

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



Ковалёва Наталья Александровна

Фармакогностическое изучение облепихи крушиновидной листьев

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Тринеева Ольга Валерьевна

Воронеж – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Ботаническая характеристика растений рода <i>Hippophae</i>	18
1.1.1. Ботаническая характеристика облепихи крушиновидной	18
1.1.2. Описание внешнего вида сырья и растений облепихи различных видов	20
1.1.3. Морфологические особенности климатипов облепихи	22
1.1.4. Полиморфизм климатипов по форме листовых пластинок	25
1.1.5. Места обитания, ареал, заготовка сырья	26
1.1.6. Сортовое разнообразие облепихи крушиновидной	29
1.1.7. Вегетационный период различных сортов в условиях средней полосы России	34
1.2. Фитохимический состав листьев облепихи крушиновидной.....	37
1.2.1. Определение биологически активных веществ в листьях растения облепихи крушиновидной	37
1.2.2. Динамика накопления биологически активных веществ в листьях различных фаз вегетации.....	42
1.2.3. Накопление экотоксикантов в листьях облепихи крушиновидной.....	45
1.3. Фармакологические свойства листьев.....	47
1.4. «Гипорамин» – препарат на основе листьев облепихи	52
1.5. Направления комплексного использования сырья облепихи крушиновидной.....	54
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ	70
3.1. Внешние признаки листьев облепихи крушиновидной	70
3.2. Микроскопия листьев облепихи крушиновидной	76
3.2.1. Изучение анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной	76

3.2.2. Изучение анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной методом растровой электронной микроскопии	82
3.2.3. Петиолярная анатомия листьев облепихи крушиновидной.....	85
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	89
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ НАКОПЛЕНИЯ ЭКОТОКСИКАНТОВ ЛИСТЬЯМИ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ.....	91
4.1. Элементный состав листьев облепихи крушиновидной	91
4.2. Радиационный контроль листьев облепихи крушиновидной.....	97
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	99
ГЛАВА 5. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ.....	100
5.1. Определение товароведческих показателей	100
5.2. Определение содержания суммы экстрактивных веществ	101
5.3. Исследование состава биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной	104
5.3.1. Исследование хроматографических профилей листьев облепихи крушиновидной в тонком слое сорбента	105
5.3.1.1. Исследование состава флавоноидов листьев облепихи крушиновидной.	105
5.3.1.2. Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной	112
5.3.1.3. Исследование состава аминокислот в листьях облепихи крушиновидной	124
5.3.1.4. Определение дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной методом тонкослойной хроматографии	126
5.4. Исследование состава листьев облепихи крушиновидной методом газовой хромато-масс-спектрометрии.....	128
5.5. Количественный анализ биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной	137

5.5.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов.....	137
5.5.2. Определение суммы дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной методом УФ-спектрофотометрии.....	149
5.5.3. Разработка и валидация методики количественного определения аминокислот в листьях облепихи крушиновидной.....	158
5.5.4. Разработка и валидация методики количественного определения лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной	169
5.5.5. Разработка и валидация методики количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной	176
5.5.6. Определение органических кислот в листьях облепихи крушиновидной ..	183
5.6. Анализ витаминов группы В в листьях облепихи крушиновидной	185
5.7. Определение антиокислительной активности листьев облепихи крушиновидной	186
5.8. Изучение комплекса биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной методом ИК-спектроскопии	190
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....	195
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ	
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ	
КРУШИНОВИДНОЙ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЖИДКИХ ВОДНЫХ И	
ВОДНО-СПИРТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ.....	
6.1. Прогноз фармакологической активности биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной <i>in silico</i>	198
6.2. Оценка противовоспалительной активности <i>in vivo</i>	204
6.3. Получение и стандартизация жидких водных и водно-спиртовых лекарственных форм на основе листьев облепихи крушиновидной	207
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.....	215
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	216
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	220
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	222

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	223
ПРИЛОЖЕНИЯ	250
Приложение А.....	250
Приложение Б	264
Приложение В.....	265
Приложение Г	268
Приложение Д.....	276
Приложение Е	279

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время активно развивается отечественная фармацевтическая отрасль, что связано, в первую очередь, с текущей экономической и политической ситуацией. Фитохимические исследования по изысканию источников для разработки новых эффективных и безопасных лекарственных растительных средств является актуальной задачей фармации. В связи с этим, необходимо также и расширение сырьевой базы для производства лекарственных препаратов (ЛП) растительного происхождения как новыми, так и ранее изученными видами лекарственных растений (ЛР) и новых морфологических групп лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Облепиха крушиновидная – широко распространена на территории Российской Федерации (РФ). Фармакопейным видом сырья являются плоды, которые служат для получения ряда лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на основе жирного масла. «Зеленая часть» облепихи, составляющая около 15 % от массы урожая, практически не используется, т.к. при заготовке плодов листья являются побочным продуктом, что не отвечает принципам рационального использования природных ресурсов.

Заготовка листьев одновременно со сбором плодов позволит не только оптимизировать производственный процесс (снижение побочных продуктов) с минимальными затратами, но и способствовать расширению спектра применения облепихи крушиновидной и увеличению возможной сырьевой базы для производства новых продуктов фармацевтического назначения. Согласно отечественным и зарубежным источникам, экстракты из листьев облепихи обладают широким спектром фармакологической активности. Нормативная документация (НД) в виде фармакопейной статьи (ФС) по стандартизации листьев облепихи крушиновидной в настоящее время отсутствует, а в литературе

встречаются разрозненные данные по накоплению биологически активных веществ (БАВ) и анатомо-диагностическим признакам данного сырья.

Таким образом, углубленное фармакогностическое изучение листьев с оценкой возможности расширения спектра ЛРП различного фармакологического действия на их основе, следует считать актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Состав БАВ листьев облепихи крушиновидной достаточно хорошо изучен отечественными и зарубежными учёными. Однако, в разных работах для оценки содержания одних и тех же групп БАВ листьев применялись различные методы, что затрудняет сравнительный анализ полученных результатов. Для каждого нового растительного объекта исследования, как известно, необходимо подбирать индивидуальные условия выделения целевых групп БАВ, а, также адаптировать известные и/или разрабатывать новые методики их определения. В литературе упоминается изучение БАВ листьев, таких как дубильные вещества, флавоноиды и гидроксикоричные кислоты методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ), жирные кислоты - газовой хроматографии (ГХ), пигменты – методом спектрофотометрии в видимой области спектра. На основе данного ЛРС учеными АО «Фармцентр ВИЛАР» запатентованы технологии выделения и очистки комплекса галло-эллаготанинов, являющегося исходной субстанцией для производства зарегистрированного ЛРП «Гипорамин» с доказанной противовирусной активностью. Ряд исследований в России и за рубежом направлен на выявление новых видов фармакологической активности, таких как противовоспалительная, репаративная, антиоксидантная, антибактериальная и иммуномодулирующая. Подтверждена низкая токсичность экстрактов из листьев облепихи крушиновидной. Несмотря на рост интереса ученых во всем Мире, и особенно в странах юго-восточной Азии, к данному ЛРС, в литературе отсутствуют данные по динамике накопления БАВ на различных

этапах жизни листьев растения, а также рекомендации по оптимальным периоду сбора и условиям сушки.

Цель и задачи исследования

Комплексное фармакогностическое изучение и стандартизация листьев облепихи крушиновидной как перспективного источника БАВ для научного обоснования возможности расширения номенклатуры ЛРП на их основе различного фармакологического действия.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи исследования:

1. Провести научно-информационный обзор литературы по разработке подходов к стандартизации листьев облепихи крушиновидной, а также степени изученности состава БАВ и динамике их накопления в сырье;

2. Изучить внешние и анатомо-диагностические признаки листьев облепихи крушиновидной;

3. Определить и нормировать товароведческие показатели качества листьев облепихи крушиновидной, а также изучить особенности накопления ими экотоксикантов;

4. С применением современных физико-химических методов анализа изучить состав БАВ листьев облепихи крушиновидной на разных сроках заготовки и научно обосновать оптимальный период сбора сырья;

5. Разработать и валидировать методики определения одной из целевых групп БАВ в листьях и водно-спиртовых извлечениях на их основе (отваре, настойках и жидком экстракте) – флавоноидов, а также дубильных веществ, лейкоантоцианов, каротиноидов, аминокислот, хлорофилловых соединений в сырье;

6. Разработать способ интенсификации выделения одной из основных групп БАВ листьев для получения более обогащенных флавоноидами экстрактов;

7. Провести прогностическую (*in silico*) оценку возможных фармакологических свойств комплекса БАВ листьев с последующим

подтверждением *in vivo* и выбрать перспективные направления для дальнейшей разработки ЛРП;

8. На основе проведенных исследований разработать критерии качества листьев облепихи крушиновидной и подготовить проект современной нормативной документации для стандартизации данного сырья.

Научная новизна

С применением комплекса различных современных методов проведения микроскопии (люминесцентной, световой, а также растровой электронной микроскопии (РЭМ)) определены основные анатомо-диагностические, в том числе впервые петиолярные, признаки листьев облепихи крушиновидной. С учетом выявленных признаков разработаны показатели для определения подлинности листьев (цельных, измельченных и порошка).

Установлены особенности накопления экотоксикантов (тяжелых металлов), а также содержание радионуклидов в листьях облепихи крушиновидной. Установлено, что изученные образцы экологически безопасны и могут быть рекомендованы для массовой заготовки сырья.

Определены основные товароведческие показатели для включения их в проект ФС.

Впервые методами капиллярного электрофореза (КЭ), газожидкостной хроматографии с масс-спектральной детекцией (ГХ-МС), ТСХ, спектрофотометрии (СФМ) установлена динамика накопления комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной. Получены инфракрасные (ИК) спектры листьев на разных сроках заготовки и выявлены специфические полосы поглощения.

Впервые разработаны спектрофотометрические методики определения одной из целевых групп БАВ (флавоноидов) в листьях облепихи крушиновидной и жидких лекарственных формах (ЛФ) на их основе (отваре, настояках и жидком экстракте). Новизна проведенных исследований подтверждается получением

патента на изобретение РФ «Способ выделения флавоноидов из лекарственного растительного сырья» (№ 2023116586 от 22.06.2023 г.).

Методом компьютерного моделирования *in silico* определены основные виды фармакологической активности и побочных действий комплекса БАВ листьев. Полученные данные по оценке потенциальных видов фармакологической активности позволяют предложить изучаемое ЛРС для разработки препаратов и биологически активных добавок (БАД), обладающих противовоспалительной, гепатопротекторной и антиоксидантной активностью. Антиокислительная активность (АОА) извлечений на основе листьев подтверждена титриметрическим и спектрофотометрическим методами (*in vitro*). *In vivo* на модели формалинового отёка лапы крыс достоверно доказана противовоспалительная активность водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной при пероральном применении.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенных исследований получены новые данные о морфолого-анатомических признаках и химическом составе листьев облепихи крушиновидной. Они позволяют расширить имеющиеся литературные данные. Исследования показали перспективность использования листьев облепихи крушиновидной в качестве источника БАВ – флавоноидов и дубильных веществ. С достаточной достоверностью (*in vivo*) доказана противовоспалительная активность водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной, что открывает перспективы для производства ЛРП для комплексной терапии различных заболеваний, сопровождающихся активацией воспалительных процессов. Даны рекомендации по срокам заготовки листьев с точки зрения максимального накопления комплекса БАВ и сохранения возможности сбора плодов растения.

На основании полученных результатов был разработан проект ФС «Облепихи крушиновидной листья» для ГФ РФ.

Методология и методы исследования

Теоретическую основу исследования составили труды российских (Мельников О.М., Верещагин А.Л., Кошелев Ю.А., Богомоллова Н.И., Мотылева С.М., Яшин Я.И., Веденин А.Н., Яшин А.Я., Тарасов А.В., Бухаринова М.А., Хамзина Е.И., Кукина Т.П., Щербаков Д.Н., Генъш К.В., Тулышева Е.А., Сальникова О.И., Гражданников А.Е., Колосова Е.А.) и зарубежных (Attrey D.P., Singh A.K., Katyal J., Naved T., Jaroszewska A., Biel W., Kauppinen S., Petruneva E., Ji M., Gong X., Li X., Wang C., Li M., Usha T., Middha S.K., Goyal A.K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V.) ученых, работы которых помогли провести анатомо-диагностическое исследование листьев, а также определить основные возможные виды фармакологической активности для дальнейшего изучения. Методология исследования включала в себя проведение комплексного (морфолого-анатомического, химического, фармакологического) фармакогностического изучения листьев облепихи крушиновидной. В процессе выполнения диссертационной работы использовались фармакопейные методы анализа ЛРС, ЛФ и требования, методы сравнительного и документального анализа, а также комплекс физико-химических методов (спектрофотометрия, капиллярный электрофорез, газовая хроматография с масс-детектированием, тонкослойная хроматография и масс-спектрометрия) и технологических испытаний, методы математической статистики и обработки результатов анализа.

Личный вклад автора

При непосредственном участии автора были определены цели и задачи исследования, автором проведен анализ российской и зарубежной научной литературы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов исследования, написании публикаций по теме исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах

исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения их в практику. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования морфологических и анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной с применением различных методов и их биометрические характеристики;
2. Результаты накопления экотоксикантов листьями облепихи крушиновидной;
3. Результаты комплексного качественного и количественного определения различных групп БАВ в листьях современными физико-химическими методами анализа, в т.ч. разработки и валидации спектрофотометрических методик;
4. Результаты стандартизации жидких водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной согласно фармакопейным требованиям;
5. Результаты изучения динамики накопления основных групп БАВ и рекомендуемых оптимальных сроков заготовки листьев облепихи крушиновидной;
6. Результаты прогностической оценки (*in silico* и *in vitro*) перспективных видов фармакологической активности комплекса БАВ листьев.
7. Результаты исследований *in vivo* противовоспалительной активности водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 5, 6 и 7 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Оценка уровня достоверности полученных результатов и выводов определяется большим объемом проанализированной отечественной и иностранной информационной базы, проведением достаточного количества экспериментальных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа. В работе использовалось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке. Статистическая обработка результатов эксперимента, а также валидация вновь разработанных методик проводилась в соответствии с требованиями соответствующих ОФС ГФ РФ XV издания.

Основные результаты исследования доложены на конференциях: VIII Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2022); Международная научная конференция «Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения» (Москва, 2024); Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (Пятигорск, 2024); XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 (Санкт-Петербург, 2024). Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральном заседании (протокол №1506-12 от 30.04.2025).

Внедрение результатов исследования

Полученные экспериментальные данные фармакогностического изучения листьев облепихи крушиновидной использованы при разработке проекта ФС «Облепихи крушиновидной листья» для ГФ РФ. Указанный проект принят ФГБУ «НЦЭСМП» к рассмотрению в установленном порядке. Подготовлена инструкция по заготовке и сушке листьев облепихи крушиновидной, утвержденная Ботаническим садом ФГБОУ ВО «ВГУ» им. проф. Б.М. Козо-Полянского

(Приложение Г). Материалы диссертационного исследования рекомендованы к внедрению для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации профессионального модуля ПМ.01 «Лекарствоведение» (МДК «Фармакогнозия») для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 «Фармация» (СПО), а также при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья (акт внедрения №1506-26 от 20.01.2025), при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по тематике фармакогностического анализа и проблем идентификации нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья (акт внедрения №1500-18 от 30.01.2025) на фармацевтическом факультете Воронежского госуниверситета, а также при реализации дисциплины «Фармацевтическая химия» для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО) на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко (акт внедрения №25/1 от 20.01.2025).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, 3 статьи в журналах, входящих в международную базу цитирования Scopus, 14 иных публикаций по результатам исследования, 1 патент на изобретение РФ и 7

публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 282 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, выводов и библиографического указателя, включающего 193 источника, в т.ч. 32 на иностранном языке, и приложений (33 страницы). Работа иллюстрирована 75 рисунками и 67 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Фармакопейным видом сырья облепихи крушиновидной являются плоды, которые служат для получения ряда лекарственных растительных препаратов (ЛРП) (облепиховое масло, суппозитории с облепиховым маслом и др.). Однако наблюдается также значительный интерес к изучению и других морфологических групп сырья данного растения. За период с 2010 по 2019 года количество публикаций (более 1000) по всем морфологическим частям облепихи крушиновидной выросло примерно в 3 раза относительно 2000-2009 годов (Рисунок 1). К концу 2022 года число статей, посвященных облепихе, уже составляло больше половины за предыдущее десятилетие, вследствие чего можно предполагать, что количество исследований по нефармакопейному сырью облепихи за текущую декаду превысит количество исследований за предыдущую. Процентное соотношение опубликованных работ (Рисунок 2) по морфологическим частям облепихи за последние 10 лет распределилось следующим образом: наибольший интерес, по-прежнему, вызывают плоды растения (13-59 %), далее семена (14-27 %) и листья (15-27 %), наименьший - ветки (3-12 %) и кора (2-9 %).

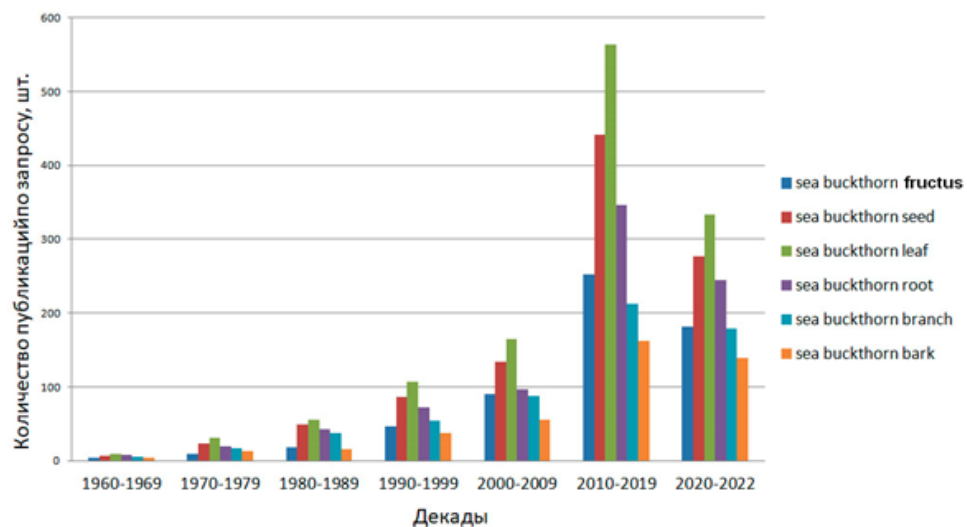


Рисунок 1 – Число публикаций по различным морфологическим частям облепихи, с 1960-го года на ресурсе SpringerLink

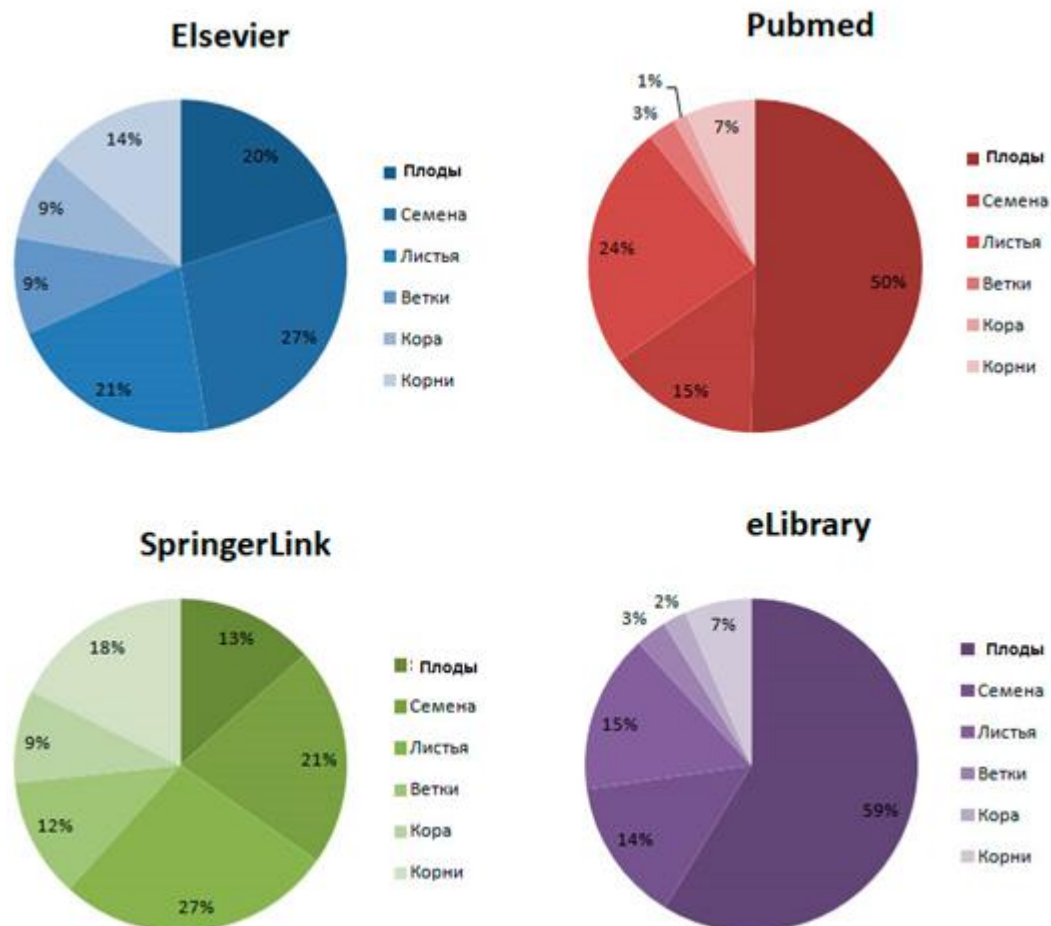


Рисунок 2 – Процентное соотношение опубликованных работ по морфологическим частям облепихи за 2012-2022 гг. в отечественных и зарубежных базах данных: Elsevier; Pubmed; SpringerLink; eLibrary

«Зеленая часть» облепихи, составляющая примерно 12–15 % от массы урожая, практически не используется. В связи с этим перспективно и целесообразно будет использовать неплодовые части (кора, ветки, листья), которые составляют 35 % от общей массы, в качестве источников сырья при производстве различных видов продукции. Поэтому крайне необходимым и актуальным является рациональное и комплексное использование всех частей облепихи с учетом максимального накопления основных групп БАВ для производства новых продуктов пищевого и медицинского применения.

1.1. Ботаническая характеристика растений рода *Hippophae*

1.1.1. Ботаническая характеристика облепихи крушиновидной

Облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.) – многолетний ветроопыляемый двудомный ягодный кустарник (Рисунок 3). Встречается в диком виде в Сибири, Средней Азии, на Кавказе, а также активно культивируется. Внешний вид растения, произрастающего в естественных условиях, отличается от культивируемых особей. Дикорастущая облепиха крушиновидная представляет собой древовидный кустарник с множеством отходящих в стороны стеблей высотой до 9 м. Культивируемые особи – многоствольные деревья от 3 до 4 м высотой. Облепиха является гигромезофитом и хорошо растёт на участках с проточным увлажнением и высоким уровнем грунтовых вод [31,70,141].



Рисунок 3 – Облепиха крушиновидная

И у культивируемых, и у дикорастущих особей крона может быть раскидистой, овальной. Ветви имеют острые колючки длиной 2-7 см. Окраска коры

побегов отличается в зависимости от возраста: побеги текущего сезона имеют коричневато-зелёный цвет, прошлогодние побеги – серовато-коричневые, а более старые – тёмно-коричневые. Как и у других видов, листья облепихи крушиновидной простые, короткочерешковые, цельнокрайние, имеют линейную форму с заострённой верхушкой и клиновидным основанием, длина варьирует от 2,0 до 8,0 см, а ширина не более 1,0 см. Окраска сверху от зелёной до серовато-зелёной, снизу – беловатая (из-за беловойлочного опушения) [61,141].

Так как облепиха – это двудомное растение, различают мужские и женские деревья (Рисунок 4). Мужские особи отличаются более крупными почками (в 2-3 раза) с 5-7 кроющими почечными чешуями (у женских их 2). Мужские и женские цветки облепихи мелкие, отличаются друг от друга по цвету. Цветки мужских особей невзрачные, окраска от серебристой до бурой, околоцветник зеленоватый или зеленовато-бурый (разделён на 2 части), собраны в колосовидные соцветия. Цветки женских особей более яркие, они жёлтого цвета с трубчатым околоцветником (также двураздельный), окрашенным в зеленовато-бурый цвет. Женские цветки собраны в пучки, расположенные в пазухах молодых побегов и колючек (до 11 штук в пучке). Плоды формируются только на женских растениях, однако, в редких случаях и на мужских. Такие плоды мелкие, недоразвитые, а выделенные из них семена имеют неправильную форму [61,70,148].



Рисунок 4 – Мужские и женские цветки облепихи крушиновидной

Для облепихи характерны нетипичные фенологические фазы жизни растения. Цветение начинается в апреле-мае, когда распускаются листья. Плоды расположены пучками и облепляют основания молодых и прошлогодних побегов. Массовое плодоношение наблюдается в августе-сентябре. Плоды облепихи – односемянные костянки округлой, яйцевидной, обратнойцевидной или продолговатой формы от золотисто-жёлтого до красно-оранжевого цвета. Форма и размер семени в плодах зависят от природно-географической зоны произрастания растения [141,148].

1.1.2. Описание внешнего вида сырья и растений облепихи различных видов

Облепиха относится к семейству *Elaeagnaceae* (Лоховые). Она включает в себя 3 вида: облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.), облепиха иволистная (*Hippophaë salicifolia* D. Don) и облепиха тибетская (*Hippophaë tibetana* Schlecht.).

Облепиха тибетская распространена в Гималаях, Индии, Непале и в горных областях Китая (Рисунок 5). Обитает в суровых условиях среды. Это кустарник высотой 10-15 см, от извилистого стебля отходят мелкие веточки, которые оканчиваются острыми колючками. Мелкие листья собраны в мутовки, цвет сверху серовато-зеленые, снизу серебристые от белых щитковидных чешуек. Крупные плоды имеют плоские семена. Характерным признаком этого вида является стержневая корневая система. Облепиха тибетская плохо изучена и отсутствует в культуре.



Рисунок 5 – Облепиха тибетская

Облепиха иволистная представляет собой небольшое дерево от 5 до 11 м высотой или кустарник от 2 до 4 м высотой. Растение имеет длинные свисающие ветви, покрытые колючками (Рисунок 6), а также простые очередные листья зелёного цвета с беловойлочным опушением с нижней стороны. Плоды – мелкие односемянные костянки, окрашенные в оранжево-жёлтый цвет. Растение распространено на южных склонах Гималаев, в районах Индии, Непала и Бутана, предпочитает хорошо увлажнённые места обитания. В культуру облепиха иволистная введена, но распространения не получила. Это связано с тем, что этот вид имеет очень мелкие плоды. Так как основным сырьём облепихи являются плоды, разводить облепиху иволистную считается нецелесообразным [61,141].



Рисунок 6 – Облепиха иволистная

Самым известным видом является облепиха крушиновидная. Разводится в садах и парках как декоративное растение, а также в качестве плодового растения. В зависимости от территории произрастания растение представляет собой либо кустарник, либо дерево высотой до 15 м, на ветках встречаются колючки, но встречаются особи и без колючек [141].

Основным сырьём, получаемым от растения, являются плоды. Они достаточно широко применяются в медицине, косметологии и пищевой промышленности.

По внешним признакам плоды представляют собой костянку с одним семенем, находящимся в кожистом эндокарпии. Размер плодов не превышает 10 мм, а форма может быть различной – от шарообразной, до вытянутой и овальной. Цвет околоплодника варьирует от жёлтого до тёмно-красного. Вкус плодов кисло-сладкий, семя продолговато-яйцевидной формы с бороздкой бурого цвета и длиной до 7 мм, а шириной не более 3 мм. Массовое созревание плодов – конец августа – начало сентября [61].

В настоящее время широко изучаются возможности применения отходов переработки плодов облепихи крушиновидной – семян, побегов, листьев и коры. Это позволит комплексно использовать растение, что соответствует принципам рационального использования природных ресурсов.

1.1.3. Морфологические особенности климатипов облепихи

Родина облепихи, как и семейства *Eleagnaceae*, – Восточная Азия, откуда она мигрировала, образуя обширный эколого-географический ареал обитания. Следовательно, растения произрастают в различных экологических условиях, которые отличаются климатическими факторами: продолжительности периода вегетации, особенности осенне-зимнего периода, количеству осадков и т.д. Под

влиянием климатических различий возникли 4 климатипа вида: сибирский, среднеазиатский, кавказский и прибалтийский [141].

Растения, относящиеся к сибирскому климатипу, распространены на территориях Забайкалья, Казахстанского Алтая, Саяно-Алтайского горного района. Характерными особенностями данного климатипа являются короткий период вегетации и морозостойкость. Из всех плодовых многолетних растений, произрастающих на юге Средней Сибири, самой устойчивой является облепиха, так как её потенциальная продуктивность превышает 70%. В данных климатических условиях выделены наиболее ценные по биохимическому составу сорта – Чуйская, Превосходная, Обильная и Солнечная. Методами гибридизации и селекции выведены 2 сорта облепихи, обладающих высокими адаптационными качествами, продуктивностью и комплексом биохимических показателей, - сорта Минуса (раннего срока созревания) и Солнечная (устойчивый к усыханию) [122,141]. Выведенные сорта позволяют обеспечить потребности в плодовых культурах районов Средней Сибири.

Среднеазиатский климатип включает в себя 3 экотипа, различающихся по форме, размеру и опушённости листьев, а также по размеру самого растения. Мелкие листья с опушением на верхней и нижней стороне листовой пластины связаны с произрастанием облепихи в условиях высоких температур и малого количества годовых осадков (наличие опушения способствует сохранению влаги). Для всех экотипов характерно наличие шипов и крючков на ветках растения. Более крупные и менее опушённые листья у облепихи, растущей на северных склонах гор. В высокогорьях Центральной части гор Тянь-Шаня встречаются карликовые формы облепихи. Внешние признаки растения могут быть различными в зависимости от места произрастания. Например, в долине реки Чыргакы на удалённых друг от друга участках листья имели разный размер, частоту встречаемости, растения отличались высотой и длиной побегов, а также размером и количеством плодов на одной особи. Это свидетельствует о том, что климатические факторы оказывают серьёзное влияние на морфологию облепихи [141,147].

Климатическим условиям Северного Кавказа и Закавказья соответствует кавказский климатип облепихи. Так как здесь наблюдается высокая температура при достаточном количестве осадков, растения представляют собой высокие деревья (до 12 м) с укрупнёнными листьями. В зоне полупустыни, где наблюдается недостаточное увлажнение (Северный Азербайджан), у растений листья мелкие и густоопушённые. В высокогорных районах, где возможны заморозки, облепиха имеет более короткий период вегетации, крупные и малоопушённые листья. Также характерна повышенная морозостойкость. Согласно исследованиям, облепиха кавказского климатипа имеет хорошую урожайность (до 2,6 кг с 1 экз.). Это важный показатель при заготовке ЛРС – плодов. Отмечается снижение верхнего предела распространения растения с 2700 до 2300 м над ур.м. Подобная тенденция не связана с климатическими условиями, а обусловлена антропогенным воздействием, в связи с чем требуется организация охраны и воспроизводства облепихи крушиновидной [31,141].

Прибалтийский климатип отличается низкорослостью и зимостойкостью. Распространён на южном побережье Балтийского моря. Следует отметить, что для данного климатипа характерны значительные показатели полиморфизма по форме листовых пластинок [141,156].

Так как облепиха крушиновидная имеет достаточно широкий ареал обитания, под действием климатических факторов происходит изменение не только морфологии растения, но и периодов вегетации, плодоношения, адаптационных особенностей. Изменения происходят не только под воздействием окружающей среды, но и антропогенных факторов. С целью увеличения продукции плодов и выделения наиболее приспособленных к климату особей, проводится селекционная работа, что также отражается на разнообразии экотипов и популяций облепихи в рамках одного климатипа.

1.1.4. Полиморфизм климатипов по форме листовых пластинок

В рамках одного климатипа облепиха крушиновидная представлена несколькими экотипами, в основе разделения которых лежат различия в морфологических признаках (размер и форма листовой пластинки, степень облиственности, форма жизни растения, степень опушенности, наличие колючек и т.д.). В исследованиях белорусских учёных рассчитан индекс формы листьев и описаны основные характерные признаки облепихи для каждого климатипа [141,149,156].

В результате выявлено, что у растений прибалтийского, южнокавказского и сибирского климатипов параметры листьев у мужских особей выше, чем у женских. Более отчетливо выражены эти различия по длине листа у прибалтийского климатипа, ширине листа — южнокавказского, сибирского климатипов. Такой морфологический параметр, как ширина листа, у мужских особей сибирского климатипа преобладает над женскими, что также подтверждается исследованиями Т.В. Шпитальной. Наиболее высокие показатели индекса форм листьев имеют мужские растения прибалтийского климатипа (14,0), а наиболее низкие — южнокавказского и северокавказского климатипов. Следует отметить, что индекс формы листа мужских особей значительно превосходил индекс женских. В связи с этим можно сделать вывод, что форма листа зависит не только от происхождения, но и от половой дифференциации растений облепихи крушиновидной. Вариация индекса формы листа говорит о изменчивости и приспособляемости растения к различным климатическим условиям [149,156].

Помимо формы и размера листовой пластины учёные выделяют ещё один диагностический признак разнокачественности облепихи — облиственность. В исследованиях Т. В. Шпитальной установлено, что на мужских особях листьев больше, чем на женских. Формирование и рост листьев верхушечных побегов протекает дольше по сравнению с боковыми. Эта закономерность характерна для особей как мужского, так и женского пола. Более ранним завершением роста и

развития листьев выделяется сибирский климатип, более поздним — северокавказский. Данное различие связано с климатическими условиями произрастания климатипов облепихи [149,156].

Степень выраженности полиморфизма может быть различной в зависимости от эколого-географического места произрастания облепихи крушиновидной. Для анализа полиморфизма впервые использованы межмикросателлитные маркеры, что позволило эффективно выявлять межпопуляционный полиморфизм облепихи. При исследовании использовались растения различных климатипов, сырьё которых заготовлено в РФ (Костромская, Ивановская, Волгоградская, Московская, Иркутская область и др.), Румынии, Польше, Австрии, Германии, Бельгии и Нидерландах. Общий уровень полиморфизма варьировал от 45,1% до 100,0% со средним уровнем 62,4%. Полученные данные свидетельствуют о высоком уровне генетического разнообразия вида [36].

В связи с вышеизложенным можно сделать вывод, что облепиха крушиновидная имеет высокий уровень полиморфизма, проявляющийся на генетическом уровне и обусловленный различием эколого-географического местообитания и, как следствие, приспособляемостью растения к климатическим условиям.

1.1.5. Места обитания, ареал, заготовка сырья

Облепиха крушиновидная – широко распространённое растение. В России введено в культуру более 150 лет назад. Облепиху можно встретить как в ботанических садах, на производственных плантациях, так и в качестве декоративного растения на дачных участках. Ареал обитания простирается от Западной Европы до Дальнего Востока.

В Западной Европе облепиха встречается в районах морских побережий, песчаных и горных рек. Наиболее северное местообитание – северо-западные

районы Норвегии. Облепиха крушиновидная распространена в таких европейских странах, как Польша, Германия, Дания, Бельгия, Голландия, вдоль побережья Падде-Кале и Ла-Манша во Франции, в юго-восточной части Великобритании (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Ареал распространения облепихи крушиновидной в странах Европы и Азии

На территории России облепиха часто образует большие заросли. На Северном Кавказе облепиха крушиновидная распространена на территории Дагестана и Кабардино-Балкарии в пойменных зарослях рек, в горах и на равнинах. В Закавказье облепиха встречается в Азербайджане, Армении и Грузии (Рисунок 8).

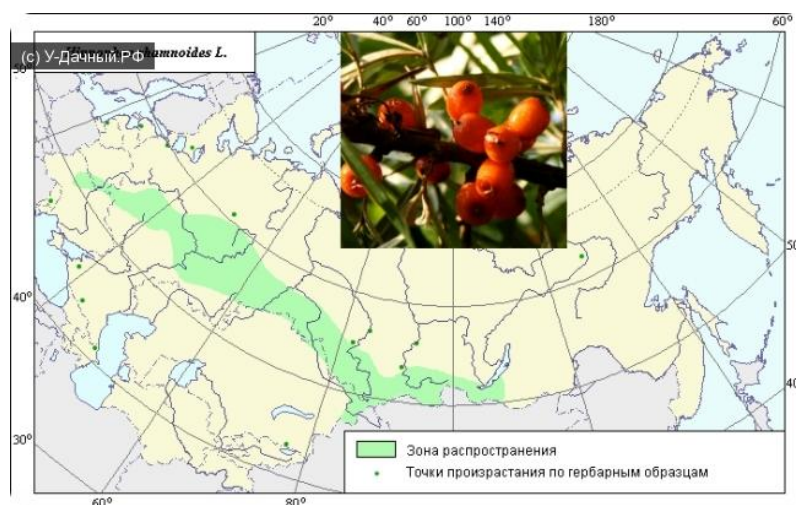


Рисунок 8 – Ареал распространения облепихи крушиновидной на территории России

В Средней Азии облепиха произрастает в долинах реки и по берегам озёр. На территории Казахстана облепиха крушиновидная распространена по горным рекам, образуя заросли совместно с лохом узколистным и тамарисками. В Малой Азии облепиха произрастает в Турции по побережью Чёрного моря, преимущественно в устьях рек. В пустынных и полупустынных районах не произрастает в связи с неблагоприятными климатическими условиями [141].

На территории Сибири облепиха распространена в Тыве, Бурятии и на Алтае и произрастает преимущественно в долинах степных рек, местами образуя крупные заросли. На состояние фитоценозов существенное влияние в этих районах оказывают антропогенные факторы (сбор плодов ветками, выпас скота, автомагистрали). Несмотря на негативные факторы облепиха не накапливает экотоксиканты в значительных количествах (не превышает предельно допустимых концентраций (ПДК)). В пойме реки Элегест Хохольского района определено благоприятное экологическое состояние фитоценозов облепихи [132,141].

В Кабардино-Балкарской Республике облепиха крушиновидная распространена в субальпийском, лесостепном и поясе остепнённых лугов. Ареал охватывает Баксанский, Терский, Черекский, Зольский, Урванский, эльбрусский и Чегемский районы. Облепиха произрастает на равнинах, в предгорных и горных районах (по берегам и в поймах рек). Растение образует заросли с другими древесно-кустарниковыми породами (тополь белый, ольха серая, шиповник собачий и баксанский, ежевика, слива колючая, мирикария прицветниковая). В исследованиях разных авторов описаны отличные друг от друга значения по верхнему пределу распространения облепихи. Он варьирует от 2000 до 2700 м над уровнем моря [31].

Для целей заготовки плодов облепиху культивируют. Основными центрами изучения и селекции облепихи являются: Ботанический сад МГУ, НИИСС им. М.А. Лисавенко, Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ГНУ ВНИИСПК, ГБС им. Н.В. Цицина РАН, Петербургский ботанический сад, и, особенно, ВИЛАР [12,30,58,71,121,141]. На территории ВИЛАР культивируется облепиха

крушиновидная для производства препарата «Гипорамин» на основе сухого экстракта листьев [71].

В промышленных масштабах облепиху крушиновидную выращивают с целью заготовки плодов – источник каротиноидов и жирного масла. Плоды являются официальным видом сырья и внесены в ГФ РФ XV издания [22]. Облепиха выращивается для заготовки плодов. Листья для переработки не используются. Это не отвечает принципам рационального природопользования, в связи с чем проводятся исследования по углубленному фитохимическому изучению других видов сырья облепихи.

Согласно вышеизложенному облепиха крушиновидная имеет достаточно широкий ареал обитания, что позволяет проводить исследования в различных эколого-географических зонах не только России, но и других стран. Заготовка листьев одновременно со сбором плодов позволит не только оптимизировать производственный процесс (снижение побочных продуктов) с минимальными затратами, но и способствовать расширению спектра применения облепихи крушиновидной и увеличению возможной сырьевой базы для производства ЛРП.

1.1.6. Сортовое разнообразие облепихи крушиновидной

Сортовое разнообразие облепихи крушиновидной связано с работой по селекции. В различных ботанических садах выведены гибриды с наилучшими свойствами (повышенная урожайность, высокое содержание БАВ, устойчивость к перепадам температур и т.д.). Большая работа проведена в Ботаническом саду МГУ в 1970-80-е годы. Гибридизация среди облепихи значительно облегчается её двудомностью и может быть широко применена при разных сочетаниях родительских пар, в частности происходящих из отдалённых частей обширного ареала. Путём скрещивания растений из различных эколого-географических зон

были выведены более 20 элитных форм с разными сроками созревания, достаточно высоким содержанием витамина С и масла.

Характеристика наиболее широко распространённых сортов растения приведена в Таблице 1.

Для всех выведенных в Ботаническом саду МГУ сортов характерна зимостойкость. Это обусловлено особенностями климата средней полосы России. Так как алтайская облепиха характеризуется достаточно разнообразным биохимическим составом с высоким уровнем БАВ, её часто использовали в селекционной работе.

Таблица 1 – Характеристика сортов облепихи крушиновидной

Сорт	Жизненная форма	Урожайность	Описание плодов	Содержание БАВ
Трофимовская	Зимостойкое деревце	Высокая (6-7 кг)	Крупные, округло-удлинённой формы оранжевой окраски с плотной кожицей и сочной мякотью плоды	Высокое содержание витамина С и жира
Солнечная	Зимостойкий кустарник	Высокая (до 7-8 кг)	Округлой формы, среднего размера, жёлто-оранжевого цвета с тонкой кожицей и сочной мякотью	-
Ботаническая любительская	Зимостойкое деревце	Высокая (6,5-7 кг)	Крупные, удлинённой формы, жёлто-оранжевой окраски с плотной кожицей и сочной мякотью. Вкус кисловатый со слабым ароматом	-
Отрадная	Зимостойкое дерево или кустарник	Высокая (до 8,5 кг)	Крупные, округлой слегка вытянутой формы красновато-оранжевого цвета с рыхлой мякотью	Высокое содержание жира и витамина С
Красноплодная	Зимостойкий среднерослый кустарник	Высокая (7-8 кг)	Средние, округлой неправильной формы красного цвета с сочной мякотью	Высокое содержание каротиноидов
Ботаническая ароматная	Зимостойкое деревце или кустарник	Средняя (5,5-6 кг)	Средние, округлой формы, оранжевые с сочной мякотью со слабо-кислым вкусом и ароматным запахом	Высокое содержание витамина С

Продолжение Таблицы 1

Перчик	Высокозимостойкий низкорослый кустарник	Высокая (6-7 кг)	Крупные продолговатоконические ягоды оранжево-красного цвета. Вкус кисло-сладкий со слабым ароматом	Высокое содержание витаминов
Воробьевская	Морозостойкое среднерослое деревце	Высокая (7-8 кг)	Крупные, удлинённо-овальные оранжево-красного цвета	Высокое содержание витамина С (до 220мг%)
Подарок саду	Зимостойкое сильнорослое дерево	Средняя (3-5 кг)	Крупные, удлинённо-овальные, тёмно-оранжевого цвета	Высокое содержание каротиноидов (49,5 мг%)
Московская прозрачная	Зимостойкий среднерослый кустарник	Высокая (более 16 кг)	Крупные, янтарно-оранжевые, кисло-сладкого вкуса	-
Финская	Зимостойкий сильнорослый кустарник	Высокая	Крупные, округло-овальные, тёмно-оранжевого почти красного цвета. Вкус кисловатый со слабой горечью	-
Московская ананасная	Зимостойкий кустарник	Высокая	Крупные, овальные, оранжево-красные с сочной ароматной мякотью	-
Рябиновая	Среднерослое дерево	Средняя	Средние, округло-овальные, оранжево-красные с кисло-сладким вкусом и ароматным запахом	Высокое содержание витамина С и каротиноидов
Университетская	Среднерослый кустарник	Высокая	Крупные, удлинённо-овальные, оранжевого цвета с мясистой, сочной мякотью. Вкус кисло-сладкий, запах слабый, ароматный	-
Ломоносовская	Среднерослый кустарник	Средняя	Крупные, овальные, оранжевого цвета; мякоть сочная, ароматная, кисло-сладкого вкуса	Высокое содержание витамина С
Нивелена	Среднерослый кустарник	Высокая (до 30 кг)	Крупные, округлой формы, оранжевого цвета. Вкус кисло-сладкий, запах ароматный, слабый	Умеренное, сбалансированное содержание БАВ

Продолжение Таблицы 1

Галерит	Низкорослый кустарник	Средняя (до 10 кг)	Крупные, округло-продолговатые, светло-оранжевые с красным пятном в основании с сочной мякотью, слабокислого вкуса и с ароматным запахом	Высокое содержание витамина С (105,7 мг%)
Менделеевская	Среднерослый кустарник	Средняя (15-16 кг)	Средние, округло-вальные, жёлтого цвета с характерным опушением	-
Краснокарминная	Среднерослый кустарник	Высокая (до 20 кг)	Средние, продолговатые, усечённые на вершине и вытянутые к плодоножке, красные с плотной кожицей	Высокое содержание витамина С, масла, каротиноидов
Дар МГУ	Среднерослый кустарник	Высокая (более 20 кг)	Крупные, округлые, янтарно-оранжевые кисло-сладкого вкуса	Высокое содержание БАВ
Гомельская	Среднерослый кустарник	Очень высокая (до 25 кг)	Крупные, округло-удлинённые, оранжево-красные с красным пятном на вершине. Вкус кисло-сладкий, ароматный	Высокое содержание БАВ

Алтайские сорта облепихи классифицируют по биохимическому составу. Данные представлены в Таблице 2 [30].

По данным таблицы 2 можно сделать вывод, что алтайские сорта облепихи имеют богатый биохимический состав. Ряд сортов (Алтайская, Теньга, Елизавета, Чечек, Чулышманка, Ажурная, Сибирская) являются перспективными источниками витамина С, а такие сорта, как Сударушка, Теньга, Елизавета, Чечек, Пантелеевская, имеют стабильно высокие показатели каротиноидов. Разработка алтайской облепихи является перспективным направлением исследований [24,29-30].

Таблица 2 – Биохимический состав плодов алтайских сортов облепихи [30]

Сорт	РСВ, %	Сумма сахаров, %	Титруемые кислоты, %	СКИ	АК, мг/100г	Каротин оиды, мг/100г	Масло, %
Чуйская (к)	10,2	5,9	1,6	3,9	77,6	13,2	5,2

Продолжение Таблицы 2

Августина	11,2	6,3	1,6	4,1	85,1	14,4	4,4
Ажурная	10,8	5,9	1,7	3,6	97,2	16,5	4,8
Алтайская	11,7	7,5	1,0	8,9	121,9	18,3	5,5
Джемовая	11,8	6,4	1,4	4,7	71,4	27,5	4,7
Елизавета	11,1	6,5	1,2	5,6	100,5	15,5	4,8
Жемчужница	11,4	6,4	1,2	6,0	64,0	18,3	4,9
Иня	11,1	5,8	1,8	3,2	83,6	17,7	5,5
Пантелеевская	10,9	6,3	1,6	4,0	89,1	20,4	4,7
Росинка	10,5	6,0	1,7	3,7	66,9	13,8	5,0
Руэт	12,2	6,8	1,7	4,1	75,7	-	4,9
Сентябринка	11,2	6,5	1,1	5,9	84,1	16,7	6,6
Сибирская	11,4	6,2	1,3	5,1	91,7	-	7,2
Сударушка	13,4	8,0	1,3	6,0	67,7	29,1	5,9
Теньга	13,4	6,9	1,3	5,6	120,5	28,2	6,0
Улала	10,4	5,8	2,0	3,3	92,8	-	5,0
Чечек	8,9	4,7	1,4	3,3	100,8	20,4	5,7
Чулышманка	12,4	6,7	1,5	4,7	100,3	21,0	5,5
Эссель	12,0	7,2	1,0	7,3	55,2	16,6	4,8

В условиях остепнённой зоны Прибайкалья наибольшая урожайность и приспособленность к условиям климата отмечена для сортов Чуйская, Превосходная и Обильная. На протяжении 20-тилетних исследований они показали наилучшие результаты [120].

Для юга Средней Сибири характерны сорта, устойчивые к усыханию и обладающие высокой урожайностью. Селекционерами выведены следующие сорта: Обильная, Превосходная, Чуйская, опылитель Алей, Новость Алтая, сорт Минуса, Солнечная, Самородок, Пантелеевская, Дар Катуня, Великан, Отрадная, Перчик, Подарок сада, Ацула, Саяна, Аяганга, Подарок Черноземью, Золотистая Сибири. Выращивание облепихи в промышленных масштабах позволит обеспечить население в аридной зоне Саянского субрегиона России и смежных территорий Монголии высоковитаминной продукцией [122].

Бурятские сорта (Туранская, Ацула, Саяна, Тасхановская, Нарантуя, Байкальский рубин, Сократовская, Память Захаровой, Заря Дабат, Сарантуя) облепихи отличаются низкорослостью, сладкоплодностью и высоким содержанием витаминов, особенно аскорбиновой кислоты. Такие особенности обусловлены экстремальным климатом Бурятии (перепады температур, возможная засуха) [15].

Согласно литературным данным облепиха крушиновидная имеет богатое сортовое разнообразие, связанное с эколого-географическими местами произрастания. Селекционеры проводят обширные исследования по выведению новых сортов, отвечающих необходимым требованиям: высокая урожайность, достаточный уровень БАВ, приспособленность к особенностям климатической зоны и т.д.

1.1.7. Вегетационный период различных сортов в условиях средней полосы России

В условиях средней полосы России культивируются сорта, выведенные в различных регионах. Их происхождение оказывает влияние на вегетационный период облепихи крушиновидной.

Облепиха, в отличие от других растений, имеет специфическую смену фаз вегетации. Основная особенность – это цветение до распускания листьев. Вопрос о количестве фенологических фаз и их календарных сроках в литературе остаётся дискуссионным. Разные авторы [58,150] дают неодинаковые данные. Наиболее полно характеризуют жизненный цикл растения следующие фенологические фазы: 1) набухание почек, 2) распускание почек, 3) появление листьев, 4) распускание листьев, 5) полная облиственность, 6) начало бутонизации, 7) массовая бутонизация, 8) начало цветения, 9) массовое цветение, 10) завязывание плодов, 11) пожелтение листьев, 12) листопад. Согласно результатам исследований, облепиха Алтайской вариации имеет довольно продолжительный период вегетации – около 260 дней. Начало вегетации относят к марту, когда начинают набухать почки, а окончание – к ноябрю, когда опадают листья. На начало, окончание и длительность вегетационного периода оказывают влияние такие климатические факторы, как влагообеспеченность, годичный температурный режим и длительность зимнего периода. Следует отметить, что при выращивании в средней полосе России

Алтайских сортов облепихи крушиновидной, наблюдается более раннее созревание плодов (на 10-12 дней раньше), чем у местных сортов. Это связано с более тёплыми по сравнению с Алтаем климатическими условиями и, как следствие, более коротким циклом развития [58,150].

Для сортов, выведенных непосредственно в средней полосе России, характерен более короткий период вегетации – до 200 дней. Это связано с невысоким уровнем зимостойкости по сравнению с Алтайскими сортами. Характерно раннее наступление фазы опадания листьев (середина сентября – конец октября). Продолжительность вегетационного периода колеблется от 184 до 199 дней. У раннеспелых сортов (Ранний столовый, Стартовая, Подарок Черноземью) он наименьший – 182-186 дней, у среднеспелых (Золотая коса, Желтоплодная, Байкал, Дончанка) – 191-194 дня, а у позднеспелых (Кенигсбергская, Морячка, Сюрприз Балтики) наибольший – 196-199 дней. Разница в продолжительности связана с началом фазы созревания плодов и, соответственно, фаза опадания листьев также варьирует. Следует отметить, что начало вегетации у сортов в условиях средней полосы России отличается лишь незначительно [11].

Значительное влияние на рост побегов и формирование листьев облепихи оказывает уровень влагообеспеченности. В условиях умеренного полива отмечается хороший прирост побегов (5,8 см), а в условиях дефицита влаги рост побегов и листьев угнетается на 23-24%. С увеличением высоты произрастания (3000 м над ур. моря) наблюдается угнетение фазы роста побегов. Подобные явления связаны с экстремальными климатическими условиями [65].

Облепиха крушиновидная отличается неприхотливостью. Она способна расти как в условиях хорошей влагообеспеченности, так и на сухих песчаных почвах. Годовые перепады температур также не страшны для неё, так как она является достаточно морозостойкой культурой. Однако, следует отметить, что, несмотря на возможность произрастания даже в условиях экстремального климата, климатические условия средней полосы России являются оптимальными для роста, развития и высокой урожайности различных сортов облепихи. Лучший рост наблюдается на лёгких песчаных, свежих и влажных почвах на открытых

солнечных местах. Благоприятные условия произрастания играют важную роль в селекционной работе, так как селекционерам не требуется работать над выведением сортов с такими свойствами, как засухоустойчивость, морозостойкость и т.д. Основное направление – повышение урожайности облепихи и увеличение накопления ценных групп БАВ [6,75].

В зависимости от происхождения семян облепихи растения, выращенные в средней полосе, имеют внешние различия. Например, облепиха, выращенная из алтайских семян, имеет плотный початок плодов на приросте прошлого года, а также имеются новые побеги. Облепиха, выращенная из семян Северной Осетии, оказалась менее зимостойкой, в результате чего отмёрзла верхняя часть прироста прошлого года. Плоды располагаются у основания побегов. Для растения, выращенного из Калининградских семян, характерно высокое содержание витамина С (более 300-400 мг%) [141].

Согласно вышеизложенному, вегетационный период сортов облепихи крушиновидной тесно связан с их местом произрастания. Следует отметить, что условия средней полосы России хоть и являются достаточно оптимальными, но в условиях холодных зим некоторые недостаточно зимостойкие сорта отмерзают, что сказывается на фазах развития и дальнейшего плодоношения. Проводится обширная селекционная работа во всех эколого-географических районах по выведению сортов, наиболее устойчивых в климатических условиях региона произрастания. Это является необходимым условием обеспечения сырьевой базы облепихи крушиновидной для заготовки ЛРС.

В промышленных масштабах облепиху крушиновидную выращивают с целью заготовки плодов – источника каротиноидов и жирного масла. Следует отметить, что при заготовке плодов листья также подвергаются сбору (побочный продукт), но дальнейшей переработке не подвергаются, что не отвечает принципам рационального использования природных ресурсов. Заготовка листьев одновременно со сбором плодов позволит не только оптимизировать производственный процесс (снижение побочных продуктов) с минимальными

затратами, но и способствовать расширению спектра применения облепихи крушиновидной и увеличению возможной сырьевой базы для производства ЛРП.

1.2. Фитохимический состав листьев облепихи крушиновидной

1.2.1. Определение биологически активных веществ в листьях растения облепихи крушиновидной

Согласно литературным данным химический состав облепихи зависит от климатических условий произрастания, сортовой и половой принадлежности растений, способа и условий заготовки ЛРС [3,79].

Основным БАВ листьев облепихи является полифенольный комплекс, состоящий из галло- и эллаготанинов, флавоноидов и фенолокислот, основными компонентами которого являются: кверцетин, нарциссин, рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, стриктинин I, изостриктинин, казуариктин и казуаринин [1,8,78-79,164,171].

С помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ в сочетании с детекцией на диодной матрице идентифицирован ряд фенольных соединений, таких как катехин, эпикатехин, галловая, п-кумаровая, кофейная и феруловая кислоты, рутин и кверцетин. Отмечается, что полифенольные профили меняются в процессе развития листьев, а именно варьирует их концентрация в сырье. Установлено, что для наиболее полной экстракции фенольных соединений в качестве экстрагента следует использовать 75% спирт этиловый. Важно отметить, что метод обращённо-фазовой ВЭЖХ в сочетании с детекцией на диодной матрице является валидированным для одновременного анализа девяти фенольных кислот, включая галловую, протокатехиновую, п-гидроксibenзойную, ванильную, салициловую, п-кумаровую, коричную, кофейную и феруловую кислоты в плодах и листьях

облепихи крушиновидной. Концентрации этих кислот (в свободной форме) в листьях составили: галловая – $689 \pm 13,6$; протокатехиновая – $16 \pm 1,8$; п-гидроксibenзойная – $144 \pm 6,6$; ванильная – $17 \pm 1,7$; коричная – $122 \pm 0,5$; п-кумаровая – 1; феруловая – $44 \pm 2,9$ и кофейная – $18 \pm 1,9$ мг/кг сухого сырья. Салициловая кислота в листьях не обнаружена [166,169,181].

Фитохимическим скринингом также были выявлены такие соединения, как дубильные вещества, флавоноиды, углеводы, тритерпеновые соединения, а также алкалоиды. По данным авторов они извлекаются из сырья петролейным эфиром, хлороформом и этилацетатом [182]. Важно отметить, что большинство российских и зарубежных источников [1,3,5,8,78-79,124,153,164,169,171,177-178,181] исключают присутствие алкалоидов среди групп БАВ, обнаруживаемых в листьях облепихи. Для достоверности определения требуются дополнительные исследования по выявлению алкалоидов в сырье.

В ряде российских и зарубежных исследований определение фенольных соединений проводили методом ТСХ с предварительным проведением качественных реакций. При анализе УФ-спектров этанольных элюатов выявлены флавоноиды группы флавана (катехины). Хромато-масс-спектрометрически в качестве основных компонентов листьев определены рутин и нарциссин. Увеличения концентрации полифенольных соединений возможно за счёт микоризации облепихи. В результате содержание полифенолов увеличивается на 7% [3,5,124,153,177-178].

При оценке биохимического состава других частей облепихи (побеги, кора, семена, цветки) выявлено, что листья женских и мужских растений в большей степени накапливают общие фенолы ($165,76$ и $123,78$ мг/г сухого сырья соответственно), и в меньшей степени в сравнении с цветками флавоноиды ($36,47$ и $81,72$ мг/г сухого сырья соответственно) [178]. В связи с чем облепиху крушиновидную рассматривают в качестве перспективного источника различных морфологических групп сырья, богатых комплексом БАВ.

При использовании обращённо-фазовой ВЭЖХ зарубежными учёными установлена концентрация таких флавоноидов, как кверцетин-3-галактозид,

кемпферол и изорамнетин и составляет от 170 до 430 мг/г, от 11 до 46 мг/г и от 24 до 113 мг/г соответственно. Степень извлечения зависит от температурного режима и метода экстракции. Наилучшие показатели были достигнуты методом подкритической экстракции водой при температуре 150°C. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности данного метода экстракции и возможности его практического применения [178,187].

Дубильные вещества, как часть фенольного комплекса БАВ листьев, являются соединениями, которые легко подвергаются окислительным процессам. Количественное содержание определяли по оксидиметрической методике. Содержание дубильных веществ может сильно варьировать в зависимости от фазы заготовки листьев, эколого-географического местообитания и антропогенных факторов в пределах от 8,43 до 10% [1,3,5].

Присутствие в сырье тритерпеновых соединений (урсоловая кислота, β -ситостерин, смесь α -амирина с лупеолом и циклоартеолом) установлено по результатам качественных реакций, проводимых с извлечением из сырья, а также методом ТСХ. Количественная оценка гексанового извлечения листьев проводилась методами хромато-масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Преобладающим тритерпеновым соединением является β -ситостерин (6,9% от массы экстракта), находящимся в экстракте преимущественно в свободном виде [1,3,59].

Содержание каротиноидов в листьях значительно меньше, чем в плодах (3,5-4,2 мг/100 г сырья и 53-97 мг/100 г сырья соответственно). Для извлечения из ЛРС каротиноидной фракции использовали в качестве экстрагента ацетон. Данным растворителем также хорошо подвергаются экстракции хлорофиллы. Для более полного извлечения токоферолов экстракцию проводили гексаном. По результатам спектрофотометрического определения (200-800 нм) концентрация каротиноидов в листьях составляет до 130 мг%, хлорофиллов – до 500 мг%. Содержание токоферолов, определяемых методом ВЭЖХ, составило более 1000 мг% в масле из листьев женских растений и до 1000 мг% в масле из листьев мужских растений. Следует отметить, что в обоих растениях преобладающим является α -токоферол –

наиболее активная форма токоферола (в женских – 1103 мг%; в мужских – 716 мг%) [3,67,126,170].

Листья облепихи также богаты жирными кислотами. При определении их состава в гексановом извлечении применяли методы хроматомасс-спектрометрии и ВЭЖХ. Установлено наличие в сырье насыщенных и ненасыщенных (миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, арахидовая, бегеновая, лигноцериновая), мононенасыщенных (пальмитолеиновая, олеиновая) и полиненасыщенных (линолевая, линоленовая) кислот, среди которых преобладают полиненасыщенные (47,45%). В большей степени накапливаются пальмитиновая, α -линоленовая и урсоловая кислоты (19,16, 16,66 и 11,95% от массы фракции соответственно). В отличие от динамики накопления каротиноидов и хлорофиллов, жирные кислоты в большей степени накапливаются в листьях мужских растений [10,67,153,176].

Листья облепихи имеют богатый минеральный состав. С использованием атомно-эмиссионного спектрографического метода установлено, что листья облепихи накапливают и макро- и микроэлементы. Среди макроэлементов преобладают калий и кальций, из микроэлементов – железо и цинк. Поскольку макро- и микроэлементы играют важную роль в нормальной жизнедеятельности организма листья облепихи можно рассматривать в качестве перспективного источника минеральных соединений. Методом ВЭЖХ проанализирован минеральный состав 8 сортов облепихи крушиновидной. Содержание цинка в листьях составило в среднем от 0,5 до 2,02 мг/г, железа – от 1,6 до 3,01 мг/кг, меди – от 0,34 до 0,81 мг/кг. Следует отметить, что листья, в отличие от плодов, накапливают значительно больше биогенных элементов. Это объясняется защитной функцией листьев, а также восходящим током веществ. В следствие этого наблюдается зависимость между уровнем накопления элементов в листьях и плодах. Также выявлена гендерная, сортовая и сезонная изменчивость содержания элементов в листьях. С целью увеличения накопления макро- и микроэлементов проводятся исследования по микоризации облепихи. Это позволило улучшить

пищевую ценность облепихи за счёт повышения концентрации кальция, натрия, железа и хрома [12,38,121,177].

В литературе описано определение и других групп БАВ, таких как витамины (А, Е, К, С, витамины группы В), бифлавоноиды, органические и аминокислоты. Из аминокислот листья облепихи содержат серотонин (1,1-2,5 мг%). При исследовании радиационной чувствительности водного экстракта листьев выявлено, что серотонин в комплексе с другими БАВ обладает высокой радиационной чувствительностью. С целью повышения акцепторных свойств серотонина необходимо подвергать сырьё сильному измельчению, так как установлена зависимость между размером частиц листьев и уровнем радиационной чувствительности. Кроме того, введение цинка дополнительно увеличивает акцепторные свойства серотонина в 2,3 раза. По результатам подобных исследований можно говорить о перспективности применения листьев облепихи в качестве радиопротективного средства [1,7,157,188].

По витаминному составу в листьях облепихи достоверно установлено наличие витаминов Е и С, а также каротина. Концентрация витамина Е и каротина составляет около 16 мг% и 4,5 мг%, соответственно. Высокие показатели характерны для аскорбиновой кислоты. В сырье она обнаруживается в концентрации 1,8-2,4 г/100 г сырья. Присутствие аскорбиновой кислоты в листьях на высоком уровне позволяет предположить наличие антиокислительной активности препаратов на их основе [1,4,151].

В литературе описано определение витаминов группы В. Основными представителями являются тиамин и рибофлавин, содержание которых составляет 0,034 и 0,029 мг% соответственно [153]. Данная группа БАВ недостаточно изучена в листьях облепихи и требует дополнительных исследований.

Согласно вышеизложенному листья облепихи крушиновидной являются перспективным видом ЛРС. Целевыми группами БАВ можно выделить фенольные соединения, такие как дубильные вещества и флавоноиды, а также богатый минеральный состав (макро- и микроэлементы). Комплексный состав БАВ обуславливает широкий спектр возможных видов фармакологической активности,

что свидетельствует об актуальности проведения скрининговых поисковых исследований *in silico*, *in vivo* и *in vitro* для выявления перспективных направлений для дальнейшей разработки ЛРП на основе листьев облепихи крушиновидной.

1.2.2. Динамика накопления биологически активных веществ в листьях различных фаз вегетации

Изменение химического состава в различных органах растения в процессе роста и развития является закономерным. Часть соединений являются первичными, в процессе вегетации они подвергаются химическим превращениям (гидролиз, окисление и т.д.) и в результате образуются вещества вторичного синтеза. Состав БАВ изменяется как в плодах, так и в листьях облепихи. В исследованиях минерального состава установлено, что содержание золы в листьях, собранных летом, ниже, чем в листьях, собранных осенью (6,50 и 7,60% соответственно). Данный уровень коррелирует с показателями в плодах (3,60 и 4,20% соответственно). Атомно-эмиссионным спектрографическим методом определены основные макро- и микроэлементы. Степень их накопления также коррелирует с содержанием золы в листьях, собранных в разные периоды вегетации. Отмечается значительное накопление калия, кальция, кремния, магния и натрия. В листьях, заготовленных осенью, содержание перечисленных элементов выше, но их концентрация по отношению друг к другу изменяется незначительно. Следует отметить, что в сравнении с плодами, листья, заготовленные осенью, в количественном отношении характеризуются наибольшей суммой минеральных веществ [38,119].

Согласно данным литературы, листья облепихи богаты различными фенольными соединениями, среди которых флавоноиды и дубильные вещества. Методом ВЭЖХ-МС установлены основные фенольные соединения – катехин, кемпферол, кверцетин, эпигаллокатехин, кемпферол-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-

галактозид, изорамнетин-3-О-глюкозид, рутин, галловая кислота, гликозид мономера процианидина, агликон димера процианидина и гидролизуемые дубильные вещества. В зависимости от периода заготовки содержание этих соединений изменялось. При анализе трёх сортов облепихи крушиновидной («Любительская», «Отрадная», «Гибрид Перчика») выявлено, что содержание общих фенольных соединений колебалось в течение апреля, мая и июня, а затем увеличивалось до конца июля (максимальный уровень накопления). Общее количество фенольных соединений сильно коррелировало с антиоксидантной активностью. Это связано с их высокой антиокислительной способностью. В сорте «Любительская» гидролизуемые дубильные вещества встречались в больших количествах, чем в любом другом изученном сорте растения. Выявленная закономерность изменения концентрации фенольных соединений объясняется тем, что в процессе жизнедеятельности растения все синтетические процессы протекают достаточно активно. К моменту массового плодоношения (конец августа – начало сентября) интенсивность этих процессов значительно снижается, а также активируются и процессы гидролитического разложения, а также окисления и восстановления. Это всё приводит к разрушению фенольных соединений [171].

В ряде зарубежных исследований выявлено, что уровень фенольных соединений коррелирует с фазой вегетации. Методом ГХ-МС установлено наличие фитостеролов в концентрации от 208 мг/100 г до 432 мг/100 г листьев, причём их содержание в течение вегетационного периода увеличивалось. Основными фитостеролами являются ситостерин и амирины. Следует отметить, что 5-авеностерол обнаруживался только в молодых листьях, что свидетельствует о его превращении в процессе вегетации. Для определения флавонолов использовали метод ВЭЖХ после кислотного гидролиза. Основными представителями флавонолов в листьях облепихи являются изорамнетин, кампеферол и кверцетин. Общее содержание флавонолов было высоким и довольно стабильным, варьируя от 562 мг/100 г до 647 мг/100 г. Самое высокое содержание было определено в листьях, заготовленных в июле. В целом, это исследование подтвердило, что листья облепихи являются богатым источником многих БАВ, включая фитостеролы и

флавонолы [178]. Мониторинг временных изменений полифенольных соединений с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ показал, что катехин, эпикатехин и галловая кислота преобладают в однолетних зеленых побегах и листьях, и их содержание значительно варьируется в течение периода вегетации [181].

Накопление белковых соединений листьями облепихи коррелирует не только с фазой вегетации, но и сортовой принадлежностью. Зарубежными учёными проведены исследования по определению содержания растворимых белков в листьях пяти сортов облепихи («Аураш», «Сильвия», «Серпента», «Тибериу» и «Виктория»), заготовленных в период с мая по сентябрь. Результат показывает, что содержание растворимого белка в листьях облепихи зависит от сортовой принадлежности и момента сбора урожая. Наибольшее количество растворимого белка было обнаружено в мае в листьях сорта «Тибериу» (2,5 мг/г), а наименьшее количество было обнаружено у сорта «Аурас» (0,97 мг/г) в июне. По периодам заготовки отмечается максимальный уровень белка в мае и минимальный – в июне. Далее происходит стабилизация концентрации до средних значений. Это объясняется тем, что белки в качестве питательных веществ участвуют в формировании плода и на момент начала плодоношения отмечается резкое снижение уровня белков в листьях. Благодаря процессам биосинтеза их концентрация стабилизируется и держится приблизительно на одном уровне в фазе массового созревания плодов [190].

В соответствии с вышеизложенным, концентрация различных БАВ тесно связана не только с фенологической фазой облепихи, но и с сортовой принадлежностью. Следует отметить, что по всем соединениям выявлена определённая закономерность – к окончанию вегетационного периода концентрация БАВ значительно снижается. Это связано с деструктивными процессами, которые интенсифицируются в растении после созревания плодов.

1.2.3. Накопление экотоксикантов в листьях облепихи крушиновидной

Помимо БАВ листья облепихи накапливают экотоксиканты – токсичные вещества, попадающие в окружающую среду в результате антропогенного воздействия. Примером таких соединений служат тяжёлые металлы (Hg, Pb, Cd). Степень их накопления коррелирует с показателем «Зола общая». Это связано с тем, что с кислотой хлористоводородной тяжёлые металлы образуют нерастворимые комплексы. В исследованиях Л.С. Науменко с соавторами определено содержание золы общей листьев облепихи – 6,50%. Методом атомно-эмиссионной спектроскопии установлен микроэлементный состав, который включает никель, свинец и молибден. При данном уровне золы общей содержание тяжёлых металлов не превышает установленных нормативов и составляет 0,13, <0,03 и 0,06 мг/100 г, соответственно [38].

Степень накопления тяжёлых металлов в сырье тесно взаимосвязана с уровнем этих соединений в почве. При сравнении способности к поглощению и накоплению веществ сырьём облепихи установлено, что листья накапливают значительно большее количество хрома, чем другие виды растений. Следует отметить, что сырьё облепихи не склонно к накоплению свинца. Однако, при его достаточно высоком уровне в почве, следует ожидать повышения его уровня в органах растения. Несмотря на это, концентрация химических элементов в сыром сырье (мг/кг) не превышает суточной нормы потребления (СНП) взрослого человека [121].

Такие элементы, как цинк и медь, являясь микроэлементами, при высоких концентрациях могут быть токсичными. В разных источниках степень их накопления в листьях различна и варьирует от 0,5 до 4,0 мг/кг для цинка (СНП – 12 мг) и от 0,34 до 0,5 мг/кг для меди (СНП – 1 мг). Такой разброс связан со степенью загрязнённости почвы, местом произрастания растения, а также и с сортовой принадлежностью облепихи. Следует отметить, что концентрация элементов в листьях в 1,5-2 раза выше, чем в плодах. Это говорит о защитной функции листьев.

Учитывая СНП, можно сделать вывод, что облепиха не накапливает тяжёлые металлы в токсичных для организма человека концентрациях [12,74,112,119,121].

Большое значение имеет влияние токсичных элементов на накопление БАВ. В одном из исследований установлена высокая взаимосвязь между накоплением никеля и уровня каротиноидов. Коэффициент корреляции исследуемых элементов $r_{Pb/Ni} = +0,7$, элементов в листьях и плодах – $r_{Pb \text{ лист/плод}} = +0,5$, $r_{Ni \text{ лист/плод}} = +0,6$ и накоплением никеля и каротина $r_{Ni/каротин} = +0,6$. Это свидетельствует о барьерной функции вегетативных органов растения [72].

Установить содержание экотоксикантов возможно рентгенофазовым анализом. На исследование отбирается не только проба сырья, но и почвы для установления связи между уровнем элемента в почве и степенью накопления в сырье. Г.М. Скуридиным с соавторами впервые рассчитаны коэффициенты биологического поглощения (КБП), на основании чего выделены элементы высокого поглощения (КБП более 100%) и элементы «отторжения» (КБП менее 10%). Выявлено, что листья интенсивно поглощают ниобий (КБП до 1900%), биологическая роль которого не установлена. Незначительный уровень поглощения характерен для токсичных элементов – свинца (КБП от 9 до 31%) и мышьяка (КБП от 28 до 64%), что свидетельствует о природной толерантности облепихи к данным экотоксикантам [69,119,159].

Подводя итог вышеизложенному, накопление экотоксикантов в листьях облепихи крушиновидной не превышает установленных нормативов. При выращивании на экологически благополучных территориях уровень токсичных элементов в сырье будет снижаться.

Целевыми группами БАВ можно выделить фенольные соединения, такие как дубильные вещества и флавоноиды, а также богатый минеральный состав (макро- и микроэлементы). Накопление различных соединений в течение периода жизни листовой пластинки вариabельно и зависит от сортовой принадлежности, пола растения и эколого-географических условий культивирования.

Накопление экотоксикантов в листьях облепихи крушиновидной не превышает установленных нормативов. При выращивании на экологически

благополучных территориях уровень токсичных элементов в сырье будет снижаться.

1.3. Фармакологические свойства листьев

В настоящее время проведён широкий спектр исследований фармакологической активности листьев как на территории России, так и за рубежом. Для выявления свойств используют различные способы выделения БАВ, такие как экстракция различными растворителями, а также получение сухих экстрактов [91,183].

В ряде исследований установлено, что листья облепихи крушиновидной содержат полифенольный комплекс (фенольные соединения, флавоноиды, фенольные кислоты) и витамин С. Именно БАВ в растении отвечают за проявление фармакологической активности. Так как облепиха очень богата различными соединениями, то и спектр активности у неё достаточно широкий. Активно изучаемые полифенолы, например, обуславливают наличие, в первую очередь, антиоксидантной активности [78,164].

Среди ЛП и БАДов, обладающих АОА, присутствуют как синтетические, так и растительные. В качестве примера могут служить «Мексидол», «Кудесан», «Дибикор», «Капилар», «Хофитол» и др. Как отмечалось выше, в растительных ЛП АОА связана с соединениями фенольной природы, такими как флавоноиды и фенольные кислоты. Для синтетических препаратов с АОА характерно наличие в структуре фенольных гидроксильных и сульфгидрильных групп [161].

Достаточно актуальным является изучение и разработка препаратов с антиоксидантными свойствами, так как развитие многих заболеваний (сердечно-сосудистых, ревматоидных, воспалительных) обусловлено окислительным стрессом в организме человека. Преимущество растительных препаратов заключается в их богатом химическом составе и, как следствие, комплексной

фармакологической активностью. Следует изучать новое ЛРС и вводить его в медицинскую практику.

Примером оценки АОА листьев облепихи электрохимическими методами являются исследования Тарасова А.В. с соавторами, в котором потенциометрически установлена АОА водных экстрактов листьев облепихи. В результате выявлено, что наибольшую АОА проявляют свежеприготовленные экстракты листьев, а величина АОА пропорциональна выходу экстрактивных веществ. Подобную взаимосвязь можно объяснить тем, что при хранении водных экстрактов часть БАВ могут осаждаться, подвергаться окислительным процессам под действием света, кислорода и углекислоты воздуха, а также микробной контаминации. Совокупность этих факторов и приводит к снижению АОА [131].

В исследованиях *in vitro* проводилось изучение влияния экстрактов листьев и плодов на процессы перекисного окисления в гепатоцитах крыс и на осмотическую резистентность эритроцитов. Установлено, что экстракты проявляли выраженную мембраностабилизирующую и антиокислительную активность [37]. Фенольные соединения, входящие в полифенольный комплекс, также проявляют и адаптогенную активность. В опытах *in vivo* на модели стресс-индуцированной гипотермии и гипоксии (5°C; 428 мм. рт. ст.) путём перорального введения водного экстракта листьев облепихи (за 30 мин., доза 100 мг/кг массы тела крысы) установлена устойчивость к гипотермии, а также ускоренное восстановление после неё. Это свидетельствует о наличии выраженной адаптогенной активности [163]. Проведённые зарубежные исследования *in vivo* по оценке влияния спиртового (70%), водного и сухого экстрактов листьев облепихи (пероральное введение в дозе 100-500 мг/кг массы тела животного) на крыс свидетельствуют о повышении работоспособности и активности животных в различных стрессовых ситуациях (шум, яркий свет, поражение электрическим током) [185]. Это также доказывает наличие адаптогенной активности.

В зарубежных исследованиях *in vivo* на модели хром индуцированного окислительного стресса крыс установлено, что спиртовой экстракт листьев облепихи в дозах 100 и 250 мг/кг массы тела животного, введённый перорально,

ингибировал вызванное хромом увеличение малонового диальдегида в плазме и восстанавливал уровень глутатиона [175]. В другом исследовании проводилось сравнение антиокислительной активности экстрактов и отвара листьев облепихи. В результате установлено, что экстракты оказывают более выраженный антиокислительный эффект [173]. При сравнительной оценке антиокислительной активности спиртовых (75%) экстрактов листьев облепихи мужских и женских растений установлено, что мужские растения обладают более выраженной активностью, чем женские. Кроме того, в спиртовом экстракте мужских листьев уровень полифенолов и β -ситостерола значительно выше и составляет 398,86 мг/г и 1,77 %, соответственно [172].

Методом *in vivo* проведена оценка ранозаживляющих свойств БАВ из листьев облепихи. Доклинические исследования выполнялись на крысах с использованием модели кожной раны с иссечением. Водный лиофилизированный экстракт из листьев различных концентраций (0,5, 1,0 и 1,5%), приготовленный в пропиленгликоле, применяли местно дважды в день в течение 7 дней. Повреждённые ткани раны иссекали на восьмой день после ранения и определяли содержание гидроксипролина, гексозамина, общего белка и уровни антиоксидантов. Площадь раневой поверхности также измеряли на восьмой день после иссечения раны, чтобы определить её сужение. Местное применение 1,0% экстракта листьев облепихи статистически значимо усилило процесс заживления, о чем свидетельствует увеличение содержания гидроксипролина и белка, а также уменьшение площади раны по сравнению с аналогичными эффектами в ответ на лечение с использованием повидон-йодной мази (стандартный уход). Результаты показывают, что водный экстракт листьев облепихи способствует заживлению ран, что может быть связано с повышением уровня антиоксидантов в повреждённой ткани [162].

В других источниках описано влияние на заживление ожоговой раны. В данном случае по аналогичной схеме применяли 5,0% водный экстракт листьев облепихи. Эффективность экстракта авторы связывают не только с

антиоксидантной активностью, но и с увеличением синтеза коллагена и усиленным ангиогенезом в месте повреждения [179].

При исследованиях *in vivo* на модели адьювантно-индуцированного артрита крыс установлена иммуномодулирующая и противовоспалительная активность листьев. Наличие противовоспалительной активности авторы связывают со снижением проницаемости стенок сосудов, агрегации лимфоцитов из синовиальной жидкости, подавлением пролиферации лимфоцитов, а также с ингибированием усиленной выработки оксида азота (NO), индуцируемой липополисахаридами в клетках макрофагов [174,184]. Экстракт вводили внутривентриально (в дозах 50, 100, 200 и 400 мг/кг массы тела животного) ежедневно в течение 28 дней. Исследование пролиферации лимфоцитов выявило клеточную иммуносупрессию на ранней стадии заболевания. Введение экстракта листьев в тот же день или за 5 дней до воспалительного поражения сустава значительно уменьшало воспаление по сравнению с необработанными животными дозозависимым образом.

Эти наблюдения свидетельствуют о том, что экстракт листьев облепихи обладает значительной противовоспалительной активностью и обладает потенциалом для лечения артрита [165].

При разработке нового ЛРП всегда встаёт вопрос о безопасности применения и возможной токсичности. В исследованиях *in vivo* проводили оценку возможного токсического влияния на кожу и цитотоксичность лиофилизированного водного экстракта листьев облепихи крушиновидной. В тестах на острую токсичность при подкожном введении экстракта в дозе 5 г/кг массы тела крысы не выявлено ни гибели особей, ни признаков раздражения кожи (эритема, отёк). При подкожном введении экстракта в дозе 1 г/кг/сут в течение 28 дней также не наблюдалось существенных изменений в массе животных, органах и в биохимии крови. Отсутствие изменений в тканях подтверждено гистологическими исследованиями [193]. При пероральном введении водного экстракта при исследовании острой (доза 5 и 10 г/кг массы тела животного) и подострой (доза 100 мг/кг массы тела животного, 30 дней) токсичности установлена полулетальная доза $LD_{50} > 10$ г/кг

массы тела крысы. Результаты свидетельствуют о низкой токсичности водного экстракта листьев облепихи [163].

В зарубежных исследованиях *in silico* проводилось изучение возможной противоопухолевой активности. В полифенольный комплекс листьев облепихи входят различные фенольные соединения, среди которых есть такие, как изорамнетин-7-рамнозид и кверцетин-3-глюкозид-7-рамнозид. Исследование всасывания, распределения, метаболизма и экскреции их стереоизомеров показало, что наименьшая токсичность и отсутствие мутагенности отмечается именно у этих соединений. Кроме того, обнаружено, что эти соединения способны влиять на раковые клетки, предотвращая их пролиферацию посредством ингибирования белков. Выявленная гепатотоксичность изорамнетина-7-рамнозида и предварительно установленная противоопухолевая активность требуют дальнейших исследований *in vivo* для подтверждения или опровержения результатов *in silico* [180].

За последние 20 лет зарегистрировано значительное количество патентов на ЛРП и биологически активные добавки (БАД), содержащие в составе листья облепихи. Желудочно-кишечный сбор «Фитовит» может быть применён при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, таких как язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, колиты, гастриты.

За счёт наличия противовирусной активности листья включены в состав нейроиммуномодулятора и лечебно-профилактической композиции, применяемой для лечения и профилактики острых респираторных вирусных инфекций. Кроме того, из листьев получают экстракт, входящий в различные нутрицевтические композиции, например, композиция, обладающая профилактическими свойствами в отношении возраст – зависимых заболеваний, а также противовирусные композиции.

Так как противовирусная активность БАВ из листьев облепихи доказана, экстракт из них наиболее часто включается в комплексы для лечения и профилактики вирусных инфекций и простудных заболеваний, в том числе для повышения иммунитета [94,96-97,99,101].

1.4. «Гипорамин» – препарат на основе листьев облепихи

«Гипорамин» - противовирусный ЛП компании ЗАО «Вилар», применяемый для профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), острых респираторных заболеваний (ОРЗ), гриппа и простудных заболеваний. Содержит сухой экстракт листьев облепихи крушиновидной. Выпускается в виде таблеток для сублингвального применения, мази и суппозиторий [117].

Впервые в РФ зарегистрирован патент на получение противовирусного препарата «Гипорамин» в 1997 г, где описан один из способов производства – экстракция листьев органическими растворителями. Новизна патента заключается в применении новой системы растворителей, наиболее полно извлекающей из водной фазы сопутствующие неактивные вещества, и дальнейшей лиофильной сушке водного концентрата, при которой не происходит изменение активных компонентов. Несколькими годами позднее (2003 г.) в РФ зарегистрирован второй патент, в котором описаны несколько способов производства ЛП с применением способа форэкстракции ЛРС полярными органическими растворителями. Данный способ применим для сырья с различным содержанием галло- и эллаго-танинов и происхождением (культивируемые и дикорастущие растения). Характерная особенность заключается в применении водного органического гидроксилсодержащего растворителя, например спирта этилового различных концентраций (от 40 до 96%). За счёт концентрирования готовый продукт содержит не менее 60% гидролизуемых танинов. Также использование спирта позволяет исключить из технологического процесса токсичные растворители (галогенсодержащие) [92,95].

Для производства ЛП селекционно выведен сорт (Ф-1) для Нечернозёмной зоны России, имеющий сильно облиственные и эластичные побеги, высокую регенерационную способность, стабильную урожайность (2,4-2,7 кг/дерево в период с 2002 по 2004 года) и содержание танинов (24,3-18,7% на абс.с.в. в период с июня по сентябрь). Особенность этого сорта также заключается в возможности

применения механизированной заготовки (комбайн) с минимальными потерями сырья и повреждением растений (полное восстановление кустов на следующий год). Использование данного сорта облепихи позволяет получать достаточное количество сырья для производства препарата «Гипорамин» [71].

Любой разработанный ЛП необходимо исследовать на возможную безопасность и токсичность. В доклинических исследованиях «острой» токсичности при внутрибрюшинном введении «Гипорамина» животным (крысы, мыши, морские свинки) установлены LD_{50} : 103-106 мг/кг для крысят и мышей, соответственно; 128-170 мг/кг – для морских свинок и крыс. При внутрижелудочном введении LD_{50} составляет 7751-9900 мг/кг. При длительном пероральном применении (3 мес.), а также при изучении мягких лекарственных форм (мазь, суппозитории) у животных не выявлено токсических эффектов. Проведённые исследования свидетельствуют о низкой токсичности и безопасности ЛП [13].

При оценке содержания дубильных веществ в креме «Гипокрем 0,5%» методом ВЭЖХ с УФ-детектированием сумма таннинов составляет 0,32 г/100 г крема. Одним из главных компонентов крема является гидролизуемый таннин – казуаринин. Его содержание составляет 0,1020 г/100 г крема. Разработанная методика применима для количественной оценки препарата по содержанию дубильных веществ в пересчёте на казуаринин [26].

За счёт полифенольного комплекса листа облепихи оказывают не только противовирусный, но и антиоксидантный эффект. На основании этого проведены исследования *in vitro* по оценке антиоксидантной активности «Гипорамина». Установлено, что в терапевтических дозах препарат способен ингибировать реакции свободнорадикального окисления путём прямого связывания свободных радикалов и непрямым способом (связывание активных форм кислорода и снижение свободных ионов двухвалентного железа). В результате можно сделать вывод о наличии у «Гипорамина» также и антиоксидантной активности [154].

1.5. Направления комплексного использования сырья облепихи крушиновидной

Фармакопейным сырьём облепихи крушиновидной являются плоды [22]. Другие части растения – листья, побеги, семена и кора – находят всё более широкое применение в медицине.

Из плодов получают облепиховое масло [15,25,42], входящее в состав ЛП и БАД, а также являющееся самостоятельным препаратом, применяемым как стимулятор репаративных процессов в коже и слизистых оболочках. Выпускается в форме капсул, суппозиторий ректальных, концентрата [117].

В качестве новых источников БАВ широко изучаются побеги, кора, семена и листья облепихи крушиновидной. С целью рационального использования природных ресурсов целесообразно использовать побеги, так как они являются отходами при переработке плодов. Проведённые учёными исследования доказывают ценность этого вида сырья, так как побеги богаты дубильными веществами (17,28%), ненасыщенными жирными кислотами (пальмитиновая, линолевая, линоленовая), а также содержат β -ситостерин [1,10].

Семена используются в фармацевтической и пищевой промышленности, а также в косметологии. Из них получают масло (в комплексе с плодами), различные пищевые добавки и средства по уходу за телом. Кора облепихи крушиновидной не имеет такого широкого применения. Её используют только в пищевой промышленности для получения добавок и в сельском хозяйстве в производстве кормов. Расширение применения различных видов сырья облепихи позволит перейти к полному безотходному производству [2].

В официальной медицине, наряду с плодами, применяются листья облепихи. Их используют для получения сухого экстракта при производстве противовирусного препарата «Гипорамин» фармкомпания ЗАО «Вилар». Однако, это единственный ЛП на основе листьев. Отечественными и зарубежными учёными

проводятся широкие исследования по выявлению различных видов фармакологической активности и токсичности БАВ из листьев [79,117,182].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. В промышленных масштабах облепиху крушиновидную выращивают с целью заготовки плодов – источника каротиноидов и жирного масла. При заготовке плодов листья являются побочным продуктом и при дальнейшей переработке не используются, что не отвечает принципам рационального использования природных ресурсов. Заготовка листьев одновременно со сбором плодов позволит не только оптимизировать производственный процесс (снижение побочных продуктов) с минимальными затратами, но и способствовать расширению спектра применения облепихи крушиновидной и увеличению возможной сырьевой базы для производства ЛРП.

2. Целевыми группами БАВ можно выделить фенольные соединения, такие как дубильные вещества и флавоноиды, а также богатый минеральный состав (макро- и микроэлементы). Накопление различных соединений в течение периода развития листьев вариабельно и зависит от сортовой принадлежности, пола растения и эколого-географических условий культивирования.

3. Листья облепихи крушиновидной способны к накоплению экотоксикантов. Однако, при культивировании растения на экологически благополучных территориях уровень токсичных элементов в сырье будет снижаться.

4. Согласно отечественным и зарубежным литературным источникам, листья облепихи крушиновидной имеют богатый состав БАВ. Однако, эти данные разрозненны, а также отсутствует единый подход к стандартизации сырья, а также валидированные методики количественного определения целевых групп БАВ.

5. Целевыми группами БАВ можно выделить фенольные соединения, такие как дубильные вещества и флавоноиды, а также богатый минеральный состав (макро- и микроэлементы). Концентрация различных БАВ тесно связана не только с фенологической фазой облепихи, но и с сортовой принадлежностью. Вопрос о количестве фенологических фаз и их календарных сроках в литературе остаётся дискуссионным.

6. Листья облепихи крушиновидной обладают широким спектром фармакологической активности благодаря богатому химическому составу. Основные виды активности: антиоксидантная, противовирусная, противовоспалительная, противоопухолевая, иммуномодулирующая, адаптогенная и ранозаживляющая. В настоящее время учёными различных стран ведутся активные исследования по выявлению других видов активности комплекса БАВ листьев.

7. Комплексное применение сырья облепихи и расширение ассортимента ЛРП и БАДов на основе листьев отечественного производства, сведёт к минимуму отходы производства, что соответствует принципам рационального использования природных ресурсов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Описание объекта исследования

В качестве объектов исследования использовали листья облепихи крушиновидной, заготовленные в сухую погоду в мае-сентябре 2021-2024 гг. от дикорастущих растений на территории Воронежской области. В литературе не было найдено данных, четко разделяющих фенофазы облепихи крушиновидной, в разных источниках они варьируются [58,150]. Стадии для заготовки сырья были выбраны по наиболее примечательным признакам изменения растения: фаза завязывания плодов – далее фаза 1 (конец мая – начало июня), фаза единичного созревания плодов – далее фаза 2 (начало – середина июля), фаза массового созревания плодов – далее фаза 3 (конец августа – начало сентября). Растительное сырье высушивали воздушно-теневым способом, раскладывая его тонким слоем и часто переворачивая. Высушенные листья хранили в цельном виде в картонных коробках не более 2-х лет. Заготовку сырья осуществляли от мужских и женских дикорастущих деревьев на территории Воронежской области. В целях анализа использовали средние пробы сырья.

2.2. Исследование внешних и анатомо-диагностических признаков

В целях изучения макро- и микроскопических признаков использовали общепринятые методики [9]. Исследование осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0003 «Листья» и ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ РФ XV [22].

Изучение внешних признаков листьев облепихи крушиновидной осуществляли методом стереомикроскопического анализа с использованием микроскопа Биомед-2 (РФ). Люминесценцию тканей листьев облепихи крушиновидной исследовали с использованием люминесцентного микроскопа марки Микромед 3 ЛЮМ (Россия), оснащенный корпусом люминесцентной насадки с люминесцентными блоками «В»; «G» (Россия). Источником света

служила высоковольтная ртутная лампа (100 Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр – 410-490 нм, наблюдение в диапазоне 515-700 нм [35].

Микроскопический анализ листьев облепихи крушиновидной осуществляли на микроскопе Биомед 6 (Россия) с применением видеокамеры «Levenhuk» C310 NG (КНР) с программным обеспечением Top View ($\times 86$) при увеличении 40 \times , 100 \times , 400 \times . Так как при проведении микроскопических исследований по классическим методикам листья чернели, для их просветления использовалась методика с азотной кислотой и щёлочью, описанная зарубежными учёными Attrey D.P., Singh A.K. с соавторами [180]. Для определения биометрических характеристик листьев облепихи крушиновидной использовали окуляр-микрометр [22,34].

С целью исследования листьев облепихи крушиновидной методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) поверхность листьев напыляли золотом на автоматической напылительной установке Q150R ES (Чехия) для повышения проводимости. Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (Япония). Обработка результатов проведена при помощи программного обеспечения Esprit 1.9. Исследования проведены в ЦКП научным оборудованием ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Для целей петиолярной анатомии свежие листья с черешком облепихи крушиновидной подвергали консервации в спирте этиловом 96%. Исследование анатомо-диагностических признаков проводилось в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ РФ XV издания [22]. Поперечный срез получали в базальной, медиальной и апикальной части черешка. Петиолярная анатомия проводилась на микроскопе Биомед 6 (Россия) с применением видеокамеры Levenhuk C310 NG (КНР) и программным обеспечением Top View ($\times 86$). С целью выявления лигнифицированных элементов проводящей системы срезы черешка обрабатывали раствором флороглюцина и кислоты серной 25%.

2.3. Исследование элементного состава

Исследование полного элементного состава листьев облепихи крушиновидной проводили на фенологической фазе 3 (фаза массового плодоношения) параллельно с анализом почвы с места произрастания растения. Профильные образцы отбирались из четырех вертикальных колонок шириной 10 см, расположенных попарно на противоположных боковых стенках разреза таким образом, чтобы расстояние между ними составляло 1 м. Изучение элементного состава образцов проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) с индуктивно связанной плазмой («ELAN-DRC», США), для чего предварительно проводилась пробоподготовка - кислотное разложение образца с использованием микроволнового излучения. Рабочие стандартные растворы (контроль правильности измерений осуществлялся методом добавок) готовили путем смешивания нескольких опорных многоэлементных стандартных растворов для масс-спектрометрии («Perkin-Elmer») или аналогичные, содержащие разные группы элементов. Для анализа почв использовали следующие референс-стандарты: почва дерновоподзолистая ГСО 5360-90, ООКО-153, почва дерновоподзолистая супесчаная ГСО 2498-83-2500-83, СДПС-1, СДПС-2, СДПС-3. Для анализа измельченных высушенных листьев: ГСО состава травосмеси (Тр-1), ГСО 8922-2007, ГСО состава элодеи канадской (ЗК-1), ГСО 8921-2007, ГСО состава листа березы (ЛБ-1), ГСО 8923-2007 [47,85,145].

2.4. Исследование содержания радионуклидов

Определение радионуклидов в листьях облепихи крушиновидной проводили в лаборатории на базе ФГБУ «Россельхозцентр» (г. Воронеж) по методикам, изложенным в соответствующих ГОСТ: ГОСТ 32161-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия ^{137}Cs » и ГОСТ 32163-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90 ».

2.5. Определение товароведческих показателей

Определение товароведческих показателей (влажность, зола общая, зола нерастворимая в 10%-ной кислоте хлористоводородной, органические и минеральные примеси) листьев облепихи крушиновидной проводили в

соответствии с ГФ РФ XV по соответствующим методикам: ОФС 1.5.3.0004 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая»; ОФС 1.5.3.0005 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»; ОФС 1.5.3.0007 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [22].

2.6. Определение суммы экстрактивных веществ

Определение экстрактивных веществ проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [22,23]. Для экстракции использовали растворители: вода очищенная, спирт этиловый 40%, 70% и 96%, гексан, ацетон, кислота хлористоводородная разведенная, раствор аммиака 0,25% (х.ч., ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург, Россия).

2.7. Качественный анализ БАВ

Для исследования БАВ листьев облепихи крушиновидной использовали методики ГФ РФ [22,23]. Предварительно готовили водные и водно-спиртовые извлечения из листьев облепихи крушиновидной.

Для получения водных извлечений 1,0 г измельченного в лабораторном измельчителе до размера частиц не более 2 мм воздушно-сухого сырья заливали 30 мл воды очищенной и настаивали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное водное извлечение фильтровали. В водных извлечениях проводили определение полисахаридов, водорастворимых сапонинов, алкалоидов, дубильных веществ и органических кислот. Водно-спиртовые извлечения получали в том же соотношении, для экстракции использовали спирт этиловый 70%. Извлечение охлаждали, фильтровали и использовали для обнаружения спирторастворимых сапонинов, флавоноидов и антоцианов.

Качественный анализ групп БАВ в листьях облепихи крушиновидной проводили с использованием общепринятых качественных реакций [146]. Реактивы готовили в соответствии с ОФС.1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы» ГФ РФ XV [22] (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия). Качественные реакции на группы БАВ приведены в Таблице Д.1 (Приложение Д).

Дополнительное обнаружение флавоноидов проводили методом тонкослойной хроматографии. Готовили спиртовое извлечение из листьев облепихи крушиновидной, для чего в качестве экстрагента использовали спирт этиловый 70% в соотношении «сырье : экстрагент» 1:50. Экстрагировали в течение 45 минут в колбе с обратным холодильником. Пробы наносили с использованием микрошприца МШ-10 (Россия) на хроматографические пластины «Silica gel 60 F254» (Германия) нескольких типов и размеров. Для подбора условий наилучшего разделения использовали различные способы хроматографирования, элюенты и детектирующие реагенты, рекомендуемые литературными источниками [85,87,123]. Параллельно хроматографировали 0,1% спиртовые растворы СО рутина, кверцетина и апигенина (степень чистоты не менее 99%, ЗАО «Вектон», Россия).

Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) проводили также методом тонкослойной хроматографии. Использовались пластины «Sorbfil» (Россия) различных типов (ПТСХ-АФ-А-УФ; ПТСХ-П-А-УФ и ПТСХ-П-В-УФ) размерами 10×10 и 10×15 см. Нанесение проб осуществляли с помощью микрошприца МШ-10 (Россия) в количестве 30-40 мкл. Идентификацию осуществляли в УФ-свете после обработки 10% спиртовым раствором натрия гидроксида или 5% спиртовым раствором хлорида алюминия.

Этот же способ использовали для изучения флавоноидного состава водных и водно-спиртовых образцов ЛФ, полученных на основе ЛРС. Готовили извлечения путём настаивания на кипящей водяной бане с обратным холодильником в соотношении «сырье : экстрагент» 1:50 с использованием различных растворителей в широком диапазоне значений полярности (ацетон, этилацетат, гексан, спирт этиловый 96%). Длительность настаивания – 120 минут, элюенты

подбирали экспериментально. Детектирование осуществляли визуально в видимом свете.

Анализ состава свободных аминокислот листьев проводили методом ТСХ для водного извлечения, приготовленного по типу отвара (ОФС «Настои и отвары» ГФ РФ XIV издания) [138]. Использовали хроматографические пластины марки «Sorbfil» ПТСХ-П-В (полимерная подложка – ПЭТФ; силикагель СТХ-1ВЭ), размером 10x15 см (Россия). Разделение 10 мкл пробы (МШ – 10, Россия) осуществляли в системе н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:1) (растворители марки х.ч. (Россия)), подобранной нами в ранних работах [141]. Параллельно на стартовую линию пластинки наносили 2,5 мкл смеси 0,1% водных растворов стандартных образцов (аргинин, глутаминовая кислота, фенилаланин, пролин, лейцин, метионин, валин, глицин) (степень чистоты не менее 99%; ЗАО «Вектон», СПб, Россия). Идентификацию хроматографических зон осуществляли путем обработки 1% раствором нингидрина в этаноле и последующего нагревания в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 2-3 минут.

Разделение и идентификацию дубильных веществ проводили в извлечении, приготовленном по типу отвара (1:10) [22,23] по запатентованной методике [98], применяя двукратное элюирование в одном и том же направлении в системе 1: диэтиловый эфир – уксусная кислота ледяная – гексан – этилацетат (20:20:40) и затем в системе 2: этилацетат – муравьиная кислота концентрированная – уксусная кислота ледяная – вода очищенная (67:7,5:7,5:18) на пластинах ПТСХ-АФА («Sorbfil», Россия). Параллельно хроматографировали водные растворы СО галловой кислоты и танина. Обнаружение зон происходило после детекции 1% спиртовым раствором железозамонийных квасцов.

2.8. Изучение состава БАВ методом ГХ-МС

Для определения качественного и количественного состава летучих БАВ листьев облепихи крушиновидной использовали ГХ-МС. Извлечение готовили по методике ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»

[22]. Экстрагент – спирт этиловый 96%. Работу проводили на газовом хроматографе Agilent 7890B/5977A (США) (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

2.9. Количественный анализ БАВ

УФ-спектры для изучаемых объектов были получены с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в требуемых диапазонах длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см относительно растворов сравнения.

В листьях облепихи крушиновидной проводили количественное определение следующих групп БАВ: флавоноиды, дубильные вещества, аминокислоты, каротиноиды и хлорофиллы, лейкоантоцианы. С целью подбора оптимальных условий экстракции БАВ при разработке методик варьировали такими показателями, как степень измельчения сырья, соотношение «Сырье : экстрагент», длительность и кратность экстракции. Разработанные методики и могут использоваться для количественного анализа групп БАВ в листьях облепихи крушиновидной.

Методом капиллярного электрофореза проводили определение витаминов группы В, а также органических кислот и аминокислот на базе лаборатории АНО «НТЦ» Комбикорм» (Воронеж). Для определения содержания витаминов В₁, В₂ и В₄ использовали методику Н.К. Флоренской [142]. Состав органических кислот и аминокислот определяли по методике ГОСТ Р 55569-2013 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза» [21].

2.10. Получение и изучение ИК-спектров листьев облепихи крушиновидной

Методом ИК-спектроскопии без пробоподготовки на базе ЦКП ФГБОУ ВО ВГУ на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32 (сам спектр (в шкале волновых чисел) получили ИК-спектры листьев облепихи крушиновидной. Все функции по регистрации интерферограммы, преобразованию Фурье, управлению спектрометром и математической обработке спектров выполнялись программой OMNIC). Спектры НПВО получали на стандартной приставке с горизонтальным расположением элемента и устройством поджатия

порошкообразных проб, что позволяло получать хорошо выраженные спектры при полном контакте образца со всей рабочей поверхностью кристалла. Кратность эксперимента для одной фазы заготовки каждого объекта исследования составляла не менее 3-х измерений.

2.11. Исследование фармакологической активности листьев облепихи крушиновидной

Первичный скрининг видов фармакологической активности и возможных токсических эффектов *in silico* проводили с использованием платформы PassOnline и Phyto4Health [189,190]. Оценивали значения P_a – вероятность наличия фармакологической активности/побочного эффекта, считая результат значимым при показателе $>0,7$; P_i – вероятность отсутствия фармакологической активности/побочного эффекта. Если $P_a > P_i$ – оцениваемый эффект присутствует с большой долей вероятности. В качестве исследуемых БАВ были выбраны соединения, преобладающих групп БАВ – флавоноидов и дубильных веществ. Выбранные вещества соответствуют правилу пяти Липински [3,5,124,153,177-178].

Антиокислительную активность водного извлечения изучали по титриметической методике Максимовой Т. В. [93], а также спектрометрической методике, основанной на изменении светопоглощения концентрацией ферри- и ферроцианата железа при добавлении исследуемого извлечения [98]. Извлечения готовили по типу отвара (1:10) в соответствии с ОФС 1.4.1.0018. «Настои и отвары» [22]. Для получения отвара использовали измельчённое сырьё, прошедшее сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм.

Определение противовоспалительной активности водного извлечения *in vivo* проводили на модели формалинового отёка лапы крыс в соответствии с известной методикой [27,158]. Животные были разделены на 3 группы по 7 особей в каждой: 1 – контрольная (моделировали отек лапы крыс, вводили воду очищенную в эквивалентном препаратам объеме внутривенно 7 суток 1 раз в сутки), 2 – опытная группа препарата сравнения (настой цветков ромашки), 3 – опытная группа изучаемого препарата (отвар листьев облепихи III фазы заготовки). В качестве флоггена использовали 3,0% водный раствор формалина, который вводили

каждому животному в объёме 0,1 мл субплантарно. Животным опытных групп ежедневно 7 суток 1 раз в сутки утром натошак внутрижелудочно вводили изучаемые экспериментальные препараты: препарат сравнения – настой цветков ромашки или отвар листьев облепихи в дозе 1 мл на 100 г массы тела животного (10 мл/кг), что исходя из расчета по сухому остатку (23,5 мг/мл) составило 235 мг/кг. Выбор дозы осуществляли на основании известных данных литературы по диапазону доз, в которых проявляется противовоспалительная активность других сходных извлечений из ЛРС [91,162,165,174-175,179,183]. Длительность эксперимента – 7 суток. На 7-е сутки эксперимента через 1 час после последнего введения исследуемых препаратов вводили флогоген (раствора формалина). Проводили измерение объема конечности в каждой из групп онкометрическим методом до введения флогогена (исходно, V_0 , см³) и затем через 1 и 3 ч после введения флогогена (V_1 – через 1 ч и V_3 – через 3 ч, см³). Затем определяли выраженность отека лапы, которую рассчитывали в процентах как изменение объёма лапы через 1 и 3 часа по сравнению со средним исходным значением (объём лапы, исходно V_0 , см³) по формуле:

$$O = \frac{V_n \times 100\%}{V_0},$$

где O – отек лапы в контрольной или опытных группах, %, V – объем конечности через n часов (V_1 – через 1 ч или V_3 – через 3 ч, см³); V_0 – исходный объем конечности, см³.

Противовоспалительную эффективность изучаемых извлечений из ЛРС оценивали по способности предотвращать развитие отека конечности, выражали в процентах и рассчитывали как разницу между исходными и последующими показателями опытной группы по сравнению с контрольной группой, по формуле [15]:

$$E = \frac{V_{K_n} \times 100\%}{V_0} - \frac{V_{O_n} \times 100\%}{V_0},$$

где E – эффективность изучаемого извлечения из ЛРС, %, V_{K_n} – последующий объем конечности в контрольной группе через n часов (V_1 – через 1 ч или V_3 – через

3 ч, см³); V_0 – исходный объем конечности, см³, V_{0n} – последующий объем конечности в опытной группе через n часов (V_1 – через 1 ч или V_3 – через 3 ч, см³).

Проводили так же измерение ректальной температуры тела ($T, ^\circ\text{C}$) животных при помощи электронного термометра – исходно, через 1 и 3 часа после введения флогогена.

2.12. Получение опытных образцов жидких водных и водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной

Для выбора оптимальных жидких водных и водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной с целью расширения спектра ЛРП и БАД, получали отвар, а также настойку несколькими способами и жидкий экстракт. Извлечения из листьев облепихи крушиновидной готовили в соответствии с методиками, изложенными ГФ РФ XV. В ранних проведённых нами исследованиях установлено, что для извлечения суммы флавоноидов и экстрактивных веществ (Глава 5, п. 5.5.1 и 5.2) оптимальным экстрагентом является спирт этиловый 70%. В связи с этим для получения водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной также был использован 70% спирт этиловый. Кроме того, способ получения ЛРП «Гипорамин» на основе листьев также предполагает использование в технологическом процессе низших спиртов 40-96% концентрации [95].

В соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары» готовили водное извлечение из листьев облепихи крушиновидной по типу отвара в соотношении 1:10 как для сырья, содержащего дубильные вещества. Отвар получали путём настоивания на водяной бане в инфундирном стакане в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Готовое извлечение фильтровали через двойной слой марли с подложенным ватным тампоном без охлаждения, сырьё отжимали. Предварительно определили коэффициент водопоглощения в соответствии с ОФС.1.5.3.0012 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья» [22].

Водно-спиртовое извлечение по типу настойки готовили в соотношении 1:5 с применением общепринятых способов, изложенных в ОФС.1.4.1.0019 «Настойки» ГФ РФ XV [22]. Использовали метод мацерации, дробной мацерации и перколяции.

Детальной разработки и обоснования индивидуальной технологии получения каждой жидкой водно-спиртовой ЛФ в работе не проводилось, что является перспективой дальнейшей разработки данной темы.

Водно-спиртовое извлечение по типу экстракта жидкого в соотношении 1:1 получали методом перколяции, как типового рекомендуемого способа согласно ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты» ГФ РФ XV [22].

В полученных жидких водных и водно-спиртовых образцах ЛФ проводили количественное определение флавоноидов, для чего разрабатывались методики их качественного и количественного анализа, а также оценивали выход данной группы БАВ по отношению к содержанию в исходном растительном сырье.

В целях стандартизации полученных водных и водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной проводили определение показателей качества в соответствии с требованиями соответствующих ОФС ГФ РФ XV изд.:

- ОФС.1.4.1.0019 «Настойки»;
- ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты»;
- ОФС.1.2.3.0034 «Определение спирта этилового в лекарственных средствах»;
- ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия»;
- ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [22,23].

2.13. Статистическая обработка

Полученные результаты обрабатывали в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ XV изд. [22] при использовании пакета прикладных программ обеспечения «Microsoft EXCEL» 2019 г. (компания-разработчик – Microsoft, США, версия 24.01). Валидация методик осуществлялась по ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV [22].

2.14. Использованные реактивы и материалы

При выполнении исследования были использованы реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

Для приготовления элюентов в ТСХ использовали растворители марки х.ч. и сорта «для хроматографии» (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

Приготовление реактивов, детектирующих реагентов, титрованных растворов проводили в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV-XV изданий из субстанций марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

2.15. Использованные стандартные образцы (СО)

При выполнении качественного и количественного анализа БАВ в листьях облепихи крушиновидной следующие СО (ЗАО «Вектон», СПб, Россия), которые имели степень чистоты не менее 99%: Рутин (CAS 153-18-4), Кверцетин (CAS 117-39-5), Апигенин (CAS 520-36-5), Танин (CAS 1401-55-4), Галловая кислота (CAS 149-91-7), Аскорбиновая кислота (CAS 50-81-7), Аргинин (CAS 74-79-3), Глутаминовая кислота (CAS 56-86-0), Фенилаланин (CAS 150-30-1), Пролин (CAS 147-85-3), Лейцин (CAS 61-90-5), Метионин (CAS 63-68-3), Валин (CAS 72-18-4), Глицин (CAS 56-40-6).

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

С целью подтверждения подлинности ЛРС необходимо определение его внешних и микродиагностических признаков. В отечественной и зарубежной литературе встречаются описания макро- и микроскопических признаков листьев облепихи крушиновидной, но они разрознены, а описание не соответствует требованиям ГФ РФ XV. В связи с этим разработка показателей подлинности листьев облепихи крушиновидной методами макро- и микроскопического анализа является актуальным.

3.1. Внешние признаки листьев облепихи крушиновидной

Внешние признаки листьев облепихи крушиновидной определяли на образцах фазы 3 – фазы массового созревания плодов (конец августа – начало сентября). Выбор данной фазы для оценки внешних признаков обусловлен тем, что в результате проведенных исследований именно она будет в дальнейшем рекомендована к заготовке. Макроскопический анализ проводили визуально, с помощью лупы (10×), а также с использованием стереомикроскопа (400×) (Глава 2, п. 2). Кроме того, проведено определение биометрических показателей листовой пластинки (Рисунок 9) [45].

Цельное сырье. Сырьё представляет собой цельные или частично измельченные простые листья длиной от 2,5 до 9,5 см, шириной от 0,3 до 1,0 см с ребристым черешком или без него. Длина черешка 0,1-0,5 см, диаметр – 0,1 см. Листья линейной формы с узкоклиновидным нисбегающим основанием и притупленной верхушкой. Край листовой пластины цельный, жилкование – сетчатое, с сильно выдающейся главной жилкой с нижней стороны листа. Верхняя

поверхность листа кожистая, блестящая. Нижняя поверхность имеет беловолочное опушение, густо усеяна бурыми точками (основания щитковидных волосков). Цвет листьев сверху от зелёного до буровато-зелёного, снизу – серовато-белый, жилки и черешка – бурый. Запах слабый, специфический.



Рисунок 9 – Внешний вид листьев облепихи крушиновидной

Измельченное сырье. Кусочки листьев и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм. При выборе рекомендуемого размера частиц сырья ориентировались на аналогичные требования ГФ РФ к листьям других видов фармакопейных растений, имеющих плотную кожистую структуру, например, листья брусники или толокнянки [22]. Цвет кусочков на верхней стороне от светло-зеленого до буровато-зеленого, иногда с желтоватым оттенком, на нижней стороне — серо-зеленый, с сильно выдающейся жилкой (Рисунок 10). Запах слабый, специфический.



Рисунок 10 – Внешний вид измельченного сырья листьев облепихи крушиновидной

Порошок. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Цвет порошка светло-зеленый или серо-зеленый. Смесь неоднородная, встречаются бурые и серовато-белые вкрапления. При рассмотрении под лупой (10×) видны от зеленых до серовато-зеленых кусочки листьев и коричневато-бурые кусочки черешков (Рисунок 11). Запах слабый, специфический.



Рисунок 11 – Внешний вид порошка листьев облепихи крушиновидной

С помощью стереомикроскопического и люминесцентного анализа, а также РЭМ проводили подробное изучение морфологии листьев облепихи крушиновидной (Глава 2, п. 2) [34-35,50]. Анализу подвергали верхнюю и нижнюю стороны листа, а также черешки.

При рассмотрении листа с поверхности обнаружено, что обе стороны и жилка покрыты простыми многоклеточными щитковидными и щитковидно-звездчатыми волосками (Рисунок 12). На верхней стороне листа по частоте встречаемости преобладают волоски щитковидные, сидящие рыхло, не образуя плотного сплетения. На нижней стороне листа также щитковидные волоски буровато-оранжевые; щитковидно-звездчатые – белые или прозрачные, густо расположенные, полностью покрывая эпидермис. При удалении волосков видно губчатое строение эпидермиса.

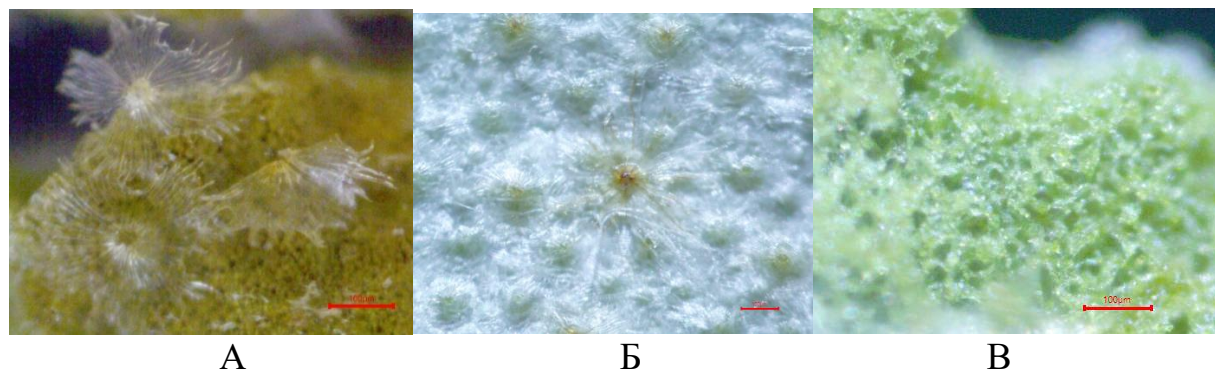


Рисунок 12 – Стереомикроскопия поверхности листа облепихи крушиновидной (100×): А – сверху, Б – снизу, В – под слоем волосков снизу

Щитковидно-звездчатые волоски прозрачные или белые; цвет щитковидных волосков – бурый или буровато-оранжевый (место прикрепления волоска). Щитковидные волоски многоклеточные, представляют собой округлый щиток, состоящий из радиально расположенных лучисто вытянутых клеток, сросшихся краями, центральной частью прикрепляющийся к эпидермису. Щитковидно-звездчатые волоски также многоклеточные, по строению похожи на щитковидные, однако, отличающиеся наличием длинных несросшихся краями лучистых клеток, выходящих из щитка. Редко встречаются единичные многоклеточные звездчатые волоски, состоящие из центральной клетки с отходящими в разные стороны лучами (Рисунок 13).

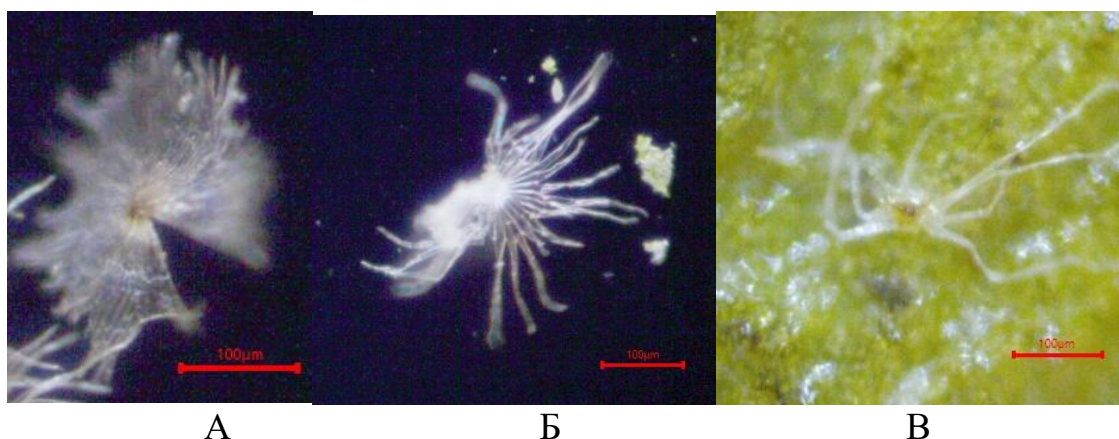
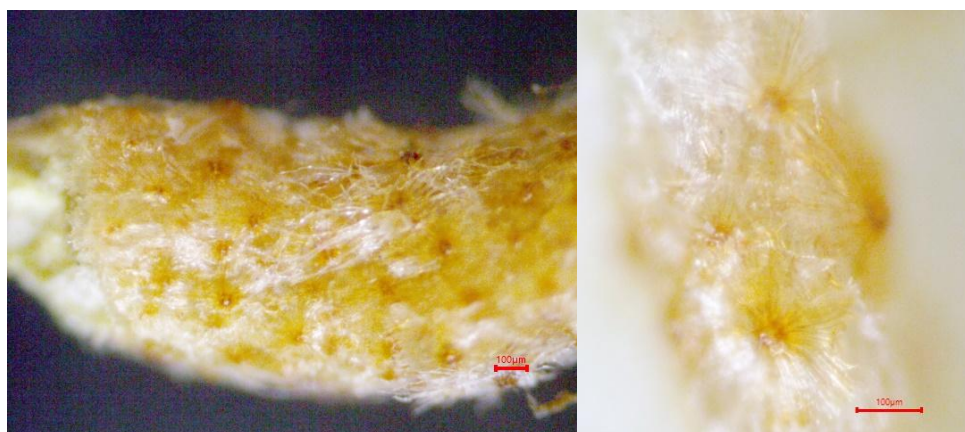


Рисунок 13 – Стереомикроскопическое исследование типов волосков листьев облепихи крушиновидной (100×): А – щитковидный, Б – щитковидно-звёздчатый, В – звёздчатый

По жилке встречаются в основном щитковидные волоски – прижатые, буроватые, на черешке – от светло-желтого до буровато-оранжевого цвета (Рисунок 14).

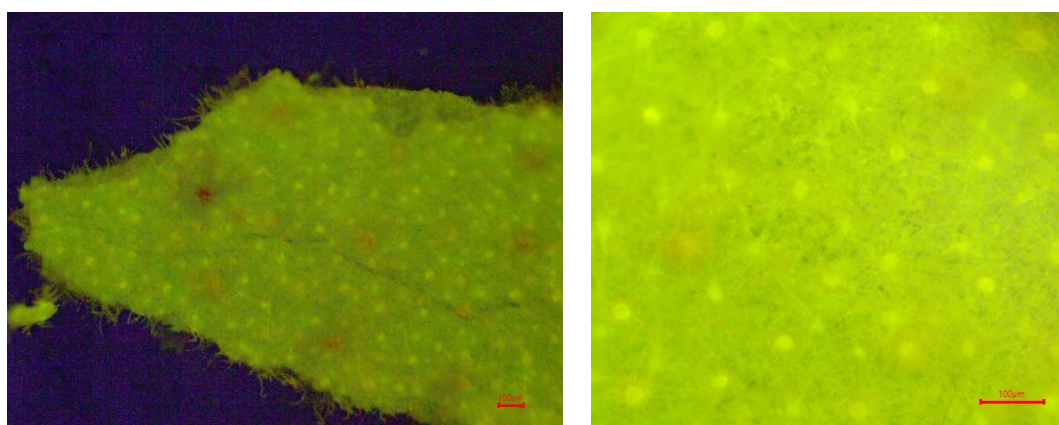


А

Б

Рисунок 14 – Стереомикроскопическое исследование черешка листа (А – 100×) и жилки с нижней стороны (Б – 100×)

Методом люминесцентной микроскопии (Глава 2, п. 2) выявлены места интенсивной флуоресценции: основания щитковидных и щитковидно-звёздчатых волосков как с верхней, так и с нижней стороны листа. Нижняя сторона флуоресцирует ярче, чем верхняя, так как снизу более густое опушение (Рисунок 15).



А

Б

Рисунок 15 – Люминесцентная микроскопия листа облепихи крушиновидной: А – поверхность листа сверху (40×), Б – снизу (100×)

При отделении волоска от клеток основания наблюдается бледное желтовато-зеленоватое свечение (Рисунок 16). Пластинки, из которых состоят щитковидные волоски не обладают яркой люминесценцией, слабое свечение характерно для мест сочленения пластинок волоска. На жилке листа волоски прижатые, их основания выступают над поверхностью. Ярко выраженная флуоресценция, как на волосках поверхности листа, отсутствует.

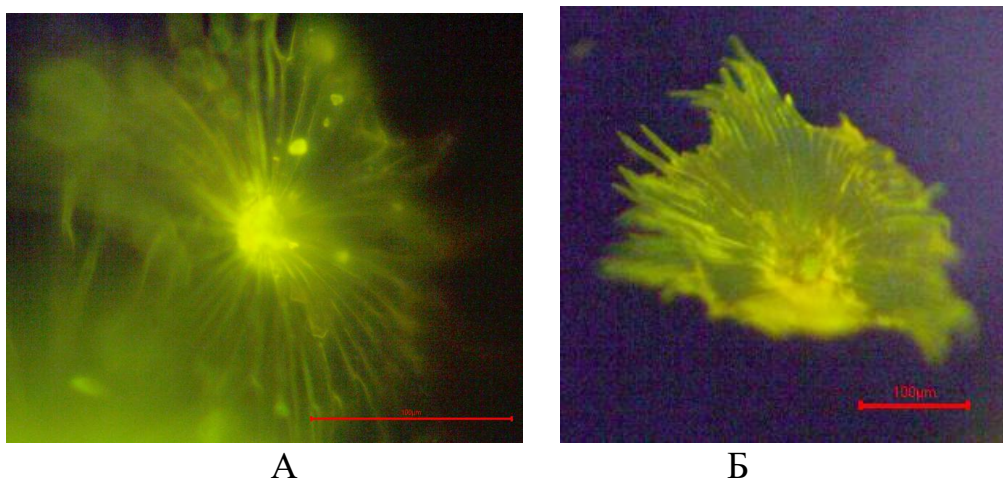


Рисунок 16 – Люминесцентная микроскопия щитковидных волосков листьев облепихи крушиновидной: А – 400×, Б – 100×

Собственно жилка обладает ярким свечением (Рисунок 17). Звездчатые волоски на фоне флуоресцирующей жилки коричневого цвета и не обладают свечением.

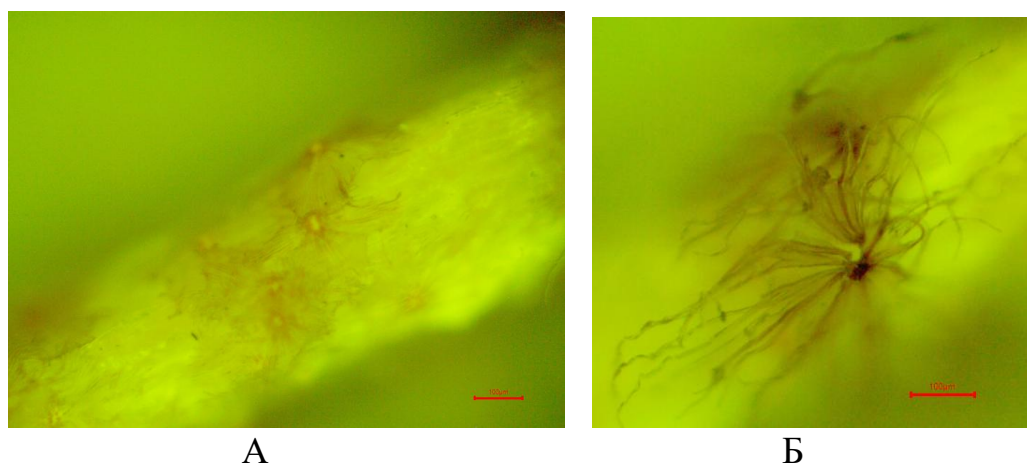


Рисунок 17 – Люминесцентная микроскопия жилки листа облепихи крушиновидной (снизу): А – 100×, Б – 400×

3.2. Микроскопия листьев облепихи крушиновидной

3.2.1. Изучение анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной

При проведении микроскопического исследования (Глава 2, п. 2) листьев облепихи крушиновидной были получены следующие результаты [34].

Для проведения микроскопии сырьё предварительно подвергалось пробоподготовке по нескольким методикам, так как фармакопейная методика не позволяла в полной мере объективно оценить наличие и биометрические характеристики листьев ввиду особенностей их строения и состава метаболома.

Согласно методике ГФ РФ XIV изд. «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» листья подвергались кипячению в 5%-м растворе натрия гидроксида в течение 8 минут ввиду наличия на их поверхности плотного слоя кутикулы [23].

Для просветления листьев облепихи использовали способы, позволяющие удалить из растительных объектов окрашенные БАВ (хлорофиллы, каротиноиды), заключающиеся в их выдерживании в течение недели в растворе хлоралгидрата (ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы, индикаторы»), спирта этилового (70 и 96%) и гексане.

Так как при использовании классической пробоподготовки листьев микроскопическое исследование оказалось невозможным ввиду их окрашивания в черно-бурый цвет за счет большого количества, по-видимому, антрагликозидов, была применена попытка их удаления путем их экстракции, как это описано для коры крушины (ФС.2.5.0021.15 «Крушины ольховидной кора»).

Для удаления всей суммы соединений, способных давать окраску при проведении микроскопического анализа была использована методика кипячения

высушенных листьев в разведенной кислоте азотной (1:3) в течение 1 минуты, с последующим промыванием водой очищенной и выдерживанием в растворе щёлочи в течение 20 минут [182].

Для получения микропрепарата поперечного среза листа высушенные листья облепихи крушиновидной помещали в смесь спирт этиловый 96% - глицерин – вода в соотношении 1:1:1, выдерживали в течение суток и выполняли поперечные срезы. При разных методах пробоподготовки листья имели различную степень просветлённости. Результаты апробации методик представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Методы пробоподготовки листьев облепихи крушиновидной к микроскопическому анализу

Метод	Результат
Кипячение в 5%-м растворе натрия гидроксида	Листья приобрели тёмно-бурый цвет ввиду взаимодействия антраценпроизводных, присутствующих в сырье, со щёлочью
Выдерживание в растворе хлоралгидрата	Листья просветлились; при микроскопировании обнаружены непросветлённые участки, а также изменение морфологии трихом
Выдерживание в спирте этиловом 96 и 70%	
Выдерживание в гексане	Листья ломкие, непросветлённые
По методике выделения антрагликозидов	Слабое просветление листьев; при повторном кипячении со щёлочью – бурое окрашивание, свидетельствующее о недостаточном выходе антрагликозидов из сырья
Кипячение в кислоте азотной и выдерживание в растворе щёлочи	Листья достаточно просветлены, визуализируются все структуры листа
Выдерживание в смеси спирт этиловый 96% - глицерин – вода (1:1:1)	Методика пригодна для получения микропрепарата поперечного среза листа

Наиболее подходящим методом пробоподготовки выбран метод кипячения в кислоте азотной и выдерживание в растворе щёлочи с последующим промыванием водой. Листья достаточно просветлены, что позволяет визуализировать все структуры листовой пластины.

Цельное сырье. На верхней стороне листа клетки многоугольные, плотно прилегают друг к другу, имеют ровные стенки с хорошо заметным утолщением.

Ширина клеток в среднем составляла 21,51 мкм, длина – 24,47 мкм. В клетках визуализируются буроватые включения в виде песка (Рисунок 18).

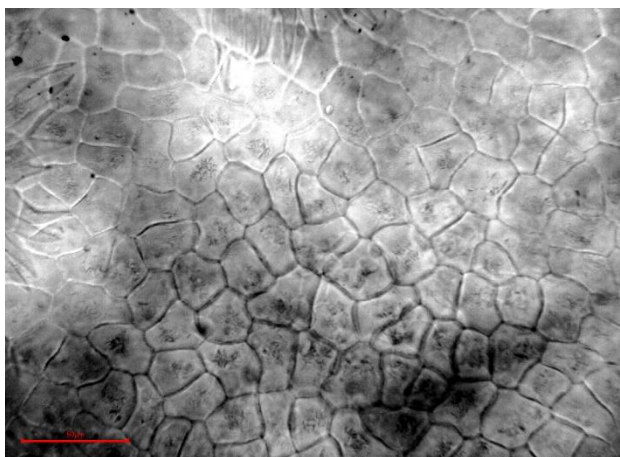


Рисунок 18 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа (400×)

На эпидермисе встречаются 3 типа трихом: щитковидные, звёздчатые и щитковидно-звёздчатые (Рисунок 19). Основания щитковидных и щитковидно-звёздчатых волосков состоят из 4-7 вытянутых треугольных клеток. Щитковидные волоски представляют собой щиток из соединённых клеток, выходящих из основания и расходящихся к краю на короткие лучи. Щитковидно-звёздчатые волоски имеют сходное строение с щитковидными, но при этом клетки, образующие щиток, срастаются не полностью, имея длинные расходящиеся лучи. Основания некоторых щитковидных и щитковидно-звёздчатых волосков окрашены в бурый цвет. Звёздчатые волоски состоят из 3-7 лучисто-вытянутых клеток, не соединённых между собой.

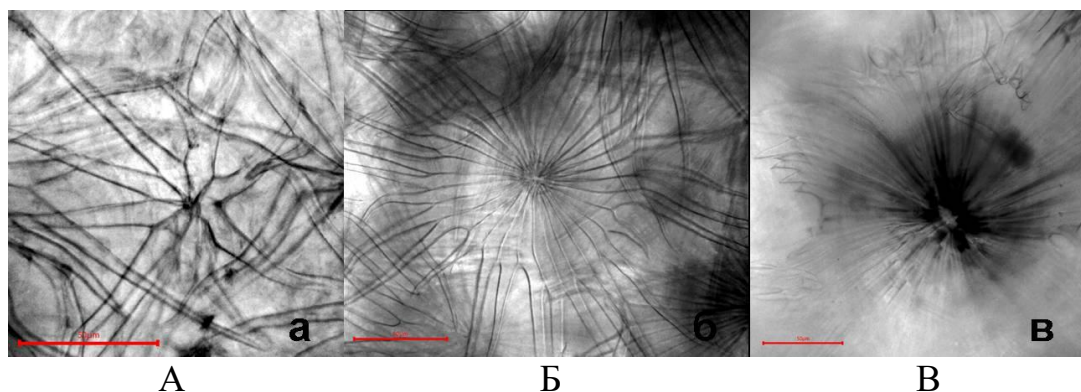


Рисунок 19 – Типы трихом (400×) : А – звёздчатые, Б – щитковидно-звёздчатые, В – щитковидные

На верхней стороне листа преобладают щитковидные ($0,82 \pm 0,074$ на 1 мм^2) и щитковидно-звёздчатые ($0,23 \pm 0,1$ на 1 мм^2) трихомы; звёздчатые встречаются реже ($0,15 \pm 0,052$ на 1 мм^2). Край листа завёрнут книзу, покрыт щитковидными и щитковидно-звёздчатыми волосками, которые в большом количестве встречаются и на центральной жилке (Рисунок 20). Чётко видно сетчатое жилкование листовой пластины. Вдоль вторичных жилок проходит ряд продольно-вытянутых клеток.

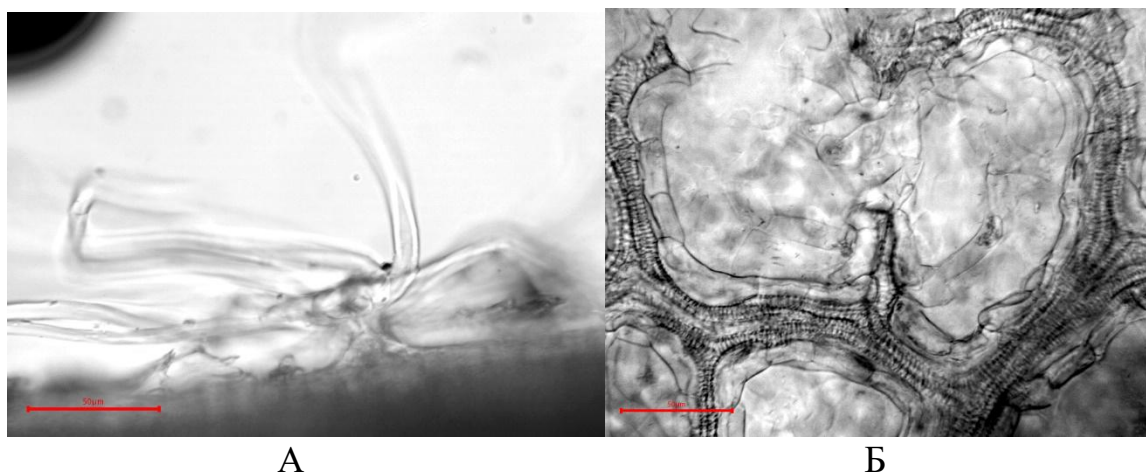
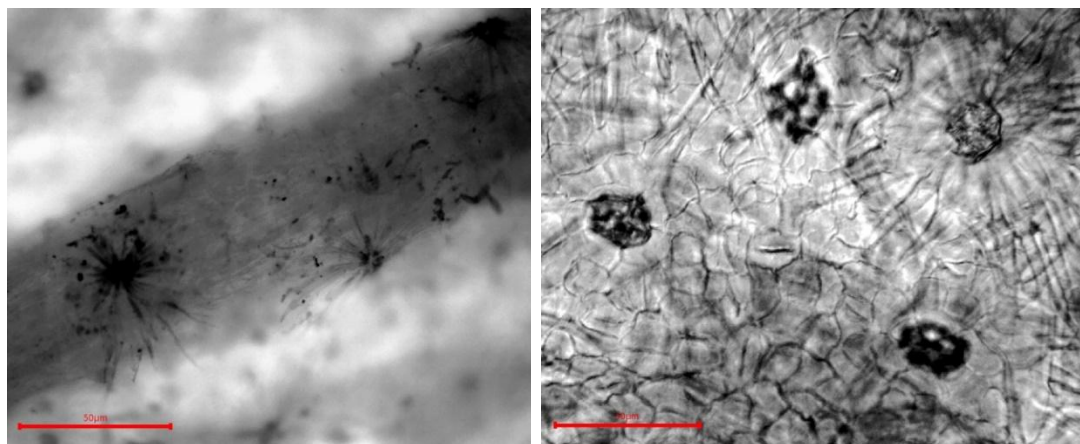


Рисунок 20 – Фрагменты верхнего эпидермиса листа (400×): А – край листовой пластины; Б – вторичные жилки

Нижняя поверхность листа облепихи и центральная жилка густо покрыта щитковидно-звёздчатыми трихомами ($3,27 \pm 0,286$ на 1 мм^2), щитковидные и звёздчатые встречаются реже ($1,4 \pm 0,163$ и $1,08 \pm 0,207$ на 1 мм^2 соответственно). Клетки нижнего эпидермиса имеют сильноизвилистые тонкие стенки (Рисунок 21). Продольный размер клеток в среднем $16,69 \text{ мкм}$, поперечный – $12,67 \text{ мкм}$. Устьица

аномоцитного типа, встречаются только на нижней стороне листа ($9,45 \pm 0,883$ на 1 мм^2). Устьичный индекс составляет $7,66 \pm 0,683$.



А

Б

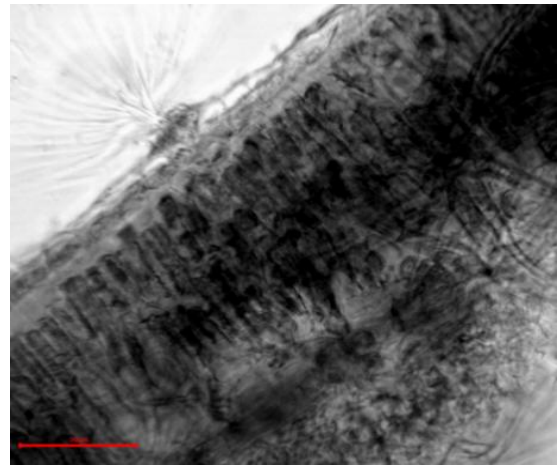
Рисунок 21 – Фрагменты нижнего эпидермиса листа (400×): А – жилка; Б – эпидермис с устьицами

При микроскопии поперечного среза листовой пластины установлено, что лист имеет дорсовентральное строение. Верхний и нижний эпидермис состоит из одного ряда полигональных клеток с тонкими стенками прямоугольной формы. Под эпидермисом с верхней стороны листа расположены два ряда палисадной паренхимы, а с нижней – из 3-4 слоя губчатой. Устьица погружены в мезофилл листа. Палисадная ткань представлена двумя рядами полигональных толстостенных клеток, вытянутых в поперечном направлении, плотно прижатых друг к другу боковыми стенками. Губчатая ткань состоит из многоугольных клеток, между которыми расположены устьица и щели-межклетники. На обеих поверхностях встречаются все типы трихом, описанные выше (Рисунок 22).

Измельченное сырье. Встречаются частички различной формы. На верхней стороне видны толстостенные клетки с ровным краем, сверху встречаются щитковидные волоски (Рисунок 23). Нижняя сторона листа покрыта плотным слоем щитковидных, щитковидно-звёздчатых, звёздчатых трихом. Основания волосков проявляются в виде скопления клеток округлой формы бурого цвета.

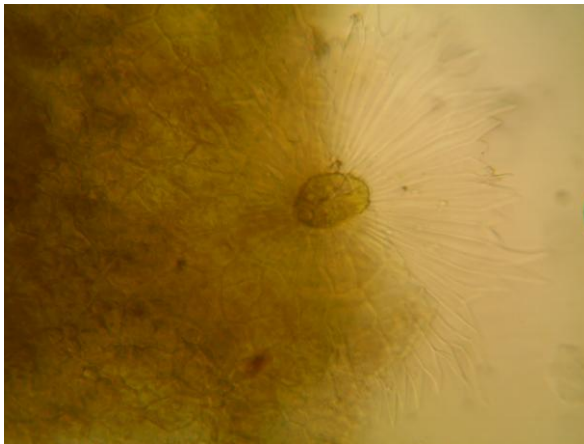


А

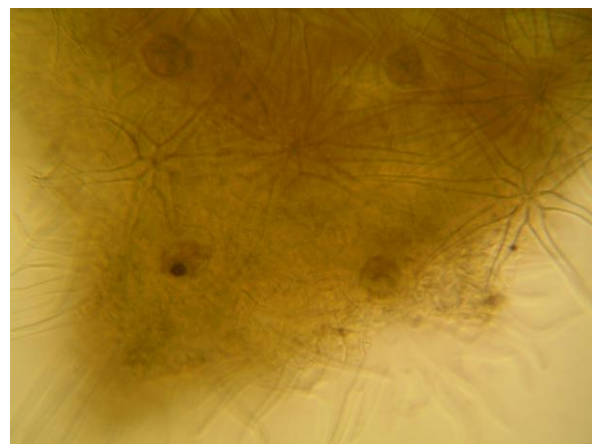


Б

Рисунок 22 – Фрагмент поперечного среза листовой пластины (400×): А – край листа; Б – центральная часть листа



А



Б

Рисунок 23 – Микроскопический анализ измельчённых листьев облепихи крушиновидной (400×): А – эпидермис верхней стороны листа; Б – эпидермис нижней стороны листа

Порошок. Встречаются отдельные клетки, группы клеток с трихомами. Встречаются все виды трихом – щитковидные, щитковидно-звёздчатые, звёздчатые (Рисунок 24).

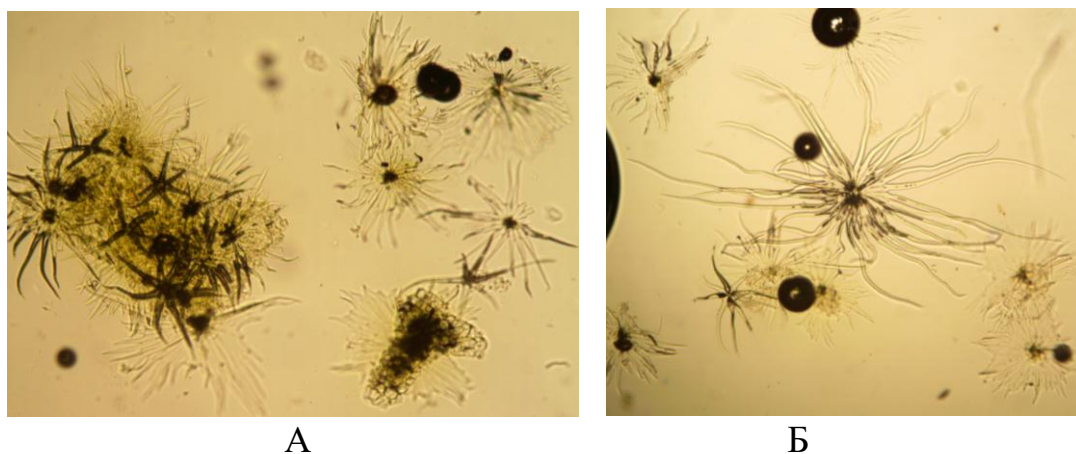


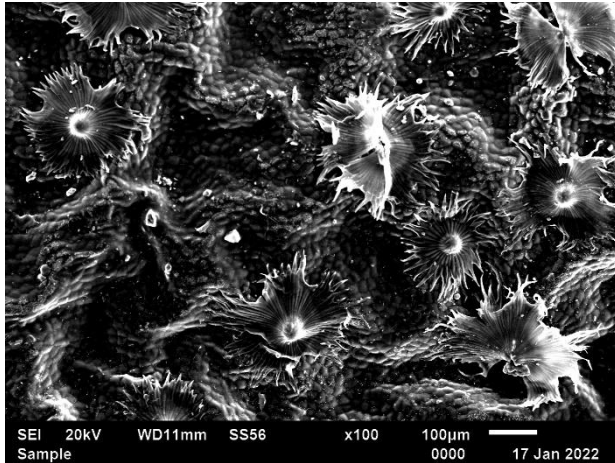
Рисунок 24 – Микроскопия порошка листьев облепихи крушиновидной (100×): А – группы клеток с трихомами; Б – отдельные трихомы

3.2.2. Изучение анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной методом растровой электронной микроскопии

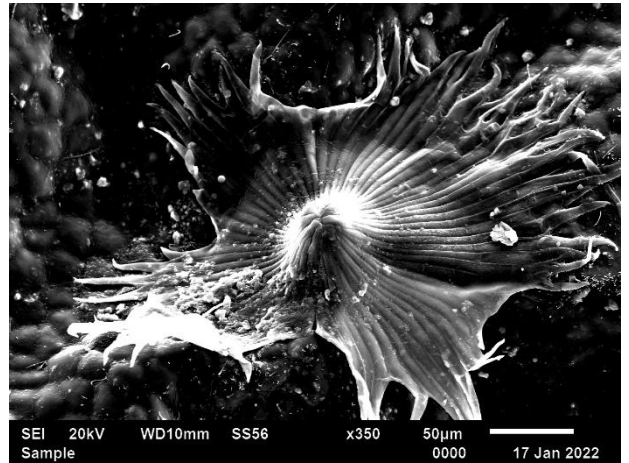
Метод РЭМ в изучении анатомо-диагностических признаков был использован с целью уточнения и визуализации признаков, выявленных при проведении световой микроскопии, и получить их объёмные изображения [50]. Пробоподготовка к проведению анализа описана в п. 2 Главы 2.

Верхняя поверхность листовой пластинки рыхло покрыта щитковидными и щитковидно-звёздчатыми волосками. Характерно, что некоторые волоски имеют воронковидное углубляющееся основание, а часть – пикообразное, выступающее над поверхностью (Рисунок 25). Для щитковидно-звёздчатых волосков характерны лучи различной длины. Клетки эпидермиса с верхней стороны листа многоугольные, имеют утолщённые стенки. Край листовой пластины цельный, завёрнут книзу. С верхней стороны листа центральная жилка погружённая, покрыта звёздчатыми трихомами с длинными, переплетающимися между собой лучами. Визуализируются округлые пыльцевые зёрна растения с шиповатой поверхностью. Сохранение пыльцы на листьях связано с тем, что облепиха – ветроопыляемый двудомный кустарник, при чем мужские и женские деревья могут находиться на

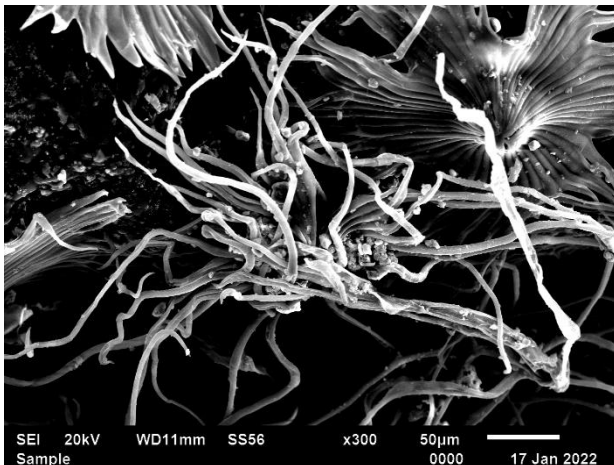
достаточно удаленном расстоянии друг от друга. При попадании пыльцы на лист, она задерживается лучами звёздчатых волосков, что, совместно с шиповатой поверхностью пыльцевых зёрен, может являться приспособлением к размножению. Устьица на верхней стороне листа не визуализируются.



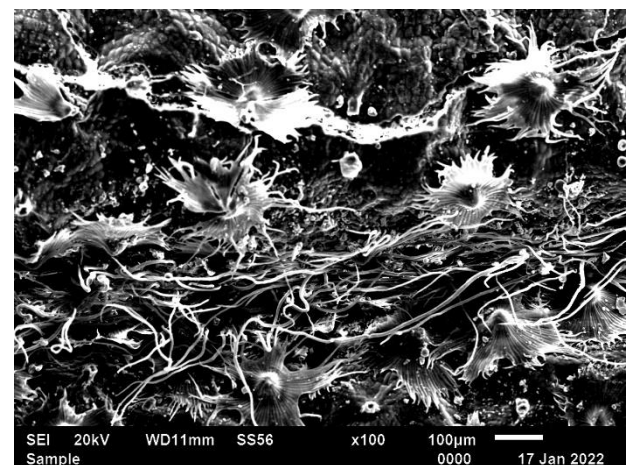
А



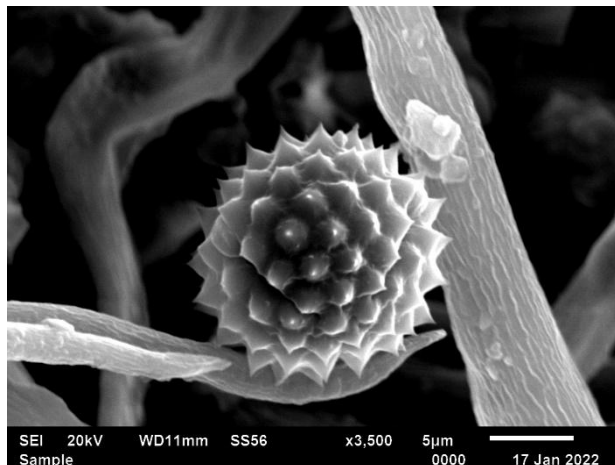
Б



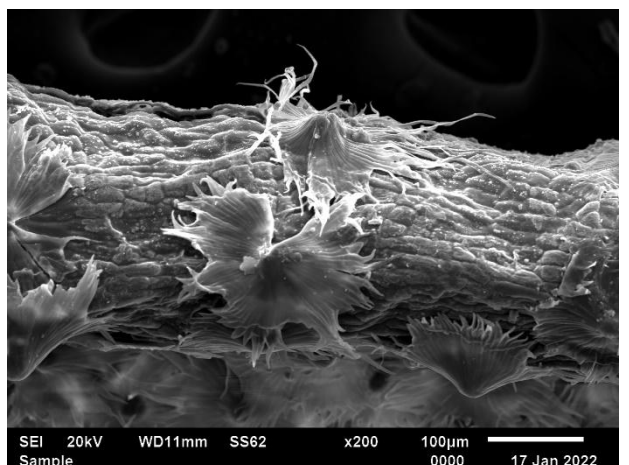
В



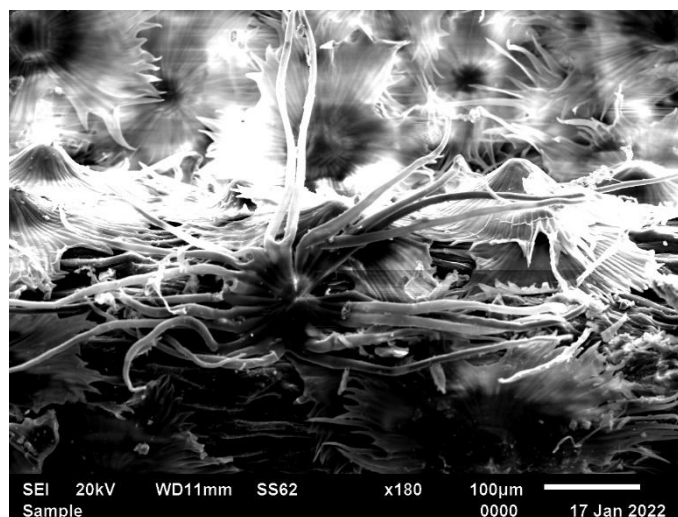
Г



Д



Е



Ж

Рисунок 25 – Фрагменты верхней поверхности листа облепихи крушиновидной (РЭМ): (А, Б – щитковидные волоски; В – звёздчатый волосок; Г – центральная жилка; Д – пыльцевое зерно; Е – край листовой пластины; Ж – щитковидно-звёздчатый волосок)

Нижняя поверхность листовой пластины, включая выступающую центральную жилку, плотно покрыта щитковидно-звёздчатыми и щитковидными трихомами. Звёздчатые волоски встречаются реже, в основном по жилке. Сплошное покрытие нижней поверхности листа волосками затрудняет визуализацию других диагностических признаков (формы клеток, наличие устьиц и их тип). При снятии верхнего слоя трихом определяется сетчатое жилкование листовой пластины. Частицы повреждённых волосков и клеток не позволяют идентифицировать тип устьичного аппарата, но сами устьица отчетливо визуализируются (Рисунок 26).

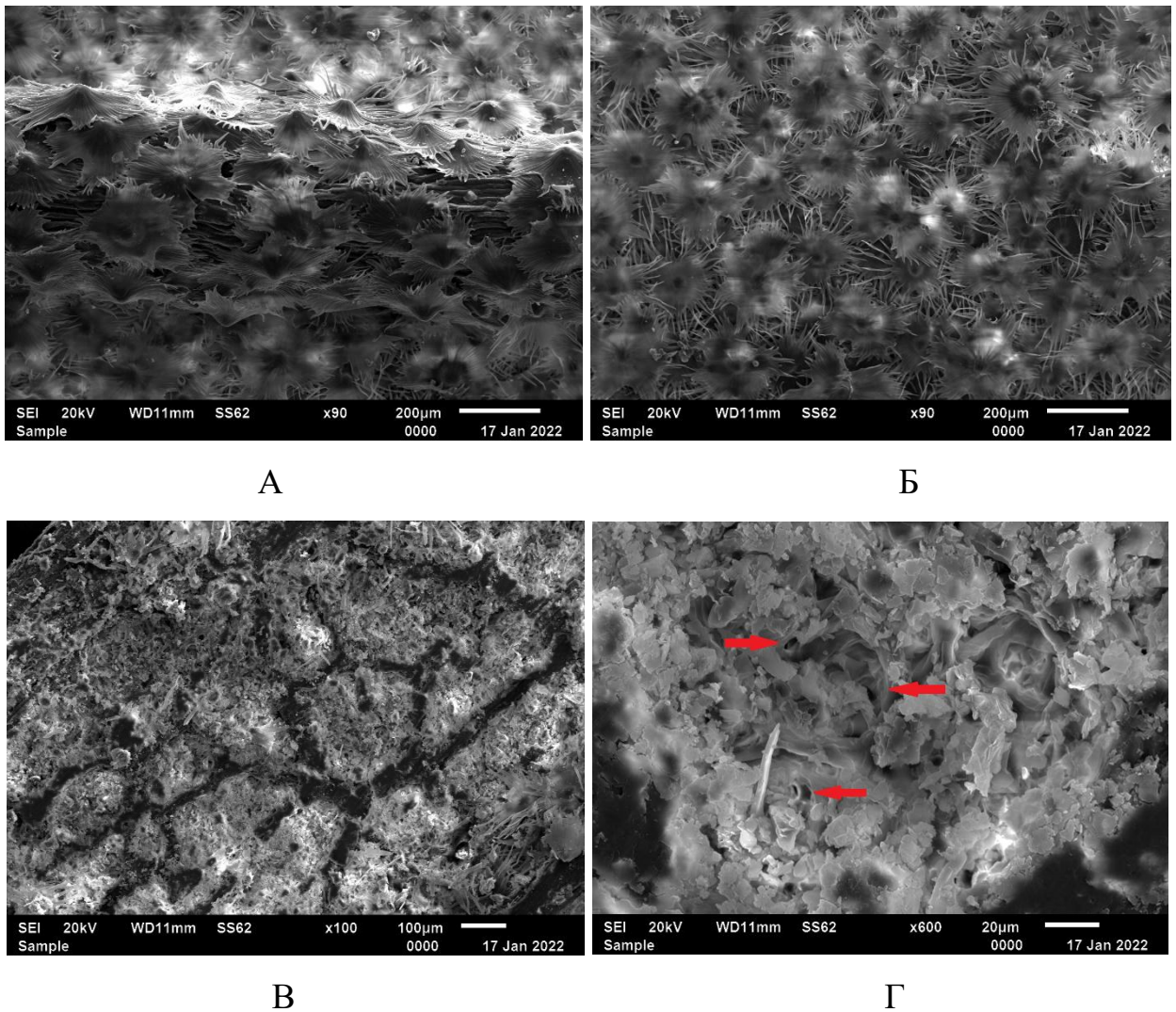


Рисунок 26 – Фрагменты листа облепихи крушиновидной (РЭМ): (А – центральная жилка; Б – щитковидные и щитковидно-звёздчатые трихомы; В – поверхность без слоя волосков; Г – устьица)

3.2.3. Петиолярная анатомия листьев облепихи крушиновидной

Одним из современных методов микроскопии ЛРС является петиолярная анатомия. Так как анатомо-диагностические признаки черешка листа характеризуются видоспецифичностью, это позволяет использовать петиолярную анатомию в целях установления подлинности ЛРС [18-19,39,57,103,112,114,117,119,127].

Черешок листа облепихи крушиновидной менее 5% от длины листовой пластины и составляет 1-2 мм. Черешок тонкий, желобоватый, опушенный, диаметром до 1 мм.

Получены микрофотографии поперечного среза (Рисунки 27-30) черешка, подготовленного как описано в Главе 2, п. 2. Установлены размеры основных диагностических признаков [104,128].

На поперечном срезе черешка листа облепихи крушиновидной видно его дорсовентральное строение (верхняя и нижняя стороны чётко идентифицируются). В среднем значении поперечный размер черешка на срезе составляет $0,759 \pm 0,038$ мм, продольный – $1,125 \pm 0,056$ мм (Рисунок 27). Поперечный срез имеет полукруглый профиль с уплощенной адаксиальной стороной. Латеральные стороны при переходе к абаксиальной выпуклой стороне гиперболически сужаются.

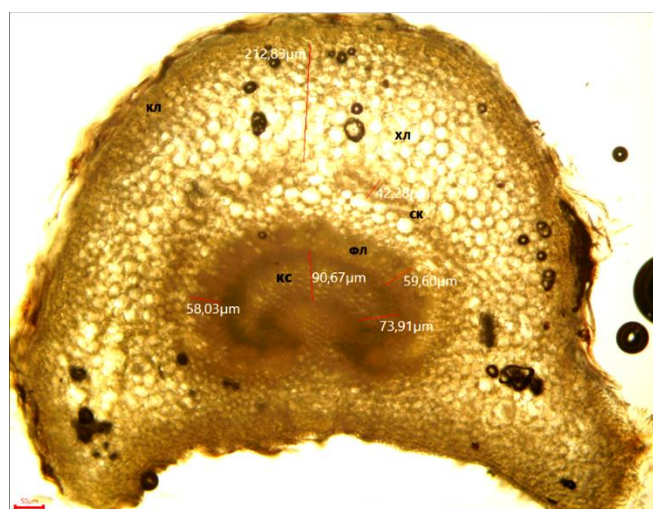


Рисунок 27 – Поперечный срез черешка листа (100×). Обозначения: кк – ксилема, фл – флоэма, ск – склеренхима, хл – хлоренхима, кл – колленхима

Эпидерма однослойная мелкоклеточная, кутинизированная (Рисунок 28). Под эпидермой по всему периметру среза расположены слои пластинчатой колленхимы (до 5-6 слоев клеток). Между клетками колленхимы видны щели-межклетники (Рисунок 28, А). Палисадная ткань черешка состоит из двух слоев вытянутых плотносомкнутых равномерно-утолщенных клеток. Губчатая ткань

состоит из 5-10 слоев крупных округлых тонкостенных клеток, между которыми расположены щели-межклетники. Толщина хлоренхимы в среднем – $212,88 \pm 10,64$ мкм. Проводящая система состоит из одного коллатерального, аркообразного пучка. Толщина флоэмы варьирует от 58,03 до 59,60 мкм. Ксилема в медиальной части в среднем имеет толщину $90,67 \pm 4,53$ мкм, а в латеральной части сужается до $73,91 \pm 3,70$ мкм (Рисунок 29). К флоэме примыкают несколько слоев мелких склерифицированных клеток ($42,28 \pm 2,11$ мкм) (Рисунок 27).

По всей поверхности черешка встречаются 3 вида трихом: щитковидные, щитковидно-звёздчатые и звёздчатые, образующие плотный покров (Рисунок 28). Щитковидный трихом состоит из многоклеточного диска (щитка) с лучисто-зубчатым краем и многоклеточной ножки. Ножка образована 6-8 радиальными клетками. У щитковидно-звездчатого волоска клетки диска сросшиеся на $1/3-1/2$ своей длины. У звездчатого срастаются только в основании, у ножки волоска [104].

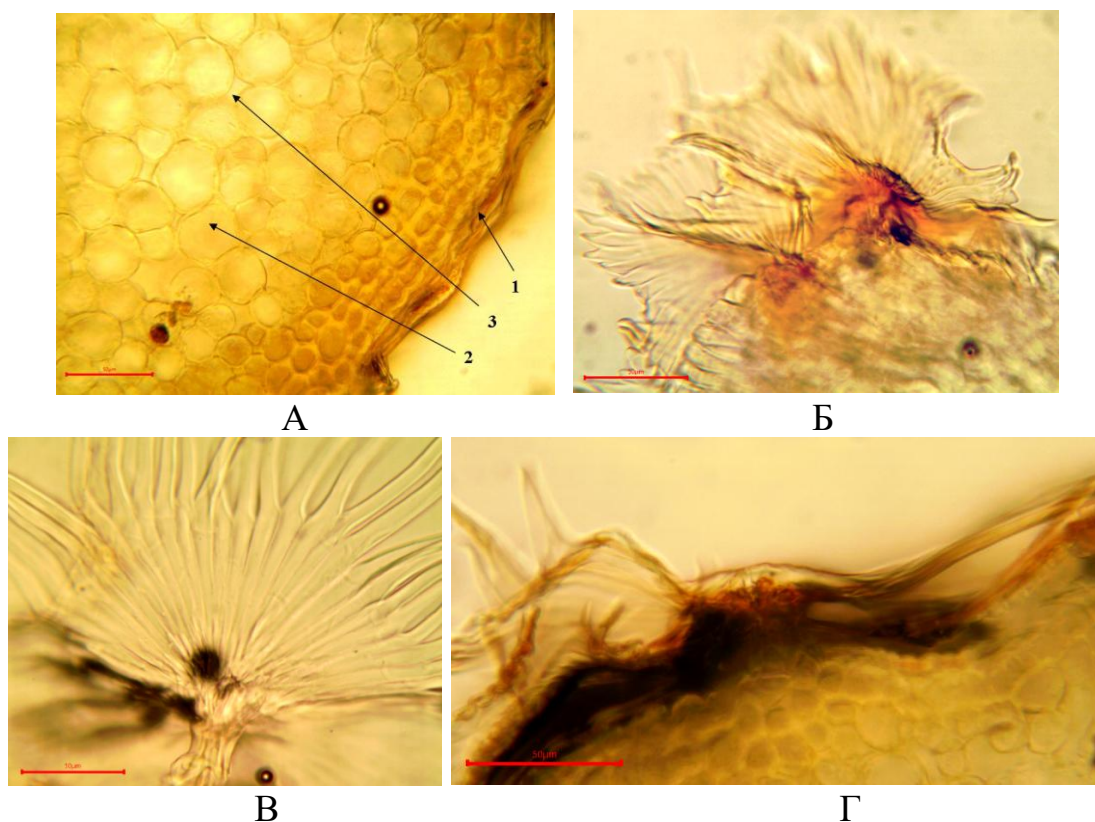


Рисунок 28 – Край черешка (400×): А – фрагмент с колленхимой (1 – эпидермис; 2 – клетки колленхимы; 3 – межклетники); Б – фрагмент с щитковидным волоском; В – фрагмент с щитковидно-звездчатым волоском; Г – фрагмент со звездчатым волоском

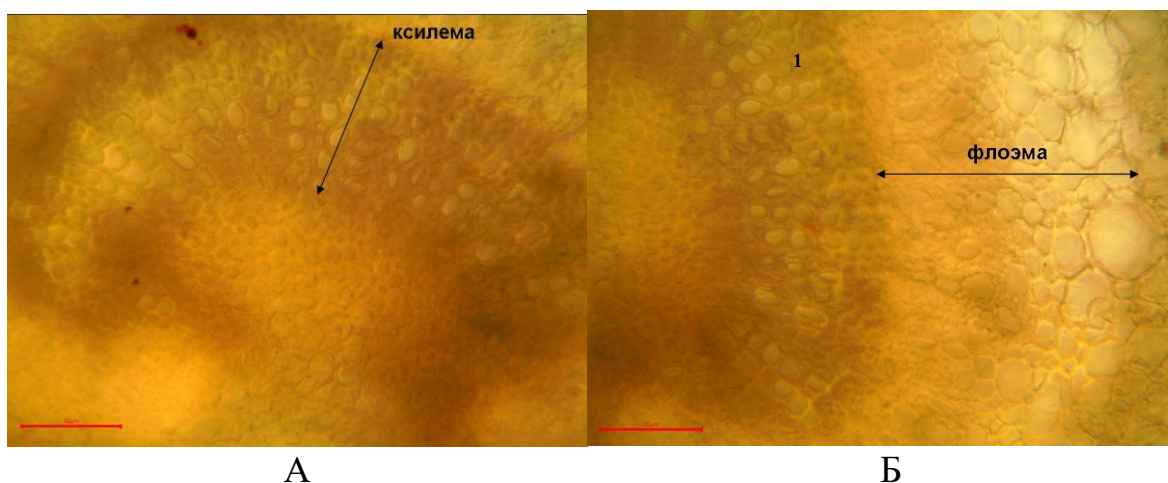


Рисунок 29 – Поперечный срез проводящего пучка черешка листа без окраски (400×): 1 – сосуды ксилемы

При нанесении на микропрепарат раствора флороглюцина и кислоты серной 25% проводящий пучок окрашивается в розово-красный цвет, что свидетельствует о наличии лигнифицированных элементов (Рисунок 30).

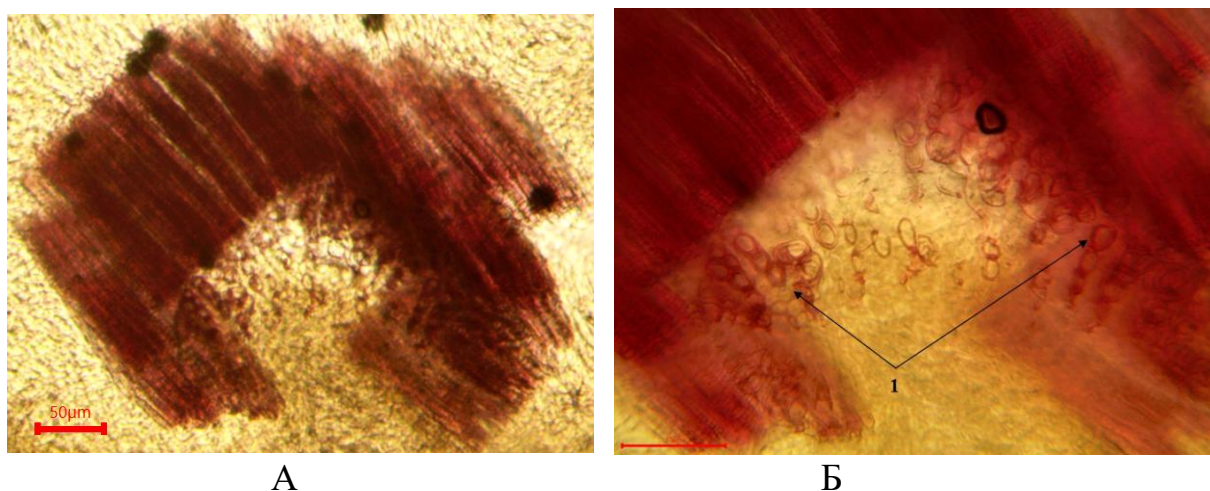


Рисунок 30 – Поперечный срез проводящего пучка черешка листа (окрашивание флороглюцином и кислотой серной) при увеличении 100× (А) и 400× (Б). 1 – сосуды ксилемы

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Методами макро- и микроскопии изучены основные морфологические и анатомические признаки листьев облепихи крушиновидной, которые могут быть использованы для определения подлинности данного сырья в цельном, измельченном и порошкованном виде. Установлены их биометрические характеристики. В качестве характерных признаков выделены: клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольной формы, с утолщёнными стенками. На нижней стороне листа клетки эпидермиса имеют сильноизвилистые стенки, а также устьица аномоцитного типа. Характерны три типа трихом – щитковидные, щитковидно-звездчатые, звездчатые. На верхней стороне листа преобладают рыхло расположенные щитковидные и щитковидно-звёздчатые волоски. Щитковидно-звёздчатые волоски плотно покрывают поверхность листовой пластинки снизу. Жилка покрыта прижатыми волосками всех трёх видов. Тип жилкования – сетчатый.

2. Подобраны оптимальные условия пробоподготовки листьев к проведению анализа методом световой микроскопии, позволившие провести визуализацию всех основных анатомо-диагностических признаков верхней и нижней поверхностей листовой пластинки.

3. При проведении люминесцентного анализа выявлены особенности флуоресценции листьев облепихи крушиновидной. Наиболее интенсивное желтое свечение наблюдается для клеток основания щитковидно-звездчатого волоска; основания щитковидных волосков характеризуются слабой флуоресценцией. Пластинки, из которых состоят щитковидные и щитковидно-звездчатые волоски, яркой флуоресценцией не обладают. Звездчатые волоски не имеют свечения. Ярко выраженная желто-зеленая флуоресценция характерна для жилки листа.

4. Впервые для листьев облепихи крушиновидной использован метод РЭМ для объемной визуализации и изучения морфологии поверхности. Уточнены детали строения трихом трёх типов. Визуализирована форма и особенности поверхности пыльцевых зерен.

5. Впервые проведена петиолярная анатомия листа облепихи крушиновидной. Установлено строение черешка и выявлены его основные анатомо-диагностические признаки: особое очертание поперечного среза медиальной части, заключающееся в полукруглом профиле с уплощенной адаксиальной стороной и выпуклой абаксиальной с гиперболически сужающимися латеральными сторонами; по всей поверхности черешка встречаются 3 вида трихом: щитковидные, щитковидно-звёздчатые и звёздчатые, образующие плотный покров; проводящая система состоит из одного коллатерального, аркообразного пучка, в котором сосуды ксилемы образуют С-образное скопление, окруженное клетками флоэмы; к флоэме примыкают несколько слоев мелких склерифицированных клеток; наличие лигнифицированных элементов в проводящем пучке.

6. Результаты исследований легли в основу разделов «Внешние признаки» и «Микроскопия» подготовленного проекта ФС «Облепихи крушиновидной листья» для ГФ РФ (Приложение А).

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ НАКОПЛЕНИЯ ЭКОТОКСИКАНТОВ ЛИСТЬЯМИ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

Оценка ЛРС на предмет содержания токсичных соединений (радионуклидов, остаточных органических пестицидов и тяжелых металлов) давно стала обязательным рутинным исследованием. Поэтому следующий этап работы был посвящен изучению накопления экотоксикантов в изучаемом сырье.

4.1. Элементный состав листьев облепихи крушиновидной

Исследование элементного состава листьев облепихи крушиновидной с применением современного метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (Глава 2, п. 4) представлялось интересным, так как микроэлементный профиль несет в себе информацию об экологическом состоянии региона и непосредственно самого растения. Изучение способности накопления различных химических элементов ЛРС дает возможность судить о безопасности его использования в медицинских целях [47].

Растения обладают способностью избирательно поглощать определенные элементы в соответствии со своими физиологическими потребностями, поэтому элементный состав ЛРС в значительной степени зависит от качества почв, на которых они произрастают [77].

При исследовании в сырье определено содержание 60 химических элементов, в т.ч. 13 из 15 эссенциальных, роль которых неоднократно обсуждена в научной литературе [16,118,168]. Также исследованию подвергали почву с места произрастания растения для оценки возможности концентрирования различных элементов посредством расчета коэффициента Перельмана (K_p). Результаты приведены в Таблице 4 [47].

Таблица 4 – Элементный состав листьев облепихи крушиновидной и почвы с места произрастания, мкг/г

Элемент	Листья/ПДК	Почва/ПДК (подвижные формы)	Кбп	Степень накопления	
Макроэлементы					
Калий (K)	10955,20±547,75	13300±665	0,82	СНиСЗ	
Кальций (Ca)	10371,90±518,55	14156±707,8	0,73		
Магний (Mg)	1697,20±84,85	5800±290	0,29		
Натрий (Na)	336,30±	4100±205	0,08	СЗ	
Фосфор (P)	2124,70±	2100±105	1,01	СН	
Микро- и ультрамикроэлементы					
Алюминий (Al)	136,80±6,79	45900±2295	$2,98 \cdot 10^{-3}$	СНиОСЗ	
Барий (Ba)	2,64±0,13	370,0±18,5	$7,14 \cdot 10^{-3}$		
Кремний (Si)	652,7±32,64	287000±14350	$2,27 \cdot 10^{-3}$		
Железо (Fe)	149,20*±7,46/5,0	28200±1410	$5,29 \cdot 10^{-3}$		
Марганец (Mn)	60,90±3,05	630,0±31,5/700 (Черноземы)	$9,67 \cdot 10^{-2}$		
Медь (Cu)	1,62±0,08/5,0	43,0±2,15*/3,0	$3,77 \cdot 10^{-2}$		
Молибден (Mo)	1,17±0,06	1,70±0,09/50,0	0,69	СНиСЗ	
Селен (Se)	0,85±0,043	1,50±0,075	0,57	СНиОСЗ	
Кобальт (Co)	0,11*±0,006/0,03	11,0*±0,55/5,0	$1 \cdot 10^{-2}$		
Стронций (Sr)	29,0±1,45	130,0±6,5	0,22	СНиСЗ	
Хром (Cr)	2,82*±0,14/0,2	55,0*±2,75/6,0	$5,13 \cdot 10^{-2}$	СНиОСЗ	
Цинк (Zn)	23,03*±1,15/10	130,0*±6,5/23,0	0,18	СНиСЗ	
Бериллий (Be)	Менее 0,001	1,70±0,085	$5,9 \cdot 10^{-4}$	СНиОСЗ	
Ванадий (V)	0,43±0,022	11,0±/150,0	$3,9 \cdot 10^{-2}$		
Висмут (Bi)	0,0013±0,00007	0,092±0,005	$1,4 \cdot 10^{-2}$		
Вольфрам (W)	Менее 0,001	3,03±0,15	$3,3 \cdot 10^{-4}$		
Гадолиний (Gd)	Менее 0,007	4,30±0,22	$1,6 \cdot 10^{-3}$		
Галлий (Ga)	0,029±0,001	12,0±0,60	$2,4 \cdot 10^{-3}$		
Гафний (Hf)	Менее 0,002	3,10±0,16	$6,45 \cdot 10^{-4}$		
Германий (Ge)	Менее 0,0001	1,2±0,06	$8,3 \cdot 10^{-5}$		
Гольмий (Ho)	Менее 0,005	0,63±0,03	$7,9 \cdot 10^{-3}$		
Диспрозий (Dy)	Менее 0,009	3,30±0,165	$2,7 \cdot 10^{-3}$		
Европий (Eu)	Менее 0,004	0,902±0,045	$4,4 \cdot 10^{-3}$		
Золото (Au)	Менее 0,0001	0,16±0,008	$6,25 \cdot 10^{-4}$		
Индий (In)	-	0,055±0,003	-		-
Итрий (Y)	0,04±0,002	17,0±0,85	$2,35 \cdot 10^{-3}$		СНиОСЗ
Иттербий (Yb)	Менее 0,005	1,70±0,09	$5,13 \cdot 10^{-2}$		
Лантан (La)	0,05±0,003	25,0±1,25	$2,0 \cdot 10^{-3}$		
Литий (Li)	0,36±0,018	27,0±1,35	$1,3 \cdot 10^{-2}$		
Лютеций (Lu)	Менее 0,002	0,31±0,016	$6,45 \cdot 10^{-3}$		

Продолжение Таблицы 4

Неодим (Nd)	0,07±0,0035	23,0±1,15	3,04·10 ⁻³	СНиОСЗ	
Никель (Ni)	0,45±0,023/3,0	32,0*±/4,0	1,4·10 ⁻²		
Ниобий (Nb)	0,01±0,0005	8,20±0,41	5,13·10 ⁻²		
Олово (Sn)	Менее 0,0001	4,30±0,22	1,2·10 ⁻³		
Платина (Pt)	Менее 0,0001	1,0±0,05	1,0·10 ⁻⁴		
Празеодим (Pr)	0,01±0,0005	6,10±0,31	1,6·10 ⁻³		
Рубидий (Rb)	3,62±0,18	75,0±3,75	4,8·10 ⁻²		
Самарий (Sm)	Менее 0,004	4,20±0,21	9,5·10 ⁻⁴		
Серебро (Ag)	Менее 0,0001	0,198±0,01	5,1·10 ⁻⁴		
Скандий (Sc)	Менее 0,002	3,0±0,15	5,13·10 ⁻²		
Сурьма (Sb)	0,02±0,001	0,99±0,05/4,5 (валовое содержание)	6,7·10 ⁻⁴		
Таллий (Tl)	Менее 0,004	0,36±0,018	1,1·10 ⁻²		
Тантал (Ta)	Менее 0,001	0,53±0,027	1,9·10 ⁻³		
Теллур (Te)	Менее 0,007	0,16±0,008	4,4·10 ⁻²		
Тербий (Tb)	Менее 0,004	0,64±0,032	6,25·10 ⁻³		
Титан (Ti)	7,10±0,36	3040±152	2,3·10 ⁻³		
Торий (Th)	0,015±0,0008	6,90±0,345	2,2·10 ⁻³		
Тулий (Tm)	Менее 0,004	0,29±0,0145	1,4·10 ⁻²		
Уран (U)	0,008±0,0004	1,50±0,075	5,3·10 ⁻³		
Цезий (Cs)	0,02±0,001	3,20±0,16	6,25·10 ⁻³		
Церий (Ce)	Менее 0,00001	53,0±2,65	1,88·10 ⁻⁷		
Цирконий (Zr)	Менее 0,0003	110,0*±5,5/6,0	2,7·10 ⁻⁶		
Эрбий (Er)	Менее 0,005	1,80±0,09	2,8·10 ⁻³		
Рутений (Ru)	-	0,01±0,0005	-		-
Рений (Re)	-	0,01±0,0005	-		-
Токсичные элементы					
Кадмий (Cd)	0,008±0,0004/1,0	0,44±0,022/2,0	1,8·10 ⁻²	СНиОСЗ	
Мышьяк (As)	0,54*±0,027/0,5	1,0±0,05/2,0 (валовое содержание)	0,54	СНиСЗ	
Ртуть (Hg)	Менее 0,0001/0,1	0,17±0,0085/2,1 (валовое содержание)	5,88·10 ⁻⁴	СНиОСЗ	
Свинец (Pb)	5,10±0,255/6,0	31,0±1,55/32,0 (валовое содержание)	0,16	СНиСЗ	
Примечание: «-» не обнаружен; * - элементы, для которых выявлено превышение ПДК					

В исследуемом образце листьев определены 5 макроэлементов; 21 микроэлемент; 32 ультрамикроэлемента. Следует отметить высокое содержание калия, кальция, магния, кремния, алюминия, железа и фосфора [47].

В результате, около 96% накапливающихся в листьях облепихи крушиновидной элементов относится к макроэлементам (Рисунок 31). При этом

содержание в почве токсичных для человека элементов, нормируемых в ЛРС, только в 5,77 раз больше, чем в анализируемом образце (Рисунок 32). Для сравнения, соотношение этих элементов в почве/плодах составляет 377 раз [118].



Рисунок 31 – Содержание макро – и микроэлементов в листьях облепихи крушиновидной



Рисунок 32 – Содержание макро – и микроэлементов в почве с места произрастания

По максимальному содержанию в листьях можно составить следующий ряд элементов в порядке убывания: Al > Fe > Zn > Mn > Zn > Pb > Cr > Cu > Ni > Co > Cd > Bi > Ag > Hg. Содержание токсичных тяжелых металлов в ЛРС не превышает допустимых нормативов [22,23]. Содержание мышьяка незначительно превышает установленные общие нормы ПДК для ЛРС. Это не единственный случай среди лекарственных растений фармакопейных видов [168]. Известно, что содержание As в листьях мяты, произрастающей на почвах, обогащённых данным элементом, часто превышает максимально допустимые в НД количества [168,189]. Многие

растения обладают природной толерантностью к элементным токсикантам и способны накапливать их в заметных количествах. Полученные результаты требуют уточнения и наработки статистики по содержанию мышьяка в листьях, заготовленных и на других территориях. В случае выявления устойчивости листьев облепихи крушиновидной к As может потребоваться введение для нее индивидуальных норм его содержания, аналогично ламинарии (индивидуальная норма на As в отечественной и Европейской фармакопее) [14]. При этом согласно данным расчета $K_{\text{бп}}$ As относится к группе элементов слабого накопления и среднего захвата. Следовательно, при сборе листьев от культивируемых растений на экологически благоприятных территориях данного элемента в сырье превышающим пороговые значения не обнаружится [47].

По нормативам СанПин 2.3.21078-01 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» (СанПин 2.3.21078-01), а также ОФС «Определение тяжелых металлов в ЛРС» ГФ XIV [23] в таблице 2 указаны предельно допустимые концентрации (ПДК) токсичных элементов в растительном сырье. В листьях облепихи крушиновидной отмечено превышение ПДК (установленные для овощей и зелени) для железа, цинка, кобальта и хрома, однако данные результаты могут быть связаны с тем, что почва с места произрастания показала превышение ПДК для данных элементов, а также циркония, никеля и меди, согласно нормативам содержания элементов в почвах [113]. При этом данные элементы не являются энергично и сильно накапливаемыми элементами (Таблица 4).

Распределение элементов в листьях облепихи крушиновидной по классификации А.И. Перельмана представлено на Рисунке 33. Энергично накапливаемых элементов не выявлено. К сильно накапливаемым элементам относится только Р равно, как и в плодах данного растения [118]. Натрий относится к элементам среднего захвата. Такие элементы как Мо, К, Са, К, Se и Pb относятся к группе слабого накопления и среднего захвата. Остальные обнаруженные минеральные компоненты относятся к группе слабого накопления и очень слабого захвата.

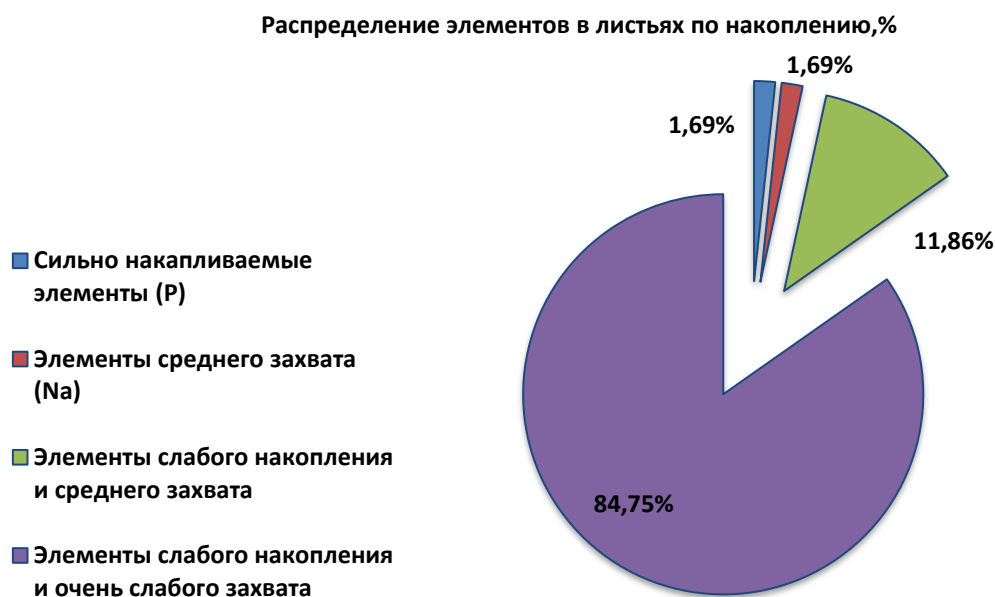


Рисунок 33 – Доля элементов по способности к накоплению из почвы (по Кбп)

Для оценки влияния места произрастания на накопление различных элементов в листьях *Hippophaes rhamnoides* L. представлялось интересным провести сравнительный анализ (Таблица 5) экспериментальных и имеющихся в литературных источниках данных [12,38,47,68-69,72].

Таблица 5 – Сравнительный анализ содержания элементов в листьях растения *Hippophaes rhamnoides* L., заготовленных на различных территориях, мкг/г

Элемент	Украина		Алтайский край	Европейская часть РФ
	Листья, собранные летом	Листья, собранные осенью		
Макроэлементы				
Натрий	1600,0	1770,0	-	-
Калий	11500,0	11550,0	7400,0	-
Кальций	6400,0	6900,0	21500,0	-
Магний	2250,0	2450,0	-	-
Фосфор	960,0	1000,0	-	-
Микро- и ультрамикроэлементы				
Кремний	2900,0	3700,0	-	-
Алюминий	320,0	460,0	-	-
Железо	320,0	420,0	190,0	3,0
Цинк	420,0	58,0	19,0	2,0
Медь	2,50	2,30	2,40	0,81
Марганец	256,0	231,0	130,0	-
Молибден	0,60	0,60	0,07	-
Свинец	0,30	0,30	0,81	-

Продолжение Таблицы 5

Никель	1,30	0,80	1,70	-
Стронций	22,0	23,0	70,0	-
Хром	-	-	2,0	-
Мышьяк	-	-	0,11	-
Кобальт	-	-	0,07	-

Результаты (Таблица 5) свидетельствует о сопоставимости полученных нами экспериментальных данных с опубликованными в литературе для листьев, заготовленных в других районах произрастания [47].

Таким образом, элементный состав листьев облепихи крушиновидной зависит от экологического благополучия места заготовки сырья. Проводя сравнительный анализ соединений изучаемых элементов в листьях и почве установлено, что не происходит накопление токсичных нормируемых элементов, исходя из отнесения их по классификации Перельмана к элементам слабого накопления и очень слабого захвата. Следовательно, возможно и целесообразно дальнейшее всестороннее изучение состава БАВ листьев с целью разработки и внедрения лекарственных растительных препаратов на их основе [47].

4.2. Радиационный контроль листьев облепихи крушиновидной

Одним из этапов изучения сырья в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд. является оценка показателя «Радионуклиды» с целью доказательства безопасности применения листьев облепихи крушиновидной. С использованием гамма-спектрометра проводили оценку удельной активности искусственных радионуклидов – цезия-137 и стронция-90 [48].

Проведение данного исследование являлось целесообразным, так как часть территорий Воронежской области (включая место заготовки сырья – Острогожский район, с. Веретье) была подвергнута радиоактивному заражению вследствие аварии на Чернобыльской АЭС. Кроме того, вблизи также расположена

Нововоронежская АЭС. Населённый пункт, в котором осуществлялся сбор листьев облепихи крушиновидной, по настоящее время относится к радиационно загрязнённым.

Исследование проводили в соответствии с ГФ РФ XV с использованием гамма-спектрометра (Глава 2, п. 4). Установлено, что удельная активность радионуклидов не превышает пределов чувствительности прибора (Таблица 6) [48].

Таблица 6 – Результаты испытаний на радионуклиды

Наименование радионуклида по НД	Единицы измерений	Фактическое значение радионуклидов в сырье	Допустимая удельная активность радионуклида, Бк/кг, не более [22]
Цезий – 137	Бк/кг	менее 3*	400
Стронций - 90	Бк/кг	менее 1*	200
Примечание: *в графе «Фактическое содержание радионуклидов в сырье» указано числовое значение, которое является нижним пределом чувствительности прибора, предусмотренной НД на метод испытаний.			

Согласно полученным результатам испытаний, исследуемые листья облепихи крушиновидной соответствуют критериям радиационной безопасности.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Определен состав элементов листьев облепихи крушиновидной и почвы с места произрастания растения методом масс-спектрометрии. Среди 50 обнаруженных в сырье химических элементов большая часть являются эссенциальными: макроэлементы, с преобладанием калия, кальция, магния и фосфора и микроэлементы, с преобладанием кремния, алюминия, железа.

2. В ходе анализа определено содержание токсичных элементов, которые подлежат нормированию. Содержание безусловно токсичных тяжелых металлов не превышает нормативов, установленных для оценки качества ЛРС. Содержание мышьяка незначительно превышает (в пределах ошибки определения) установленные общие нормы. Для листьев облепихи крушиновидной, как установлено на основе данных расчета Кбп, As относится к группе элементов слабого накопления и среднего захвата. Следует рекомендовать заготовку данного ЛРС от культивируемых растений на экологически благоприятных территориях. Требуются дополнительные уточняющие исследования по обоснованию повышения норматива содержания мышьяка для листьев облепихи крушиновидной (подобно сырью ламинарии и некоторых других).

3. По критерию «Радиационная безопасность» листья облепихи крушиновидной, заготовленные на территории Воронежской области, следует считать экологически безопасными, так как удельная активность нормируемых радионуклидов не превышает установленных ГФ РФ XV норм.

ГЛАВА 5. КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

С целью выявления целевых групп БАВ и оценки динамики их накопления в процессе развития листовой пластинки проведён качественный и количественный анализ листьев облепихи крушиновидной трёх фенологических фаз (Глава 2, п. 5-10). Так как в литературе отсутствует единые методики стандартизации данного сырья, данная глава посвящена разработке и валидации методик количественного определения БАВ листьев облепихи крушиновидной. Также на основе изучаемого сырья были получены опытные образцы водных и водно-спиртовых ЛФ.

5.1. Определение товароведческих показателей

Определение влажности, золы общей и золы нерастворимой в растворе 10% кислоты хлористоводородной, органических и минеральных примесей проводили в соответствии с методиками, изложенными в ГФ РФ XIV и XV издания (Глава 2, п. 5) [22,23]. Определена вариабельность данных показателей на различных стадиях заготовки сырья (Таблица 7).

Таблица 7 – Товароведческие показатели качества листьев

Фаза заготовки	Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в HCl, %
Исследованные образцы листьев облепихи крушиновидной			
Фаза 1 (конец мая-начало июня)	7,57±0,047	4,50±0,47	0,085±0,005
Фаза 2 (начало – середина июля)	7,67±0,036	5,14±0,30	0,20±0,06
Фаза 3 (конец августа – начало сентября)	8,36±0,068	4,92±0,22	0,21±0,08

По показателю «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» можно оценить степень загрязнённости сырья тяжёлыми металлами, так как полученный после сжигания и прокаливания остаток содержит практически нерастворимые хлориды металлов. Это косвенно связано с безопасностью использования заготовленного сырья в том или ином районе произрастания.

Разрабатывали также раздел для проекта ФС на данное ЛРС «Посторонние примеси». Предложены следующие нормативы по результатам экспериментальных исследований: «Ветки и другие части растения» (в том числе отделенные при анализе) – не более 1 %; «Листья, поврежденные вредителями» – не более 2 %; «Листья, изменившие окраску» – не более 1 %. Органическая примесь – не более 1 %. Минеральная примесь – не более 0,5 %.

По результатам исследования предложены верхние пределы по листьям облепихи крушиновидной следующих показателей: влажность – не более 10%, зола общая – не более 6%, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1% [47]. Дальнейшие исследования по оценке данных показателей для листьев разных годов сбора, сортов, разных регионов произрастания, разных сроков годности, заготовленных от мужских и женских растений, будут также необходимы для уточнения и возможной корректировки.

5.2. Определение содержания суммы экстрактивных веществ

Одним из показателей качества ЛРС, включенного практически во все монографии на растительные объекты ГФ РФ XV [23], является количественное содержание экстрактивных веществ (ЭВ). Поэтому в рамках фитохимического анализа листьев облепихи крушиновидной определение содержания ЭВ необходимо для установления такого показателя качества, как «Экстрактивные вещества» [86].

Для оценки влияния природы и полярности экстрагента использовали следующие растворители: гексан, хлороформ, этилацетат, ацетон, спирт 96, 70 и 40%, вода очищенная, а также кислота хлористоводородная разведенная и 0.25% раствор аммиака (Рисунки 34 и 35) [86].

Оптимальным экстрагентом для листьев облепихи крушиновидной могут быть выбраны вода очищенная и спирт этиловый 40-70%, так как наблюдается максимальное выделение комплекса БАВ из изучаемого сырья [86].

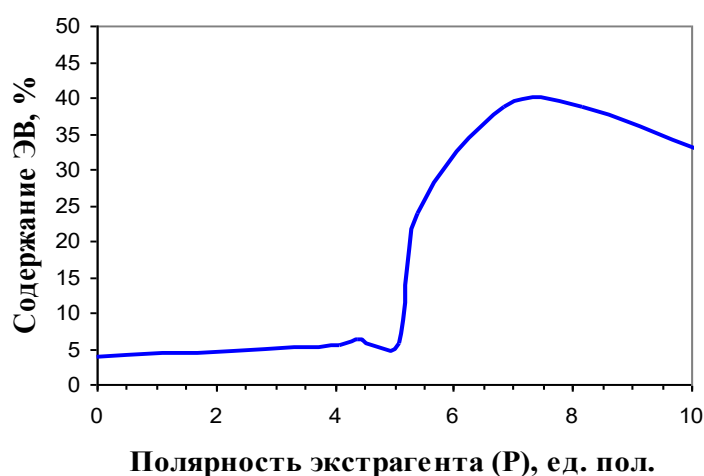


Рисунок 34 – Влияние полярности экстрагента на выход ЭВ из листьев облепихи крушиновидной

Наибольший выход ЭВ при экстракции сырья спиртами 40-70 % (Рисунок 34) объясняется их универсальностью по отношению к БАВ различной природы.

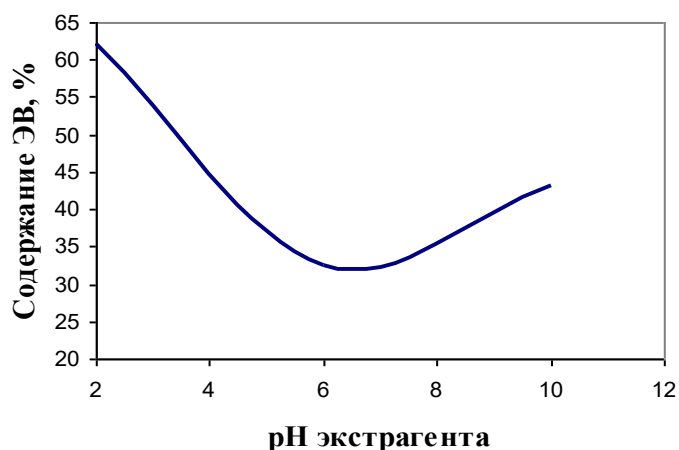


Рисунок 35 – Влияние pH экстрагента на выход ЭВ из листьев облепихи крушиновидной

Для определения влияния кислотности экстрагента на данный показатель сырьё подвергали экстракции растворителями в интервале рН 2-10. В результате установлено, что при рН=2-3 выход ЭВ максимальный, постепенно снижаясь к рН=6-7, и снова увеличивающийся с ростом рН до 10-11 (Рисунок 35). Это связано, в первую очередь, с гидролитическими процессами БАВ в кислой и щелочной средах, что приводит к повышению их растворимости и выходу в извлечение.

Для сравнительного анализа накопления БАВ в листьях облепихи крушиновидной различных изучаемых фенологических фаз проведено определение содержания ЭВ в них на примере 70% этанола, как экстрагента, обеспечивающего максимальную степень извлечения (Рисунок 36).

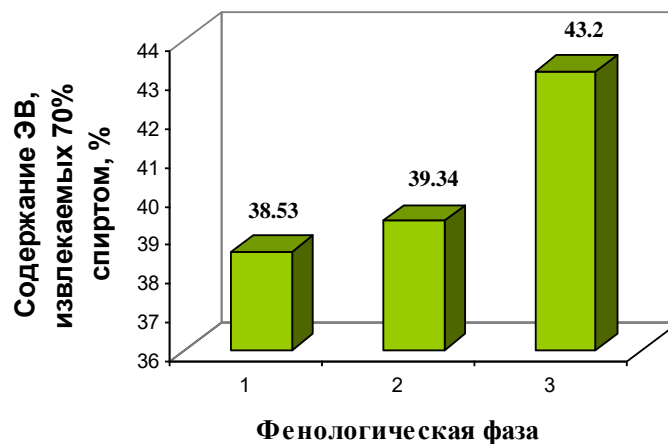


Рисунок 36 – Выход ЭВ из листьев, заготовленных в различные изучаемые фенологические фазы

В результате установлено, что в фазу 3 (фаза массового созревания плодов) наблюдается максимальное накопление БАВ, экстрагируемых данным растворителем.

Согласно вышеизложенному рекомендуемой фазой заготовки листьев облепихи крушиновидной является фаза массового плодоношения (конец августа – начало сентября), так как выход БАВ на данных стадиях достаточно высок, а раннее обезлиствование растения может привести к снижению накопления БАВ в фармакопейном сырье (плодах). В подготовленный проект ФС включены

рекомендуемые на основании экспериментальных данных нормативы показателя «Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом этиловым» – не менее 30 %, «Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой» – не менее 25% (Приложение А).

5.3. Исследование состава биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной

В целях качественного анализа БАВ листьев облепихи крушиновидной использовали групповые качественные реакции (Глава 2, п. 7), подробно описанных в Приложении Д (Таблица Д.1). Результаты проведённых исследований представлены в Таблице 8. Для проведения качественных реакций предварительно готовили водное и водно-спиртовое извлечение (Глава 2, п. 7).

Таблица 8 – Результаты качественного анализа БАВ в листьях облепихи крушиновидной (фаза заготовки – 3) [40]

Группа БАВ	Заключение о присутствии
Алкалоиды	Отсутствуют
Сапонины (тритерпеновой группы)	Присутствуют (спирто-растворимые сапонины)
Полисахариды (слизи)	Присутствуют
Дубильные вещества (гидролизуемые танины)	Присутствуют
Витамины (Аскорбиновая кислота)	Присутствует
Флавоноиды	Присутствуют
Антраценпроизводные	Присутствуют
Аминокислоты (АК)	Присутствуют
Лейкоантоциановые соединения	Присутствуют
Каротиноиды	Присутствуют
Хлорофилловые соединения	Присутствуют

В результате проведённого исследования установлено, что листья облепихи крушиновидной содержат аскорбиновую кислоту, слизи, тритерпеновые сапонины,

простые фенолы и дубильные вещества идролizuемой природы, флавоноиды, антраценпроизводные (1,4-диоксиантрахиноны), а также свойственный для листьев комплекс пигментов (хлорофиллов и каротиноидов). Кумарины и алкалоиды отсутствуют в данном сырье, что согласуется с литературными данными. [1,5,40,169,181].

5.3.1. Исследование хроматографических профилей листьев облепихи крушиновидной в тонком слое сорбента

Способ «отпечатков пальцев» или «штрихкодирования» - «Fingerprinting» - быстрый и высокопроизводительный метод, направленный на получение профиля метаболитов в суммарных экстрактах. Обычно при использовании данного подхода метаболиты не идентифицируют и не определяют количественно [67].

5.3.1.1. Исследование состава флавоноидов листьев облепихи крушиновидной

Флавоноиды в листьях облепихи крушиновидной в составе комплекса БАВ полифенольной природы, наряду с суммой дубильных веществ, определяют ценность данного сырья для медицины и фармации. Поэтому разработка и внедрение методик их разделения и идентификации в НД по стандартизации данного сырья является актуальной задачей для исследований.

Разработку методики разделения флавоноидов листьев облепихи методом ТСХ проводили с использованием извлечения, получаемого следующим образом. Высушенное сырье измельчали и просеивали через сита с диаметром отверстий 3,0 мм. Экстрагирование проводили 70% этиловым спиртом в соотношении сырье – экстрагент (1:50) на водяной бане в течение 120 минут.

Для хроматографирования использовались пластины марки «Silica gel 60 F254» на алюминиевой подложке (Germany) размером 10×10 см и марки «Sorbfil» (Россия, Краснодар) различных типов (ПТСХ-АФ-А-УФ; ПТСХ-АФ-В-УФ; ПТСХ-П-А-УФ, ПТСХ-П-В-УФ) размерами 10×10 и 10×15 см. Пробы наносили с помощью микрошприца МШ-10 (Россия, СПб, ЗАО «Вектон») (Глава 2, п. 7).

В качестве элюентов были использованы наиболее часто рекомендуемые в литературе системы этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода в соотношениях (7,5:1,5:1,5) и (5:1:1) с близкими значениями полярности по Л. Снайдеру 5,31 и 5,25 соответственно [20,126], а для идентификации полученных зон был использован УФ-свет после обработки пластин 10% спиртовым раствором NaOH и 5% спиртовым раствором алюминия хлорида.

Тип и размер пластин, как известно, существенным образом влияет на качество разделения зон БАВ на хроматограммах. Поэтому в работе проведена сравнительная характеристика различных пластин для ТСХ (Таблица 9) на основе показателей эффективности с целью выбора наиболее предпочтительных. Предварительно установлено, что оптимальный объем пробы извлечения для всех изученных типов пластин составляет 7-10 мкл при нанесении в виде тонкой полосы длиной не более 5 мм, а не круглой зоны).

Таблица 9 – Параметры эффективности хроматографического разделения флавоноидов листьев облепихи крушиновидной на различных типах пластин для ТСХ (этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода в соотношениях (7,5:1,5:1,5); проявитель - 10% спиртовым раствором NaOH)

№ зоны	ПТСХ-АФ-В-УФ (10×15 см)			ПТСХ-П-А-УФ (10×10 см)			№ зоны
	$R_f \pm 0,02$	α^*	R^{**}	$R_f \pm 0,02$	α	R	
1	0,29	2,45	2,45	0,24	3,17	2,60	1
2	0,50	1,0		0,45	1,22		2
3	0,58	0,72	3,40	0,55	0,82	1,49	3
4	0,63	0,59	1,22	0,78	0,28	2,93	4
5	0,69	0,45	1,31	0,93	0,08	3,73	5
6	0,73	0,37	1,22	0,99	0,01	7,50	6

Продолжение Таблицы 9

7	0,80	0,25	1,48	-			
8	0,85	0,18	1,39				
9	0,90	0,11	1,64				
10	0,94	0,06	1,72				
11	0,99	0,01	6,40				
ПТСХ-АФ-А-УФ (10×10 см)				ПТСХ-П-В-УФ (10×15 см)			
1	0,24	3,17	2,50	0,25	2,91	2,85	1
2	0,44	1,27		0,50	1,02		2
3	0,48	1,08	1,18	0,69	0,45	2,67	3
4	0,52	0,92	1,17	0,88	0,14	3,21	4
5	0,58	0,72	1,28	0,98	0,03	5,60	5
6	0,68	0,47	1,53	0,99	0,01	3,13	6
7	0,76	0,32	1,47	-			
8	0,93	0,08	4,27				
9	0,98	0,02	3,75				
ВЭТСХ «Silica gel 60 F254» (10×10 см)				ВЭТСХ «Silica gel 60 F254» (10×15 см)			
1	0,07	13,93	3,70	0,02	44,45	3,35	1
2	0,21	3,76		0,07	13,28		2
3	0,26	2,85	1,32	0,10	9,00	1,48	3
4	0,30	2,33	1,22	0,13	6,69	1,35	4
5	0,38	1,63	1,43	0,19	4,26	1,57	5
6	0,45	1,22	1,34	0,22	3,54	1,20	6
7	0,52	0,92	1,33	0,25	3,00	1,18	7
8	0,64	0,56	1,64	0,27	2,70	1,11	8
9	0,88	0,14	4,00	0,30	2,33	1,16	9
10	0,98	0,02	7,00	0,33	2,03	1,15	10
-				0,39	1,56	1,30	11
				0,41	1,44	1,08	12
				0,44	1,27	1,13	13
				0,48	1,08	1,18	14
				0,54	0,85	1,27	15
				0,56	0,79	1,08	16
				0,65	0,54	1,46	17
				0,88	0,14	3,86	18
				0,98	0,02	7,00	19
Примечание: * α – селективность разделения; **R – разрешение двух хроматографических зон [17,18].							

В использованных элюирующих системах наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон флавоноидов на всех использованных пластинах, так как значение селективности сорбции (коэффициента разрешения двух рядом расположенных хроматографических зон), больше 1,0 (Таблица 9). Однако, наибольшее количество разделяемых зон флавоноидов листьев в тонком

слое удалось достичь только при использовании пластин типа ВЭТСХ «Silica gel 60 F254» (10×15 см), что определило использование в дальнейшей работе.

На хроматограммах извлечения из листьев облепихи в УФ-свете при нанесении 7 мкл после проявления 10% спиртовым раствором NaOH или 5% спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдали 19 зон. При сравнении величин R_f полученных хроматографических зон с доступными нам стандартными образцами флавоноидов, были идентифицированы зоны рутина ($R_f=0,54\pm 0,02$); кверцетина ($R_f=0,78\pm 0,02$) и лютеолин-7-гликозида ($R_f=0,76\pm 0,02$). Неидентифицированные зоны предположительно также относились к флавоноидам, так как имели характерное свечение в УФ-свете [82,85,135]. Зона со значением величины $R_f=0,99\pm 0,01$ были отнесены к хлорофилловым соединениям (зеленая окраска в видимом свете и розовая – в УФ-свете). Полученный вид хроматограммы извлечений в УФ-свете из листьев облепихи крушиновидной представлен на Рисунке 37.

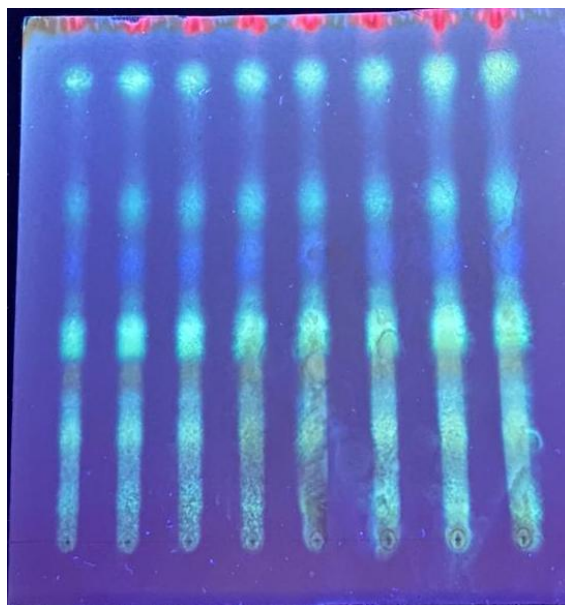


Рисунок 37 – Вид хроматограммы извлечений из высушенных листьев облепихи крушиновидной в УФ-свете после проявления 10% спиртовым раствором NaOH (слева направо: 2 мкл; 3 мкл; 4 мкл; 5 мкл; 6 мкл; 7 мкл; 8 мкл; 9 мкл)

При визуальной оценке хроматограмм с большим количеством разделяемых зон с близкими значениями величин R_f возможны ошибки, поэтому полученные

результаты сравнивали с данными обработки хроматограмм компьютерной программой «Денситометр Сорбфил» (ООО «Имид», Краснодар). Для чего полученные хроматограммы сканировались при помощи планшетного сканера с разрешением не менее 600 dpi, а изображения обрабатывались указанным выше программным обеспечением. В результате при использовании исследуемых систем и детектирующих реагентов обнаружено также 19 зон (Рисунок 38 и 39). Расчет значений величин R_f при помощи данной программы считается более правильным, так как центр зоны не всегда совпадает с визуальным (Таблица 10).

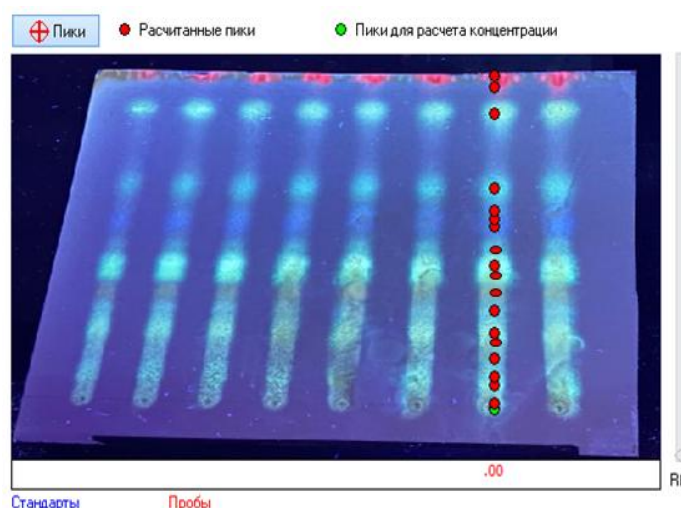


Рисунок 38 – Скрин данных результатов определения количества зон на треке извлечений из высушенных листьев облепихи крушиновидной в УФ-свете после проявления 10% спиртовым раствором NaOH (слева направо: 2 мкл; 3 мкл; 4 мкл; 5 мкл; 6 мкл; 7 мкл; 8 мкл; 9 мкл)

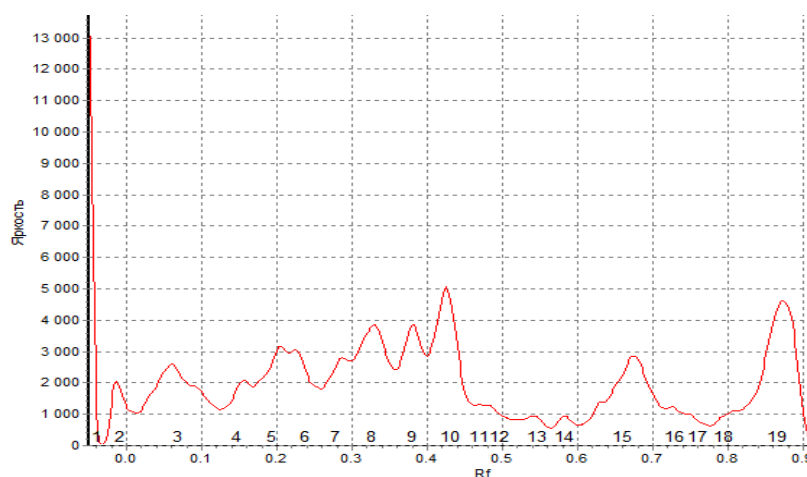


Рисунок 39 – Денситограмма трека разделения флавоноидов листьев облепихи крушиновидной

Таблица 10 – Сравнение параметров эффективности хроматографического разделения флавоноидов листьев облепихи крушиновидной в различных системах (ВЭТСХ «Silica gel 60 F254» (10×15 см); проявитель - 5% спиртовой раствор алюминия хлорида) по данным программы «Денситометр Сорбфил»

Пик	этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (5:1:1)					этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (7,5:1,5:1,5)					Цвет зоны в УФ-свете
	R _f ±0,02	S мкм ²	%S	H, мкм	%H	R _f	S мкм ²	%S	H, мкм	%H	
1	0,02	31700	2,8	2050	3,5	0	33850	1,8	3735	4,6	желтый
2	0,09	115800	10,2	2610	4,4	0,02	104300	5,5	4310	5,4	
3	0,19	41800	3,7	2073	3,5	0,09	217300	11,5	6250	7,8	голубовато-зеленый
4	0,24	74500	6,6	3172	5,4	0,13	84200	4,5	4811	6	
5	0,26	59200	5,2	3063	5,2	0,18	59100	3,1	3907	4,9	
6	0,32	52800	4,7	2798	4,8	0,21	94060	5	4774	5,9	
7	0,36	113850	10	3843	6,5	0,24	108750	5,8	6557	8,1	
8	0,41	79400	7	3858	6,6	0,26	139300	7,4	5831	7,2	
9	0,46	119000	10,5	5056	8,6	0,32	82400	4,4	4365	5,4	синий
10	0,50	11700	1	1307	2,2	0,36	70300	3,7	3023	3,8	
11	0,51	24000	2,1	1292	2,2	0,42	114400	6,1	6630	8,2	ярко-голубая
12	0,57	18700	1,6	952	1,6	0,45	241900	12,8	7948	9,9	
13	0,62	16700	1,5	941	1,6	0,50	60550	3,2	2693	3,3	
14	0,71	113600	10	2861	4,9	0,58	118300	6,3	3052	3,8	голубовато-зеленый
15	0,76	18300	1,6	1247	2,1	0,68	166260	8,8	3423	4,3	
16	0,78	16400	1,4	1021	1,7	0,82	19450	1	1090	1,4	
17	0,84	19400	1,7	1114	1,9	0,84	7200	0,4	1032	1,3	
18	0,90	141800	12,5	4617	7,8	0,9	135300	7,2	5438	6,8	
19	0,98	30750	2,7	3069	5,2	0,99	27700	1,5	1456	1,8	розовый
Сумма	-	1134800	-	58886	-	-	1886000	-	80464	-	-

Таким образом, разделение флавоноидов можно проводить в любой из исследованных систем. Однако, лучшей подвижной фазой с точки зрения высоты, эквивалентной теоретической тарелке, является система этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (5:1:1), которая далее использована в работе и может быть рекомендована для включения в современную НД для данных целей.

Известно, что группа фенольных соединений (флавоноидов в частности) в растениях неоднородна, а их содержание вариабельно в зависимости от различных факторов внешней среды. Так, интересным представлялось изучить состав данных БАВ листьев в различные фенофазы (Рисунок 40) с целью научно обоснованного определения оптимального срока заготовки данного ЛРС.

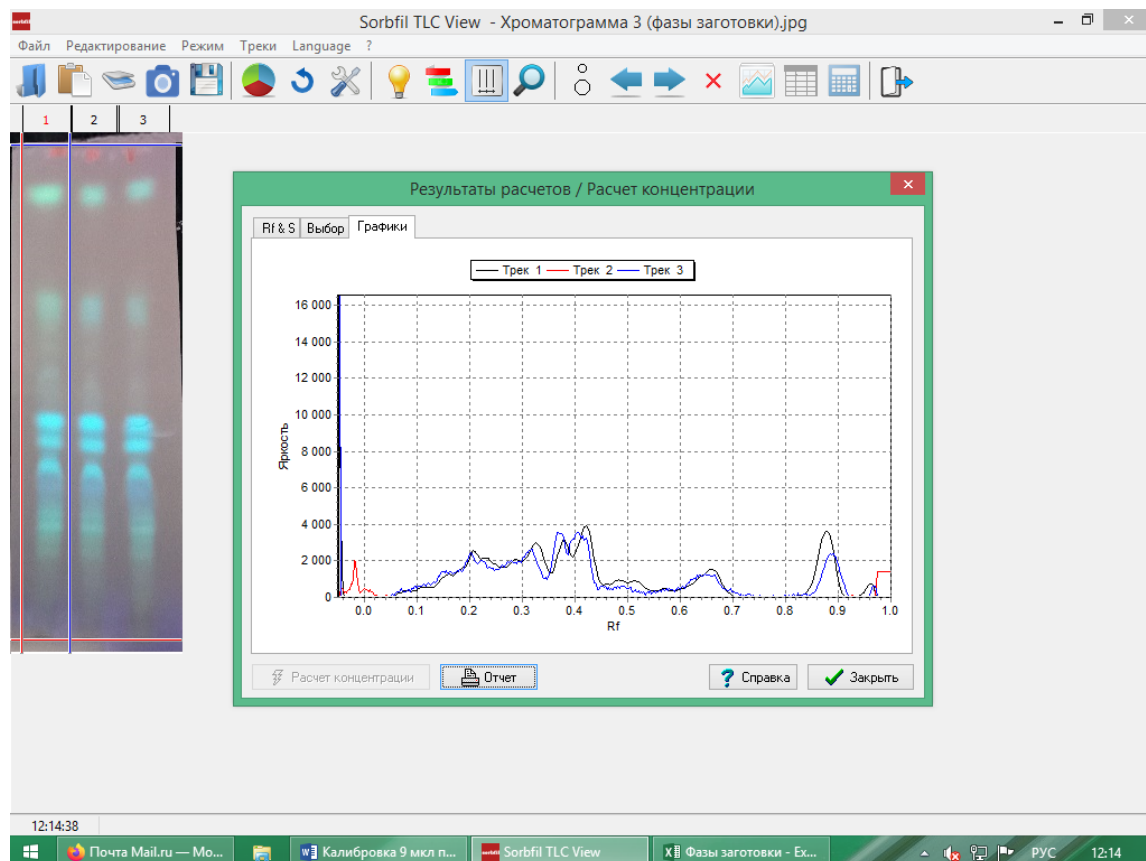


Рисунок 40 – Воспроизводимость величин R_f при оценке 3-х однотипных треков (трек 1 – фаза заготовки 1; трек 2 – фаза заготовки 2; трек 3 – фаза заготовки 3) на хроматограммах извлечений из листьев (скрин экрана)

Полученные данные показали, что при заготовке листьев в период с начала июня по конец августа (фазы 1-3) качественный состав флавоноидов не меняется.

Однако, при сборе в период технической спелости плодов (конец августа – начало сентября – фаза 3), в ТСХ-профиле извлечений зоны флавоноидов визуально характеризуются меньшей площадью и интенсивностью окраски. Это может быть связано с тем, что флавоноиды в процессе развития растения подвергаются химическим превращениям (окисление, гидролиз), что приводит к снижению их концентрации к окончанию вегетации.

Таким образом, основываясь на параметрах эффективности хроматографирования, по совокупности способов визуальной оценки хроматограмм и их обработки при помощи компьютерной программы «Денситометр Сорбфил» подобраны оптимальные условия разделения флавоноидов листьев облепихи крушиновидной в тонком слое сорбента. Установлено наличие 18 БАВ флавоноидной природы, а также хлорофилл [139]. При заготовке листьев в период с начала июня по конец августа (фазы 1-3) качественный состав данных БАВ не меняется, среди которых идентифицированы рутин, кверцетин и лютеолин. Однако, при сборе листьев одновременно с плодами, в ТСХ-профиле извлечений зоны флавоноидов визуально характеризуются меньшей площадью и интенсивностью окраски, чем при заготовке их в период формирования плодов, что согласуется с данными о количественном содержании суммы флавоноидов в листьях различных фаз заготовки [110], описываемых далее в данной главе (п. 5.5.1).

5.3.1.2. Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной

Пигменты листьев облепихи крушиновидной (хлорофиллы и каротиноиды), не являясь целевой группой БАВ листьев, служат частью комплекса БАВ суммарных экстрактивных препаратов на основе листьев, а, следовательно, могут вносить вклад, участвуя в проявлении различных видов фармакологической

активности последних. Поэтому на следующем этапе работы подбирались условия для разделения пигментов листьев методом ТСХ.

Обзор литературы показал, что для эффективного разделения хлорофиллов и каротиноидов различных зеленых частей растений используют многокомпонентные системы (Таблица 11) [32,62,64,105,108,112,119,129,133,140,160].

Таблица 11 – Исследованные системы для ТСХ пигментов листьев (на примере спиртового извлечения)

Состав	Соотношение	Полярность по Снайде ру	Значения величин $R_f \pm 0,02$ разделяемых пигментов				Характеристика картины разделения	Возможность использования
			Хлорофилл а	Хлорофилл b	Феофитин	β -каротин		
Ацетон-петролейный эфир	(3:7)	1,62	0,94	0,82	0,24	0,99	Удовлетворительное	+
Бензол-ацетон-петролейный эфир-гексан	(10:10:3:10)	2,46	0,99	0,99	-	0,99	Нет разделения	-
Петролейный эфир-этанол	(16:1)	0,31	0,28	0,18	0,41	0,97	Удовлетворительное	+
Петролейный эфир-метанол	(98:2)	0,13	0,26	0,11	-	0,30	Нет разделения	-
Петролейный эфир-ацетон	(95:5)	0,27	0,056	0,02	0,03	0,99	Нет разделения	-
Метанол-ацетон-вода	(20:4:3)	6,68	0,99	0,99	0,99	0,99	Нет разделения	-
Петролейный эфир-хлороформ	(3:1)	1,10	0,01	0,01	0,05	0,99	Нет разделения	-
Петролейный эфир-бензол-ацетон-кислота уксусная	(80:20:2:1)	0,75	0,023	0,124	0,27	0,99	Разделение неполное	+/-

Продолжение Таблицы 11

Петролейный эфир-ацетон	(1:1)	2,70	0,99	0,99	0,25	0,99	Нет разделения	-
Этилацетат-лед. уксусная кислота-вода	(7,5:1,5 :1,5)	5,24	0,99	0,99	0,99	0,99	Нет разделения	-
Петролейный эфир-этанол	(16:2)	0,48	0,94	0,75	0,97	0,99	Удовлетворительное	+

Вид полученных ТСХ-профилей пигментов листьев (на примере фазы заготовки 1), выделенных с применением различных по полярности экстрагентов, согласно методу 1 ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [23] представлен на Рисунках 41 и 42. Условия хроматографирования описаны в Главе 2, п. 7. Следует отметить, что картина разделения для спиртовых, ацетоновых и этилацетатных вытяжек имела одинаковый характер, так как данные растворители способны извлекать как полярные ксантофиллы, так и малополярные каротины и хлорофиллы (Рисунок 41). Гексановые же экстракты содержали более бедный состав пигментов (Рисунок 42), поэтому далее в работе не использовались.

Элюирующие системы № 2, 4-7, 9 и 10 не могут быть использованы для разделения и идентификации пигментов листьев крапивы двудомной (Рисунок 41, Таблица 11), поэтому для дальнейших расчетов их не использовали.

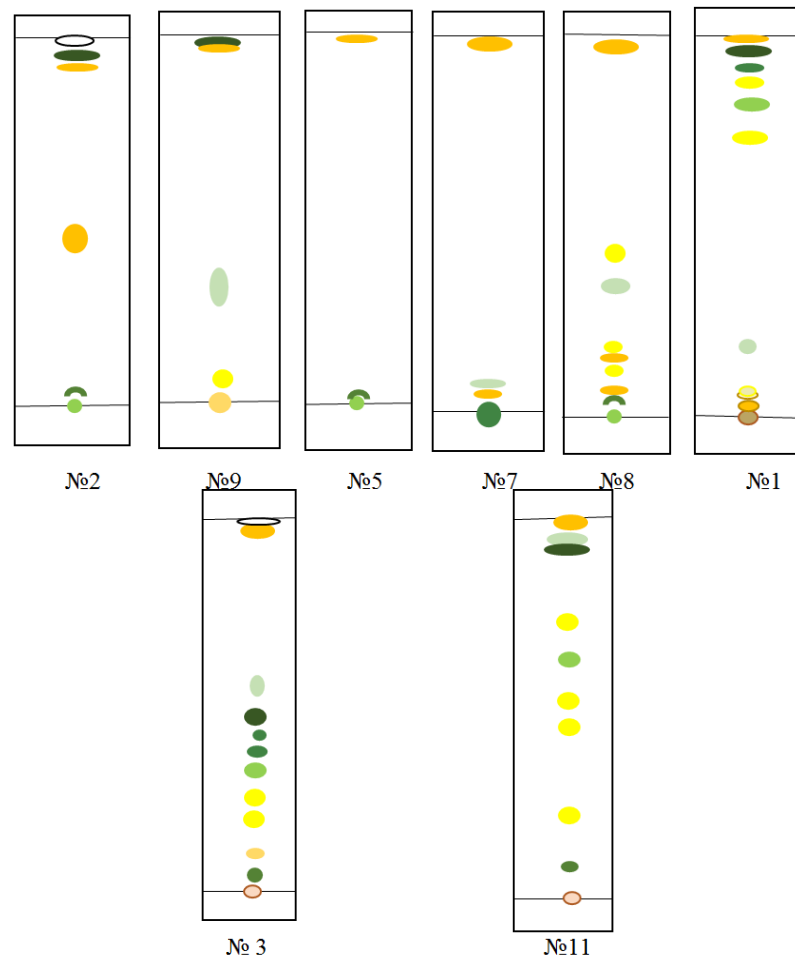


Рисунок 41 – Вид ТСХ-профилей пигментов листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 1); (экстрагент – этилацетат, ацетон, этанол), полученных в системах №1-11 (зоны без окраски идентифицировались в УФ-свете)

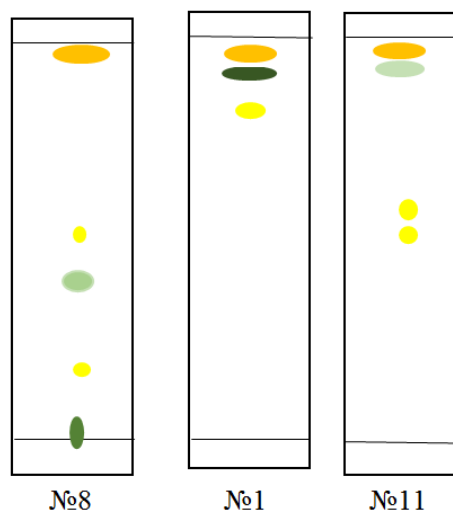


Рисунок 42 – Вид ТСХ-профилей пигментов листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 1); (экстрагент – гексан), полученных в системах №1, 8 и 11

В извлечениях, согласно данным литературы [46], идентифицированы β -каротин, феофитин, хлорофиллы а и в в соответствии со значениями хроматографической подвижности в различных системах.

Данные Рисунка 43 показывают, что величина R_f желтого пигмента β -каротина зависит от полярности элюента в очень узком диапазоне (от 0,1 до 0,4 ед.). При достижении полярности 0,5 и более ед., β -каротин практически не удерживается сорбентом – величина R_f стремится к единице (перестает зависеть от полярности). Вид подобной зависимости для зеленых пигментов – феофитина, хлорофиллов а и в имеет отличный характер. Величина R_f зеленых пигментов (Рисунок 43) переменна в различных диапазонах полярности, однако, вид кривых сходен между собой, по-видимому, в виду общности структур изучаемых хлорофиллов. При этом хлорофиллы а и в перемещаются с током элюента при достижении величины полярности системы 1,7 и более, тогда как для феофитина это наблюдается только при 5,0 ед. и более.

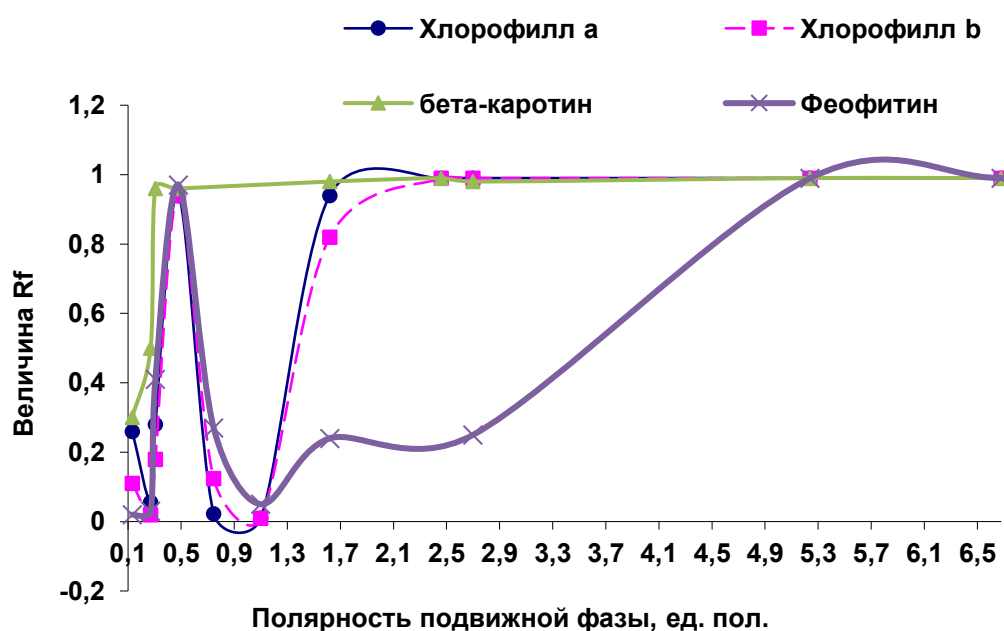


Рисунок 43 – Влияние полярности элюента на хроматографическую подвижность разделяемых пигментов в тонком слое (на примере феофитина, хлорофиллов а, в и β -каротина)

Оптимальные величины R_f достигнуты для пигментов листьев облепихи в системах № 3 и 11. Однако, максимальное количество разделяемых зон на хроматограммах, проявлялось только в системах №1, 3, 8 и 11, а выбор оптимальной хроматографической системы для многокомпонентных смесей должен основываться на параметрах, характеризующих эффективность хроматографического процесса и степень разделения веществ на пластинке (Таблица 12).

Таблица 12 – Эффективность разделения хроматографических зон пигментов листьев в различных элюентах (на примере спиртового извлечения)

№ зон	$R_f \pm 0,02$	K	L	Окраска в видимом свете	Окраска в УФ-свете (365нм)	Идентификация вещества
Элюирующая система №1						
1	0,24	3,17	6,10	серо-зеленая	розовая	феофитин
2	0,66	0,52		желтая	-	ксантофилл
3	0,82	0,22	2,36	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0,87	0,14	1,57	желтая	-	ксантофилл
5	0,91	0,10	1,4	ярко-зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
6	0,94	0,064	1,56	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
7	0,99	0,01	6,4	оранжевая	-	β -каротин
Элюирующая система №3						
1	0,014	70,36	2,18	грязно-зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
2	0,03	32,33		желтая	-	ксантофиллы
3	0,12	7,33	4,41	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0,134	6,46	1,13			
5	0,18	4,56	1,42	зеленая	розовая	неидентифицированный хлорофилл
6	0,22	3,55	1,28			
7	0,25	3,0	1,18			
8	0,28	2,57	1,17	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
9	0,41	1,44	1,78	серо-зеленая		феофитин
10	0,97	0,031	46,45	-	голубая	-
11	0,99	0,01	3,10	оранжевая	-	β -каротин
Элюирующая система №8						
1	0,023	42,47	1,72	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a
2	0,039	24,65		желтая	-	ксантофилл
3	0,124	7,06	3,49	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b
4	0,14	6,15	1,15	желтая	-	ксантофилл
5	0,16	5,28	1,16	желтая	-	ксантофилл

Продолжение Таблицы 12

6	0,27	2,70	1,96	серо-зеленая	розовая	феофитин	
7	0,31	2,23	1,21	желтая	-	ксантофиллы	
8	0,33	2,03	1,10				
9	0,99	0,01	203	оранжевая	-	β -каротин	
Элюирующая система №11							
1	0,063	14,88	4,69	зеленая	розовая	неидентифицированны й хлорофилл	
2	0,24	3,17		желтая	-	ксантофиллы	
3	0,625	0,60					5,28
4	0,67	0,50					1,20
5	0,75	0,33	1,52	светло-зеленая	розовая	хлорофилл b	
6	0,84	0,186	1,77	желтая	-	ксантофилл	
7	0,94	0,07	2,66	темно-зеленая	розовая	хлорофилл a	
8	0,97	0,03	2,33	серо-зеленая		феофитин	
9	0,98	0,02	1,5	-	голубая	-	
10	0,99	0,01	1,5	оранжевая	-	β -каротин	

Для оценки эффективности хроматографического процесса на хроматограммах были рассчитаны такие хроматографические параметры, как высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ, Н) и число теоретических тарелок (N) [44,126,155]. Данные представлены в Таблице 13. Вид зависимостей Н и N от полярности элюента для изучаемых пигментов листьев облепихи крушиновидной представлен на Рисунке 44.

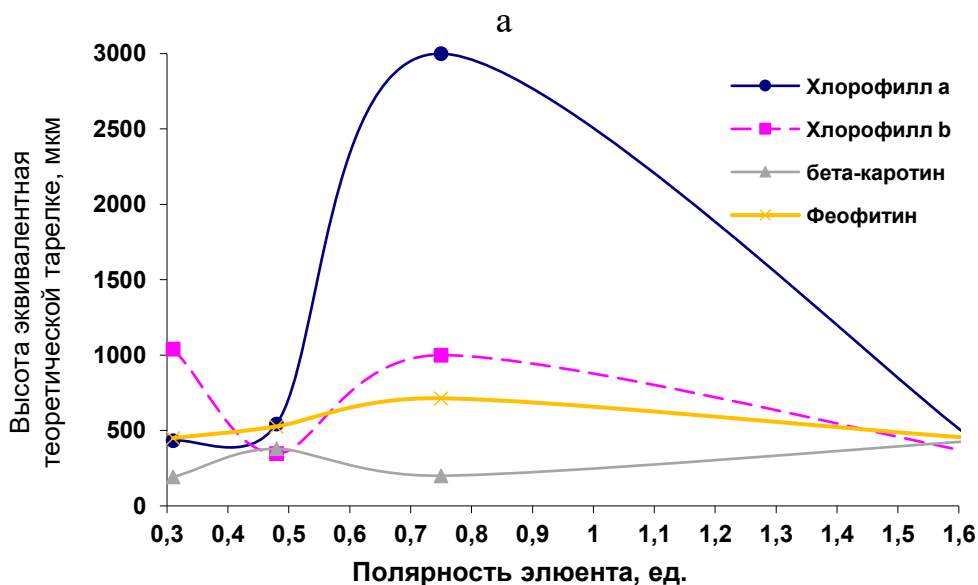
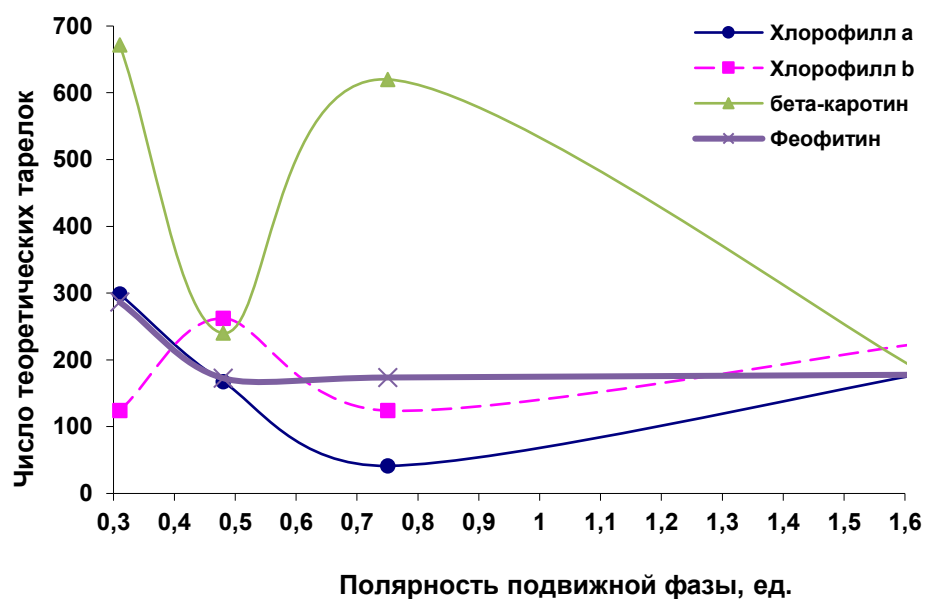
Наилучшая степень разделения пигментов на пластинках была достигнута в системе №8 (Рисунок 41, 42). Однако, в данной системе удастся разделить только 9 БАВ в отличие от систем №3 и 11.

Таблица 13 – Характеристика эффективности хроматографических систем для разделения пигментов листьев

БАВ	Н, мм	N	БАВ	Н, мм	N
Подвижная фаза №1			Подвижная фаза №8		
хлорофилл b	0,357	224,09	хлорофилл b	1,0	124,0
хлорофилл a	0,45	177,78	хлорофилл a	3,0	41,33
β -каротин	0,43	186,05	β -каротин	0,20	620,0

Продолжение Таблицы 13

феофитин	0,45	177,78	феофитин	0,714	173,67
Подвижная фаза №3			Подвижная фаза №11		
хлорофилл b	1,04	124,04	хлорофилл b	0,347	262,25
хлорофилл a	0,432	298,61	хлорофилл a	0,544	167,28
β -каротин	0,192	671,88	β -каротин	0,379	240,11
феофитин	0,45	286,67	феофитин	0,527	172,68



б

Рисунок 44 – Зависимость величин N (а) и H (б) от полярности элюента (на примере феофитина, хлорофиллов а, b и β -каротина)

Сравнивая параметры N (ВЭТТ) и приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ПВЭТТ), возможно провести выбор среди различных

сорбентов наиболее эффективных. Величина ПВЭТТ позволяет для двух любых пластин оценить качество сорбента, независимо от длины пластины, зернения сорбента и его природы [20]. Для каждого анализируемого типа пластин (Таблица 14) на хроматограммах после разделения были рассчитаны показатели эффективности [20,139].

Таблица 14 – Параметры эффективности хроматографического разделения пигментов листьев облепихи крушиновидной на двух типах пластин для ТСХ

№ зоны	ВЭТСХ-АФ-В						БАВ
	R _f	N	ВЭТТ, мм	ПВЭТТ	α^*	R**	
1	0,03	33,67	3,0	300	32,33	2,07	хлорофилл
2	0,06	67,33	1,50	150	15,59		ксантофиллы
3	0,26	269,33	0,375	37,5	2,85	5,47	хлорофилл b
4	0,30	113,48	0,89	89	2,33	1,22	
5	0,42	157,81	0,64	64	1,38	1,69	хлорофилл
6	0,53	306,06	0,33	33	0,89	1,55	хлорофилл a
7	0,67	250,62	0,403	40,3	0,50	1,78	феофетин
8	0,914	106,32	0,95	95	0,094	5,32	-
9	0,95	88,59	1,14	114	0,056	1,68	β-каротин
10	0,99	91,90	1,10	110	0,01	5,60	
ПТСХ-П-В							
1	0,03	38,33	3,0	300	32,33	1,71	хлорофилл
2	0,05	43,07	2,67	267	18,91		ксантофиллы
3	0,22	174,24	0,66	66	3,55	5,33	хлорофилл b
4	0,24	119,79	0,96	96	3,18	1,12	
5	0,318	251,64	0,457	45,7	2,14	1,49	хлорофилл
6	0,35	179,69	0,64	64	1,84	1,16	хлорофилл a
7	0,48	680,47	0,169	16,9	1,08	1,70	феофетин
8	0,72	363,92	0,316	31,6	0,39	2,77	ксантофилл
9	0,85	1337,21	0,086	8,6	0,18	2,17	-
10	0,98	133,72	0,86	86	0,012	15,0	β-каротин
11	0,99	161,97	0,71	71	0,01	1,20	

Примечание: α^* – коэффициент распределения; R** – разрешение двух хроматографических зон [17,18].

В использованной элюирующей системе наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон изучаемых пигментов на всех использованных пластинах, так как значение селективности сорбции (R) больше 1,0 (Таблица 14). Однако, показатели эффективности хроматографического разделения пигментов в

тонком слое достигают больших значений при использовании пластин типа ПТСХ-П-В.

Известно, что группа фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в зеленых частях растений неоднородна, а их содержание вариабильно в зависимости от различных факторов внешней среды. Так, интересным представлялось изучить состав пигментов листьев в различные фенофазы (Рисунок 45) с целью научно обоснованного определения оптимального срока заготовки данного ЛРС.

Полученные данные показали, что при заготовке листьев в период с начала июня по конец июля (фазы 1 и 2) качественный состав пигментов не меняется. Однако, при сборе в период технической спелости плодов (конец августа – начало сентября – фаза 3), в ТСХ-профиле извлечений обнаруживается дополнительная зона ксантофиллов (оранжево-желтое окрашивание в видимом свете) (Рисунок 45). Кроме того, другие зоны пигментов визуальнo характеризуются большей площадью и интенсивностью окраски, что свидетельствует об их накоплении в процессе жизни листовых пластинок. В связи с чем, с точки зрения разнообразия качественного состава и количественного содержания желтых и зеленых пигментов, можно считать листья, заготовленные в фазу 3.

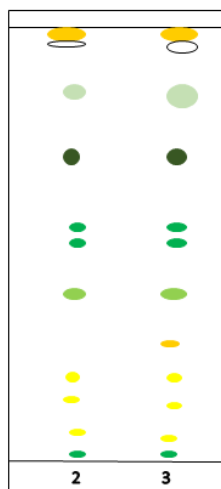


Рисунок 45 – ТСХ-профили пигментов листьев облепихи крушиновидной различных периодов заготовки сырья (2 и 3 фазы заготовки)

При однократном элюировании, даже при высоте пробега растворителя более 13 см, разделение зон изучаемых БАВ на хроматограммах может являться неполным, ввиду богатого состава пигментов в листьях. Одна хроматографическая зона может содержать несколько БАВ с похожими параметрами удерживания в данных условиях проведения ТСХ-анализа. Проведение двумерного хроматографирования на завершающем этапе было использовано для оценки полноты разделения выделенных пигментов по средствам однократного элюирования (Рисунок 46). В отличие от одномерной, двумерная ТСХ сопоставима с колоночной хроматографией по разрешающей способности [20]. На основании ранее полученных результатов, для проведения двумерного хроматографирования исследуемых пигментов в ЛРС третьей фазы заготовки, использовали пластины марки «Sorbfil» ВЭТСХ-АФ-В размером 10×10 см при элюировании в системе петролейный эфир-этанол (16:1) в двух направлениях. Вид двумерных хроматограмм извлечения из листьев представлен на Рисунке 46.

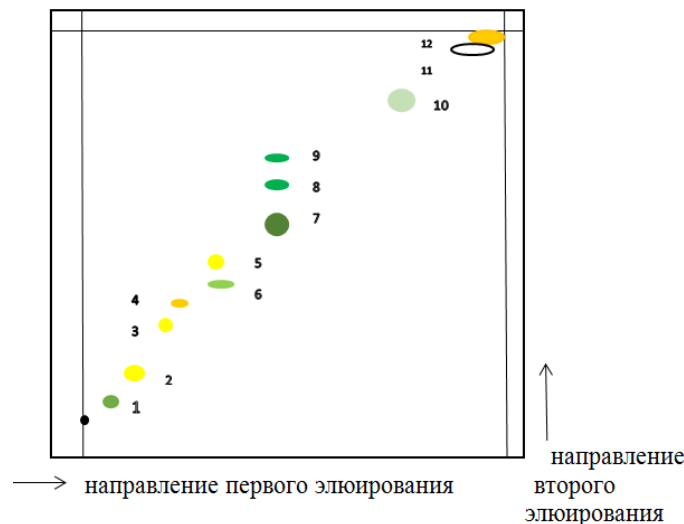


Рисунок 46 – Вид двумерной ТСХ извлечения из листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 3) при просмотре в видимом свете и УФ_{365 нм}-свете

На хроматограммах обнаружено 12 зон БАВ, 11 из которых отнесены к каротиноидам и хлорофиллам по характерному окрашиванию в видимом свете

(Таблица 15). Природа одной зоны не проявляющейся при дневном свете, имеющая интенсивно-голубую флуоресценцию в УФ-свете, не установлена.

Таблица 15 – Характеристика хроматографического профиля пигментов листьев облепихи крушиновидной (при $Z_{01}=Z_{02}=5$ мм и $Z_{f1}=92$ мм; $Z_{f2}=85$ мм)

№ зоны	$Z_{x1\pm 2}$, мм	$Z_{x2\pm 2}$, мм	Окраска зоны		БАВ
			в видимом свете	УФ _{365 нм} -свете	
1	2-3	1-2	Грязно-зеленая	розовая	хлорофилл
2	4-5	5-6	Желтая	-	ксантофилл
3	15-16	21-22	Желтая	-	ксантофилл
4	18-19	25-26	Желто-оранжевая	-	ксантофилл
5	24-25	25-26	Желтая	-	ксантофилл
6	25-26	30-31	Светло-зеленая	розовая	хлорофилл в
7	35-36	34-35	Темно-зеленая	розовая	хлорофилл а
8	35-36	39-40	Зеленая	розовая	хлорофилл
9	37-38	44-45	Зеленая	Зеленая	хлорофилл
10	56-57	64-65	Серо-зеленая	розовая	феофитин
11	74-75	80-81	-	голубая	-
12	77-78	83-84	Желто-оранжевая	-	β -каротин

Примечание: Z_{x1} - длина пути, пройденного пятном в направлении первого элюирования, мм; Z_{x2} - длина пути, пройденного пятном в направлении второго элюирования, мм

В литературе приводится информация о том, что при двумерном хроматографировании целесообразнее использовать координаты зон, в качестве которых могут быть использованы известные в ТСХ величины (Z_0 - расстояние от линии погружения до стартовой линии, мм; Z_f - путь, пройденный фронтом растворителя, мм; Z_x - длина пути, пройденного пятном, мм) для оценки их расположения на хроматограммах, что связано со значительным увеличением ошибки расчета привычного для хроматографии в тонком слое сорбента параметра R_f . Такие хроматографические профили – «fingers print» возможно использовать для оценки подлинности, а также экспресс-метода установления оптимального момента срока заготовки ЛРС, содержащего целый комплекс БАВ различной природы [133,139-140]. Кроме того, подобные хроматографические паспорта сырья могут быть использованы и для определения района заготовки, так как, вероятнее всего, состав пигментов зависит и от условий произрастания растения.

Методом двумерной ТСХ установлено также наличие 12 зон БАВ в извлечениях из листьев облепихи крушиновидной, поэтому для целей разделения и идентификации пигментов листьев различных фаз заготовки можно применять как двумерное, так и однократное элюирование при высоте пробега подвижной фазы не менее 13 см.

Таким образом, подобраны оптимальные условия разделения пигментов листьев облепихи крушиновидной в тонком слое сорбента. Установлено наличие 6 БАВ хлорофилловой природы, в т.ч. хлорофиллы а, b и феофитин, и 5 БАВ пигментов группы каротиноидов (β -каротин и ксантофиллы) [46].

5.3.1.3. Исследование состава аминокислот в листьях облепихи крушиновидной

Аминокислоты (АК) – первичные метаболиты жизнедеятельности растений, как известно, являются не только источником белка, но и строительным материалом при синтезе вторичных метаболитов – основных фармакофорных комплексов в извлечении.

В рамках комплексного фармакогностического исследования состава свободных аминокислот в общей сумме изучения листьев проведено методом ТСХ в сравнении с достоверными стандартными образцами и литературными данными (Рисунок 47).

Установлено, что водные извлечения (на примере отвара) листьев облепихи крушиновидной содержат 11 аминокислот, среди которых идентифицировано 10 (Таблица 16). Условия определения приведены в Главе 2 (п. 7). Следует отметить, что в использованной элюирующей системе, предложенной в работе [134], наблюдается удовлетворительное разделение зон аминокислот на хроматограммах при нанесении пробы объемом 10 мкл, что подтверждается данными расчета

коэффициента селективности сорбции ($R > 1,0$), представляющего собой отношение коэффициентов распределения ($R = \alpha_1/\alpha_2$) разделяемых веществ (α) [20,44,126,155].

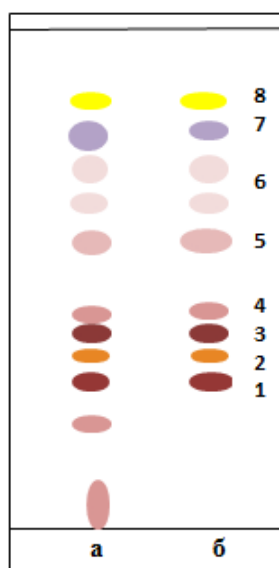


Рисунок 47 – Вид хроматограммы извлечений из листьев облепихи крушиновидной (а) на примере фазы заготовки 2 после проявления 1% раствором нингидрина в спирте и смеси стандартных образцов аминокислот (б) (1 – аргинин, 2 – пролин, 3 – глицин, 4 – глутаминовая кислота, 5 – валин, 6 – метионин, 7 – лейцин, 8 – фенилаланин)

Таблица 16 – Результаты исследования ТСХ-профиля свободных аминокислот листьев облепихи крушиновидной

Полученные зоны	Величина $R_f \pm 0,02$	Цвет зоны в видимом свете	Идентификация аминокислоты	Коэффициент распределения (α)	Коэффициент селективности сорбции (R)
1	0,054	розовый	лизин	17,52	5,23
2	0,23	розовый	не идентифицирована	3,35	
3	0,28	малиновый	аргинин	2,57	1,30
4	0,32	оранжевый	пролин	2,13	1,21
5	0,35	Темно-малиновый	глицин	1,86	1,15
6	0,38	розовый	глутаминовая кислота	1,63	1,14
7	0,46	светло-розовый	валин	1,17	1,39
8	0,52	светло-розовый	метионин	0,92	1,27
9	0,60	светло-розовый	тирозин	0,67	1,37
10	0,66	сине-фиолетовый	фенилаланин	0,52	1,29
11	0,72	желтое	лейцин	0,39	1,33

Различий в картине хроматографического разделения (по количеству и окраске зон) АК листьев на разных этапах сбора сырья отмечено не было. Таким образом, в водном извлечении листьев облепихи крушиновидной, приготовленного по типу отвара, методом ТСХ идентифицированы такие свободные аминокислоты, как аргинин, лизин, пролин, глицин, метионин, глутаминовая кислота, фенилаланин, тирозин, валин и лейцин [41]. Присутствие данных АК в составе подтверждено также методом капиллярного электрофореза (п. 5.5.3).

5.3.1.4. Определение дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной методом тонкослойной хроматографии

Дубильные вещества, как известно, являются одной из главных компонент полифенольного комплекса листьев. В виду того, что согласно патенту на получение противовирусного ЛРП «Гипорамин» [95] допускается его получение из листьев осеннего периода сбора, исследования проведены на примере сырья 3 фазы заготовки. Для подтверждения присутствия дубильных веществ гидролизуемой группы (п. 5.3 данной главы) проводили их разделение в водном извлечении, приготовленном по типу отвара [22,23], в тонком слое сорбента.

На силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» (Россия, Краснодар) 10×10 см (ПТСХ-АФ-А) наносили по 1-10 мкл водного извлечения листьев, приготовленного по типу отвара, и хроматографировали способом фронтального элюирования восходящим способом в соответствии с запатентованной методикой [98], сначала в системе диэтиловый эфир-уксусная кислота ледяная-гексан-этилацетат (20:20:20:40) до высоты подъема фронта 9 см, а затем, после просушивания при комнатной температуре, в системе этилацетат-муравьиная кислота конц.-кислота уксусная ледяная-вода (6:7,5:7,5:18) в том же направлении, остановив развитие хроматограмм при достижении высоты пробега второго элюента в 7 см. Пластины проявляли 1% спиртовым раствором железоаммониевых квасцов и высушивали

при температуре 105 °С 2-3 минуты. Зоны проявлялись в виде серо-голубых и зеленоватых пятен (Рисунок 48).

При хроматографировании 1 мкл водного извлечения обнаруживается 1 зона, идентифицированная по величине R_f в сравнении с достоверным стандартным образцом как галловая кислота. При нанесении 2-5 мкл – 2 зоны (одна из которых – кислота галловая); 6-7 мкл – 3 зоны (одна из которых – кислота галловая); 8-9 мкл – 4 зоны (одна из которых – кислота галловая) и 10 мкл – 5 зон (из которых идентифицированы кверцетин и кислота галловая). Результаты представлены в Таблице 17.

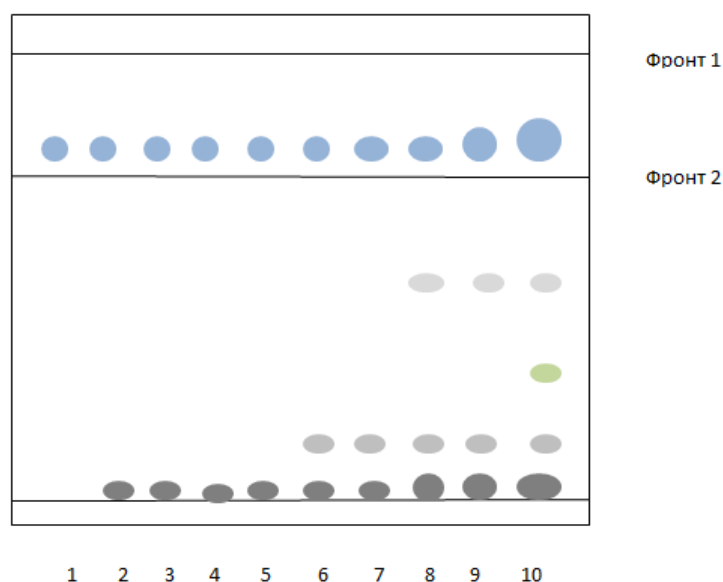


Рисунок 48 – Вид ТСХ-разделения дубильных веществ листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки – 3)

Таблица 17 – Результаты ТСХ-анализа дубильных веществ листьев облепихи крушиновидной

Объем пробы, мкл	R_f	R	Идентификация БАВ	Цвет зоны в видимом свете
1	$0,84 \pm 0,02$	-	Галловая кислота	Голубовато-серая
2-5	$0,05 \pm 0,002$	1951,2	Неидентифицированная зона	Темно-серая
	$0,83 \pm 0,02$		Галловая кислота	Голубовато-серая

Продолжение Таблицы 17

6-7	0,05±0,002	81,97	Неидентифицированная зона	Темно-серая
	0,17±0,02	23,80	Неидентифицированная зона	Светло-серая
	0,83±0,02		Галловая кислота	Голубовато-серая
8-9	0,05±0,002	81,97	Неидентифицированная зона	Темно-серая
	0,17±0,02	11,35	Неидентифицированная зона	Светло-серая
	0,70±0,02	2,10	Неидентифицированная зона	Серая
	0,83±0,02		Галловая кислота	Голубовато-серая
10	0,05±0,002	81,97	Неидентифицированная зона	Темно-серая
	0,17±0,02	11,35	Неидентифицированная зона	Светло-серая
	0,31±0,02	2,19	Кверцетин	Зеленоватая
	0,70±0,02	2,10	Неидентифицированная зона	Серая
	0,83±0,02		Галловая кислота	Голубовато-серая

Методом ступенчатого хроматографирования в водном извлечении листьев облепихи крушиновидной выявлено пять зон БАВ полифенольной природы, четыре из которых относятся к дубильным веществам гидролизуемой группы (по характерному голубовато-серому окрашиванию с железоммониевыми квасцами), в т.ч. галловая кислота (по величине R_f в сравнении с достоверным стандартным образцом), а также 1 флавоноидный компонент – кверцетин (по характерному зеленоватому окрашиванию с железоммониевыми квасцами и величине R_f в сравнении с достоверным стандартным образцом).

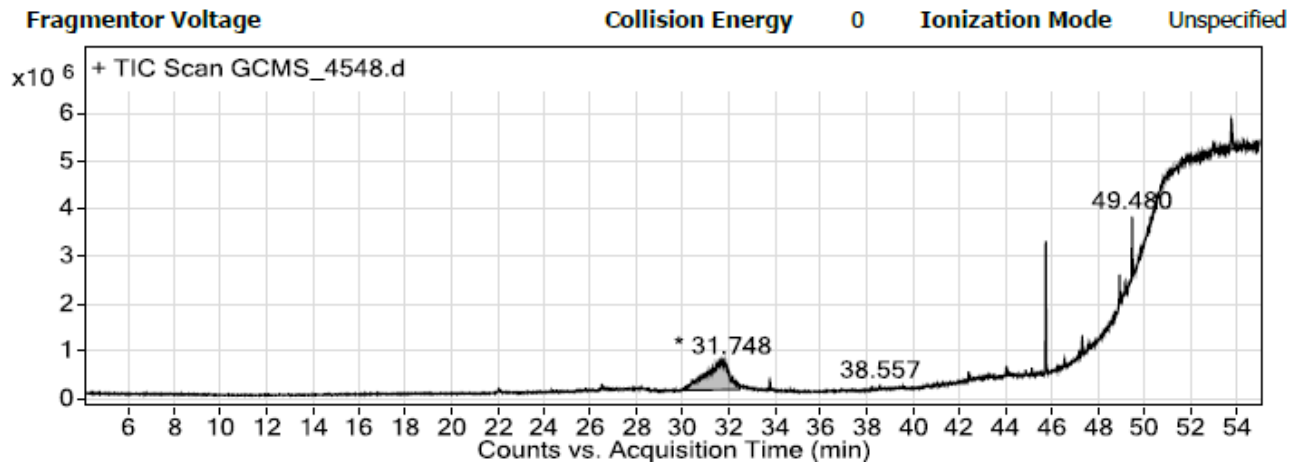
5.4. Исследование состава листьев облепихи крушиновидной методом газовой хромато-масс-спектрометрии

Компонентный состав липофильной фракции, согласно литературным данным, является наименее изученным и не рассматривается как потенциальный

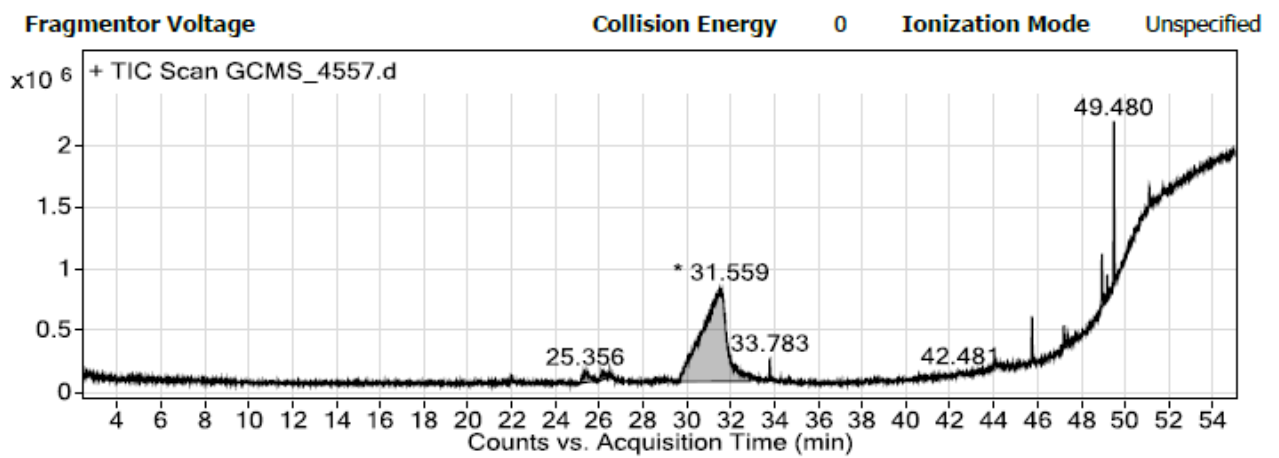
источник, что свидетельствует об актуальности проводимых исследований. Методом ГХ-МС установлен состав липофильной фракции, а также динамики их накопления.

Извлечения из исследуемого сырья проводили по методике ГФ РФ XIV издания [23] ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (методика 1) с применением спирта 96% этилового, хлороформа, гексана и эфира в качестве экстрагентов. В виду того, что только спиртовые извлечения показали наиболее богатый по составу и количественному содержанию компонентов профиль БАВ, далее в работе приводим только их обсуждение. Анализ осуществляли, как описано в Главе 2 (п. 8).

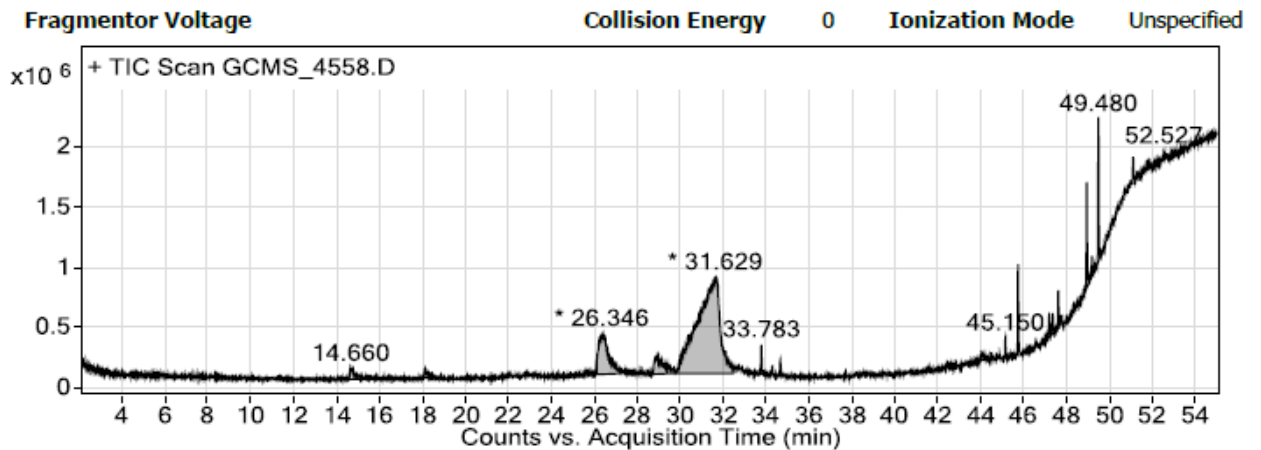
В результате исследования извлечений трех фенологических фаз заготовки листьев всего обнаружено 41 соединение, из них идентифицировано 30 – 73,17% (по 15 – 50% в извлечениях из листьев фаз заготовки 1 и 3; 12 – 40% - фазы заготовки 2). Вид хроматограмм (ГХ/МС) комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки приведен на Рисунке 49. Масс-спектры основных идентифицированных компонентов представлены на Рисунке 50. Спектр идентифицированных соединений в сравнительном аспекте по фенологическим фазам представлен на Рисунке 51 и в Таблице 18, которая демонстрирует соотношение групп БАВ в анализируемых извлечениях [136].



А



Б



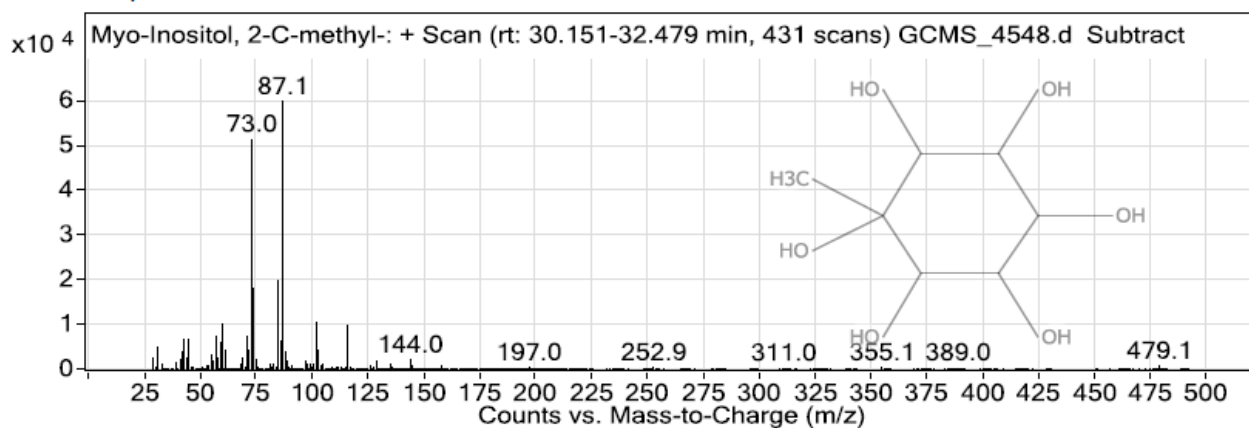
В

Рисунок 49 – Вид хроматограмм (ГХ/МС) комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки: А – фаза 1; Б – фаза 2; В – фаза 3

Таблица 18 – Идентифицированные соединения комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки

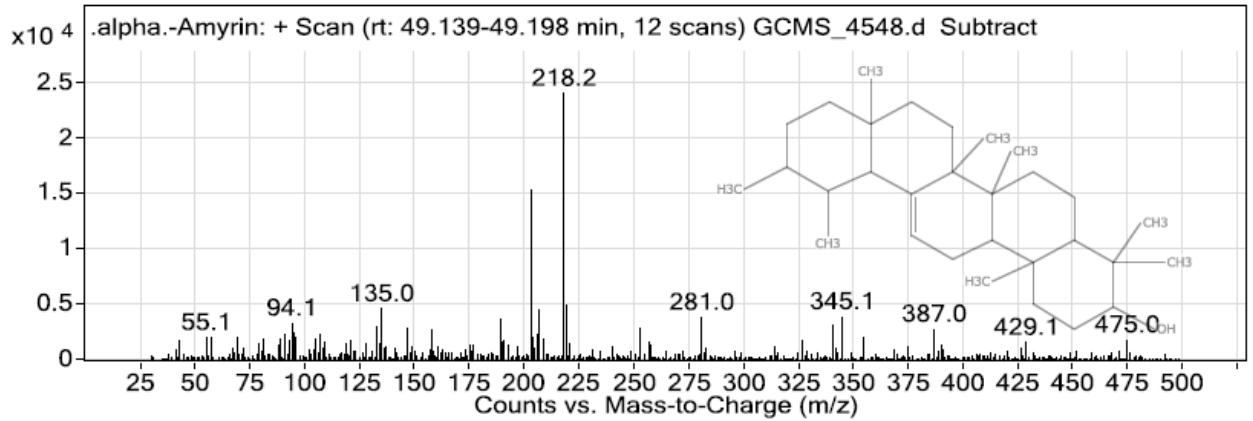
Соединение	Время удерживания, мин	Содержание в общей сумме, %		
		Фаза 1	Фаза 2	Фаза 3
d-манноза	28,89	-	-	5,34
Азафрин	47,358	-	-	0,69
альфа-амирин	49,177	0,95	4,45	3,24
Аскорбилпальмитат	53,788	5,33	-	-
бета-амирин	49,48	4,55	0,56	0,41
Бетулин	47,19	-	-	0,51
Витамин Е	47,607	0,42	0,11	0,88
гамма-ситостерол	48,933	2,0	1,69	2,56
Лактоза	26,097	-	1,06	-
Мио-инозитол, 2-С-метил-	31,748	69,69	-	-
Мио-инозитол, 4-С-метил-	31,559	-	86,66	67,54
Родопин	47,315	1,75	-	-
Фитол	34,66	-	0,21	0,5
Фитола ацетат	33,783	-	0,68	0,73
Всего соединений обнаружено	41	21	16	20
Идентифицировано из них	30	15	12	15
Идентифицированная сумма БАВ (% от общей суммы), всего	-	84,69	95,42	82,4

MS Zoomed Spectrum



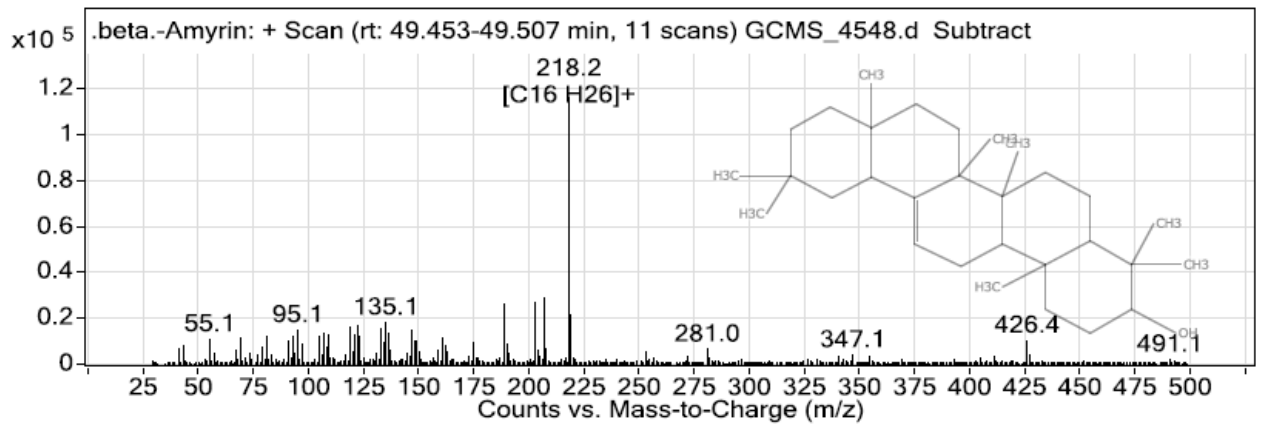
А

MS Zoomed Spectrum



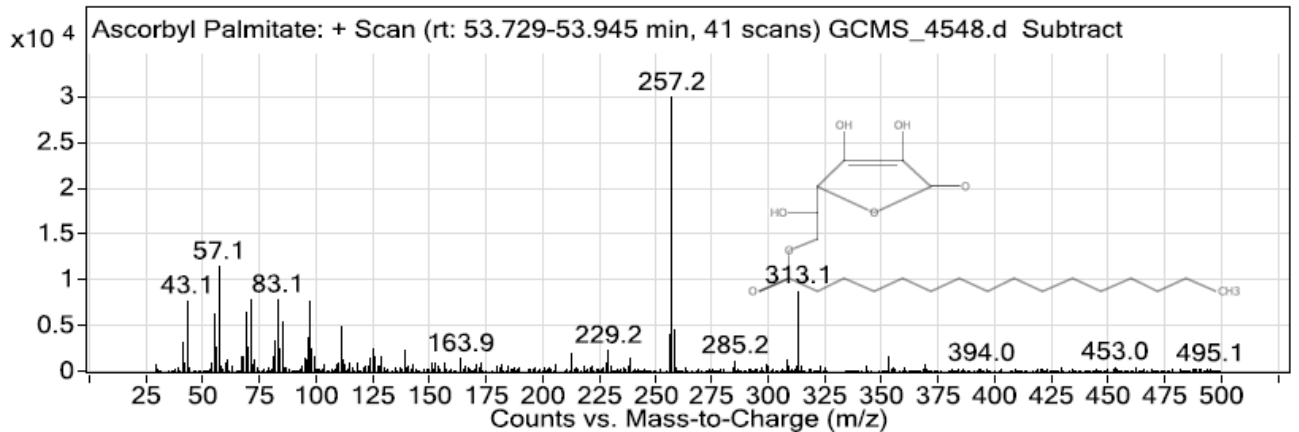
Д

MS Zoomed Spectrum



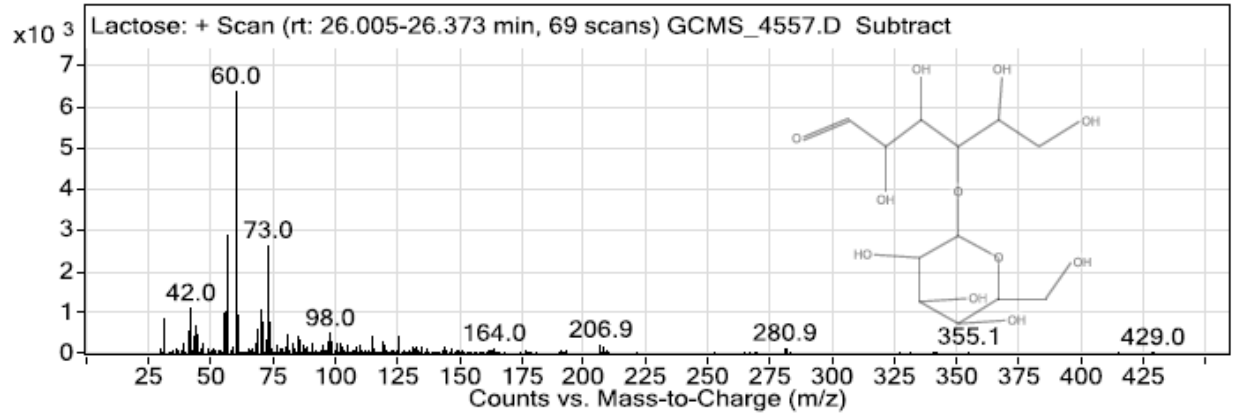
Е

MS Zoomed Spectrum

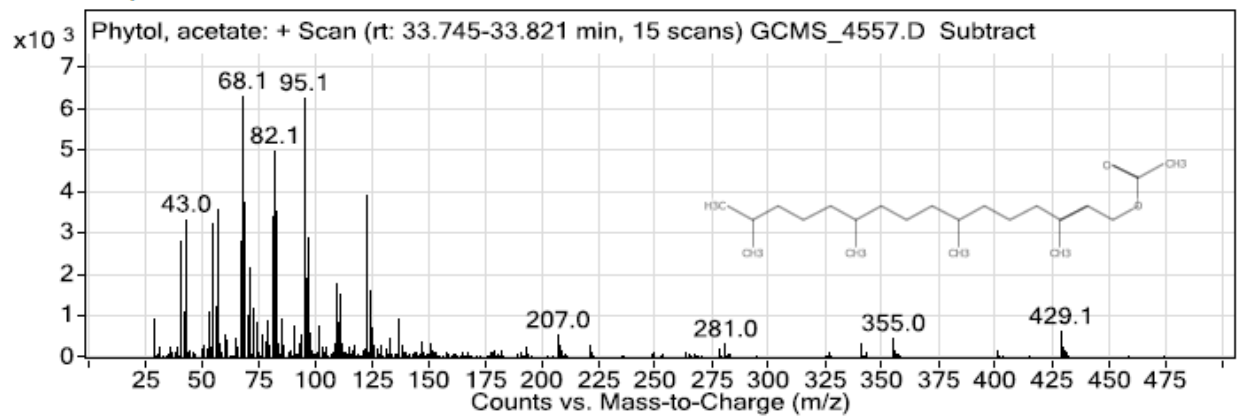


Ж

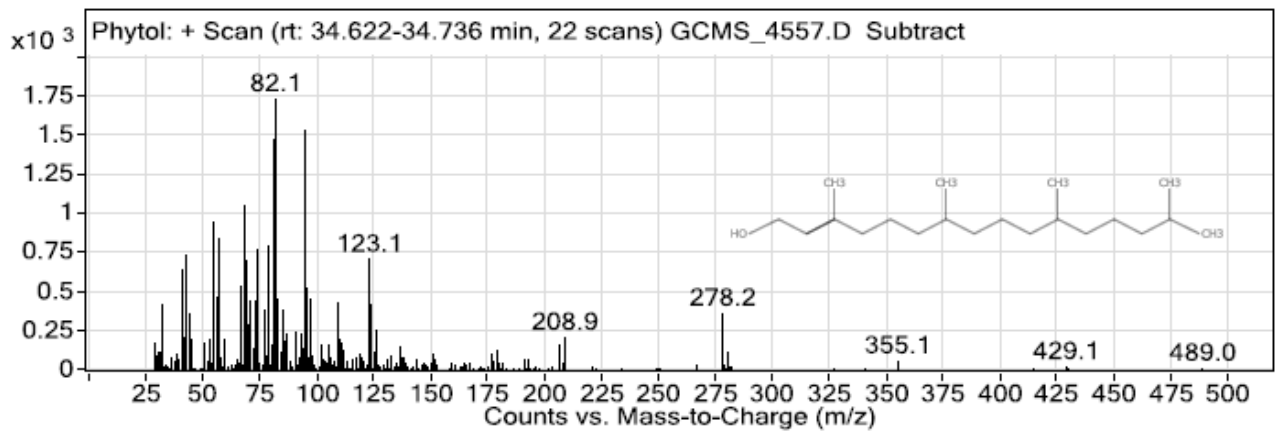
MS Zoomed Spectrum



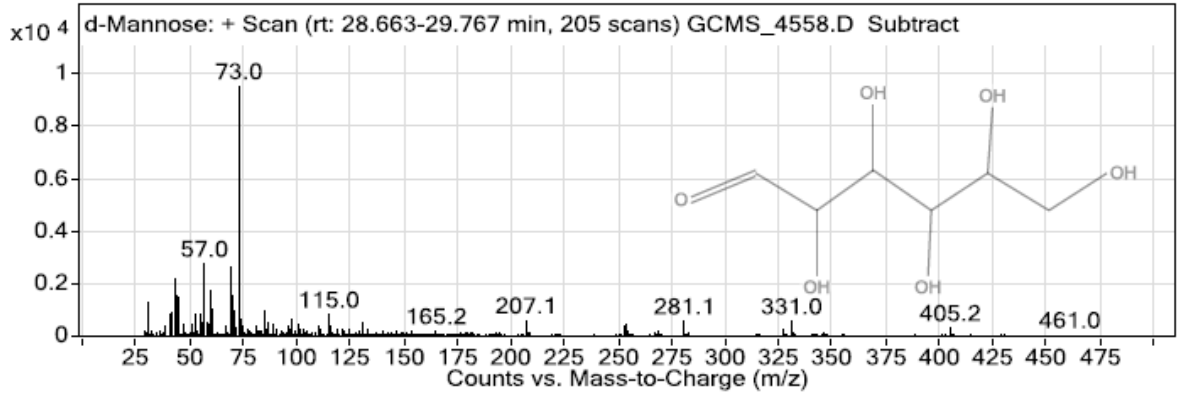
MS Zoomed Spectrum



MS Zoomed Spectrum

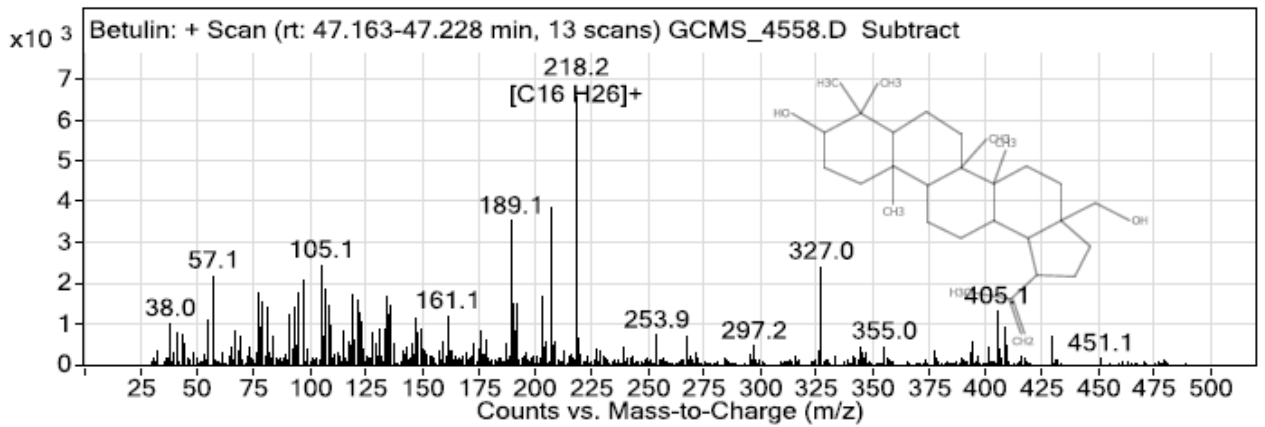


MS Zoomed Spectrum



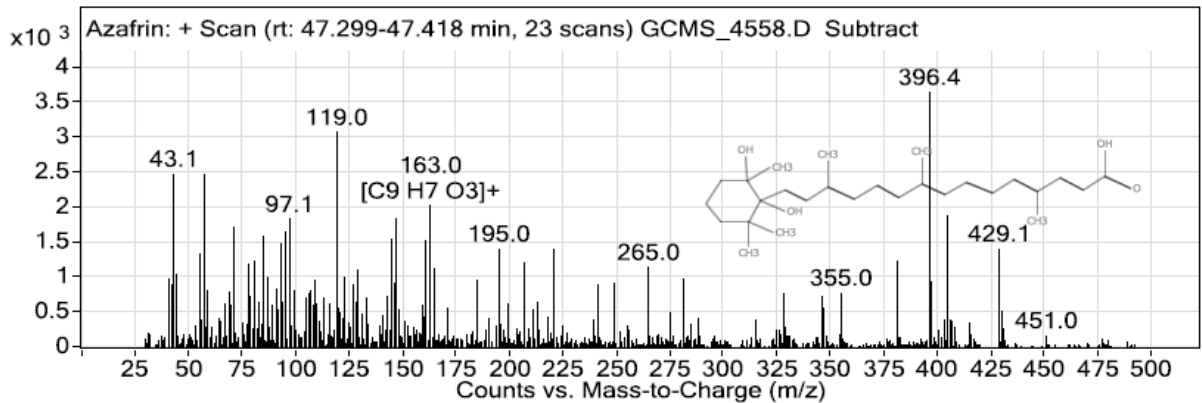
Л

MS Zoomed Spectrum



М

MS Zoomed Spectrum



Н

Рисунок 50 – Масс-спектры основных идентифицированных компонентов листьев облепихи крушиновидной (А – мио-инозитол; Б – родопин; В – α -токоферол; Г – γ -ситостерол; Д – α -амирин; Е – β -амирин; Ж – аскорбилпальмитат; З – лактоза; И – фитол ацетат; К – фитол; Л – d-манноза; М – бетулин; Н - азафрин

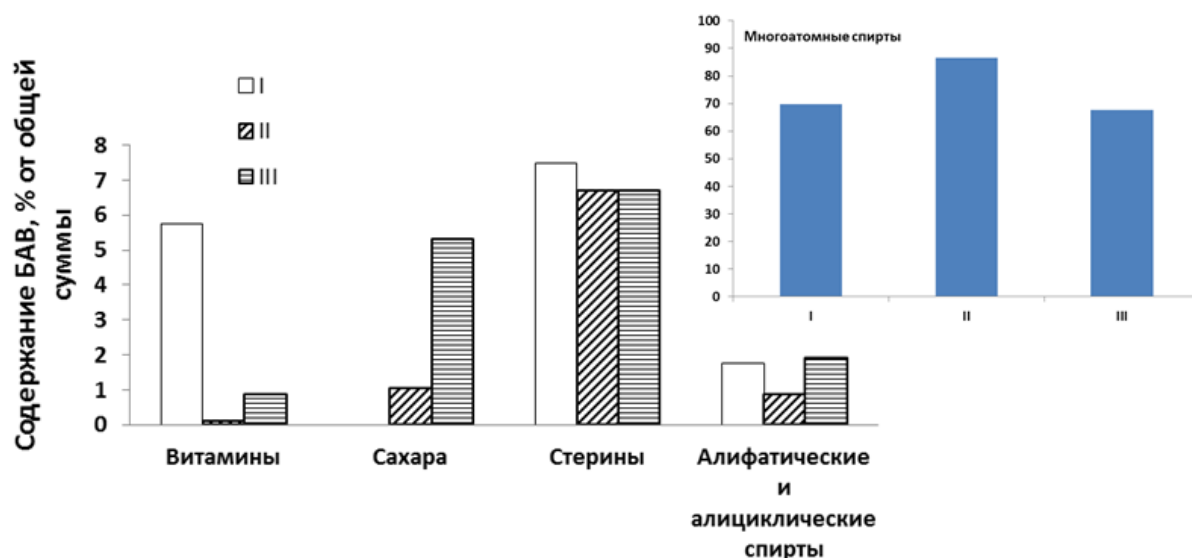


Рисунок 51 – Сравнительные данные по содержанию групп БАВ (%) в спиртовых извлечениях листьев облепихи крушиновидной различных фенофаз

Так, для листьев, заготовленных в конце августа – начале сентября характерно появление в составе липофильного комплекса БАВ азафрина (0,84%), маннозы (6,48%) и бетулина (0,62%). Только в листьях, заготовленных в начале июня, была идентифицирована жирорастворимая форма витамина С – аскорбилпальмитат (6,29%), а также спирт терпеновой природы – родопин (2,07%) и изомер многоатомного спирта инозитола (2-С-метил-) (более 50%). Такие компоненты как витамин Е и фитостеролы (изомеры амирина и γ -ситостерол) присутствуют во всех изученных образцах, преобладая в различные фазы заготовки. Известно, что растительные стерины – органические вещества группы стероидных спиртов, представляют собой незначительные по содержанию, но очень важные БАВ клеточной оболочки растений, которые помогают снизить концентрацию холестерина в крови, предотвратить сердечные заболевания [136].

Накопление фитола как в свободной форме, так и в виде ацетата закономерно возрастает к концу периода жизни листовой пластинки кустарника.

С использованием библиотеки масс-спектров NIST20 было идентифицировано более 70% веществ, относящихся к классам витаминов, сахаров, стеринов, алифатических, алициклических и многоатомных спиртов. Наибольшее количество соединений группы сахаров, стеринов, алифатических и

алициклических спиртов характерно было для листьев фенологической фазы 3 – фазы технической зрелости плодов, что обуславливается накоплением данных БАВ в процессе жизнедеятельности. Однако листья уже в первую фазу заготовки можно рассматривать как потенциальный источник витаминов и стероидов ввиду их значительного накопления [136].

По результатам проведенных исследований, а также *in silico* оценки возможных видов фармакологической активности идентифицированных в листьях БАВ (Глава 6, п. 1), можно сделать вывод о том, что листья облепихи крушиновидной являются также ценным источником липофильных соединений, таких как стероиды и жирорастворимых витаминов, которые могут быть использованы в комплексной терапии заболеваний печени и атеросклероза, как результата нарушения метаболизма холестерина, а также дискинетических расстройств желудочно-кишечного тракта. Фитостеролы (бетулин и γ -ситостерол) максимально накапливаются в листьях в период сбора урожая плодов – основного фармакопейного ценного сырья данного растения, что способствует возможности безотходного рационального использования растительных ресурсов [136].

5.5. Количественный анализ биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной

5.5.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов

При разработке методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной использовали стандартную фармакопейную методику, основанную на дифференциальной спектрофотометрии. Оптимальные условия экстракции подбирали экспериментально.

Спектр поглощения извлечений из листьев с добавкой алюминия хлорида имел характерные четко выраженные максимумы при длинах волн 320 ± 2 нм и 400 ± 2 нм, что позволяет рекомендовать лютеолин в качестве СО в расчетах содержания суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной и использовать эту длину волны в качестве аналитической. Дифференциальный спектр поглощения извлечения комплекса флавоноидов листьев облепихи крушиновидной с алюминия хлоридом представлен на Рисунке 52.

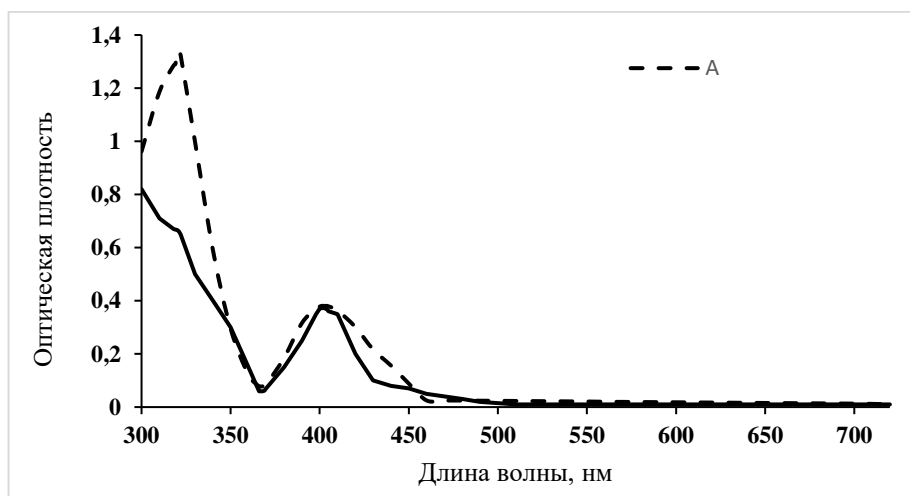


Рисунок 52 – Спектр поглощения извлечения комплекса флавоноидов из листьев облепихи с алюминия хлоридом (А – собственные данные) и спектр поглощения комплекса стандартного образца лютеолина с алюминия хлоридом (В - [28])

Предварительно установлено, что спирт этиловый 70% является оптимальным экстрагентом для листьев облепихи крушиновидной, так как при его использовании выход суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин (абсолютно сухое сырье) максимален (соотношение «сырье : экстрагент» – 1:150). Длительность экстракции – 45 минут, так как при увеличении времени экстрагирования до 120 минут выход флавоноидов постепенно снижался и выходил на плато. Оптимальная степень измельчения сырья – 0,5–0,2 мм. Увеличение кратности экстракции не приводило к повышению выхода флавоноидов из сырья (Таблица 19).

Таблица 19 – Варьирование условиями экстрагирования флавоноидов из листьев облепихи крушиновидной

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, %
Концентрация спирта, %	
40	1,273±0,029
70	1,331±0,031
96	0,968±0,022
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:25	1,043±0,024
1:50	1,295±0,030
1:100	1,331±0,031
1:150	1,431±0,033
1:200	1,355±0,031
1:250	1,295±0,030
Время экстрагирования, мин	
15	1,246±0,030
30	1,431±0,033
45	1,499±0,034
60	1,285±0,030
90	1,288±0,030
120	1,161±0,027
Размер частиц сырья, мм	
Менее 0,2	1,421±0,033
0,2 – 0,5	1,523±0,035
0,5 – 1,0	1,392±0,032
1,0 – 2,0	1,331±0,031
2,0 - 3,0	1,130±0,026
Кратность экстракции	
1	1,499±0,034
2	1,479±0,025
3	1,360±0,031

Для определения оптимального времени измерения, необходимого для образования стабильного комплекса флавоноидов листьев с алюминия хлоридом, оценивали динамику изменения оптической плотности во времени (Рисунок 53). Рекомендуемое время выдерживания, согласно экспериментальным данным, составило 30–40 мин.

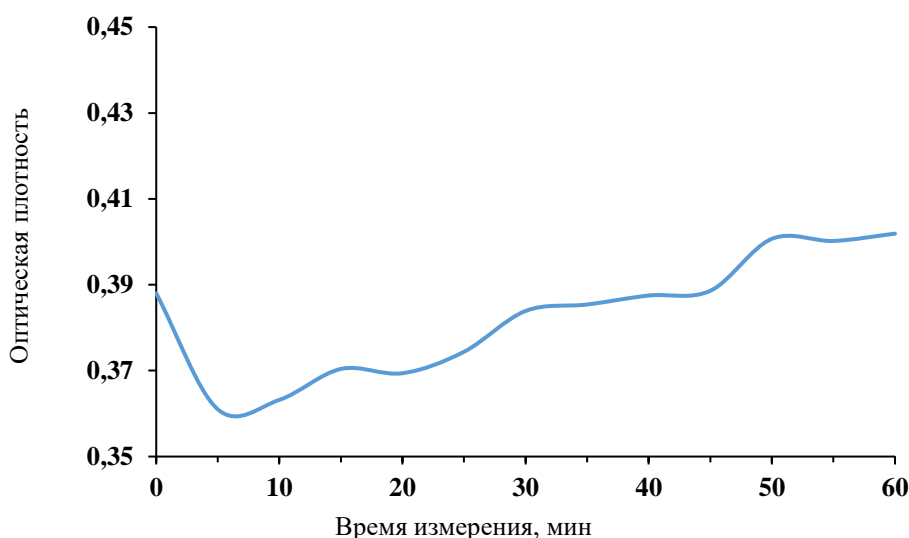


Рисунок 53 – Влияние времени выдержки образца с раствором алюминия хлорида на стабильность оптической плотности

На основании полученных результатов была разработана методика [114].

Точную навеску высушенного сырья, прошедшего сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм, массой около 1,0 г помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 150 мл спирта этилового 70% и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 45 мин при периодическом встряхивании. После нагревания колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной объем массы тем же растворителем (спирт этиловый 70%). Объем извлечения фиксировали равным 150 мл. Извлечение фильтровали через 6 слоев марли, отжимая остатки сырья (раствор А).

2,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 5% (в спирте этиловом 70%) и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, перемешивали, доводили объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и оставляли на 30 мин при дневном освещении (раствор Б).

Раствор сравнения. К 2,0 мл раствора А в мерной колбе вместимостью 25 мл прибавляли 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, доводили спиртом этиловым 70% до метки и перемешивали (готовили параллельно с раствором Б).

Через 30 мин измеряли оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы флавоноидов (X, %) в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times 150 \times 25}{E_{1\text{ см}}^{1\%} \times 100 \times a \times (100 - W) \times l \times 2}, \quad (1)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б; $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения лютеолина в комплексе с алюминия хлоридом, равный 549 [23]; 150 – объем извлечения, мл; 25 – объем мерной колбы, мл; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %; 2 – объем аликвоты, взятый для разведения, мл; l – толщина слоя в кювете, см.

Проведена метрологическая оценка предложенной методики. В результате установлено, что относительная ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет около 4,046%, т.е. находится в пределах случайной ошибки методики и не превышает 5% (Таблица 20).

Таблица 20 – Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной (P=95%; n=7)

$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
1,394	0,000528	0,023	0,0609	0,0564	0,149	4,046	1,528

Предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, аналитическая область методики, специфичность, прецизионность на уровне сходимости (внутрилабораторной и межлабораторной) были доказаны в ходе валидации разработанной методики.

Специфичность методики оценивали путем сравнения спектров поглощения комплексов СО лютеолина [28] и исследуемого извлечения с алюминия хлоридом (Рисунок 52).

Линейность определяли на девяти уровнях концентраций (Рисунок 54). Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме (Таблица 21).

Таблица 21 – Схема приготовления растворов для определения линейности методики

Уровень разведения	Аликвота раствора А, мл	Объем раствора Б, мл	Доля от стандартной аликвоты по методике, %
1	0,1	25	5
2	0,25		12,5
3	0,5		25,0
4	1,0		50,0
5	1,5		75,0
6	2,0		100,0
7	2,5		125,0
8	3,0		150,0
9	3,5		175,0

Характеристики линейности методики приведены в Таблице 21 и на Рисунке 54.

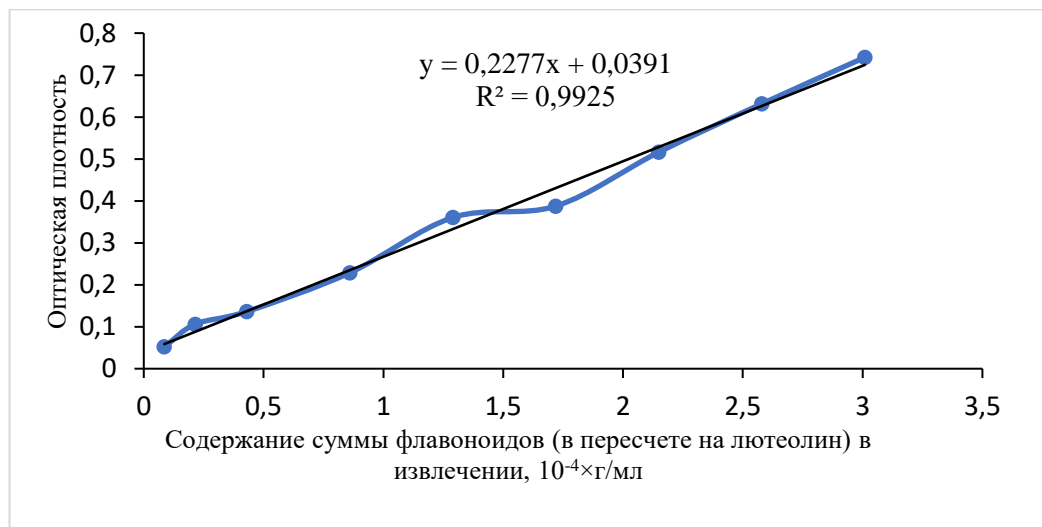


Рисунок 54 – Зависимость оптической плотности раствора от содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в извлечении из листьев облепихи крушиновидной

Прецизионность методики на уровне сходимости (внутрилабораторной) определяли в условиях, при которых семь независимых результатов измерений (n) получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Межлабораторную сходимость определяли в аналогичных условиях и тем же методом, но в другой лаборатории и другим исследователем (Таблица 23). Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 23).

Для исследования динамики накопления флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной, проводили также количественное определение данных БАВ в листьях, заготовленных в различные фенологические фазы (Таблица 22).

Таблица 22 – Сравнительная оценка содержания флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной различных фенологических фаз заготовки

Фенофаза	Содержание, %
1	1,431±0,033
2	0,941±0,022
3	0,803±0,018

Известно, что одним из способов интенсификации процессов экстракции является УЗ-обработка сырья. С целью изучения возможности увеличения экспрессности разработанной методики определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной, а также их стабильности под действием физического воздействия, была проведена экстракция с использованием УЗ-ванны (на примере фазы I, экстрагент – спирт этиловый 70%, трёхкратная экстракция, температура бани – 80 °С).

Таблица 23 – Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в листьях облепихи крушиновидной

Валидационный показатель	Характеристика показателя	Результаты
Линейность	Уравнение прямой	$y=0,2277x+0,0391$
	Наклон (а)	0,2277
	Отрезок на оси ординат b	0,0391
	Коэффициент корреляции	0,9925
	Диапазон линейности (по содержанию флавоноидов в извлечении г/мл)	$0,086 - 3,01 \times 10^{-4}$
Аналитическая область методики, г/мл	80-120% от номинального значения определяемой величины	$1,128 - 1,778 \times 10^{-4}$
Предел обнаружения, г/мл	Содержание флавоноидов в 1 мл извлечения	$8,6 \times 10^{-6}$
Предел количественного определения, г/мл	Содержание флавоноидов, которое может быть определено в 1 мл извлечения количественно	$2,38 \times 10^{-5}$
Повторяемость (внутрилабораторная)	Содержание флавоноидов (n=7), % (лаборатория 1, исследователь 1)	1,404 / 1,382 / 1,415 / 1,390 / 1,377 / 1,361 / 1,427
	Среднее значение, %	1,394
	Доверительный интервал (P=95%)	$1,394 \pm 0,0564$
	Стандартное отклонение, %	2,3
	Коэффициент вариации, %	1,65
Повторяемость (межлабораторная)	Содержание флавоноидов (n=7), % (лаборатория 2, исследователь 2)	1,409 / 1,405 / 1,409 / 1,399 / 1,386 / 1,433 / 1,416
	Среднее значение, %	1,408
	Доверительный интервал (P=95%), %	$1,408 \pm 0,0355$
	Стандартное отклонение, %	1,45
	Коэффициент вариации, %	1,03

Продолжение Таблицы 23

	<p>Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения</p> $F_{\text{практ}} = s_1^2 / s_2^2 \leq F_{\text{теор}}$	$F_{\text{практ}} = s_1^2 / s_2^2 = 0,00371/0,00147 = 2,52$ $F_{\text{теор}} = 4,28$ $F_{\text{практ}} \leq F_{\text{теор}}$
Правильность	<p>Свободный член уравнения меньше своего доверительного интервала</p> $\Delta b = t(0,05, n - 2) \times s_a$ $b \leq \Delta b$	$\Delta b = 2,37 \times 0,4192 = 0,9935$ $b \leq \Delta b$ $0,0391 < 0,9935$

На первом этапе был проведён подбор соотношения сырья : экстрагент при прочих условия по разработанной методике выделения на водяной бане. В результате определено, что наибольший выход флавоноидов наблюдается при соотношении 1:15 (Таблица 24).

При соотношении 1:15 была исследована зависимость степени измельчения сырья от выхода флавоноидов. Максимальный выход составил 1,8% при степени измельчения 0,5 мм (Таблица 24).

Таблица 24 – Варьирование условиями УЗ-экстракции флавоноидов

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин, %
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:10	1,043±0,024
1:15	1,360±0,031
1:20	0,891±0,020
Размер частиц сырья, мм	
Менее 0,2	1,563±0,036
0,2 – 0,5	1,802±0,041
0,5 – 1,0	1,360±0,031
1,0 – 2,0	1,188±0,027
2,0 - 3,0	0,806±0,019

На следующем этапе исследовали влияние частоты ультразвука и времени экстракции при сохранении кратности (3-х кратная). В результате установлено, что оптимальной частотой является 30 кГц при экстракции в течение 37,5 минут (трёхкратно – по 12,5 минут) (Таблица 25).

Таблица 25 – Влияние времени экстракции и частоты ультразвука на выход флавоноидов из сырья

Частота, кГц	25	30	35
Время экстракции, мин			
15	-	1,570±0,036	1,434±0,033

Продолжение Таблицы 25

22,5	1,347±0,031	1,481±0,034	1,476±0,034
30	1,410±0,032	1,490±0,034	1,403±0,023
37,5	1,413±0,032	1,639±0,038	1,372±0,032
45	-	1,584±0,036	1,373±0,032

На завершающем этапе подобрана кратность экстракции. Следует отметить, что при увеличении кратности экстракции с соблюдением соотношения сырьё : экстрагент 1:15, выход флавоноидов увеличивался до достижения 4-кратного извлечения, далее снижаясь при 5-кратной экстракции по 10 минут (Таблица 26).

Таблица 26 – Влияние кратности экстракции на выход флавоноидов из сырья

Кратность экстракции	Выход суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин, %
2	1,497±0,034
3	1,639±0,038
4	1,828±0,042
5	1,628±0,037

Следовательно, оптимальными условиями экстракции флавоноидов из листьев облепихи крушиновидной на УЗ-бане являются: фаза заготовки – I (фаза завязывания плодов); экстрагент – спирт этиловый 70%; степень измельчения 0,2-0,5 мм; соотношение сырьё : экстрагент 1:15; частота ультразвука – 30 кГц; время экстракции – 40 минут; кратность экстракции – 4-х кратная (по 10 минут).

Также была проведена УЗ-экстракция флавоноидов из трёх фаз заготовки листьев. Как и при экстракции на водяной бане, наибольший выход флавоноидов наблюдался из листьев фазы заготовки 1 (фаза завязывания плодов) (Таблица 27).

Таблица 27 – Содержание флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной различных фенологических фаз

Фенологическая фаза	Сумма флавоноидов, в пересчёте на лютеолин, %	
	Экстракция на водяной бане	УЗ-экстракция
Фаза 1	1,431±0,033	1,639±0,038
Фаза 2	0,941±0,022	0,921±0,021
Фаза 3	0,803±0,018	1,236±0,028

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в листьях облепихи крушиновидной, которая предложена для стандартизации данного ЛРС (Приложение А). Проведенный анализ показал, что листья облепихи в зависимости от фенологической фазы содержат 0,8–1,5% флавоноидов и являются их перспективным источником для получения ЛРП и БАД. Установлено наибольшее содержание суммы флавоноидов для листьев фенологической фазы 1 (заготовлены в середине июня). Наблюдается постепенное снижение содержания флавоноидов в листьях фенологических фаз 2 (середина июля) и 3 (конец августа).

Впервые использован метод озвучивания для интенсификации экстракции флавоноидов, как целевой группы БАВ, из листьев облепихи крушиновидной, что подтверждено получением патента РФ №2813186 «Способ выделения флавоноидов из лекарственного растительного сырья». Применение этого метода позволило сократить время экстракции (с 45 до 40 минут), значительно снизить расход экстрагента (со 150 до 60 мл) и энергозатраты в условиях производства, а также увеличить выход флавоноидов на 30% (с 1,4% до 1,83%) [104,114]. Следовательно, для производства на основе листьев ЛРП и БАД, для которых фармакофорной группой БАВ будут являться флавоноиды, может быть рекомендована 1 фаза заготовки листьев (молодые активно развивающиеся июньские листья) с содержанием около 1,5%. При использовании в производстве разработанного в работе способа УЗ-обработки к заготовке и использованию в промышленных масштабах могут быть рекомендованы, по аналогии с ЛРП «Гипорамин» [95], также листья всех изученных фенологических фаз, для которых содержание суммы флавоноидов достигает 1%.

5.5.2. Определение суммы дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной методом УФ-спектрофотометрии

Проведено первичное скрининговое количественное определение содержания суммы дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной различных фенологических фаз развития растения фармакопейным методом перманганатометрического титрования [83].

Данная методика была выбрана ввиду получения предварительных данных по преимущественному содержанию в листьях дубильных веществ гидролизуемой группы (п 5.3 данной главы) [40], а также литературным сведениям о том, что данные БАВ могут накапливаться в количестве до 30% [1,4-5,95]. Исследование показало, что их накопление более 10% наблюдается уже к началу июня и сохраняется без тенденции к росту до массового созревания и сбора плодов (Рисунок 55, Таблица 28).

На следующем этапе исследования, в виду известной неселективности методики перманганатометрического титрования для определения дубильных веществ, разрабатывали спектрофотометрический способ их количественного определения в листьях. Известно, что специфическими маркерными представителями данной группы БАВ являются казуаринин, стриктинин и изостриктинин, ВЭЖХ-методики определения которых разработаны и опубликованы в литературе [10,171,181].

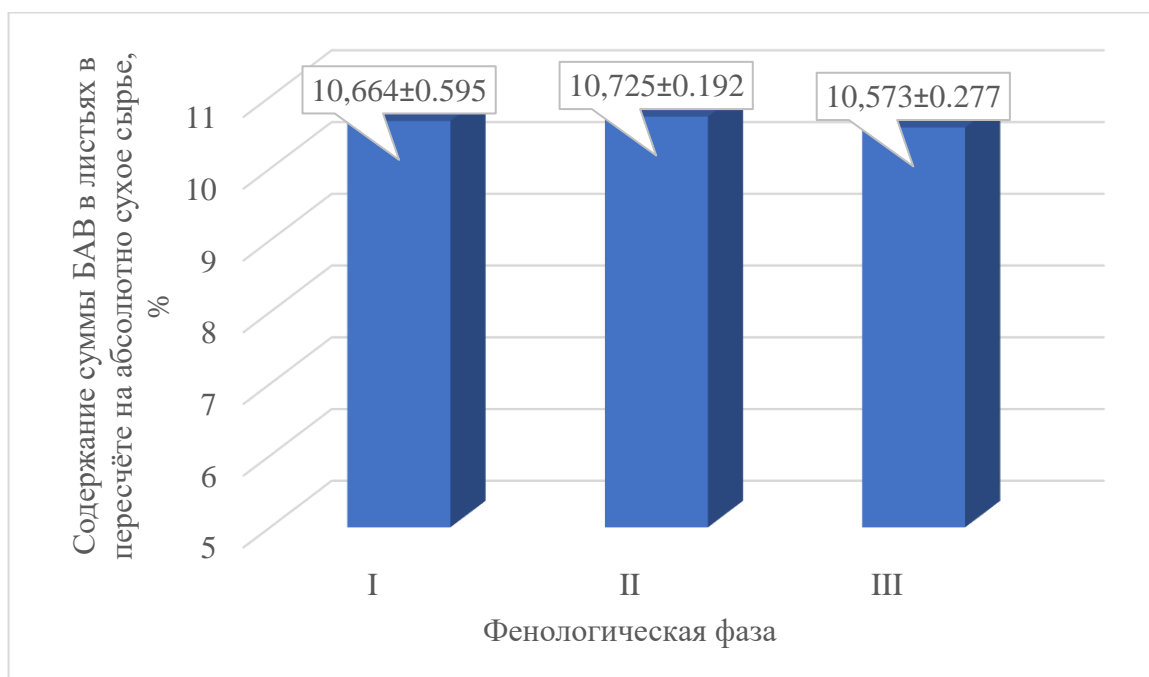


Рисунок 55 – Содержание суммы БАВ в листьях облепихи крушиновидной различных фенофаз в пересчёте на абсолютно сухое сырьё, %

Таблица 28 – Метрологические характеристики перманганатометрического определения суммы дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной в пересчёте на танин, % (на примере фенологической фазы 2) ($P=95\%$; $n=7$)

$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$
10,725	0,0597	0,244	0,0813	0,5758	0,192	1,789

Ввиду идентификации методом ТСХ (п. 5.3.1.4 данной главы) в водном извлечении листьев таких представителей комплекса гидролизуемых танинов, как галловая кислота и танин, нам показалось интересным провести собственные исследования по разработке методики их определения простым и доступным методом спектрофотометрии.

Из литературы известно, что листья облепихи крушиновидной содержат гидролизуемые галло- и эллаготанины – действующие вещества в составе ЛРП «Гипорамин» [95]. При длительной температурной экстракции сложные соединения могут гидролизироваться до простых – галловой, эллаговой кислот, танина. Следовательно, при расчёте содержания дубильных веществ в сырье вести пересчёт возможно на простые соединения [10,25,38,40,41,60,83,166,170].

Для определения дубильных веществ за основу была взята методика, разработанная и запатентованная учёными Тринеевой О.В. и Сливкиным А.И. «Способ идентификации и отдельного количественного определения танина и галловой кислоты при совместном присутствии в растительном сырье и фитопрепаратах без предварительного разделения» [98]. Выбор данной методики обусловлен видом спектра поглощения извлечения в боратном буфере (Рисунок 56). На спектре наблюдается два пологих максимума поглощения в 275 ± 3 и 305 ± 3 нм, что соответствует полосам поглощения галловой кислоты и танина соответственно. Присутствие данных БАВ в водных извлечениях из листьев также подтверждено нами методом ТСХ (п. 5.3.1.4 данной главы).

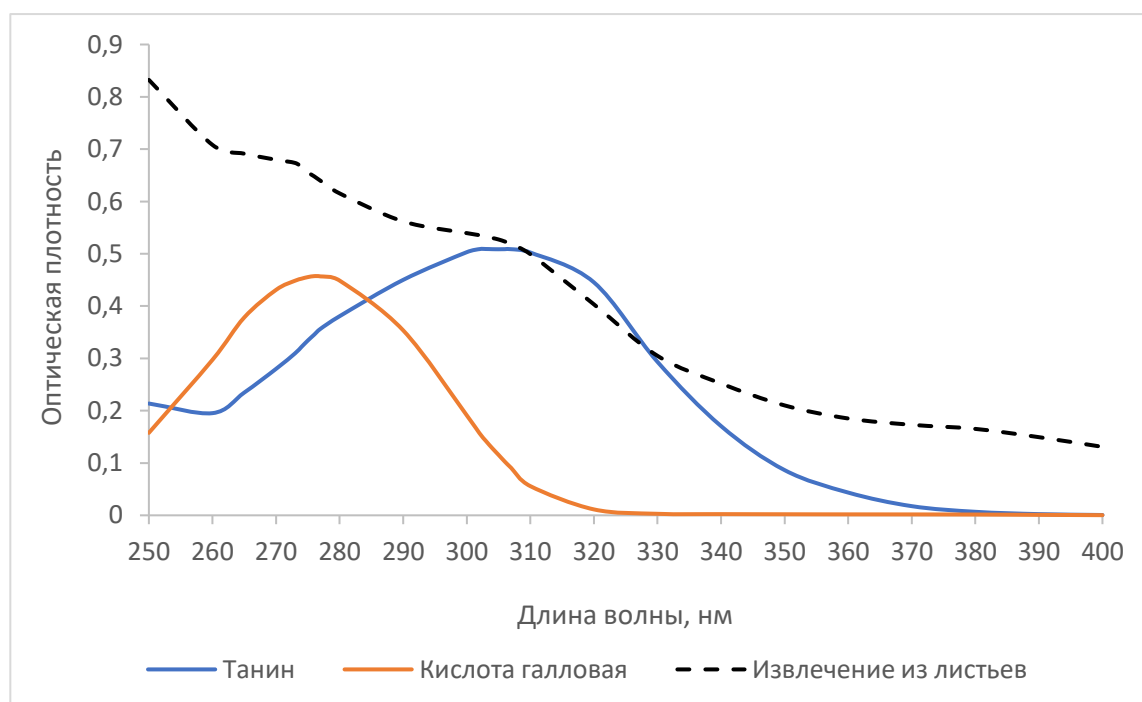


Рисунок 56 – Спектр поглощения извлечения из листьев облепихи крушиновидной, РСО танина и кислоты галловой в боратном буфере

В ходе предварительно проведенных исследований было установлено, что наибольший выход суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую и танин (абсолютно сухое сырье) наблюдалось в случае экстрагирования листьев облепихи крушиновидной водой очищенной в соотношении «сырье : экстрагент» 1:125 в течение 45 минут. Увеличение времени экстрагирования не привело к

повышению выхода дубильных веществ (Таблица 29). Для полноты экстракции дубильных веществ из листьев облепихи крушиновидной степень измельчения сырья – 0,5-1,0 мм. При оценке влияния кратности экстракции установлено, что при двух- и трёхкратной экстракции наблюдалось увеличение выхода дубильных веществ свыше 8%. При разработке методики выбрана двукратная экстракция (Таблица 29).

При оценке содержания дубильных веществ в различных фенологических фазах жизни растения выявлено, что наибольшее количество целевой группы БАВ накапливается в листьях 1 фазы (Таблица 30).

Таблица 29 – Варьирование условиями экстрагирования дубильных веществ из листьев облепихи крушиновидной

Условия экстракции	Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую, %	Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин, %
Соотношение «сырье : экстрагент»		
1:50	5,652±0,146	2,145±0,110
1:100	6,488±0,170	3,169±0,159
1:125	7,964±0,206	3,118±0,157
1:150	5,808±0,150	2,818±0,142
1:200	7,251±0,188	3,164±0,159
Время экстрагирования, мин		
30	7,201±0,578	3,730±0,316
45	7,964±0,640	3,118±0,264
60	8,010±0,643	2,783±0,236
90	7,432±0,597	2,493±0,211
120	1,679±0,136	4,080±0,346
Размер частиц сырья, мм		
0,2 – 0,5	7,243±0,187	3,927±0,198
0,5 – 1,0	7,201±0,186	3,730±0,188
1,0 – 2,0	6,715±0,174	3,378±0,170
2,0 - 3,0	4,504±0,117	2,535±0,128
Кратность экстракции		
1	7,964±0,640	3,118±0,264
2	8,216±0,660	3,083±0,261
3	8,150±0,654	3,261±0,276

Таблица 30 – Содержание дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной различных фенологических фаз

Фенологическая фаза	Содержание дубильных веществ в пересчёте на кислоту галловую в абсолютно сухом сырье, %	Содержание дубильных веществ в пересчёте на танин в абсолютно сухом сырье, %
1	9,120±0,236	4,175±0,210
2	7,783±0,201	3,540±0,178
3	8,216±0,213	3,083±0,155

Разработана методика количественного определения дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной [54].

Т.н. (около 2,0 г) измельчённого менее 1,0 мм сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, заливают нагретой до кипения водой в количестве 125 мл и кипятят с обратным холодильником в течение 23 минут, периодически перемешивая. Извлечение процеживают через несколько слоёв марли, не дожидаясь охлаждения, в мерную колбу вместимостью 250 мл. Сырьё вместе с марлей помещают обратно в коническую колбу на 250 мл, заливают второй порцией горячей воды объёмом 125 мл и кипятят ещё 23 минуты. Полученное извлечение фильтруют через марлю в ту же мерную колбу, доводят объём раствора, если необходимо, до метки водой, перемешивают. Измеряют оптическую плотность 1,0 мл фильтрата, разведённого боратным буферным раствором с рН=9,0 в мерной колбе вместимостью 50 мл, относительно буфера при длинах волн 275±3 нм и 305±3 нм. Содержание кислоты галловой ($X_{ГК}$) и танина (X_T) в пересчёте на абсолютно сухое сырьё в процентах вычисляют по формулам:

$$C_{ГК} = \frac{E_2^{\lambda 2} \times A^{\lambda 1} - E_2^{\lambda 1} \times A^{\lambda 2}}{(E_1^{\lambda 1} \times E_2^{\lambda 2} - E_1^{\lambda 2} \times E_2^{\lambda 1}) \times l}; C_T = \frac{E_1^{\lambda 1} \times A^{\lambda 2} - E_1^{\lambda 2} \times A^{\lambda 1}}{(E_1^{\lambda 1} \times E_2^{\lambda 2} - E_1^{\lambda 2} \times E_2^{\lambda 1}) \times l}.$$

$$X_{ГК} = \frac{C_{ГК} \times W_1 \times W_2 \times 100}{a \times (100 - B) \times V_a}; X_T = \frac{C_T \times W_1 \times W_2 \times 100}{a \times (100 - B) \times V_a}, \text{ где}$$

где $A^{\lambda 1}$ – оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 275±2 нм; $A^{\lambda 2}$ – оптическая плотность исследуемого извлечение при длине волны 305±2 нм; а – масса сырья, г; В – потеря в массе при высушивании сырья, %; W_1 и W_2 –

объём мерных колб, взятых для разведения, мл; V_a – объём аликвоты извлечения, взятой на анализ, мл; $E_1^{\lambda_1}$ – величина удельного показателя поглощения галловой кислоты при 275 нм; $E_1^{\lambda_2}$ – величина удельного показателя поглощения галловой кислоты при 305 нм; $E_2^{\lambda_1}$ – величина удельного показателя поглощения танина при 275 нм; $E_2^{\lambda_2}$ – величина удельного показателя поглощения танина при 305 нм.

Приготовление боратного буферного раствора с рН 9,0 проводилось в соответствии с ОФС.1.3.0003 Буферные растворы.

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в Таблице 31.

Таблица 31 – Метрологические характеристики методики определения дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной (P=95%; n=7)

<i>Пересчёт</i>	$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
на кислоту галловую	7,596	0,006441	0,08026	0,03034	0,1966	0,0743	2,588	0,978
на танин	4,126	0,007183	0,08475	0,03203	0,2076	0,07847	5,032	1,902

В целях валидации методики проверялась линейность, для чего использовали 7 уровней концентрации (25-175%). При приготовлении растворов уменьшали и увеличивали аликвоту исходного извлечения. Характеристики линейности приведены на Рисунке 57 и в Таблице 32.

Согласно результатам, методика линейна на всех уровнях концентрации, коэффициент корреляции более 0,99.

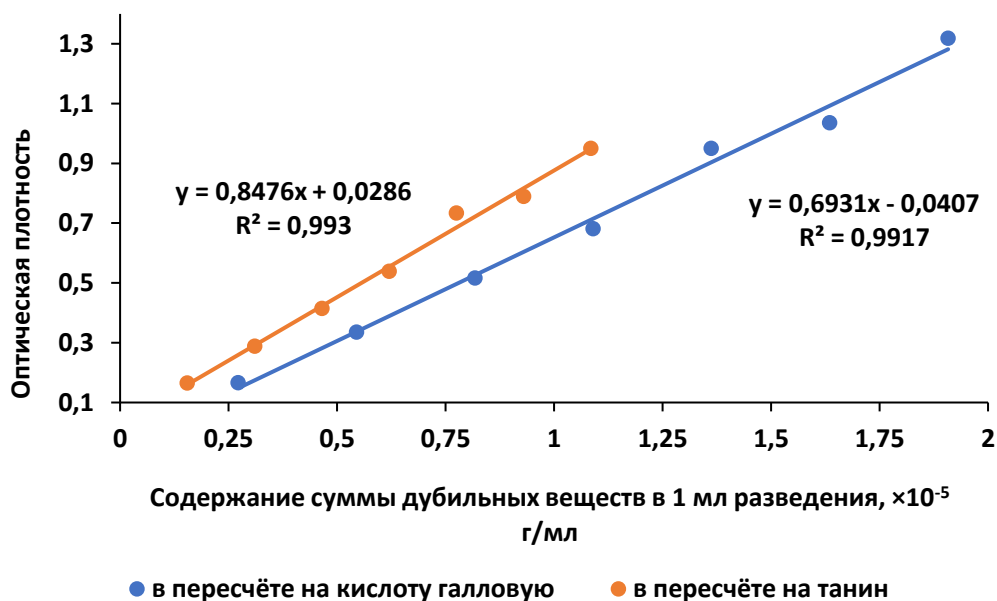


Рисунок 57 – Зависимость оптической плотности раствора от содержания дубильных веществ в 1 мл разведения

Таблица 32 – Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной

Валидационный показатель	Характеристика	Результаты	
		в пересчёте на кислоту галловую	в пересчёте на танин
Линейность	Уравнение прямой	$y=0,6931x - 0,0407$	$y=0,8476x+0,0286$
	Наклон (а)	0,6931	0,8476
	Отрезок на оси ординат (b)	0,0407	0,0286
	Коэффициент корреляции	0,9917	0,993
	Диапазон линейности (по содержанию дубильных веществ в 1 мл разведения, г/мл)	$0,272-1,908 \times 10^{-5}$	$0,165-1,085 \times 10^{-5}$
Аналитическая область методики, г/мл	80-120% от номинального значения определяемой величины	$0,818-1,362 \times 10^{-5}$	$0,465-0,775 \times 10^{-5}$
Предел обнаружения, г/мл	Содержание дубильных веществ в 1 мл разведения	$0,272 \times 10^{-5}$	$0,155 \times 10^{-5}$
Предел количественного определения, г/мл	Содержание дубильных веществ, которое может быть определено в 1 мл разведения количественно	$0,816 \times 10^{-5}$	$0,465 \times 10^{-5}$

Продолжение Таблицы 32

Повторяемость (внутрилабораторная)	Содержание дубильных веществ (n=7), % (лаборатория 1, исследователь 1)	7,609 / 7,814 / 7,639 / 7,533 / 7,576 / 7,586 / 7,418	4,126 / 4,232 / 4,165 / 4,193 / 4,091 / 4,109 / 3,970
	Среднее значение 1, %	7,596	4,126
	Доверительный интервал 1 (при P=95%), %	7,596±0,1966	4,126±0,2076
	Стандартное отклонение 1, %	8,03	8,475
	Коэффициент вариации 1, %	1,06	2,054
Повторяемость (межлабораторная)	Содержание дубильных веществ (n=5), % (лаборатория 2, исследователь 2)	7,432 / 7,626 / 7,734 / 7,839 / 7,892	3,388 / 3,403 / 3,410 / 3,463 / 3,469
	Среднее значение 2, %	7,705	3,427
	Доверительный интервал 2 (при P=95%), %	7,705±0,5082	3,427±0,1026
	Стандартное отклонение 2, %	18,28	3,69
	Коэффициент вариации 2, %	2,37	1,08

Прецизионность методики на уровне сходимости (внутрилабораторной) определяли в условиях, при которых семь независимых результатов измерений (n) получали одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени. Межлабораторную сходимость определяли в аналогичных условиях и тем же методом, но в другой лаборатории и другим исследователем (Таблица 32). Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 32).

Правильность оценивали методом «введено-найдено» с помощью добавления стандартных растворов кислоты галловой и танина. Открываемость должна находиться в пределах $100\pm 5\%$. Оценку проводили трёхкратно на 3-х уровнях концентраций (Таблица 33). Согласно полученным результатам, процент открываемости соответствует требованиям.

Таблица 33 – Результаты определения правильности методики

Содержание кислоты галловой в исходном извлечении, мг	Добавлено РСО кислоты галловой, мг	Расчётное содержание кислоты галловой, мг	Полученное содержание кислоты галловой, мг	Открываемость, %	Среднее значение открываемости, %
0,305	0,127	0,432	0,441	102,19	104,83
0,305	0,127	0,432	0,459	105,95	
0,305	0,127	0,432	0,461	106,34	
0,305	0,253	0,558	0,585	104,63	104,75
0,305	0,253	0,558	0,587	105,05	
0,305	0,253	0,558	0,585	104,59	
0,305	0,380	0,685	0,723	105,25	103,96
0,305	0,380	0,685	0,694	101,29	
0,305	0,380	0,685	0,723	105,32	
Содержание танина в исходном извлечении, мг	Добавлено РСО танина, мг	Расчётное содержание танина, мг	Полученное содержание танина, мг	Открываемость, %	Среднее значение открываемости, %
0,127	0,124	0,251	0,244	97,46	97,92
0,127	0,124	0,251	0,245	97,73	
0,127	0,124	0,251	0,247	98,56	
0,127	0,247	0,374	0,363	97,11	96,29
0,127	0,247	0,374	0,360	96,20	
0,127	0,247	0,374	0,476	95,57	
0,127	0,371	0,498	0,476	95,45	95,04
0,127	0,371	0,498	0,473	94,76	
0,127	0,371	0,498	0,473	94,91	

Согласно проведённым исследованиям, листья облепихи в зависимости от фенологической фазы содержат от 7 до 9% (в пересчёте на кислоту галловую) и от 3 до 4% (в пересчёте на танин) суммы дубильных веществ и являются перспективным источником танинов гидролизуемой группы для получения ЛРП. Разработанная методика одновременного спектрофотометрического определения танина и галловой кислоты в листьях валидна и может быть использована для стандартизации сырья. Установлено, что наибольшее содержание дубильных веществ характерно для фенологической фазы 1 (сырьё заготовлено в середине июня). Постепенное снижение содержания дубильных веществ наблюдается в фенологических фазах 2 (середина июля) и 3 (конец августа), выходя на плато.

В виду того, что листья продемонстрировали достаточно высокое содержание таннинов на всех этапах своего развития (снижение содержания суммы дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту в листьях не превышает 10%) к заготовке могут быть рекомендованы листья разных сроков сбора, в т.ч. поздних (фаза 3 – массового плодоношения (технической зрелости плодов). Кроме того, заготовка листьев совместно с плодами максимально позволит сохранить уникальный комплекс БАВ в плодах, что соответствует принципу рационального использования природных ресурсов [54].

5.5.3. Разработка и валидация методики количественного определения аминокислот в листьях облепихи крушиновидной

В фармацевтическом производстве листья могут быть востребованы в качестве исходного сырья для получения экстрактов с комплексом БАВ в зависимости от экстрагента как гидрофильной, так и липофильной природы. Несмотря на то, что аминокислоты, с одной стороны, не являются целевыми фармакофорными группами БАВ ЛРС, представление о содержании этих БАВ является важным в понимании вопросов уникального характера действия комплексных ЛРП. С другой стороны, аминокислоты, являясь первичными метаболитами, как известно, служат исходными компонентами для биохимического синтеза специфических целевых групп БАВ – вторичных метаболитов в растительных клетках.

Определение аминокислот (свободных и связанных) в листьях облепихи крушиновидной проводили методами капиллярного электрофореза и спектрофотометрически (Глава 2, п. 9).

При исследовании полного аминокислотного профиля количественно установлено содержание 17 аминокислот, среди которых 7 являются незаменимыми (Рисунок 58). Максимальное накопление отмечалось уже в фазу 1 и далее

снижалось ко 2 и 3. Это связано с тем, что аминокислоты при развитии растения используются им для получения других соединений. Результаты определения аминокислот в листьях облепихи крушиновидной методом КЭ представлены в Таблице 34, Рисунке 59.

В процессе разложения проб аспарагин и глутамин количественно гидролизуются до аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно, поэтому данные по содержанию аспарагиновой и глутаминовой кислот представляют собой суммарное содержание этих кислот и соответствующих амидов. Сбор, обработку и анализ данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения. Вид полученных электрофореграмм представлен на Рисунке 58.

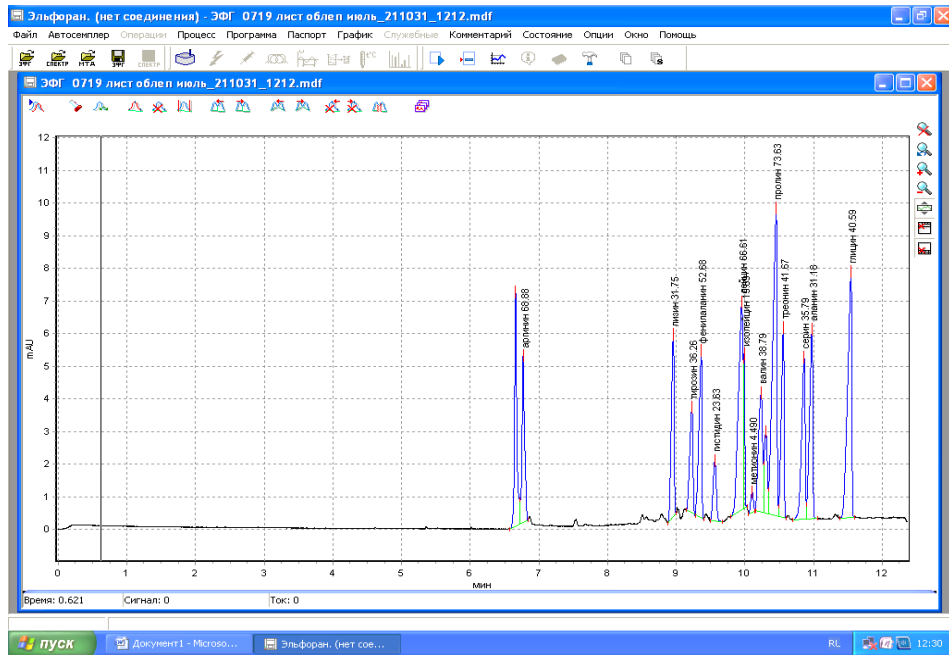


Рисунок 58 – Электрофореграмма аминокислот (свободных и связанных) листьев облепихи крушиновидной (фаза заготовки 1)

В составе водных извлечений из листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ, как описано ранее (п. 5.3.1.3, Таблица 16 данной главы), идентифицированы такие свободные аминокислоты, как аргинин, лизин, пролин, глицин, метионин, глутаминовая кислота, фенилаланин, тирозин, валин и лейцин.

Таблица 34 – Результаты исследования профиля аминокислот в листьях облепихи крушиновидной

Аминокислота	Содержание аминокислоты, %		
	1	2	3
Аргинин	0,99	0,79	0,78
Лизин*	0,39	0,36	0,41
Тирозин	0,45	0,42	0,37
Фенилаланин*	0,75	0,60	0,58
Гистидин	0,31	0,27	0,26
Лейцин*	0,90	0,76	0,71
Изолейцин*	0,30	0,22	0,26
Метионин*	0,06	0,05	0,03
Валин*	0,50	0,44	0,45
Пролин	0,83	0,84	0,74
Треонин*	0,56	0,48	0,48
Серин	0,52	0,41	0,41
Аланин	0,38	0,36	0,36
Глицин	0,52	0,47	0,47
Цистин	0,09	0,08	0,04
Глутаминовая кислота	0,59	0,52	0,55
Аспарагиновая кислота	0,67	0,57	0,56
Всего, %	8,81	7,64	7,46
Примечание: * - незаменимая АК			

Для количественного определения суммы свободных аминокислот в листьях, переходящих в экстракционные препараты, за основу была использована известная спектрофотометрическая методика [116], основанная на получении окрашенных продуктов реакции водного извлечения из ЛРС с нингидрином и последующим измерением оптической плотности в видимой области дифференциальным способом. Данный способ послужил прототипом для разработки методики количественного спектрофотометрического определения аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую в листьях облепихи крушиновидной [52].

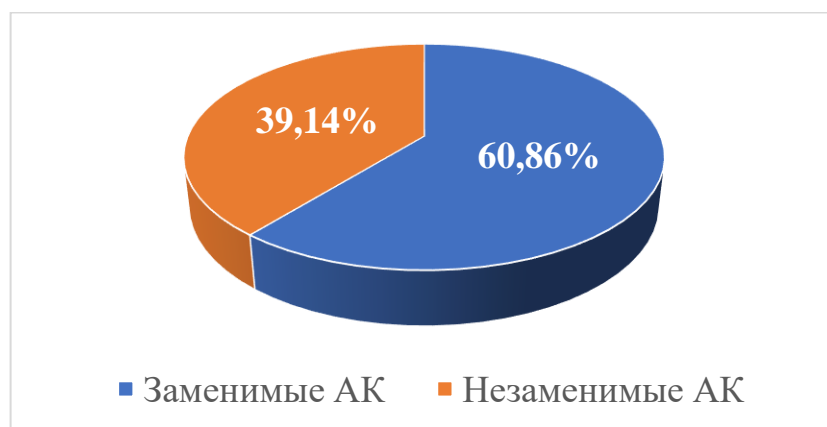


Рисунок 59 – Содержание незаменимых АК от общего количества АК в листьях (на примере фенофазы 3)

Спектры поглощения продуктов реакции комплекса аминокислот извлечения из исследуемого ЛРС, полученных при рН 6,4, характеризовались четко выраженными максимумами поглощения при длинах волн 401 ± 2 нм и 568 ± 2 нм, а также 2 минимумами, лежащими в области 350-360 нм и 460-480 нм (Рисунок 60). В качестве аналитической использована длина волны 568 ± 2 нм. Максимумы поглощения продукта реакции стандартного образца глутаминовой кислоты с нингидрином находился в области 401 ± 2 нм и 568 ± 3 нм, что позволило использовать глутаминовую кислоту в качестве стандартного образца в расчетах содержания суммы свободных аминокислот в листьях (Рисунок 60) [45,52].

Для установления стабильности окраски продуктов реакции выделенной суммы аминокислот извлечения из листьев с нингидрином были проанализированы растворы после проведения реакции в течение 1 часа. Установлено, что оптическая плотность достаточно стабильна и сохраняется в течение наблюдаемого периода (Рисунок 61).

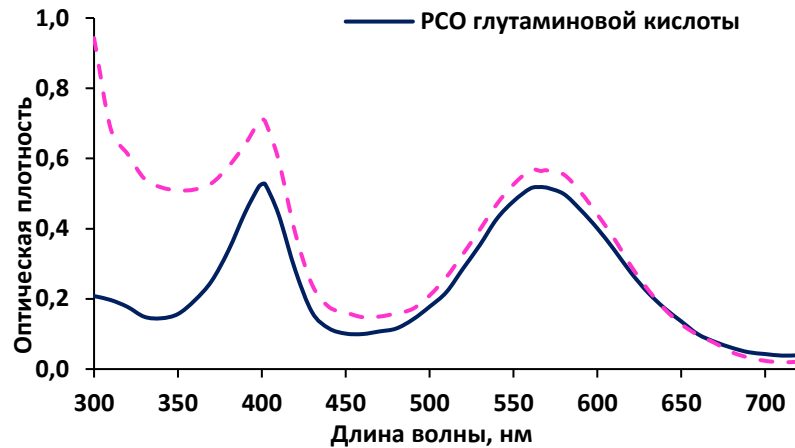


Рисунок 60 – Дифференциальные спектры поглощения продуктов взаимодействия с нингидрином

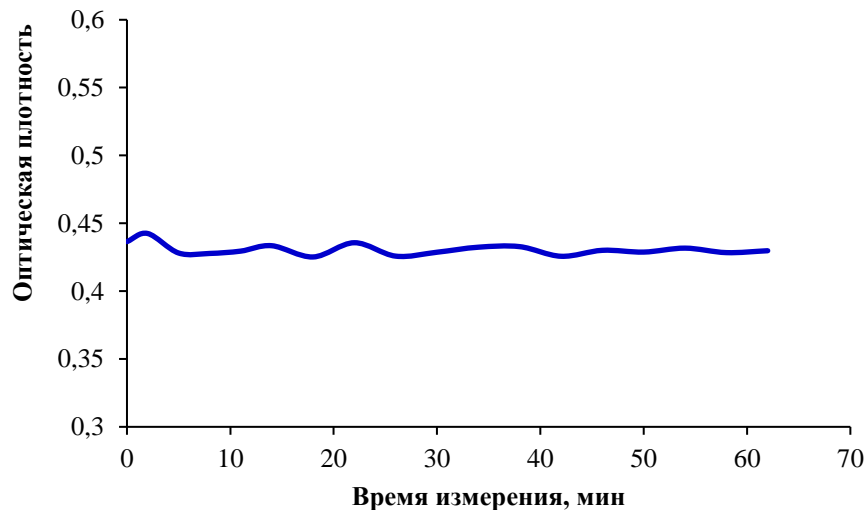


Рисунок 61 – Зависимость оптической плотности продуктов реакции выделенной суммы свободных аминокислот листьев облепихи с нингидрином от времени измерения

Для установления полноты экстракции аминокислот из листьев облепихи крушиновидной изучали влияние различных параметров экстракции: соотношения сырья и экстрагента, кратности экстракции, измельченности сырья, а также оптимального времени экстракции. Оптимальным соотношением сырья и экстрагента признано 1:50 (Таблица 35).

При исследовании влияния кратности экстракции на выход изучаемых БАВ в извлечение из листьев облепихи установлено, что повышение кратности не

приводит к повышению их экстрагируемости. По-видимому, это связано со снижением времени контакта сырья с растворителем (Таблица 35).

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 30 минут (Таблица 35).

Таблица 35 – Варьирование условиями экстрагирования аминокислот из листьев облепихи крушиновидной

Условия экстракции	Содержание суммы аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую, %
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:10	1,094±0,053
1:50	2,291±0,111
1:100	1,823±0,088
1:150	1,891±0,092
Размер частиц сырья, мм	
Менее 0,2	1,317±0,071
0,2 – 0,5	1,417±0,069
0,5 – 1,0	1,647±0,080
1,0 – 2,0	2,291±0,111
2,0 - 3,0	1,317±0,064
Время экстрагирования, мин	
15	2,182±0,106
30	2,291±0,111
45	1,651±0,080
60	1,325±0,064
90	1,140±0,055
Кратность экстракции	
1	2,291±0,111
2	1,887±0,091

Исходя из вышесказанного была разработана следующая методика.

Около 1,0 г высушенных измельченных листьев (точная навеска), прошедших сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 50 мл воды очищенной. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым быстро охлаждали до комнатной температуры. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, в мерную колбу вместимостью 50 мл, отжимая остатки сырья. При необходимости доводили раствор водой до

метки (раствор А). 2 мл извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 2 мл 1% раствора нингидрина в 96% этиловом спирте, 4 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,4 и 2 мл 0,05% водного раствора аскорбиновой кислоты. Реакционную массу нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин; быстро охлаждали, объем раствора доводили до метки водой очищенной и перемешивали (раствор Б). Параллельно проводили аналогичные опыты с 2 мл раствора В рабочего стандартного образца глутаминовой кислоты и 2 мл воды очищенной (контрольный опыт). Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия, СПб, ОКБ «Спектр») при длине волны 568 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно контрольного опыта. Содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{A_x \cdot 0,05 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 200 \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot 2} = \frac{A_x \cdot 0,05 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot 2}$$

A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 - оптическая плотность раствора РСО глутаминовой кислоты; m — масса сырья, г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление раствора стандартного образца глутаминовой кислоты. Около 0,05 г (точная навеска) РСО глутаминовой кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 50 мл воды очищенной, растворяли, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор В). Приготовление фосфатного буферного раствора с рН 6,4 проводили по ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» ГФ РФ XIV изд. [23].

Метрологическая оценка предложенной методики показала, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составила около 4,84%, т.е. находилась в пределах случайной ошибки разработанной методики и не превышала 5% (Таблица 36).

Таблица 36 – Метрологическая характеристика методики определения (P=95%; n=6)

$\bar{x}_{\text{ср}}$	S^2	S	$S_{\bar{x}_{\text{ср}}}$	Δx	$\Delta \bar{x}_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
2,145	0,00163	0,0404	0,0165	0,1038	0,0424	4,84	1,98

При валидации разработанной методики установлены такие характеристики, как предел определения, линейность, специфичность, прецизионность на уровне сходимости. Содержание аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую в образцах ЛРС составило $2,264 \pm 0,11\%$ (принятое опорное значение).

Специфичность методики подтверждали методом добавок. При введении аликвоты РСО кислоты глутаминовой (Рисунок 62), спектр поглощения продуктов реакции извлечения из листьев с нингидрином имел аналогичный вид с гиперхромными характерными максимумами поглощения при 401 ± 2 и 568 ± 2 нм.

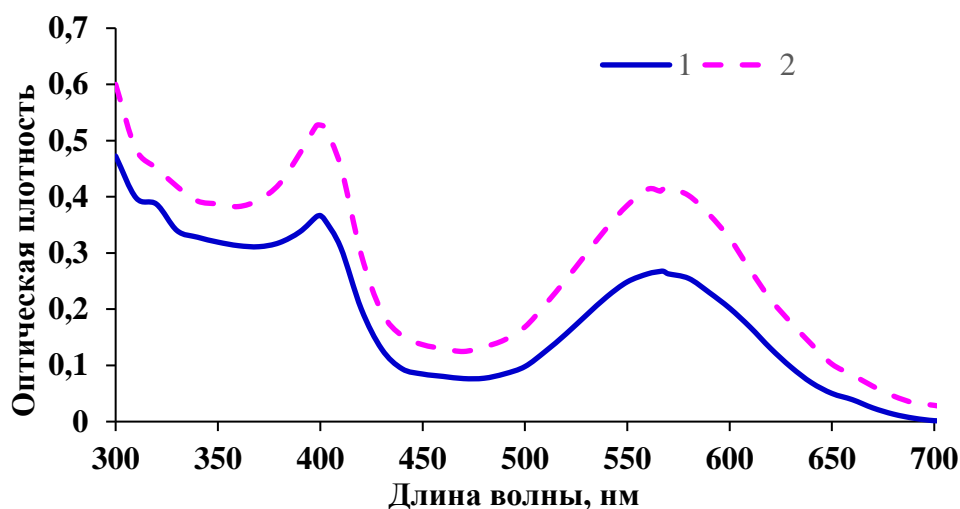


Рисунок 62 – Вид спектра поглощения продуктов реакции извлечения из листьев облепихи крушиновидной с нингидрином (1 – без добавки РСО кислоты глутаминовой; 2 – с добавкой РСО кислоты глутаминовой)

Линейность подтвердили на семи уровнях концентраций (Рисунок 63). Растворы готовили путем увеличения аликвоты (Таблица 37). Объем раствора Б везде составлял 50,0 мл.

Характеристики линейности (уравнение прямой, коэффициент корреляции, наклон прямой, отрезок на оси ординат) приведены в Таблице 38 и на Рисунке 63.

Таблица 37 – Приготовление испытуемых растворов для оценки линейности методики

Аликвота раствора А, мл	Уровень концентрации
0,5	25,0%
1,0	50,0%
1,5	75,0%
2,0	100,0%
2,5	125,0%
3,0	150,0%
3,5	175,0%

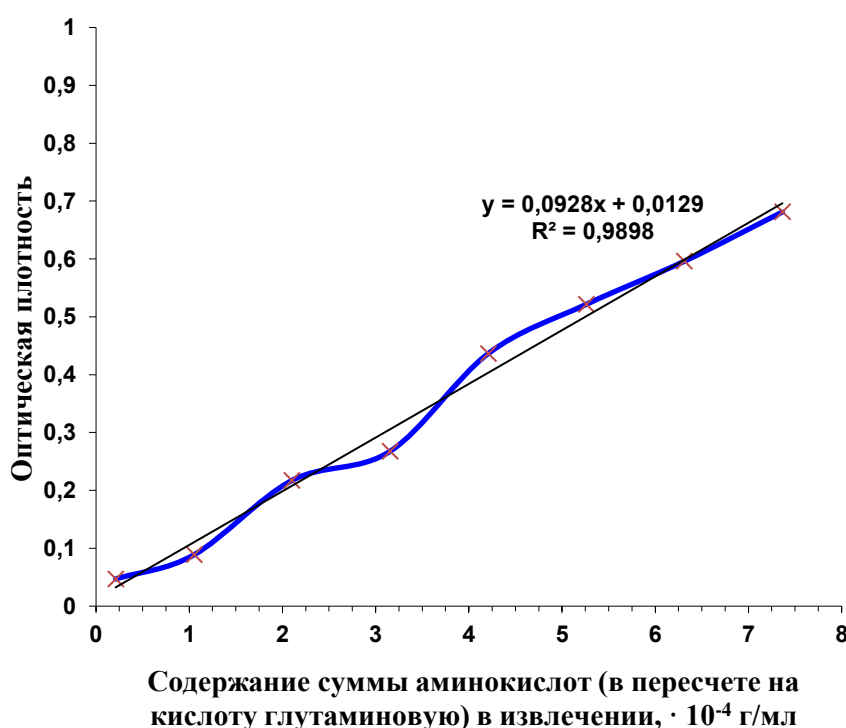


Рисунок 63 – Зависимость оптической плотности раствора от содержания суммы аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую ($\text{г} \times 10^{-4}$) в извлечении из листьев облепихи крушиновидной

Таблица 38 – Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения суммы свободных в листьях облепихи крушиновидной

Характеристика	Статистические характеристики	Результаты
Линейность	Уравнение прямой	$y=0,0928x+0,0129$
	Наклон (а)	0,0928
	Отрезок на оси ординат b	0,0129

Продолжение Таблицы 38

	Коэффициент корреляции			0,9898			
	Диапазон линейности (грамм аминокислот в 1 мл извлечения)			0,21 – 7,36×10 ⁻⁴			
Предел определения, г/мл	Количество грамм аминокислот в 1 мл извлечения			2,1×10 ⁻⁵			
Правильность	проба	Было, г в пробе	Введено, г в пробу	Должно быть, г в пробе	Найдено, г в пробе	R, %	
	1	0,0003156	0,000125	0,0004406	0,0004019	100,51	
	2				0,0004070		
	3				0,0004428		
	1	0,0003156	0,0001875	0,0005031	0,00048814	99,21	
	2				0,0004846		
	3				0,0005246		
	1	0,0003156	0,000250	0,0005656	0,00060712	99,25	
	2				0,00054551		
	3				0,00053143		
	Повторяемость	проба	Оптическая плотность		Содержание аминокислот, %		
		1	0,4114		2,139		
2		0,4161		2,163			
3		0,4060		2,111			
4		0,4011		2,085			
5		0,4229		2,199			
6		0,4170		2,168			
		Наименьшее значение, %		Наибольшее значение, %			
		2,085		2,199			
Среднее значение, % = 2,145							
Доверительный интервал (P=95%), % 2,145±0,0424							
Стандартное отклонение (SD), % = 4,04							
Коэффициент вариации (RSD), % = 1,88							

Сходимость методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95%, свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 38).

Правильность методики устанавливали методом «введено-найдено». Среднее значение критерия приемлемости – открываемости (R) на трех уровнях концентраций составил 95%, что следует считать удовлетворительным.

Для исследования динамики накопления данных БАВ в листьях облепихи крушиновидной, проводили также количественное определение суммы свободных аминокислот в листьях, заготовленных в различные фенологические фазы (Таблица 39). Установлено, что наибольшее содержание суммы свободных аминокислот наблюдается в листьях, заготовленных в середине июня (фенофаза 1), постепенно снижаясь к концу августа (фенофаза 3), что также согласуется с данными по оценке полного состава АК методом КЭ (Таблица 34 данной главы). Данный факт обусловлен тем, что аминокислоты, являясь БАВ первичного обмена в растениях, используются в качестве исходных субстратов для синтеза БАВ вторичного обмена биохимическим аппаратом клетки.

Таблица 39 – Сравнительная оценка содержания аминокислот в листьях различных фенофаз заготовки

Фенофаза	Содержание, %
1	2,957±0,143
2	2,145±0,104
3	1,727±0,084

Таким образом, проведено определение суммы свободных и связанных аминокислот в листьях облепихи крушиновидной различных фенологических фаз. Установлено, что наибольшее их содержание наблюдается в листьях, заготовленных в середине июня (фенофаза 1), постепенно снижаясь к концу августа (фенофаза 3). Разработанная методика спектрофотометрического определения суммы аминокислот в пересчёте на кислоту глутаминовую в листьях облепихи крушиновидной валидна и может быть использована для всесторонней оценки комплекса БАВ данного ЛРС. При заготовке сырья фенологической фазы 3 (период массового плодоношения) в нем может содержаться не менее 1,5% свободных аминокислот и не менее 7% свободных и связанных аминокислот [45,52].

5.5.4. Разработка и валидация методики количественного определения лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной

При обзоре литературных источников не выявлено упоминаний о таких соединениях, как антоцианы и лейкоантоцианы. При проведении серии скрининговых исследований на различные группы БАВ нами было отмечено, что при экстракции подкисленным спиртом этиловым наблюдалось покраснение извлечения. Согласно литературным данным листья редко содержат антоцианы, но это не исключает присутствие их восстановленных форм – лейкоантоцианов [22], которые способны окрашивать «кислые» извлечения при длительной температурной экстракции в красно-вишневый цвет, вследствие их превращения при этом в собственно антоциановые соединения. Так как лейкоформы антоцианов входят в состав комплекса БАВ листьев полифенольной природы, которая, как предполагается, отвечает за различные виды фармакологической активности ЛРП на их основе в т.ч. антиокислительной активности (АОА) и противовоспалительной [83,143], на следующем этапе проводили разработку и валидацию спектрофотометрической методики количественного определения лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной по сумме собственно антоциановых соединений.

Согласно фармакопейной методике количественного определения антоцианов в сырье [22], экстрагентом является спирт этиловый 96%, подкисленный кислотой хлористоводородной. При снятии спектра поглощения получаемого извлечения в области длин волн от 200 до 800 нм наблюдался максимум поглощения при 535 ± 2 нм. Согласно литературным данным, цианидин-3-О-глюкозид имеет максимум поглощения при 535 ± 2 нм [22]. Следовательно, расчёт содержания лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной следует вести в пересчёте на цианидин-3-О-глюкозид [22]. Вид спектра поглощения подкисленного спиртного извлечения из листьев облепихи крушиновидной представлен на Рисунке 64.

При разработке методики варьировали такими показателями, как степень измельчения сырья, соотношение «сырье : экстрагент», длительность и кратность экстракции (Таблица 40).

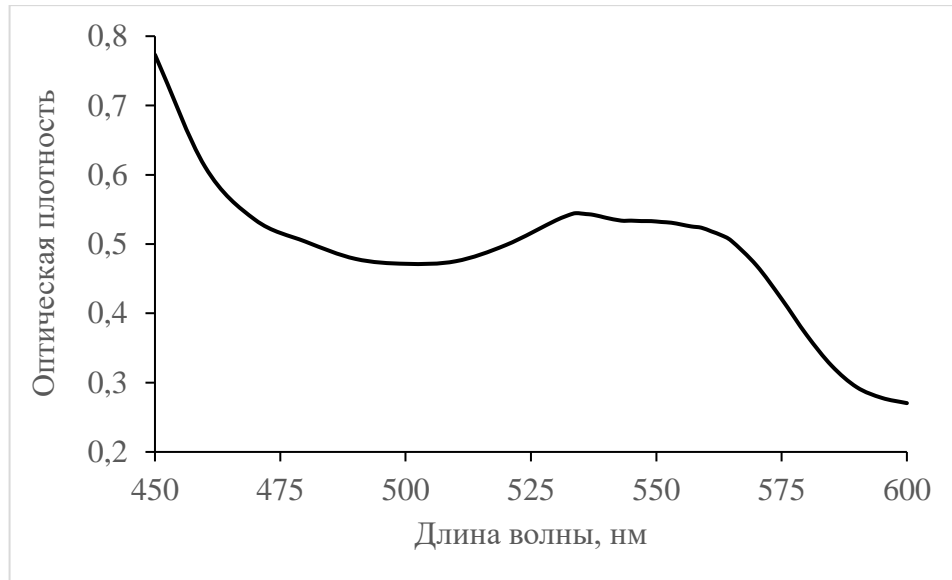


Рисунок 64 – Спектр поглощения извлечения из листьев облепихи крушиновидной (экстрагент – спирт этиловый 96% подкисленный HCl до 1%) в видимой области спектра

Таблица 40 – Результаты количественного определения лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной при разных условиях экстрагирования

Условия экстракции	Содержание лейкоантоцианов, в пересчёте на цианидин-3-О-глюкозид, в абсолютно сухом сырье, %
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:25	0,710±0,021
1:50	1,309±0,039
1:150	1,483±0,044
1:200	2,188±0,065
Время экстрагирования, мин	
30	0,774±0,023
60	1,011±0,030
90	1,108±0,033
120	1,267±0,037
150	1,483±0,044
180	1,416±0,042
Размер частиц сырья, мм	
Менее 0,2	0,646±0,019
0,2 – 0,5	0,426±0,029

Продолжение Таблицы 40

0,5 – 1,0	0,774±0,023
1,0 – 2,0	0,356±0,011
2,0 - 3,0	0,369±0,011
Кратность экстракции	
1	2,188±0,065
2	1,245±0,037

Максимальное содержание суммы лейкоантоцианов в извлечении в пересчете на образующийся в процессе выделения цианидин-3-О-глюкозид наблюдался при экстракции фракции сырья с размером частиц менее 1,0-0,5 мм. При варьировании временем экстракции происходило постепенное увеличение выхода лейкоантоцианов из сырья с увеличением длительности экстракции, достигая максимума при 150 минутах (2,5 часа). Следовательно, оптимальным временем экстракции выбрано 150 минут, соответствующее максимальному количественному протеканию реакции окисления лейкоформ антоцианов в кислой среде в присутствии кислорода воздуха. При дальнейшем увеличении времени экстракции до 180 минут повышения содержания антоцианов в извлечении не наблюдалось. При увеличении соотношения «сырье : экстрагент» возрастал выход лейкоантоцианов из сырья и достигал максимума при соотношении 1:150, а увеличение кратности экстракции при сохранении общего времени процесса и объема получаемого экстракта, не приводило к возрастанию их выхода в извлечение. Это объясняется сокращением времени контакта сырья с порцией экстрагента, а также снижением интенсивности процессов диффузии вследствие снижения градиента концентрации на разделе фаз сырье-экстрагент при снижении объема экстрагента.

На заключительном этапе была проведена оценка стабильности оптической плотности во времени полученного извлечения из ЛРС. Результаты представлены на Рисунке 65.

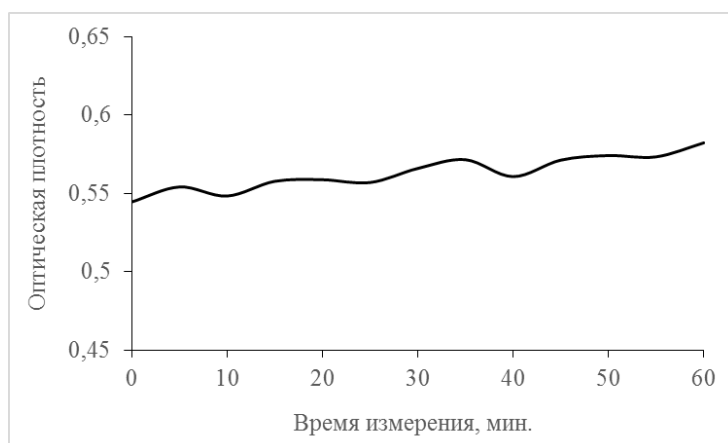


Рисунок 65 – Стабильность оптической плотности извлечения во времени

Исходя из графика, оптическая плотность извлечения стабильна только в течение первых 25 минут после разведения. При дальнейшем измерении наблюдается значительное увеличение оптической плотности, что может быть связано с образованием побочных продуктов, ассоциации полученных антоцианов по средствам водородных связей в извлечении, что сопровождается отклонением от закона Бугера-Ламберта-Бера.

Методика количественного определения лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной заключается в следующем [53]:

Навеску сырья около 1,0 г (т.н.), измельчённого до размера частиц от 1,0 до 0,5 мм помещали в колбу на 250 мл, заливали 150 мл подкисленного кислотой хлороводородной спирта этилового 96% до концентрации 1% и экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником 150 минут при периодически перемешивании. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата, в мерные колбы вместимостью 100 и 50 мл, доводили до метки последнюю колбу тем же растворителем. Содержимое колб объединяли в одном стакане, тщательно перемешивали (раствор А). 10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же растворителем (раствор Б). Измеряли оптическую плотность раствора Б не позднее 30 минут после разведения при длине волны 535 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворителя. Расчёт содержания лейкоантоцианов в

листьях, в пересчёте на образующийся в процессе выделения цианидин-3-О-глюкозид, в абсолютно сухом сырье вели по формуле:

$$X = \frac{A_x \times V_{k1} \times V_{k2} \times 100 \times 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times a \times (100 - W) \times V_a \times l}$$

где A_x – оптическая плотность раствора Б; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100; V_{k1} и V_{k2} – объём раствора А и объём раствора Б, соответственно, мл; a – навеска сырья, взятая на анализ, г; V_a – объём аликвоты раствора А, мл; W – влажность сырья, %; l – толщина слоя, см.

Спирт этиловый 96% подкисленный: в соответствии с ОФС «Реактивы» ГФ РФ XIV издания [23].

Результаты метрологической оценки методики представлены в Таблице 41.

Таблица 41 – Метрологические характеристики методики определения суммы лейкоантоцианов в листьях облепихи крушиновидной (P=95%; n=7)

$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
2,215	0,000872	0,0295	0,0111	0,0723	0,0272	3,264	1,228

Разработанная методика подвергалась валидации по следующим характеристикам: линейность, предел обнаружения, область линейности, предел количественного определения, прецизионность на этапе сходимости (повторяемость) [22].

Линейность проверялась на 8 уровнях концентрации (12,5-175%). Растворы готовили путём уменьшения и увеличения аликвоты исходного извлечения. Уравнение прямой, величина достоверности аппроксимации, наклон прямой и отрезок на оси ординат представлены на Рисунке 66 и в Таблице 42. На рисунке видно, что почти все точки лежат на одной прямой и, так как $R^2 > 0,99$, наблюдалась линейная зависимость по всем выбранным аликвотам. Предел обнаружения составил $0,1704 \times 10^{-3}$ г/мл. Область линейности наблюдалась в широком диапазоне

содержаний антоцианов от $0,17 \times 10^{-3}$ до $2,4 \times 10^{-3}$ г/мл извлечения. Предел количественного определения составил $0,64 \times 10^{-3}$ г/мл извлечения.

Повторяемость методики оценивалась на одном образце в 7 повторностях. Величина относительного стандартного отклонения составила 1,33% (не превышает 5%), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 43).

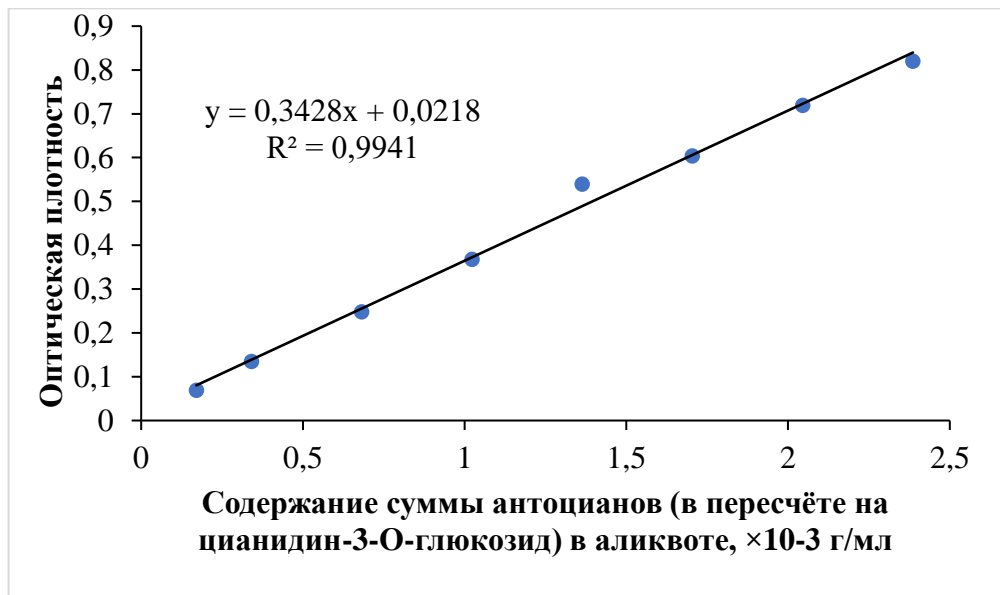


Рисунок 66 – Зависимость оптической плотности извлечения из листьев облепихи крушиновидной от содержания суммы лейкоантоцианов

Таблица 42 – Результаты исследования методики по показателю линейность

Аликвота извлечения, %	Аликвота извлечения, мл	Оптическая плотность раствора	Содержание суммы антоцианов в аликвоте, $\times 10^{-3}$ г/мл
12,5	1,25	0,0695	0,1704
25	2,5	0,1352	0,3408
50	5,0	0,2481	0,6817
75	7,5	0,3679	1,023
100	10,0	0,5395	1,363
125	12,5	0,6043	1,704
150	15,0	0,7194	2,045
175	17,5	0,8203	2,386
Коэффициент корреляции			0,9941

Таблица 43 – Результаты определения прецизионности методики

Номер опыта	Содержание суммы лейкоантоцианов в сырье, %
1	2,199
2	2,212
3	2,182
4	2,231
5	2,193
6	2,214
7	2,271
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,33
Стандартное отклонение (SD)	2,95

На основе валидированной методики проведена оценка динамики накопления БАВ в листьях облепихи крушиновидной трёх фенологических фаз с целью выбора оптимального срока заготовки сырья с максимальным накоплением антоцианов (Таблица 44).

Таблица 44 – Содержание лейкоантоцианов в листьях различных фенологических фазах заготовки

Фенологическая фаза	Содержание лейкоантоцианов, в пересчёте на цианидин-3-О-глюкозид, в абсолютно сухом сырье, %
1	2,188±0,065
2	2,355±0,070
3	1,847±0,055

Согласно полученным результатам установлено, что содержание данных полифенольных БАВ в сырье колеблется от 1,8 до 2,3% в зависимости от фенологической фазы жизни растения. Разработанная методика валидна и пригодна для оценки качества листьев облепихи крушиновидной. При заготовке листьев на всех этапах развития рекомендуемая норма содержания данной группы БАВ может быть установлена не менее 1,5%, что требует подобных дополнительных исследований листьев, заготовленных в период плодоношения (в различных климатических зонах этот период может варьировать) от растений разнообразных сортовых принадлежностей, произрастающих в различных регионах РФ.

Полученные результаты по содержанию антоцианов в листьях облепихи крушиновидной свидетельствуют о перспективности их использования в качестве источника данной группы БАВ [53].

5.5.5. Разработка и валидация методики количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной

Для определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной, как БАВ, вносящих вклад в комплексный характер действия суммарных экстракционных препаратов, за основу была взята методика спектрофотометрического определения хлорофиллов, каротиноидов и гидроксикоричных кислот в листьях крапивы двудомной, разработанная Тринеевой О.В. с соавторами, основанная на извлечении БАВ из сырья подходящим растворителем и измерении оптической плотности на спектрофотометре СФ-2000 в максимумах поглощения при длине волны 442 ± 2 нм (характерно для каротиноидов) и 667 ± 3 нм (характерно для хлорофиллов) [138].

При изучении спектральных характеристик полученных нами извлечений из листьев облепихи крушиновидной наблюдали основные максимумы поглощения в области 460 ± 5 нм, характерные для каротиноидов (γ -каротин и другие фракции), и 667 ± 3 нм, свойственные для хлорофилла (Рисунок 67).

На начальном этапе нами осуществлён подбор степени измельчения листьев облепихи при экстракции спиртом этиловым 96% в течение 30 минут однократно. Согласно полученным результатам, наибольший выход каротиноидов и хлорофиллов отмечен для сырья со степенью измельчения 0,5-1,0 мм. Несмотря на максимальный выход этих соединений при степени измельчения 0,2 мм, использование её нецелесообразно в связи с необходимостью двух-трёхкратного фильтрования извлечения. Даже в этом случае фильтрат имел определенную

мутность, и мы получили завышенные показатели оптической плотности и, как следствие, высокое содержание определяемых веществ (Таблица 45).

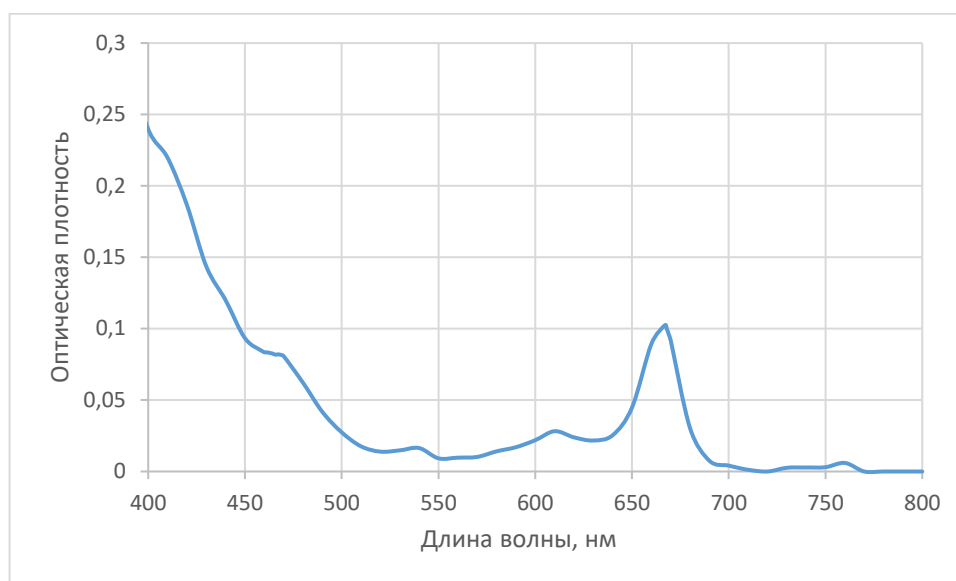


Рисунок 67 – Спектр поглощения спиртового извлечения из листьев облепихи крушиновидной в видимой области

На следующем этапе разработки методики провели выбор экстрагента, который позволяет получить максимальный выход каротиноидов и хлорофиллов из сырья. Экстракцию осуществляли спиртом этиловым в концентрации 70 и 96%. Установлено, что наибольшее значение оптической плотности извлечения наблюдалось при использовании спирта этилового в концентрации 96%, что соответствует максимальному выходу хлорофиллов и каротиноидов (Таблица 45).

При выборе оптимального времени экстракции были проанализированы пробы, собранные в 5 точках: после 30, 45, 60, 90 и 120 мин нагревания. В результате было установлено, что с увеличением длительности экстракции выход хлорофиллов и каротиноидов возрастал, достигая максимума при 45 мин, и далее снижался, выходя на плато после 60 мин (Таблица 45).

Для установления полноты экстракции каротиноидов и хлорофиллов из листьев облепихи крушиновидной изучали влияние соотношения сырье-экстрагент. В результате установлено, что с увеличением объема экстрагента наблюдалось возрастание выхода каротиноидов и хлорофиллов и при соотношении 1:200 выход

был максимальным (0,053% - каротиноиды, 0,167% - хлорофиллы). Ввиду того, что с ростом объема экстрагента на 1,0 г сырья, не наблюдалось значительного увеличения выхода БАВ (в пределах ошибки определения), а также нерациональности необоснованных трат реактивов и материалов при воспроизведении методики, дальнейшего увеличения соотношения не проводилось (Таблица 45).

Таблица 45 – Варьирование условиями экстрагирования каротиноидов и хлорофиллов в извлечение

Условия экстракции	Содержание каротиноидов, %	Содержание хлорофиллов, %
Размер частиц сырья, мм		
Менее 0,2	0,050±0,00005	0,159±0,0005
0,2 – 0,5	0,044±0,00005	0,149±0,0005
0,5 – 1,0	0,047±0,00005	0,141±0,0005
1,0 – 2,0	0,039±0,00004	0,118±0,0004
2,0 - 3,0	0,021±0,00002	0,067±0,0002
Экстрагент		
Спирт этиловый 70%	0,042±0,00005	0,102±0,0003
Спирт этиловый 96%	0,047±0,00005	0,141±0,0005
Соотношение «сырье : экстрагент»		
1:25	0,027±0,00003	0,087±0,0003
1:50	0,036±0,00004	0,113±0,0004
1:100	0,042±0,00005	0,134±0,0004
1:150	0,050±0,00005	0,163±0,0005
1:200	0,053±0,00006	0,167±0,0006
Время экстрагирования, мин		
30	0,034±0,00004	0,111±0,0004
45	0,042±0,00005	0,134±0,0004
60	0,042±0,00005	0,134±0,0004
90	0,039±0,00004	0,121±0,0004
120	0,044±0,00005	0,132±0,0004
Кратность экстракции		
1	0,053±0,00006	0,167±0,0006
2	0,054±0,00006	0,177±0,0006
3	0,048±0,00005	0,159±0,0005

На заключительном этапе осуществляли варьирование кратностью экстракции (одно-, двух- и трёхкратная экстракция). Результаты представлены в таблице 45. Согласно полученным данным, наибольший выход каротиноидов и хлорофиллов отмечен при двукратной экстракции (Таблица 45).

При определении содержания каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной различных фаз вегетации установлено, что наиболее богатой данными соединениями является фаза массового созревания плодов (фаза 3) (Таблица 46), что согласуется с результатами ТСХ-анализа данных БАВ (п. 5.3.1.2 данной главы).

Таблица 46 – Содержание каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной различных фаз вегетации.

Фенологическая фаза	Фенофаза 1	Фенофаза 2	Фенофаза 3
Содержание каротиноидов, %	0,050±0,00005	0,043±0,00005	0,07±0,00008
Содержание хлорофиллов, %	0,163±0,0005	0,123±0,0004	0,179±0,0006

Большинство методик по определению БАВ предлагают использовать в качестве фильтрующего материала бумажный фильтр. С целью выявления влияния способа фильтрования проведена сравнительная оценка выхода каротиноидов и хлорофиллов в извлечение при фильтрации через бумажный фильтр и через марлю (10 слоёв) (Таблица 47). Установлено, что при использовании бумажного фильтра процесс более длителен (фильтрация одной порции при двукратной экстракции осуществляется 40-50 минут). При использовании марли наблюдается больший выход БАВ в извлечение (примерно на 30%). Предположительно, это объясняется тем, что в порах фильтра задерживаются балластные вещества (слизи, дубильные вещества), забивая поры и сорбируя на своей поверхности молекулы каротиноидов и хлорофиллов. На основании этого использование марли в качестве фильтрующего материала целесообразно (Таблица 47).

Разработанная методика количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной реализуется следующим образом [51].

Таблица 47 – Влияние фильтрующего материала на выход БАВ в извлечение

Фильтрующий материал	Содержание каротиноидов, %	Содержание хлорофиллов, %
Бумажный фильтр	0,054±0,00006	0,177±0,0006
Марля (10 слоёв)	0,096±0,00010	0,228±0,0008

Около 1,0 г (точная навеска) высушенных до остаточной влажности не более 10% и измельчённых до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм помещали в круглодонную колбу вместимостью 500 мл, заливали 100 мл спирта этилового 70%, взвешивали и в течение 45 минут проводили кипячение на водяной бане с обратным холодильником. По истечении времени колбу с экстрактом быстро охлаждали, доводили объём растворителя по массе и фильтровали через 10 слоёв марли и повторяли экстракцию ещё раз. Фильтраты объединяли в мерной колбе вместимостью 200 мл и доводили до метки тем же растворителем (раствор А). 10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же этанолом (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия, СПб, ОКБ «Спектр») при длинах волн 460±5 нм, характерных для каротиноидов, и 665±5 нм, характерных для хлорофиллов, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворителя (спирт этиловый 70%). Содержание суммы каротиноидов (в пересчёте на β-каротин) и суммы хлорофиллов в процентах (X) в пересчёте на абсолютно сухое сырьё рассчитывали по формулам (1 и 2, соответственно):

$$X = \frac{A \times W_1 \times W_2 \times 100\% \times 100\%}{m \times E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times V_a \times (100\% - B\%)} = \frac{A \times 200 \times 25 \times 100 \times 100}{m \times 2500 \times 100 \times 10 \times (100 - B)} \quad (1)$$

$$X = \frac{A \times W_1 \times W_2 \times 100\% \times 100\%}{m \times E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times V_a \times (100\% - B\%)} = \frac{A \times 200 \times 25 \times 100 \times 100}{m \times 944,5 \times 100 \times 10 \times (100 - B)} \quad (2)$$

где A – оптическая плотность раствора Б в соответствующем максимуме поглощения; m – масса сырья, г; B – потеря в массе при высушивании сырья, %; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения (2500 для β-каротин при 450±5 нм; 944,5 для хлорофилла при 663±5 нм); W_1 и W_2 – объёмы мерных колб, использованных для разведения, мл; V_a – объём аликвоты, взятый на анализ, мл.

Проведена метрологическая оценка разработанной методики. Относительная ошибка единичного определения составляет 3,54% для хлорофиллов и 2,74% для каротиноидов (с доверительной вероятностью 95%) (Таблица 48).

Таблица 48 – Метрологическая характеристика методики определения каротиноидов (1) и хлорофиллов (2) (P=95%; n=7)

БАВ	x_{cp}	S^2	S	Sx_{cp}	Δx	Δx_{cp}	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{cp}, \%$
1	0,0957	0,00000115	0,00107	0,000404	0,00262	0,00099	2,74	1,03
2	0,228	0,0000108	0,00329	0,00124	0,00806	0,00304	3,54	1,33

Валидация методики проведена по следующим критериям: прецизионность на уровне сходимости, предел обнаружения, предел количественного определения, аналитическая область методики.

Линейность определяли на восьми уровнях концентраций. График, уравнение линейности и коэффициент аппроксимации представлены на Рисунке 68. Так как R^2 и по определению каротиноидов, и по определению хлорофиллов более 0,99, можно сделать вывод, что область линейности в диапазоне концентраций от 0,55 до $7,74 \times 10^{-5}$ г/мл (каротиноиды) и от 1,32 до $18,45 \times 10^{-5}$ г/мл (хлорофиллы). Предел обнаружения – 0,55 и $1,32 \times 10^{-5}$ г/мл каротиноидов и хлорофиллов извлечения, соответственно. Аналитическая область методики составляет 80-120% от номинальной величины ($3,32-5,55 \times 10^{-5}$ г/мл для каротиноидов и $7,91-13,18 \times 10^{-5}$ г/мл для хлорофиллов). Предел количественного обнаружения каротиноидов данной методикой составляет $5,55 \times 10^{-5}$ г/мл, хлорофиллов – $15,81 \times 10^{-5}$ г/мл.

Прецизионность оценивали на уровне сходимости путём получения семи независимых результатов в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем по одной и той же методике с использованием того же оборудования за короткий промежуток времени. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (Таблица 49).

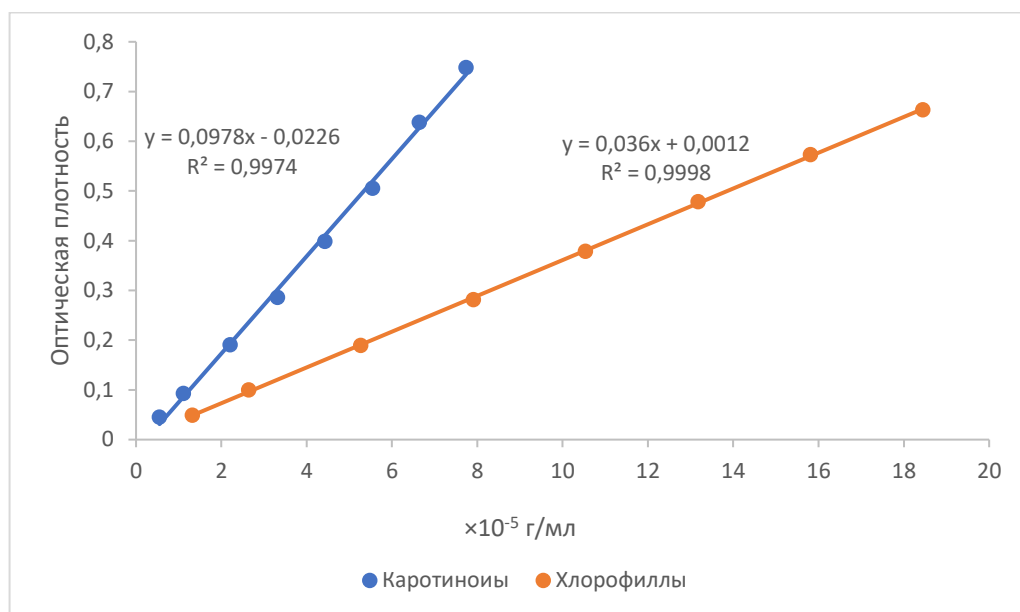


Рисунок 68 – График линейности методики

Таблица 49 – Прецизионность методики определения каротиноидов и хлорофиллов (P=95%; n=7)

Каротиноиды			Хлорофиллы		
Проба	Оптическая плотность	Содержание, %	Проба	Оптическая плотность	Содержание, %
1	0,4497	0,0972	1	0,4058	0,232
2	0,4480	0,0969	2	0,4064	0,233
3	0,4440	0,0960	3	0,3978	0,228
4	0,4363	0,0943	4	0,3948	0,226
5	0,4408	0,0953	5	0,3976	0,228
6	0,4401	0,0951	6	0,3952	0,226
7	0,4390	0,0949	7	0,3915	0,224
Наименьшее значение, % = 0,0943 Наибольшее значение, % = 0,0972 Среднее значение, % = 0,0957 Доверительный интервал (P=95%), % = 0,0957±0,00262 Стандартное отклонение, % = 0,107 Коэффициент вариации, % = 1,118			Наименьшее значение, % = 0,224 Наибольшее значение, % = 0,233 Среднее значение, % = 0,228 Доверительный интервал (P=95%), % = 0,228±0,00806 Стандартное отклонение, % = 0,329 Коэффициент вариации, % = 1,443		

В результате проведенных исследований в качестве критерия качества сырья по показателю «Количественное определение» можно предложить регламентировать содержание суммы каротиноидов, в пересчете на β-каротин не менее 0,05% и содержание суммы хлорофиллов – не менее 0,2% [51].

5.5.6. Определение органических кислот в листьях облепихи крушиновидной

Согласно литературным данным, листья облепихи крушиновидной богаты различными БАВ, в том числе органическими кислотами, среди которых чаще всего встречаются щавелевая, яблочная, винная и лимонная кислоты [88,167]. Органические кислоты в целом, по литературным данным, обладают широким спектром фармакологических свойств, включая противовоспалительную, витаминную, антисептическую, кератолитическую, желчегонную активности [88,167]. Следовательно, изучение полного качественного и количественного состава органических кислот целесообразно в рамках всесторонних фитохимических исследований листьев.

Методика определения описана в Главе 2 (п. 9). Оценку накопления органических кислот проводили на листьях облепихи крушиновидной трёх изучаемых фенологических фаз жизни растения. В ходе исследования по определению суммы органических кислот нами была адаптирована известная алкалометрическая методика и было выявлено, что листья изучаемых фенофаз демонстрируют примерно одинаковое накопление органических кислот (более 2%) наблюдается уже к началу июня и сохраняется без тенденции к росту до массового созревания и сбора плодов. Результаты представлены на Рисунке 69 и в Таблице 50.

Таблица 50 – Метрологические характеристики определения суммы органических кислот в листьях облепихи крушиновидной (на примере фенологической фазы II в пересчете на кислоту яблочную) (P=95%; n=6)

x_{cp}	S^2	S	Sx_{cp}	Δx	Δx_{cp}	$\varepsilon, \%$
2,414	0,00042	0,0207	0,00782	0,0507	0,0192	0,795

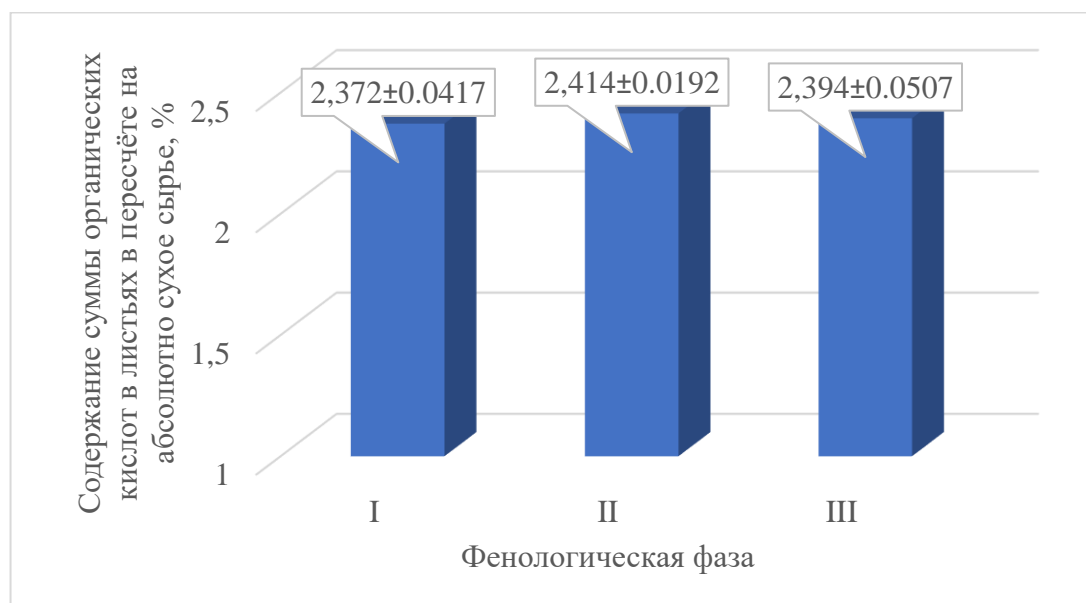


Рисунок 69 – Содержание суммы органических кислот в листьях облепихи крушиновидной различных фенофаз в пересчёте на абсолютно сухое сырьё, %

Для исследования компонентного состава данных БАВ (свободные органические кислоты) изучаемые образцы листьев анализировали методом КЭ.

Установлено, что листья облепихи крушиновидной содержат 7 органических кислот, а содержание фумаровой, янтарной, масляной, лимонной и яблочной кислот не превышает нижних пределов измерения. Также установлено, что в составе комплекса органических кислот листьев всех изучаемых фенофаз преобладают уксусная и муравьиная кислоты, тогда как для фазы массового плодоношения наблюдается также накопление молочной и пропионовой кислот (Таблица 51).

Таблица 51 – Результаты исследования компонентного состава органических кислот в листьях облепихи крушиновидной

Органическая кислота	Фенологическая фаза, %		
	1	2	3
Щавелевая	0,013	0,058	0,025
Муравьиная	0,188	0,165	0,342
Фумаровая	Менее 0,01*		
Янтарная			
Масляная			
Лимонная			
Яблочная			
Уксусная	1,422	2,048	1,304

Продолжение Таблицы 51

Пропионовая	0,014	0,014	0,260
Молочная	0,028	0,014	0,432
Бензойная	0,002	0,004	0,001
Сорбиновая	0,013	0,017	0,006
Итого, %	1,68	2,32	2,37
Примечание: *- предел обнаружения			

Листья облепихи крушиновидной имеют высокое содержание органических кислот с целью использования данного сырья в качестве их источника. Для заготовки данного ЛРС в промышленных масштабах с точки зрения содержания суммы органических кислот может быть рекомендована фаза сбора урожая. При этом содержание органических кислот на данном периоде заготовки сырья является достаточно высоким для морфологической группы листьев (не менее 2% свободных органических кислот) [41,84].

5.6. Анализ витаминов группы В в листьях облепихи крушиновидной

Из литературных источников известно, что листья облепихи крушиновидной содержат витамины группы В – тиамин (0,034-0,14 мг%) и рибофлавин (0,029-0,586 мг%) [81]. Для уточнения данных по разным фенологическим фазам проведено исследование листьев на содержание витаминов и витаминоподобных веществ группы В (Глава 2, п. 9).

Содержание тиамина в листьях достигает максимума ко 2 фенофазе (период единичного созревания плодов) и снижается к 3 фенофазе (период массового плодоношения). Содержание холина с ростом продолжительности жизни листьев постепенно снижается. В листьях 2 и 3 фаз заготовки выявлено достаточное количество рибофлавина. Последний по мере роста и развития листовой пластинки имеет тенденцию к накоплению (Таблица 52). Содержание рибофлавина является наиболее высоким (с учётом его суточной потребности), но необходимое к

употреблению количество листьев облепихи крушиновидной оказывается значительным [55].

Таблица 52 – Состав витаминов группы В в листьях облепихи крушиновидной

Витамин	Содержание витамина по фазам, мг/кг			Нормы потребности, мг/сут*	Суточная норма потребления листьев (фенофаза 3), г
	1	2	3		
Тиамин (В ₁)	4,63	6,93	1,17	1,5	1282,05
Рибофлавин (В ₂)	1,71	2,78	2,93	1,8	614,33
Холин (В ₄)	171,0	94,5	88,6	500,0	5643,34
Примечание: *Рекомендуемая суточная потребность для взрослых в возрасте старше 18 лет [73]					

В результате проведённых исследований установлено, что листья облепихи крушиновидной не являются источником витаминов группы В, однако, за счёт комплексного состава БАВ, они могут оказывать влияние на фармакологический эффект ЛРП на организм.

5.7. Определение антиокислительной активности листьев облепихи крушиновидной

Несмотря на то, что листья, с одной стороны, давно известны в качестве сырья фармацевтических фабрик, с другой – имеют, согласно литературным данным, перспективы расширения линейки продукции фармацевтического назначения на их основе, которые потенциально могут обладать антиоксидантным, противовоспалительным, вяжущим, капилляропротекторным и венотонизирующим действием [78,163-164,170,177]. Однако, на сегодняшний день, в научном поле наблюдается небольшое количество работ, посвященных изучению АОА данного сырья, которое возможно заготавливать вместе с плодами, повышая эффективность использования многочисленных плантаций культивирования

растения на территории РФ, что подтверждает актуальность проведенных в данном разделе исследований.

Для оценки АОА ЛРС применяются различные титриметрические, электрохимические, спектральные и другие методы [137]. Мы использовали спектрофотометрическое определение общей АОА по методике, основанной на взаимодействии извлечения из ЛРС, содержащего БАВ-восстановители с растворами медиаторной системы, состоящей из 0,002 М раствора ферроцианида калия и 0,002 М раствора феррицианида калия, взятых в соотношении 1:1 [100]. Под действием БАВ, способных восстанавливать Fe^{3+} в Fe^{2+} , происходит снижение содержания в растворе $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ и рост концентрации $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, что сопровождается гипохромным смещением максимума поглощения при длине волны 420 нм на спектре поглощения медиаторной пары (Рисунок 70). По данной методике можно проводить оценку АОА ЛРС и суммарного содержания в нем БАВ-антиоксидантов в пересчете на кислоту аскорбиновую. Методика отличается достаточной чувствительностью (1×10^{-5} г/мл), экономичностью, доступностью и экспрессностью.

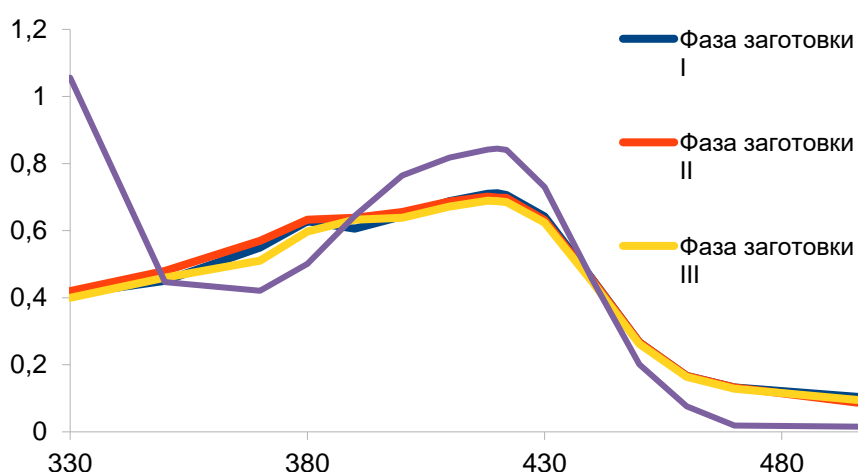


Рисунок 70 – Спектр поглощения медиаторной пары до и после добавления извлечений из листьев

Для оценки вклада содержания аскорбиновой кислоты в значения общей АОА, являющейся суммой активностей различных групп БАВ восстановительного характера, присутствующих в одном извлечении, было установлено содержание

аскорбиновой кислоты в листьях, с использованием титриметрической методики, представленной в ФС.2.5.0106.18 ГФ РФ XV изд. «Шиповника плоды» [22]. Результаты определения АОА представлены в Таблице 53.

Таблица 53 – Общий антиокислительный потенциал и суммарное содержание БАВ-антиокислителей в пересчете на аскорбиновую кислоту и абсолютно сухое сырье

Фаза заготовки сырья	Антиокислительная активность, $\text{г} \times 10^{-5} / \text{мл}$	Сумма антиокислителей в пересчете на аскорбиновую кислоту и абсолютно сухое сырье, %	Содержание аскорбиновой кислоты (фармакопейный метод) [22]	АОА, мг/г в пересчете на кислоту аскорбиновую (перманганатометрия) [95]
2	1,0908±0,1397	0,177±0,029	0,136±0,010	124,79±2,177
2	1,0555±0,1075	0,171±0,017	0,142±0,006	121,06±2,952
3	1,8757±0,1413	0,307±0,025	0,154±0,004	135,69±2,846

Наибольшее содержание антиокислителей в листьях в пересчете на аскорбиновую кислоту, в три раза большей по сравнению с листьями, заготовленными в июне и июле, наблюдали в третьей фазе заготовки, т.е. в период готовности плодов растения к сбору.

Содержание аскорбиновой кислоты, показавшее тенденцию к возрастанию в период наблюдения в листьях, оценивали для понимания вклада данного БАВ в общее значение показателя АОА, несомненно, являющегося суммой БАВ восстановительного характера, присутствующих в любом ЛРС (Таблица 53). Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,9314. При оценке АОА исследуемых листьев по известной методике Максимовой [93] также нами установлено, что фаза заготовки 3 содержит в своём составе наибольший комплекс БАВ восстанавливающего характера. Коэффициент корреляции Пирсона данных, полученных методом дифференциальной спектрофотометрии с данными АОА по методу перманганатометрии, составил 0,9783, что свидетельствует о наличии жесткой зависимости общего антиокислительного потенциала листьев облепихи от содержания в них аскорбиновой кислоты.

Наряду с аскорбиновой кислотой, листья облепихи крушиновидной содержат в своём составе различные гидрофильные природные соединения, обладающие АОО (флавоноиды, процианидины, каротиноиды, гидролизуемые танины). Сводные данные по результатам ранних наших исследований обобщены в Таблице 54.

Таблица 54 – Зависимость общего антиокислительного потенциала листьев от содержания БАВ по разным фазам развития

Фаза заготовк и сырья	Сумма дубильн ых веществ , %	Сумма флавоноид ов, %	Сумма каротино идов, мг%	Сумма лейкоанто цианов, %	АОО, мг/г в пересчете на			
					кверце тин	рутин	танин	кисло ту галлю вую
1	10,66±0,60	1,43±0,03	50±0,54	2,19±0,07	14,50±0,25	30,98±0,54	44,82±0,78	35,15±0,61
2	10,73±0,19	0,94±0,02	43±0,46	2,36±0,07	14,07±0,34	30,05±0,73	43,48±1,06	34,10±0,83
3	10,57±0,28	0,80±0,02	70±0,75	1,85±0,06	15,77±0,33	33,68±0,71	48,73±1,02	38,22±0,80

Однако, при исследовании корреляции между значениями общего антиокислительного потенциала листьев (Таблица 53) и содержанием полифенолов (дубильных веществ, лейкоантоцианов и флавоноидов) установлены обратные зависимости с коэффициентами корреляции – 0,9319; – 0,9570 и – 0,6405 соответственно. Напротив, оценка корреляционной связи АОО с содержанием каротиноидов в листьях показала наличие жесткой положительной взаимосвязи (0,9773).

Таким образом, можно предположить, что суммарный показатель АОО листьев облепихи крушиновидной в большей степени определяется накоплением в них аскорбиновой кислоты и каротиноидов. Листья периода сбора урожая плодов и ЛРП на его основе являются наиболее ценными с точки зрения проявления АОО [80,90]. Однако найденные количества аскорбиновой кислоты и каротиноидов не достаточны, чтобы рекомендовать листья в качестве витаминного средства.

5.8. Изучение комплекса биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной методом ИК-спектроскопии

Согласно литературным данным, метод ИК-спектроскопии находит применение в исследовании качества пищевого и ЛРС. В частности, в ближней ИК-области, в качестве неразрушающего метода анализа, метод используется для контроля накопления БАВ в растениях на площадках их культивирования. Наличие специфических полос, обусловленных присутствием в сырье целевых групп БАВ, а также их интенсивность, позволяет научно обосновать готовность сырья к сбору. Это способствует получению стандартных партий ЛРС и ЛРП на его основе.

Все большее распространение в оценке доброкачественности ЛРС находит метод ИК-Фурье спектроскопии НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения). Инфракрасные спектры важны не только для изучения строения сложных БАВ растительного происхождения, но и для исследования характера взаимодействия между ними в сырье и ЛРП.

В литературных источниках постепенно появляются и обобщаются сведения о возможности использования ИКС в оценке подлинности ЛРС [33,56,107,130,152]. Интерпретация спектров, продолжает оставаться в данном случае достаточно сложной задачей, т.к. ИК-спектр ЛРС, представляет собой суммарный спектр, в котором происходит наложение полос поглощения различных функциональных групп природных БАВ [111].

Согласно выдвинутой научной гипотезе вид полученных ИК-спектров изучаемого ЛРС покажет наличие полос поглощения, характерных для определенных групп БАВ, а также позволит установить образование межмолекулярных комплексов БАВ и термодинамические характеристики их связей. Вид полученных спектров представлен на Рисунке 71 [111].

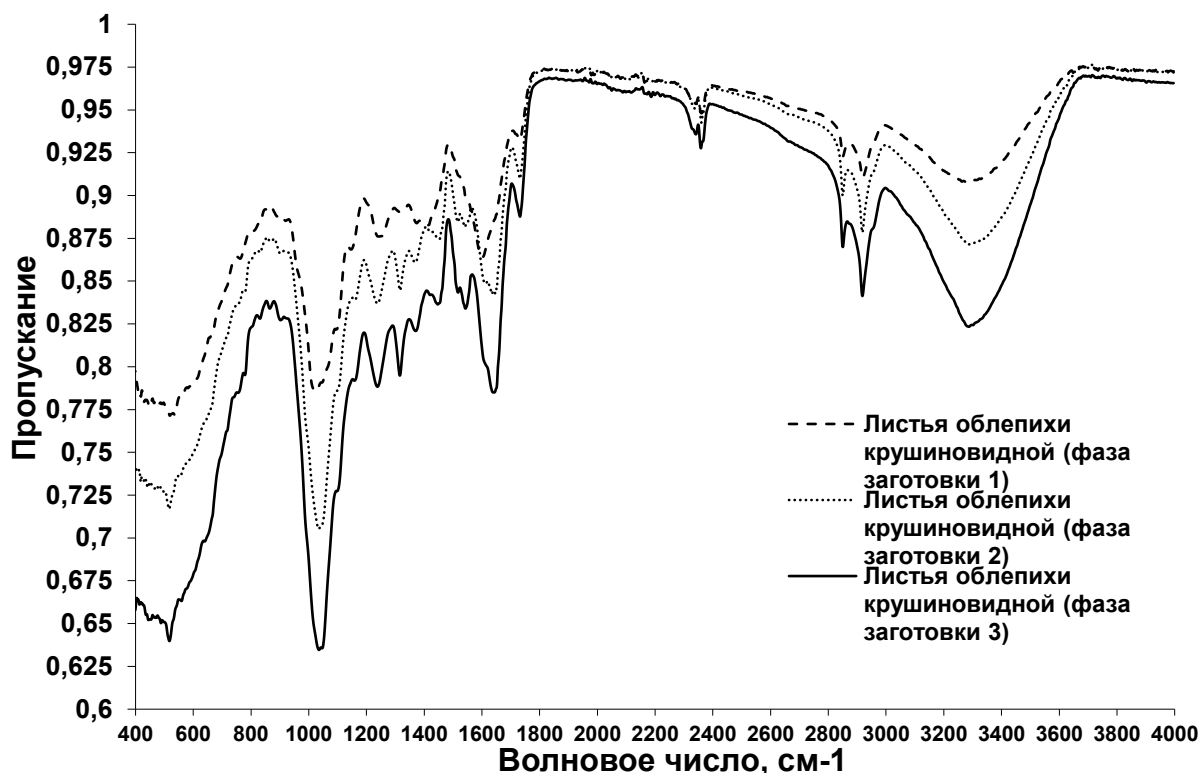


Рисунок 71 – Вид ИК-спектров листьев облепихи крушиновидной

При сравнении спектров изучаемых образцов листьев обнаружено их значительное сходство в области валентных и деформационных колебаний. Полосы сильной и средней интенсивности при 2960-2850; 1750-1730; 1460-1410; 1380-1300 см^{-1} (Таблица 55) указывают на присутствие в сырье ароматических фенольных соединений. Симметричные и асимметричные колебания валентных связей С-О-С-группы в составе гликозидов флавоноидов, лейкоантоцианов и галлотанинов представлены полосами поглощения в области частот 1280-1010 см^{-1} [17,43,65,78,91,140]. Наличие многочисленных фенольных соединений в листьях, обуславливающих их биологическую ценность, подтверждается также не только полосой поглощения при 1174-1161 см^{-1} , характерной для деформационных колебаний свободной ОН-группы фенола, но и одновременным присутствием двух полос при частотах 1270-1140 и 1410-1310 см^{-1} . ОН-группы, как спиртовые, так и фенольные определили на полученных спектрах группу полос в интервале частот 995-890 см^{-1} . Анализ спектров показывает, что практически у всех исследуемых фаз заготовки сырья с различной степенью интенсивности присутствуют полосы

поглощения в указанных диапазонах частот (Таблица 55, Рисунок 71 и 72). Четко прослеживается тенденция к снижению величины светопропускания, а, следовательно, росту оптической плотности, на спектрах листьев от ранней к более поздней стадиям заготовки сырья, что может объясняться накоплением БАВ по мере жизни листовой пластинки. Вид спектров изучаемого сырья в области «отпечатков пальцев» (ниже 1500 см^{-1}) показывает идентичность спектров между собой и может быть использован в качестве подтверждающего идентификацию сырья способа, наряду с внешними и микродиагностическими признаками (Рисунок 72) [111].

Таблица 55 – Характеристические частоты поглощения в полученных ИК-спектрах изучаемых образцов листьев

Диапазон частот	Фенологическая фаза			Интенсивность*	Функциональная группа	Тип колебаний
	1	2	3			
$\nu, \text{ см}^{-1}$ (на спектрах)						
3600-3200	3290	3280	3288	С.	Фенольный гидроксил в межмолекулярных водородных связях	валентные колебания О-Н 3400-3200 (полиассоциаты)
2960-2850	2922 2852	2918 2850	2918 2850	С.	С-CH ₃ С-CH ₂	валентные колебания связей
1750-1730	1731	1731	1732	Ср.	-HC=CH-	валентные колебания связи С=C ароматического ядра
1680-1600	- 1602	1645 1608	1637 -	С.	(NH ₃ ⁺)	деформационные, аминокислотная полоса I
1556-1510	- -	- 1541	1517 1543	Ср.		деформационные, аминокислотная полоса II
1460-1410	1413	1454	1444	Ср.	С-CH ₃ С-CH ₂	асимметрические деформационные колебания групп

Продолжение Таблицы 55

1380-1300	1319 1375	1317 1371	1315 1371	Ср.		симметрические деформационные колебания групп
1280-1010	1245 1147 1091	1240 1157 1035	1240 1161 1031	Ср. Ср. С.	С-ОН	симметрические и ассиметрические колебания валентных связей С-О
918-912	919	904	902	Сл.	-С-О-С-	эфирь
840-800	894 -	864 833	866 831	Сл.	=СН -С=C- (цис-)	деформационное, =С-Н валентное, СН
750-720	761	777 759	-	Сл.	С-Н	деформационное, - С-Н
-	536 447	514 -	518 -	-	-	-
Примечание: * - (С. – сильная; Ср. – средняя; Сл. – слабая).						

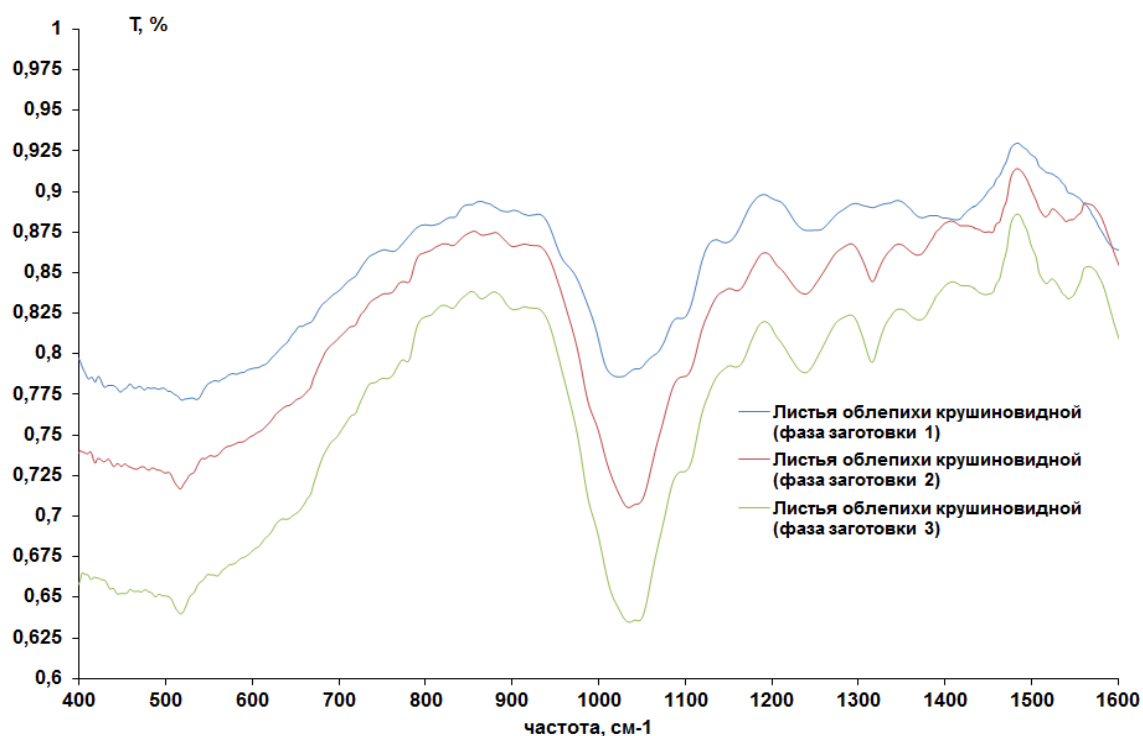


Рисунок 72 – Вид ИК-спектров листьев облепихи крушиновидной в области «отпечатков пальцев»

Полифенольные соединения листьев облепихи крушиновидной (Рисунок 72), по данным ИК-спектров [17,43], образуют межмолекулярные водородные связи, т.к. полосы поглощения расположены в интервале $3400-3200\text{ см}^{-1}$, что характерно для

валентных колебаний группы –ОН в составе полиассоциатов вовлеченных в водородные связи. При обсчете данных спектров (Рисунок 71) вычислены термодинамические характеристики [17,33,56,152] выявленных связей, таких как энергия (E_H) и длина (R), которые представлены в Таблице 56. Причем при заготовке листьев в период конца августа – начала сентября, данная полоса также имеет наибольшую интенсивность. Сами связи в межмолекулярных комплексах полифенолов, согласно данным авторов [17,33,56,152], следует отнести к типу сильных, так как энергия их превышает 5 ккал/моль, а длина около 2,7 Å [111].

Таблица 56 – Термодинамические характеристики межмолекулярных водородных связей фенольных БАВ в листьях изучаемых растений по данным ИКС

Образцы листьев	Частота, см ⁻¹	$\Delta \nu,^*$ см ⁻¹	E_H		$R, \text{Å}$
			кДж/моль	ккал/моль	
Фаза завязывания плодов, июнь (фаза 1)	3290	410	29,01	6,93	2,747
Фаза единичного созревания плодов, июль (фаза 2)	3280	420	29,68	7,09	2,745
Фаза массового созревания плодов, конец августа – сентябрь (фаза 3)	3288	412	29,14	6,96	2,747

Согласно литературным данным преобладающими группами БАВ в листьях облепихи крушиновидной [186] и нашим собственным исследованиям [51,83], являются вещества полифенольной природы (дубильные вещества гидролизуемой группы, флавоноиды и лейкоантоциановые, соединения). Методом ИК–спектроскопии установлено, что молекулы БАВ полифенольной природы в изучаемом ЛРС взаимодействуют между собой с образованием полиассоциатов посредством водородных связей [111].

Дальнейшее накопление данных по ИК-спектрам листьев, заготовленных на различных территориях, от различных сортов и на разных сроках заготовки позволит проводить оценку подлинности сырья в дополнении к морфологии и анатомии. А также накопление многолетних данных по соотношению интенсивности полос поглощения с результатами количественного содержания целевых БАВ в сырье будет способствовать развитию и повсеместному внедрению неразрушающих методов оценки готовности ЛРС к заготовке [111].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Содержание минеральных и органических примесей в листьях облепихи крушиновидной составляло $0,20 \pm 0,02\%$ и $0,50 \pm 0,05\%$ соответственно. Согласно полученным результатам предложены критерии для показателя «минеральные примеси» - не более 0,5 %, «органические примеси» - не более 1 % (Приложение А).

2. Проведено качественное определение состава БАВ листьев облепихи крушиновидной, подтверждено наличие следующих групп веществ: флавоноиды, дубильные вещества, аскорбиновая кислота, полисахариды (слизи), спирторастворимые сапонины, аминокислоты, органические кислоты, лейкоантоцианы, витамины группы В, лейкоантоцианы и др.

3. По результатам исследований вода очищенная и спирт этиловый 70% являются оптимальными экстрагентами для выделения суммы ЭВ. На основании полученных результатов предложены критерии качества для стандартизации листьев облепихи крушиновидной (содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 70% - не менее 30%; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 25%).

4. Проведён качественный и количественный анализ БАВ листьев облепихи крушиновидной различными физико-химическими методами. Компонентный состав липофильной фракции установлен методом ГХ-МС. Состав свободных и связанных аминокислот, свободных органических кислот и витаминов группы В установлен методом КЭ.

5. Проведена разработка и валидация методик количественного определения БАВ в листьях облепихи крушиновидной: флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот, каротиноидов и хлорофиллов, антоцианов.

6. Методом ТСХ проведено разделение флавоноидов, аминокислот, дубильных веществ и пигментов листьев облепихи крушиновидной.

7. Разработан способ интенсификации процесса экстракции основной целевой группы БАВ из листьев – флавоноидов. Применение метода озвучивания позволило сократить время экстракции, снизить в 2 раза расход экстрагента и энергозатраты в условиях производства, а также увеличить выход флавоноидов на 30%.

8. Исследована динамика накопления различных групп БАВ в листьях облепихи крушиновидной. Листья облепихи накапливали 0,8–1,5% флавоноидов; от 7 до 9% (в пересчёте на кислоту галловую) и от 3 до 4% (в пересчёте на танин) суммы дубильных веществ; от 1,8 до 2,3% лейкоантоциановых соединений.

9. Рекомендованы оптимальные сроки для заготовки листьев облепихи крушиновидной – период массового плодоношения (фенофаза 3 – конец августа – начало сентября) с учетом совокупности таких факторов как: незначительная вариабельность содержания таннинов, как основного фармакокофорного компонента листьев для производства ЛРП «Гипорамин» и сохранение возможности накопления ценных БАВ в фармакопейном сырье растения – плодах, также широко используемых для промышленного производства ЛРП. Содержание же целевых групп БАВ фенольной природы для листьев облепихи крушиновидной, заготовленных на территории Центрального Черноземья (на примере Воронежской области), на данном этапе также можно считать высоким (флавоноидов – не менее 0,5%, а при использовании УЗ-экстракции – не менее 1,0%; дубильных веществ – не менее 6% (в пересчете на кислоту галловую) и не менее 3% (в пересчете на танин); лейкоантоциановых соединений – не менее 1,5%).

10. С применением нескольких методов проведено определение АОА извлечений из листьев облепихи крушиновидной, заготовленных в различные периоды развития. Наибольшие показатели были характерны для сырья фенофазы, соответствующей периоду полного созревания плодов. В результате анализа корреляции полученных значений АОА с содержанием природных антиоксидантов таких как аскорбиновой кислоты, лейкоантоцианов, каротиноидов, дубильных веществ и флавоноидов в листьях выявлено, что антиокислительный эффект в

большой степени определяется накоплением в них аскорбиновой кислоты и каротиноидов.

11. Результаты представленных в главе исследований легли в основу подготовки проекта ФС «Облепихи крушиновидной листья» для ГФ РФ (Приложение А).

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЖИДКИХ ВОДНЫХ И ВОДНО-СПИРТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ

6.1. Прогноз фармакологической активности биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной *in silico*

Несмотря на наличие на фармацевтическом рынке РФ зарегистрированного ЛРП на основе очищенной фракции галло-эллаготанинов листьев с доказанной противовирусной активностью [13,66,71,92,95,117,154], продолжают активно развиваться исследования по оценке других видов фармакологической активности комплекса БАВ [40-41,47,51-53,55,83,86,90,110-112,115,136].

In silico оценка фармакологических свойств БАВ изучаемого сырья проводилась с помощью доступных интернет-ресурсов PASS-online и Phyto4Health (Глава 2, п. 11). На первом этапе работы с помощью интернет ресурса PASS-online проведен прогноз возможных фармакологических и токсических эффектов основных БАВ полифенольного комплекса листьев облепихи крушиновидной, перечень которых составлен на основании известных опубликованных данных профессора Самылиной И.А. с соавторами [8] – кверцетин, нарциссин, рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, стриктинин I, изостриктинин, казуариктин, казуаринин (Приложение E, Таблицы E.1 и E.2).

Прогнозируется, что 3 вещества из выбранного перечня (37,5% веществ), такие как кверцетин, рутин и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина с максимальной долей вероятности ($P_a > 0,9$) являются ингибиторами проницаемости мембран и при этом агонистами целостности мембраны. Следует предположить, что мембранопротекторный эффект может являться одним из основных механизмов реализации многих фармакологических эффектов, особенно

таких как прогнозируемые с высокой вероятностью и описанные далее гепатопротекторный, кардиопротекторный и вазопротекторный эффекты.

Установлено, что подавляющее большинство выбранных БАВ (75% веществ) листьев облепихи крушиновидной, в т.ч. такие как кверцетин, рутин, стриктинин I и изостриктинин, казуариктин и казуаринин с высокой долей вероятности ($P_a > 0,7$) проявляют противовоспалительную активность, которая может быть патогенетически взаимосвязана с антиоксидантным действием, вероятным для тех же веществ (75% веществ из перечня) и хорошо известным по литературным данным [90,137,161,165]. Вяжущий эффект, прогнозируемый для 1 вещества (кверцетин), может так же вносить определенный вклад в обеспечение противовоспалительного действия при местном контакте с кожными покровами и слизистыми оболочками. В связи с вышеизложенным, именно противовоспалительная активность была выбрана для проведения дальнейших доклинических исследований *in vivo*, выполненных на следующем этапе.

Большинство БАВ (87,5%) листьев облепихи крушиновидной с достаточно высокой вероятностью ($P_a > 0,7$) проявляют гепатопротекторную активность, механизмами которой, как известно, могут являться прогнозируемые с высокой вероятностью упомянутые выше антиоксидантные, противовоспалительные и мембранопротекторные механизмы. Определенную терапевтическую ценность при заболеваниях печени, желчного пузыря и желчевыводящих путей может иметь так же слабительный эффект, прогнозируемый для 2 веществ (25% веществ из перечня) – рутина и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина. Следовательно, перспективно изучение возможности применения извлечений из листьев облепихи крушиновидной в составе комплексной терапии заболеваний печени и желчевыводящих путей.

Кардиопротекторная активность высоко вероятна ($P_a > 0,8$) для 62,5% БАВ, в т.ч. для кверцетина, рутина и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина. Важно, что при этом вероятны так же связанные фармакологические эффекты, такие как вазопротекторный (для 37,5% БАВ), сосудорасширяющий, прогнозируемый для 1 вещества – рутин (12,5%), а также антигиперхолестеринемический эффект,

прогнозируемый с максимальной вероятностью для рутина ($P_a=0,900$), что позволяет рассматривать извлечения из листьев облепихи крушиновидной в качестве перспективного компонента в составе комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Однако, при этом возможно влияние на систему гемостаза, а именно для 37,5% БАВ, таких как кверцетин, рутин и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, прогнозируется кровоостанавливающий эффект, что требует обязательного подтверждения данными клинико-лабораторных исследований и наряду с потенциальной терапевтической ценностью может напротив являться нежелательным при применении в терапии сердечно-сосудистых заболеваний из-за риска тромбообразования.

Противоинфекционный эффект (без уточнения перечня возбудителей) прогнозируется для четверти веществ из перечня выбранных БАВ (25%), таких как рутин и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, для этих же веществ прогнозируется противогрибковый ($P_a > 0,7$), антипротозойный ($P_a > 0,9$) и противовирусный (грипп) ($P_a > 0,7$) эффекты, кроме того антибактериальный эффект прогнозируется для 1 вещества (12,5%) – рутина. Высокая вероятность прогноза противоинфекционной, и в частности противовирусной активности, согласуется с известными литературными данными, согласно которым экстракт из листьев облепихи, а именно полифенольный комплекс в составе лекарственного препарата «Гипорамин», оказывает противовирусное действие, что используется в клинической практике для лечения и профилактики ОРВИ и гриппа [10]. Отдельно для 62,5% веществ прогнозируется применение с целями химиопрофилактики, следовательно, можно предположить перспективность применения БАВ из листьев облепихи крушиновидной для системного и местного применения при лечении и профилактике инфекционных заболеваний различной этиологии.

Определенный интерес вызывает тот факт, что все перечисленные БАВ (100%) с высокой вероятностью ($P_a > 0,7-0,9$) проявляют противоопухолевую активность и смежные, синонимичные виды активности, такие как антиканцерогенная, прогнозируемая для 50% веществ и цитостатическая

активность для 62,5% веществ. Отдельный вклад в механизмы данных видов активности может вносить иммунодепрессивный эффект, прогнозируемый для 50% веществ и, возможно, антимуtagenное действие, прогнозируемое с высокой вероятностью ($P_a > 0,9$) для 1 вещества (12,5%) – кверцетина. Потенциально полезным при сочетанной химиотерапии и лучевой терапии может представляться и радиопротекторное действие, прогнозируемое для 1 вещества (12,5%) из перечня – рутина. Однако, важно подчеркнуть, что несмотря на высокую вероятность прогноза, применение извлечений из данного ЛРС в фармакотерапии онкологических заболеваний требует особенно тщательного подтверждения и обоснования.

Проведено прогнозирование токсических эффектов выбранного перечня БАВ, содержащихся в листьях облепихи крушиновидной, результаты представлены в Таблице Е.2 (Приложение Е). Токсичность без уточнения органотропности прогнозируется для 62,5% веществ из выбранного перечня БАВ листьев, в т.ч. рутина, стриктинина I и изостриктинина, казуариктина и казуаринина. Наименьшее число вероятных токсических эффектов прогнозируется для таких веществ как нарциссин (1 наименование из перечня токсических эффектов – гипотензия) и кверцетин (4 наименования, в т.ч. гематотоксичность, сосудистая токсичность, отрицательное влияние на эндокринную систему и репродуктивная дисфункция). Наибольшее число вероятных токсических эффектов прогнозируется для вещества стриктинин I (32 наименования, в т.ч. нейротоксичность, гематотоксичность, отрицательное влияние на сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечная токсичность, репродуктивная токсичность и канцерогенность).

Нейротоксические эффекты прогнозируются для 75% БАВ, таких как рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, стриктинин I и изостриктинин, казуариктин и казуаринин. Следует отметить, что наибольший перечень нейротоксических эффектов прогнозируется за счет вещества стриктинин I – 7 наименований, в т.ч. такие как боль, нарушение сна, сонливость, поведенческие расстройства, атаксия, дискинезия, мышечная слабость, все – с достаточной

вероятностью ($P_a > 0,7$). Для 37,5% БАВ прогнозируется офтальмотоксичность, для 1 вещества (казуаринин) конъюнктивит.

Для 87,5% веществ прогнозируется гематотоксический эффект, анемия (для вещества стриктинин I), тромбоцитопения (7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина и стриктинин I).

Отрицательное влияние на функции сердечно-сосудистой системы вероятно не менее чем для половины БАВ (50%) из выбранного перечня. Гиперхолестеринемический эффект прогнозируется для 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина. Интересно, что гипертонический эффект наряду с гипотензией прогнозируется для стриктинина I, что может свидетельствовать скорее о его регулирующем влиянии на сосудистый тонус.

Бронхоконстрикторным действием вероятно обладают половина БАВ (50%) из выбранного перечня, такие как стриктинин I, изостриктинин, казуариктин, казуаринин. Вероятность одышки прогнозируется для стриктинина I.

Желудочно-кишечная токсичность вероятна для 75% БАВ из выбранного перечня, ни одного из ее проявлений не прогнозируется только для кверцетина и нарциссина. Для всех остальных веществ вероятны гепатотоксический эффект, диарея, потеря веса, рвотный эффект, тошнота, стоматит. Следует отметить, что диарея, рвотный эффект и тошнота могут быть связаны с прокинетическим действием, и помимо отрицательного значения вероятно могут вносить свой вклад в реализацию терапевтически потенциально полезного слабительного эффекта, прогнозируемого для рутина и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина (Приложение E, Таблица E.2). Наибольший перечень проявлений гастроинтестинальной токсичности (6 наименований) прогнозируется для вещества стриктинин I.

Для 37,5% веществ (рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, изостриктинин) *in silico* вероятен нефротоксический эффект.

Риск провоспалительных эффектов возможно для половины (50%) БАВ листьев облепихи крушиновидной, прогноз *in silico* не уточняет характера таких изменений, однако, по аналогии с побочными эффектами ЛРС следует

предположить местный характер таких проявлений в зоне нанесения на кожу и слизистые оболочки. Для стриктинина I с высокой долей вероятности ($P_a > 0,8$) прогнозируется так же дерматит и воспаление.

Ацидоз прогнозируется для стриктинина I и казуариктина.

Для 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина предполагается гипотермический эффект, при этом интересно, что противовоспалительный эффект для данного вещества не прогнозируется, что может свидетельствовать о центральном, и, вероятно, нециклооксигеназном механизме его действия.

Репродуктивная дисфункция вероятна для 62,5% БАВ (кроме нарциссина, изостриктинина и казуаринина). Для рутина, помимо этого, возможно нарушение функции эндокринной системы. Эмбриотоксичность и тератогенность прогнозируется для 50% БАВ (рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, стриктинин I, изостриктинин). Генотоксичность и канцерогенность – для вещества стриктинин I.

Важно подчеркнуть, что приведенный анализ перечня фармакологических и токсических эффектов *in silico* является именно и только лишь количественным прогнозом вероятности проявления того или иного эффекта БАВ, позволяя оптимизировать затраты времени и ресурсов для более избирательного проведения доклинических исследований *in vitro*, *in vivo* и, в перспективе, клинических исследований, но не является их заменой.

Проведенный анализ и систематизация данных позволяют считать наиболее перспективными изучение противовоспалительной, гепатопротекторной, кардиопротекторной, а так же антибактериальной и противогрибковой активности, что открывает перспективы для дальнейших доклинических и клинических исследований с целью расширения перечня показаний к применению извлечений из листьев облепихи крушиновидной в клинической практике [143].

6.2. Оценка противовоспалительной активности *in vivo*

На следующем этапе исследования в качестве одного из наиболее вероятных и перспективных фармакологических эффектов для изучения в первичных скрининговых исследованиях выбрано противовоспалительное действие (на примере отвара листьев 3 фазы заготовки, как рекомендованной в подготовленном проекте ФС, а также допустимой разработчиком для использования при производстве существующего на фармацевтическом рынке РФ ЛРП «Гипорамин»). Оценку противовоспалительной активности проводили *in vivo* в условиях вивария кафедры фармакологии и клинической фармакологии фармацевтического факультета ВГУ по известной методике (Глава 2, п. 11).

При проведении доклинических исследований установлено, что в процессе эксперимента масса тела животных всех групп на 7 сутки незначительно увеличилась по сравнению с исходной не более чем на 5,5%, не имея достоверных различий между группами, что соответствует параметрам нормы для взрослых здоровых животных, свидетельствуя об отсутствии отрицательного влияния краткосрочного курсового применения комплекса БАВ отвара листьев на аппетит, функции ЖКТ и общее клиническое состояние животных. Данные приведены в таблице (Таблица 57) [143].

Таблица 57 – Результаты изменения массы тела животных в динамике

Масса тела, г	Контрольная группа	Настой цветков ромашки	Отвар листьев облепихи
Исходная (1 сут.)	225,67±4,097		
Конечная (7 сут.)	237,71±6,837	238,00±8,696	237,14±5,124
Разница с исходным, %	+5,3	+5,5	+5,1

Установлено, что у животных контрольной группы на фоне модельного воздействия флоггена через 1 ч после введения формалина выявлено значительное

достоверное увеличение объёма конечности на 30,2%, и через 3 ч – на 57,9% (Таблица 56), что свидетельствовало о развитии отека лапы крыс, как проявления местного воспалительного процесса. В опытной группе (препарат сравнения) у животных, получавших ежедневно перорально 7 сут. настой цветков ромашки, отек лапы через 1 ч составил 39,5% (эффективность отсутствует), через 3 ч – 50,5%, что лишь незначительно меньше на 7,4% по сравнению с контролем (эффективность 7,4%).

В опытной группе (изучаемый экспериментальный препарат) у животных, получавших ежедневно перорально 7 сут. отвар листьев облепихи отек лапы через 1 ч составил 24,7%, что на 5,5% меньше, чем в контроле (эффективность 5,5%), через 3 ч – отек лапы составил 21,9%, что значительно, достоверно ($P < 0,001$) на 36,0% меньше по сравнению с контролем (эффективность 36,0%). Результаты определения выраженности отёка лапы крыс приведены в Таблице 58.

Таким образом, на фоне краткосрочного в течение 7 сут. курсового перорального применения отвара листьев облепихи крушиновидной выявлено значительное, достоверное снижение выраженности отёка лапы крыс, максимальная эффективность достигается через 3 ч после введения флогогена составляя 36,0%, что превышало эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки) [143].

Таблица 58 – Результаты определения выраженности отёка лапы крыс

Показатель	Контрольная группа	Препарат сравнения	Водное извлечение из листьев облепихи
Объём лапы крыс, исходный, см ³	1,03±0,027		
Объём лапы крыс, через 1 ч, см ³	1,34±0,024 ⁺⁺⁺	1,44±0,053 ⁺⁺⁺	1,29±0,033 ⁺⁺⁺
Объём лапы крыс, через 3 ч, см ³	1,63±0,046 ⁺⁺⁺	1,55±0,046 ⁺⁺⁺	1,26±0,042 ^{+++,*}
Отёк лапы крыс, через 1 ч, разница с исходным, %	+30,2	+39,5	+24,7
Отёк лапы крыс, через 3 ч, разница с исходным, %	+57,9	+50,5	+21,9

Продолжение Таблицы 58

Эффективность (разница с контролем, 1 ч), %	-	-	5,5
Эффективность (разница с контролем, 3 ч), %	-	7,4	36,0
Примечание: + - P<0,05; ++ - P<0,01; +++ - P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями с исходными значениями; * - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями.			

Известно, что согласно ранее опубликованным данным исследований, проведённых в той же лаборатории ФГБОУ ВО ВГУ по идентичной методике, препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 8,0 мг/кг однократно внутримышечно за 1 ч до введения формалина, достоверно снижал выраженность отёка лапы через 1 ч на 13,8%, а через 3 ч – на 30,1% по сравнению с контрольной группой [27,158]. Следует предположить по аналогии, что противовоспалительная активность комплекса БАВ отвара листьев облепихи при краткосрочном курсовом применении внутрь в течении 7 сут., проявляющаяся как уменьшение отека лапы через 3 ч на 36,0% по сравнению с контролем, сопоставима по выраженности с эффективностью диклофенака натрия, при этом ввиду перорального способа введения действие развивается постепенно, достигая максимума через 3 ч.

В результате эксперимента не выявлено значимого влияния отвара листьев облепихи крушиновидной на ректальную температуру тела животных, показатели во всех группах находились в пределах видово-возрастной нормы (Таблица 59).

Таблица 59 – Результаты термометрии

Показатель	Контрольная группа	Препарат сравнения	Водное извлечение из листьев облепихи
Температура тела крыс, исходная, °С	39,02±0,106		
Температура тела крыс, через 1 ч, °С	38,74±0,157	38,86±0,095	38,84±0,107
Температура тела крыс, через 3 ч, °С	38,09±0,338	38,43±0,187	38,50±0,212

В исследованиях *in vivo* на модели отека лапы крыс доказано, что отвар листьев облепихи крушиновидной при краткосрочном (7 сут.) курсовом

пероральном применении в дозе 10 мл/кг (235 мг/кг из расчета по сухому остатку) проявляет достаточный противовоспалительный эффект, обеспечивая значительное, достоверное снижение выраженности отёка лапы крыс, максимально через 3 ч после введения флогогена на 36,0% по сравнению с контролем, что превышает эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки) [143].

6.3. Получение и стандартизация жидких водных и водно-спиртовых лекарственных форм на основе листьев облепихи крушиновидной

Для исследования дополнительных возможных путей внедрения изучаемого сырья в практическую фармацию, а также расширения ассортимента отечественных ЛРП, содержащих комплекс БАВ листьев, на следующем этапе работы были получены опытные образцы жидких водных и водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной – отвар, настойка и экстракт жидкий (Глава 2, п. 12). С целью оценки полученных ЛФ в рамках принципа сквозной стандартизации в цепочке ЛРС – фармацевтическая субстанция растительного происхождения – ЛРП, осуществлена разработка методик количественного определения одной из основных целевых групп БАВ, обуславливающих в т.ч. показанную противовоспалительную активность - флавоноидов [49].

Для корректного получения отвара предварительно экспериментально определяли коэффициент водопоглощения сырья, который составил 2,4. Все исследуемые извлечения готовили из листьев 3 фазы развития, выбранной ранее в качестве рекомендуемой по результатам комплексного фитохимического исследования для заготовки (Глава 5).

Полученные в лабораторных условиях образцы извлечений подвергали стандартизации по показателям, изложенным в соответствующих ОФС ГФ РФ XV [22].

В исследуемых извлечениях проводили количественное определение флавоноидов, как целевой группы БАВ для чего разрабатывались методики.

Методики определения суммы флавоноидов в водных и водно-спиртовых в пересчете на лютеолин: указанный объем ЛФ (A , мл) помещали в мерную колбу вместимостью V мл, прибавляли 5 мл 5% спиртового (70%) раствора алюминия хлорида, оставляли на 10 минут и далее прибавляли 1 мл кислоты уксусной 3% (Таблица 60). Полученный раствор доводили до метки спиртом этиловым 70%, перемешивали и оставляли на 30 минут при дневном освещении (исследуемый раствор). Жидкий экстракт предварительно разводили в пять раз спиртом этиловым 70% ввиду очень высокого содержания БАВ. Параллельно готовили раствор сравнения аналогично испытуемому раствору без добавки аликвоты раствора алюминия хлорида. Через 30 минут измеряли оптическую плотность исследуемых растворов на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно соответствующих растворов сравнения. Вид полученных спектров поглощения приведен на Рисунке 73. Содержание суммы флавоноидов (X , %) в пересчёте на лютеолин в полученных образцах ЛФ вычисляли по формулам:

Для настоя и настоек:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times a \times l},$$

Для жидкого экстракта:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times 5}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times a \times l}$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения лютеолина в комплексе с алюминия хлоридом, равный 549,41; a - объем ЛФ, взятый для определения, мл; l – толщина слоя в кювете, см.

Таблица 60 – Обобщенные данные по методикам количественного определения суммы флавоноидов в полученных водных и водно-спиртовых ЛФ

Образец ЛФ	Приготовление испытуемого раствора		Приготовление раствора сравнения	
	А, мл	В, мл	А, мл	В, мл
Отвар (1:10)	2,0	100	2,0	100
Настойка (метод мацерации)	1,0	100	1,0	100
Настойка (метод дробной мацерации)	1,0	100	1,0	100
Настойка (метод реперколяции)	1,0	100	1,0	100
Жидкий экстракт (1:1)	1,0	100	1,0	100

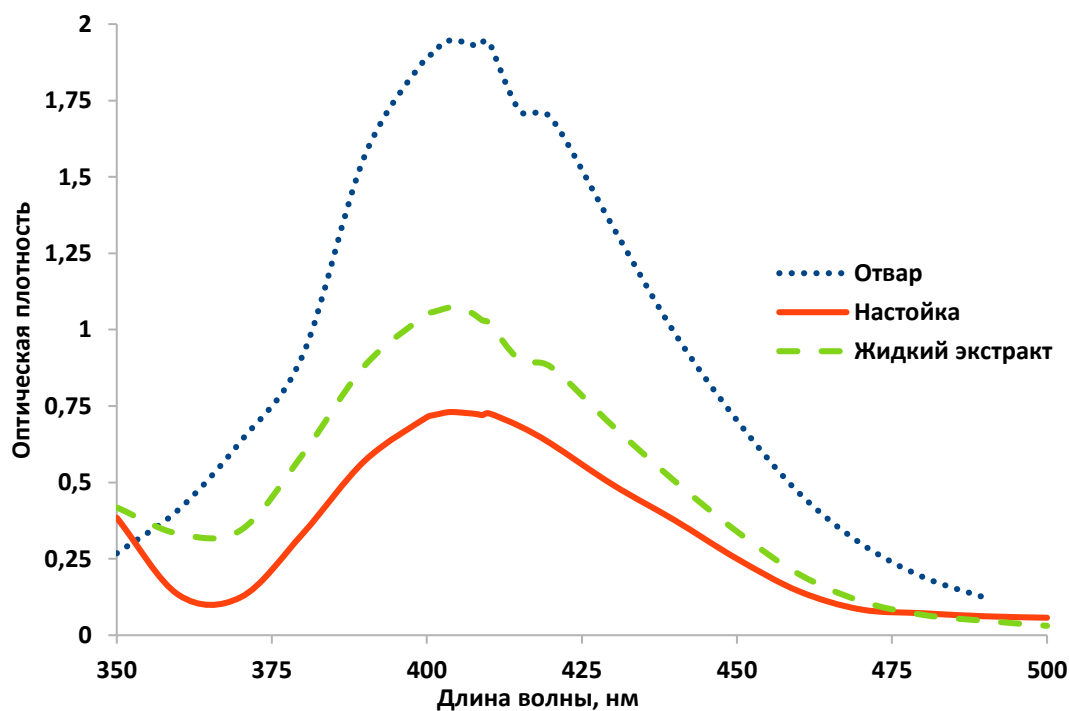


Рисунок 73 – Вид дифференциальных спектров поглощения полученных водных и водно-спиртовых ЛФ с добавкой алюминия хлорида

Результаты стандартизации изучаемых жидких водных и водно-спиртовых опытных лабораторных образцов ЛФ приведены в Таблице 61. Содержание флавоноидов максимально в экстракте жидком (1:1), минимально в отваре.

Таблица 61 – Результаты стандартизации водных и водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной

Показатель	Отвар	Настойка (простая мацерация) 1:5	Настойка (дробная мацерация) 1:5	Настойка (перколяция) 1:5	Экстракт жидкий 1:1
Описание	Зеленовато-бурая жидкость с ароматным специфическим запахом. Вкус горький, вяжущий	Непрозрачная, опалесцирующая, коричневато-зелёная жидкость со специфическим характерным запахом			Непрозрачная, опалесцирующая, черно-коричневая жидкость с сильным специфическим характерным запахом
Сухой остаток	2,65%	3,77%	4,76%	3,93%	18,17%
рН водного извлечения	5,662	-	-	-	-
Спирт этиловый, об. %	-	64,0	62,27	60,0	67,0
Тяжелые металлы	-	Не более 0,001%			Не более 0,01%
Сумма флавоноидов, %	0,052± 0,003	0,094± 0,004	0,128± 0,003	0,132± 0,001	0,489±0,002

По показателю «Сухой остаток» наибольшее количество экстрактивных веществ среди настоек содержится в настойке, полученной методом дробной мацерации. Жидкий экстракт демонстрировал самый высокий выход БАВ. Содержание тяжелых металлов не превышало нормативов, рекомендованных в ОФС «Настойки» и «Экстракты» ГФ РФ [22].

Исследование флавоноидного состава анализируемых извлечений осуществлено методом ТСХ по методике, описанной для ЛРС (Глава 5, п. 5.3.1.1). Вид хроматограмм, полученных при нанесении 10 мкл отвара, приведен на Рисунке 74, параметры эффективности разделения – в Таблице 62.

Таблица 62 – Параметры эффективности хроматографического разделения флавоноидов исследуемых водных и водно-спиртовых извлечений из листьев облепихи крушиновидной

№ зоны	Отвар (10 мкл)			Настойка (1 мкл)			Жидкий экстракт (1 мкл при разведении 1:5)		
	$R_f \pm 0,02$	α^*	R^{**}	$R_f \pm 0,02$	α^*	R^{**}	$R_f \pm 0,02$	α^*	R^{**}
1	0,04	26,78	2,11	0,02	49,00	3,13	0,02	49,00	2,58
2	0,07	12,70		0,06	15,67		0,05	19,00	
3	0,20	3,90	3,26	0,18	4,56	3,44	0,16	5,25	3,62
4	0,26	2,85	1,37	0,24	3,17	1,44	0,22	3,55	1,48
5	0,29	2,45	1,16	0,29	2,45	1,29	0,28	2,57	1,38
6	0,33	2,03	1,21	0,33	2,03	1,21	0,32	2,13	1,21
7	0,35	1,86	1,09	-	-	-	-	-	-
8	0,39	1,56	1,19	0,37	1,70	1,19	0,39	1,56	1,37
9	0,42	1,38	1,13	0,42	1,38	1,23	0,42	1,38	1,13
10	0,50	1,00	1,38	0,51	0,96	1,44	0,50	1,00	1,38
11	0,54	0,85	1,18	-	-	-	-	-	-
12	0,68	0,47	1,81	0,67	0,49	1,96	0,68	0,47	2,13
13	0,90	0,11	4,27	0,90	0,11	4,45	0,90	0,11	4,27
14	0,98	0,02	3,67	0,98	0,02	5,50	0,98	0,02	5,50

Примечание: α^* – селективность разделения; R^{**} – разрешение двух хроматографических зон [17,18].

В ранее подобранных для исследования состава флавоноидов в сырье условиях, при анализе полученных водных и водно-спиртовых опытных лабораторных образцов ЛФ также наблюдается удовлетворительное разделение зон на хроматограммах (коэффициент разрешения двух рядом расположенных хроматографических зон), больше 1,0 (Таблица 62). На хроматограммах отвара из листьев облепихи в УФ-свете при нанесении 10 мкл после проявления 10% спиртовым раствором NaOH или 5% спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдали 14 зон флавоноидной природы, так как имели характерное свечение в УФ-свете [58,137]. Зона со значением величины $R_f=0,99 \pm 0,01$ относится к хлорофилловым соединениям (зеленая окраска в видимом свете и розовая – в УФ-свете).

При апробации методики для настоек (1:5), установлено, что оптимальным объемом пробы следует считать 1-3 мкл, а вид хроматографического профиля не зависит от способа получения (мацерация, дробная мацерация или перколяция). На

хроматограммах наблюдали 12 зон, в т.ч. зона хлорофилловой природы, а также неидентифицированные зоны группы флавоноидов. Вид хроматограмм, полученных при нанесении 1-3 мкл настойки, приведен на Рисунке 74, параметры эффективности разделения – в Таблице 62.

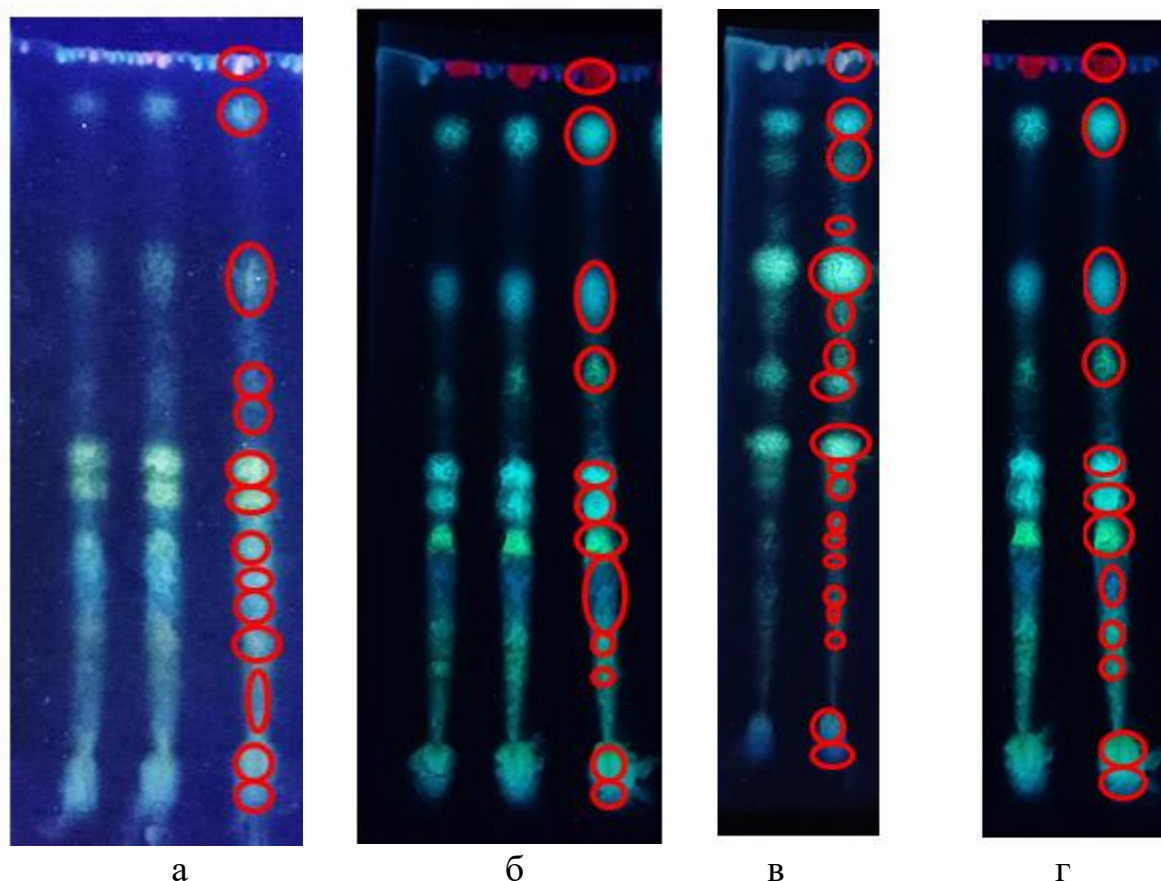


Рисунок 74 – Вид хроматограмм, полученных при нанесении: а - 10 мкл отвара; б - 1-3 мкл настойки; в - 1 мкл жидкого экстракта, г – 3 мкл жидкого экстракта, разведенного предварительно в 5 раз

Применение ТСХ-методики для жидкого экстракта (1:1), показало, что при нанесении 1 мкл, вид хроматографического профиля флавоноидов полностью был идентичен профилю сырья. На хроматограммах наблюдали 19 зон, в т.ч. зона хлорофилловой природы, а также 18 зон группы флавоноидов. Однако зоны расположены плотно друг за другом, что может затруднить оценку. При разведении экстракта в 5 раз спиртом этиловым 70%, наблюдали 12 зон, в т.ч. зона хлорофилловой природы, а также 11 зон группы флавоноидов. Вид хроматограмм,

полученных при нанесении 1 мкл экстракта и 1-3 мкл разведенного экстракта, приведен на Рисунке 74, параметры эффективности разделения – в Таблице 62.

По каждому виду полученных опытных лабораторных образцов ЛФ составлен материальный баланс по действующим веществам (Таблица 63), отражающий эффективность экстракции БАВ.

Таблица 63 – Материальный баланс по флавоноидам для полученных водных и водно-спиртовых образцов

Взято ЛРС, г	Содержание флавоноидов в ЛРС, г	Получено извлечения, мл	Содержание флавоноидов в извлечении, г
Отвар (1:10)			
10,006	0,07227	100	0,052
Всего	0,07227	Потери Всего	0,02027 0,07227
Эффективность экстракции	Выход (степень использования ЛРС), % = 71,95 Расходный коэффициент = 1,39 Остаточное содержание БАВ в ЛРС = 28,05%		
Настойка (1:5), метод перколяции			
10,00	0,07227	45	0,0594
Всего	0,07227	Потери Всего	0,01287 0,07227
Эффективность экстракции	Выход (степень использования ЛРС), % = 82,19 Расходный коэффициент = 1,22 Остаточное содержание БАВ в ЛРС = 17,81%		
Жидкий экстракт (1:1)			
50,00	0,3635	50	0,24425
Всего	0,3635	Потери Всего	0,11925 0,3635
Эффективность экстракции	Выход (степень использования ЛРС), % = 67,19 Расходный коэффициент = 1,45 Остаточное содержание БАВ в ЛРС = 32,81%		
Настойка (1:5), метод мацерации			
10,00	0,07227	40	0,0376
Всего	0,07227	Потери Всего	0,03467 0,07227

Продолжение Таблицы 63

Эффективность экстракции	Выход (степень использования ЛРС), % = 52,03 Расходный коэффициент = 1,92 Остаточное содержание БАВ в ЛРС = 47,97%		
Настойка (1:5), метод дробной мацерации			
10,00	0,07227	40	0,0512
Всего	0,07227	Потери Всего	0,02107 0,07227
Эффективность экстракции	Выход (степень использования ЛРС), % = 70,85 Расходный коэффициент = 1,41 Остаточное содержание БАВ в ЛРС = 29,15%		

С точки зрения эффективности использования сырья наилучшим водно-спиртовым извлечением являлся опытный лабораторный образец настойки, полученной методом перколяции. Согласно полученным данным оптимальным водно-спиртовым извлечением на основе листьев облепихи крушиновидной является экстракт жидкий (1:1) за счёт наибольшего количества флавоноидов в составе полифенольного комплекса, определяющего фармакологическую активность данного растительного сырья.

Таким образом, получены жидкие водные и водно-спиртовые опытные лабораторные образцы ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной (отвар, настойка, экстракт жидкий), проведена их стандартизация по показателям, изложенным в НД, разработаны методики количественного определения флавоноидов. Методом ТСХ показан неодинаковый флавоноидный состав водных и водно-спиртовых извлечений, в которые переходит от 11 до 13 БАВ группы флавоноидов. Наиболее высокое содержание флавоноидов отмечено для экстракта жидкого (1:1), что позволяет рекомендовать данную ЛФ в качестве оптимальной из исследованных.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. Проведенный анализ и систематизация данных *in silico* позволяют считать наиболее перспективными изучение противовоспалительной, гепатопротекторной, кардиопротекторной, а также антибактериальной и противогрибковой активности, что открывает перспективы для дальнейших доклинических и клинических исследований с целью расширения перечня показаний к применению извлечений из листьев облепихи крушиновидной в клинической практике.

2. Оценена противовоспалительная активность отвара из листьев облепихи крушиновидной *in vivo* на модели формалинового отёка лапы крыс. В результате доказано, что отвар листьев облепихи крушиновидной при краткосрочном курсовом (7 сут.) пероральном применении в дозе 10 мл/кг (235 мг/кг из расчета по сухому остатку) проявляет достаточный противовоспалительный эффект, обеспечивая значительное, достоверное снижение выраженности отёка лапы крыс, максимально через 3 ч после введения флогогена на 36,0% по сравнению с контролем, что превышает эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки).

3. Разработаны методики количественного определения флавоноидов в полученных на основе листьев жидких водных и водно-спиртовых опытных лабораторных образцах ЛФ (отвар, настойки, экстракт жидкий). Проведена их стандартизация в соответствии с ГФ РФ XV. Установлено, что экстракт жидкий (1:1) содержит наибольшее количество флавоноидов, в связи с чем данная ЛФ рекомендована в качестве оптимальной из исследованных. Методом ТСХ показан неодинаковый флавоноидный состав водных и водно-спиртовых жидких ЛФ, в которые переходит от 2 до 14 БАВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время на основе листьев облепихи крушиновидной зарегистрирован только один ЛРП «Гипорамин». Однако, по большей части, изучаемое сырье продолжает оставаться побочным продуктом при заготовке плодов. Ежегодные запасы их значительны, так как площади культивирования данного растения на территории РФ, по литературным данным, составляют более 55 тыс. га, а естественные заросли занимают более 145 тыс. га. Листья облепихи крушиновидной могут быть использованы в качестве перспективного источника БАВ для разработки на их основе различных ЛРП и БАД противовоспалительного, капилляропротекторного и антиокислительного действия с дальнейшей оценкой *in vivo* на этапе доклинических исследований в рамках решения задач по разработке эффективных и безопасных лекарственных препаратов Российского производства.

По результатам комплексного исследования состава с оценкой динамики накопления различных групп БАВ в листьях облепихи крушиновидной (Таблица 64), проведенного в работе, установлено, что листья накапливали 0,8–1,5% флавоноидов; более 10% (в пересчёте на танин) суммы дубильных веществ; от 1,8 до 2,3% лейкоантоциановых соединений.

Таблица 64 – Сводные данные по результатам исследования состава БАВ листьев

Группа БАВ	Содержание БАВ по фенофазам, %		
	1	2	3
Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом этиловым	38,53±1,927	39,34±1,967	43,20±2,160
Сумма флавоноидов	1,431±0,033	0,941±0,022	0,803±0,018
Дубильные вещества в пересчёте на кислоту галловую (СФ)	9,120±0,236	7,783±0,201	8,216±0,213
Содержание дубильных веществ в пересчёте на танин (СФ)	4,175±0,210	3,540±0,178	3,083±0,155
Сумма свободных аминокислот	2,957±0,143	2,145±0,104	1,727±0,084
Сумма лейкоантоцианов	2,188±0,065	2,355±0,070	1,847±0,055

Продолжение Таблицы 64

Содержание каротиноидов	0,050±0,00005	0,043±0,00005	0,070±0,00008
Содержание хлорофиллов	0,163±0,0005	0,123±0,0004	0,179±0,0006
Тиамин (В1)	4,63±0,463	6,93±0,693	1,17±0,117
Рибофлавин (В2)	1,71±1,71	2,78±0,278	2,93±0,293
Холин (В4)	171,0±17,1	94,5±9,45	88,6±8,86
АОА, мг/г в пересчете на кверцетин	14,50±0,253	14,07±0,343	15,77±0,331
АОА, мг/г в пересчете на кислоту аскорбиновую	124,79±2,177	121,06±2,952	135,69±2,846
Сумма свободных органических кислот	2,372±0,0417	2,414±0,0192	2,394±0,0507
Сумма дубильных веществ (методика ОФС)	10,664±0,595	10,725±0,192	10,573±0,277
Аскорбиновая кислота	0,136±0,0104	0,142±0,0061	0,154±0,0040

Выявлено, что содержание суммы дубильных веществ на протяжении всего периода наблюдений остается стабильным без тенденции к значительному снижению. Увеличение содержания в листьях к периоду созревания плодов наблюдалось для аскорбиновой кислоты, рибофлавина и каротиноидов, что сопровождалось ростом общей АОА извлечений из сырья.

С точки зрения накопления флавоноидов, по результатам исследований, установлено снижение их содержания в сырье с июня по конец августа – начало сентября. При использовании в производстве разработанного в работе способа УЗ-обработки, к заготовке и использованию в промышленных масштабах могут быть рекомендованы, по аналогии с ЛРП «Гипорамин» [95], также листья всех изученных фенологических фаз, для которых содержание суммы флавоноидов достигает 1%. Данный подход позволит наиболее рационально использовать листья растения с целью возможности производства не только известного противовирусного ЛРП, не снижая требований к его качеству, но и дать возможность расширения ассортимента препаратов и БАД на основе листьев с другими видами фармакологической активности, обусловленной группой флавоноидов.

В виду того, что листья продемонстрировали достаточно высокое содержание таннинов (более 10%) на всех этапах своего развития (снижение содержания суммы дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту в листьях

не превышает 10%), к заготовке могут быть рекомендованы листья разных сроков сбора, в т.ч. поздних (фаза 3 – массового плодоношения (технической зрелости плодов)). Следует также принимать во внимание, что заготовка листьев совместно с плодами максимально позволит сохранить уникальный комплекс БАВ в плодах, широко используемых для промышленного производства ЛРП, что соответствует принципу рационального использования природных ресурсов. По результатам работы предложена схема заготовки листьев облепихи крушиновидной (Рисунок 75).



Рисунок 75 – Технологическая схема заготовки листьев облепихи крушиновидной

Таким образом, оптимальным рекомендованным периодом для заготовки листьев облепихи крушиновидной является период массового плодоношения (фенофаза 3 – конец августа – начало сентября). Содержание же целевых групп БАВ фенольной природы для листьев облепихи крушиновидной, заготовленных на территории Центрального Черноземья (на примере Воронежской области), на данном этапе также можно считать высоким (флавоноидов – не менее 0,5%; дубильных веществ – не менее 10% (в пересчете на танин); лейкоантоциановых соединений – не менее 1,5%).

Также в данной работе научно обоснована перспективность применения экстрактов листьев облепихи крушиновидной для расширения ассортимента и получения различных ЛРП, в т.ч. противовоспалительного действия. Разработаны критерии оценки качества листьев облепихи крушиновидной и проект современной нормативной документации (ФС) для их стандартизации.

Для дальнейшего выявления variability накопления БАВ листьями облепихи крушиновидной целесообразно проведение исследований сырья, заготовленного в других эколого-географических зонах, различных сортов, а также с учётом разделения мужских и женских особей, а также динамики накопления БАВ в течении нескольких лет в листьях изучаемого региона.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведенный научно-информационный обзор литературы по теме показал отсутствие фармакопейного стандарта качества на листья облепихи крушиновидной, как исходного сырья для получения ЛРП, а также отсутствие научных обоснований к срокам заготовки данного сырья с учетом динамики накопления различных групп БАВ;

2. В результате комплексного морфолого-анатомического анализа листьев облепихи крушиновидной установлены диагностические признаки, позволяющие проводить идентификацию данного сырья: клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольной формы, с утолщёнными стенками; на нижней стороне листа клетки эпидермиса имеют сильноизвилистые стенки, а также устьица аномоцитного типа; характерны три типа трихом – щитковидные, щитковидно-звездчатые, звездчатые;

3. Предложены нормативы товароведческих показателей качества листьев облепихи крушиновидной: влажность – не более 10 %, зола общая – не более 6 %, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1 %; а также по результатам оценки способности сырья к накоплению токсичных элементов и радионуклидов показана его экологическая безопасность;

4. С применением современных физико-химических методов (СФМ, ГХ-МС, капиллярный электрофорез, ТСХ и др.) изучен состав БАВ (флавоноиды, дубильные вещества, аминокислоты, пигменты, органические кислоты и др.) листьев облепихи крушиновидной различных фенологических фаз и установлен оптимальный срок заготовки листьев облепихи крушиновидной (фаза массового плодоношения);

5. Разработаны и валидированы спектрофотометрические методики определения содержания в листьях и жидких водно-спиртовых ЛФ на их основе (отваре, настойке, жидком экстракте) суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин (не менее 0,5%), как одной из целевых групп БАВ для стандартизации и оценки

качества сырья. Дополнительно разработаны и валидированы методики количественного определения суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую и танин (не менее 6% (в пересчете на кислоту галловую) и не менее 3% (в пересчете на танин)), аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую (не менее 2%), лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид (не менее 1,5%), хлорофиллов и каротиноидов (не менее 0,2% и 0,05% соответственно).

6. Впервые использован метод озвучивания для интенсификации экстракции флавоноидов, как целевой группы БАВ, из листьев облепихи крушиновидной, позволивший сократить время экстракции, снизить расход экстрагента и энергозатраты, а также увеличить выход флавоноидов на 30% (с 1,4% до 1,83%);

7. Методом *in silico* проведена прогностическая оценка возможных фармакологических свойств комплекса БАВ листьев полифенольной природы и выбраны перспективные направления для дальнейшей разработки ЛРП (противовоспалительного, гепатопротекторного, а также антибактериального действия). *In vivo* на модели формалинового отёка лапы крыс достоверно показано наличие противовоспалительной активности водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной при пероральном применении;

8. Разработаны критерии оценки качества листьев облепихи крушиновидной и проект современной нормативной документации (ФС) для их стандартизации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АОА – антиокислительная активность
- БАВ – биологически активные вещества
- БАД – биологически активная добавка
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
- ГХ – газовая хроматография
- ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором
- ИКС – инфракрасная спектроскопия
- КБП – коэффициент биологического поглощения
- КЭ – капиллярный электрофорез
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛР – лекарственное растение
- ЛРП – лекарственный растительный препарат
- ЛРС – лекарственное растительное сырье
- ЛФ – лекарственная форма
- МС – масс-спектрометрия
- НД – нормативная документация
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- РФ – Российская Федерация
- РЭМ – растровая электронная микроскопия
- СО – стандартный образец
- СФМ – спектрофотометрия
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ФС – фармакопейная статья
- ЭВ – экстрактивные вещества

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдыкаликова, К. А. Фитохимический состав надземной части облепихи крушиновидной / К. А. Абдыкаликова, Л. П. Нечипоренко // Вестник КГПИ. – 2008. – № 4. – С. 104-107.
2. Аверьянова, Е. В. Биологическая ценность облепихи как основа её комплексной безотходной переработки / Е. В. Аверьянова // Современная наука и инновации. – 2018. - №3. – С. 104-111.
3. Азарова, О. В. Кора и побеги облепихи крушиновидной - новый сырьевой источник биологически активных веществ: специальность 11.00.11: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Азарова Ольга Васильевна. – Барнаул, 1998. – 19 с.
4. Айтуарова, А. Ш. Выделение биологически активных веществ из надземной части растения вида *Hippophae rhamnoides* L. и возможности их использования в медицине / А. Ш. Айтуарова, Г. Е. Жусупова // Вестник КазНМУ. – 2016. – №3. – С. 195-197.
5. Айтуарова, А. Ш. Качественная и количественная оценка состава биологически активных веществ надземной части растения вида *Hippophae rhamnoides* L. / А. Ш. Айтуарова, Г. Е. Жусупова // V Международная конференция-школа по химической технологии ХТ'16: сборник тезисов докладов сателлитной конференции XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии, Волгоград, 16–20 мая 2016 года. Том 3. – Волгоград: Волгоградский государственный технический университет, 2016. – С. 247-249.
6. Аксенова, Н. А. О новых сортообразцах облепихи селекции ботанического сада Московского университета / Н. А. Аксенова, В. С. Долгачева // Новое в биологии, химии и фармакологии облепихи: Сборник научных трудов – Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1991. – С. 23-28.
7. Антропова, И. Г. Исследование радиационной чувствительности серотонина / И. Г. Антропова, А. А. Ревина, Е. С. Попова // Сопроводительная

фитотерапия в онкологии: материалы 2-й международной научно-практической конференции, Москва, 23 мая 2015 года / под ред. В. Ф. Корсуна – Москва, 2015. – С. 6-10.

8. Багиров, И. М. Фармакогностическое изучение растений семейства лоховые : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Багиров Исмаила Мамед оглы; Первый московский медицинский университет. им. И. М. Сеченова. – Москва, 2010. – 22 с.

9. Барыкина, Р. П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р. П. Барыкина. – Москва: МГУ имени М. В. Ломоносова, 2004. – 312 с. - ISBN 5-211-06103-9.

10. Биоактивные компоненты древесной зелени облепихи *Hipporhae rhamnoides* L. / Т. П. Кукина, Д. Н. Щербаков, К. В. Генъш [и др.] // Химия растительного сырья. – 2016. – №1. – С. 37-42.

11. Богомолова, Н. И. Продолжительность вегетационного периода и уровень его теплообеспеченности у различных сортов облепихи крушиновидной в условиях средней полосы России / Н. И. Богомолова // Аграрный вестник Урала. – 2009. - №1(55). – С. 34-36.

12. Богомолова, Н. И. Содержание биогенных элементов в вегетативных органах и плодах облепихи крушиновидной / Н. И. Богомолова, С. М. Мотылева // Современное садоводство. – 2013. - №3. – С. 1-6.

13. Бортникова, В. В. Экспериментальное изучение безопасности гипорамина – нового фитопрепарата противовирусного действия / В. В. Бортникова // Биомедицина. – 2011. - №3. – С. 106-108.

14. Валидация методики определения ртути, свинца, кадмия и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах на его основе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой / В. М. Щукин, Е. С. Жигилей, А. А. Ерина [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – №54(9). – С. 57-64.

15. Васильева, Н. А. Биохимический состав и технологическая оценка бурятских сортов облепихи / Н. А. Васильева, Н. К. Гусева, Ю. М. Батуева // Успехи современного естествознания. – 2016. – № 1. – С. 61-65.
16. Власов, А. С. Оценка экологической безопасности лекарственного растительного сырья некоторых районов Пермского края / А. С. Власов, В. Д. Белоногова, А. В. Курицын // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №5. – URL: www.science-education.ru/119-15027 (дата обращения: 06.05.2025).
17. Водородная связь / Сборник статей: под ред. Н. Д. Соколова, В. М. Чулановского. - Москва: Наука, 1964. - 340 с.
18. Вопросы петиолярной анатомии листьев смородины черной (*Ribes nigrum* L.) / М. Д. Цулукидзе, В. М. Рыжов, В. А. Куркин [и др.]. // Молодой ученый. – 2016. – № 3 (107). – С. 373-378.
19. Гавриленко, И. Г. Анатомическое строение черешка листа, стебля и семени *Aconitum coreanum* (*Ranunculaceae*) / И. Г. Гавриленко, Е. В. Новожилова / *Turczaninowia*. – 2017. – Т.20, №1. – С. 75-79.
20. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Ф. Гейсс ; пер. с англ. М. А. Кошевник, Б. П. Лапина, под ред. В. Г. Березкина – Москва : Мир, 1999. – 405 с.
21. ГОСТ Р 55569-2013 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза: нац. стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие приказом Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 06 сент. 2013 г. N 841-ст: введен впервые: дата введения 2015-07-01 // Кодекс: электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200105562> (дата обращения: 06.05.2025).
22. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издание: офиц. сайт. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 06.05.2025).

23. Государственная Фармакопея РФ XIV издание: офиц. сайт. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/> (дата обращения: 06.05.2025).
24. Гроховатский, И. А. Облепиха крушиновидная (*Hipporhae rhamnoides* L.) алтайской вариации в условиях юга Приаралья / И. А. Гроховатский, Т. О. Отенов, Ф. Т. Отенова // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. – 2012. – № 11. – С. 56-58.
25. Гуленкова, Г. С. Особенности биохимического состава плодов облепихи / Г. С. Гуленкова // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2013. – № 11. – С. 262-265.
26. Джавахян, М.А. Оценка содержания суммы дубильных веществ в креме «Гипокрем 0,5%» / М.А. Джавахян, О.Ю. Куляк, П.Г. Мизина // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20, №1. – С. 227-232.
27. Доклинические исследования лекарственных веществ: учебное пособие / А. В. Бузлама, В. А. Николаевский, Ю. Н. Чернов, А. И. Сливкин. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2017. – 383 с. – ISBN 978-5-9704-3834-3.
28. Дроздова, И. Л. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в траве икотника серого / И. Л. Дроздова, Т. И. Лупина // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2016. – № 1. – С. 106-112.
29. Ершова, И. В. Оценка Алтайских сортов и гибридов облепихи по биохимическому составу плодов / И. В. Ершова // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №7. – С. 11-12.
30. Ершова, И. В. Сортовое разнообразие алтайской облепихи по биохимическому составу плодов / И. В. Ершова // Плодоводство и ягодоводство России. – 2012. – Т. 31, № 1. – С. 163-170.
31. Жашуев, А. Ж. Облепиха крушиновидная (*Hipporhae rhamnoides* L.) в прибрежных и луговых сообществах в Кабардино-Балкарской республике / А. Ж.

Жашуев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17, № 4(2). – С. 341-344.

32. Землянухин, А. А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений: учебное пособие для вузов по направлению и специальности «Биология» / А. А. Землянухин, Л. А. Землянухин. – Воронеж: Издательство Воронежского университета, 1996. – 188 с.

33. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сорта плодов облепихи крушиновидной (*Hippophaes rhamnoides* L.) / О. В. Тринеева, М. А. Рудая, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Химия растительного сырья. – 2019. – № 1. – С. 301-308.

34. Изучение микродиагностических признаков облепихи крушиновидной листьев / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. А. Гудкова [и др.] // Фармация. – 2022. – Т. 71, № 3. – С. 18-23.

35. Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 123-131.

36. Использование межмикросателлитных маркеров для анализа полиморфизма облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) различного происхождения / К. Д. Боне, Ю. В. Бочаркина, Г. И. Карлов, О. В. Разумова // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2020. – Т. 75, № 1. – С. 43-48.

37. Исследование антиоксидантных и мембранопротекторных свойств экстрактов облепихи / М. К. Мурзахметова, Р. С. Утегалиева, А. Н. Аралбаева, Ж. Т. Лесова // Actualscience. – 2015. – Т. 1, № 5(5). – С. 26-28.

38. Исследование минерального состава сырья облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / Л. С. Науменко, Н. В. Попова, Е. В. Гладух, Л. А. Бобрицкая // Norwegian Journal of development of the International Science. – 2020. – № 38. – С. 46-49.

39. Исследование петиолярной анатомии листьев каштана конского как перспективного источника биологически активных соединений / П. В. Белов, В. А. Куркин, В. М. Рыжов [и др.] // Аспирантский вестник Поволжья. - 2019. – Т.19, № 1-2. – С. 6-12.

40. Исследование состава биологически активных веществ облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) листьев / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, Д. К. Носова, А. И. Колотнева // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2022. – С. 270-279.

41. Исследование состава органических кислот в листьях облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Чувицова, Е. Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. – 2023. – № 3. – С. 211-219.

42. Исследование химического состава плодов некоторых нетрадиционных видов растительного сырья флоры Башкортостана / Л. А. Валитова, С. Р. Ишмухаметова, Л. И. Пусенкова, О. В. Ласточкина // Российский электронный научный журнал. – 2016. – № 2(20). – С. 138-144.

43. Казицына, Л. А. Применение УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии в органической химии / Л. А. Казицына, Н. Б. Куплетская. – Москва: Издательство «Высшая школа», 1971. – 264 с.

44. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер; пер. с англ. Д. Н. Соколов, М. И. Яновский; под редакцией В. Г. Березкина. – Москва: Мир, 1981. – С. 402-407.

45. Ковалёва, Н. А. Внешние признаки измельченного и порошкованного сырья облепихи крушиновидной листьев / Н. А. Ковалёва, А. И. Колотнева, Д. К. Носова // Innovative research projects: Сборник статей Международного научно-исследовательского конкурса, Петрозаводск, 14 февраля 2022 года. – Петрозаводск:

Международный центр научного партнерства «Новая Наука» (ИП Ивановская И.И.), 2022. – С. 202-205.

46. Ковалёва, Н. А. Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2022. – Т. 22, № 3. – С. 284-298.

47. Ковалева, Н. А. Исследование элементного состава облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) листьев / Н. А. Ковалева, О. В. Тринеева // Микроэлементы в медицине. – 2022. – Т. 23, № 3. – С. 45-58.

48. Ковалева, Н. А. Оценка радиационной безопасности листьев облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалева, И. В. Давыдов // Инновационный потенциал развития общества: взгляд молодых ученых: сборник научных статей 4-й Всероссийской научной конференции перспективных разработок, Курск, 01 декабря 2023 года. – Курск: ЗАО «Университетская книга», 2023. – С. 78-80.

49. Ковалёва, Н. А. Получение и стандартизация лекарственных растительных препаратов на основе листьев облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. В. Выдрин // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 : сборник тезисов, Санкт-Петербург, 07–09 октября 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 81-82.

50. Ковалёва, Н. А. Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 79-86.

51. Ковалёва, Н. А. Разработка и валидация методики количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. И. Колотнева // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2023. – Т. 22, № 4. – С. 199-207.

52. Ковалёва, Н. А. Разработка и валидация методики определения аминокислот в листьях облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Биофармацевтический журнал. – 2023. – Т. 15, № 1. – С. 47-52.

53. Ковалёва, Н. А. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Чувикова // Химия растительного сырья. – 2025. – № 2. – С. 130-138.

54. Ковалёва, Н. А. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Давыдов // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т. 16, № 4. – С. 42-48.

55. Ковалёва, Н. А. Состав витаминов группы В в листьях облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой, Н. А. Дьяковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2023. – С. 271-274.

56. Колосова, О. А. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сырья валериан сомнительной и волжской / О. А. Колосова, О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 162-172.

57. Коляда, Н. А. О перидермальных древесных растениях юга Приморья / Н. А. Коляда // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. – 2010. – № 5. – С. 80-81.

58. Корреляционный анализ фенофаз и феноинтервалов у сортов Облепихи крушиновидной (*Hipporhae rhamnoides* L.) в коллекции ГБС РАН им. Н. В. Цицина

/ А. В. Исачкин, И. Н. Зубик, А. В. Потапова, М. А. Ермаков // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 2. – С. 64-69.

59. Кукина, Т. П. Биологически активные изопреноиды листьев облепихи: специальность 02.00.10 «Биоорганическая химия»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук / Кукина Татьяна Петровна; Новосибирский институт биоорганической химии. – Новосибирск, 1992. – 21 с.

60. Кулиев, А. С. Лекарственное и декоративное значение облепихи крушиновидной (*Hipporhae rhamnoides* L.) / А. С. Кулиев, Э. Абдилабек уулу // Исследования живой природы Кыргызстана. – 2018. – № 2. – С. 83-86.

61. Кусова, Р. Д. Лекарственные растения Северной Осетии семейства *Elaeagnaceae*: перспективы использования / Р. Д. Кусова. – Владикавказ: Северо-Осетинский государственный университет им. К. Л. Хетагурова, 2015. – 173 с. – ISBN 978-5-8336-0860-9.

62. Лапинская, Е. С. Изучение состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и крапивы жгучей (*Urtica urens* L.) / Е. С. Лапинская, Я. Ф. Копытько // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 12. – С. 26-29.

63. Литтл, Л. Инфракрасные спектры адсорбированных молекул / Под ред. В. И. Лыгина. М.: Мир, 1969. – 514 с.

64. Lupinская, С. М. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе / С. М. Lupinская, С. В. Орехова, О. Г. Васильева // Химия растительного сырья. – 2010. – № 3. – С. 143-145.

65. Мавлододова, З. Д. Действие условий влагообеспеченности и высотного фактора на динамику роста и активность эндогенных регуляторов роста в листьях растений облепихи / З. Д. Мавлододова, А. Б. Сафаралихонов, О. А. Акназаров // Известия академии наук республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. – 2019. – № 4(207). – С. 44-48.

66. Маркетинговый анализ Российского рынка противовирусных лекарственных препаратов / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. А. Занина [и др.] //

Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2023. – № 3. – С. 66-76.

67. Мельников, О. М. Исследование биологически активных соединений почек и листьев мужских растений облепихи крушиновидной / О. М. Мельников, А. Л. Верещагин, Ю. А. Кошелев // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 113-116.

68. Мельников, О. М. Исследование микроэлементного состава листьев и почек облепихи крушиновидной *Hippophaë rhamnoides* L. / О. М. Мельников, А. Л. Верещагин, Ю. А. Кошелев // Товарный консалтинг и аудит потребительского рынка. – 2008. – С. 128-132.

69. Микроэлементный состав тканей облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / Г. М. Скуридин, О. В. Чанкина, А. А. Легкодымов [и др.] // Известия РАН. Серия Физическая. – 2013. – № 2(77). – С. 229–232.

70. Михеев, А. М. Облепиха / А. М. Михеев, В. И. Деменко. – Москва : Росагропромиздат, 1990. – 48 с. – ISBN 5-260-02610-1.

71. Морозов, В. И. Культура облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) как источник сырья для производства препарата «Гипорамин» / В. И. Морозов // Химико-фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41, № 8. – С. 19-21.

72. Мотылева, С. М. Мониторинг абиогенных металлов в плодах и листьях облепихи крушиновидной / С. М. Мотылева, Н. И. Богомолова // Селекция, генетика и сортовая агротехника плодовых культур: сборник научных статей. – Орёл: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, 2009. – С. 131-134.

73. МР 2.3.1.2432—08 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: методические рекомендации: утвержден и введен в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко: дата введения 2018-12-18 // Кодекс:

электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200076084> (дата обращения: 06.05.2025).

74. МУК 4.1.1483 – 03 Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной аргонной плазмой: методические указания: утвержден и введен в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко: введен впервые: дата введения 2003-06-30 // Кодекс: электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200032531> (дата обращения: 06.05.2025).

75. Мусоев, С. М. Биологические особенности облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) и ее вегетативное размножение на Западном Памире: специальность 03.00.05 «Ботаника», 03.00.12 «Физиология и биохимия растений»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Мусоев Суроб Мамадерович; Памирский биологический институт. – Душанбе, 1997. – 23 с.

76. Наканиси, К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений: Практ. руководство / Пер. с англ. канд. хим. наук Н. Б. Куплетской и Л. М. Эпштейн; Под ред. канд. хим. наук А. А. Мальцева. – Москва: Мир, 1965. – 216 с.

77. Накопление и распределение тяжелых металлов в растениях зоны техногенеза / Т. М. Минкина, Г. В. Мотузова, Н. Н. Мирошниченко [и др.] // Агрохимия. – 2013. – № 9. – С. 65-75.

78. Нилова, Л. П. Антиоксидантные комплексы облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) северо-запада России / Л. П. Нилова, С. М. Малютенкова // Вестник ВГУИТ. – 2021. – Т. 83, № 1. – С. 108-114.

79. Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) – источник биоактивных веществ / А. Б. Хасенова, А. Н. Аралбаева, Р. С. Утегалиева [и др.] // Вестник Алматинского технологического университета. – 2020. – № 1. – С. 82-88.

80. Определение антиокислительной активности листьев облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Чуви́кова, А. И. Колотнева // Гербарium. – 2025. – Т. 2, № 2. – С. 63-70.

81. Определение витамина В₁ в растительных премиксах методами зонного капиллярного электрофореза и флуориметрии / И. В. Стурова, Н. В. Комарова, Н. Ю. Страшила, А. В. Калач // Химия растительного сырья. – 2007. – №4. – С. 121–122.

82. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) методом ТСХ / Т. В. Великая, К. К. Кожанова, С. К. Жетерова, О. А. Дрегерт // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 1(43), Ч. 3. – С. 78-80.

83. Определение некоторых биологически активных веществ в листьях облепихи крушиновидной титриметрическими методами / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Чуви́кова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2023. – № 2. – С. 97-102.

84. Определение содержания органических кислот в листьях облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. И. Колотнева, Д. К. Носова // VolgaMedScience: Сборник тезисов VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, Нижний Новгород, 17–18 марта 2022 года. – Нижний Новгород: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2022. – С. 660-662.

85. Определение флавоноидов и исследование влияния условий хранения на их содержание в плодах облепихи методом ТСХ / О. В. Тринеева, И. И. Сафонова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12, № 5. – С. 806-813.

86. Определение экстрактивных веществ в листьях облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, Д. К. Носова, А. И. Колотнева //

Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2022. – № 1. – С. 105-109.

87. Оптимизация разделения некоторых флавоноидов методом ТСХ / Н. А. Беланова, С. И. Карпов, В. Ф. Селеменев [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т.11, № 6. – С. 905-912.

88. Осмоловская, Н. Г. Роль органических кислот при формировании ионного состава листьев гликофитов в онтогенезе / Н. Г. Осмоловская, Л. Н. Кучаева, В. А. Новак // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 381-388.

89. Отто, М. Современные методы аналитической химии (в 2-х томах) / М. Отто. – Москва: Техносфера, 2003. – 416 с. – ISBN 5-94836-014-8.

90. Оценка антиокислительной активности облепихи крушиновидной листьев титриметрическим методом / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, Д. К. Носова, А. И. Колотнева // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2022. – № S9. – С. 80-84.

91. Оценка эффективности сочетанного применения сухого экстракта листьев облепихи крушиновидной и адаптации к гипоксии при остром токсическом гепатите / С. А. Чукаев, С. М. Николаев, О. А. Роднаева, Л. А. Нагаслаева // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3(73). – С. 289-293.

92. Патент № 2098111 Российская Федерация, МПК А61К35/78. Способ получения противовирусного препарата «Гипорамин»: № 94011336/14: заявл. 30.03.1994 : опублик. 10.12.1997 / Толкачев О. Н., Шейченко О. П., Фадеева И. И. [и др.] // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2098111C1> (дата обращения: 06.05.2025).

93. Патент № 2170930 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, G01N 33/52. Способ определения антиокислительной активности: № 2000111126/14: заявл. 05.05.2000: опублик. 20.07.2001 / Максимова Т. В., Никулина И. Н., Пахомов В. П. [и др.] // FindPatent.RU. Патентный поиск, поиск патентов на изобретения. URL: <https://findpatent.ru/patent/217/2170930.html> (дата обращения: 06.05.2025).

94. Патент № 2185846 Российская Федерация, МПК А61К35/78. Желудочно-кишечный сбор «Фитовит»: № 2001119713/14: заявл. 16.07.2001:

опублик. 27.07.2002 / Югов С. Д. // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2185846C1> (дата обращения: 06.05.2025).

95. Патент № 2197978 Российская Федерация, МПК А61К35/78, А61Р31/12. Способ получения противовирусного препарата Гипорамина (варианты): № 2001115424/14: заявл. 07.06.2001: опублик. 10.02.2003 / Шейченко О. П., Толкачѳв О. Н., Шейченко В. И. [и др.] // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2197978C1> (дата обращения: 06.05.2025).

96. Патент № 2393871 Российская Федерация, МКП А61К36/76, А61К36/484, А61К36/72, А61К36/74, А61Р31/00. Лечебно-профилактическая композиция: № 2009100670/15: заявл. 11.01.2009: опублик. 10.07.2010 / Прокопьева Л. А., Хрулев В. В. // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2393871C1> (дата обращения: 06.05.2025).

97. Патент № 2401121 Российская Федерация, МКП А61К36/72, А61К36/185, А61К36/484, А61Р31/22, А61Р31/00, А61Р31/18, А61Р1/16, А61Р35/00. Фармацевтическая композиция для лечения и профилактики вирусных инфекций и сифилиса на основе экстрактов растительного происхождения и способ лечения и профилактики вирусных инфекции и сифилиса: № 2009120384/15: заявл. 29.05.2009: опублик. 10.10.2010 / Кожока Т. Г., Ясинский С. Я. // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2401121C1> (дата обращения: 06.05.2025).

98. Патент № 2613878 Российская Федерация, МКП G01N33/52. Способ идентификации и отдельного количественного определения танина и галловой кислоты при совместном присутствии в растительном сырье и фитопрепаратах без предварительного разделения: № 2015127130: заявл. 06.07.2015: опублик. 21.03.2017 / Тринеева О. В., Сливкин А. И. // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2613878C2> (дата обращения: 06.05.2025).

99. Патент № 2654868 Российская Федерация, МКП А23L33/10, А23L33/105, А23L33/16. Нутрицевтическая композиция: № 2017108046: заявл. 10.03.2017: опублик. 23.05.2018 / Гайдуль К. В., Корнилов С. И. // Patenton.RU.

Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2654868C1> (дата обращения: 06.05.2025).

100. Патент № 2712069 Российская Федерация, МПК G01N 33/15, G01N 33/52, G01N 21/75. Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов методом дифференциальной спектрофотометрии: № 2018120667: заявл. 04.06.2018: опублик. 24.01.2020 / Тринеева О. В., Рудая М. А., Сливкин А. И. // FindPatent.RU. Патентный поиск, поиск патентов на изобретения. URL: <https://poleznayamodel.ru/patent/271/2712069.html> (дата обращения: 06.05.2025).

101. Патент № 2747986 Российская Федерация, МКП А61К36/9066, А61К36/48, А61К36/484, А61К36/66, А61К36/72, А61К36/81, А61К36/82, А61К31/715, А61К33/30, А61Р37/02. Иммуномодулятор: № 2020116766: заявл. 13.05.2020: опублик. 18.05.2021 / Маркова Е. В., Гольдина И. А., Савкин И. В., Княжева М. А. // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2747986C1> (дата обращения: 06.05.2025).

102. Патент № 2813186 Российская Федерация, МПК А61К 36/72, В01D 11/00. Способ выделения флавоноидов из лекарственного растительного сырья: № 2023116586: заявл. 22.06.2023: опублик. 07.02.2024 / Ковалёва Н.А, Тринеева О. В., Дьякова Н. А., Чувицова И. В. // Patenton.RU. Пантеон патентов. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2813186C1> (дата обращения: 06.05.2025).

103. Петиолярная анатомия в рамках анатомио-морфологического исследования перспективного лекарственного сырья – травы женьшеня / Куркин В. А., Акушская А. С., Рыжов В.М. [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5-6. – С. 1274-1278.

104. Петиолярная анатомия листьев облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, В. В. Негроров [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2022. – Т.14, № 6. – С. 10-15.

105. Петухова, Н. М. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части яснотки белой и яснотки пурпурной / Н. М. Петухова, Л. С. Теслов, Ю. В. Бобкова // Часть III Анализ и стандартизация лекарственных средств: Сборник

трудов научно-практической конференции «Фармация из века в век», Санкт-Петербург, 01-30 апреля 2008 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, 2008 – С. 115-118.

106. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве: Гигиенические нормативы. – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 15 с.

107. Применение ИК-спектроскопии в анализе лекарственного растительного сырья / О. В. Тринеева, М. А. Рудая, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 4. – С. 187-194.

108. Применение синтетических эфиров высших жирных кислот для экстрагирования листьев крапивы / А. В. Белякова, В. А. Вайнштейн, К. В. Маркова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т.39, № 11. – С. 35-39.

109. Применение ТСХ для оценки профиля флавоноидов листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки / О. В. Тринеева, Н. А. Ковалева, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2023. – Т. 23, № 4. – С. 547-557.

110. Применение ультразвуковой экстракции для выделения флавоноидов из листьев облепихи крушиновидной / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Чувицова, Н. А. Дьякова // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т. 16, № 1. – С. 12-18.

111. Пугачева, О. В. Изучение комплекса биологически активных веществ листьев аронии Мичурина (*Aronia mitschurinii* А.К. Skvortsov & Maitul) и облепихи крушиновидной (*Hippophaes rhamnoides* L.) / О. В. Пугачева, О. В. Тринеева, Н. А. Ковалева // Химия растительного сырья. – 2025. – № 1. – С. 227–237.

112. Пугачева, О. В. Фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев : специальность 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Пугачева Ольга Валериевна ; ФГБОУ ВО «Самарский

государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Самара, 2025. – 224 с.

113. Пшенникова, Л. М. Анатомическое строение черешков листьев видов рода *Dasiphora (Rosaceae)* / Л. М. Пшенникова, С. А. Волкова / *Turczaninowia*. – 2013. – Т.16, № 2. – С. 106-109.

114. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, И. В. Чувилова, А. И. Сливкин // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. – 2023. – Т. 13, № 2. – С. 216-226.

115. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г. И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова // *Фармация*. – 2011. – № 3. – С. 14-17.

116. Рамазанова, З. Р. Анатомическое строение листьев хурмы кавказской (*Diospyros lotus L.*) / З. Р. Рамазанова, З. М. Асадулаев // *Ботанический вестник Северного Кавказа*. – 2016. – № 3. – С. 54-60.

117. Регистр лекарственных средств России: офиц. Сайт. URL: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 06.05.2025).

118. Рудая, М. А. Исследование элементного состава плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides L.*) различных сортов / М. А. Рудая, О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // *Микроэлементы в медицине*. – 2018. – № 3 (19). – С. 49-59.

119. Рудая, М. А. Сравнительное фармакогностическое изучение плодов облепихи крушиновидной различных сортов : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Рудая Маргарита Александровна ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2021. – 277 с.

120. Сагирова, Р. А. Особенности роста, развития и продуктивность сортов облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) в условиях остепнённой зоны Прибайкалья / Р. А. Сагирова // Вестник ИрГСХА. – 2020. – Т. 100. – С. 73-82.
121. Скуридин, Г. М. Накопление эссенциальных элементов и свинца в плодах и вегетативных частях облепихи / Г. М. Скуридин, О. В. Чанкина, Н. В. Багинская // Химия растительного сырья. – 2017. – № 1. – С. 113-117.
122. Смыкова, Т. К. Облепиха крушиновидная на юге Средней Сибири / Т. К. Смыкова // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 07. – С. 46-48.
123. Современные методы определения флавоноидов / Н. В. Калганова, Н. А. Полотнянко, Е. Д. Грибова, И. А. Стаханова // Студенческий научный форум: Материалы IX Международной студенческой научной конференции – Москва, 2017. – URL: <https://scienceforum.ru/2017/article/2017037327>.
124. Состав и содержание флавоноидов листьев *Hippophae rhamnoides* L. произрастающих в Азербайджане / Э. Н. Новрузов, З. Г. Мамедов, Л. А. Мустафаева, А. М. Зейналова // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 209-214.
125. Составление БАД на основе растительного сырья / Н. М. Имашева, В. В. Елина, О. С. Садомцева [и др.] // Международный академический вестник. – 2014. – № 3(3). – С. 52-55.
126. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров [и др.]. – Воронеж: Издательство «Водолей», 2004. – 528 с. – ISBN 5-88563-049-6.
127. Сравнительное анатомо-морфологическое исследование некоторых вегетативных органов эвкалипта прутовидного и эвкалипта серого / В. А. Куркин, Е. В. Авдеева, Л. В. Тарасенко [и др.] // Медицинский альманах. – 2013. – № 5 (28). – С. 191-196.
128. Строение черешка листа облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / Н. А. Ковалёва, В. В. Негроров, О. В. Тринеева [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 8-й

Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2022. – С. 280-284.

129. Струсовская, О. Г. Определение пигментного состава *cochlearia officinalis*, произрастающей на островах Соловецкого архипелага / О. Г. Струсовская // Фармация и общественное здоровье: Материалы V Международной научно-практической конференции, Екатеринбург, 18 апреля 2012 года. – Екатеринбург: Уральская государственная медицинская академия, 2012. – С. 184-187.

130. Съедин, А. В. Использование метода ИК-спектроскопии для экспресс – идентификации тиогликозидов в растительном сырье / А. В. Съедин, Т. В. Орловская, М. В. Гаврилин // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 1. – С. 367.

131. Тарасов, А. В. Определение антиоксидантной активности водных экстрактов некоторых растений Уральского региона / А. В. Тарасов, М. А. Бухаринова, Е. И. Хамзина // Food Industry. – 2018. – № 2. – С. 31-34.

132. Торопова, Е. Ю. Экологическая оценка местообитаний и плодов облепихи в республике Тыва / Е. Ю. Торопова, Н. А. Ховалыг // Biological sciences. – 2014. – №11. – С. 1732-1735.

133. Тринеева, О. В. Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ / О. В. Тринеева, С. С. Воропаева, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т. 13, № 2. – С. 213-219.

134. Тринеева, О. В. Исследование профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза / О. В. Тринеева, М. А. Рудая, А. И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 38-42.

135. Тринеева, О. В. Исследование профиля флавоноидов плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии / О. В.

Тринеева, М. А. Рудая, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. – Т. 20, № 1. – С. 79-86.

136. Тринеева, О. В. Исследование состава биологически активных веществ облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) листьев методом ГХ-МС / О. В. Тринеева, Н. А. Ковалёва // Химия растительного сырья. – 2023. – № 4. – С. 219-229.

137. Тринеева, О. В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 4(21). – С. 180-197.

138. Тринеева, О. В. Определение гидрокислоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.). / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, Е. Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. – 2015. – № 3. – С.105-110.

139. Тринеева, О. В. Сравнительная характеристика пигментного состава сырья и масляного экстракта листьев крапивы двудомной / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 1(14). – С. 142-148.

140. Тринеева, О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе: специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Тринеева Ольга Валерьевна; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2017. – 441 с.

141. Трофимов, Т. Т. Облепиха / Т. Т. Трофимов. – Москва: Издательство Московского университета, 1988. – 224 с.

142. Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами / Под ред. Вайсбергера А. – Москва: Химия, 1967. – 532 с.

143. Фармакологическая активность облепихи крушиновидной листьев : *in silico* и *in vivo* / Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. В. Бузлама, А. Ю. Кузнецов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 3. – С. 174-188.

144. Флоренская, Н. К. Технохимический контроль качества сырья и комбикормов / Н. К. Флоренская. – Москва: Колос, 1968. – 120 с.

145. ФР.1.31.2010.06997 МВИ 002-ХМС-2009 Методика измерений массовых долей 62 элементов в почвах, донных отложениях, горных породах и сплавах цветных металлов методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: дата введения 12.01.2015 // Томск: ООО «Химико-аналитический центр «Плазма». URL: <https://www.plasma-tomsk.ru/our-methods> (дата обращения: 06.05.2025).

146. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Е. Я. Ладыгин, Л. Н. Сафронич, В. Э. Отряшенкова и [и др.] – Москва: Высшая школа, 1983. – 176 с.

147. Ховалыг, Н. А. *Hippóphaë rhamnóides* L. в долине речки Чыргагы Дзун-Хемчикского района Республики Тыва / Н. А. Ховалыг, Е. Ю. Торопова // Научные труды Тувинского государственного университета: Материалы ежегодной научно-практической конференции преподавателей, сотрудников и аспирантов Тувинского государственного университета, посвященной Международному году Периодической таблицы химических элементов и Году человека труда в Республике Тыва, Кызыл, 26 октября 2019 года / Тувинский государственный университет. Том Выпуск XVIII. – Кызыл: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тувинский государственный университет», 2019. – С. 137-138.

148. Царькова, Т. Ф. Облепиха / Т. Ф. Царькова. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1987. – 32 с.

149. Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры / под ред. В. В. Титка, В. Н. Решетникова. – Минск: Беларуская навука, 2012. – 345 с. – ISBN 978-985-08-1430-2.

150. Чернощтанов, Н. А. Фенология облепихи на северо-западном Кавказе / Н. А. Чернощтанов // Новые технологии. – 2008. – Выпуск 5. – С. 56-57.
151. Черняк, Д. М. Содержание каротина и витаминов Е и С в Дальневосточных растениях / Д. М. Черняк, М. С. Титова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – № 2. – С. 92-93.
152. Чечета, О. В. Исследование водородных связей α -токоферола методом ИК-спектроскопии / О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2010. – № 2. – С. 164-167.
153. Чиркина, Т. Ф. Перспективные растительные источники биологически активных веществ в Байкальском регионе / Т. Ф. Чиркина, А. М. Золотарева, З. А. Пластинина // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – № 1. – С. 71-74.
154. Чукаев, С. А. Оценка спектра антиоксидантной активности гипорамина *in vitro* / С. А. Чукаев, О. А. Роднаева // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – № 2(66). – С. 140-142.
155. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – Москва : Мир, 1980. – Т. 2. – С. 610.
156. Шпитальная, Т. В. Полиморфизм интродуционных популяций *Hipporhae rhamnoides* L. по форме листовых пластинок в ЦБС НАН Беларуси / Т. В. Шпитальная // Современные направления деятельности ботанических садов и держателей ботанических коллекций по сохранению биоразнообразия растительного мира: Материалы Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика Н. В. Смольского, Минск, 27–29 сентября 2005 года. – Минск: ООО «Эдит ВВ», 2005. – С. 193-195.
157. Эйдельмант, А. С. Все об облепихе / А. С. Эйдельмант. – М.: Издательство правления общества «Знание» Российской Федерации, 1992. – 80 с.
158. Экспериментальная фармакология - принципы, модели, анализ / А. В. Бузлама, В. А. Николаевский, Ю. Н. Чернов, А. И. Сливкин. – Воронеж:

Воронежский государственный университет, 2013. – 362 с. – ISBN 978-5-9273-2023-3.

159. Элементный состав и интенсивность накопления химических элементов в листьях сибирской облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) / Г. М. Скуридин, О. В. Чанкина, А. А. Легкодымов [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2014. – № 22. – С. 301-305.

160. Яцюк, В. Я. Биологически активные вещества крапивы двудомной / В. Я. Яцюк, Г. А. Чалый, О. В. Сошникова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2006. – № 1. – С. 25-29.

161. Яшин, Я. И. Лекарственные препараты, лекарственные растения и БАДы с антиоксидантной активностью / Я. И. Яшин, А. Н. Веденин, А. Я. Яшин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17, № 3. – С. 496-505.

162. A preclinical study of the effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf extract on cutaneous wound healing in albino rats / A. Gupta, R. Kumar, K. Pal [et al.] // The international journal of lower extremity wounds. – 2005. № 4(2). – P. 88–92.

163. Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study / S. Saggu, H. M. Divekar, V. Gupta [et al.] // Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. – 2007. – № 45(4). – P. 609-617.

164. Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from *Hippophae Species*-A Review / M. Ji, X. Gong, X. Li [et al.] // Molecules [Electronic resource]. – 2020. – № 25(4). – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32092874/> (date of treatment: 06.05.2025).

165. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves / L. Ganju, Y. Padwad, Singh R. [et al.] // International immunopharmacology. – 2005. – № 5(12). – P. 1675–1684.

166. Arimboor, R. Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD / R. Arimboor, K. S. Kumar, C. Arumughan // J Pharm Biomed Anal. – 2008. – Vol. 12. – №47(1). – P. 31-38.

167. Bayraktar, V. Organic acids concentration in wine stocks after *Saccharomyces cerevisiae* fermentation / V. Bayraktar // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Vol. 6. – №3. – P. 97-106.

168. Begaa, S. Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region / S. Begaa, M. Messaoudi // *Biological trace element research*. – 2019. – № 187(1). – P. 301-316.

169. Bioactivity guided extraction of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *turkestanica*) leaves / A. Kumar, A. Paul, N. Tanveer // *Journal of Scientific and Industrial Research*. – 2013. – №72. – P. 307-311.

170. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties / R. M. Pop, Y. Weesepeel, C. Socaciu [et al.] // *Food Chem*. – 2014. – № 147. – P. 1-9.

171. Changes in content of major phenolic compounds during leaf development of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) / A. Morgenstern, A. Ekholm, P. Scheewe, K. Rumpunen // *Agricultural and Food Science*. – 2014. – № 23(3). – P. 207-219.

172. Comparative Studies on Antioxidant Activity, Total Phenol Content and High-Performance Thin Layer Chromatography Analysis of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) Leaves / A. K. Singh, D. P. Attrey, T. Naved // *Pharmacognosy Journal*. – 2014. – № 6(5). – P. 5-8.

173. Comparison of Extraction Methods for the Determination of Antioxidant Activity in Extracts of *Hippophae Rhamnoides* L. and *Lippia Citriodora* // A. Roidaki, P. G. Zoumpoulakis, C. Proestos // *The Effect of Seasonal Collection. Austin J Nutri Food Sci*. – 2015. – №3(1). – P. 1057.

174. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages / Y. Padwad, L. Ganju, M. Jain [et al] // *International immunopharmacology*. – 2006. – № 6(1). – P. 46-52.

175. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats / S. Geetha, M. Sai Ram, S. S. Mongia [et al.] // *Journal of ethnopharmacology*. – 2003. – № 87(2-3). – P. 247–251.

176. Jablonsky, M. Biologically active compounds of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) / M. Jablonsky, A. Haz, M. Jablonsky // 6th International Scientific Conference Renewable Energy Sources [Electronic resource]. – 2016. – URL: https://www.academia.edu/25858483/biologically_active_compounds_of_sea_buckthorn_hippophae_rhamnoides (date of treatment: 06.05.2025).
177. Jaroszevska, A. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). / A. Jaroszevska, W. Biel // Chilean journal of agricultural research. – 2017. – № 77. – P. 155-161.
178. Kauppinen, S. Producing Sea Buckthorn of High Quality / S. Kauppinen, E. Petruneva // Proceedings of the 3rd European Workshop on Sea Buckthorn.: Natural Resources Institute Finland (Luke), Helsinki, 2015. – 98 pp.
179. Mechanism of Wound-Healing Activity of *Hippophae rhamnoides* L. Leaf Extract in Experimental Burns / N. K. Upadhyay, R. Kumar, M. S. Siddiqui, A. Gupta // Evidence-based complementary and alternative medicine [Electronic resource]. – 2011. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19946025/> (date of treatment: 06.05.2025).
180. Molecular docking studies of anti-cancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia* / T. Usha, S. K. Middha, A. K. Goyal [et al.] // Journal of biomedical research. – 2014. – № 28(5). – P. 406-415.
181. Monitoring of HPLC profiles of selected polyphenolic compounds in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) plant parts during annual growth cycle and estimation of their antioxidant potential / M. Bittová, E. Krejzová, V. Roblová [et al.] // Central European Journal of Chemistry. – 2014. – № 12(11). – P. 1152-1161.
182. Pharmacognostical Characterization and Preliminary Phytochemical Investigation of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves / P. Dharam, A. Dharam, A. Singh [et al.] // Indo Global journal of Pharmaceutical Sciences. – 2012. – № 2. – P. 108-113.
183. Protective effect of ethanolic and water extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas / R. Vijayaraghavan, A. Gautam, O. Kumar [et al.] // Indian journal of experimental biology. – 2006. – № 44(10). – P. 821-831.

184. Remedial Prospective of *Hippophae rhamnoides* Linn. (Sea Buckthorn) / C. A. Patel, K. Divakar, D. Santani [et al.] // ISRN pharmacology [Electronic resource]. – 2012. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22530142/> (date of treatment: 06.05.2025).
185. Saggu, S. Effect of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf aqueous and ethanol extracts on avoidance learning during stressful endurance performance of rats: a dose dependent study / S. Saggu, R. Kumar // Phytotherapy research. – 2008. – № 22(9). – P. 1183-1187.
186. Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmeceuticals / M. B. Lalit, M. Venkatesh, S. N. Naik, S. Santosh // Food Research International. – 2011. – № 44. – P. 1718-1727.
187. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity / M. S. Kumar, R. Dutta, D. Prasad, K. Misra // Food Chem. – 2011. – № 127(3). – P. 1309-1316.
188. Suryakumar, G. Medicinal and Therapeutic Potential of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) / G. Suryakumar, A. Gupta // Journal of Ethnopharmacology. – 2011. – № 138. – P. 268-278.
189. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in *Mentha Aquatica* L / J. Szakova, P. Tlustoš, W. Goessler [et al.] // Archives of Environmental Protection. – 2011. – № 37(2). – P. 109-121.
190. The monthly dynamics of the protein biosynthesis in the leaves harvested from *Hippophae rhamnoides* L. varieties. / N. Badaluta, M. M. Zamfirache, L. A. Oprica [et al.] // Biology, Environmental Science, Agricultural and Food Sciences [Electronic resource]. – 2010. Published 15 December 2010. – URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-monthly-dynamics-of-the-protein-biosynthesis-in-Badaluta-Zamfirache/c6d06a8f8000656fafa6ff6144f7c5004fbc72b> (date of treatment: 06.05.2025).

191. The PASS: site Prediction of Activity Spectra for Substances. - URL: <http://way2drug.com/passonline/> (date of treatment: 06.05.2025).

192. The Phyto4Health: site by Database of Phytocomponents from Russian Pharmacopoeia Plants. - URL: <http://www.way2drug.com/p4h/index.php> (date of treatment: 06.05.2025).

193. Upadhyay, N. *IN vitro* and dermal toxicity studies for *Hippophae rhamnoides* L. leaf extract / N. Upadhyay, A. Gupta // Toxicology Letters [Electronic resource]. – 2010. – Vol. 196. – URL: <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2010.03.833> (date of treatment: 06.05.2025).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
 федеральное государственное
 бюджетное образовательное
 учреждение
 высшего образования
 «Воронежский государственный
 университет»
 (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Университетская пл., 1, Воронеж, 394018,
 Тел. (473) 220-75-31. Факс (473) 220-87-55.
 E-mail: office@main.vsu.ru
<http://www.vsu.ru>
 ОКПО 02068120. ОГРН 1023601560510
 ИНН/КПП 3666029505/366601001

30.06.2025 № 1500-159
 Па № 17821 от 08.07.2025

Генеральному директору
 ФГБУ «НЦЭСМП»
 МИНЗДРАВА РОССИИ,
 кандидату фармацевтических наук
 Косенко В.В.

Фармацевтический факультет Воронежского государственного университета направляет для рассмотрения проект ФС «Облепихи крушиновидной листья», разработанный сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии в результате выполнения диссертационной работы.

Декан фармацевтического факультета
 ФГБОУ ВО ВГУ,
 д.фарм.н., профессор


 Е.Е. Чупандина


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Облепихи крупновидной листья	ФС
<i>Hipporhaes rhamnoides folia</i>	Вводится впервые

Цельные, высушенные листья, заготовленные в период технической зрелости плодов (конец августа – начало сентября), многолетнего культивируемого или дикорастущего кустарника или небольшого дерева облепихи крупновидной – *Hipporhaes rhamnoides* L., сем. лоховых – *Eleagnaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Сырьё представляет собой цельные или частично измельчённые простые листья длиной от 2,5 до 9,5 см, шириной от 0,3 до 1,0 см с ребристым черешком или без него. Длина черешка 0,1-0,5 см, диаметр – 0,1 см. Листья линейной формы с узкоклиновидным нисбегающим основанием и притупленной верхушкой. Край листовой пластины цельный, жилкование – сетчатое, с сильно выдающейся главной жилкой с нижней стороны листа. Верхняя поверхность листа кожистая, блестящая. Нижняя поверхность имеет беловолочное опушение, густо усеяна бурыми точками (основания шпиковидных волосков). Цвет листьев сверху от зелёного до буровато-зелёного, снизу – серовато-белый, жилки и черешка – бурый. Запах слабый, специфический.

Измельченное сырье. Кусочки листьев и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм. Цвет кусочков на верхней стороне от светло-зеленого до буровато-зеленого, иногда с желтоватым оттенком, на нижней стороне — серо-зелёный, с сильно

выдающейся жилкой. Запах слабый, специфический.

Порошок. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Цвет порошка светло-зеленый или серо-зеленый. Смесь неоднородная, встречаются бурые и серовато-белые вкрапления. При рассмотрении под лупой (10х) видны от зеленых до серовато-зеленых кусочки листьев и коричневато-бурые кусочки черешков. Запах слабый, специфический.

Стереомикроскопические признаки

Цельное сырье. При рассмотрении листа с поверхности обнаружено, что обе стороны и жилка покрыты простыми многоклеточными щитковидными и щитковидно-звездчатыми волосками. На верхней стороне листа по частоте встречаемости преобладают волоски щитковидные, сидящие рыхло, не образуя плотного сплетения (1, а). Щитковидно-звездчатые волосками прозрачные или белые; цвет щитковидных волосков – бурый или буровато-оранжевый (место прикрепления волоска). Щитковидные волоски многоклеточные, представляют собой округлый щиток, состоящий из радиально расположенных лучисто вытянутых клеток, сросшихся краями, центральной частью прикрепляющийся к эпидермису (2, а). Щитковидно-звездчатые волоски также многоклеточные, по строению похожи на щитковидные, однако, отличающиеся наличием длинных несросшихся краями лучистых клеток, выходящих из щитка (2, б). На нижней стороне листа также щитковидные волоски буровато-оранжевые; щитковидно-звездчатые – белые или прозрачные, густо расположенные, полностью покрывая эпидермис (1, б). Редко встречаются единичные многоклеточные звездчатые волоски, состоящие из центральной клетки с отходящими в разные стороны лучами (2, в). При удалении волосков видно губчатое строение эпидермиса (1, в). По жилке (3, б) встречаются в основном щитковидные волоски – прижатые, буроватые, на черешке – от светло-желтого до буровато-оранжевого цвета (3, в).

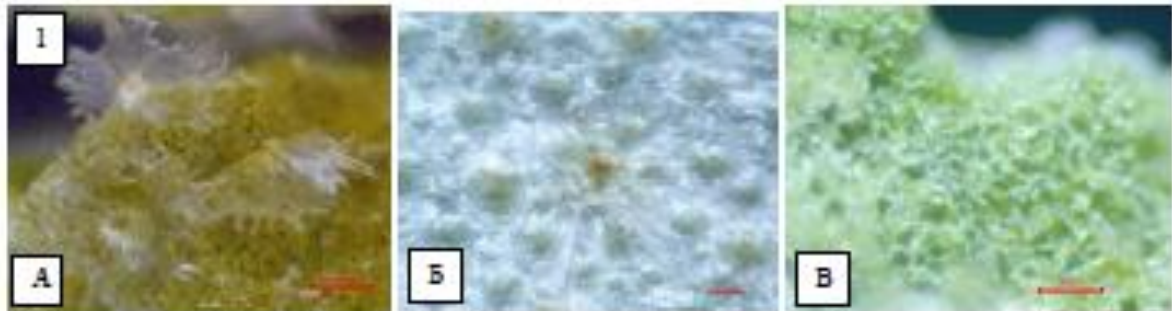


Рисунок 1 – Облепки крупинковидной листья

А – поверхность листа сверху, снизу (Б), под слоем волосков снизу (В) (100×)

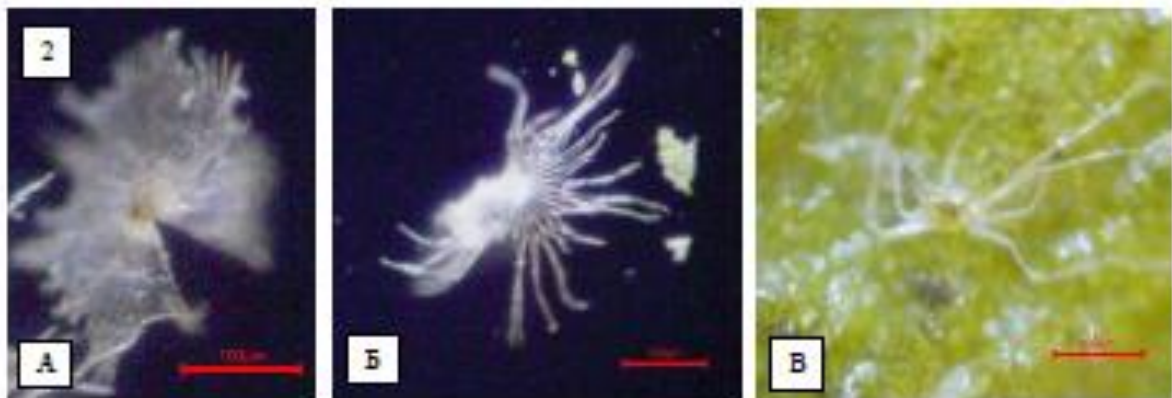


Рисунок 2 – Многоклеточные волоски (100×)

А – шишковидный, Б – шишковидно-звездчатый, В – звездчатый

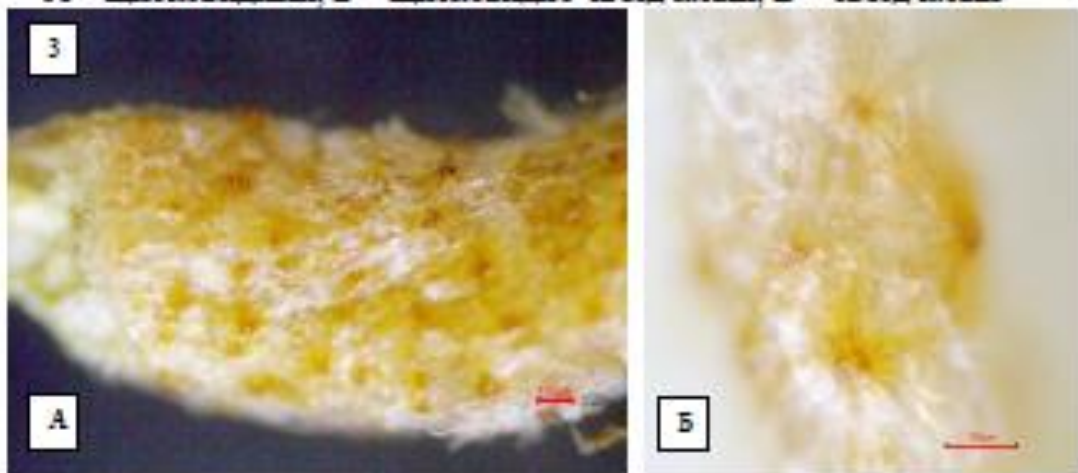


Рисунок 3 – Черешок и жилка листа

А – черешок (40×); Б – жилка с нижней стороны (100×)

Люминесцентный анализ.

Цельное сырье. На верхней и нижней поверхности листовой пластины обнаружена флуоресценция оснований (мест прикрепления) шишковидных и

щитковидно-звездчатых волосков (4, а, б). Нижняя сторона флуоресцирует ярче, чем верхняя, так как снизу более густое опушение (4, б). При отделении волоска от клеток основания наблюдается бледное желтовато-зеленоватое свечение (5, а, б). Пластинки, из которых состоят щитковидные волоски не обладают яркой люминесценцией, слабое свечение характерно для мест сочленения пластинок волоска. На жилке листа волоски прижаты, их основания выступают над поверхностью. Яркая выраженная флуоресценция, как на волосках поверхности листа, отсутствует. Собственно жилка обладает ярким свечением (6, а). Звездчатые волоски на фоне флуоресцирующей жилки коричневого цвета и не обладают свечением (6, б).

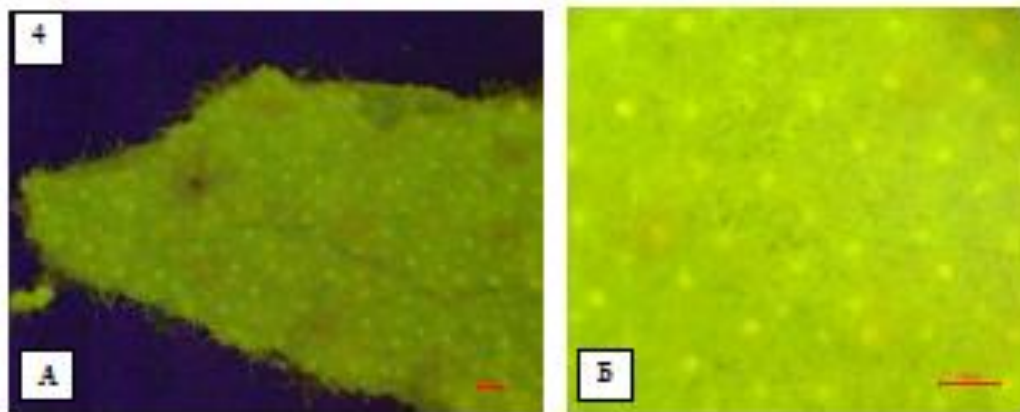


Рисунок 4 – Люминесценция поверхности обложки крупнолистной
А – поверхность листа сверху (40×), Б – снизу (100×)

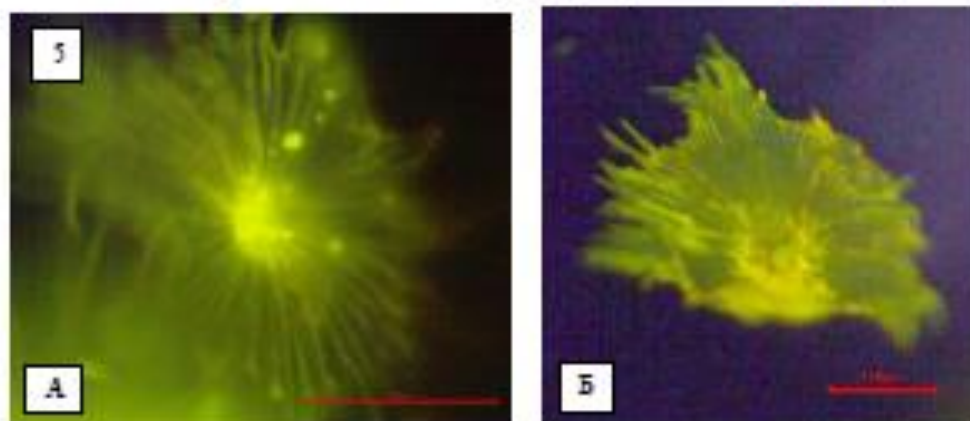


Рисунок 5 – Люминесценция щитковидных волосков (А – 400×, Б – 100×)

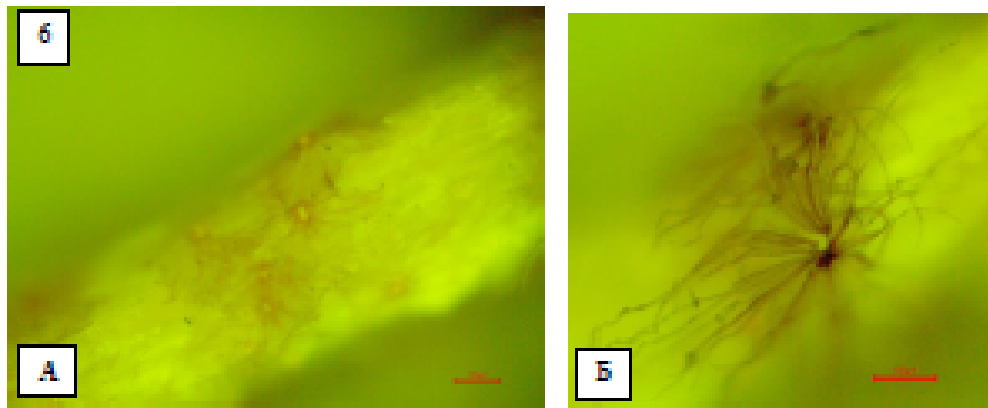


Рисунок 6 – Люминесценция жилки с нижней стороны (А – 100×, Б – 400×)

Микроскопические признаки. Цельное сырье. На верхней стороне листа клетки многоугольные, плотно прилегают друг к другу, имеют ровные стенки с хорошо заметным утолщением. Поперечный размер клеток в среднем 21,51 мкм, продольный – 24,47 мкм. В клетках визуализируются буроватые включения в виде песка (7). На эпидермисе встречаются 3 типа трихом: щитковидные, звёздчатые и щитковидно-звёздчатые (8, а, б, в). Основания щитковидных и щитковидно-звёздчатых волосков состоят из 4-7 вытянутых треугольных клеток.

Щитковидные волоски (8, в) представляют собой щиток из соединённых клеток, выходящих из основания и расходящихся к краю на короткие лучи. Щитковидно-звёздчатые волоски (8, б) имеют сходное строение с щитковидными, но при этом клетки, образующие щиток, срастаются не полностью, имея длинные расходящиеся лучи. Основания некоторых щитковидных и щитковидно-звёздчатых волосков окрашены в бурый цвет. Звёздчатые волоски (8, а) состоят из 3-7 лучисто-вытянутых клеток, не соединённых между собой.

На верхней стороне листа преобладают щитковидные ($0,82 \pm 0,074$ на 1 мм^2) и щитковидно-звёздчатые ($0,23 \pm 0,1$ на 1 мм^2) трихомы; звёздчатые встречаются реже ($0,15 \pm 0,052$ на 1 мм^2). Край листа завернут книзу, покрыт щитковидными и щитковидно-звёздчатыми волосками, которые в большом количестве встречаются и на центральной жилке (9). Чётко видно сетчатое

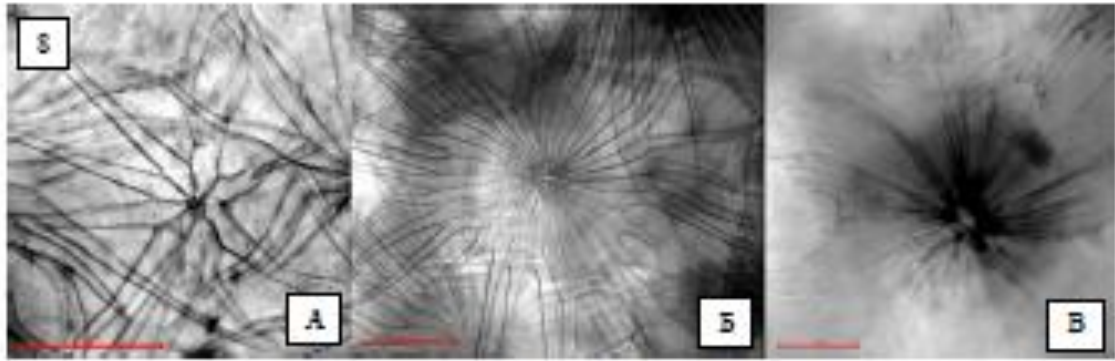


Рисунок 8 – Типы трихом (400×)

А – звездчатые, Б – щитковидно-звездчатые, В – щитковидные

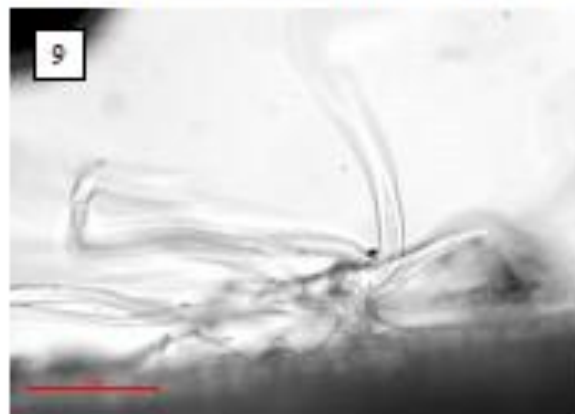


Рисунок 9 –Край листовой пластины (400×)

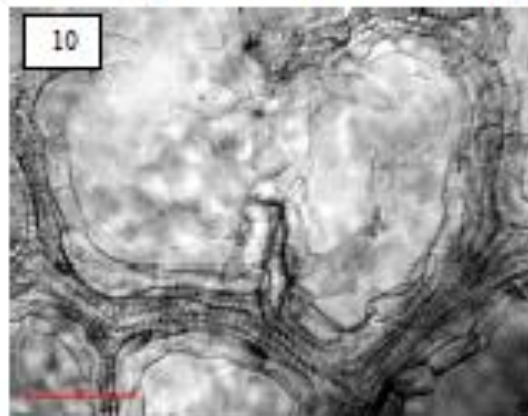


Рисунок 10 – Вторичные жилки (400×)

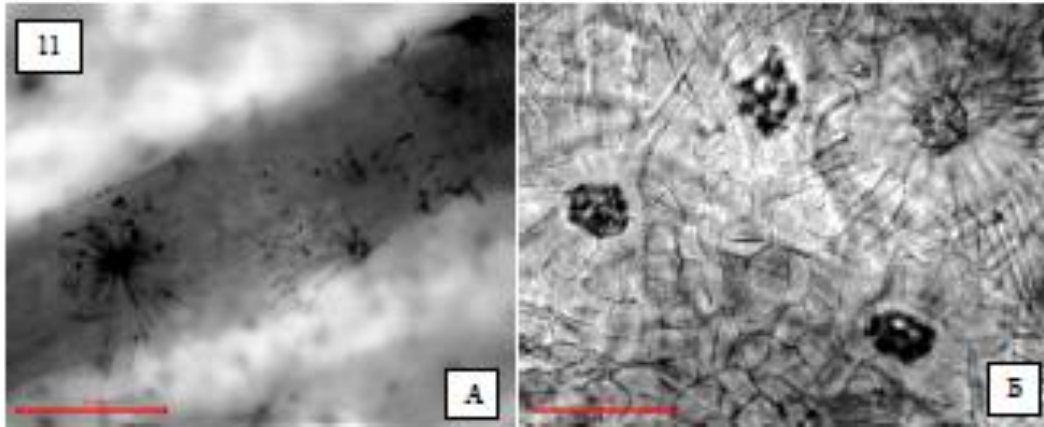


Рисунок 11 – Микроскопические признаки нижней стороны листа (400×)

А – вид жилки, Б – эпидермис с устьицами

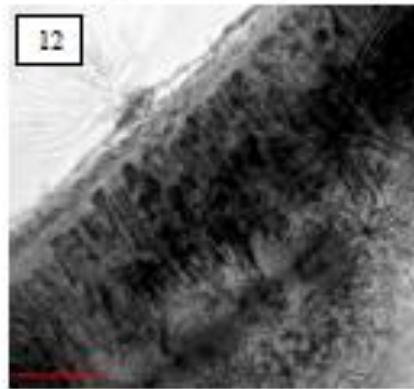


Рисунок 12 – Поперечный срез листовой пластины (400×)

Измельченное сырье. Встречаются кусочки различной формы. На верхней стороне видны толстостенные клетки с ровным краем, сверху встречаются щитковидные волоски (13, а). Нижняя сторона листа покрыта плотным слоем щитковидных, щитковидно-звездчатых, звездчатых трихом (13, б). Основания волосков проявляются в виде скопления клеток округлой формы бурого цвета (13, а, б).

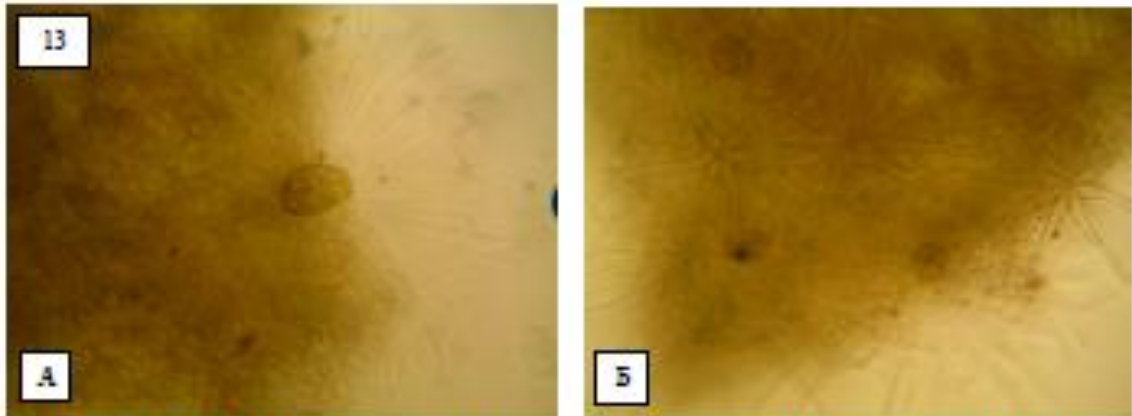


Рисунок 13 – Облепки крупновидной листья измельченные (400×)

А – эпидермис верхней стороны листа; Б – эпидермис нижней стороны листа

Порошок. Встречаются отдельные клетки, группы клеток с трихомами. Встречаются все виды трихом – шишковидные, шишковидно-звездчатые, звездчатые (14, а, б).

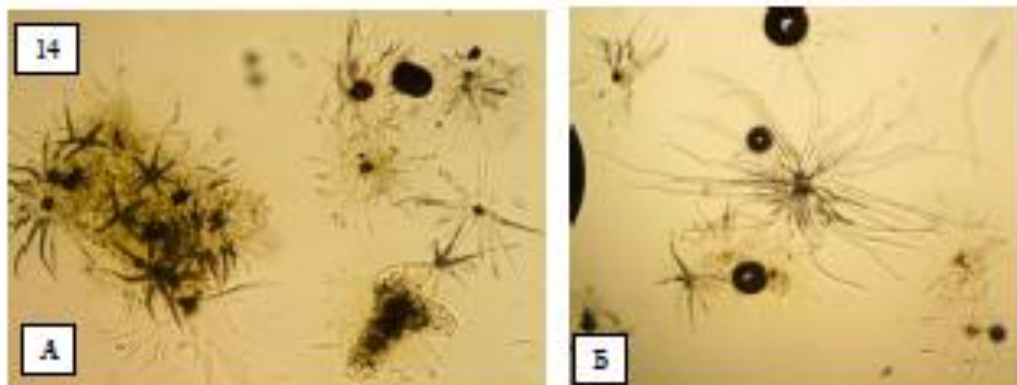


Рисунок 14 – Облепки крупновидной листья порошок (100×)

А – группы клеток с трихомами; Б – отдельные трихомы

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография. Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Пластинка. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подвижная фаза (ПФ). Этилацетат: ледяная уксусная кислота: вода (5:1:1).

Испытуемый раствор. Получение извлечения для проведения анализа

готовят путем экстракции сырья на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут, используя измельчённые листья с размером частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3,0 мм, с применением 70% спирта этилового в соотношении 1:50.

Раствор стандартного образца лютеолина. Растворяют 10 мг лютеолина в 10 мл спирта 70 %.

Реактив для детектирования. Алюминия хлорида раствор 5% в спирте 70%.

На линию старта пластинки размером 10×15 см полосами длиной 10 мм и шириной 2 мм наносят 7 мкл (0,007 мл) испытуемого раствора и 10 мкл раствора стандартного образца лютеолина. Пластинку с нанесёнными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет не менее 90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей при комнатной температуре. Затем пластинку опрыскивают реактивом для детектирования и просматривают в УФ-свете (365 нм).

Результат. На хроматограмме раствора стандартного образца лютеолина должна обнаруживаться зона адсорбции желто-зеленого цвета. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции желто-зеленого цвета на уровне зоны адсорбции лютеолина; допускается обнаружение других зон адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета (флавоноиды).

Качественная реакция. К 3 мл испытуемого раствора (раздел «Количественное определение. Сумма дубильных веществ в пересчете на танин») прибавляют 0,5 мл железа (III) аммония сульфата раствора 10%; раствор должен окраситься в чёрно-синий цвет (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более

10 % (в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 6 % (в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 1 % (в соответствии с требованиями ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

Измельченность сырья. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %.

Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). Цельное и измельченное сырье – не более 1 %.

Листья, поврежденные вредителями. Цельное и измельченное сырье – не более 2 %.

Листья, изменившие окраску (пожелтевшие, покрасневшие, потемневшие). Цельное и измельченное сырье – не более 2 %.

Органическая примесь. Цельное и измельченное сырье – не более 1 %.

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Заражённость вредителями запасов. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение степени заражённости лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок.* Сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,5%; сумма дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 10%; экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом этиловым – не менее 30%; экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 25%.

Сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 150 мл спирта этилового 70% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 45 мин при периодическом перемешивании. После нагревания колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы тем же растворителем

(спирт этиловый 70%). Объем извлечения фиксируют равным 150 мл. Извлечение фильтруют через 6 слоев марли, отжимая остатки сырья (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 5% (в спирте этиловом 70%) и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, перемешивают, доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и оставляют на 30 мин при дневном освещении (раствор Б).

Раствор сравнения. К 2,0 мл раствора А в мерной колбе вместимостью 25 мл прибавляют 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, доводят спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают (готовят параллельно с раствором Б).

Через 30 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы флавоноидов (X , %) в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times V_{\text{изв}} \times V_{\text{к}}}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times a \times (100 - W) \times l \times V_{\text{а}}}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора Б; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения лютеолина в комплексе с алюминия хлоридом, равный 549,41; $V_{\text{изв}}$ – объем извлечения, мл; $V_{\text{к}}$ – объем мерной колбы, мл; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %; $V_{\text{а}}$ – объем аликвоты, взятой для разведения, мл; l – толщина слоя в кювете, см.

Сумма дубильных веществ в пересчете на танин. В соответствии с требованиями ОФС «Определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1;

экстрагент – вода, спирт этиловый 70%).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и перевозка лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Приложение Б

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**
 НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2813186
**Способ выделения флавоноидов из лекарственного
растительного сырья**

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Воронежский государственный университет" (ФГБОУ
ВО "ВГУ") (RU)*

Авторы: *Ковалёва Наталья Александровна (RU), Тринеева
Ольга Валерьевна (RU), Дьякова Нина Алексеевна (RU),
Чувикова Ирина Вячеславовна (RU)*

Заявка № 2023116586

Приоритет изобретения **22 июня 2023 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **07 февраля 2024 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **22 июня 2043 г.**

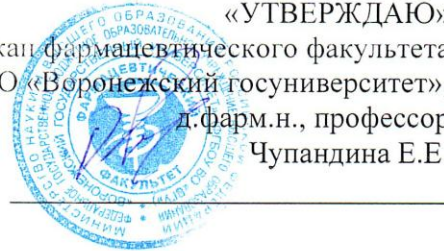
*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Ю.С. Зубов



Приложение В

«УТВЕРЖДАЮ»
 Декан фармацевтического факультета
 ФГБОУ ВО «Воронежский госуниверситет»,
 д.фарм.н., профессор
 Чупандина Е.Е.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1500-18

г. Воронеж

30 января 2025 года

1. Наименование для предложения:

Материалы диссертационного исследования «Фармакогностическое изучение листьев облепихи крушиновидной».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:

Аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Ковалёва Н.А.

3. Где и когда внедрено:

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет.

4. Эффективность внедрения:

Предлагаемое внедрение используется при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по ДПО «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» по тематике фармакогностического анализа и проблем идентификации нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья.

К.фарм.н., доцент кафедры
 фармацевтической химии и фармакогнозии
 фармацевтического факультета ВГУ

Карлов П.М.

К.фарм.н., доцент кафедры
 управления и экономики фармации
 фармацевтического факультета ВГУ

Колосова О.А.

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и
фармакогнозии фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО «Воронежский госуниверситет»,
д.фарм.н., профессор
Тринеева О.В.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1506-26

г. Воронеж

20 января 2025 г

1. Наименование для предложения:

Материалы диссертационного исследования «Фармакогностическое изучение листьев облепихи крушиновидной».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:

Аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Ковалёва Н.А.

3. Где и когда внедрено:

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии.

4. Эффективность внедрения:

Внедряемые материалы будут использованы для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации профессионального модуля ПМ.01 «Лекарствоведение» (МДК «Лекарственные растительные препараты») для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 «Фармация» (СПО). Предлагаемое внедрение полезно также при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья.

Д.фарм.н., доцент кафедры
фармацевтической химии и фармакогнозии
фармацевтического факультета ВГУ

Гудкова А. А.

К.фарм.н., доцент кафедры
фармацевтической химии и фармакогнозии
фармацевтического факультета ВГУ

Чистякова А.С.

«УТВЕРЖДАЮ»
 Заведующий кафедрой фармацевтической химии и
 фармацевтической технологии фармацевтического факультета
 ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет
 имени Н.Н. Бурденко»,
 д.хим.н., доцент
 Рудакова Л.В.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 25/1

г. Воронеж

20 января 2025 г

1. Наименование для предложения:

Материалы диссертационного исследования «Фармакогностическое изучение листьев облепихи крушиновидной».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:

Аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Ковалёва Н.А.; и.о. заведующего кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Тринеева О.В.

3. Учреждение-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет».

4. Где и когда внедрено:

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии.

5. Эффективность внедрения:

Внедряемые материалы будут использованы для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармацевтическая химия» для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО). Предлагаемое внедрение полезно при проведении научно-исследовательских работ по разработке методик выделения, а также последующего разделения некоторых групп биологически активных веществ природного происхождения (флавоноидов, дубильных веществ, каротиноидов, хлорофиллов и аминокислот) методом тонкослойной хроматографии.

К.хим.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГМУ

Сафонова Е.Ф.

К.хим.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГМУ

Никитина Т.Н.

Приложение Г

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Ботанический сад им. профессора Б.М. Козо-Полянского ВГУ

Утверждаю
Директор ботанического сада ВГУ
К. с.-х. наук, доцент
Воронин А.А.
«22» _____ 2025 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ ЛИСТЬЕВ**

Согласовано: ведущий биолог
ботанического сада

Комова А.В.

Воронеж – 2025

Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) – многолетнее культивируемый или дикорастущий кустарник или небольшое дерево, принадлежащее к семейству лоховых (*Eleagnaceae*), роду облепиха (*Hippophae*).

Высота растения достигает 3,5-8 м, диаметр 20 см. Ветви имеют острые колючки длиной 2-7 см. Корневая система преимущественно поверхностная, уходящая от ствола на 10-12 м. Окраска коры побегов отличается в зависимости от возраста: побеги текущего сезона имеют коричневатозелёный цвет, прошлогодние побеги – серовато-коричневые, а более старые – тёмно-коричневые.

Листья простые, короткочерешковые, цельнокрайние, имеют линейную форму с заострённой верхушкой и клиновидным основанием, длина варьирует от 2,0 до 8,0 см, а ширина не более 1,0 см. Окраска сверху от зелёной до серовато-зелёной, снизу – беловатая (из-за беловойлочного опушения).

Цветки однополые, растение двудомное. Мужские особи отличаются более крупными почками (в 2-3 раза) с 5-7 кроющими почечными чешуями (у женских их 2). Мужские цветки в коротких колосьях серебристо-бурого цвета у основания молодых веточек, с двураздельным зеленоватым или зеленовато-бурым околоцветником и 4 тычинками. Женские цветки жёлтого цвета с трубчатым двураздельным зеленовато-бурым околоцветником образуют пучки, расположенные в пазухах молодых побегов и колючек (до 11 штук в пучке).

Плоды – односемянные костянки округлой, яйцевидной, обратнойцевидной или продолговатой формы от золотисто-жёлтого до красно-оранжевого цвета, длиной до 1,0 см.

Цветёт – в апреле-мае, когда распускаются листья, плоды созревают в августе-сентябре.

Растение широко распространено на территории России. Ареал естественных зарослей облепихи очень прерывистый. Самой Западной

границей служит Калининградская область и дельта р. Дунай, а восточной – отдельные куртины и кусты по р. Ингоде в Читинской области; обычно большие заросли (куртины) приурочены к горным речным системам, дренированным поймам, побережным участкам. На Северном Кавказе облепиха крушиновидная распространена на территории Дагестана и Кабардино-Балкарии в пойменных зарослях рек, в горах и на равнинах. В Закавказье облепиха встречается в Азербайджане, Армении и Грузии. В Средней Азии облепиха произрастает в долинах реки и по берегам озёр. На территории Сибири облепиха распространена в Тыве, Бурятии и на Алтае и произрастает преимущественно в долинах степных рек, местами образуя крупные заросли. В Кабардино-Балкарской Республике облепиха крушиновидная распространена в субальпийском, лесостепном и поясе остепнённых лугов. Ареал охватывает Баксанский, Терский, Черекский, Зольский, Урванский, эльбрусский и Чегемский районы. Облепиха произрастает на равнинах, в предгорных и горных районах (по берегам и в поймах рек).

Для целей заготовки плодов облепиху крушиновидную культивируют. Основными центрами изучения и селекции облепихи являются: Ботанический сад МГУ, НИИСС им. М.А. Лисавенко, Центральный сибирский ботанический сад СО РАН; ГНУ ВНИИСПК, ГБС им. Н.В. Цицина РАН, Петербургский ботанический сад, и, особенно, ВИЛАР. На территории ВИЛАР культивируется облепиха крушиновидная для производства препарата «Гипорамин» на основе сухого экстракта листьев.

Облепихи крушиновидной листья заготавливают в период массового плодоношения в конце августа-начале сентября в сухую погоду. Вручную осторожно ощипывают или срезают ножницами с черешком или с частью черешка развитые листья из средних и нижних ярусов растения. При заготовке с дикорастущих особей нужно оставлять часть из них, чтобы растения не погибли. Из собранных листьев удаляют случайно попавшие другие части растения – колючки, веточки, а также листья, изменившие

окраску (пожелтевшие, потемневшие) или поражённые вредителями и болезнями. Сушку сырья осуществляют воздушно-теневым способом. Листья раскладывают тонким слоем в хорошо проветриваемом помещении или в тени на открытом воздухе. Предпочтительнее сушить сырьё в сушилках с искусственным обогревом при температуре не выше 40 °С. Сушка считается законченной, если листья легко разламываются и крошатся [1-9].

Внешние признаки облепихи крушиновидной листьев

Сырьё представляет собой цельные или частично измельчённые простые листья длиной от 2,5 до 9,5 см, шириной от 0,3 до 1,0 см с ребристым черешком или без него. Длина черешка 0,1-0,5 см, диаметр – 0,1 см. Листья линейной формы с узкоклиновидным нисбегающим основанием и притупленной верхушкой. Край листовой пластины цельный, жилкование – сетчатое, с сильно выдающейся главной жилкой с нижней стороны листа. Верхняя поверхность листа кожистая, блестящая. Нижняя поверхность имеет беловолочное опушение, густо усеяна бурыми точками (основания щитковидных волосков). Цвет листьев сверху от зелёного до буровато-зелёного, снизу – серовато-белый, жилки и черешка – бурый. Запах слабый, специфический [10].

Испытания

Влажность. *Цельное сырьё, измельченное сырьё, порошок* – не более 10 %. **Зола общая.** *Цельное сырьё, измельченное сырьё, порошок* – не более 6 %. **Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Цельное сырьё, измельченное сырьё, порошок* – не более 1 % [11].

Измельчённость сырья. *Измельчённое сырьё:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). Цельное и измельченное сырье – не более 1 %. Листья, поврежденные вредителями. Цельное и измельченное сырье – не более 2 %. Листья, изменившие окраску (пожелтевшие, покрасневшие, потемневшие). Цельное и измельченное сырье – не более 2 %. Органическая примесь. Цельное и измельченное сырье – не более 1 %. Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 0,5 %.

Также облепихи крушиновидной листья должна выдержать испытания на примеси тяжёлых металлов и мышьяка, остаточных пестицидов, радионуклидов, микробиологическую чистоту, заражённость вредителями запасов, что регламентируется соответствующими ОФС ГФ РФ XV [12].

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок.* Сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин – не менее 0,5%; сумма дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 10%; экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом этиловым – не менее 30 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 25% [13-15].

Готовое сырьё упаковывают в тюки или кипы. Упаковочная тара должна быть крепкой, сухой, чистой, без посторонних запахов. Хранят сырьё на стеллажах, в сухом, хорошо проветриваемом помещении, защищённом от воздействия прямого солнечного света. Срок годности 2 года.



Рис. 1. Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) [2,3,5]

Источники использованной литературы:

1. Корреляционный анализ фенофаз и феноинтервалов у сортов Облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) в коллекции ГБС РАН им. Н.В. Цицина / А.В. Исачкин, И.Н. Зубик, А.В. Потапова, М.А. Ермаков // Вестник

- Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 2. – С. 64-69.
2. Трофимов, Т.Т. Облепиха / Т.Т. Трофимов. – Москва: Издательство Московского университета, 1988. – 224 с.
 3. Царькова, Т.Ф. Облепиха / Т.Ф. Царькова. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1987. – 32 с.
 4. Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры / под ред. В. В. Титка, В. Н. Решетникова. – Минск: Беларуская навука, 2012. – 345 с. – ISBN 978-985-08-1430-2.
 5. Эйдельмант, А.С. Все об облепихе / А.С. Эйдельмант. – М.: Издательство правления о-ва «Знание» Российской Федерации, 1992. – 80 с.
 6. Аксенова, Н.А. О новых сортообразцах облепихи селекции ботанического сада Московского университета / Н.А. Аксенова, В.С. Долгачева // Новое в биологии, химии и фармакологии облепихи: Сборник научных трудов – Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1991. – С. 23-28.
 7. Барыкина, Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина. – Москва: МГУ имени М.В. Ломоносова, 2004. – 312 с. - ISBN 5-211-06103-9.
 8. Богомолова, Н.И. Продолжительность вегетационного периода и уровень его теплообеспеченности у различных сортов облепихи крушиновидной в условиях средней полосы России / Н.И. Богомолова // Аграрный вестник Урала. – 2009. - №1(55). – С. 34-36.
 9. Ершова, И.В. Сортовое разнообразие алтайской облепихи по биохимическому составу плодов / И.В. Ершова // Плодоводство и ягодоводство России. – 2012. – Т. 31, № 1. – С. 163-170.
 10. Ковалёва, Н.А. Внешние признаки измельченного и порошкованного сырья облепихи крушиновидной листьев / Н.А. Ковалёва, А.И. Колотнева, Д.К. Носова // Innovative research projects: Сборник статей Международного

научно-исследовательского конкурса, Петрозаводск, 14 февраля 2022 года. – Петрозаводск: Международный центр научного партнерства «Новая Наука» (ИП Ивановская И.И.), 2022. – С. 202-205.

11. Ковалёва, Н.А. Исследование элементного состава облепихи крушиновидной (*Hipporhae rhamnoides* L.) листьев / Н.А. Ковалева, О.В. Тринеева // Микроэлементы в медицине. – 2022. – Т. 23, № 3. – С. 45-58.

12. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издание: офиц. сайт. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 06.05.2025).

13. Ковалёва, Н.А. Определение некоторых биологически активных веществ в листьях облепихи крушиновидной титриметрическими методами / Н.А. Ковалёва, О.В. Тринеева, И.В. Чувикова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2023. – № 2. – С. 97-102.

14. Ковалёва, Н.А. Определение экстрактивных веществ в листьях облепихи крушиновидной / Н.А. Ковалёва, О.В. Тринеева, Д.К. Носова, А.И. Колотнева // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2022. – № 1. – С. 105-109.

15. Ковалёва, Н.А. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии / Н.А. Ковалёва, О.В. Тринеева, И.В. Чувикова, А.И. Сливкин // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – Т. 13, № 2. – С. 216-226.

Приложение Д

Таблица Д.1 – Качественные реакции, использованные в работе на основные группы БАВ листьев

Определяемая группа БАВ	Соединение	Добавляемые реактивы	Эффект реакции	Результат
Витамины	Кислота аскорбиновая	Раствор калия перманганата	Обесцвечивание	+
		Раствор йода	Обесцвечивание	+
		Раствор серебра нитрата	Серебристо-бурый осадок	+
Полисахариды	Крахмал	Раствор йода	Сине-фиолетовое окрашивание	-
		Раствор натрия гидроксида	Жёлтое окрашивание	+
	Слизи	Спирт этиловый 95%	Хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии	+
		Раствор аммиака	Лимонно-жёлтое окрашивание	+
		Раствор свинца ацетата	Белый осадок	+
		Инулин	Раствор йода	Оранжевое окрашивание
	Резорцин, кислота хлористоводородная разведённая		Красное окрашивание	-
	Сапонины	-	Встряхивание извлечения в течение 1 минуты	Стойкая пена
Соль магния (магния сульфат)			Осадок	+
Кислота серная концентрированная			Красное или красно-фиолетовое окрашивание	+
Хлороформ, кислота серная концентрированная (реакция Сальковского)			Окрашивание органического слоя в оранжевый цвет	+
0,01 М раствор кислоты хлористоводородной, 0,01 М раствор натрия гидроксида			Стероидные сапонины – в пробирке со щелочью столб пены будет выше. Тритерпеновые сапонины – образуется пена, примерно равная по объему и стойкости или в пробирке с кислотой столб пены будет выше.	+(с кислотой столб пены выше)

Продолжение Таблицы Д.1

Простые фенолы и дубильные вещества	Арбутин	Железа сульфат закисный	Красновато-фиолетовое, затем тёмно-фиолетовое окрашивание, переходящее в тёмно-фиолетовый осадок	+	
	Таннины	Раствор железоаммонийных квасцов	Гидролизуемые дубильные вещества – черно-синее окрашивание, а конденсированные – черно-зеленое.	Тёмно-синее окрашивание	
		5%-й раствор калия бихромата		Жёлто-коричневый осадок	+
		Натрия нитрит, раствор кислоты хлористоводородной		При наличии гидролизуемых дубильных веществ в извлечении образуется красно-коричневое окрашивание раствора.	Красно-коричневое окрашивание
Флавоноиды	Флавонолы, флаваноны, флавоны, антоцианы	Магний, кислота хлористоводородная концентрированная (цианидиновая реакция)	Изменение окраски	-	
	Флавонолы, флаваноны, халконы, ауроны, флавоны	1%-й раствор железа (III) хлорида	Сине-зелёное окрашивание (флавонолы)	+	
	Флавоны, флавонолы, флаваноны, халконы, ауроны, антоцианы	Раствор аммиака	Жёлтое окрашивание (флавоны, флавонолы, флаваноны)	+	
	Флавоны, халконы, ауроны, антоцианы	Раствор ацетата свинца среднего	Жёлтые хлопья в растворе (флавоны, халконы, ауроны)	+	
Антрацен производные	-	Раствор натрия гидроксида 10%, вода очищенная, раствор кислоты хлористоводородной 10%, хлороформ, раствор аммиака 10% (реакция Борнтрегера)	При наличии 1,8-диоксиантрахинонов аммиачный слой принимает вишнево-красное окрашивание, 1,4-диоксиантрахинонов – пурпурное окрашивание, 1,2-диоксиантрахинонов – фиолетовое окрашивание.	Пурпурное окрашивание	

Продолжение Таблицы Д.1

		Сублимация, раствор натрия гидроксида 5% спиртовой	Жёлтые капли или жёлтые игольчатые кристаллы	Жёлтый цвет капель, переходящий в бурый
--	--	--	--	---

Приложение Е

Таблица Е.1 – Прогнозирование фармакологических эффектов основных биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной *in silico*

Фармакологическая активность	Кверцетин		Нарциссин		Рутин		7-рамнозид-3-глюкозид изорамнетина		Стриктинин I		Изостриктинин		Казуариктин		Казуаринин		Лютеолин	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Ингибитор проницаемости мембраны	0,938	0,003	-	-	0,990	0,000	0,961	0,002	0,647	0,063	0,636	0,068	-	-	-	-	-	-
Агонист целостности мембраны	0,973	0,002	-	-	-	-	0,936	0,004	-	-	-	-	-	-	-	-	0,965	0,003
Противовоспалительный	0,689	0,017	-	-	0,728	0,013	-	-	0,809	0,006	0,765	0,009	0,865	0,005	0,699	0,016	-	-
Вяжущий	0,729	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Антиоксидант	0,872	0,003	-	-	0,923	0,003	-	-	0,840	0,003	0,844	0,003	0,932	0,003	0,658	0,004	0,775	0,004
Гепатопротектор	0,706	0,007	-	-	0,968	0,001	0,833	0,004	0,919	0,002	0,890	0,003	0,864	0,003	0,749	0,005	-	-
Лечение заболеваний печени	-	-	-	-	0,704	0,005	-	-	0,633	0,005	0,596	0,007	0,621	0,005	-	-	-	-
Слабительное	-	-	-	-	0,776	0,002	0,892	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кровоостанавливающий	0,771	0,003	-	-	0,993	0,001	0,840	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кардиопротектор	0,833	0,003	-	-	0,988	0,001	0,830	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	0,756	0,004
Сосудорасширяющее	-	-	-	-	0,740	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вазопротектор	0,824	0,004	-	-	0,980	0,001	0,953	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	0,901	0,003
Лечение ломкости капилляров	0,737	0,001	-	-	0,939	0,000	0,752	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Антигиперхолестеринемический	-	-	-	-	0,900	0,003	0,644	0,011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Противоинфекционный	-	-	-	-	0,657	0,009	0,811	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Антибактериальный	-	-	-	-	0,677	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Противогрибковый	-	-	-	-	0,784	0,006	0,700	0,010	-	-	0,714	0,009	-	-	-	-	-	-

Продолжение Таблицы Е.1

Антипротозойный	-	-	-	-	0,907	0,003	0,914	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Противовирусный (грипп)	-	-	-	-	0,743	0,004	0,679	0,007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Химиопрофилактика	0,717	0,006	-	-	-	-	-	-	0,867	0,003	0,807	0,004	0,835	0,003	0,675	0,007	-	-
Противоопухолевый	0,797	0,012	-	-	0,849	0,007	0,814	0,010	0,888	0,005	0,861	0,006	0,902	0,005	0,911	0,005	0,783	0,014
Противоопухолевый (рак лёгких)	-	-	0,699	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Антиканцерогенный	0,757	0,007	-	-	0,983	0,001	0,893	0,003	0,831	0,004	0,721	0,008	-	-	-	-	-	-
Цитостатический	-	-	-	-	-	-	0,852	0,005	0,900	0,004	0,748	0,008	0,789	0,007	0,795	0,007	-	-
Антимутагенный	0,940	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,940	0,001
Иммунодепрессант	-	-	-	-	-	-	0,653	0,023	0,736	0,013	0,768	0,009	0,745	0,012	-	-	-	-
Лечение пролиферативных заболеваний	0,614	0,010	-	-	0,952	0,001	0,780	0,004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Радиопротектор	-	-	-	-	0,725	0,009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

В таблицах Е.1 и Е.2 указаны вероятности проявления в эксперименте фармакологических либо токсических эффектов (P_a) или отсутствие активности (P_i), значимыми считали величины $P_a > 0,7$.

Таблица Е.2 – Прогнозирование токсических эффектов основных БАВ листьев облепихи крушиновидной *in silico*

Токсические эффекты	Кверцетин		Нарциссин		Рутин		7-рамнозид-3-глюкозид изорамнетина		Стриктинин I		Изостриктинин		Казуариктин		Казуаринин		Лютеолин	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Токсичный	-	-	-	-	0,851	0,019	-	-	0,906	0,011	0,897	0,012	0,865	0,017	0,872	0,015	-	-
Нейротоксический	-	-	-	-	0,882	0,007	0,789	0,018	0,898	0,005	0,770	0,021	0,843	0,013	0,822	0,015	-	-
Боль	-	-	-	-	-	-	-	-	0,745	0,031	-	-	-	-	-	-	-	-
Нарушение сна	-	-	-	-	0,859	0,016	0,702	0,040	0,699	0,041	0,676	0,046	-	-	-	-	-	-

Продолжение Таблицы Е.2

Эндокринный деструктор	0,706	0,014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,734	0,012
Репродуктивная дисфункция	0,719	0,032	-	-	0,691	0,038	0,735	0,029	0,857	0,012	-	-	0,804	0,018	-	-	0,819	0,016
Эмбриотоксический	-	-	-	-	0,831	0,010	0,726	0,020	0,815	0,011	0,786	0,014	-	-	-	-	-	-
Тератоген	-	-	-	-	0,832	0,010	0,754	0,017	-	-	0,693	0,023	-	-	-	-	-	-
Генотоксичность	-	-	-	-	-	-	-	-	0,889	0,003	-	-	-	-	-	-	0,824	0,004
Канцерогенный	-	-	-	-	-	-	-	-	0,907	0,004	-	-	-	-	-	-	-	-