
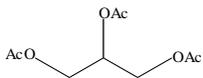
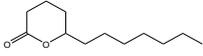
1	2	3	4	5
2,6,6,9-Тетраметил-1,4,8-циклоундекатриен; (α -Кариофиллен; α -Гумулен)		1511	0,65	M^{+} 204(6), 189(7), 175(1), 161(10), 147(18), 136(8), 121(52), 107(27), 93(100), 80(30), 67(21), 53 (14), 41(24)
1,5,5,8-Тетраметил-12-оксабицикло-[9.1.0]додека-3,7-диен		1680	0,28	M^{+} 220(2), 204(20), 189(7), 179(4), 161(48), 147(10), 138(26), 123(45), 109(49), 96(48), 93(49), 81(100), 67(62), 55 (41), 43(95)
БИОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДРЕВО ГЕРМАКРАНА				
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП ЭЛЕМАНА				
1-Винил-2-изопропенил- <i>n</i> -мент-3-ен; 3-Изопропенил-1-изопропил-4-винил-4-метил-1-циклогексен (δ -Элемен)		1369	0,20	M^{+} 204(2), 189(5), 175(2), 161(29), 136(46), 121(100), 105(22), 93(81), 77(29), 67(17), 53 (14), 41(25)
1-Винил-2-изопропенил- <i>n</i> -мент-8-ен; 2,4-Диизопропенил-1-винил-1-метил-циклогексан (β -Элемен)		1428	0,57	M^{+} 204(2), 189(24), 175(7), 161(32), 147(46), 133(32), 121(44), 107(69), 93(100), 81(92), 68(61), 53 (37), 41(49)
1-Винил-2-изопропенил- <i>n</i> -мент-4(8)-ен; 1-Винил-2-изопропенил-4-изопропилиден-1-метилциклогексан(τ -Элемен)		1470	1,55	M^{+} 204(5), 189(15), 175(2), 161(23), 147(12), 133(22), 121(100), 107(46), 93(70), 79(34), 67(35), 53 (22), 41(35)

1	2	3	4	5
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ТИПЫ ГЕРМАКРАНА И ЭУДЕСМАНА				
Эудесма-3,11-диен; 2-Изопропенил-4а,8-диметил-1,2,3,4,4а,5,6,8а-октагидронафталин (α -Селинен), сумма стереоизомеров		1487 1552 среднее значение 1520	0,1 0,43 суммарно 0,55	Типичный спектр: M^{+} 204(37), 189(92), 175(26), 161(56), 147(35), 133(67), 121(68), 107(78), 93(100), 79(72), 67(48), 55 (39), 41(57)
Эудесма-4(14),11-диен; 2-Изопропенил-4а-метил-8-метилен-декагидронафталин (β -Селинен), сумма стереоизомеров		1499 1546 среднее значение 1523	0,09 0,37 суммарно 0,46	Типичный спектр: M^{+} 204(23), 189(32), 175(14), 161(49), 147(34), 133(42), 121(96), 105(86), 93(100), 79(72), 67(58), 55 (34), 41(55)
Гермакра-1(10),4,7(11)-триен; 1,5-Диметил-8-изопропилиден-1,5-циклодекадиен, (Гермакрен В)		1529	0,10	M^{+} 204(8), 189(4), 175(3), 161(28), 147(15), 133(26), 121(100), 107(53), 93(77), 79(45), 67(42), 55 (30), 41(46)
Эудесма-3,7(11)-диен; 4а,8-Диметил-2-изопропилиден-1,2,3,4,4а,5,6,8а-октагидронафталин		1602	0,21	M^{+} 204(43), 189(20), 175(4), 161(100), 147(12), 135(23), 122(60), 107(57), 91(46), 81(25), 67(27), 55 (22), 41(29)
Гермакрен D-4-ол; 4-Изопропил-1,7-диметил-2,7-циклодекадиен-1-ол		1634	0,33	M^{+} 222(43), 204(8), 189(4), 175(1), 161(20), 147(3), 133(6), 123(21), 105(18), 93(16), 81(100), 67(17), 55 (20), 43(77)

Продолжение табл. 15

1	2	3	4	5
Эудесм-7(11)-ен-4-ол; 1,4а-Диметил-7- изопронилендека- гидронафталин-1-ол		1647	0,24	M ⁺ 222(3), 204(30), 189(24), 175(6), 161(100), 147(23), 133(31), 121(56), 105(83), 93(67), 81(56), 67(43), 55 (42), 43(98)
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП КАДИНАНА				
1,3-Диметил-8- изопропилтрицикло- [4.4.0.0(2,7)]дец-3-ен, (α-Копаен)		1419	0,08	M ⁺ 204(11), 189(8), 161(78), 150(10), 135(24), 119(100), 105(89), 93(70), 81(30), 77(37), 67(33), 55 (22), 41(45)
Кадина-1(10),4-диен; 1- Изопропил-4,7- диметил-1,2,3,5,6,8а- гекса-гидронафталин (δ-Cadinene)		1564	0,75	M ⁺ 204(38), 189(14), 176(3), 161(100), 147(8), 134(40), 119(57), 105(54), 91(46), 81(25), 67(10), 55 (13), 41(24)
1-Изопропил-7-метил- 4-метилен- 1,2,3,4,4а,5,6,8а-окта- гидронафталин		1582	0,04	M ⁺ 204(44), 189(24), 175(5), 161(100), 147(32), 135(46), 119(76), 105(88), 91(90), 79(61), 67(54), 55 (46), 41(68)
4-Изопропил-1,6- диметил- 1,2,3,4,4а,7,8,8а-окта- гидронафталин-1-ол, сумма стереоизомеров		1695 1698 1712 среднее значение 1702	0,16 0,16 0,31 суммарно 0,63	Типичный спектр: M ⁺ 222(4), 204(36), 189(7), 179(3), 161(38), 149(9), 137(18), 121(83), 109(35), 105(37), 95(100), 79(42), 71(29), 55 (22), 43(67)

1	2	3	4	5
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ТИПЫ АРОМАДЕНДРАНА И ГВАЯНА				
Гвайя-1(5),7(11)-диен; 1,2,3,4,5,6,7,8- Октагидро-1,4- диметил-7- изопропилиденазулен		1595	0,29	M ⁺ 204(71), 189(28), 175(23), 161(85), 147(19), 133(53), 119(40), 105(64), 91(70), 81(100), 69(83), 55 (34), 41(72)
1,1,4,7-Тетраметил- декагидро-1H-цикло- пропа[e]азулен-4-ол		1653	0,23	M ⁺ 220(2), 204(16), 189(17), 177(10), 161(62), 147(21), 135(28), 121(51), 105(77), 93(94), 79(96), 69(46), 55(49), 43(100)
1,1,7-Триметил-4- метилендека-гидро-1H- циклопропа-[e]азулен- 7-ол (Спатуленол)		1683	0,74	M ⁺ 220(6), 205(14), 187(16), 177(17), 162(45), 159(50), 147(39), 131(27), 119(100), 105(57), 91(91), 79(44), 67(24), 55 (23), 43(87)
1,1,4,7-Тетраметил- декагидро-1H-цикло- пропа[e]азулен эпексид (Аромандендрена эпексид), сумма стереоизо- меров		1705 1720 1723 среднее значение 1716	0,03 0,03 0,03 суммарно 0,09	Типичный спектр: M ⁺ 220(17), 204(8), 187(7), 177(4), 162(14), 147(10), 135(34), 121(18), 107(21), 93(30), 81(20), 67(26), 55 (20), 41(27)
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИП БИСАБОЛАНА				
4-[(1Z)-1,5-Диметил- 1,4-гексадиенил]-1- метил-1-циклогексен (Цис-α-Бисаболен)		1422	Следовые количества	M ⁺ 204(5), 189(13), 175(5), 161(26), 147(15), 133(20), 121(36), 105(36), 93(100), 79(54), 67(69), 53 (31), 41(51)

1	2	3	4	5
ПРОЧИЕ				
7-Метил-4-изопропилиден-бицикло[5.3.1]ундец-1-ен-8-ол, сумма стерео-изомеров		1829 1836 среднее значение 1832	0,17 0,15 суммарно 0,32	Типичный спектр: M ⁺ 220(100), 202(20), 187(52), 176(32), 173(10), 159(70), 145(50), 131(66), 119(48), 105(60), 91(70), 79(46), 67(36), 55 (42), 41(66)
6,10,14-Триметил-2-пентадеканон		1852	0,10	267(3), 135(16), 123(14), 109(23), 95(31), 85(23), 71(48), 58 (76), 43(100)
СОЕДИНЕНИЯ, НЕ ОТНОСЯЩИЕСЯ К КЛАССУ ТЕРПЕНОИДОВ				
Глицерилтриацетат (Триацетин)		1336	0,10	158(13), 145(15), 116(8), 103(23), 86(3), 53(2), 43(100)
<i>n</i> -Гептил-δ-валеролактон; 6-Гептилтетрагидро-2H-пиран-2-он		1745	0,26	M ⁺ 198(1), 180(2), 162(6), 151(3), 136(8), 127(6), 114(12), 99(100), 84(12), 71(40), 55 (40), 41(48)
ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ КОМПОНЕНТЫ				97,33 %
НЕИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ КОМПОНЕНТЫ				2,67 %

Содержание эфирного масла в почках черной смородины составляет 2,74 %. В эфирном масле почек черной смородины определено 59 компонентов. Основными компонентами эфирного масла, содержание которых превышает 1 %, являются 12 компонентов: сабинен карен, α – пинен, β – пинен, борнил – ацетат, лимонен, фелландрен, терпинолен, β – мерцен, оцимен, β – цитропеллол, 1 – винил – 2 изопропенил – 4 – пропилидин – 1 - метилцикло-гексан (τ – элемен).

4.8. Изучение качественного состава флавоноидов почек и листьев

Представляет интерес сравнительное исследование состава и содержания флавоноидов в почках и листьях черной смородины, поскольку в качестве ЛРС используются оба вида сырья.

Целью данного исследования являлось: подбор условий и разработка методики определения флавоноидов в сырье черной смородины методом ВЖХ/МС и сравнительное изучение флавоноидов в почках и листьях данного растения.

Методика. 4 г высушенных почек или листьев, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл; прибавляли 60 мл спирта этилового 70 %, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы сырье не попало на фильтр. В круглодонную колбу со штифтом прибавляли 40 мл спирта этилового 70 % и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Колбу и осадок на фильтре промывали 5 мл спирта этилового 70 % и доводили объем раствора до метки (раствор А). Аналогичным способом получали извлечение из листьев (извлечение Б).

Определение качественного состава флавоноидов проводилось методом ВЭЖХ на хроматографе Waters Acquity с тандемным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters). Подвижная фаза А (ПФ А): вода – ацетонитрил (95 : 5) с муравьиной кислотой. Подвижная фаза В (ПФ В): ацетонитрил с муравьиной кислотой. Хроматографируют испытуемый раствор, приготовленный как указано выше, в следующих условиях:

- объем пробы 1 мкл;
- колонка 0,21 x 5,0 см Acquity UPLC BEH C18 (1,7 мкм);

- температура колонки 35 °С;
- скорость потока 0,5 мл/мин;
- градиентный режим хроматографирования формируется путем смешивания подвижных фаз А и В по следующей схеме:

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	95	5
3,0	60	40
3,1	95	5

- МС детекция в режиме позитивных ионов;
- параметры детектора: напряжение на капилляре - 3 кВ; напряжение на конусе - 55 В; температура капилляра 450 °С; температура источника 120 °С; скорость потока осушающего газа 800 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1000 ед.

Полученные результаты представлены на хроматограммах. На рис. 29 приведены результаты анализа методом ВЭЖХ/МС извлечения А из почек черной смородины.

Из почек выделено и установлено 4 флавоноида, из них 2 производных кверцетина и 2 производных мирицетина: кверцетин-3-О-[6-О-малонил-β-D-глюкопиранозид] (I), кверцетин-3-О-D-галактопиранозид (гиперозид) (II), мирицетин-3-О-[6-О-малоноил-β-D-глюкопиранозид] (III), мирицетин-3-О-β-D-глюкуронид (IV) (рисунки 30-33).

На рис. 36 представлены результаты анализа извлечения Б из листьев черной смородины. Установлено, что в листьях черной смородины содержится 2 производных кверцетина и 2 производных кемпферола: кверцетин-3-О-[6-О-малонил-β-D-глюкопиранозид] (I), кверцетин-3-О-D-галактопиранозид (гиперозид) (II), кемферол-3-О-[6-О-малоноил-β-D-глюкопиранозид] (V), кемферол-3-О-D-галактопиранозид (VI) (рисунки 30, 31, 34, 35).

Производные кверцетина, выделенные из почек и листьев черной смородины по химическому строению совпадают.

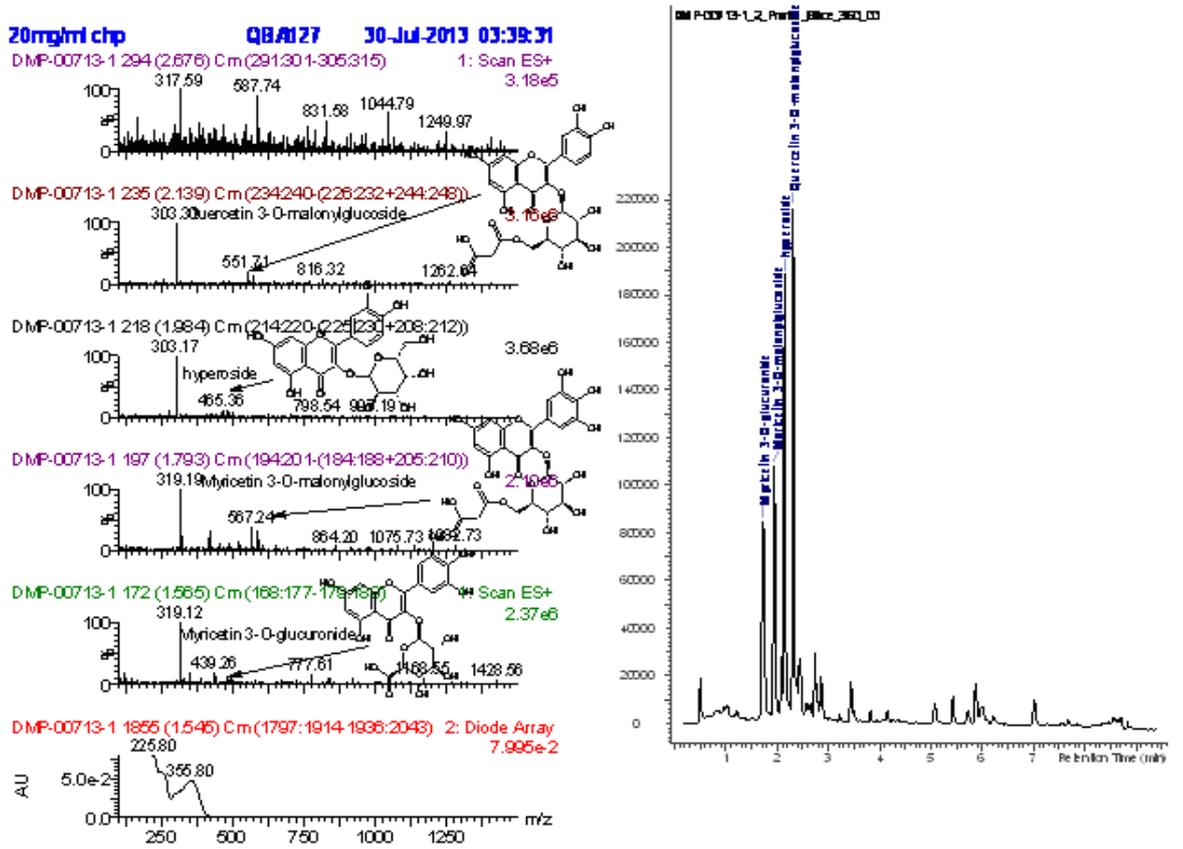


Рис. 29. ВЭЖХ флавоноидов в извлечении из почек черной смородины

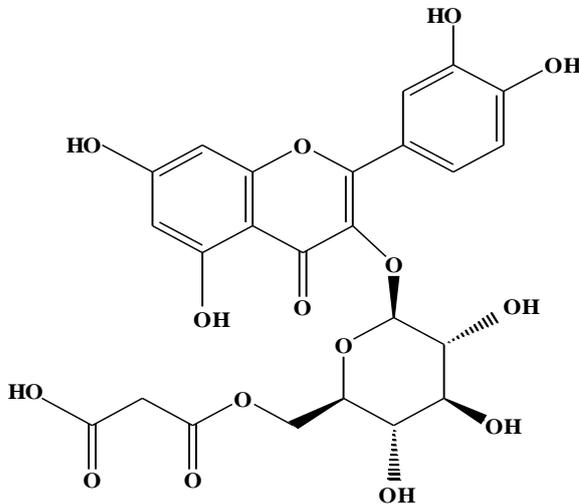


Рис. 30. Кверцетин-3-О-[6-О-малонил-β-D-глюкопиранозид] (I)

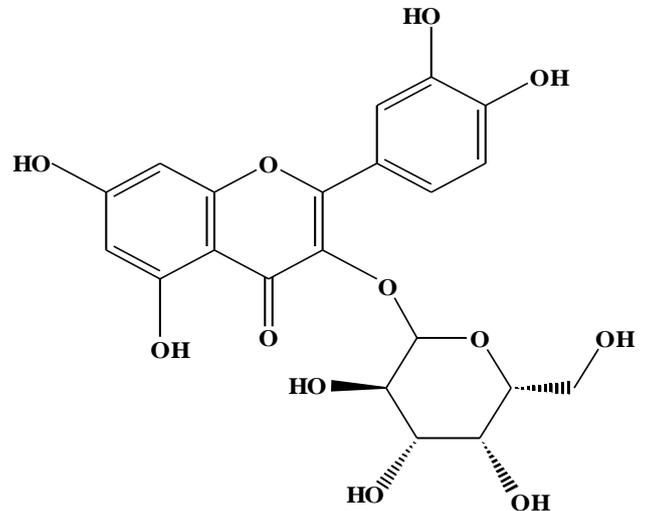


Рис. 31. Кверцетин-3-О-D-галактопиранозид (гиперозид) (II)

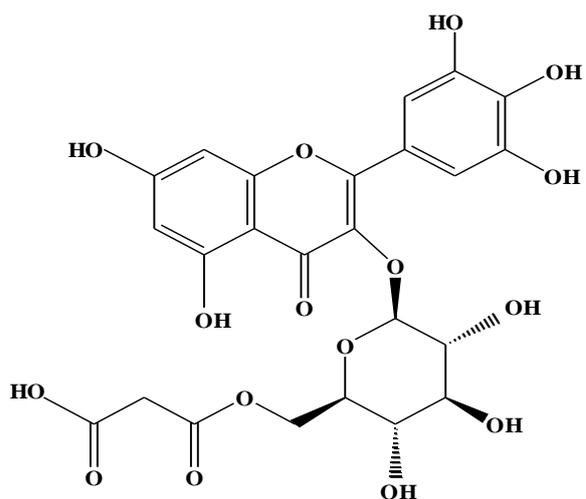


Рис. 32. Мирицетин-3-О-[6-О-малонил-β-D-глюкопиранозид]
(III)

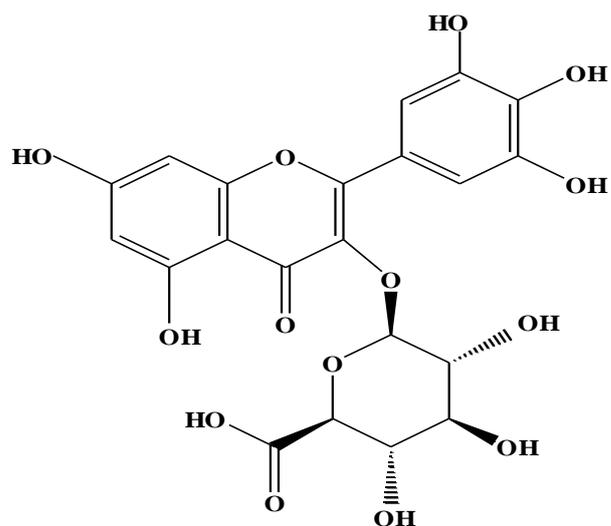


Рис. 33. Мирицетин-3-О-β-D-глюкуронид
(IV)

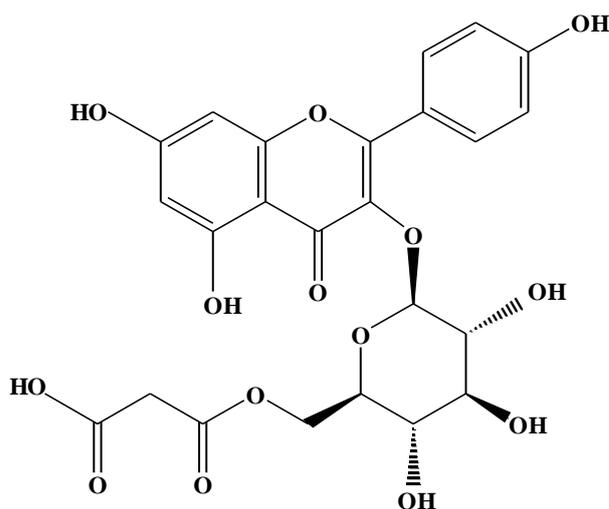


Рис. 34. Кемферол-3-О-[6-О-малониол-β-D-глюкопиранозид]
(V)

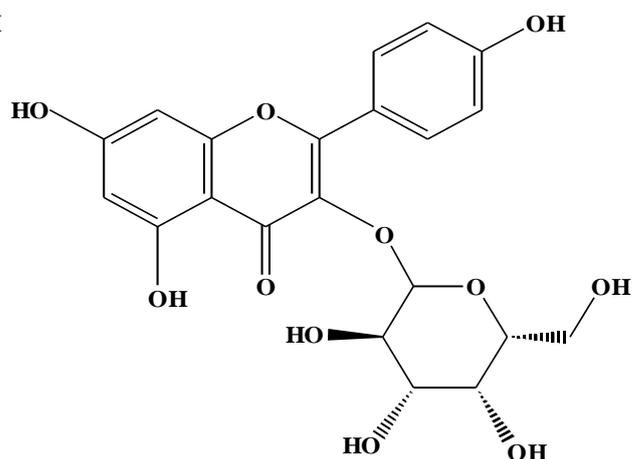


Рис. 35. Кемферол-3-О-D-галактопиранозид
(VI)

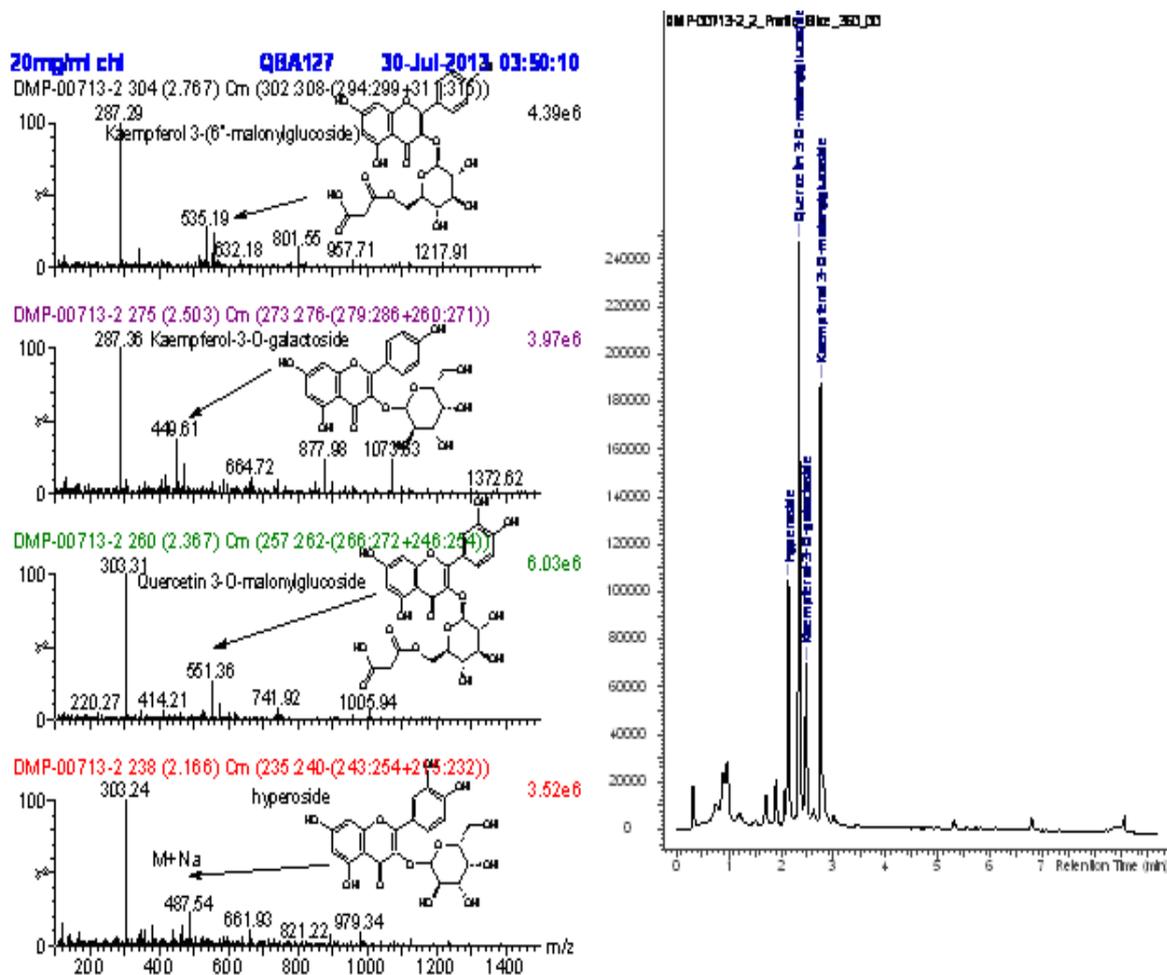


Рис. 36. ВЭЖХ флавоноидов в извлечении из листьев черной смородины

Таким образом, установлено, что почки и листья черной смородины имеют различный качественный состав флавоноидов, что должно учитываться при получении лекарственных препаратов из данных видов сырья.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Качественными реакциями и методом ТСХ установлено в почках и листьях черной смородины наличие углеводов (в том числе свободных и связанных сахаров при отсутствии полисахаридов), аминокислот, кумаринов, стероидов, тритерпеноидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, иридоидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты.

2. Изучен качественный и количественный состав углеводов в почках и листьях черной смородины. Методом ВЭЖХ установлено, что свободные сахара в почках и листьях черной смородины представлены глюкозой и фруктозой; содержание их в почках в 5 раз выше, чем в листьях. Связанные сахара в почках представлены арабинозой, глюкозой и галактозой, в листьях содержатся арабиноза, глюкоза, ксилоза и галактоза; методом капиллярного электрофореза установлено содержание связанных сахаров: в почках - 9,53%, в листьях - 5,53%.

3. Установлен качественный состав и оценено содержание аминокислот в почках и листьях черной смородины; в почках идентифицировано 19 аминокислот, в листьях – 18 аминокислот, причем состав аминокислот в почках и листьях одинаков, в листьях отсутствует аминокислота оксипролин. Установлено количественное содержание аминокислот в почках 12,20 %, в листьях 10,65%.

4. Разработана спектрофотометрическая методика определения суммы сапонинов в пересчете на эсцин в сырье. Установлено содержание сапонинов в почках смородины 2,01-2,92%; в листьях 2,81-3,39%. Проведена валидация методики.

5. Методом ВЭЖХ проведено сравнительное изучение содержания аскорбиновой кислоты в почках и листьях черной смородины. Установлены существенные колебания в содержании в различных образцах сырья. Содержание аскорбиновой кислоты в почках черной смородины колеблется от 22,5 до 71,2 мг/%; в листьях от 60,4 до 191,2 мг/%.

6. Установлен качественный состав и количественное содержание катехинов в сырье методом ВЭЖХ. В листьях и почках черной смородины идентифицированы: галловая кислота, эпигаллокатехин, катехин, эпикатехин, эпигаллокатехин галлат, эпикатехин галлат, в почках присутствует еще галлокатехин; содержание катехинов в почках черной смородины 0,234%, в листьях 0,097%.

7. Исследован компонентный состав эфирного масла почек черной смородины методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Содержание эфирного масла в почках черной смородины составляет 2,74 %. Определено 59 компонентов. Основными компонентами эфирного масла, содержание которых превышает 1 % являются 12 компонентов: сабинен карен, α – пинен, β – пинен, борнил – ацетат, лимонен, фелландрен, терпинолен, β – мерцен, оцимен, β – цитропеллол, τ – элемен.

8. Проведено сравнительное изучение флавоноидов почек и листьев черной смородины. Методом ВЭЖХ в почках установлено 4 флавоноида, из них 2 производных кверцетина и 2 производных мирицетина, в листьях черной смородины содержится 2 производных кверцетина и 2 производных кемпферола, производные кверцетина, выделенные из почек и листьев по химическому строению совпадают: кверцетин-3-О-[6-О-малонил- β -D-глюкопиранозид], кверцетин-3-О-D-галактопиранозид (гиперозид), мирицетин-3-О-[6-О-малоноил- β -D-глюкопиранозид], мирицетин-3-О- β -D-глюкуронид; кверцетин-3-О-[6-О-малонил- β -D-глюкопиранозид], кверцетин-3-О-D-галактопиранозид (гиперозид), кемферол-3-О-[6-О-малоноил- β -D-глюкопиранозид], кемферол-3-О-D-галактопиранозид.

Глава 5. РАЗРАБОТКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА СЫРЬЯ И НАСТОЕК ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ МАТРИЧНЫХ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

5.1. Стандартизация сырья и разработка проектов НД на свежие и высушенные листья смородины черной

5.1.1. Определение числовых показателей и подлинности

В качестве сырья для настойки гомеопатической матричной были использованы свежие и высушенные листья смородины черной. Исследования проводились по показателям, включенным в проекты ФС на сырье: «Внешние признаки», «Микроскопия», «Подлинность», «Числовые показатели», «Количественное определение», «Микробиологическая чистота», «Упаковка», «Тяжелые металлы», «Радиоактивность», «Остаточные количества пестицидов», «Упаковка, маркировка и транспортирование», «Хранение».

Микроскопический анализ проводили в соответствии с указанием статьи «Техника микробиологического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ XI, вып. 1, с. 277). Из аналитической пробы сырья готовили микропрепараты по методике приготовления микропрепаратов из цельного растительного сырья (ГФ XI, вып. 1, с. 278). Готовые препараты изучали под микроскопом МБИ – 3 (при увеличении на $\times 125$, $\times 200$) результаты фиксировали в виде микрофотографий. К разделу «Микроскопия» приложены фотографии микропрепаратов. Результаты исследования приведены в Главе 3.

Определение влажности сырья проводили по методике ГФ XI, вып. 1, с. 285. Для установления золы общей и золы нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной использовали методику ГФ XI, вып. 1, с. 24.

Содержание примесей в сырье определяли в соответствии с методикой ГФ XI, вып. 1, с. 276.

Полученные результаты представлены в табл. 16, 17.

Таблица 16

Содержание влажности, общей золы, золы нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной, органические и минеральные примеси в свежих листьях смородины черной

<i>Се- рия</i>	<i>Влаж- ность, %</i>	<i>Зола об- щая, %</i>	<i>Зола нераствори- мая в 10 % кислоте хлористоводород- ной, %</i>	<i>Органиче- ские приме- си, %</i>	<i>Минераль- ные приме- си, %</i>
1	65,00	3,21	0,19	0,31	0,40
2	67,42	4,51	0,04	0,27	0,34
3	68,26	2,43	0,04	0,33	0,29
4	63,71	4,56	0,13	0,41	0,35
5	65,00	4,23	0,04	0,29	0,38

Из табл. 16 видно, что норму влажности для свежих листьев можно установить не менее 60,0 %, зола не должна превышать 10 %, зола нерастворимая в 10 % раствора кислоты хлористоводородной – не более 0,5 %, органических примесей – не более 0,5 %, минеральных примесей – не более 0,5 %.

Таблица 17

Содержание влажности, общей золы, золы нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной, органические и минеральные примеси в высушенном сырье смородины черной

<i>Серия</i>	<i>Влажность, %</i>	<i>Зола общая, %</i>	<i>Зола нерастворимая в 10 % кислоте хло- ристоводородной, %</i>	<i>Органические примеси, %</i>	<i>Минеральные примеси, %</i>
1	9,10	8,34	0,1	0,31	0,40
2	10,04	13,6	0,54	0,27	0,34
3	14,10	11,74	0,42	0,33	0,29
4	12,52	11,05	0,20	0,41	0,35
5	11,73	11,91	0,11	0,29	0,38

На основании экспериментальных данных установлены нормы для высушенных листьев смородины черной: влажность - не более 15,0 %, зола не

должна превышать 14 %, зола нерастворимая в 10 % кислоте хлористоводородной - не более 1,0 %, органических примесей - не более 0,5 %, минеральных примесей – не более 0,5 %.

Флавоноиды являются одним из основных действующих веществ сырья смородины, в связи с этим целью данного исследования было: разработка методик качественного и количественного определения флавоноидов и установление их количественного содержания в листьях и почках черной смородины.

Для определения подлинности использовали общеизвестную качественную реакцию на наличие флавоноидов с порошком магния или цинка в присутствии хлористоводородной концентрированной кислоты и метод ТСХ.

Подлинность

Методика

Свежие листья смородины черной

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц 5 мм. Около 4,3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл 70 % этанола и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу прибавляют 40 мл 70 % этанола, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 70 % этанолом до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

Высушенные листья смородины черной

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц проходящих сквозь сито по ТУ 23.2.2068-89 с отверстиями диаметром 2 мм.

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл 70 % этанола и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45

мин. После охлаждения до комнатной температуры фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу с сырьем прибавляют 40 мл 70 % этанола, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 70 % этанолом до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

20 мл раствора А помещают в выпарительную чашку и упаривают на кипящей водяной бане до удаления запаха спирта. Остаток разбавляют водой до 30 мл, переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл н-бутанола и встряхивают в течение 10 мин. Водный (нижний) слой отбрасывают, бутанольное извлечение переносят в круглодонную колбу и упаривают на горячей водяной бане под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл 70 % этанола (раствор Б).

Приготовление раствора СО кверцетина

10 мг кверцетина растворяют в 20 мл этанола 96%.

1. К 0,5 мл раствора А прибавляют 0,1 г порошка магния или цинка и 0,2 мл кислоты хлористоводородной концентрированной постепенно образуется малиновое окрашивание (флавоноиды).

2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой основе размером 10×15 см наносят по 10 мкл СО кверцетина и 30 мкл раствора Б. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей н-бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40:10:20), хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 11-12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, опрыскивают 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме СО кверцетина должна обнаруживаться зона желто-зеленого цвета с R_f около 0,74.

На хроматограмме испытуемого раствора Б должны обнаруживаться зоны желто-зеленого цвета с R_s 1,0, 0,79, 0,64 и 0,51 (по кверцетину).

Хроматограмма представлена на рис. 37.

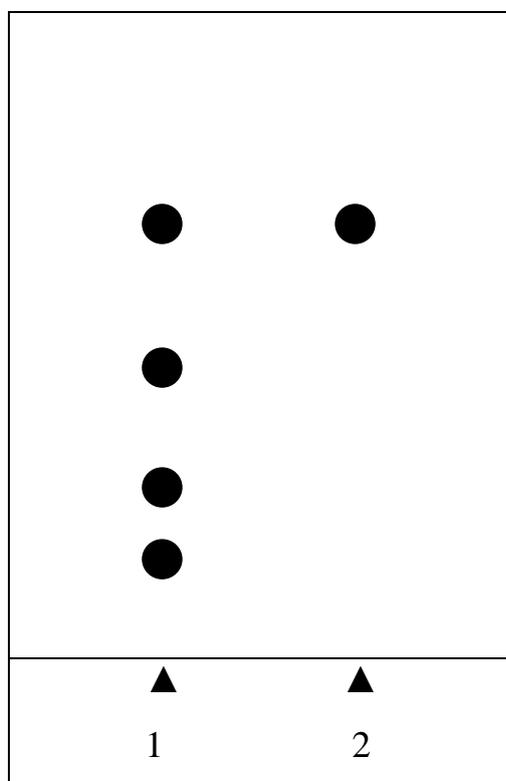


Рис. 37. ТСХ извлечения из листьев смородины черной

1 – извлечение из листьев черной смородины; 2 – 0,05 % раствор кверцетина в этаноле 96 %.

5.1.2. Количественное определение флавоноидов

Для количественного определения флавоноидов нами применен спектрофотокolorиметрический метод после проведения реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, который вызывает батохромный сдвиг 1 полосы поглощения флавоноидов с 330-350 нм до 390-412 нм.

Это позволяет применять в качестве контроля испытуемый раствор без реактива и тем самым исключить влияние окрашенных сопутствующих веществ. Для проведения более воспроизводимых результатов реакцию комплексообразования проводят в среде 55 – 60 % этанола.

В качестве стандартного вещества выбран рутин, дифференциальный спектр поглощения которого с алюминия хлоридом совпадает с дифференциальным спектром поглощения флавоноидов листьев черной смородины (рис. 38).

Оптимальными условиями экстракции являются: измельченность сырья 2 мм (для высушенного сырья) и 5 мм (для свежего сырья); экстрагент 70 % этанол; соотношение сырья и экстрагента 1:50 (для высушенного сырья) и 2:50 (для свежего сырья); извлечение на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин (первое извлечение) и 15 мин (второе извлечение).

Методика. 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты и объем раствора в колбе доводят 95 % этанолом до метки. Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служит раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты и доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл раствора РСО рутина, 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 уксусной кислоты, доведенный 95 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Примечание. 1. Приготовление раствора стандартного образца. Около 0,05 г (точная навеска) (ГФ Х, ст. 587) предварительно высушенного при $130 - 135$ °С в течение 3 часов, растворяют в 90 мл 95 % этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же этанолом до метки и перемешивают.

2. Приготовление 2 % спиртового раствора алюминия хлорида. 2 г алюминия хлорида (ГОСТ 13759-75) растворяют в 90 мл 95 % этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл. После растворения тем же этанолом доводят до метки.

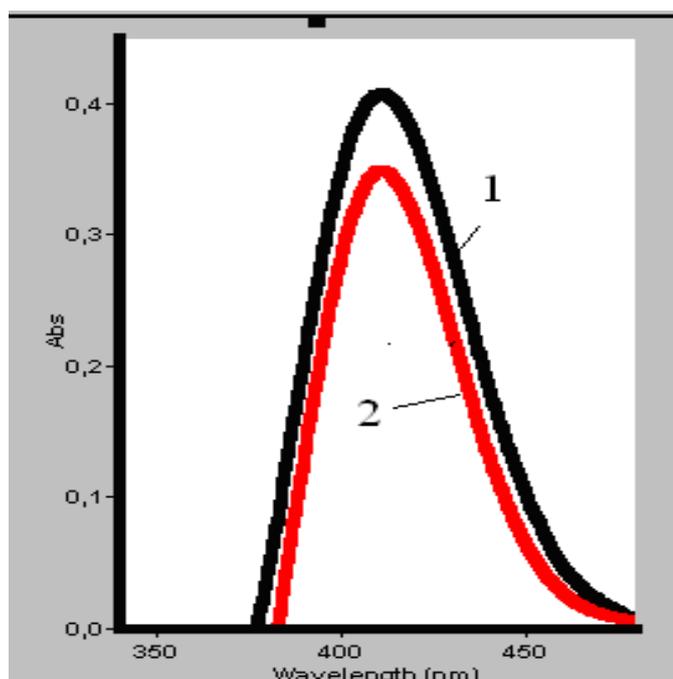


Рис 38. УФ – спектр поглощения продуктов реакции флавоноидов с алюминием хлоридом

1 - извлечение из листьев черной смородины; 2 – РСО рутина

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле (4):

$$X = \frac{D \times m \times 1 \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times 100 \times 25 \times a \times 2 \times (100 - W)} = \frac{D \times m \times 5000}{D \times a \times (100 - W)}, \quad (4)$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность РСО рутина;

m – масса рутина для приготовления РСО;

a – навеска сырья, граммы;

W – потеря в массе при высушивании, проценты.

Был построен калибровочный график продуктов реакции рутина с алюминием хлоридом. Установлено, что калибровочная кривая зависимости между оптической плотностью и концентрацией рутина носит линейный характер в пределах концентраций от 0,0002 до 0,0020 %. Чувствительность определения 0,002 мг/мл рутина. Методика была апробирована с целью изучения её воспроизводимости и точности. Полученные результаты представлены в табл. 18.

Таблица 18

Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в свежих листьях смородины

f	X, г	S _x -	P, %	T (p,f)	Δ _x -	A ± %
7	1,94	0,033	95	2,36	0,078	± 4,01

Ошибка единичного определения при доверительной вероятности 0,95 составляет ± 4,01 %. Отсутствие систематической ошибки доказано проведением опытов с использованием метода добавок рутина (табл. 19).

Таблица 19

Результаты количественного определения флавоноидов в свежих листьях смородины черной с использованием метода добавок рутина

№/№ серии	Найдено флавоноидов, г/100г	Добавлено рутина, г	Должно быть в сумме флавоноидов и рутина, г/100г	Найдено в сумме флавоноидов и рутина, г/100г	Относительная ошибка, %
1	1,71	0,43	2,14	2,11	- 1,4
2	1,46	0,73	2,19	2,24	+ 2,3
3	1,94	0,97	2,97	2,93	- 1,4
4	1,36	1,02	2,38	2,34	- 1,7
5	1,70	0,43	2,13	2,19	+ 2,8

Для установления границ содержания флавоноидов с помощью разработанной методики были проанализированы свежие и высушенные листья черной смородины. Результаты представлены в табл. 20 и 21.

Таблица 20

**Количественное содержание флавоноидов
в свежих листьях смородины черной**

<i>Номер образца</i>	<i>Содержание флавоноидов, %</i>
1	1,71
2	1,46
3	1,94
4	1,36
5	1,70

Содержание флавоноидов колеблется от 1,36 до 1,94 %. На основании полученных результатов рекомендовано установить границу содержания суммы флавоноидов в свежих листьях смородины в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье не менее 1 %.

Для установления границ содержания флавоноидов с помощью разработанной методики были проанализированы высушенные листья черной смородины. Установлено, что содержание флавоноидов колеблется от 1,29 до 1,84 %.

Таблица 21

**Содержание суммы флавоноидов в высушенных листьях
черной смородины**

<i>Номер образца</i>	<i>Содержание флавоноидов, %</i>
1	1,29
2	1,63
3	1,68
4	1,39
5	1,84

На основании полученных данных рекомендуется норма содержания суммы флавоноидов в высушенных листьях черной смородины не менее 1,0 %.

5.1.3. Установление сроков годности сырья

Свежие листья смородины черной

Контроль за микробиологической чистотой должен осуществляться в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ. Учитывая, что сырье подвергается немедленной переработке, считаем необходимым дополнить этот раздел предложением «определение микробиологической чистоты должно осуществляться по специальному требованию потребителя», поскольку анализ достаточно длительный.

Упаковку сырья рекомендуется производить в ящики с отверстиями в боковых стенках и крышках, по 0,5 кг нетто.

Транспортирование. Свежесобранное сырье следует отправлять для переработки немедленно после сбора любым видом транспорта.

Условия хранения. Сырье подлежит переработке в течение 24 часов с момента сбора.

Срок годности. В гомеопатии срок хранения сырья, как правило, составляет не более 24 часов, поэтому мы провели контроль качества исследуемого сырья в течение суток. Результаты представлены в табл. 22.

Таблица 22

Результаты анализа свежесобранного сырья листьев смородины черной в процессе хранения

<i>Время до переработки ЛРС, часы</i>	<i>Внешние признаки</i>	<i>Микроскопия, реакции, ТСХ</i>	<i>Влажность, %</i>	<i>Остальные числовые показатели</i>
0	соответствует	соответствует	65,71	соответствует
6	соответствует	соответствует	65,62	соответствует
12	соответствует	соответствует	65,61	соответствует
18	соответствует	соответствует	65,17	соответствует
24	соответствует	соответствует	64,91	соответствует

Из данных табл. 22 видно, что с момента сбора изменилась только влажность после 18 часов хранения. Влажность изменилась с 65,71 % до

65,17 %. Остальные характеристики: внешние признаки, подлинность и другие показатели качества сырья в процессе хранения сырья в течение 24 часов практически не изменилась.

Высушенные листья смородины черной

Результаты по изучению срока годности высушенного сырья представлены в табл. 23. На основе полученных данных установлено, что в течение 2 лет сырье отвечает всем требованиям ФС.

Таблица 23

Показатели качества высушенных листьев черной смородины в процессе хранения

<i>Наименование показателей качества и допустимые отклонения</i>	<i>№ образца</i>	<i>Срок хранения</i>			
		<i>Исходные данные</i>	<i>Через 1 год</i>	<i>Через 2 года</i>	<i>Через 2 года 6 месяцев</i>
1	2	3	4	5	6
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, не менее 1,0 %.	1	1,68	1,59	1,47	1,37
	2	1,37	1,33	1,24	1,17
	3	1,72	1,65	1,51	1,49
	4	1,29	1,21	1,14	1,11
	5	1,49	1,42	1,39	1,27
Влажность, не более 15 %	1	12,44	12,41	12,39	12,35
	2	13,07	13,00	12,81	12,48
	3	12,57	12,54	12,40	12,45
	4	14,10	14,01	13,97	13,54
	5	11,77	11,71	11,69	11,55
Зола общая, не более 14,0 %	1	12,34	12,30	12,31	12,27
	2	12,44	12,42	12,41	12,39
	3	11,76	11,74	11,75	11,69
	4	12,99	12,95	12,93	12,91
	5	13,11	13,10	13,11	13,09
Зола не растворимая в 10 % кислоте хлористоводородной, не более 1,0 %	1	0,11	0,10	0,12	0,13
	2	0,54	0,55	0,53	0,52
	3	0,42	0,43	0,42	0,44
	4	0,20	0,21	0,19	0,21
	5	0,10	0,12	0,11	0,13

1	2	3	4	5	6
Органические при- меси, не более 0,5 %	1	0,36	0,37	0,35	0,37
	2	0,41	0,40	0,42	0,43
	3	0,38	0,36	0,38	0,37
	4	0,33	0,35	0,32	0,31
	5	0,37	0,35	0,35	0,36
Минеральные при- меси, не более 0,5 %	1	0,34	0,33	0,32	0,33
	2	0,27	0,26	0,27	0,29
	3	0,38	0,37	0,38	0,36
	4	0,40	0,39	0,37	0,39
	5	0,31	0,30	0,29	0,31
Микробиологическая чистота, ОФС 42–0016-04 (категория 4 А).	1	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
	2	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
	3	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
	4	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
	5	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.

Полученные результаты использованы при разработке проектов ФС на свежее и высушенное сырье черной смородины.

5.2. Получение и стандартизация настоек гомеопатических матричных из свежих и высушенных листьев смородины черной

Сырьем для получения настоек служили свежие и высушенные листья смородины черной (*Ribes nigrum* L.), заготовленные в 2011-2012 гг.

5.2.1. Технология приготовления НГМ из свежих листьев смородины черной

Сырьем для получения настойки гомеопатической матричной служат свежие листья черной смородины, собранные в июле-августе.

Настойку листьев черной смородины гомеопатическую матричную готовили из свежего сырья методом мацерации по методу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные» с использованием 86 % (по массе) этанолом. Данный метод применяется для свежего сырья, содержащего эфирные масла.

Лекарственное растительное сырье взвешивали, определяли влажность, тщательно измельчали и массу немедленно заливали не менее, чем половинным от массы ЛРС количеством спирта этилового 86 % (по массе), перемешивали и оставляли для мацерации в хорошо закрытом сосуде при температуре не выше 20 °С.

Расчет количества экстрагента определяли по влажности свежего растительного сырья.

По формуле (5) рассчитывали необходимое для растительной массы количество спирта этилового 86 % (по массе) в килограммах (E).

$$E = \frac{2 \cdot m \cdot W}{100}, (5)$$

где: m - масса растительного сырья, в килограммах;

W - влажность сырья, в процентах.

От рассчитанного количества спирта этилового 86 % (E) вычитали количество ранее прибавленного спирта, и остаток спирта смешивали с полученной массой. Массу оставляли не менее чем на 10 дней при температуре

не выше 20°C при периодическом встряхивании, затем отжимаюли и фильтровали.

Если содержание сухого остатка или количественное содержание превышают нормируемое частной нормативной документацией, проводят разбавление настойки, используя спирт этиловый 62 % (по массе). Количество спирта этилового 62 % (по массе) (E_1) в килограммах, необходимое для разбавления, вычисляют по формуле (6):

$$E_1 = \frac{M \cdot (B_x - B_o)}{B_o} \quad (6),$$

где: M - масса фильтрата, в килограммах;

B_x - содержание сухого остатка или количественное содержание действующих веществ в фильтрате, в процентах;

B_o - содержание сухого остатка или количественное содержание действующих веществ, нормируемые частной нормативной документацией, в процентах.

После добавления спирта этилового настойку отстаивают не менее 5 дней при температуре не выше 20°C, после чего при необходимости фильтруют.

Содержание спирта в настойке, полученной по методу 3, составляет около 60 % (по массе).

Таблица 24

Расчетное соотношение масс сырья и экстрагента для получения настоек гомеопатических матричных из свежих листьев смородины черной

<i>Образец сырья</i>	<i>Масса сырья, кг</i>	<i>Масса экстрагента (спирта этилового 86%), кг</i>
1	0,500	0,657
2	0,500	0,656
3	0,500	0,656
4	0,500	0,652
5	0,500	0,649

Настойки гомеопатические фильтровали через фильтровальный складчатый картон. Затем проводили изучение показателей качества полученных настоек.

5.2.2. Технология приготовления НГМ из высушенных листьев смородины черной

Получение настойки гомеопатической матричной из высушенных листьев осуществляют по методу 4а (метод перколяции) ОФС «Настойки гомеопатические матричные и жидкие разведения» [52].

Методика. Одну часть высушенных и измельченных листьев смородины черной (размер частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 5 мм) заливают 5 частями спирта этилового 62% (по массе) и настаивают в течение 2 суток при частом взбалтывании. Подготовленное сырье достаточно плотно укладывают в перколятор. Затем, при открытом спускном кране, добавляют такое количество спирта этилового той же концентрации, чтобы слой его над поверхностью сырья составлял 1-3 см (вытекающую из крана жидкость наливают обратно в перколятор). После этого перколят с определенной скоростью (скорость вытекания извлечения из перколятора при загрузке сырья: до 1 кг: 10-15 капель в мин.) выпускают из крана, непрерывно доливая в перколятор такое количество спирта этилового, чтобы на 1 часть сырья приходилось 10 частей спирта, и над сырьем был его постоянный слой. Процесс перколяции продолжают до получения 10 частей извлечения, которое отстаивают в течение 8 суток и фильтруют. Затем взвешивают фильтрат и определяют в нем содержание сухого остатка или количественное содержание действующих веществ.

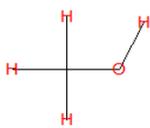
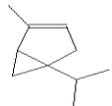
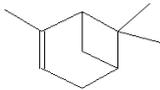
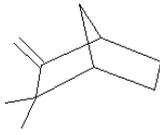
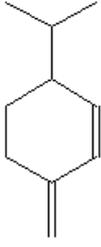
Если содержание сухого остатка или количественное содержание превышают нормируемое частной нормативной документацией, проводят разбавление настойки способом, указанным для настойки из свежих листьев, используя спирт этиловый 62% (по массе).

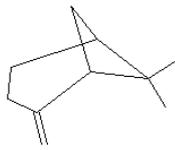
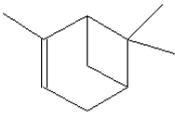
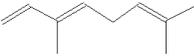
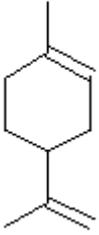
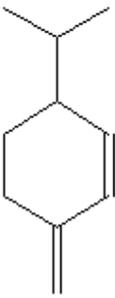
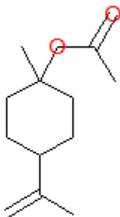
5.2.3. Исследование эфирного масла в НГМ

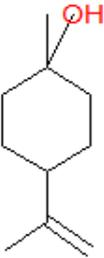
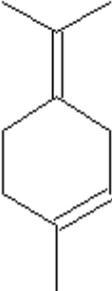
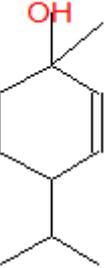
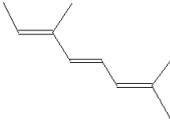
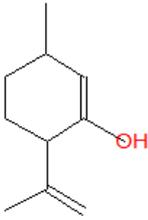
С помощью методов хромато-масс-спектрометрии определяли в НГМ эфирное масло. В настойке из высушенных листьев смородины черной не удалось установить эфирное масло. В НГМ из свежих листьев определено не только наличие эфирного масла, но и установлен компонентный состав. Результаты представлены в таблице 25.

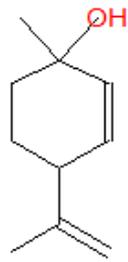
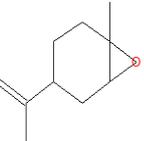
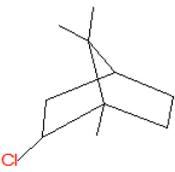
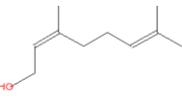
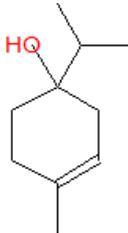
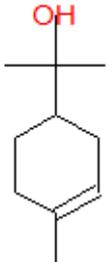
Таблица 25

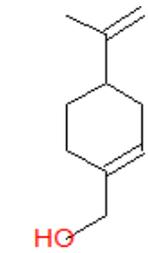
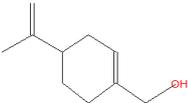
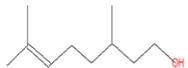
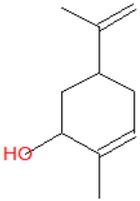
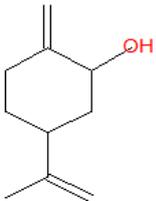
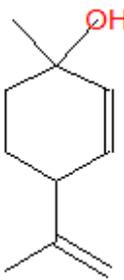
Хромато-масс-спектрометрическое исследование настойки матричной гомеопатической из свежих листьев смородины черной

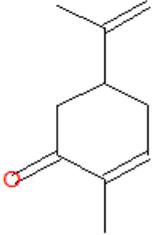
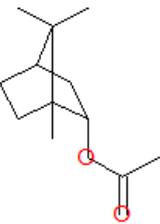
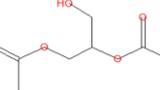
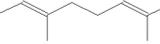
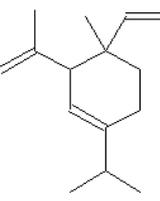
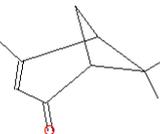
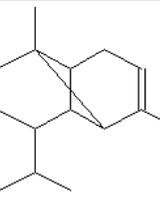
№	Название	Формула	Rt	Индекс Ковача	S	%	Основные пики
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Метиловый спирт CH ₄ O		6.477	315	29798 12	1,05	31 999 29 719 32 670 15 415 28 122 14 99 30 88 13 55 12 30 2 24
2	Бицикло[3.1.0]]-гекс-2-ен, 2-метил-5-(1-метилэтил) C ₁₀ H ₁₆		23.617	902	11922 51	0,42	93 999 91 349 77 342 92 308 39 99 79 99 94
3	1R-α-пинен C ₁₀ H ₁₆		24.089	948	19916 525	7,03	93 999 91 454 92 440 77 358
4	Камфен C ₁₀ H ₁₆		24.790	943	26542 53	0,94	93 999 121 582 79 399 91 373 39 335 41 317 67 294 77 280 107 259 27 197
5	α-фелландрен C ₁₀ H ₁₆		25.491	964	47017 63	1,66	93 999 77 274 91 247 136 177 79 168 94 151 41 110 80 89 92 83 39 80

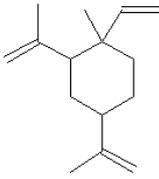
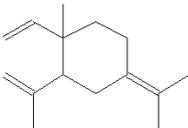
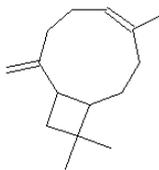
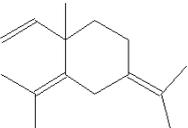
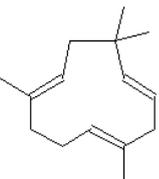
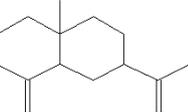
1	2	3	4	5	6	7	8
6	α -пинен $C_{10}H_{16}$		25.689	943	10481 990	3,70	93 999 41 609 69 350 39 318 77 275 79 274 27 214 92 152 53 134
7	1R- α -пинен $C_{10}H_{16}$		26.898	948	98877 27	3,49	93 999 91 454 92 440 77 358 79 270 53 135 105 118 121 115
8	3,6- октатриен, 3,7-диметил- (E) $C_{10}H_{16}$		27.339	976	79181 51	2,80	93 999 91 449 92 395 79 370 41 264 39 191 53 171 105 159 80 158
9	Лимонен $C_{10}H_{16}$		27.631	1018	15317 0387	54,07	68 999 67 637 93 603 39 578 53 414 79 407 27 397 94 278
10	α - Фелландрен $C_{10}H_{16}$		27.721	964	20895 695	7,38	93 999 77 274 91 247 136 177 79 168 94 151 41 110 80 89 92 83 39 80
11	Циклогесано л, 1-метил-4- (1- метилэтил)-, ацетат $C_{12}H_{20}O_2$		28.467	1348	41608 6	0,15	68 999 93 670 67 460 41 360 39 330 121 300 79 280 27 240 53 240

1	2	3	4	5	6	7	8
12	Терпинеол, цис- α - $C_{10}H_{18}O$		28.889	1158	85699 8	0,30	43 999 71 534 41 500 55 335 69 240 81 230 111 183 79 171
13	Циклогесен, 1-метил-4-(1- метилэтилиде н)- $C_{10}H_{16}$		29.586	1052	55898 50	1,97	93 999 121 783 91 617 136 614 79 457 77 428 105 260 39 253 41 240 107 165
14	2- Циклогесен - 1-ол, 1- метил-4-(1- метилэтил)-, цис- $C_{10}H_{18}O$		30.018	1109	18325 8	0,06	43 999 93 837 139 703 69 410
15	Оцимен $C_{10}H_{16}$		30.557	993	14548 5	0,05	93 999 121 670 79 490 91 420 41 400 77 360 80 330 136 330 105 320 92 220
16	транс-р- мента-2,8- диенол $C_{10}H_{16}O$		30.728	1120	65254 5	0,23	94 999 43 873 109 862 79 809

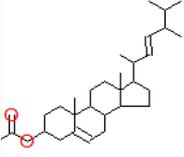
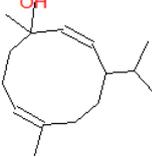
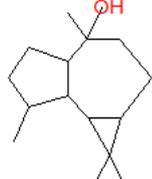
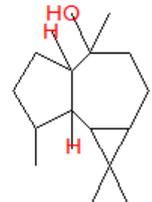
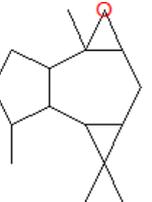
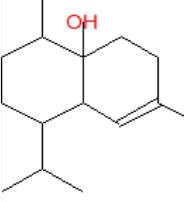
1	2	3	4	5	6	7	8
17	цис-р-мента- 2,8-диен-1-ол $C_{10}H_{16}O$		31.204	1140	63594 4	0,22	134 999 109 833 43 780 79 673 137 658 41 358 119 340 95 327 91 306 93 302
18	7- октабицикло[4.1.0]гептан, 1-метил-4-(1- метилэтил)- $C_{10}H_{16}O$		31.326	1031	22259 7	0,08	43 999 67 689 41 518 94 471 79 398 108 371 81 345 109 300 39 270
19	Борнилхлори д $C_{10}H_{17}Cl$		31.501	1116	30782 0	0,11	95 999 93 474 121 283 136 270 41 267 67 249 79 237 91 211 77 211 81 209
20	2,6- Октадиен-1- ол, 3,7- диметил-, (Z)- $C_{10}H_{18}O$		31.721	1228	15024 2	0,05	69 999 93 960 41 942 68 525 91 417 39 380 79 363 77 317
21	3- Циклогесен- 1-ол, 4- метил-1-(1- метилэтил)- $C_{10}H_{18}O$		32.782	1137	16057 47	0,57	71 999 43 544 93 505 111 494
22	3- Циклогесен- 1-метанол, α,α -4- триметил- $C_{10}H_{18}O$		33.110	1143	11572 61	0,41	59 999 93 909 121 555 136 438 67 417 81 408 43 357 68 352 79 337 91 309

1	2	3	4	5	6	7	8
23	1-Циклогесен-1-метанол, 4-(1-метилэтил)- $C_{10}H_{16}O$		33.357	1261	156240	0,06	68 999 79 925 67 765 41 729 91 566 39 558 121 477 55 463
24	(S)-(-)-(4-Изопропенил-1-циклогексил)метанол $C_{10}H_{16}O$		33.447	1261	478106	0,17	68 999 79 991 121 873 93 806 91 480 41 472 55 470 119 367
25	6-Октен-1-ол, 3,7-диметил-, (R)- $C_{10}H_{20}O$		33.641	1179	4331639	1,53	69 999 41 852 67 515 55 445 82 369 95 358 71 278 68 252 56 230
26	2-Циклогесен-1-ол, 2-метил-5-(1-метилэтил)-, цис- $C_{10}H_{16}O$		33.910	1206	958218	0,34	109 999 84 541 55 362 41 326 91 246 39 235 69 226 43 193
27	Циклогексанол, 2-метилен-5-(1-метилэтенил)- $C_{10}H_{16}O$		34.292	1201	565287	0,20	109 999 41 942 134 824 79 711 119 616 67 500 55 499 69 470
28	Цис-р-мента-2,8-диен-1-ол $C_{10}H_{16}O$		34.567	1140	288538	0,10	91 999 134 919 43 844 119 820 79 761 41 632 39 592 77 453 93 421 137 415

1	2	3	4	5	6	7	8
29	2-Циклогексен-1-он, 2-метил-5-(1-метилэтенил)-, (S)- C ₁₀ H ₁₄ O		34.859	1190	10823 03	0,38	82 999 54 457 39 318 93 312
30	Уксусной кислоты, 1,7,7-триметил-бицикло[2.2.1]гепт-2-ил эфир C ₁₂ H ₂₀ O ₂		36.099	1277	79700 22	2,81	95 999 43 895 93 464 121 393 41 363 136 360 55 202 108 174 69 157 80 154
31	(Гидроксиметил)этилен ацетат C ₇ H ₁₂ O ₅		36.765	1230	30163 6	0,11	43 999 103 132 119 58 145 55
32	2,6-Октадиен, 2,6-диметил- C ₁₀ H ₁₈		37.277	985	79282 7	0,28	43 999 69 790 41 782 81 761 82 568 67 519 55 473 123 447 68 342
33	Циклогексен, 4-этил-4-метил-3-(1-метилэтенил)-1-(1-метилэтил)-, (3R-транс)- C ₁₅ H ₂₄		37.718	1377	61799 2	0,22	121 999 93 914 41 657 136 493 91 425 77 364 79 297 43 292 161 282 105 252
34	D-Вербенон C ₁₀ H ₁₄ O		38.014	1119	16124 2	0,06	107 999 91 874 39 731 135 690 41 652 80 577 150 559 27 523 79 486 55 321
35	Копаен C ₁₅ H ₂₄		39.107	1221	24103 9	0,09	119 999 105 965 161 939 93 652 41 605 91 499 92 297 81 262 55 249 77 231

1	2	3	4	5	6	7	8
36	Циклогексан, 1-этенил-1- метил-2,4- бис(1- метилэтенил) -, [1S- (1a,2a,4a)]- C ₁₅ H ₂₄		39.340	1398	17656 27	0,62	81 999 93 870 68 744 41 582
37	с-Элемен C ₁₅ H ₂₄		40.482	1431	47789 16	1,69	121 999 93 693 41 635 107 453 67 343 55 339 105 302 53 301 91 287 81 284
38	Кариофиллен C ₁₅ H ₂₄		40.621	1494	14962 29	0,53	93 999 133 921 91 858 41 769 79 763 69 754 105 623 107 483 120 447 77 439
39	с-Элемен C ₁₅ H ₂₄		40.954	1465	37366 6	0,13	41 999 121 951 93 825 39 594 67 578 91 530 107 487 53 484 105 459 79 423
40	α- Кариофиллен C ₁₅ H ₂₄		41.570	1579	20102 56	0,71	93 999 41 517 80 394 121 249 91 247 79 238 67 222 53 221 77 219 92 217
41	Эудесма- 4(14),11-диен C ₁₅ H ₂₄		42.464	1469 iu	11239 73	0,40	93 999 105 938 41 915 107 894 81 864 79 749 121 628 91 608 67 607 55 570

1	2	3	4	5	6	7	8
42	Нафтаген, 1,2,3,4,4 $\alpha,5,6,8 \alpha$ - октагидро-4 $\alpha,8$ -диметил- 2-(1- метилэтенил) -, [2R-(2 $\alpha,4 \alpha$ $\alpha,8 \alpha \alpha$)]- C ₁₅ H ₂₄		42.626	1474	13297 25	0,47	189 999 204 761 93 746 81 641 41 635 107 635 105 495 133 480 55 459 91 451
43	Нафтаген, 1,2,3,5,6,8а- гексагидро- 4,7-диметил- 1-(1- метилэтил)-, (1S-цис)- C ₁₅ H ₂₄		42.950	1469	23083 77	0,81	161 999 119 899 105 762 41 754 91 709 134 617 204 399 81 370 77 352 93 324
44	Кубенол C ₁₅ H ₂₆ O		43.390	1580	13154 6	0,05	119 999 41 937 43 919 161 909 93 634 59 614 105 586 55 528 81 485 79 420
45	1Н- Циклопроп[е] азулен, 1а,2,3,5,6,7,7а ,7b- октагидро- 1,1,4,7- тетраметил-, [1 α R-(1 $\alpha \alpha,7$ $\alpha,7 \alpha \alpha,7\beta$ α)]C ₁₅ H ₂₄		43.714	1419	90051 6	0,32	107 999 41 966 105 938 93 872 161 727 135 585 119 572 79 565 81 564
46	Нафтаген, 1,2,3,4,4 $\alpha,5,6,8 \alpha$ - октагидро-4 $\alpha,8$ -диметил- 2-(1- метилэтилид) -, (4 α R- транс)- C ₁₅ H ₂₄		43.903	1507	65113 1	0,30	161 999 122 618 107 613 204 447 105 442 91 410 93 364 133 297 119 293 189 289

1	2	3	4	5	6	7	8
47	Эргоста-5,22-диен-3-ол, ацетат, (3 α ,22E)- C ₃₀ H ₄₈ O ₂		44.217	2779	87660	0,03	43 999 41 996 55 676 44 387 69 351 91 339 39 321 81 316 79 292
48	1-Гидрокси-1,7-диметил-4-изопропил-2,7-циклодекадиен C ₁₅ H ₂₆ O		44.739	1660	10107 93	0,36	81 999 43 766 41 394 123 207 80 196 55 194 161 189 105 172 79 168 67 166
49	1H-Циклопроп[е]азулен-4-ол, декагидро-1,1,4,7-тетраметил-, [1 α -(1 $\alpha\alpha$,4 α ,4 $\alpha\alpha$,7 α ,7 $\alpha\alpha$,7 $\beta\alpha$)]- C ₁₅ H ₂₆ O		45.076	1530	74777 1	0,26	43 999 41 684 107 389 67 356 55 329 109 323 69 313 93 300 79 278
50	Эпиглобулол C ₁₅ H ₂₆ O		45.229	1530	70209 6	0,25	43 999 41 687 82 598 69 523
51	Изоаромадендрен эпоксид C ₁₅ H ₂₄ O		45.427	1281	12076 3	0,04	41 999 43 667 55 505 93 428 81 396 107 383 29 367 39 357 67 344
52	Кубенол C ₁₅ H ₂₆ O		45.764	1580	53198	0,02	119 999 41 937 43 919 161 909 93 634 59 614 105 586 55 528 81 485 79 420

5.2.4. Установление показателей качества настоек гомеопатических матричных

Методики оценки качества настоек гомеопатических матричных из свежих и высушенных листьев смородины черной гармонизированы с методиками, разработанными для сырья.

Для определения подлинности настоек гомеопатических матричных из свежих и высушенных листьев черной смородины, исходя из компонентного состава, исследованы качественные реакции с порошком магния в присутствии кислоты хлористоводородной (флавоноиды), с раствором железа окисного хлорида (фенольные соединения), с кислотой серной концентрированной (сапонины), с реактивом Фелинга (углеводы), также методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ).

В проект нормативной документации для определения подлинности НГМ включена качественная реакция на флавоноиды с порошком магния и кислотой хлористоводородной концентрированной и метод хроматографии в тонком слое сорбента. В качестве сорбента использовали «Сорбфил». Система растворителей: н-бутанол – кислота уксусная – вода (4:1:2). Для обнаружения зон адсорбции на хроматограмме использовали 2 % спиртовой раствор алюминия хлорида.

Определение содержания тяжелых металлов осуществляли в соответствии с требованиями ГФ XII, ч. 1, с. 121, ОФС 42 – 0059 – 07.

Определение сухого остатка устанавливали в соответствии с требованиями ГФ XII, ч. 2, с. 149.

Плотность определяли в соответствии с требованиями ГФ XII, ч. 1, с. 38, ОФС 42 – 0037 – 07.

Определение микробиологической чистоты проводили в соответствии с требованиями ГФ XII, ч. 1, с. 160, ОФС 42 – 0067 – 07.

Для количественного определения в качестве стандарта использовали рутин. При снятии спектров поглощения РСО рутин и настойки из листьев смородины показано, что спектры поглощения продуктов реакции рутина и настойки с алюминия хлоридом совпадают и находятся при длине волны 409 ± 2 нм (рис. 39).

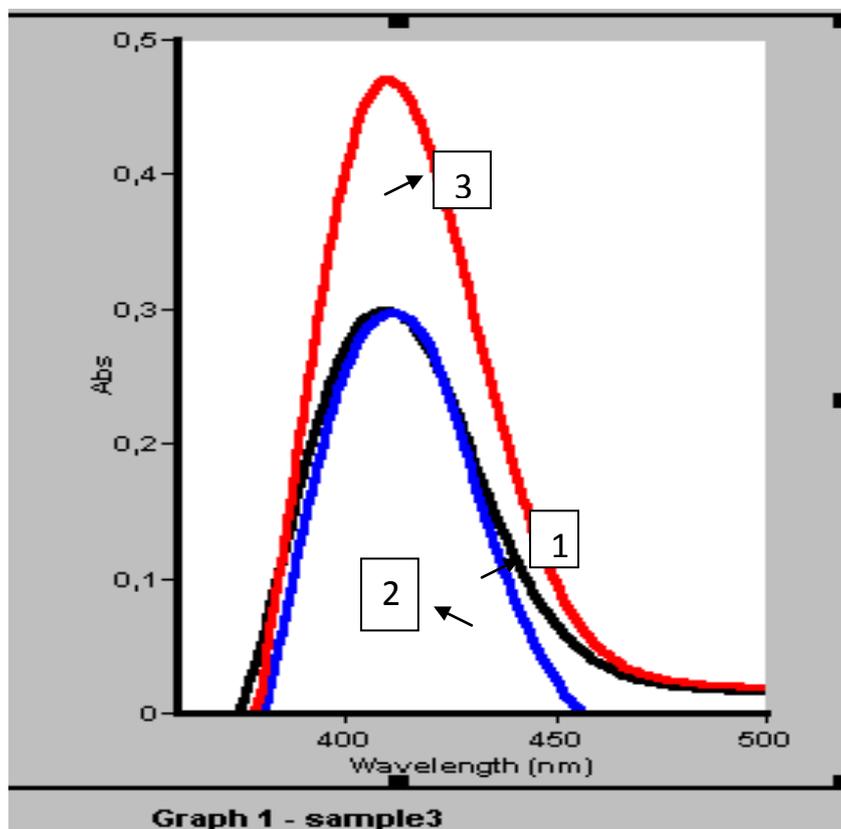


Рис. 39. Спектры поглощения продуктов реакции флавоноидов с алюминия хлоридом: 1. НГМ из высушенных листьев; 2. НГМ из свежих листьев; 3. раствор рутина в 95 % этаноле.

Методика была апробирована с целью изучения её воспроизводимости и точности. Полученные результаты представлены в табл. 26.

Отсутствие систематической ошибки доказано проведением опытов с использованием метода добавок (табл. 27).

При анализе НГМ из свежих листьев установлено, что содержание флавоноидов колеблется от 0,190 до 0,256 %. На основании полученных данных рекомендовано установить норму содержания флавоноидов в НГМ из свежих листьев смородины черной не менее 0,1 %.

Таблица 26

**Метрологические характеристики методики
определения флавоноидов в НГМ из свежих листьев**

f	\bar{X} , мг/100 мл	S_{x-}	P, %	T (p,f)	Δ_{x-}	A \pm %
<i>НГМ из свежих листьев</i>						
7	190	3,320	95	2,26	7,232	3,81
<i>НГМ из высушенных листьев</i>						
7	75	1,258	95	2,26	2,843	3,79

Ошибка единичного определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает 4 %.

Таблица 27

**Результаты определения флавоноидов в НГМ из свежих листьев
с использованием метода добавок**

Се- рия	Найдено флавонои- дов мг/100 мл	Добав- лено ру- тина, мг	Долж- но быть в сумме мг/100 мл	Найде- но в сумме	Относитель- ная ошибка
<i>НГМ из свежих листьев</i>					
1	190	143	333	339	+ 1,8
2	256	64	320	311	- 2,2
3	200	100	300	289	- 3,7
<i>НГМ из высушенных листьев</i>					
1	75	56,25	131,25	129,25	- 1,9
2	103	25,75	128,75	125,50	- 2,5
3	72	36,00	108,20	112,00	+ 3,6

Проведена стандартизация НГМ из высушенных и свежих листьев черной смородины по показателям: сухой остаток, плотность, содержание спирта и сумма флавоноидов в пересчете на рутин. Результаты анализа аллопатической и гомеопатической настойки представлены в табл.28.

**Результаты анализа НГМ из свежих и высушенных листьев
смородины черной**

<i>Показатели качества</i>	<i>НГМ из высушенных листьев</i>			<i>НГМ из свежих листьев</i>		
	<i>Сер. 1</i>	<i>Сер. 2</i>	<i>Сер. 3</i>	<i>Сер. 1</i>	<i>Сер. 2</i>	<i>Сер. 3</i>
Сухой остаток	1,44	1,40	1,44	3,04	3,00	3,60
Плотность	0,883	0,888	0,895	0,902	0,900	0,888
Содержание спирта	63,5	61,3	58,3	59,2	57,1	58,3
Содержание флавоноидов, %	0,075	0,103	0,072	0,217	0,190	0,200

Сухой остаток значительно выше в настойке из свежих листьев. Содержание флавоноидов в настойках отличается значительно. В НГМ из высушенных листьев содержание флавоноидов колеблется от 0,072 до 0,103 %, в настойке из свежих листьев – от 0,190 до 0,217. Плотность НГМ из высушенных листьев составляет от 0,883 до 895, НГМ из свежих листьев - от 0,888 до 0,902.

Для настоек гомеопатических матричными стандартными условиями хранения являются: В защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С. Проведено изучение стабильности НГМ из листьев смородины черной.

В таблице 29 представлены результаты определения показателей качества НГМ из высушенных листьев в процессе хранения. Аналогичное исследование проведено для настоек из свежих листьев. На основании полученных данных установлено, что настойки стабильны в течение 2-х лет.

Показатели качества настойки гомеопатической матричной из высушенных листьев черной смородины в процессе хранения

Показатели качества и нормы	№ образца	Числовые показатели			
		Момент изготовления	Через 1 год	Через 2 года	Через 2 года 6 месяцев
1	2	3	4	5	6
Содержание флавоноидов, не менее 0,05 %.	1	0,075	0,074	0,074	0,073
	2	0,103	0,102	0,103	0,101
	3	0,072	0,072	0,071	0,071
	4	0,108	0,105	0,103	0,102
	5	0,081	0,082	0,081	0,081
Плотность, от 0,880 до 0,899	1	0,883	0,883	0,882	0,883
	2	0,888	0,887	0,888	0,887
	3	0,895	0,894	0,895	0,895
	4	0,894	0,895	0,895	0,895
	5	0,897	0,897	0,897	0,896
Сухой остаток, не менее 1,0 %	1	1,44	1,46	1,44	1,44
	2	1,41	1,39	1,41	1,40
	3	1,45	1,44	1,45	1,46
	4	1,44	1,45	1,45	1,45
	5	1,48	1,48	1,49	1,48
Тяжелые металлы, не более 0,001 %	1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	2	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	3	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	4	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	5	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

На основании полученных данных разработаны проекты фармакопейных статей на свежие и высушенные листья смородины черной и настойки гомеопатические матричные из данных видов сырья:

- «Смородина черная листья свежие *Ribes nigrum folia recens*»
- «Смородина черная листья *Ribes nigrum folia*»
- «*Ribes nigrum* Настойка гомеопатическая матричная из свежих листьев»

- «*Ribes nigrum* Настойка гомеопатическая матричная из высушенных листьев»

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

3. Проведена стандартизация сырья высушенных и свежих листьев черной смородины.
4. Определены требования по внешним признакам и микроскопии лекарственного сырья, установлены числовые показатели, разработана методика количественного определения флавоноидов; установлены сроки годности сырья.
5. Разработаны способы получения настоек гомеопатических матричных из свежих и высушенных листьев смородины черной.
6. Установлен качественный и количественный состав эфирного масла НГМ.
7. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в настойках с использованием спектрофотометрического метода, проведена валидация метода.
8. Определены показатели качества НГМ: подлинность (качественная реакция, метод ТСХ), числовые показатели: содержание суммы флавоноидов; сухой остаток, плотность, микробиологическая чистота, тяжелые металлы.
9. Определены условия хранения и срок годности настоек.
10. Разработаны проекты Фармакопейных статей на сырье и настойки гомеопатические матричные из свежих и высушенных листьев смородины черной, которые направлены в ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава для рассмотрения.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое исследование данных литературы и нормативных документов по требованиям к качеству сырья и матричных настоек смородины. Выявлены основные показатели качества сырья и настоек.

2. Определены и выделены анатомо-диагностические признаки почек и листьев черной смородины, которые охарактеризованы количественно (определены размеры клеток, устьиц, волосков, железок, друз).

3. С использованием современных методов исследования (ТСХ, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС) изучены БАВ почек и листьев черной смородины и выявлены различия в составе и содержании флавоноидов, катехинов, аминокислот, углеводов.

4. Впервые из почек чёрной смородины выделено и установлено строение четырех флавоноидов (производных кверцетина и мирицетина) и семи катехинов, установлено количественное содержание эфирного масла (2,77%) и определён его компонентный состав.

5. Разработаны методы получения НГМ из свежих и высушенных листьев черной смородины; подобраны оптимальные условия качественного и количественного анализа БАВ и разработаны методики контроля качества сырья и НГМ на основе современных физико-химических методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленький, Б.Г. Об определении содержания аскорбиновой кислоты в крови по Тильману // Лабораторное дело. – 1957. – № 6. – С. 7–11.
2. Белоусов, М.В. Аминокислоты листьев некоторых видов рода рододендрон. / Белоусов М.В., Жаворонкова М.Е. // Современные вопросы теории и практики лекарствоведения, Ярославль. - 2007. – С.54–56.
3. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т.Березов, Б.Ф.Коровкин - М.: Медицина, 2008. – 704 с.
4. Биохимия мозга / под ред. И. П. Ошмарина, П. В. Стукалова, Н. Д. Ещенко. СПб.: СПб университет. 1999. 325 с.
5. Блинова, К.Ф. Ботанико-фармакогностический словарь: Справ. пособие / Под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. — М.: Высш. шк., 1990. — 187 с.
6. Бомбела, Т.В. Состав полисахаридов травы *Euphrasia brescipila* (Scrophulariaceae) / Т.В. Бомбела, С.А. Короткова, В.М. Петроченко // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2010. - № 7. – С.26–28.
7. Борисова, Д.А. Сравнительное исследование химического состава цветков, листьев и корневищ с корнями первоцвета лекарственного с целью контроля качества и стандартизации сырья // Дисс. канд. фарм. наук. – 2013. – 182 с.
8. Борисова, Д.А. Определение аскорбиновой кислоты в первоцвете лекарственном методом ВЭЖХ. / Д.А. Борисова, Д.М. Попов // 2013. - N 3. - С. 22-24.
9. Ботаническая характеристика черной смородины и история введения в культуру. - Режим доступа: <http://www.1000listnik.ru/lekarstvennie-travi/17/165-smorodina-chnaya.html>.
10. Валов, Р.И. Полисахариды надземной части хамериона узколистного (*Chameriona angustifolium*) Halub / Р.И. Валов, М.А Ханина // Вестник

Пермской государственной фармацевтической академии. – 2010. - № 7. – С.34–37.

11. Винокуров, А.П. Основные закономерности в распределении микроэлементов между растениями и средой // Микроэлементы в жизни растений и животных. Сб.ст. – М. – 1992. – С.33– 38.

12. Гомеопатические комплексы Рой Мартина. – Режим доступа: <http://vitadoctor.mitiendy.com/ru/productos/-14>.

13. Гончаров, К.Ф. Фармакогностическое изучение лапчатки серебристой, лапчатки гусиной, лапчатки прямостоячей. // Дисс. канд. фарм. наук. – 1990. – С. 65–70.

14. Городинская, В.С. Тайны целебных трав. – М.: Советская Россия, 1989. - 256 с.

15. ГОСТ 31643-2012 Продукция соковая. Определение аскорбиновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

16. Государственная Фармакопея СССР. Одиннадцатое издание. Выпуск 1 (1987), выпуск 2 (1990).

17. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издания. Часть 1, 2. – 2009, 2010.

18. Государственный Реестр Лекарственных Средств. – Режим доступа: URL <http://grls.rosminzdrav.ru>.

19. Гомеопатия. Одесские крупинки или globuli по-одесски. – Режим доступа: <http://www.polykhrest.od.ua/mono.php?page=r>.

20. Гуленкова, М. А. Лекарственные растения. Энциклопедия природы России / М. А. Гуленкова, Н. Г. Замятина, М. Н. Сергеева – Эгмонт Россия Лтд. - 2002. – 64 с.

21. Данилова Н.В. Исследование по созданию методики контроля качества и стандартизации сырья щавеля конского // Дисс. канд. фарм. наук. – Москва. – 2001. – 139 с.

22. Демчук, Т.А. Качественный анализ и количественное определение аминокислот корневища и корней валерианы лекарственной. / Т.А. Дем-

чук, П.Ю. Шкроботко, Н.С. Фурса // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии, Пермь. – 2007. - № 12. – С.229–230.

23. Жаворонкова, М.Е. Хроматографическое исследование флавоноидов двух видов рододендрона. / М.Е. Жаворонкова, М.С. Короткова, М.В. Белоусов // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Пермь. –2007. - № 2. – С. 230–235.

24. Жидехина, Т. В. Новые сорта смородины черной для промышленного возделывания / Т. В. Жидехина // Состояние и перспективы развития ягодоводства в России: материалы Всерос. науч. метод. конф. (19-22 июня 2006 г., Орел). - Орел, 2006. - С. 104-108.

25. Забелина, Л. Н. Эколого-биологические особенности сибирского подвида черной смородины и наследование основных признаков в его гибридном потомстве / Л. Н. Забелина // Селекция черной смородины: сб. ст. Новосибирск, 1980. - С. 59-62.

26. Зазулина, Н. А. Селекция смородины черной в Белоруссии / Н. А. Зазулина // Плодоводство: науч. тр. Самохваловичи, 2000. - Т. 13. - С. 112-115.

27. Зинкевич, И.Г. Использование растворов неорганических солей для увеличения выхода эфирного масла методом гидродистилляции / Т.А. Зинкевич, К.Г. Ткаченко, М.М. Коробова // Растительные ресурсы. – СПб.: Наука. - 1998. - Вып. 3. – С. 107-111.

28. Ильина, Т.А. Лекарственные растения России (Иллюстрированная энциклопедия). – М., «ЭКСМО». - 2006. – 190 с.

29. Ильма Деста Использование реакции тритерпеноидов с концентрированной серной кислотой в анализе олеиновой кислоты в препарате «Сенапар». / Ильма Деста, Оганесян Э.Т. Беликов В.Т. // Изучение препаратов растительного и животного происхождения. – Томск. – 1978. – С.82–83.

30. Исайкина Н.В. Разработка количественного определения полисахаридов в жидком экстракте корней Алтая / Н.В. Исайкина, В.Ю. Андреева

// Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2010. - № 7. – С.78–80.

31. Ищенко, З.В. Аминокислотный состав надземной части магнолии суланга (*Magnoliae Soulangelaceae*), магнолии Кобза (*Magnoliae Kobsae*) и морозника Кавказского (*Helleborus caucasicus*). / З.В. Ищенко, М.И. Филатова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. -Пермь. – 2010. - № 7. –С.81–83.

32. Кабалоева, Д.Р. Исследование аминокислотного состава гомеопатических матричных настоек клубнелуковиц безвременника осеннего и великолепного / Д.Р.Кабалоева, Н.С.Терёшина // Традиционная медицина. - 2011. - № 5 (28). – С. 197-200.

33. Кампанцев, В.А. Потенциометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах с помощью $Fe^{+}(III)$ -О-фенантролинового комплекса / В.А. Кампанцев, С.Н. Щербак, Н.Ж. Кайшева // Тр. Пятигорского фармацевтического института.-1981.- 12 с.

34. Кемертелидзе, Э.П. Количественное определение танина / Э.П. Кемертелидзе, П.Л. Явич, А.К. Сарабунович // Фармация. – 1984. – №4. - С.95.

35. Количественное определение углеводов в листьях и корневищах двух видов валерианы/ С.В. Талашова, П.Ю. Штребатько, А.А. Цуркан, А.И. Бородин// В сб. Современные вопросы теории и практики лекарствоведения. – Ярославль.- 2007. – С.321–324.

36. Костенникова, З.П. Количественное определение флавоноидов в настойках, применяемых- в гомеопатической практике / З.П. Костенникова, Л.В. Акашкина, Т.В. Григорьева // Ресурсоведческое и фитохимическое изучение лекарственной флоры СССР. -М. –1991. – С.173–177.

37. Кретович, В.Л. Биохимия растений / В.Л. Кретович – М.: Высшая школа, 1980. – 445 с.

38. Кузнецова, А.А. Антиокислительные свойства экстракта листьев черной смородины / А.А. Кузнецова, С.Н. Петрова // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – Иркутск. – 2012. - № 2(3). – С. 145-147.
39. Кучина, Н.Л. Лекарственные растения средней полосы Европейской части России - М.: Планета, 1992. – 157 с.
40. Лекарственные растения Государственной Фармакопеи. Фармакогнозия / Под редакцией проф. И.А. Самылиной, проф. В.А Северцева. – М.: АНМИ, 2003. - 534 с.
41. Мировые ресурсы гомеопатического лекарственного сырья. / А.В. Патудин, Н.С. Терёшина, В.С. Мищенко, И.А. Губанов – М., 2006. – 560 с.
42. Макарова, В.Г., Артемьева Г.Б. Фитотерапия и фитотоксикология. - 1994. - С 34-35.
43. Мигралгин (Migralgin). – Режим доступа: http://adonis.ru/catalog/nastoyki_i_rastvory/migralgin/.
44. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: Учебник. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2007. – 656 с.
45. Наумова, О.А. Качественное и количественное определение углеводов в плодах бархата амурского. / О.А Наумова, Д.М. Попов // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии – 2011. - № 8. - с. 29 – 32.
46. Наумова, О.А. Определение аминокислот в плодах бархата амурского / О.А. Наумова, Д.М.Попов // Современные вопросы теории и практики лекарствоведения. Ярославль. - 2007. - С. 251-253.
47. Наумова, О.М. Дубильные вещества в плодах бархата амурского. / О.М. Наумова, Д.М. Попов // Фармация. – 2012. –№ 8. –С.12–14.
48. Николайчук, Л.В., Жигар М.П. Целебные растения: Лекарственные свойства. Кулинарные рецепты Применение в косметике.- Х.: Прапор,1991, -С.173-176.

49. Номенклатура гомеопатических препаратов, изготавливаемых *ex tempore*. ООО «Панацея». Смородина черная *Ribes nigrum*. – Режим доступа: http://gomeopatiya.su/gds.php?cid=Ribes_nigrum__11-0-0.

50. Определение иридоидов в траве татарника колючего (*Oporordum asanthium* L., род *Oporordum*) / Л.Р. Иванова, Л.И. Бутенко, Л.В. Лигай, В.Г. Сбежнева // Химия растительного сырья. - 2010. - № 4. - С. 131–133.

51. ОСТ 91 500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения».

52. ОФС 42-0027-05 Настойки гомеопатические матричные. - М.: Научн. центр экспертизы средств мед. применения, 2005. – 80 с.

53. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: использование в народной медицине и быту. / Пастушенков Л.В, Пастушенков А.Л., Пастушенков В.Л. - Л.: Лениздат, 1990. – С.243-244.

54. Патудин, А.В. Биологически активные вещества гомеопатического лекарственного сырья / А.В. Патудин, Н.С. Терешина, В.С. Мищенко, Л.И. Ильенко / М.: «Знак», 2009. - 588 С.

55. Патудин, А.В. Гомеопатические лекарственные средства, разрешенные в Российской Федерации для применения в здравоохранении и ветеринарии. 6е издание, исправленное и дополненное / А.В. Патудин, В.С. Мищенко, Л.И. Ильенко, Л.В. Космодемьянский – М.: Знак, 2011. – 352 с.

56. Пашинский, В.Г. Лечение травами / В.Г. Пашинский.- Наука, 1991.-140 с.

57. Перечень простых (однокомпонентных) гомеопатических лекарственных средств, разрешенных к применению в соответствии с приказом Минздравмедпрома РФ от 29.11.1995 г. № 335.

58. Петрова, С.Н. Состав плодов и листьев смородины черной *Ribes nigrum* / С.Н. Петрова, А.А. Кузнецова // Химия растительного сырья. – 2014. - № 4. – С. 43-50.

59. Позняковский, В.М. Экспертиза свежих плодов и овощей. Качество и безопасность: учебно-справочное пособие / В.М. Позняковский, Т.В.

Плотникова, Т.В. Ларина и др. - Сибирское университетское издательство. – 2009. - 312 с.

60. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалазубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федорковский // Фармация - 2012. –№ 2. – С.5–7.

61. Попов, Д.М. Исследование аминокислотного состава звездчатки средней (мокрицы) / Д.М.Попов, А.В.Наумов / Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. - №5. – С. 46-48.

62. Попова, Т.С. Количественное определение углеводов в почках черной смородины / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // Изыскание и создание природных лекарственных средств: Межвузовский сборник научных трудов с международным участием, посвященный 25-летию кафедры фармакогнозии и ботаники Яросл. Гос. Мед. академии /под ред. Фурсы Н.С.- Ярославль: ООО «ЯрМедиаГрупп», 2009. - 237-238.

63. Попова, Т.С. Исследование аминокислотного состава почек черной смородины / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // Межвузовский сборник научных трудов с международным участием, посвященный 25-летию кафедры фармакогнозии и ботаники Яросл. Гос. Мед. академии /под ред. Фурсы Н.С.- Ярославль: ООО «ЯрМедиаГрупп», 2009. - 239-241.

64. Попова, Т.С., Флавоноиды листьев и почек черной смородины / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // Фармация. – 2011. - № 6 – С. 19 – 21.

65. Попова, Т.С. Исследование качественного состава почек черной смородины / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // В сб. «Инновационные технологии в лекарствоведении», Ярославль.- 2012. - С. 258 – 263.

66. Попова Т.С. Сравнительное качественное и количественное определение углеводов в почках и листьях черной смородины / Т.С. Попова, Н.С. Терёшина // Фармация. – 2013. - № 8. – С. 10-13.

67. Попова, Т.С. Исследование качественного состава почек черной смородины / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // В сб. «Инновационные процессы в лекарствоведении», Ярославль. - 2013. - С.258-263.

68. Попова, Т.С. Сравнительное исследование аминокислотного состава почек и листьев черной смородины (*Ribes nigrum* L.) / Т.С. Попова, Н.С. Терёшина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. - 2013. - С.52–57.
69. Попова, Т.С. Получение и стандартизация аллопатической и гомеопатической настойки из листьев черной смородины / Т.С. Попова, Н.С. Терёшина, Д.М. Попов // Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике - Ярославль.– 2014.– С.156–161.
70. Попова, Т.С. Исследование качественного состава почек черной смородины (*Ribes nigrum* L.) / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // Инновационные процессы в лекарствоведении. - Ярославль .– 2012.–С.258–263.
71. Попова, Т.С. Флавоноиды листьев и почек черной смородины / Т.С. Попова, О.Г. Потанина // Фармация – 2011. - № 6.–С. 19–21.
72. Попова, Т.С. Сравнительное качественное и количественное определение углеводов в почках и листьях черной смородины / Т.С. Попова, Н.С. Терёшина // Фармация. – 2013. - № 8. – С.23–25.
73. Попова, Т.С. Сравнительное исследование количественного содержания сапонинов в листьях и почках черной смородины / Т.С. Попова, Н.С. Терёшина // Сеченовский вестник. – 2015. - № 1 (19). – С. 77-78.
74. Попова, Т.С. Количественное определение тритерпеновых сапонинов в листьях и почках черной смородины / Т.С. Попова, Н.С. Терёшина // Фармация.–2015, № 8. –С. 3-6
75. Попова Т.С. Качественное и количественное определение катехинов в почках и листьях черной смородины методом ВЭЖХ-МС. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. - № 1 (6). – С. 74–76.
76. Попова, Т.С. Определение компонентного состава эфирного масла почек черной смородины. / Т.С. Попова, Д.М. Попов, Н.С. Терёшина // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2015. -№ 2 (11). – С.152–159.

77. Препараты Аллергоплекс. - Режим доступа: <http://www.vitadoctor.mitiendy.com/ru/posts/20657>.
78. Растительные лекарственные средства / Н.П. Максютин, Н.Ф. Комиссаренко, А.П. Прокопенко и др. – Киев. – 1985. – 280 с.
79. Романова, З.Р. Фармакогностическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного. // Диссертация на соискание учен. степени канд. фармац. наук. Курск, - 2010.
80. Сапонины и их определение в корневищах аралии маньчжурской в условиях Белгородской области /Д.И. Писарев, Н.А. Миртисянова, Н.Н. Нетробенко и др.// Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С.197–198.
81. Сахаров, А.А. Амперометрическое определение аскорбиновой кислоты // Хим.-фарм. журнал. – 1989, – Т. 23. –№ 10. - С. 1274 -1276.
82. Смородина черная (*Ribes nigrum* L.) - Режим доступа: <http://udoktora.net/plants/smorodina-chernaya-ribes-nigmm-l>.
83. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. - М.: Недра.1987, -С 455-456.
84. Справочник О.Т.І. *Ribes-Manganese* (Рибес-Манганезе). – Режим Доступа: <http://www.bach-flowers.com.ua/about/sub2/?curPos=40>
85. Стандартизация листьев черной смородины / Попова Т.С., Кузина В.Н., Попов Д.М., Потанина О.Г. // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2014, № 2. – С.100–106.
86. Степанова, Т.А. Изучение динамики накопления флавоноидов и фенольных кислот в соцветиях пижмы северной и пижмы обыкновенной // Изыскание новых биологически активных веществ в лекарственных растениях флоры Дальнего Востока. – Хабаровск, –1989. – С.28-31.
87. Стрельцина, С.А. Питательные и биологически активные вещества ягод и листьев смородины черной (*Ribes nigrum* L.) в условиях северо-запада России / С.А. Стрельцина, О.А. Тихонова // Аграрная Россия. - 2010. - N 1.

88. Тимофеев, А., Иванова Е. И. Смородина / *Ribes nigrum*/ - L Режим доступа: <http://fitoapteka.org/herbs-s/5100-ribes-nigrum>.
89. Турова, А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Медицина, 1982.- С. 245 -246.
90. Хакимова Д.Р. Унификация методов стандартизации флавоноидов в процессе производства препаратов боярышника, зверобоя и календулы. // Дис.. канд. фарм. наук. 15.00.01. – М., 1994. – 128 с
91. Химический анализ лекарственных растений. / Под ред. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. – М.: Высш. школа, 1983. – 176 с.
92. Чёрная смородина (*Ribes nigrum*) / Original- Flowers. - Режим доступа: <http://www.original-flowers.ru/fruits/view.php?id=274#ixzz3ozk3gjYd>.
93. Шаменькова, Н.В. Выбор методики стандартизации сырья пустырника / Н.В. Шаменькова, Д.М. Попов // Современные вопросы теории и практики лекарствоведения. – Ярославль. –2007. – С. 366–369.
94. Шапошник, Е.И. Биологические и биохимические особенности плодов растений рода *Ribes* при интродукции в Бедгородской области: автореф. дис. ...канд. биологических наук. – Белгород. – 2009. – 200 с.
95. Andersson, J. The composition of the essential oil of black currant leaves (*Ribes nigrum* L.) / J. Andersson , R. Bosvik and E. Von Sydow // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1963. – V. 14, N 11 - P. 834–840.
96. Arbos, A. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extractsю / A. Arbos, L. M. Claro // Nutrition Research. – 2008. – V. 28. - N 7. – P. 457–463.
97. Assessment report on *Ribes nigrum* L., folium European Medicines Agency, 2010. – Режим доступа: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2010/07/WC500094204.pdf.
98. Benzie, F.F. Evolution of dietary antioxidants. // Comparative Biochemistry and Physiology. – 2003. – V. 136. - N 1. – P. 113–126.

99. Bishayee, T. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats / Bishayee, T. Mbimba, R. J. Thoppil et al. // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2011. – V. 22. - N 11. – P. 1035–1046.
100. Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* / S. Bladt. - Springer Science & Business Media/ - 2009. – 384 p.
101. Bonarska-Kujawa, D. Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants, // D. Bonarska-Kujawa, S. Cyboran, J. Oszmiański et al. // *Journal of Medicinal Plant Research*. – 2011. – V. 5. - N 11. -P. 2339–2347.
102. Bonarska-Kujawa, D. Biological Activity of Blackcurrant Extracts (*Ribes nigrum* L.) in Relation to Erythrocyte Membranes / D. Bonarska-Kujawa, S. Cyboran, R. Żyłka et al. // *BioMed Research International*. - (2014). – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/783059/>.
103. Brangoulo, H.L. Assay of the antioxidant capacity of foods using an iron(II)-catalysed lipid peroxidation model for greater nutritional relevance. / H.L. Brangoulo, P.C. Molan. // *Food Chemistry*. – 2011. – V. 125. - N 3. – P. 1126–1130.
104. *British Pharmacopeia 2009. British Pharmacopeia Volume 111 Herbal Drugs and Herbal Drugs Preparations Primula root.*
105. Bukowska, B. Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radical formation in human erythrocytes (in vitro). / B. Bukowska, J. Michałowicz, A. Krokosz // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2007. - V. 39. - N 3. – P. 238–244.
106. Butariu, M. Detection of the polyphenolic components in *Ribes nigrum* L. // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. – 2014. – V. 21. - N 1. – P. 11-14.
107. Calibration and prediction of amino acids in stevia leaf powder using near infrared reflectance spectroscopy / G. Li, R. Wang, A.J. Quampah et al. // *J. Agric. Food. Chem.* – 2011. - Dec 28;59(24). – P. 13065-13071.

108. Chaudhuri, S. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. / S. Chaudhuri, A. Banerjee, K. Basu // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2007. - V. 41. N 1. – P. 42–48.
109. Chanh, P.H. Comparative effects of total flavonoids extracted from *Ribes nigrum* leaves, rutin and isoquercitrin on biosynthesis and release of prostaglandins in the ex vivo rabbit heart / P.H. Chanh, N. Ifansyah, R. Chahine et al. // *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*. – 1986, 22(3). – P. 295-300.
110. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivar Čačanska crna / T.Stević, K. Šavikin, RISTIĆ M. et al. // *Serb. Chem. Soc.* 2010. - V. 75 (1). - P. 35–43.
111. Cyboran, D. Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of trees and fruit bushes. / D. Cyboran, I. Bonarska-Kujawa, J. Kapusta et al. // *Current Topics in Biophysics*. – 2011. – V. 34. – P. 15–21.
112. Dannapfel, S. The acute effect of prolonged intense cycling and blackcurrant extract on protein carbonyls in well-trained male cyclist. / S. Dannapfel, T. Lowe, R. Cummins // *Journal of Science and Medicine in Sport*. – 2009. – V. 12 – P. S69-S70.
113. Essential Oil of the Leaves of *Ribes nigrum* L. from Turkey / C.S. Kiliç , M. Koyuncu, T/ Özek, K.H.C. Başer // *Journal of Essential Oil Research*.- 2008. – V. 20, N 6. – P. 512-514.
114. Declume, C. Anti-inflammatory evaluation of a hydroalcoholic extract of black currant leaves (*Ribes nigrum*). // *J. Ethnopharmacol.* – 1989. – V. 27(1-2). - P. 91-98.
115. Fleurentin, J. Des sources du savoir aux médicaments du futur / J. Fleurentin, J.-M.Pelt, G.Mazars // *Société française d'ethnopharmacologie, Institut européen d'écologie, Société européenne d'ethnopharmacologie*. - IRD Editions, 2002 – 468 p.

116. Garbacki, N. Effects of prodelfinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity / N.Garbacki, L. Angenot, C. Bassleer et al. // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 2002. - V 365(6). – P. 434-341.
117. Gemmotherapy by Unda. Homeopathy by Unda. *Ribes Nigrum*. - Режим доступа: <http://www.rockwellnutrition.com/ribes-nigrum-gemmotherapy-by-unda.html>.
118. Hertog, M. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study / Hertog M., Kromhout D, Aravanis C. // *Arch Intern Med.* – 1995. – V.155. – P.381–386.
119. *Homoeopathic Pharmacopoeia of India (H.P.I.) Fourth Volume First edition.* - 1993.
120. Hou, L. Inhibition of free radical initiated peroxidation of human erythrocyte ghosts by flavonols and their glycosides. / L. Hou, B. Zhou, L. Yang et al. // *Organic and Biomolecular Chemistry.* – 2004. – V. 2. - N 9. - P. 1419–1423.
121. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black Currants, blueberries, raspberries, red Currants, and cranberries. / G. Borges, A. Dege-neve, W. Mullen, A. Crozier // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2009, 58. – P. 3901-3909.
122. Jia, N. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage / N. Jia, B. Kong, Q. Liu // *Meat Science.* – 2012. – V. 91. - N 4. – P. 533–539.
123. Jones, E. Quercetin, flavonoids and the life-span of mice. / E. Jones, A.E. Hughes // *Experimental Gerontology.* – 1982. – V. 17. – P. 213-217.
124. Kansanen L. Inhibition of CYP1A1 in vitro by berries with different quercetin contents. In: *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease.* / L. Kansanen et al. // *Royal Society of Chemistry.* - 1999. – P. 395-397.
125. Kansanen L. Flavonoids and extracts of strawberry and blackcurrant are inhibitors of the carcinogen-activating enzyme CYP1A1 in vitro. In: *Natural*

Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention. / L. Kansanen et al. // The Royal Society of Chemistry. – 1996. – P. 386-388.

126. Kapasakalidis, PG; Rastall, RA; Gordon, MH (). "Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues". Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006, 54 (11). – P. 4016–4021.

127. Karjalainen, R. A review on bioactive compounds in black currants (*ribes nigrum* l.) and their potential health-promoting properties / R. Karjalainen, M. Anttonen, N. Saviranta, D. Stewart, G.J. McDougall, H. Hilz, P. Mattila, R. Törrönen // I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: Biotechfruit, 2008. - Режим доступа: http://www.actahort.org/books/839/839_38.htm.

128. Kiliç, C.S. Essential Oil of the Leaves of *Ribes nigrum* L. from Turkey / C.S. Kiliç, M. Koyuncu , T. Özek , K.H.C. Başer // Journal of Essential Oil Research. – 2008. – V. 20. - N. 6. - P. 512-514.

129. Koeppen B.H., Herrmann K. Flavonoid glycosides and hydroxycinnamic acid esters of blackcurrants (*Ribes nigrum*). Phenolics of fruits 9. // Z. Lebensm Unters Forsch. – 1977, Aug 31. -164(4). – P. 263-268.

130. Krisch, J. L. Anticandidal effect of berry juices and extracts from *Ribes* species," / J. Krisch, L. Ördögh, L. Galgóczy et al. // Central European Journal of Biology. - 2009. - V. 4. - N 1. – P. 86–89.

131. Le Quere, J.L. Composition of the essential oils of blackcurrant buds (*Ribes nigrum*) / J.L. Le Quere, Latrasse A. // J. Agric. Food Chem. - 1990, N 38. – P. 3-10.

132. Matsumoto, H. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans / H. Matsumoto, E. Takenami, K. Iwasaki-Kurashige et al. // European Journal of Applied Physiology. – 2005. – V. 94. – V. 1-2. – P. 36–45.

133. Matsumoto, H. Delphinidin-3-rutinoside relaxes the bovine ciliary smooth muscle through activation of ETB receptor and NO/cGMP pathway. / H. Matsumoto, K.E. Kamm, J.T. Stull // Experimental Eye Research. – 2005. - V. 80. - N 3. – P. 313–322.

134. Matsumoto, H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. / H. Matsumoto, Y. Nakamura, H. Iida et al. // *Experimental Eye Research*. – 2006. – V. 83. - N 2. – P. 348–356.
135. Mattila, P.H. Polyphenol and vitamin C contents in European commercial blackcurrant juice products. / P.H. Mattila, J. Hellström, G. McDougall et al. // *Food Chemistry*. - 2011. – V. 127. - N 3. – P. 1216–1223.
136. Molan, A.-L. The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. / A.-L. Molan, Z. Liu, M. Kruger // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2010. – V. 26. - N. 10. – P. 1735–1743.
137. Monados s.r.o. Renol. – Режим доступа: http://www.monados.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=69:renol&catid=4:energy&Itemid=14.
138. Mongold, J.J. Anti-inflammatory activity of *Ribes nigrum* leaf extract in rats / J.J.Mongold, P.Susplugas, et al. // *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. - 1993. – N 26(2). – P. 109-116.
139. Movileanu, L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. / L. Movileanu, I. Neagoe, M.L. Flonta // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2000. – V. 205. - N 1-2. – P. 135–146.
140. Mulleder, U. Urinary excretion of cyanidin glycosides / Mulleder, U., Murkovic, M., and Pfannhauser, W. // *J Biochem Biophys Methods*. - 2002; 53(1-3). – P. 61-66.
141. Netzel, M. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. / Netzel, M., Strass, G., Janssen, M. Et al. // *J. Environ Pathol Toxicol Oncol*. – 2001. – V. 20(2). – P.89-95.
142. Peto, C. Tabletta is pulvis chinacisssalis cum Vitamina c gyogyszrar aszharbinav tartalmanak potenciometrias meghatozasa // *Acta pharm. Hung*. – 1982. - V. 52. – N 5. – P. 228-231.
143. Pieri, G. Flavonoids from the leaves of *Ribes nigrum* L. identification of a malonyl flavonol and HPLC analysis / Pieri, G. Ollivier E., Mahiou V. Et al. //

Des sources du savoir aux médicaments du futur : actes du 4e congrès européen d'ethnopharmacologie = From the sources of knowledge to the medicines of the future = proceedings of the 4th European Congress on Ethnopharmacology, Paris (FRA), Metz : IRD, SFE. - 2002. – P. 422-425.

144. Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 / N.Garbacki, M.Kinet, B.Nusgens et al. // Journal of Inflammation. – 2005. V. 2. – P.9.

145. Raudseppa, P. Nutritional quality of berries and bioactive compounds in the leaves of black currant (*Ribes nigrum* L.) cultivars evaluated in Estonia / P.Raudseppa, H. Kaldmäeb, A. Kikasb // Journal of Berry Research. – 2010. – P. 53–59.

146. Repertorio omeopatico. – IMO (Istituto di medicina omeopatica), 1947.

147. *Ribes nigrum* berries (use in phytotherapy). – Режим доступа: http://www.naturafoundation.co.uk/monografie/Ribes_nigrum_berries.html.

148. *Ribes nigrum* for homoeopathic preparations / French Pharmacopoeia 2003: Режим доступа http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7b2e751b3330cd173f62d6acf901aa90.pdf.

149. *Ribes Nigrum* Gemmotherapy по Unda. – Режим доступа: http://www.rockwellnutrition-canada.com/Ribes-Nigrum-Gemmotherapy-by-Unda_p_771.html.

150. Sawant, L. Quantitative HPLC Analysis of Ascorbic Acid and Gallic Acid in *Phyllanthus Emblica*. / Sawant L, Prabhakar B, Pandita N // J. Anal. Bioanal. Tech. – 2010. – V. 1. – P. 111.

151. Seeram, N.P. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. - V. 56 (3). – P. 627–629.

152. Separation and Purification of Flavonoids from Black Currant Leaves by High-Speed Countercurrent Chromatography and Preparative HPLC. /He D,

Huang Y, Ayupbek A, et al. // *J. Liq. Chromatogr Relat Technol.* – 2010. – V. 33(5). – P. 615-628.

153. Shukitt-Hale B. Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. / B. Shukitt-Hale, R.L. Galli, V. Meterko et al. // *Age.* – 2005. – V. 27. – N. 1. – P. 49–57.

154. Szachowicz-Petelska, B. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol / B. Szachowicz-Petelska, I. Dobrzyńska, E. Skrzydlewska et al. // *Journal of Membrane Biology.* – 2012. - V. 245. – P. 191–200.

155. Tabart, J., Kevers C., Evers D., Dommes J. Ascorbic acid, phenolic acid, flavonoid, and carotenoid profiles of selected extracts from *Ribes nigrum*. // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. - May 13;59(9).- P. 4763-4770.

156. Tabart, J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts / J. Tabart, T. Franck, C. Kevers et al. // *Food Chemistry/* - 2012. – V. 131. - N 4. – P. 1116–1122.

157. *The Homoeopathic Pharmacopoeia of the United States.*- 1989, 1990.

158. Tits, M. Proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves : TLC Analysis / M. Tits, P. Poukens, L. Angenot // *Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols.* – 1992. - Vol 16 (Part 1). – P. 182-185.

159. Vagiri, M.R. Phenolic compounds and ascorbic acid in black currant (*Ribes nigrum* L.) – Variation due to genotype, ontogenetic stage, harvest date and location. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences. - Alnarp 2014. – 68 p.

160. Vagiri, M. Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date / M. Vagiri, S. Conner, D. Stewart et al. // *Food Chem.* – 2015. - Apr 1;172. – P.135-142.

161. Vagiri, M. An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) / M. Vagi-

ri, A. Ekholm, S.C. Andersson // *J. Agric. Food Chem.* – 2012. V. 60. – P. 10501–10510.

162. Verma, K.K. Determination of ascorbic acid in fruits and pharmaceuticals by titration with thallium (III) / Verma K.K., Polad S. // *Microchim. Acta.* - 1983. - V. 2. – N 5-6. - P. 361-367.

163. Wang, H. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors / H. Wang, G.J. Provan, K. Helliwell // *Food Chemistry.* – 2003. – V. 81. – N 2. – P. 307–312.

164. Wichtl, M., Anton, R. *Plantes thérapeutiques - Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* - 2 éd., Paris, Éditions Tec & Doc, 2003. – 692 p.

165. Williams, B The Isolation and Identification of Quercetin and Isoquercitrin from Black Currants (*Ribes nigrum*) / B. Williams, C.H. Ice, S.H. Wender // *J. Am. Chem. Soc.* – 1952. – V. 74 (18). – P.4566–4567.

ПРИЛОЖЕНИЯ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Смородина черная листья свежие	ФС 42 -
<i>Ribes nigrum folia recens</i>	Водится впервые

Настоящая Фармакопейная статья распространяется на свежесобранные в конце июля, августе листья дикорастущей или культивируемой смородины черной - *Ribes nigrum* L., семейство камнеломковые – *Saxifragaceae* (крыжовниковые – *Grossulariaceae*), используемые для приготовления настойки матричной гомеопатической.

Внешние признаки. В соответствии ОФС «Методы анализа растительных лекарственных средств» раздел «Листья» ГФ XIII. Сырье исследуется невооруженным глазом, с помощью лупы (10 ×) или стереомикроскопом (8 ×; 16 ×).

Листья цельные или частично измельченные длинночерешковые, 3 – 5 – лопастные, с двояковильчатым краем, сверху голые тусклые, снизу – серые, по жилкам пушистые и усажены точечными золотистыми железками, издающими специфический запах. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопия. Анализ проводят в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ XIII).

Из части аналитической пробы готовят микропрепараты по методике приготовления микропрепаратов из цельного и измельченного сырья (ГФ XIII). При рассмотрении листа с поверхности видны с верхней стороны клетки эпидермиса с сильноизвилистыми, извилистыми и слабоизвилистыми стенками, длиной 21-62 мкм, шириной 12-33 мкм; с нижней стороны - со слабоизвилистыми, извилистыми и сильноизвилистыми, длиной 8-71 мкм, шириной 6-38 мкм. Стенки клеток с обеих сторон местами четковидно утолщенные (чаще вдоль жилок и по краю листа). Клетки эпидермиса вдоль жилок вытянутые прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы, крупнее, чем на всей поверхности листа. Кутикула с обеих сторон листа ровная. Устьица аномоцитного типа расположены с нижней стороны листа (длиной 17-25 мкм, шириной 8-25 мкм) расположены с частотой 137-431 на 1 мм². С верхней стороны листа встречаются крупные водяные устьица с округлой зияющей щелью на концах лопастей и зубцах листа (длиной 25-62 мкм, шириной 29-75 мкм), как правило, одно устьице более крупное и 2-4 более мелких. С нижней стороны листа по жилкам, близко к краю и по краю видны простые остроконусовидные одноклеточные волоски длиной 115-793 мкм с бородавчатой кутикулой, по краю они прижаты по направлению к вершине листа. С верхней стороны листа волоски редко встречаются по всей пластинке с частотой 0-9 на 1 мм². С обеих сторон листа видны щитковидные железки (диаметром 133-250 мкм) с частотой встречаемости с верхней стороны листа 0-9 на 1 мм², с нижней – 0-13 на 1 мм². Среди клеток эпидермиса встречаются пигментные клетки, а вдоль жилки просвечивают секреторные ходы. В паренхиме листа имеются идиобласты, содержащие друзы оксалата кальция диаметром 2-15 мкм. Лист дорсовентрального строения. Сосудисто-волокнистый пучок включает сетчатые и лестничные сосуды и спиральные трахеиды.

Эпидермис черешка представлен вытянутыми по длине черешка клетками многоугольной (ближе к основанию листа), прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы с ровными или слабоизвилистыми четко-

видно утолщенными стенками. Кутикула ровная. На эпидермисе черешка встречаются железки и простые волоски такие же, как на листе.

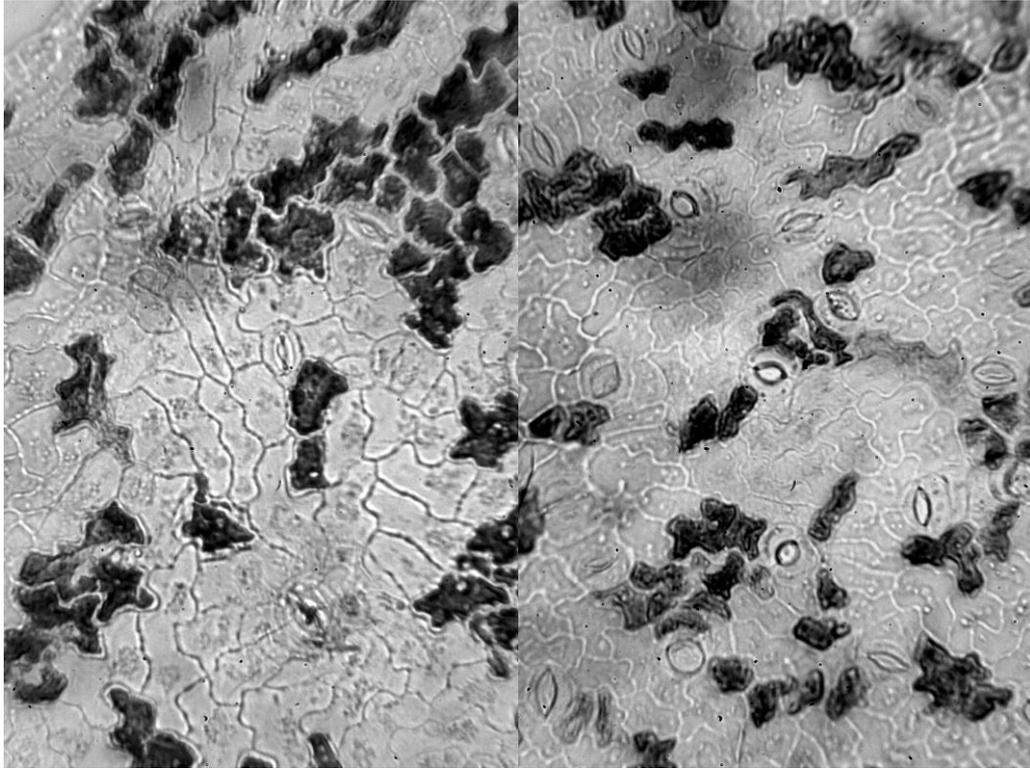


Рис. 1. Смородины черной листья свежие.
Нижний эпидермис листа с устьицами. Ув. $\times 250$.

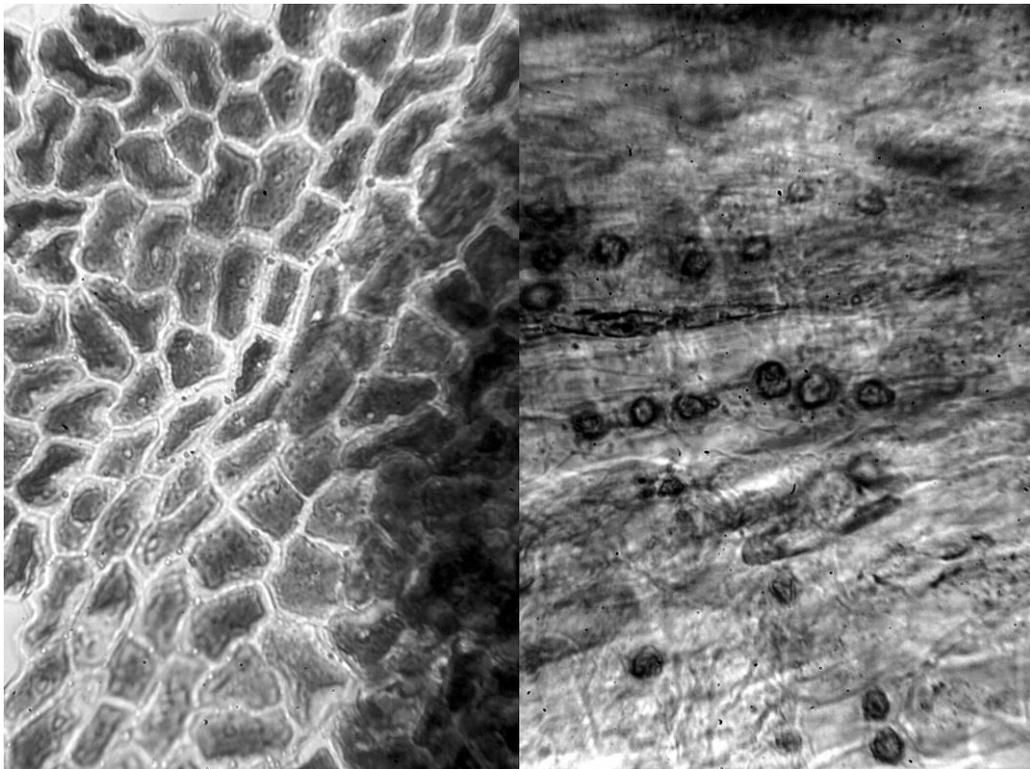


Рис. 2. Смородины черной листья свежие.
Слева: верхний эпидермис листа. Справа: друзы в паренхиме. Ув. $\times 250$.

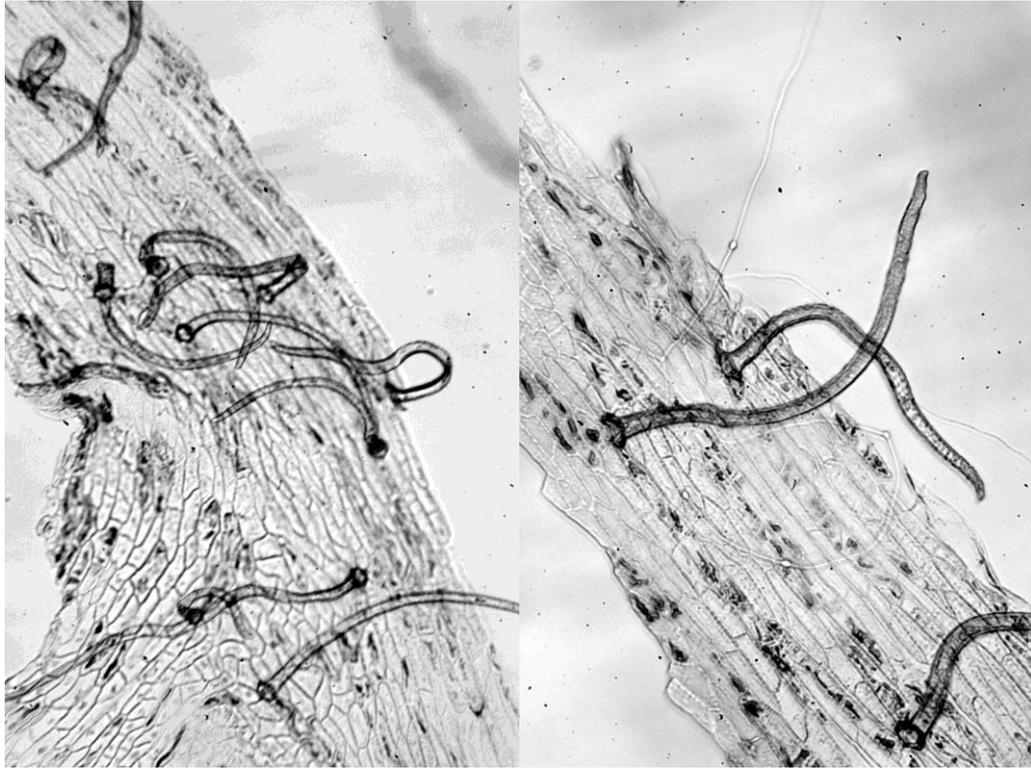


Рис. 3. Смородины черной листья свежие. Простые волоски по жилкам с нижней стороны листа. Ув. $\times 70$ – слева; $\times 100$ - справа.

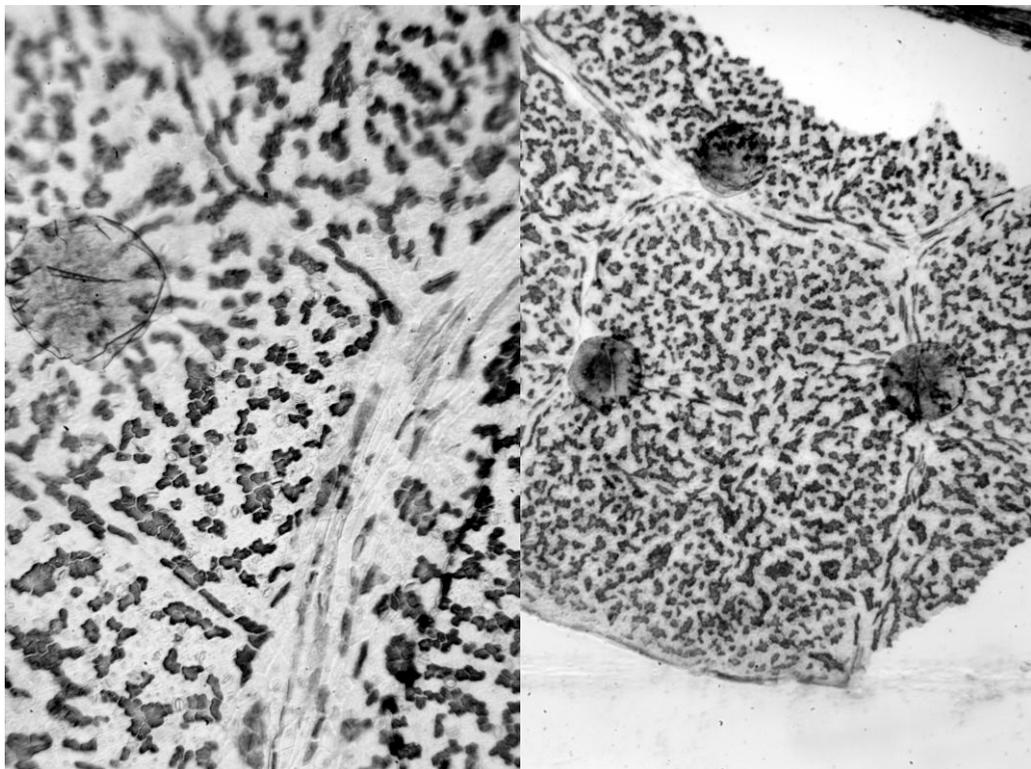


Рис. 4. Смородины черной листья свежие. Нижний эпидермис листа с железками. Ув. $\times 70$ – слева; $\times 31,25$.

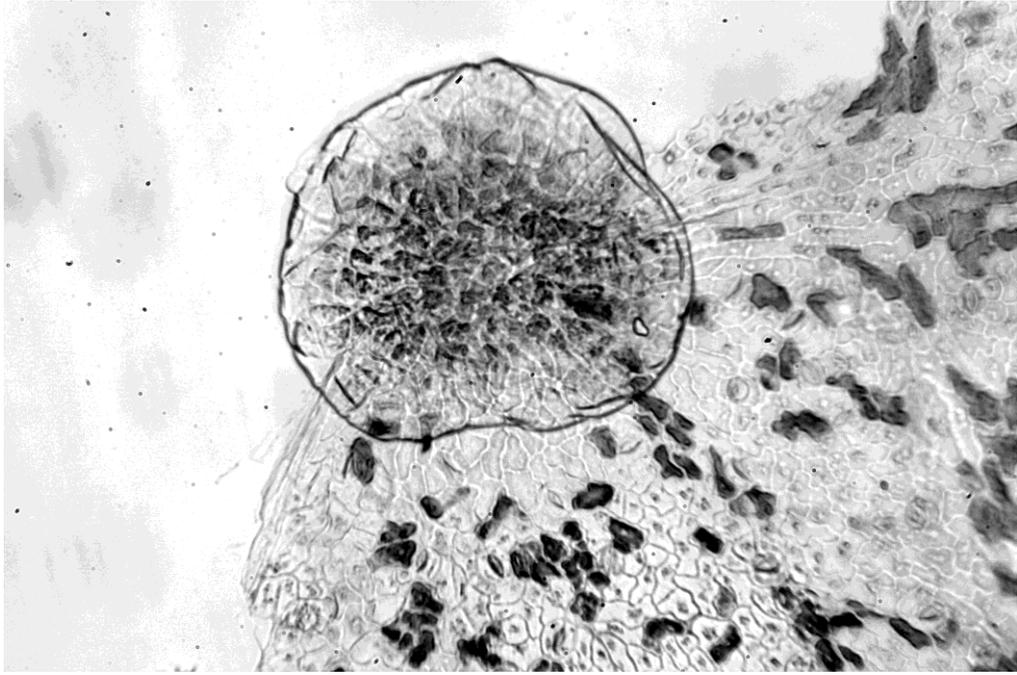


Рис. 5. Смородины черной листья свежие.
Обрывок нижнего эпидермиса с железкой. Ув. $\times 100$.

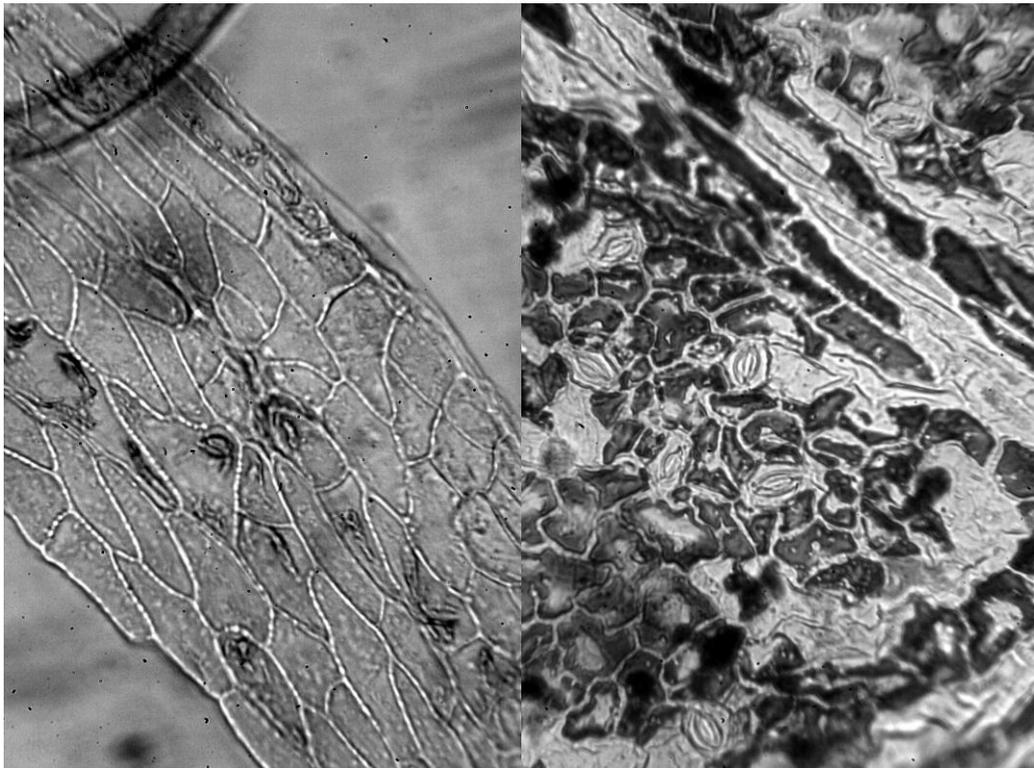


Рис. 6. Смородины черной листья свежие.
Слева: обрывок нижнего эпидермиса над жилкой листа с вытянутыми клетками с четковидноутолщенными стенками.
Справа: нижний эпидермис (с устьицами), включающий эпидермис над жилкой листа (с вытянутыми клетками). Ув. $\times 250$.

Подлинность

Приготовление растворов

Приготовление исследуемых растворов А и Б

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц 5 мм.

Около 4,3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл 70 % этанола и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу прибавляют 40 мл 70 % этанола, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 70 % этанолом до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

20 мл раствора А помещают в выпарительную чашку и упаривают на кипящей водяной бане до удаления запаха спирта. Остаток разбавляют водой до 30 мл, переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл *n*-бутанола и встряхивают в течение 10 мин. Водный (нижний) слой отбрасывают, бутанольное извлечение переносят в круглодонную колбу и упаривают на горячей водяной бане под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл 70 % этанола (раствор Б).

Приготовление раствора СО кверцетина

10 мг кверцетина растворяют в 20 мл этанола 96%.

1. К 0,5 мл раствора А прибавляют 0,1 г порошка магния или цинка и 0,2 мл кислоты хлористоводородной концентрированной постепенно образуется малиновое окрашивание (флавоноиды).

2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой основе размером 10×15 см наносят по 10 мкл СО кверцетина и 30 мкл раствора Б. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей *n*-бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40:10:20), хрома-

тографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 11-12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, опрыскивают 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме СО кверцетина должна обнаруживаться зона желто-зеленого цвета с R_f около 0,74.

На хроматограмме испытуемого раствора Б должны обнаруживаться зоны желто-зеленого цвета с R_s 1,0, 0,79, 0,64 и 0,51 (по кверцетину).

Числовые показатели. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,0 %, влажность не менее 60,0%, золы общей не более 10,0 %, золы не растворимой в 10 % кислоте хлористоводородной не более 0,5 %, органических примесей не более 0,5 %, минеральных примесей не более 0,5 %.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII издания, ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Приготовление растворов

Приготовление раствора РСО рутин

Около 0,05 г (точная навеска) рутин (ГФ X, ст. 587) предварительно высушенного при 130 -135 °С в течение 3 часов, растворяют в 90 мл 96 % этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты и объем раствора доводят 96 % этанолом до метки. Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служит раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты

и доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл раствора РСО рутина, 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 уксусной кислоты, доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Раствором сравнения для измерения оптической плотности РСО рутина служит раствор, состоящий из 1 мл РСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный до метки 96 % этанолом в колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m \times 1 \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times 100 \times 25 \times a \times 2 \times (100 - W)} = \frac{D \times m \times 5000}{D \times a \times (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность РСО рутина;

m – масса рутина;

a – навеска сырья, граммы;

W – потеря в массе при высушивании.

Содержание суммы флавоноидов в листьях смородины в пересчете на рутин должно быть не менее 1 %.

Тяжелые металлы. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радиоактивность. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания радионуклидов лекарственном растительном сырье».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. Определение проводят согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

Упаковка, маркировка и транспортирование. Осуществляется с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Упаковка. В ящики с отверстиями в боковых стенках и крышках по 0,5 кг нетто.

Транспортирование. Свежесобранное сырье следует отправлять для переработки немедленно после сбора любым видом транспорта.

Хранение. Хранение ЛРС осуществляется с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Сырье подлежит переработке в течение 24 часов с момента сбора.

Сырье для получения настойки матричной гомеопатической.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Смородина черная листья	ФС 42 -
Ribes nigrum folia	Водится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на высушенные листья дикорастущей или культивируемой смородины черной - *Ribes nigrum* L., семейство камнеломковые – *Saxifragaceae* (крыжовниковые – *Grossulariaceae*), собранные в конце июля, августе и в начале сентября, используемые для приготовления гомеопатических лекарственных средств.

Внешние признаки. В соответствии с ОФС «Методы анализа растительных лекарственных средств» раздел «Листья» ГФ XIII. Сырье исследуется невооруженным глазом, с помощью лупы (10 ×) или стереомикроскопом (8 ×; 16 ×).

Листья цельные или частично измельченные длинночерешковые, 3 – 5 – лопастные, с двояковильчатым краем, сверху голые тусклые, снизу – серые, по жилкам пушистые и усажены точечными золотистыми железками, издающими специфический запах. Вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопия. Анализ проводят в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ XIII).

Из части аналитической пробы готовят микропрепараты по методике приготовления микропрепаратов из цельного и измельченного сырья (ГФ XIII). При рассмотрении листа с поверхности видны с верхней стороны клетки эпидермиса с сильноизвилистыми, извилистыми и слабоизвилистыми стенками, длиной 21-62 мкм, шириной 12-33 мкм; с нижней стороны - со слабоизвилистыми, извилистыми и сильноизвилистыми, длиной 8-71 мкм, шириной 6-38 мкм. Стенки клеток с обеих сторон местами четковидно утолщенные (чаще вдоль жилок и по краю листа). Клетки эпидермиса вдоль жилок вытянутые прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы, крупнее, чем на всей поверхности листа. Кутикула с обеих сторон листа ровная. Устьица аномоцитного типа расположены с нижней стороны листа (длиной 17-25 мкм, шириной 8-25 мкм) расположены с частотой 137-431 на 1 мм². С верхней стороны листа встречаются крупные водяные устьица с округлой зияющей щелью на концах лопастей и зубцах листа (длиной 25-62 мкм, шириной 29-75 мкм), как правило одно устьице более крупное и 2-4 более мелких. С нижней стороны листа по жилкам, близко к краю и по краю видны простые остроконусовидные одноклеточные волоски длиной 115-793 мкм с бородавчатой кутикулой, по краю они прижаты по направлению к вершине листа. С верхней стороны листа волоски редко встречаются по всей пластинке с частотой 0-9 на 1 мм². С обеих сторон листа видны щитковидные железки (диаметром 133-250 мкм) с частотой встречаемости с верхней стороны листа 0-9 на 1 мм², с нижней – 0-13 на 1 мм². Среди клеток эпидермиса встречаются пигментные клетки, а вдоль жилки просвечивают секреторные ходы. В паренхиме листа имеются идиобласты, содержащие друзы оксалата кальция диаметром 2-15 мкм. Лист дорсовентрального строения. Сосудисто-волокнистый пучок включает сетчатые и лестничные сосуды и спиральные трахеиды.

Эпидермис черешка представлен вытянутыми по длине черешка клетками многоугольной (ближе к основанию листа), прямоугольной, веретеновидной и комбинированной формы с ровными или слабоизвилистыми четко-

видно утолщенными стенками. Кутикула ровная. На эпидермисе черешка встречаются железки и простые волоски такие же, как на листе.

Порошок. Микропрепараты порошкованного лекарственного сырья под микроскопом представляют собой смесь из различных частиц:

- обрывков эпидермиса листа с клетками со слабоизвилистыми, извилистыми и сильноизвилистыми стенками иногда четковидно утолщенными, с пигментными клетками (и без них), с устьицами аномоцитного типа (и без них), с щитковидными железками (и без них), с простыми конусовидными одноклеточными бородавчатыми волосками (и без них);

- обрывков эпидермиса черешка с многоугольными, прямоугольными, веретеновидными и комбинированной формы клетками с прямыми или слабоизвилистыми стенками четковидно утолщенными, с щитковидными железками (и без них), с простыми конусовидными одноклеточными бородавчатыми волосками (и без них).

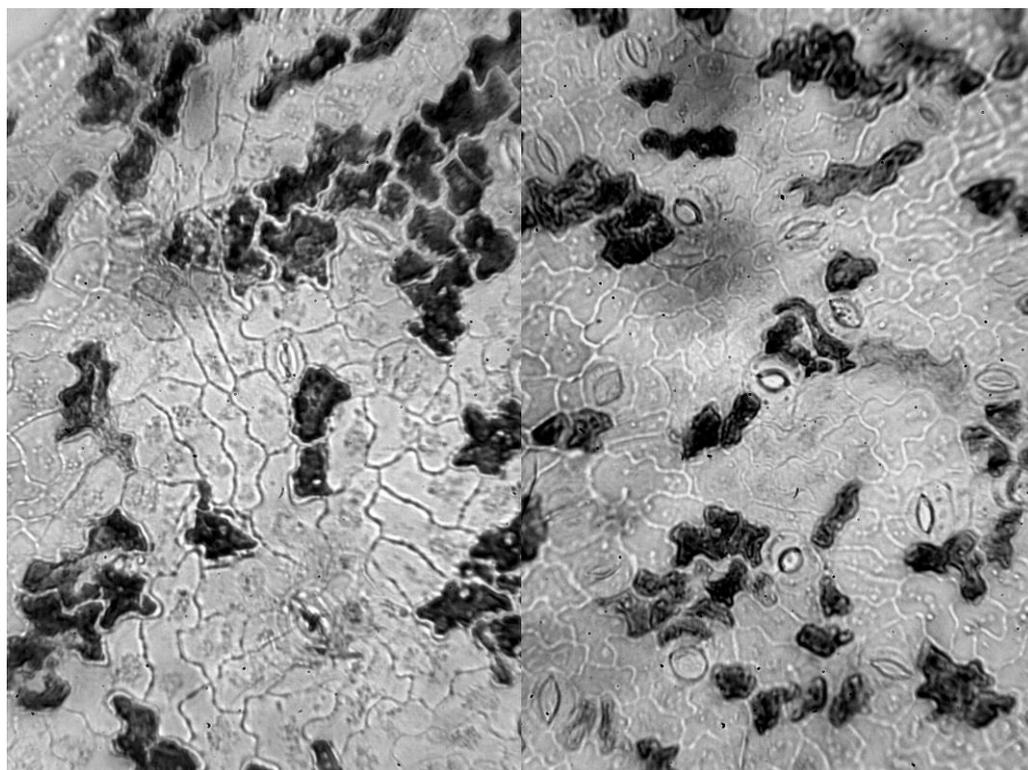


Рис. 1. Нижний эпидермис с устьицами. Ув. $\times 250$.

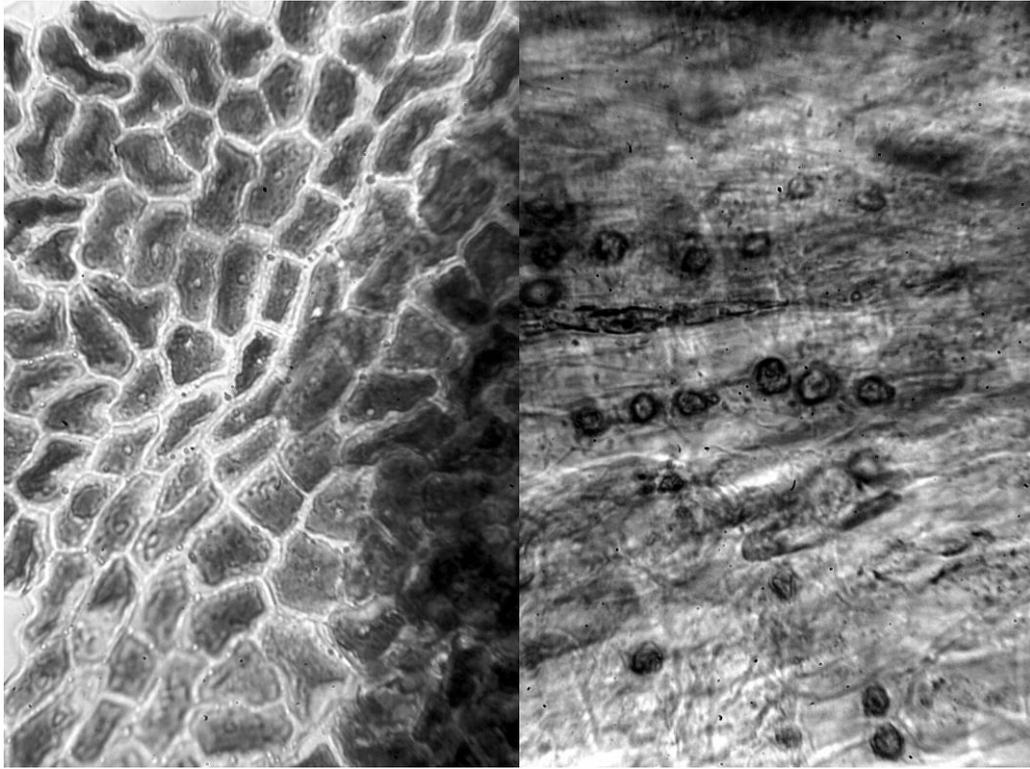


Рис. 2. Слева: верхний эпидермис. Справа: друзы в паренхиме. Ув. $\times 250$.

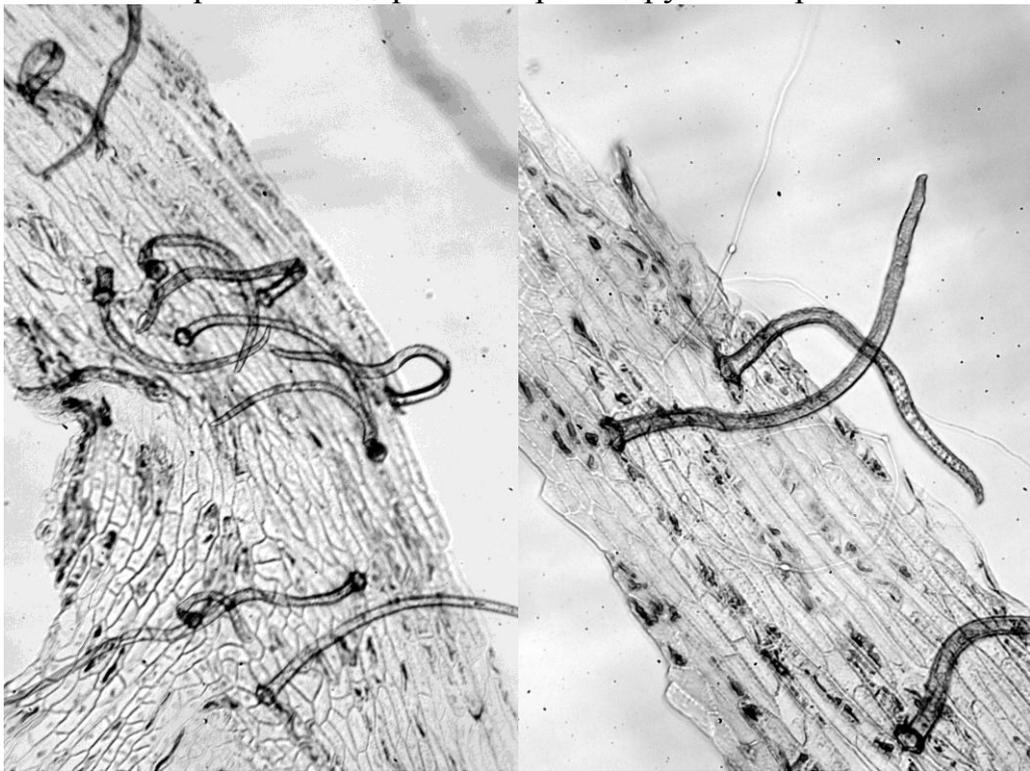


Рис. 3. Простые волоски по жилкам с нижней стороны листа.
Ув. $\times 70$ – слева; $\times 100$ – справа.

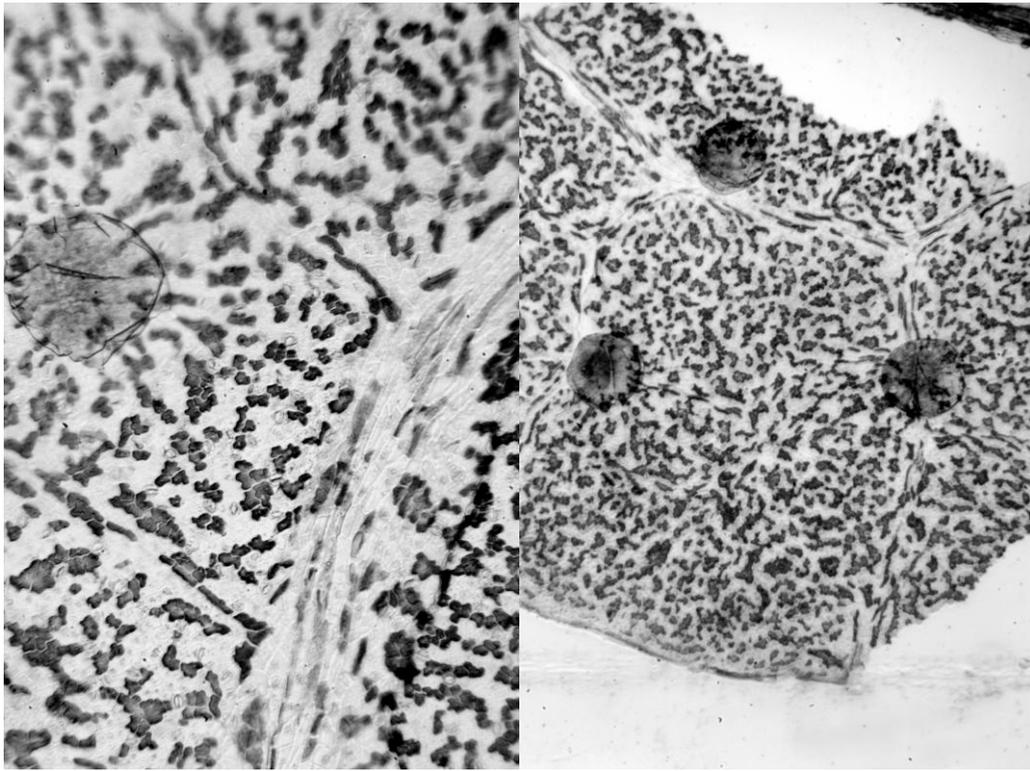


Рис. 4. Нижний эпидермис с железами. Ув. $\times 70$ – слева; $\times 31,25$.

Подлинность

Приготовление растворов

Приготовление исследуемых растворов А и Б

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц проходящих сквозь сито по ТУ 23.2.2068-89 с отверстиями диаметром 2 мм.

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 60 мл 70 % этанола и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу с сырьем прибавляют 40 мл 70 % этанола, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 70 % этанолом до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

20 мл раствора А помещают в выпарительную чашку и упаривают на кипящей водяной бане до удаления запаха спирта. Остаток разбавляют водой

до 30 мл, переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл н-бутанола и встряхивают в течение 10 мин. Водный (нижний) слой отбрасывают, бутанольное извлечение переносят в круглодонную колбу и упаривают на горячей водяной бане под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл 70 % этанола (раствор Б).

Приготовление раствора СО кверцетина

10 мг кверцетина растворяют в 20 мл этанола 96%.

1. К 0,5 мл раствора А прибавляют 0,1 г порошка магния или цинка и 0,2 мл кислоты хлористоводородной концентрированной; постепенно образуется малиновое окрашивание (флавоноиды).

2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой основе размером 10×15 см наносят по 10 мкл СО кверцетина и 30 мкл раствора Б. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей н-бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40:10:20), хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 11-12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, опрыскивают 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме СО кверцетина должна обнаруживаться зона желто-зеленого цвета с R_f около 0,74.

На хроматограмме испытуемого раствора Б должны обнаруживаться зоны желто-зеленого цвета с R_s 1,0, 0,79, 0,64 и 0,51 (по кверцетину).

Числовые показатели. *Цельное сырье.* Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,0 %, влажность не более 15,0%, золы общей не более 14,0 %, золы не растворимой в 10 % кислоте хлористоводородной не более 1,0 %, листьев почерневших и пожелтевших не более 5,0 %, других частей растения (стеблей, коры), не более 2,0 %, измельченных частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3,0 мм не более 4,0 %, органических примесей не более 0,5 %, минеральных примесей не более 0,5 %.

Измельченное сырье. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,0 %, влажность не более 15,0 %, золы общей не более 14,0 %, золы не растворимой в 10 % кислоте хлористоводородной не более 1,0 %, кусочков листьев почерневших и пожелтевших не более 5,0 %, других частей растения (стеблей, коры), не более 2,0 %, частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 7,0 мм не более 10,0 %, частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм не более 10,0 %, органических примесей не более 0,5%, минеральных примесей не более 0,5 %.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII издания, ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Приготовление растворов

Приготовление раствора РСО рутин

Около 0,05 г (точная навеска) рутин (ГФ X, ст. 587) предварительно высушенного при 130 -135 °С в течение 3 часов, растворяют в 90 мл 96 % этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты и объем раствора в колбе доводят 96 % этанолом до метки. Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служит раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты и доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл раствора РСО рутин, 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Раствором сравнения для

измерения оптической плотности РСО рутина служит раствор, состоящий из 1 мл РСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты доведенный до метки 96 % этанолом в колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m \times 1 \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times 100 \times 25 \times a \times 2 \times (100 - W)} = \frac{D \times m \times 5000}{D \times a \times (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность РСО рутина;

m – масса рутина;

a – навеска сырья, граммы;

W – потеря в массе при высушивании.

Содержание суммы флавоноидов в листьях смородины в пересчете на рутин должно быть не менее 1 %.

Тяжелые металлы. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радиоактивность. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания радионуклидов лекарственном растительном сырье».

Остаточные количества пестицидов. Определение проводят согласно ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. Определение проводят согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

Упаковка, маркировка и транспортирование. Осуществляется с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья».

Хранение. Хранение ЛРС осуществляется с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ribes nigrum

ФС

Настойка гомеопатическая матричная
из свежих листьев

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на *Ribes nigrum* настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных в июле, августе свежих листьев черной смородины *Ribes nigrum* L., семейство камнеломковые – *Saxifragaceae* (крыжовниковые – *Grossulariaceae*),, применяемую для приготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:

Смородины черной листьев свежих
(при содержании влаги не менее 60 %)

- 100 г

Спирта этилового (этанол) 86 % (по
массе) или 90 % (по объему)

- достаточное количество
для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по методу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные и жидкие разведения».

Описание

Прозрачная жидкость от зеленого до коричнево-зеленого цвета со специфическим запахом.

Подлинность

Приготовление растворов

Приготовление раствора СО кверцетина

10 мг кверцетина растворяют в 20 мл этанола 96%.

1. К 0,5 мл настойки прибавляют 0,1 г порошка магния или цинка и 0,2 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, постепенно образуется малиновое окрашивание (флавоноиды).

2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой основе размером 10×15 см наносят по 10 мкл СО кверцетина и 30 мкл настойки. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей н-бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40:10:20), хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 11-12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, опрыскивают 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 5 мин.

На хроматограмме СО кверцетина должна обнаруживаться зона желто-зеленого цвета с R_f около 0,74.

На хроматограмме испытуемого раствора Б должны обнаруживаться зоны желто-зеленого цвета с R_s 1,0, 0,79, 0,64 и 0,51 (по кверцетину).

Сухой остаток. Не менее 3,0 % (ГФ XIII).

Плотность. От 0,888 до 0,902.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ГФ XIII).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ГФ XIII.

Количественное определение

Приготовление растворов

Приготовление раствора РСО рутина

Около 0,05 г (точная навеска) рутина (ГФ Х, ст. 587) предварительно высушенного при 130 -135 °С в течение 3 часов, растворяют в 90 мл 96 % этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

5 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объём раствора до метки 70 % этанолом и перемешивают (раствор А).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты. Объём раствора доводят до метки 96 % этанолом и перемешивают (испытуемый раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служит раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты и доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора из 1 мл раствора РСО рутина, 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенного 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Раствором сравнения служит раствор из 1 мл РСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m \times 25 \times 1 \times 25 \times 100}{D_0 \times 100 \times 5 \times 25 \times 2} = \frac{D \times m \times 2,5}{D_0}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО рутина;

m – масса рутина, граммы.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин должно быть не менее 0,1 %.

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Гомеопатические лекарственные формы».

Упаковка должна обеспечивать стабильность при транспортировании и хранении в течение установленного срока годности.

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные и жидкие разведения».

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ribes nigrum D1**ФС**Настойка гомеопатическая матричная
из высушенных листьев**Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на *Ribes nigrum* настойку гомеопатическую матричную, получаемую из собранных в конце июля, августе и в начале сентября высушенных листьев черной смородины *Ribes nigrum* L., семейство камнеломковые – *Saxifragaceae* (крыжовниковые – *Grossulariaceae*), применяемую для приготовления гомеопатических лекарственных средств.

Для получения настойки необходимо:Смородины черной листьев высу-
шенных

- 100 г

Спирта этилового (этанола) 62 % (по
массе) или 70 % (по объему)- достаточное количество
для получения настойки

Примечание

Получение настойки гомеопатической матричной осуществляют по методу 4а ОФС «Настойки гомеопатические матричные и жидкие разведения» (размер частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 5 мм).

Описание

Прозрачная жидкость зеленовато – коричневого цвета, ароматного запаха.

Подлинность

Приготовление растворов

Приготовление раствора СО кверцетина

10 мг кверцетина растворяют в 20 мл этанола 96%.

1. К 1 мл настойки, прибавляют 0,1 г порошка магния или цинка, 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной; образуется малиновое окрашивание (флавоноиды).

2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой основе размером 10×15 см наносят по 10 мкл СО кверцетина и 30 мкл настойки. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей н-бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (40:10:20), хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 11-12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей, опрыскивают 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100-105 0С в течение 5 мин.

На хроматограмме СО кверцетина должна обнаруживаться зона желто-зеленого цвета с Rf около 0,74.

На хроматограмме испытуемого раствора Б должны обнаруживаться зоны желто-зеленого цвета с Rs 1,0, 0,79, 0,64 и 0,51 (по кверцетину).

Сухой остаток. Не менее 1,0 % (ГФ XIII).

Плотность. От 0,880 до 0,899.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (ГФ XIII).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ГФ XIII.

Количественное определение

Приготовление растворов

Приготовление раствора РСО рутина

Около 0,05 г (точная навеска) рутина (ГФ X, ст. 587) предварительно высушенного при 130 -135 °С в течение 3 часов, растворяют в 90 мл 96 % этанола в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

5 мл настойки помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора в колбе 70 % этанолом до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты и объем раствора в колбе доводят 95 % этанолом до метки, перемешивают ((испытуемый раствор). Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора с помощью спектрофотометра при длине волны 409 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствором сравнения служит раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты и доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно в тех же условиях измеряют оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл раствора РСО рутина, 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 уксусной кислоты, доведенный 96 % этанолом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Раствором сравнения для измерения оптической плотности РСО рутина служит раствор состоящий из 1 мл РСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенный до метки 96 % этанолом в колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m \times 25 \times 1 \times 25 \times 100}{D_0 \times 100 \times 5 \times 25 \times 2} = \frac{D \times m \times 2,5}{D_0}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D₀ – оптическая плотность раствора РСО рутина;

m – масса рутина, граммы.

Содержание суммы флавоноидов в настойке гомеопатической матричной в пересчете на рутин должно быть не менее 0,05 %.

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Гомеопатические лекарственные формы».

Упаковка должна обеспечивать стабильность при транспортировании и хранении в течение установленного срока годности.

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Настойки гомеопатические матричные и жидкие разведения».

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 15 до 25 °С.