

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И. М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Нестеров Георгий Викторович

**Изучение показателей качества листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.)  
*Moench; Alnus glutinosa* (L.) Gaertn**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**

кандидат фармацевтических наук, доцент  
Литвинова Татьяна Михайловна

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
1.1. Краткий очерк исторических тенденций использования соплодий и листьев ольхи видов <i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.; <i>A. incana</i> (L.) Moench. в медицине .....	16
1.2. Ботанико-фармакогностическая характеристика особенностей семейства <i>Betulaceae</i> и рода <i>Alnus</i> .....	21
1.2.1. Краткая характеристика семейства ( <i>Betulaceae</i> ).....	21
1.2.2. Особенности рода Ольха ( <i>Alnus</i> ) .....	22
1.3. Описание особенностей мест обитания, ареала распространения и принципов заготовки сырья ольхи видов черная и серая .....	24
1.4. Краткая характеристика современного состояния изученности химического состава листьев ольхи черной и серой .....	26
1.5. Особенности фармакологического действия извлечений из листьев ольхи серой и черной .....	31
1.6. Оценка современной проблемы антибиотикорезистентности и возможных путей ее решения .....	34
1.7. Выводы к Главе 1 .....	41
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Характеристика объектов исследования, особенностей заготовки, консервации и хранения листьев ольхи серой и черной .....	44
2.2. Краткая характеристика методов анализа, применяемых при исследовании соплодий и листьев ольхи фармакопейных видов.....	46
2.2.1. Определение экстрактивных веществ в листьях ольхи .....	47
2.2.2. Анализ тритерпеновых сапонинов .....	47
2.2.3. Определение содержания каротиноидов и хлорофилла в листьях ольхи .....	49
2.2.4. Изучение состава и оценка суммарного содержания флавоноидов .....	49
2.2.5. Изучение состава и оценка суммарного содержания фенолкарбоновых кислот .....	51

2.2.6. Изучение состава и оценка суммарного содержания органических кислот .....	53
2.2.7. Определение аминокислотного состава листьев ольхи .....	55
2.2.8. Определение дубильных веществ .....	56
2.2.9. Определение полисахаридов.....	58
2.2.10. Определение веществ-маркеров листьев ольхи серой и черной.....	60
2.3. Определение товароведческих показателей листьев ольхи.....	61
2.4. Определение антимикробной активности исследуемого сырья .....	62
2.5. Валидация применяемых в ходе исследования методик, статистическая обработка полученных экспериментальных данных.....	63
2.6. Разработка методического подхода к анализу листьев ольхи серой и черной на основе системного анализа нормативной документации и научной литературы .....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ <i>ALNUS INCANA</i> (L.) <i>MOENCH</i> И <i>ALNUS GLUTINOSA</i> (L.) <i>GAERTH</i> .....	
3.1. Изучение внешних признаков сырья ольхи серой и черной .....	65
3.2. Изучение микроскопических признаков листьев ольхи серой и черной .....	69
3.2.1. Изучение микродиагностических признаков свежих, высушенных и замороженных листьев ольхи .....	70
3.3. Выводы к Главе 3 .....	72
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ .....	
4.1. Результаты предварительного качественного группового анализа биологически активных веществ листьев ольхи черной и серой свежих, высушенных, замороженных .....	74
4.2. Оценка содержания экстрактивных веществ в листьях ольхи серой и черной .....	77

4.3. Определение содержания комплекса хлорофилла и каротиноидов в листьях ольхи .....	78
4.4. Идентификация и количественная оценка флавоноидов и фенолкарбоновых кислот листьев ольхи .....	81
4.5. Идентификация и количественная оценка органических кислот листьев ольхи .....	92
4.6. Результаты аминокислотного анализа листьев ольхи .....	96
4.7. Результаты оценки содержания полисахаридов в листьях ольхи серой и черной .....	98
4.8. Идентификация и количественная оценка содержания тритерпеновых сапонинов в исследуемом сырье.....	101
4.9. Анализ дубильных веществ в листьях ольхи .....	105
4.10. Определение веществ-маркеров листьев ольхи серой и черной.....	108
4.11. Итоговая оценка зависимости содержания биологически активных веществ листьев ольхи видов серая и черная (свежих, высушенных и замороженных) от консервации.....	113
4.12. Выводы к Главе 4 .....	114
<b>ГЛАВА 5. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ .....</b>	<b>117</b>
5.1. Разработка показателей качества нового лекарственного растительного сырья – листья ольхи.....	117
5.2. Изучение технологических параметров листьев ольхи серой и черной .....	121
5.3. Изучение адсорбционной способности измельченного шрота листьев ольхи .....	122
5.4. Определение антимикробной активности извлечений из листьев ольхи серой и черной .....	126
5.5. Выводы к Главе 5 .....	128
<b>ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ .....</b>	<b>130</b>

6.1. Оценка влияния некоторых параметров на показатели качества водных извлечений из листьев ольхи разных способов консервации.....	130
6.2. Сравнительный анализ некоторых показателей качества водных извлечений из листьев ольхи серой и черной .....	136
6.3. Особенности получения и оценка показателей качества водно-спиртового извлечения из листьев ольхи серой и черной.....	138
6.4. Выводы к Главе 6 .....	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	140
ВЫВОДЫ .....	141
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	143
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	166

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Оценивая программу технологического развития и повышения уровня лекарственного суверенитета «Фарма-2030» по развитию фармацевтической отрасли, В.В.Путин отметил необходимость дальнейшего наращивания инновационных конкурентоспособных лекарственных средств, в том числе на основе лекарственного растительного сырья.

В последние годы ученые стали больше интересоваться возможностью использования частей растений, которые в настоящее время не считаются лекарственным сырьем, но по своим фармакологическим свойствам и содержанию активных веществ могут соперничать с официальными источниками.

К такому растительному сырью можно отнести листья черной и серой ольхи, которые распространены по территории России и долгое время находили применение в народной медицине для лечения различных заболеваний.

В России в качестве лекарственного сырья в основном применяются соплодия ольхи, которые собираются вручную. Растения рода *Alnus* традиционно использовались в медицине различных народов для лечения инфекционных ран и кровотечений. В народной медицине Европы и Канады отвары из листьев ольхи служили в качестве средства против рака.

Информация о применении ольхи для лечения заболеваний желудка и данные о действии эллаготанинов послужили основой для создания нового препарата для терапии язв.

Некоторые виды ольхи зарегистрированы в России как разрешенные для медицинского применения. Листья черной ольхи также внесены в фармакопею Беларуси за их противовоспалительные и антиоксидантные свойства.

Тем не менее, несмотря на широкий спектр фармакологического действия и доступность дикорастущего сырья, листья черной и серой ольхи не признаны официальными и не включены в фармакопею, вероятно, из-за недостатка

систематизированных исследований активных компонентов и методов контроля качества. Комплексное изучение листьев ольхи и извлечений из них может подтвердить их потенциал в качестве сырья, что является важной задачей для современной фармации.

### **Степень разработанности темы исследования**

Исследование научной литературы выявило растущий интерес ученых к детальному анализу лекарственного растительного сырья, в частности, листьев ольхи, как источников природных антиоксидантов, способных бороться с оксидативным стрессом, который играет значимую роль в процессе старения.

С помощью хроматографических методов в листьях ольхи разных видов было обнаружено наличие гидроксикоричных кислот, флавонолов (кверцетин, кемпферол, мирицетин) и флаванолов, а также дубильных веществ. В работе Н.В. Шиловой было продемонстрировано, что водные экстракты из листьев ольхи клейкой могут замедлять рост опухолей и повышать эффективность химиотерапии, при этом значительно снижая ее токсичность для клеток крови. Д.В. Моисеев в своем исследовании установил антимикробные свойства экстракта листьев ольхи против *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Имеются данные о фармакологических испытаниях фитопрепарата альтан, основанного на эллаготанинах из соплодий ольхи клейкой и серой, который показал выраженное противоязвенное действие.

Однако, наибольшее внимание исследователей до сих пор сосредоточено на соплодиях ольхи и продуктах их переработки, в то время как опыт народной и официальной медицины ряда стран показывает, что листья ольхи обладают значительными фармакологическими свойствами.

## Цель и задачи исследования

**Целью** исследования является фармакогностическое изучение и научное обоснование характеристик подлинности и показателей качества нового вида растительного сырья – листьев ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench) и черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn), а также разработка и стандартизация лекарственных средств на их основе, в том числе антимикробного действия.

Для достижения поставленной нами цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Осуществить анализ отечественной и зарубежной научной литературы, характеризующей современное состояние проблемы исследований состава, фармакологического действия и особенностей стандартизации листьев ольхи видов черная и серая и перспектив создания на их основе лекарственных препаратов, а также состояние сегмента рынка антимикробных лекарственных средств растительного происхождения;

2. Провести анализ анатомо-морфологического строения нового растительного сырья - листьев ольхи, заготавливаемых от растений ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench) и черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) (цельного и измельченного), установить основные диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию и разработать критерии подлинности данного сырья;

3. Изучить качественный состав и количественное содержание БАВ (флавоноидов, тритерпеновых сапонинов, органических и фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, полисахаридов) для сырья листьев ольхи в свежем, замороженном и высушенном сырье и провести их сравнительную оценку. Разработать показатели качества и нормы, характеризующее содержание БАВ, а также методы их определения;

4. Провести определение товароведческих показателей листьев ольхи черной и серой, а также установить их нормы для включения в разрабатываемую НД;

5. Изучить влияние способа консервации, измельченности сырья и режимов получения водных и водно-спиртовых извлечений на их качество. Провести

определение показателей качества водных и водно-спиртовых извлечений и установить их нормы для включения в разрабатываемую НД; провести изучение антимикробного действия исследуемого сырья и получаемых на его основе водно-спиртовых извлечений листьев ольхи серой и чёрной;

б. Провести оценку адсорбционного действия отходов переработки листьев ольхи и оценить перспективность создания растительного энтеросорбента на их основе.

### **Научная новизна**

Получены новые данные в ходе исследования внешних и микроскопических признаков листьев ольхи видов серая и черная, установлены диагностические значимые признаки, для включения в соответствующие разделы, разрабатываемой НД.

С применением современных инструментальных физико-химических методов (ВЭЖХ-УФ, ГХМС, спектрофотометрия, ТСХ и др.) проведено изучение качественного состава и определено содержание изучаемых БАВ: флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, аминокислот, полисахаридов, дубильных веществ, сапонинов. Доказана идентичность качественного состава БАВ свежих, замороженных, высушенных, а также подвергшихся ферментации листьев ольхи. Впервые проведена оценка БАВ, извлекаемых из сырья ацетонитрилом, которые могут быть рассмотрены в качестве специфических маркеров экстрактов листьев ольхи черной и серой. По результатам количественного анализа выявлены закономерности изменения содержания БАВ в исследуемом сырье в зависимости от способа консервации, проявляющиеся в существенном снижении БАВ при использовании теплового режима сушки и незначительном – при замораживании. Подтверждена возможность получения экстракционных препаратов из свежего, замороженного и высушенного сырья листьев ольхи двух видов и проведена сравнительная оценка содержания в них сапонинов, органических кислот, флавоноидов, полисахаридов и дубильных

веществ. По результатам изучения антимикробной активности выявлено наличие антимикробного действия экстракционных препаратов из сырья на 8 штаммах микроорганизмов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты проведенных нами экспериментальных исследований позволяют значительно расширить представления о химическом составе БАВ, анатомо-морфологических признаках и биологической активности нового растительного сырья – листьев ольхи видов серая и черная. Научно обоснованы характеристики подлинности и показатели качества фармацевтических субстанций растительного происхождения – настойки и экстракта сухого листьев ольхи. Предложены методики качественного и количественного анализа основных БАВ в новом растительного сырья - листья ольхи, а также в извлечениях из сырья, которые включены в проекты НД.

### **Положения, выносимые на защиту**

- Результаты морфолого-анатомического изучения листьев ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench) и черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn);
- Результаты сравнительного исследования состава БАВ свежих, замороженных, высушенных листьев ольхи;
- Результаты по изучению состава БАВ извлечений из свежих, замороженных и высушенных листьев ольхи;
- Результаты разработки показателей качества листьев ольхи и методов их определения и норм;
- Результаты экспериментальных исследований по определению антимикробной активности исследуемого сырья листьев ольхи и извлечений на их основе.

## **Методология и методы исследования**

Методология работы основана на анализе и обобщении данных информационно-аналитического поиска, охватывающих фитохимическое и фармакологическое изучение листьев ольхи серой и черной, проработку изученности и актуальности темы, совокупность методов фармакогностического анализа, результаты которого могут быть положены в основу разрабатываемой нормативной документации на новые виды сырья - листья (*Folia Alni*).

В работе нами были применены современные физико-химические методы анализа, среди которых хромато-масс спектроскопия, тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, спектрофотометрия, гравиметрический и титриметрический анализ, биологические (макро- и микроскопический анализ, оценка антимикробной активности), фармакопейные методики ГФ XV изд. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XV изд. с применением программного обеспечения «Statistica 8,0»; «Microsoft Excel 2016».

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов исследований листьев ольхи черной и серой и экстракционных препаратов на их основе подтверждена проведением достаточного числа экспериментальных анализов с применением рутинных и современных аналитических методик, а также статистической обработкой результатов экспериментов и их сопоставлением с имеющимися данными научной литературы. Экспертная оценка подтвердила достоверность предоставленных автором первичных материалов. В работе также исследован максимально доступный объём литературных научных источников, как зарубежных, так и отечественных авторов.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на научной межкафедральной конференции кафедр фармации, фармацевтического естествознания, химии и фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А. П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (19 мая 2025 г.).

Материалы исследования были доложены автором на V Международной научно-практической конференции, Пенза: «Наука и Просвещение», 2018; XXVII Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации», Пенза: 2019; Международном научно-исследовательском конкурсе, Пенза: «Наука и Просвещение», 2019; XVI научно-практической конференция молодых учёных и студентов с международным участием ГОУ «ТГМУ им.Абу али ибн Сино», посвященной 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021) Душанбе – 2021; Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» Ташкент – 2021.

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит основополагающая роль в выборе темы диссертационного исследования, формировании цели и необходимых для ее достижения задач, разработке дизайна исследования, проведении экспериментальных анализов, интерпретации, критическом изучении и обобщении полученных данных. На всех этапах выполнения диссертационной работы, начиная от информационно-аналитического поиска, охватывающего проработку научной литературы, патентной и нормативной документации, постановки задач, заготовки сырья от растений, произрастающих на территории Московской и Тверской области, проведения экспериментальных исследований, статистической обработки, теоретического обобщения и анализа до обсуждения результатов в

представленных докладах и научных статьях – вклад автора является основным. Автором лично получены и интерпретированы все экспериментальные данные на используемом измерительном оборудовании, установлены показатели подлинности и доброкачественности листьев ольхи. Результаты проведенных исследований были доложены в научных публикациях и внедрены в практику научно-практических и образовательных учреждений непосредственно автором.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты проведенного исследования использованы в учебном процессе кафедры фармации Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 22.03.2022), кафедры фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института (акт внедрения от 15.03.2022), подготовлен проект ФС на новый вид сырья листьев ольхи. Предложенная автором методика идентификации и количественного определения суммарного содержания тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту в листьях ольхи внедрена для оценки качества фитопрепаратов ОКК ООО «ФАРМАПАРК» (акт внедрения 17.01.2022), а методика идентификации и количественного определения веществ флавоноидной природы апробирована и внедрена ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России (акт внедрения 17.01.2022).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты выполненного автором исследования полностью соответствуют направлению научных изысканий специальности, в том числе пунктам 2,3 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

## **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

Выполнение диссертационной работы проводили в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе данных (Scopus), 4 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, 4 иные публикации, 4 публикации в сборниках материалов всероссийских конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы и 48 рисунков, состоит из введения, обзора научной литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, списка литературы, включающего 182 источника, в том числе 114 иностранных, приложения. Принцип построения диссертационной работы представлен на Рисунке 1.

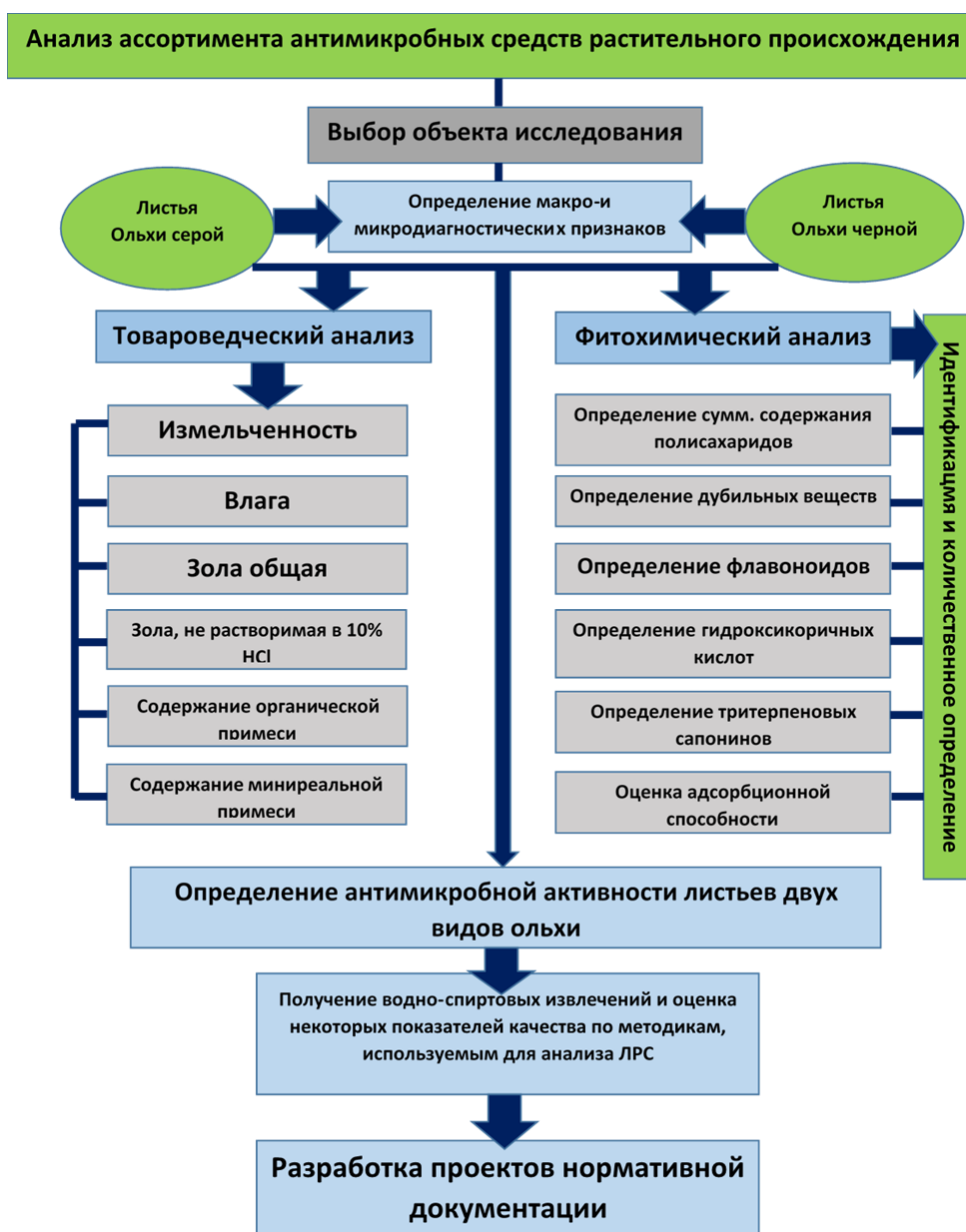


Рисунок 1 – Принцип построения диссертационной работы

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Краткий очерк исторических тенденций использования соплодий и листьев ольхи видов *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.; *A. incana* (L.) Moench. в медицине

Согласно современным ботаническим подходам, род ольха (*Alnus*) включает от 23 до 40 видов, распространенных, как правило, в зоне умеренного климата северного полушария, отмечается встречаемость отдельных видов в горных районах Южной Америки, а также в Юго-Восточной Азии. Представители рода ольха традиционно использовались разными народами в качестве лечебных и культовых средств, однако наибольшее применение находили у славянских племён. Ценность сырья ольхи в быте древнего общества доказывается сохранившимися распространенными легендами и мифами, в которых иносказательно или напрямую говорится о пользе и широком применении плодов и листьев растения. В диалектах многочисленных славянских племен ольха называется по-разному: вильха, вольха, елоха, елшина, ольшняк и др., однако вне зависимости от названия неизменным является утверждение о пользе растения, дарующего людям здоровье и долголетие. Народы древней Руси были убеждены, что ветви ольхи позволяют сохранить урожай от природной стихии, а человека – от хвори и сглаза.

Историки-энциклопедисты Древнего Рима Витрувий, Плиний и другие, описывая особенности быта, земледелия, врачевания народов Римской империи неоднократно упоминают растения, именуемые *Alnus* [12]. Согласно римской мифологии Rhea Silvia (Рея Сильвия, Илия), родившая двух близнецов Ромула и Рея, основавших впоследствии Рим, спасая младенцев, положила их в ковчег, сделанный из древесины ольхи и высланный ольховыми листьями, сила которых призвана защищать от невзгод и болезней, и отправила в нем вниз по течению реки. Описание растения содержится в основополагающем труде «*Historia plantarum*» Теофраста (370-286). Исторические манускрипты свидетельствуют, что многие

известные врачеватели Древнего мира и Средневековья широко использовали в своей врачебной практике, а также для профилактики многих заболеваний соплодия, листья, кору, ветви ольхи разных видов в свежем и переработанном виде. Дошедшие до нас научные труды знаменитых ученых-энциклопедистов древнего мира Гиппократ, Авла Корнелия Цельса, Diosкорида и многих других включают данные о применении различных снадобий на основе соплодий или листьев ольхи при врачевании кровотечений, воспалений, лихорадки, при расстройствах пищеварения, как вяжущее, противоотечное средство, а также в составе многокомпонентных териакон и других, применяемых в то время лекарственных прописей [13, 36, 38, 45, 43, 57, 115].

Ефросиния Полоцкая рекомендовала больных лихорадкой-«лихоманкой» сажать в бочку, наполненную листьями ольхи и укутывать по горло одеялом, через час жар должен отступить.

Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм (Парацельс), сформулировавший теорию о сигнатурах (*signa natura* – знаки природы), согласно которой внешний вид объекта содержал указание на возможности его применения, использовал в своей практике древесину ольхи для врачевания различных кровотечений, поскольку свежий срез растения на воздухе, окисляясь приобретает кирпично-красный цвет (Рисунок 2). Поскольку авторитет Парацельса среди Европейских врачей был непререкаем, использование отвара древесины ольхи широко вошло в практику врачей-сигнатуристов, определив его применение на несколько веков.



Рисунок 2 – Свежий срез ствола ольхи черной

Оствальд Кроль, автор манускрипта «Tractatus novus de signaturis» (1634), указывал на существенный эффект использования отвара древесины ольхи при долго не заживающих ранах, маточном кровотечении, отравлениях различными ядами и кровавом поносе [11].

В книге Васильева Г.К. и Григораш Ф.Ф. «Очерки истории медицины и здравоохранения Латвии» ( М., 1964) приводятся данные о первой открытой в Риге в 1291 году аптеке, изготавливавшей сборы и извлечения из известных на то время лекарственных растений, в том числе сборов для врачевания расстройств желудка и кишечника, содержавших помимо прочих компонентов соплодия ольхи. С конца 18 века, описание ольхи, сопровождаемое красочными иллюстрациями, можно встретить в большинстве Европейских Фармакопей и справочных изданий, посвященных характеристике растительного сырья (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Иллюстрация ольхи черной в справочном издании «Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz», 1885

Российские травники широко применяли лечение как соплодиями, так и листьями ольхи. Подробный перечень болезней, при которых следует применять соплоды и листья ольхи приводится в рукописной книге XVII в., лечебник «Прохладный Вертоград». В более поздний период высушенные листья ольхи применяли как противовоспалительное, вяжущее средство, а свежие- в виде ванн использовали при простудных заболеваниях, ревматоидном полиартрите, подагре, суставных болях, сердечной недостаточности, привязывали к огнестрельным и колотым ранам, фурункулам, абсцессам. Монография «Русский травник-цветник. Руководство к лечению испытанными народными средствами» Томсон-Яна А.Ф. (1901) содержит данные о применении настоя листьев ольхи клейкой для лечения лихорадочных состояний и труднозаживающих ран.

В ходе проведения исторической экспедиции В.Г. Николаевой была изучена литература на славянских языках России о лечении инфицированных ран разными народами, а также проведен сбор сведений непосредственно у населения сёл и удаленных деревень Белоруссии, Калининской (ныне Тверской), Костромской и Рязанской областей по выбору лекарственного растительного сырья, применяемого при лечении ран, нагноений, фурункулов [45]. Наиболее используемыми во всех областях растениями, применяемыми для лечения гнойных ран, оказались: тысячелистник(трава), ольха (листья), дуб (кора), сосна (хвоя), горец змеиный (корневище).

Однако, несмотря на широкое использование сырья в народной медицине соплодия и листья ольхи долгое время не включали в Фармакопею. Научные исследования соплодий ольхи, проведенные врачом Д.М.Российским, позволили начать официальное использование отвара соплодий в 1942 г. Начиная с X издания Российской Фармакопеи соплодия ольхи видов серая и черная являются фармакопейным сырьем, заготовка которых осуществляется от двух видов сырья и регламентируется фармакопейной статьей «Соплодия ольхи – *Fructus Alni*». Фармакопея Республики Беларусь содержит отдельные статьи на соплодия ольхи черной и серой, качество сырья – листья ольхи, также регламентируются двумя самостоятельными статьями. На Украине налажен промышленный выпуск

препарата «Альтан» и «Альтабор», содержащего эллаготанины листьев ольхи черной для лечения желудочно-кишечных заболеваний, а также густого экстракта коры ольхи – *Extractum Cortici Alni spissum* для лечения воспалительных заболеваний слизистых оболочек ротовой полости, глотки, влагалища [13, 72, 73].

Соплодия и листья ольхи японской и сибирской находят применение в традиционной тибетской медицине в виде отваров и припарок в качестве кровоостанавливающего и противовоспалительного средства [5, 178]. Также плоды представлены в номенклатуре однокомпонентных (простых) гомеопатических лекарственных средств, допущенных к медицинскому применению на территории Российской Федерации [43].

Российскими учеными разработан и апробирован фитосбор «Золотистый» (производство ООО «Травы Башкирии»), в состав которого входят плоды шиповника, плоды расторопши, соплодия ольхи, трава душицы, трава тысячелистника, трава пустырника, трава горца птичьего, семена льна, цветки бессмертника. Сбор рекомендован в качестве средства для лечения печени и желчевыводящих путей [46]. Соплодия ольхи реализуются в аптечной сети Российской Федерации в пачках и в фильтр-пакетах, однако, спрос на данное сырье не удовлетворяется, что можно связать с ограниченностью сезона заготовки сырья, а также с низким потенциальным запасом данного вида сырья. Так, по данным «Таксационного справочника по лесным ресурсам России» Федерального агентства лесного хозяйства Российской Федерации, запас соплодий ольхи (сырая масса) в граммах на одном дереве с диаметром, замеренном на высоте растения 1,3 м, составляет при диаметре 10 см -28 г сырья, 12 см -43 г., 14 см – 70 г., 16 см -100 г., 20 см -170 г.

Учитывая наличие в Российской Федерации существенных запасов ольшаников, в том числе используемых лесхозами под промышленную заготовку древесины, рациональным решением проблемы расширения рынка лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов, на наш взгляд, является всестороннее изучение химического состава и последующая стандартизация листьев ольхи фармакопейных видов.

## 1.2. Ботанико-фармакогностическая характеристика особенностей семейства *Betulaceae* и рода *Alnus*

### 1.2.1. Краткая характеристика семейства (*Betulaceae*)

Согласно современным ботаническим представлениям, семейство *Betulaceae* содержит 6 родов, включающих около 234 видов растений, распространение которых приурочено преимущественно к умеренным и холодным поясам Северного полушария, исключение составляют некоторые виды рода *Alnus*, распространенные в горной местности Южной Америки до Чили и Аргентины, а также в Северном Вьетнаме [43]. Преимущественно в семействе *Betulaceae* представлены деревья и кустарники, в основном листопадные, получившие распространение в хвойных и смешанных лесных сообществах, а также способные формировать чистые лесные и кустарниковые сообщества.

Для представителей данного семейства характерна способность произрастания в неблагоприятных условиях, в которых другие древесные растения выживать не приспособлены. К примеру, *Alnus glutinosa* не имеет конкурентов при произрастании на мокрых топяных болотах, в условиях которых способна образовывать лесное сообщество-ольшанник.

У Березовых чаще всего встречается очередное листорасположение. По строению листья бывают простые с перистонервным жилкованием, как правило с черешками, снабженные быстро опадающими прилистниками, реже почти сидячие. Для представителей данного семейства характерно наличие мужских и женских соцветий, как правило, существенно отличающихся по внешнему виду. Цветение у представителей семейства может совпадать с распусканием листьев или происходить несколько ранее, как у рода *Alnus*. Мужские цветки у березовых начинают развитие в начале лета, полностью развиваясь в зимний период. Ветви растений покрываются мужскими соцветиями (сережками), пыльники которых растрескиваются в продольном направлении, что приводит к высеиванию, разносимой ветром пыльцы. Женские соцветия в период цветения прямостоячие с

удлиненными рыльцами. Для подсемейства березовых характерно строение плода, представляющего собой орех с 2-4 крыльями, строение которых отличается у родов.

### 1.2.2. Особенности рода Ольха (*Alnus*)

Род – ольха *Alnus*. Систематическое положение исследуемых объектов представлено на Рисунке 4.

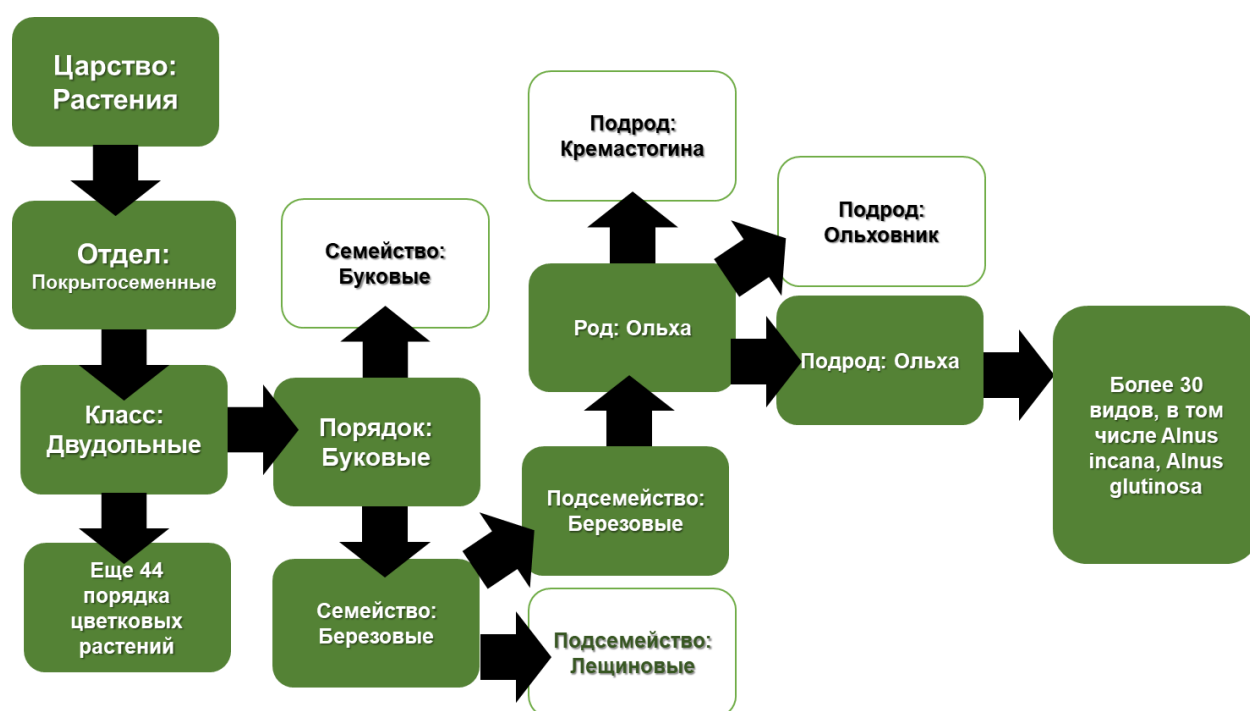


Рисунок 4 – Систематическое положение растений *Alnus incana* и *A. glutinosa*

В роде *Alnus* принято выделять три подрода: *Cremastogyne* – Кремастогина, *Alnobetula* – Ольховник, *Alnus* – Ольха.

Подрод *Alnus* включает более 30 видов. Растения представляют собой высокие деревья и крупномерные кустарники, однако встречаются и мелкие, высотой до 1 м кустарники, приуроченные обычно к жестким условиям обитания.

В соответствии с лесотипологической классификацией ольховые заросли принято относить к группе мелколиственных лесов. Следует отметить особенность растений рода *Alnus* образовывать не только коренные и условно коренные лесные

сообщества, но и замещать вырубленные в ходе хозяйственной деятельности человека или выгоревшие лесные массивы, прежде всего дубовые.

Анализ научной литературы, содержащей данные, полученные при изучении состава биологически активных веществ [10, 67, 78, 103, 122, 133, 135, 149], особенностей их накопления разными органами растения, сезонной динамики [24], а так же характеризующей фармакологические свойства и особенности применения соплодий и листьев ольхи [91, 95, 94, 104, 107, 110, 111, 116, 123, 136, 157, 177], показал, что наибольшее внимание исследователей привлекают виды ольхи, представленные на Рисунке 5.

<b>Alnus viridis</b> (Chaix.)	Приземистый или ползучий кустарник с укороченными ветвями. Молодые ветви зеленовато-серого цвета. Побеги коричневые с многочисленными белыми чечевичками. Листовые пластинки существенно меньше, чем у других видов ольхи. Форма листовых пластинок яйцевидная или широко-яйцевидная, край doublyзубчатый, 8-10 пар жилок. Листья часто смолистые от многочисленных клейких железок. Плод орешек, эллиптической формы, крылатый.	Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Наиболее зимостойкий вид ольхи. Распространена в умеренной и субарктической зоне Северного полушария. В РФ встречается в северных районах по лесным опушкам, в еловых и лиственничных редколесьях, может формировать чистые заросли или с примесью кедрового стланика.
<b>Alnus rubra</b> (Bong.)	Дерево, достигающее в высоту до 20 м. с серой практически гладкой корой. Побеги в начале развития имеют опушение, но потом становятся голыми, темно-красного интенсивного цвета. Листья яйцевидные, остроконечные с широко-клиновидным основанием. Черешки и жилки окрашены в красный или оранжевый цвет. Отличительной особенностью является подвернутость края листовой пластинки.	Растение распространено на западе Северной Америки. Широко введено в культуру, как яркое декоративное парковое растение.
<b>Alnus japonica</b> (Thunb.)	Дерево высотой до 25 м с красновато-бурыми ветвями, на коре – ярко заметные чечевички. Листья эллиптические или продолговато-овальные, неравномерно и редкозубчатые. Плоды-орешки с узким крылом.	Встречается в Китае, Коре, Японии, в РФ – в южном Приморье, на Сахалине и Курильских островах
<b>Alnus formosana</b> (Burkill) Makino	Дерево до 20 м высотой с темно-коричнево-серой корой, эллиптическими или продолговато-ланцетными листьями с мелко зубчатым краем листа	Эндемик Тайваня
<b>Alnus firma</b> (Siebold\Zucc)	Дерево или кустарник высотой до 3 м с серовато-коричневыми, опушенными ветвями. Листья яйцевидно-продолговатые, заостренные остро- и неравномерно-зубчатые	Распространена в Японии, наиболее часто встречается на острове Кюсю
<b>Alnus glutinosa</b> (L.) Gaertn	Дерево высотой до 35 м, часто многоствольное. Ветви трехгранные или круглые, в молодом возрасте клейкие, в более зрелом остаются одиночные выходы смолистых веществ, красноватые, бурые или зелено-бурые с выраженными чечевичками. Листья округлые или обратнояйцевидные, край листа, как правило, городчато-пильчатый. Плод- маленький орех, расположенный в соплодии	Распространена в зоне умеренного климата в западной части Азии и практически повсеместно в Европе, что обуславливает еще одно название растения – Ольха европейская. Растение натурализовалось во многих частях планеты, проявляя агрессию к местным видам
<b>Alnus incana</b> (L.) Moench	Дерево высотой до 20 м или кустарник. Кора светлого-серого цвета, всегда с гладкой поверхностью. Побеги изначально зеленоватые, с возрастом бурые или темно-серые. Листья овальные или яйцевидно-округлые, остроконечные, остро-двойно пильчатые. Плоды обратнояйцевидные орешки с узкими перепончатыми крыльями.	Распространена по всей территории Европы, Малой Азии, Закавказья, Западной Сибири и Северной Америки.

Рисунок 5 – Краткая характеристика видов и сырья ольхи, наиболее широко изучаемых в качестве источника получения перспективных лекарственных средств

### 1.3. Описание особенностей мест обитания, ареала распространения и принципов заготовки сырья ольхи видов черная и серая

Фармакопейные виды ольхи (о.черная; о.серая) широко распространены на Европейской территории Российской Федерации [43]. Ольха серая произрастает преимущественно в равнинной местности в лесной, лесостепной и лесотундровой зоне. Растение способно формировать небольшие заросли, приуроченные к заболоченным опушкам, берегам рек, болотам, заброшенным территориям, получившие наименование сероольшатников. Ольха черная произрастает в обильно увлажненных заболоченных лесах, поймах рек, по берегам озер, на низинных болотах. На избыточно увлажненной почве образует чистые насаждения-черноольховые трясины. Способна выступать в качестве содоминанта в широколиственных лесах. По данным нвучной литературы в Московской области выделяют следующие геоботанические округа, в составе которых выделяют сплошные ольшанниковые зоны:

- Латошинско Талдомский;
- Можайско Загорский;
- Ногинско Шатурский;
- Подольско Коломенский;
- Каширско Зарайский;
- Серебрянопрудский.

Зоны распространности ольхи черной и серой представлены на Рисунках 6, 7.

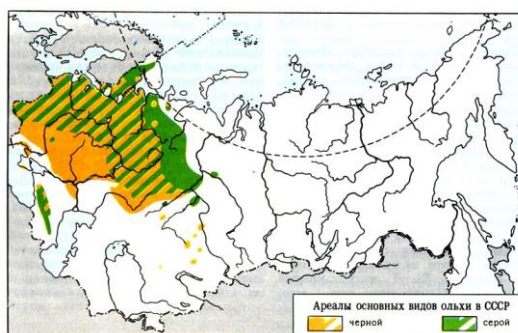


Рисунок 6 – Ареал ольхи черной *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn (а) и ольхи серой *Alnus incana* (L.) Moench (б) на территории Российской Федерации

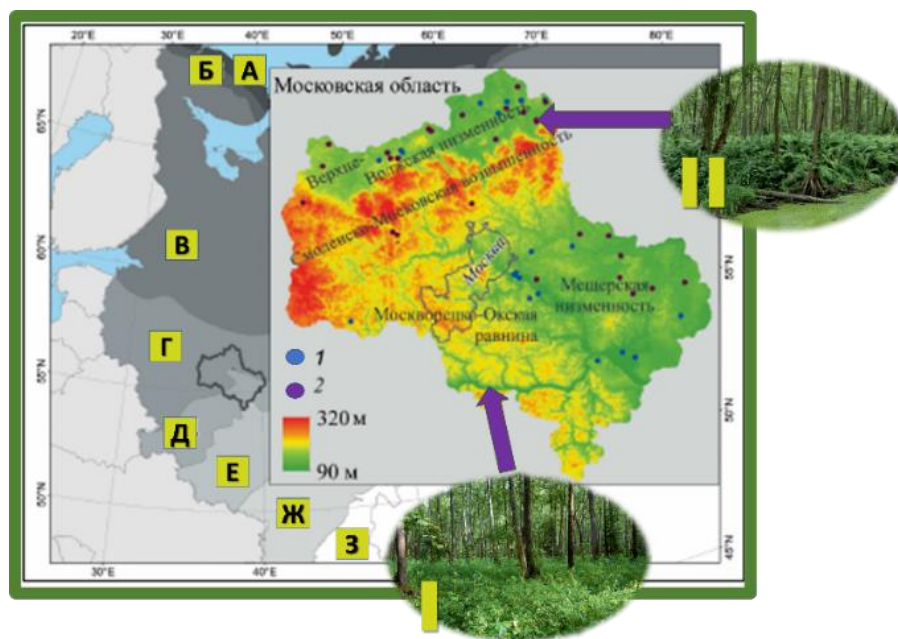


Рисунок 7 – Ареал ольхи черной *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn (а) и ольхи серой *Alnus incana* (L.) Moench (б) на территории Московской области: А – Тундра; Б – Лесотундра; В – Хвойные леса; Г – Смешанные леса; Д – Лиственные леса; Е – Лесостепь; Ж – Степь; З – Полупустыня

Данные цифровой модели рельефа представлены по базе SRTM; В Московской области сплошные сообщества - черноольшаник лабазниковый(II) - *Carici elongatae-Alnetum glutinosae* и крапивный(I) - *Urtico dioicae – Alnetum glutinosae*, ольха серая не образует сплошных сообществ.

В соответствии с данными, предоставленными по космическим снимкам, сообщества, образованные ольхой черной на территории МО, составляют не менее 5% от промышленных лесов региона [142]. Ольха серая представлена отдельными крутинами по 3-12 растений.

В настоящее время в Российской Федерации производится заготовка соплодий ольхи черной и серой в соответствии с рекомендациями «Правил сбора и сушки лекарственных растений. Сборник инструкций» (1985), согласно которым соплодия («шишки») ольхи заготавливают осенью и зимой (до начала марта), срезая секатором концы тонких ветвей растений, с которых затем вручную обрывают соплодия [47]. Рекомендации по заготовке листьев ольхи в настоящее время отсутствуют.

#### 1.4. Краткая характеристика современного состояния изученности химического состава листьев ольхи черной и серой

Как уже отмечалось ранее ольха видов черная и серая в Российской Федерации являются фармакопейными видами и используются для заготовки соплодий, стандартизация которых осуществляется по суммарному содержанию дубильных веществ. В настоящее время, согласно литературным данным химический состав как соплодий, листьев и коры ольхи различных видов активно изучается учеными многих стран, что обусловлено широким спектром фармакологического действия данных растений [161, 174]. Согласно современным данным, для рода *Alnus* наиболее важными являются биологически активные вещества, относящиеся к 5 классам, представленным на Рисунке 7.

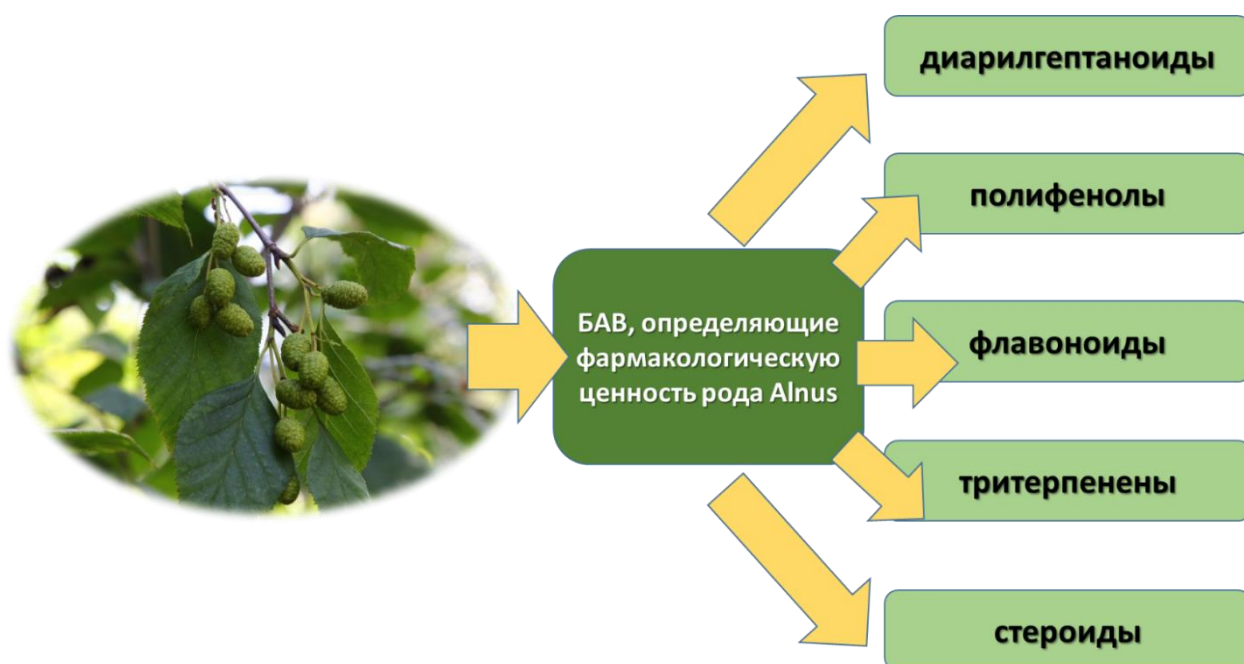


Рисунок 8 – Наиболее важные БАВ растений рода *Alnus*

Диарилгептаноиды характеризуются наличием подтвержденной противораковой активности [11]. В настоящее время имеются данные о 99 соединениях, относящихся к классу диарилгептаноидов, выделенных из

представителей рода *Alnus* [78, 80, 89, 95, 98, 105, 107, 108, 110, 111, 114, 116, 119, 135, 137, 158].

Диарилгептаноиды растений рода *Alnus* представлены тремя основными группами: линейными соединениями, циклическими производными эфирного типа и дифенильными циклами. Основные структуры диарилгептаноидов, выделенных из сырья различных представителей рода ольха представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Основные типы диарилгептаноидов, выделенных из растений рода Ольха

Название группы веществ	Формула	Представители рода <i>Alnus</i> , в которых встречается данная группа БАВ	Источник литературы
Представители диарилгептаноидов в линейного типа		<i>Alnus sieboldiana</i> , A. <i>Fruticose Rupr.</i> , A. <i>Mandshurica (Callier)</i> <i>Hand.-Mazz.</i> , <i>A.hirsuta</i> , <i>A.japonica</i> , <i>A.fo</i> <i>rmosana</i> , <i>A.rubra</i> , <i>A.</i> <i>viridis</i> , <i>A. glutinosa</i> , <i>A.incana</i> , <i>A.</i> <i>serrulatoides</i> , <i>A.nepalensis</i> .	[110, 118, 120]
Представители диарилгептаноидов, представленных циклическими производными эфирного типа		<i>Alnus hirsute</i> , A. <i>japonica</i>	[104, 178]
Представители диарилгептаноидов, представленных дифенильными циклами		<i>Alnus sieboldiana</i> , <i>Alnus</i> <i>hirsute</i> , <i>A. japonica</i>	[76, 129]

В исследованиях Lundqvist A, Magnusson L.U. и др [154, 175] была выделена серия циклических диарилгептаноидов с двойной связью в гептильном скелете, таких как гаругамблин-3 из *Alnus japonica* [111].

В исследованиях М. А. Кушнер и Т. С. Селивестровой был проведен ВЭЖХ-анализ маслообразной фракции коры ольхи черной, в ходе которого был идентифицирован диарилгептаноид орегонин (1,7-ди-(3,4-дигидроксифенил)-3-оксогепт-5-ил-в-D-ксилопиранозид) [20]. Исследование особенно актуально, учитывая, что сырьем является кора ольхи, являющаяся отходом деревообрабатывающей промышленности, количество которой достигает до 15% от перерабатываемой древесины. При этом известно, что диарилгептаноид орегонин может быть использован при лечении атопического дерматита, внутренних кровотечений, диареи, хронического алкоголизма [125, 141, 151], обладает антимикробным и иммуномодулирующим действием [88, 153, 154]. Выявлено, что орегонин способен повышать скорость активации и цитотоксическую активность [100, 101, 130, 144].

Анализ научных статей показал, что для рода *Alnus* характерно существенное накопление веществ флавоноидной природы [181]. На настоящий момент выделено 63 индивидуальных вещества, относящихся к флавонам, флавононам, флавонолам, флаванолам из ольхи разных видов [132, 177]. Интересно, что по данным Wollenweber E., халконы, в частности 2,4-дигидрокси-6-метоксихалкон, выделены только из сырья *Alnus viridis* [181].

В исследованиях Д.В. Моисеева методом ВЭЖХ в листьях ольхи серой были идентифицированы лютеолин-7-О-глюкозид, гиперозид, кверцетин, лютеолин, в листьях ольхи черной выявлены гиперозид и кверцетин [24].

Существенный интерес исследователей вызывает изучение состава веществ стероидной природы и тритерпеновых сапонинов, встречающихся у представителей рода ольха [179], максимальное содержание которых, как правило, отмечается в листьях, цветках и соплодиях растений [89, 98]. При этом из цветков и листьев *Alnus sieboldiana*, *A. serrulatoides* Call., *A. pendula*, *A. japonica* выделены вещества даммаранового типа [102, 113]. Производные олеанана ( $\beta$ -амирина),

урсана, лупана идентифицированы в метанольных экстрактах *A. japonica*, *A. hirsuta*, *A. nepalensis*, *A. Maximowiczii Call.*, *A. acuminata ssp. argute*, *A. rubra* [109, 148, 178]. Для ольхи черной имеются данные о присутствии производных  $\beta$ -амирина.

Традиционно, сырье, получаемое от ольхи различных видов, принято рассматривать в качестве источника дубильных веществ. Так, стандартизация разрешенных к применению видов ольхи в Российской Федерации и Республике Беларусь осуществляется с использованием качественных реакций для идентификации группы дубильных веществ и количественная оценка предполагает титриметрическое определение суммы дубильных веществ (Таблица 2).

Таблица 2 – Фармакопейные методы анализа, применяемые для оценки качества разных видов сырья ольхи

Исследуемое сырье	Нормативный документ	Качественный анализ дубильных веществ	Количественное определение дубильных веществ
Соплодия ольхи серой и черной	Государственная фармакопея Республики Беларусь, ст «Ольхи соплодия. <i>Alni fructus. Alder fruit</i> »	Качественная реакция на группу дубильных веществ с раствором железа (111) аммония сульфата. Образование черно-синего окрашивания подтверждает наличие дубильных веществ	Перманганатометрическое титрование в присутствии индикатора индигокармина. Суммарное содержание дубильных веществ в пересчете на танин не менее 10%
Ольхи черной листья	Ольхи черной листья. <i>Alni glutinosae folia. Black Alder leaf</i>	Подтверждение наличия эллаговой кислоты методом ТСХ в системе растворителей 2-пропанол Р-кислота муравьиная безводная Р- вода Р (2:5:5)	Количественная оценка полифенолов. Их содержание в соответствии с НД не менее 5%

Также имеются данные, подтверждающие возможность использования для количественной оценки содержания дубильных веществ метода комплексонометрического титрования в присутствии ксиленового оранжевого. Данный метод применялся О.В. Мушкиной при анализе суммарного содержания дубильных веществ в листьях ольхи серой и черной, заготовленных в Витебской и Брестской областях [27].

В последнее время интерес к исследованию полифенольных веществ существенно возрос, не стало исключением и сырье ольхи разных видов, поскольку именно дубильные вещества, по мнению исследователей являются носителями высокой антокидантной активности всех представителей рода *Alnus* [122, 145].

Соединения, объединенные термином «дубильные вещества», по сути, являются производными четырех групп веществ, представленных на Рисунке 9.

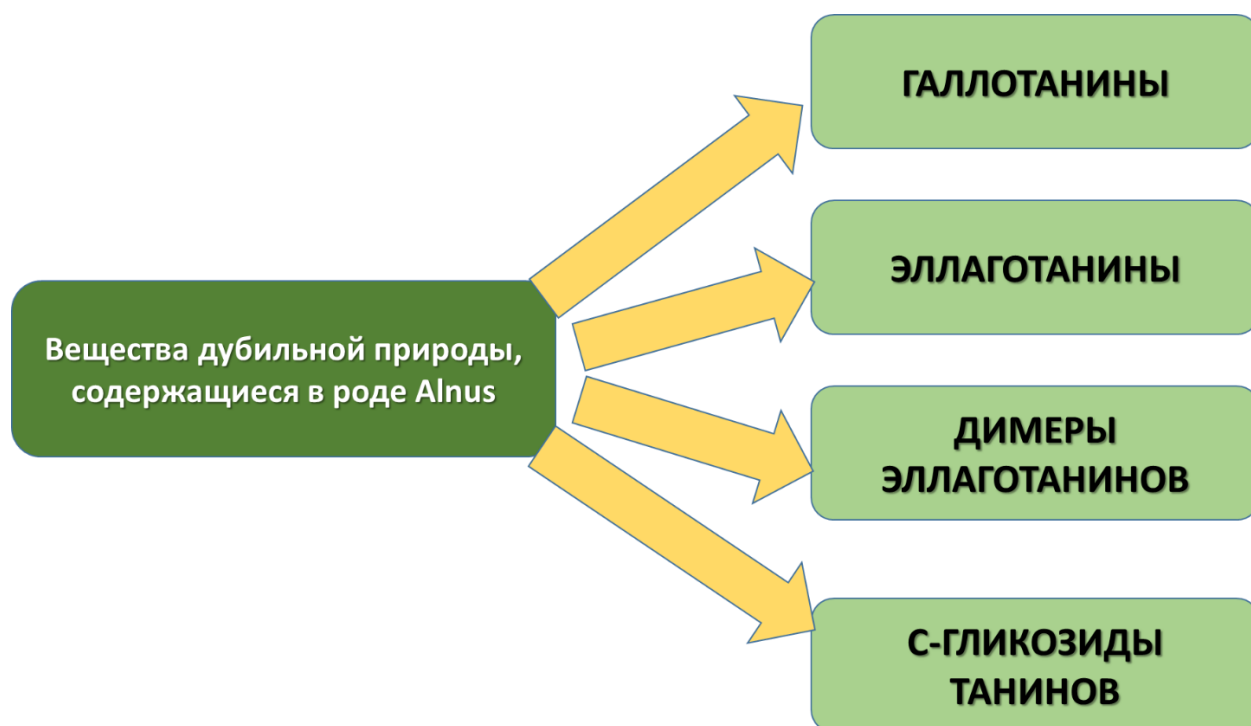


Рисунок 9 – Группы соединений, определяемых как дубильные вещества, характерных для сырья растений рода *Alnus*

В исследованиях были выявлены новые структуры производных танинов, содержащиеся в *Alnus glutinosa*, *A. japonica*, *A. hirsuta* такие как 1-флозин А. представленный на Рисунке 10, а также группа эллаготанинов, получившая

название алнусины [122]. Алнусины на сегодняшний день выделены только из представителей рода *Alnus*.

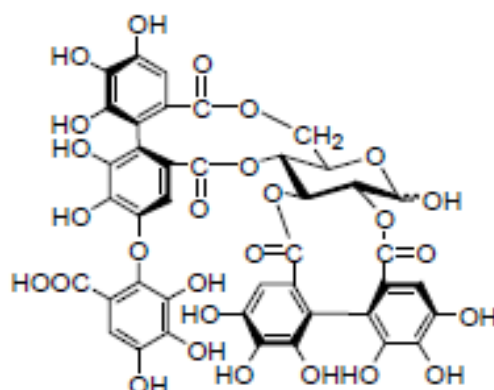


Рисунок 10 – Структура 1-флозина А, выделенного из листьев, коры и соплодий *Alnus glutinosa*, *A.japonica*, *A.hirsuta*

В исследованиях Д.В. Моисеева была проведена оценка содержания эллаговой кислоты в листьях ольхи черной в процессе хранения в различных условиях влажности и при разной степени измельченности. Автором было установлено, что в процессе хранения как цельного, так и измельченного сырья наблюдается сначала рост содержания эллаговой кислоты, а по истечении определенного срока ее динамичное снижение, что, по мнению Д.В. Моисеева, может быть связано с процессами гидролиза сложных полифенольных веществ до эллаговой кислоты на первом этапе хранения, а затем с ее деструктуризацией [24].

### 1.5. Особенности фармакологического действия извлечений из листьев ольхи серой и черной

Как уже отмечалось выше, листья ольхи широко использовались в традиционной медицине многих народов наряду с фармакопейным сырьем – *Fructus Alni*. В ходе проведения исторической экспедиции В.Г. Николаевой была изучена литература на славянских языках России о лечении инфицированных ран разными народами, а также проведен сбор сведений непосредственно у населения

сёл и удаленных деревень Белоруссии, Калининской (ныне Тверской), Костромской и Рязанской областей по выбору лекарственного растительного сырья, применяемого при лечении ран, нагноений, фурункулов [45]. Наиболее используемыми во всех областях растениями, применяемыми для лечения гнойных ран, оказались: тысячелистник (трава), ольха (листья), дуб (кора), сосна (хвоя), горец змеиный (корневище).

Анализ научной литературы показал, что одним из «лидеров» по исследованиям химического состава и фармакологического действия является *Alnus japonica Steudel*, что объяснимо высокой активностью ученых Китая, Японии и Южной Кореи в изучении представителей рода *Alnus*, прежде всего эндемиков [78, 79, 90, 94, 96, 109, 110, 116, 122, 123, 136, 141, 149, 150, 157, 158, 181]. Ими выявлено наличие эффективного гепатопротекторного, антимикробного, противовоспалительного действия, а также способность экстрактов исследуемого сырья тормозить рост раковых клеток. Экстракты успешно применяли при лечении острой диареи, дизентерии, острых лихорадочных состояний. Для нас интерес представляют, прежде всего виды ольхи, произрастающие в Российской Федерации.

В исследовании Моисеева Д.В. была проведена оценка противовоспалительной активности извлечений из листьев ольхи серой и черной «in vitro» в модели подавления избыточного накопления цитокина ТФР-в активированными опухолевыми клетками, что позволяет прогнозировать наличие у исследуемого объекта противовоспалительного и иммуносупрессорного действия [66]. Исследованное автором растительное сырье было условно разделено на три группы: объекты с высоким значением коэффициента подавления (больше 10); с средним (1-10); и низким (менее 1). Проведенные исследования позволили автору отнести сырье- листья ольхи серой к первой, а листья ольхи черной ко второй группе. Также автором отмечен рост коэффициента подавления у листьев ольхи черной в процессе хранения, что поясняется как влияние температурной деструкции БАВ, приводящей к появлению метаболитов с большей активностью по сравнению с исходным сырьем [25]. Антимикробная активность экстракта

листьев ольхи в отношении *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* была установлена в исследованиях Моисеева Д.В. [23].

При использовании отвара из листьев ольхи серой была выявлена высокая эффективность при терапевтическом лечении стоматитов различного генеза, а также при повышенной кровоточивости десен в исследованиях Б.М. Зузук [71].

Шиловой Н.В. экспериментально установлено воздействие водных извлечений из листьев ольхи клейкой, осуществляющее торможение роста злокачественных новообразований и существенный рост эффективности цитостатической терапии, сопровождающийся значительным сокращением уровня токсичности на клетки крови [68].

В исследованиях, направленных на выявление растительных средств, проявляющих антимикробную активность и возможность их использования при наличии антибиотикорезистентности, проводимых Федченковой Ю.А. и соавт. показано наличие бактериостатического действия у водных извлечений из сырья ольхи фармакопейных видов [65].

Сербиной Н.А. осуществлено экспериментальное фармакологическое изучение фитопрепарата альтан, разработанного на основе эллаготанинов, выделенных из сырья ольхи клейкой и серой. В процессе эксперимента доказано, что препарат альтан характеризуется наличием выраженного противоязвенного действия на моделях экспериментальных острых и хронических язв желудка у крыс [53]. В настоящее время осуществляется выпуск альтановой мази («Научно-производственный центр «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина), обладающей выраженным антимикробным действием против таких возбудителей гнойно-септической раневой инфекции как *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*. Таким образом, можно утверждать о наличии у листьев ольхи разнообразного фармакологического действия. Основные фармакологические эффекты представлены на Рисунке 11.

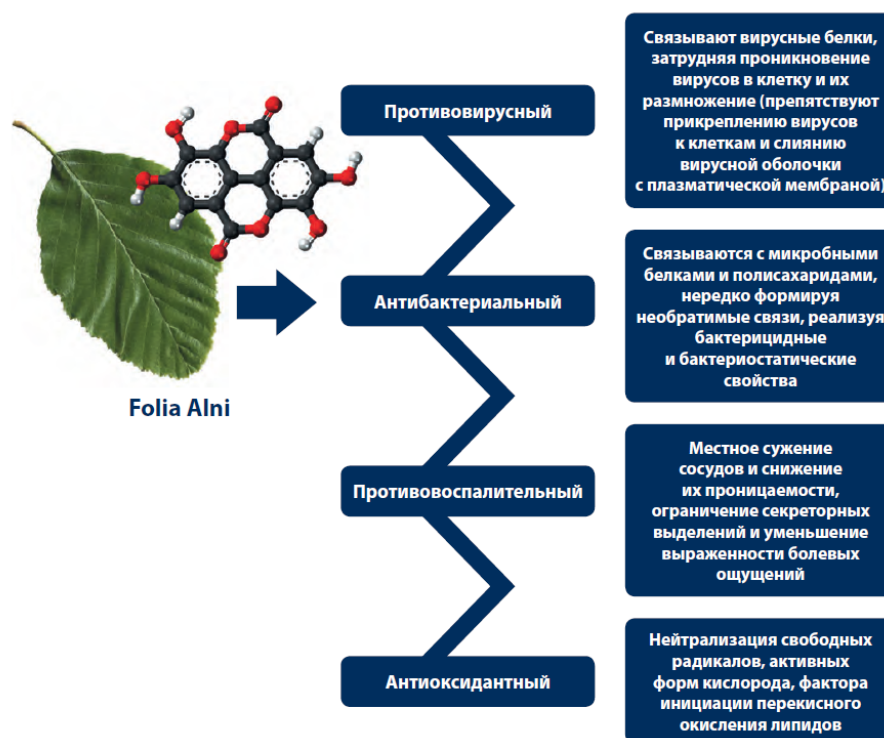


Рисунок 11 – Возможное фармакологическое действие нового растительного сырья листьев ольхи

### 1.6. Оценка современной проблемы антибиотикорезистентности и возможных путей ее решения

По данным экспертных разработок ВОЗ растущая проблема антибиотикорезистентности признана существенной угрозой здравоохранения в общечеловеческом масштабе. Как известно, антибиотикорезистентность проявляет себя в уменьшении или потере чувствительности бактерий к антибиотикам и синтетическим противомикробным средствам. Биохимические механизмы, обеспечивающие появление антибиотикорезистентности представлены на Рисунке 12. В исследованиях Lin J. et al. 2015 было показано, что пути передачи генов антибиотикорезистентности между микроорганизмами реализуются через взаимную передачу плазмид и конъюнктивных транспозонов.

На Рисунке 13 представлены наиболее распространенные виды антибиотикорезистентности, выявляемые в клинической практике, что может

обернуться серьезными социально-экономическими последствиями. Важность проблемы в общемировом масштабе подчеркивается принятием «Декларации по борьбе с антимикробной резистентностью» в 2000 г. Данный вопрос поднимался Всемирной Ассамблеей здравоохранения в 2014 г., когда была сформулирована резолюция о создании Глобального плана действий по решению проблемы антимикробной резистентности. В 2016 г. была сформулирована Политическая декларация заседания высокого уровня Генеральной Ассамблеи Организации Объединенных наций по проблеме устойчивости к противомикробным препаратам, принятая на 71 сессии Генеральной Ассамблеи ООН (резолюция A/RES/71/3 от 5.09.2016 г. Распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017г. №2045-р была принята «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года».



Рисунок 12 – Схема основных биохимических механизмов, обеспечивающих антибиотикорезистентность



Рисунок 13 – Схема основных механизмов антибиотикорезистентности, выявленных в клинической практике

В 2019 г. ВОЗ приступила к реализации крупномасштабной программы, направленной на сокращение тенденции распространения резистентности к противомикробным препаратам, что планируется достичь посредством использования механизма AWaRe (Access, Watch, Reserve), направленного на безопасное и эффективное использование антибиотиков. Разработанный экспертами список подразделяет антибиотики на следующие группы выбора – «Доступ, Наблюдение, Резерв» и предлагает выборочное использование для наиболее распространенных и наиболее опасных инфекций. Так, антибиотики группы «Резерв» должны использоваться только в крайних случаях, таких как туберкулез, ВИЧ и др. Также рекомендовано вести направленный поиск альтернативных средств, обладающих антимикробным действием. Тем не менее, в

условиях пандемии, по мнению экспертов бесконтрольное использование антибиотиков возросло не менее чем 28% (прежде всего, левофлоксацина и азитромицина), что может привести к еще более существенному росту устойчивости к антимикробной терапии. По экспертным данным, представленным группой «Деловой профиль» в Российской Федерации, антибиотики являются абсолютными лидерами по спросу в период пандемии ковид-19. Так, только за январь 2021 года рост объема продаж антибиотика Левофлоксацин по отношению к аналогичному периоду 2020 составил 463,1%, а Цефтриаксон -382,4%. По данным экспертов DSM Group последний период развития рынка стал пиком продаж антибиотиков.

Растительные вещества с выраженной антимикробной активностью вызывают растущий интерес отечественных и международных фармацевтических корпораций, что объяснимо не только целевым действием, зачастую не уступающему синтетическим аналогам, но и наличием низкой токсичности, а также практически полным отсутствием побочного действия [65]. Для большинства БАВ растительного происхождения, обладающих, согласно литературным данным, антимикробным действием характерно также наличие выраженного противовоспалительного действия, что представляет дополнительные возможности в терапии микробных контаминаций [88, 100, 139].

Как известно, фармацевтический рынок является высокодоходным и энергично развивающимся сегментом мировой экономики, что особенно наглядно демонстрирует рост его активов на фоне падения экономического роста, связанного с пандемией ковид-19. Эксперты отмечают неравномерность развития фармацевтического рынка в развитых и развивающихся странах, однако несмотря на существующие различия в уровнях динамики роста, период с 2020 г. по всем группам развития характеризуется увеличением продаж антибиотиков и антимикробных средств синтетического происхождения. По данным Van Voesci T.P. et.al. в США наиболее назначаемыми антибиотиками, по-прежнему, остаются пенициллины (около 40%), цефалоспорины, тетрациклины, макролиды и

хинолоны. Антибактериальные препараты растительного происхождения в США даже не назначаются.

В Российской Федерации, согласно данным экспертов, в Перечень ЖНВЛП, отвечающий за формирование стандартов оказания медицинской помощи, вносятся противомикробные лекарственные препараты для системного применения, относящиеся к 9 подгруппам в соответствии с принципами АТХ-классификации, среди которых также отсутствуют лекарственные препараты антимикробного действия на основе лекарственного растительного сырья. Таким образом, на фармацевтическом рынке Российской Федерации парадоксальным образом повторяется общемировая тенденция роста потребления лекарственных средств группы антибиотиков, сопряженная с данной тенденцией проблема антибиотикорезистентности на фоне умаления возможности использования антимикробных средств растительного происхождения.

Анализ ассортимента противомикробных препаратов осуществлялся с использованием контент-анализа нормативно-правовых документов и официальной информации, представленных на сайте экспертной ассоциации DSM Group, данных Государственного Реестра Лекарственных средств и научной литературы. В ходе исследования были выделены группы препаратов растительного происхождения, проявляющие антимикробное действие или комбинированное действие с присущим антимикробным эффектом, противовирусное, антисептическое действие.

Как видно из данных таблицы, в Российской Федерации зарегистрированы лекарственные средства растительного происхождения, реализуемые в разных лекарственных формах.

Нами был составлен топ-5 средств, наиболее часто реализуемых в аптеках г. Москвы, который представлен на Рисунке 14.



Рисунок 14 – Топ-5 растительных препаратов антимикробного действия в аптеках города Москвы

Учитывая имеющиеся литературные данные, а также результат проведенных исследований следует отметить актуальность и перспективность создания дополнительной номенклатуры лекарственных средств с антимикробным действием на основе лекарственного растительного сырья. Исследователями выявлено наличие эффекта синергизма антибактериального действия при совместном назначении антибиотиков и препаратов из лекарственного растительного сырья [139, 162, 169, 170].

Учитывая вышеизложенное считаем целесообразным предложить общую методическую схему отбора растительных объектов как потенциальных источников получения антибактериальных препаратов, включающую проведение всестороннего первичного скрининга растительного сырья, рассматриваемого в качестве потенциального источника получения антимикробных средств, осуществление мероприятий по формированию дизайна и проведения комплексных физико-химических исследований, направленных на изучение и выделение фракции БАВ, ответственных за антимикробное действие и, наконец, получение конечного продукта и подтверждение его антимикробных свойств (Рисунок 15).

Анализ результатов собственных экспериментальных исследований, а также опыт зарубежных исследований антимикробной активности листьев ольхи различных видов [23, 65, 73, 74, 88, 90, 93, 100, 145, 161, 174, 177], позволяет с оптимизмом рассматривать прогноз выведения на фармацевтический рынок Российской Федерации новых антимикробных средств на основе извлечений из листьев ольхи видов серая и черная (Рисунок 16).

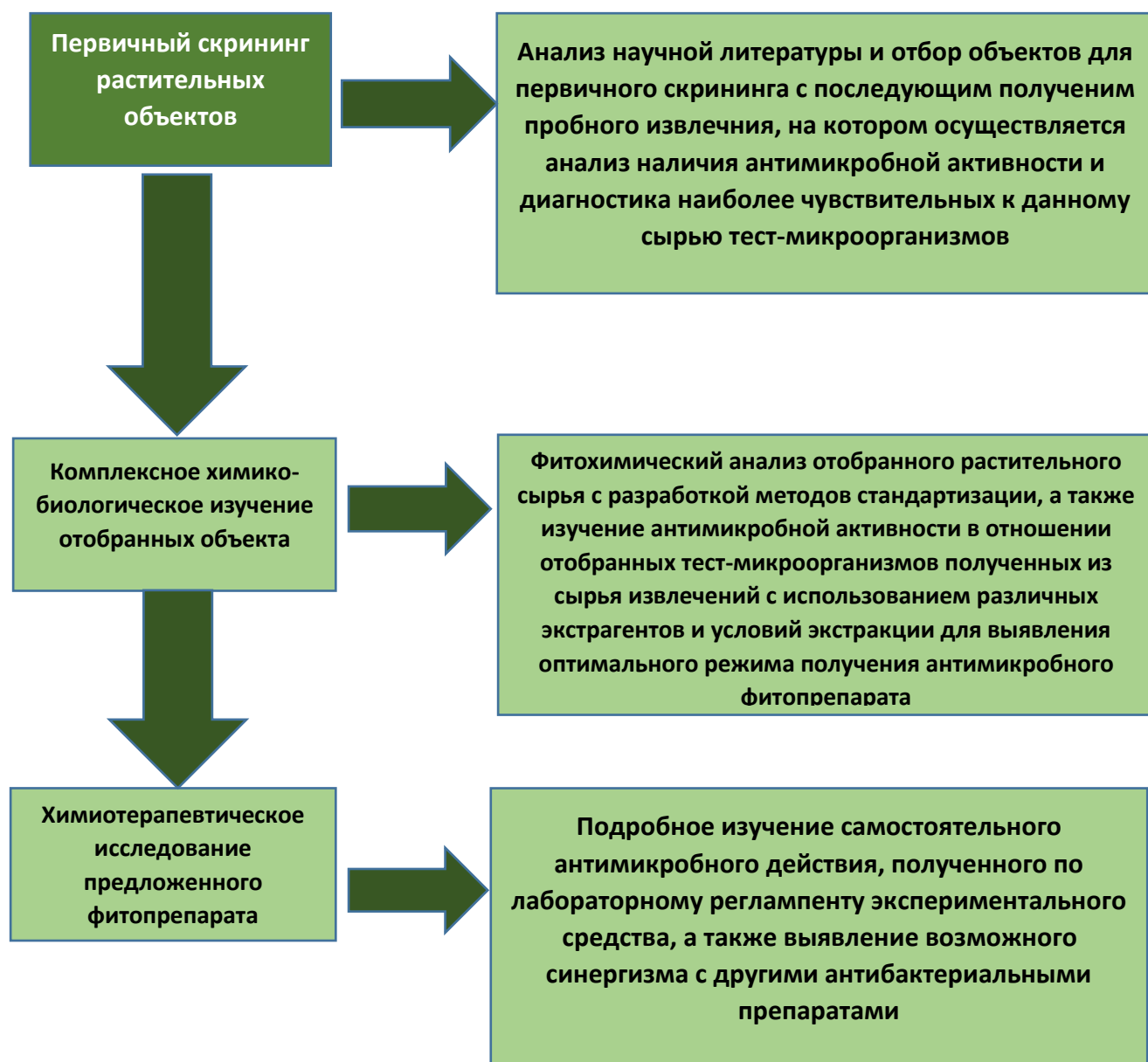


Рисунок 15 – Схема действий при выборе растительного сырья, потенциально обладающего, антимикробной активностью



Рисунок 16 – Особенности антимикробного действия соплодий и листьев ольхи фармакопейных видов

## 1.7. Выводы к Главе 1

1. В ходе изучения научной литературы, патентной и нормативной документации проведено информационно-аналитическое исследование, направленное на выявление современного состояния изученности состава БАВ, особенностей фармакологического действия и возможных направлений использования в качестве лекарственного растительного сырья *Alni folia*.

2. Проведенный по базам данных PubMed, Cyberleninca, Elibrary и др. анализ информационных источников продемонстрировал наличие серьезных запасов ольхи серой и ольхи черной, представленных промышленными массивами в Российской Федерации, в том числе на территории Московской области, а также, подтвержденный современными экспериментальными исследованиями, широкий спектр возможного фармакологического действия, связанного с наличием в сырье разнообразных БАВ, представленных гидроксикоричными кислотами,

флавоноидами, дубильными веществами, тритерпеновыми сапонинами, полисахаридами, органическими кислотами [43].

3. По результатам мониторинга научной литературы выявлено, что для анализа соплодий и листьев ольхи различных видов, исследователями используются разнообразные методы современного физико-химического анализа, позволяющие осуществить качественную и количественную оценку содержания указанных выше биологически активных веществ (бумажная и тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, спектрофотометрия, денситометрия), однако в Российской Федерации до сих пор отсутствуют данные системного фармакогностического анализа сырья ольхи, направленные на разработку показателей его качества [43].

4. Соплодия ольхи в Российской Федерации являются фармакопейным сырьем, контроль качества которых осуществляется в соответствии с требованиями ФС. 2.5.0087.18 «*Alni fructus* – Ольхи соплодия», предусматривающей определение содержания дубильных веществ в пересчете на танин, влажности сырья, содержания золы общей и золы, нерастворимой в 10% кислоте хлористоводородной, веточек и отделившихся плодоножек, соплодий с длиной плодоножки более 15 мм, измельченных частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, органическую и минеральную примеси. Потребности практического здравоохранения по сырью ольхи не всегда удовлетворяются, что объяснимо сложностью и ограниченным сроком заготовки. При этом сырьевая база ольховых массивов достаточная, причем сбор листьев можно осуществлять с ветвей деревьев, заготовленных для нужд деревоперерабатывающей промышленности и представляющих, по сути, отходы, подлежащие утилизации. Но нормативная документация на листья ольхи серой и черной отсутствует, что предопределяет ограничения их применения в широкой медицинской практике.

5. Результаты представленных в современной научной литературе данных, а также имеющийся международный опыт применения листьев ольхи как самостоятельного лекарственного средства, так и субстанции для производства фитопрепаратов, обуславливают актуальность проведения фармакогностического анализа сырья листьев *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth. и *A. incana* (L.) Moench.,

включающего определение морфологических, анатомо-диагностических признаков сырья, изучение состава основных групп БАВ с последующей разработкой показателей качества для включения в нормативную документацию, а также создание на основе изучаемого сырья отечественных инновационных лекарственных средств [43].

б. Анализ научной литературы показал наличие серьезной проблемы прогрессирующей антибиотикорезистентности у микроорганизмов, что существенно снижает эффективность назначаемой антимикробной терапии. Снижение рисков развития антибиотикорезистентности подразумевает осуществление комплекса мер, включающих как формирование ответственного отношения к рациональности назначения антибактериальных препаратов, так и увеличению доли антибактериальных препаратов растительного происхождения, которые не вызывают привыкания микроорганизмов и способствуют синергизму суммарного антимикробного действия при совместном назначении с синтетическими антибактериальными средствами и антибиотиками.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика объектов исследования, особенностей заготовки, консервации и хранения листьев ольхи серой и черной

Объектом нашего исследования являются листья ольхи серой- *Alnus incana* (L.) Moench и ольхи клейкой (черной) - *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn семейства Березовые-*Betulaceae*, собранные в период вегетации.

Заготовка сырья осуществлялась от дикорастущих растений, произрастающих в сплошных ольховых лесах Московской области, представленных широко-травно-влажнотравными и трояно-болотными сообществами, в подлеске смешанного леса в экологически чистых районах Московской и Тверской областей в августе-сентябре 2019-2024 г., а также в местах промысловых заготовок древесины ольхи в Талдомском районе с ветвей, представляющих собой отходы деревообрабатывающей промышленности, направляемых на утилизацию. Также нами изучались образцы, собранные в ботаническом саду МГУ им. М.В. Ломоносова.

Сбор сырья проводили с ветвей средней части кроны взрослых представителей ольхи серой и черной. Собранные листья анализировали в свежем, замороженном и высушенном виде. Заморозку сырья осуществляли в морозильных камерах. Для получения высушенного сырья использовали метод воздушно-теневого сушки, а также сушка в изотермическом режиме при 45-50 С. Характеристика объектов исследования в соответствии с отсутствием (использование в аналитических целях свежесобранного сырья) или наличием метода консервации (сушка воздушно-теновая или тепловая; замораживание) представлена на Рисунке 17.

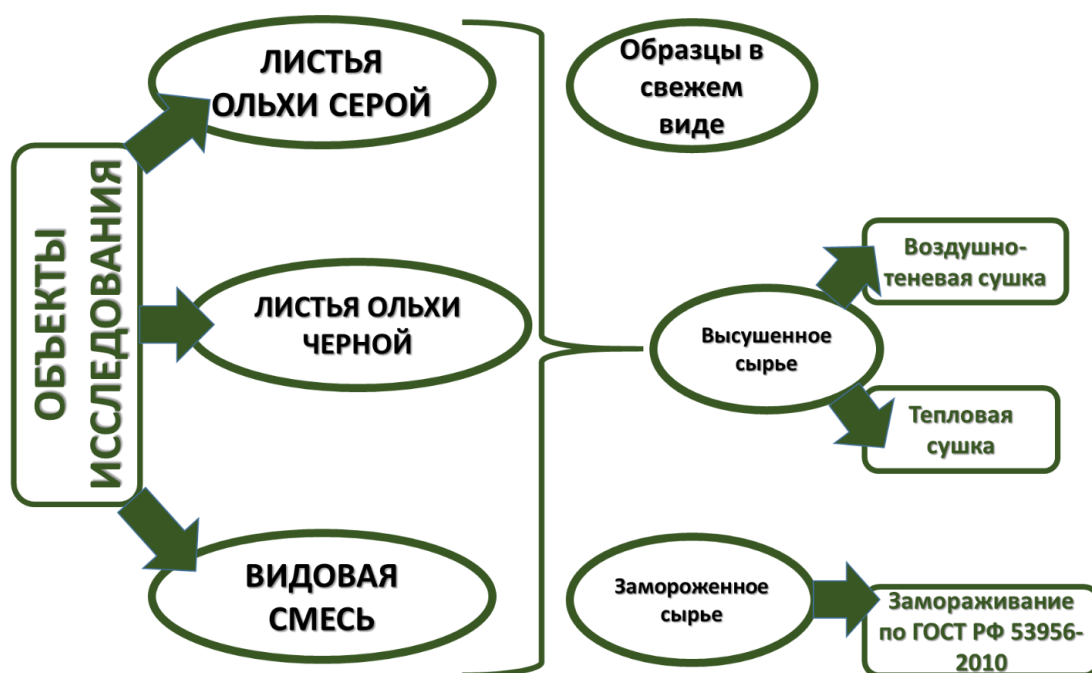


Рисунок 17 – Характеристика объектов исследования, отличающихся методом консервации

Образцы высушенного сырья листьев ольхи серой и черной были упакованы в бумажные пакеты промышленного изготовления. Хранение отобранных образцов сырья осуществлялось с учетом требований нормативной документации [62] в чистом, регулярно вентилируемом, сухом помещении с уровнем контроля влажности, температуры, исключая попадания прямых солнечных лучей и исключением возможности перекрестной контаминации [62]. Для проведения заморозки сырья образцы листьев ольхи серой и черной герметично упаковывали в полиэтиленовые пакеты, хранение осуществляли в морозильных камерах «Бирюса 215к-в». Свежее сырье непосредственно после заготовки перевозили в лабораторию для осуществления аналитических исследований, проведение которых осуществляли не позднее суток со времени сбора сырья. Для проведения отдельных исследований использовали соплодия ольхи серой и черной, заготовленные в соответствии с требованиями «Инструкции по сбору и сушке соплодий ольхи серой и ольхи клейкой» [43, 47].

Учитывая требования общей статьи ГФ XV [61], из исследуемого сырья проводили отбор точечных, объединенных, средних и аналитических проб для

проведения соответствующих испытаний. Свежее и замороженное сырье измельчали в аптечной ступке растиранием, образцы высушенного сырья подвергали измельчению на аналитической мельнице «Ика» (Германия) [43].

Для предварительной оценки качества возможных лекарственных форм, получаемых из нового растительного сырья листья ольхи серой и черной были получены водные и водно-спиртовые извлечения: настои, настойки, полученные в соответствии с рекомендациями ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары; ОФС.1.4.1.0019.15 Настойки. Для получения извлечений был использован спирт этиловый разных концентраций, получаемый разведением спирта этилового, соответствующего требованиям ФС.2.1.0036., а также воду очищенную, соответствующую требованиям ФС .2.2.0020 «Вода очищенная – Aqua purificata».

Изучение качественного состава различных групп БАВ листьев ольхи и оценка их количественного содержания проводилась с использованием реактивов и реагентов, отвечающих требованиям нормативно-технической документации, обеспечивающей их доброкачественность.

При проведении экспериментальных исследований, требующих использования стандартных образцов, использовались коммерчески доступные на российском рынке стандартные образцы различных производителей («Sigma-Aldrich» и «Flucka» и др) [43].

## **2.2. Краткая характеристика методов анализа, применяемых при исследовании соплодий и листьев ольхи фармакопейных видов**

При формировании дизайна фитохимического исследования листьев ольхи видов серая и черная планировали проведение определения в сырье групп биологически активных веществ, наличие которых в составе сырья предопределяет наличие в листьях ольхи комплексной фармакологической активности и гарантирует его лекарственную ценность. При выборе групп БАВ перспективных для изучения в составе извлечений из листьев ольхи ориентировались на имеющиеся данные научной литературы, а также возможность разработки методов

стандартизации сырья по данным веществам. Для осуществления фитохимического анализа получали извлечения из сырья с использованием различных реагентов, обеспечивающих максимальное извлечение анализируемой группы БАВ.

### **2.2.1. Определение экстрактивных веществ в листьях ольхи**

Оценку содержания экстрактивных веществ, содержащихся в листьях ольхи серой и ольхи черной, осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0006. «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». В качестве экстрагента использовали воду очищенную, спирт этиловый разных концентраций, гексан, хлороформ, ацетонитрил. Также использовалась хлороформная вода.

### **2.2.2. Анализ тритерпеновых сапонинов**

На этапе предварительного анализа проводили качественные реакции обычно используемые для подтверждения наличия в сырье веществ сапониновой природы. С целью проведения качественных реакций готовили водные извлечения из исследуемого сырья, с которыми проводили реакции пенообразования, с раствором свинца ацетата, спиртовым раствором холестерина, реакцию Лафона [8, 64], позволяющие подтвердить наличие сапонинов в листьях ольхи.

Для верификации результатов качественных реакций идентификацию тритерпеновых веществ осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках компании «Merck», применяя различные системы растворителей, используемые в качественном анализе сапонинов [8]. Учитывая принятую лабораторную практику, вещества сапониновой природы из предварительно измельченных листьев ольхи извлекали 70%-ным этиловым спиртом в

соотношении 1:10 (сырье: экстрагент). Для дальнейшей идентификации агликонов тритерпеновых сапонинов проводили стадию гидролиза, в ходе которой отбирали аликвоты объемом 15 мл из анализируемых экстрактов и выпаривали до сухого остатка в выпарительных чашках. Образовавшиеся остатки подвергали обработке гидролизующей смесью, состоящей из уксусной кислоты, концентрированной хлороводородной кислоты (35-38%) и воды очищенной, смешанных в соотношении 3,5:1:5,5. Данная стадия пробоподготовки занимала 120 минут и её проводили при нагревании на водяной бане. По завершении процесса гидролиза, образовавшийся раствор разводили водой очищенной и фильтровали, выделяя осадок, содержащий сумму генинов тритерпеновой природы. Осадок, содержащий сумму генинов, растворяли в этаноле 95%. В качестве контрольного образца использовали стандарт олеаноловой кислоты.

Идентификацию веществ на хроматограммах проводили с помощью 20%-ного раствора фосфорновольфрамовой кислоты в 95%-ном этиловом спирте, при этом зоны адсорбции тритерпеновых соединений и олеаноловой кислоты (Solarbio; CAS 508-02-1) приобретают розоватую окраску.

К количественному определению содержания тритерпеновых сапонинов в экстрактах листьев и соплодий ольхи серой и черной прибегали с использованием метода УФ-спектрофотометрии после реакции с концентрированной серной кислотой [8]. Это приводило к протонированию тритерпенового цикла с образованием карбокатиона в месте расположения непредельной связи; в случае наличия карбоксильной группы на С-28 происходило дополнительное формирование лактона. Максимум поглощения полученного продукта реакции фиксировался при длине волны 310 нм. Подробная характеристика стадий аналитического процесса количественного определения тритерпеновых сапонинов в листьях ольхи представлена в методике, изложенной в научной литературе [8].

### **2.2.3. Определение содержания каротиноидов и хлорофилла в листьях ольхи**

Учитывая растущий интерес исследователей к использованию растительных извлечений, содержащих компоненты, обладающие фотосенсибилизирующим действием в фотодинамической терапии, в частности производные порфирина, а также уникальную для растений средней полосы способность сохранять зеленый цвет листьев до их сбрасывания после наступления отрицательных температур, характерную для листьев ольхи серой и черной, мы сочли целесообразным провести оценку содержания пигментов (хлорофилла и каротиноидов в сырье). Идентификацию веществ каротиноидной природы и хлорофиллов в листьях ольхи серой и черной проводили методом ТСХ на пластинках Merk; подвижная фаза гексан-изопропиловый спирт-раствор натрия карбоната водный (50: 5: 0,25). Стандартными образцами служили  $\beta$ -каротин (CAS 7235-40-7 Alfa-Aesar) и хлорофилл, а (CAS 479-61-8 Sigma- Aldrich). Результаты разделения оценивали по цвету пятен в видимом и УФ-свете. Для количественного определения суммы каротиноидов и хлорофиллов при совместном присутствии использовалась методика УФ-спектрофотометрии, изложенная в патенте Российской Федерации RU 2 531 940 C1 от 2014-10-27 (G01N33\15 G01N21\25). Пробоподготовка сырья включала дробную экстракцию листьев ольхи спиртом этиловым 70%, с последующим объединением полученных фракций, доведением объема извлечения спиртом этиловым 96% и измерение оптической плотности раствора относительно спирта этилового 96% при 442 и 667 нм, с пересчетом содержания каротиноидов и хлорофиллов на абсолютно сухое сырье.

### **2.2.4. Изучение состава и оценка суммарного содержания флавоноидов**

Предварительное определение наличия флавоноидов в извлечениях из листьев ольхи серой и черной осуществляли с использованием фармакопейных

качественных реакций [67], в дальнейшем идентификацию флавоноидов проводили методом ТСХ в системах растворителей:

\*кислота уксусная 15%;

\*хлороформ – метиловый спирт (8:2);

\*этилацетат – метановая кислота безводная – вода очищенная (70:15:15).

Детектирование зон, соответствующих веществам флавоноидной природы проводили в УФ –свете при длине волны 365 нм и последующей обработкой спиртовым раствором алюминия хлорида 5 %, парами аммиака [43].

После обработки детектирующим реагентом пластинку нагревали при температуре 100-105°C в сушильном шкафу в течение 2-3 мин. Оценку изменений фиксировали при дневном освещении [43].

Определение веществ флавоноидной природы проводилось также методом ТСХ по методике ФС .2.5.0005.15 «Березы листья» в системе растворителей хлороформ-спирт этиловый 96%-вода очищенная (26:16:3) с детектированием зон, соответствующих веществам флавоноидной природы в УФ–свете при длине волны 254 нм и последующей обработке свежеприготовленным диазореактивом [43].

Идентификацию компонентного состава фракции флавоноидов проводили методом ВЭЖХ на приборе «GILSTON» UV/VIS МОДЕЛЬ 151» [43].

Для проведения эксперимента высушенные листья ольхи серой и черной подвергали измельчению до достижения размера частиц сырья, способных проходить через сито, диаметр отверстий которого составляет 3 мм (ГОСТ 214-83). Около 1,0 г измельченных листьев ольхи серой и черной (точная навеска) аккуратно переносили в колбу вместимостью 100 мл, приливали 20 мл С<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН 70%, колбу с анализируемым сырьем и экстрагентом присоединяли к обратному холодильнику и осуществляли извлечение на кипящей водяной бане в течение 60-70 минут с начала закипания водно-спиртовой смеси в экстракционной колбе. По завершении времени экстракции, исследуемую смесь подвергали последовательно охлаждению и фильтрации в мерную колбу объемом 25 мл, с применением фильтра бумажного лабораторного. Объем полученного извлечения доводили этанолом 70% до метки [43].

Параллельно осуществляли приготовление серии 0,05% растворов сравнения стандартных образцов в 70% спирте этиловом. При проведении хроматографического анализа исследуемые извлечения и растворы сравнения объемом 20 мкл вводили в хроматограф и проводили исследование по вышеизложенной методике [43].

Количественное определение суммарного содержания веществ флавоноидной природы проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на 3-рутинозид кверцетина [43].

### **2.2.5. Изучение состава и оценка суммарного содержания фенолкарбоновых кислот**

Анализ качественного состава фракции, содержащей фенолкарбоновые кислоты осуществляли в образцах, выделенных в процессе экстракции спиртом этиловым 70%, из листьев ольхи серой и ольхи черной, методом ВЭЖХ на приборе компании «GILSON», производства Франции, модель 305, оснащенном ручным инжектором, модели RHEODYNE 7125 USA с применением компьютерной обработки экспериментальных данных, для чего мы воспользовались программой Мультихром для Windows [43]. Краткая характеристика условий проведения анализа представлена на Рисунке 18.



Рисунок 18 – Условия проведения хроматографического анализа фенолкарбоновых кислот в извлечениях из листьев ольхи серой и черной

Оценку количественного содержания фенолкарбоновых кислот в листьях ольхи серой и черной осуществляли методом спектрофотометрии в пересчете на кофейную кислоту [43]. Стадии аналитической методики представлены на Рисунке 19.

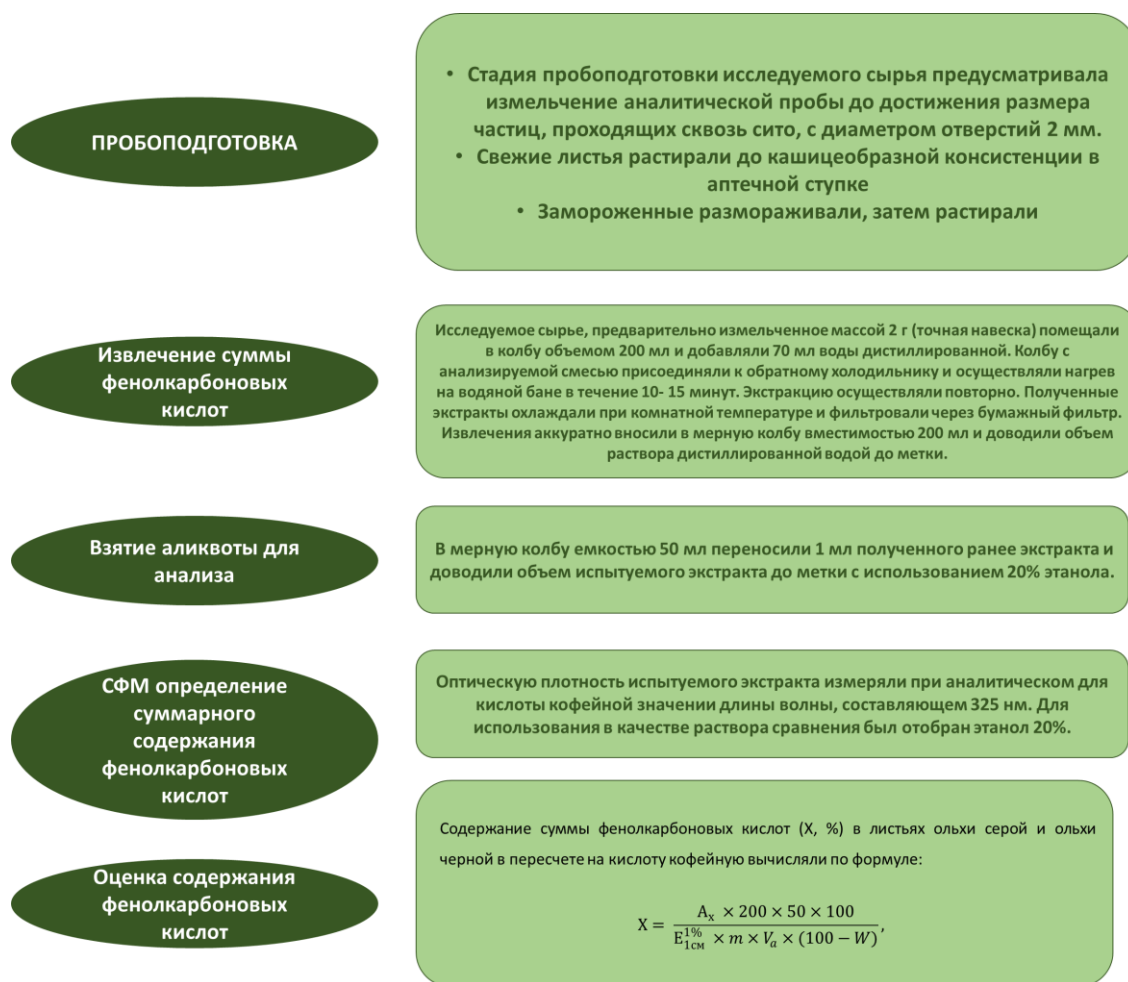


Рисунок 19 – Характеристика аналитической методики количественного определения суммарного содержания фенолкарбоновых кислот

## 2.2.6. Изучение состава и оценка суммарного содержания органических кислот

Органические кислоты являются одними из наиболее распространенных веществ, вырабатываемых растительными организмами. Они являются активными участниками метаболизма, наличие которых необходимо при синтезе хлорофилла, пектинов, лигнина и многих других групп веществ. В настоящее время в научной проблематике активно рассматривается влияние органических кислот на биохимические реакции организма человека, что в свою очередь повышает интерес к изучению данной группы БАВ в различных видах лекарственного и пищевого растительного сырья [21].

Поскольку нами не была выявлена исчерпывающая информация о содержании органических кислот в листьях ольхи серой и черной, нами был проведен их качественный анализ и количественное определение.

Идентификация свободных органических кислот осуществлялась по описанной ранее для лекарственного растительного сырья и сборов лекарственных растений методике, предложенной А. Н. Кузьменко и соавт. [17]. Стадии аналитического процесса представлены на Рисунке 20.

Учитывая выраженную метаболическую активность природных органических кислот, содержащихся в лекарственном растительном сырье, мы сочли целесообразным провести сравнительную оценку их содержания в листьях ольхи [17, 21, 55].

Оценку количественного содержания свободных органических кислот проводили алкалометрическим титрованием в пересчете на кислоту пропандиовую в соответствии с фармакопейной методикой, предложенной для сырья – рябины обыкновенной плоды, ФС.2.5.0093.18.

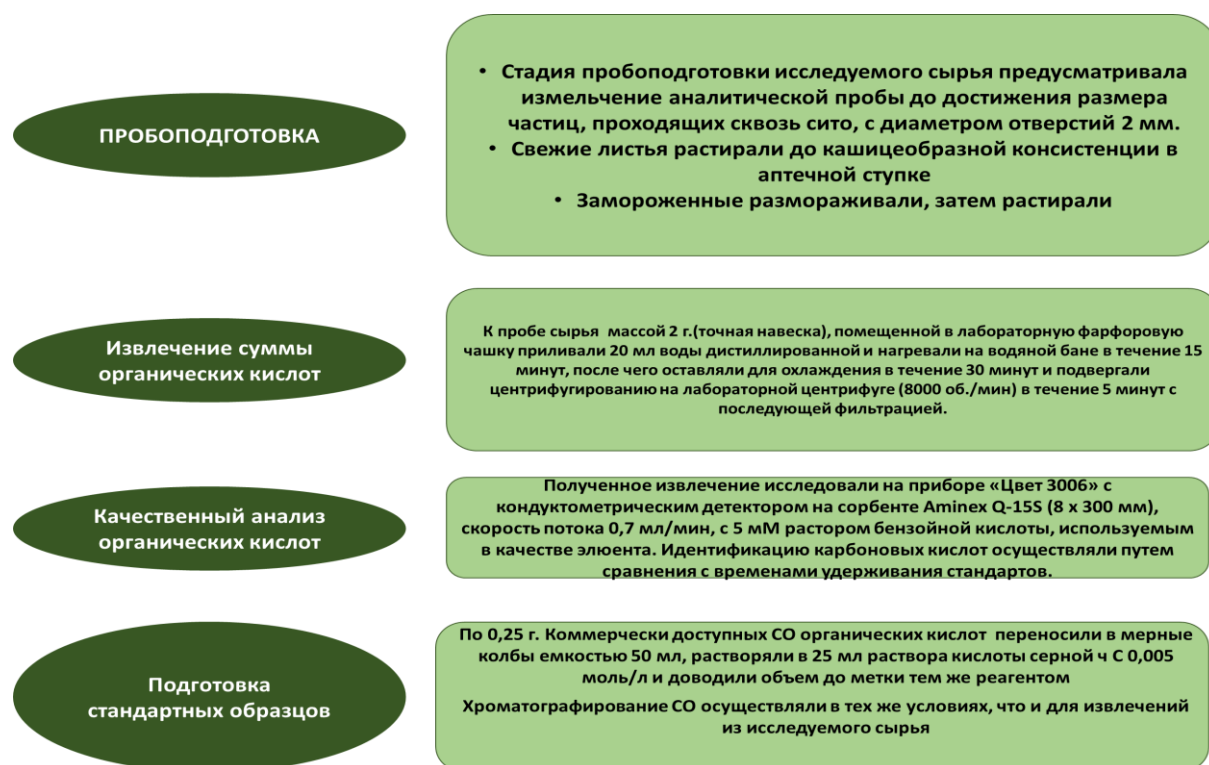


Рисунок 20 – Характеристика стадий процесса анализа состава комплекса органических кислот листьев ольхи серой и черной

### 2.2.7. Определение аминокислотного состава листьев ольхи

Аминокислоты встречаются в растительном сырье в свободном и связанном виде и, согласно современным исследованиям, способны как формировать собственный вклад в фармакологическое действие сырья (к примеру, кукурбитин, обеспечивающий антигельминтную активность семян тыквы или лизин, замедляющий формирование диабетической ретинопатии), так и синергитическое воздействие совместно с БАВ, отвечающими за основное направление физиологического действия конкретного растительного объекта. Обладая высокой биодоступностью, аминокислоты, поступающие в организм при использовании лекарственного растительного сырья, способствуют нормализации метаболических процессов, что обуславливает интерес исследователей к изучению и нормированию их содержания в различных растительных объектах.

Для подтверждения присутствия аминокислот в извлечениях из листьев ольхи серой и черной использовали нингидриновую и биуретовую реакции, добавляя к извлечениям, полученным нагреванием 1г сырья с 50 мл воды очищенной на водяной бане в течение 20 минут 0,1% раствор нингидрина свежеприготовленный (1-я пробирка) и 10% раствор натрия гидроксида и 2-3 капли 1% раствора сульфата меди (2-я пробирка).

Для определения состава аминокислотной фракции воспользовались методикой аминокислотного анализа, применяемой при изучении состава АК и низкомолекулярных пептидов в растительном сырье. Анализ проводили на приборе Keltec 1030, Швеция. Пробоподготовка листьев ольхи включала измельчение исследуемого сырья, взятие точной навески измельченных листьев ольхи серой и черной- 100 мг, добавление 50 мл раствора SDS (натриевую соль монододецилового эфира серной кислоты; CAS151-21-3) 0,25% в буферном фосфатном растворе с рН - 6,4 (буфер получали растворением 2,5 г додекагидрата динатрия гидрофосфата ;2,5 г дигидрата натрия дигидрофосфата и около 8 г натрия хлорида в воде очищенной с последующим потенциометрическим доведением

значения водородного показателя до заданного значения pH; ОФС.1.3.0003 Буферные растворы).

Состав аминокислот, входящих во фракцию низкомолекулярных пептидов, также извлекаемых в составе гидрофильной фракции в водное извлечение из растительного сырья анализировали после проведения гидролиза с кислотой хлороводородной в запаянных ампулах. Хроматографическое исследование подготовленных проб проводили, используя коллектора фракций "multriac" Pharmacia LKB Frac-100. Показания интегратора прибора расшифровывали по стандартным хроматограммам известных аминокислот [43].

### 2.2.8. Определение дубильных веществ

Известно, что фармакопейное сырье – *Alni fructus* рассматривается традиционно, как источник дубильных веществ, согласно литературным данным, листья ольхи также богаты дубильными веществами. Для подтверждения наличия дубильных веществ в сырье получали водные извлечения из листьев ольхи серой и черной и проводили качественные реакции с использованием фармакопейных реактивов, которые широко используются для подтверждения подлинности лекарственного, а также пищевого растительного сырья, рассматриваемого как источник соединений данной группы [29]. Нами также был использован ТСХ анализ, рекомендуемый Европейской Фармакопеей 7 изд. Анализ, проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» 10x15 см, в приведенных ниже системах растворителей (Рисунок 21), широко используемых в хроматографическом анализе извлечений из объектов, содержащих дубильные вещества [2, 33, 43].

Компоненты хроматографической системы	Объемное соотношение компонентов
эфир диэтиловый - этановая кислота ледяная – гексан – этилацетат	20:20:20:40
метановая кислота безводная – этилацетат-толуол	10:30:60
н-бутанол- этановая кислота – вода	4:1:2
этилацетат – метановая кислота безводная – вода	80:10:10

Рисунок 21 – Некоторые системы растворителей, используемые в хроматографическом анализе извлечений из растительных объектов, содержащих дубильные вещества

Зоны адсорбции детектировали при просмотре в УФ-свете с длиной волны 254 и 365 нм, после чего хроматограммы обрабатывались растворами железоаммониевых квасцов 1% и  $AlCl_3$  раствором спиртовым 2% [43].

Анализ количественного содержания дубильных веществ в листьях ольхи серой и черной проводили с использованием метода перманганатометрического титрования в пересчете на танин [2, 27, 29, 43, 63, 67].

Оценку количественного содержания полифенолов [35, 82] в исследуемых листьях ольхи проводили спектрофотометрически, используя метод *Folin-Ciocalteu*, получивший широкое распространение при стандартизации пищевого растительного сырья, содержащего дубильные вещества, а в последнее время, применяемый и в анализе ЛРС. В основе данного метода лежит применение комплексного реактива, предложенного шведским физиологом и химиком О.К.О. Folin и румынским врачом, и биохимиком V. Ciocalteu, получивший название

«реактив *Folin-Ciocalteu*»,. Значение показателя оптической плотности реакционной смеси является пропорциональным количественному содержанию полифенолов исследуемого сырья. Пробоподготовка объектов исследования-листьев ольхи анализируемых видов разных способов консервации осуществлялась по традиционной методике, обычно применяемой для образцов растительного сырья, анализ которого осуществляется методом спектрофотометрии с реактивом *Folin-Ciocalteu* [164]. Для сравнения использовали раствор, содержащий 3,4,5-тригидроксибензойную (галловую) кислоту, свежеприготовленный реактив *Folin-Ciocalteu*, раствор натрия карбоната и воду очищенную [43].

Для расчета суммарного содержания полифенольных соединений в % в пересчете на кислоту 3,4,5-тригидроксибензойную использовали формулу [43]:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 1 \times 100 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times a \times 100 \times 100 \times (100 - w)}, \text{ где}$$

$D$  – оптическая плотность исследуемого раствора

$D_0$  – оптическая плотность раствора РСО 3,4,5-триоксибензойной кислоты

$m$  – масса листьев ольхи, взятых для анализа, г

$m_0$  – масса РСО 3,4,5-тригидроксибензойной кислоты, г

$a$  – аликвота испытуемого раствора, мл

$w$  – потеря в массе при высушивании листьев ольхи, %

### 2.2.9. Определение полисахаридов

Для оценки содержания водорастворимого полисахаридного комплекса в листьях ольхи видов серая и черная, а также видовой смеси сырья использовали на первом этапе пробоподготовки экстракцию сырья 70% этанолом для удаления, мешающих анализу фенольных веществ.

Экстракт отфильтровывали, полученный шрот высушивали в изотермическом режиме, взвешивали точную навеску, помещали в колбу емкостью 2 л, доливали подогретую дистиллированную воду в соотношении шрот-экстрагент 1:20, и выдерживали на водяной бане в течение 120 минут, осуществляя постоянное

перемешивание. Экстракция повторялась дважды в соотношении сырье-экстрагент 1:10. Полученные водные извлечения объединяли и очищали на полиамидном сорбенте [43]. Полученное объединенное извлечение использовалось для выделения фракции полисахаридов реакцией «замены растворителя», путем осаждения 96% этанолом. Осадок, содержащий объединенный полисахаридный комплекс, отфильтровывали и очищали от балластных веществ последовательной обработкой 70% этанолом, 96% этанолом и диметилкетонем, после чего высушивали в сушильном шкафу и взвешивали.

Для проведения анализа на выявление состава моносахаридов, полисахаридные комплексы, полученные для количественного определения, подвергали гидролизу серной кислотой с последующим качественным анализом состава моносахаридов методом ВЭЖХ в соответствии с стадиями, представленными в Таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика стадий и оборудования для анализа состава моносахаридов полисахаридного комплекса листьев ольхи

Стадия методики	Краткая характеристика	Используемое оборудование
Пробоподготовка	точные навески полисахаридных комплексов взвешивали на весах аналитических OHAUS-Pioneer, количественно переносили в колбы для проведения гидролиза.	весы аналитические OHAUS-Pioneer; сушильный шкаф BINDER FED53 (Германия)
Гидролиз полисахаридного комплекса	В колбу с образцами доливали кислоту серную и выдерживали в сушильном шкафу BINDER FED53 (Германия) в течение 6 часов.	сушильный шкаф BINDER FED53 (Германия)

## Продолжение Таблицы 3

Нейтрализация	После выдерживания в течение указанного времени, полученные гидролизаты нейтрализовали порошком бария карбоната, отфильтровывали полученный осадок бария сульфата, вносили 3 равные оставшемуся фильтрату объема 96% этанола и оставляли на 120 минут, далее образовавшийся осадок отфильтровывали, фильтраты, содержащие сумму нейтральных моносахаров упаривали и использовали для изучения качественного состава.	Колбы, воронки, бумажные фильтры, выпарительная чашка
Определение качественного состава моносахаридов полисахаридного комплекса листьев ольхи	Определение качественного состава простых сахаров проводили методом ВЭЖХ	Колонка 300 мм x 8 мм Shodex sugar SC 1011Ca; S подачи ПФ: 1,0см <sup>3</sup> /мин, детектирование: рефрактометрический детектор V ВФ: 20 мм <sup>3</sup> , Элюент: дистиллированная вода

**2.2.10. Определение веществ-маркеров листьев ольхи серой и черной**

Современные тенденции исследований, проводимых с целью стандартизации и предотвращения фальсификации лекарственного растительного сырья,

предполагают проведение анализов, направленных на выявление так называемых «веществ-маркеров». Как показывает анализ научной литературы подобные соединения могут быть в составе как гидрофильной, так и липофильной фракций исследуемого сырья, могут отвечать за совокупный фармакологический эффект или не выполнять важных физиологических функций, однако их присутствие в исследуемых образцах позволяет однозначно решить вопрос подлинности образцов. Как известно, данное аналитическое направление в последние годы получило признание как одно из важнейших в системе стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе, что было внесено в Директивы Совета Евразийской экономической комиссии «Требования к исследованию стабильности средств из лекарственного растительного сырья».

Пробоподготовка осуществлялась по известной методике, применяемой для подготовки лекарственного и пищевого растительного сырья к анализу маркерных компонентов [39, 42].

Исследование проводили на приборе Agilent Technologies 6850 Series II. Детектор масс-селективный Agilent Technologies Network. Хроматографическая колонка HP-5MS (30м x 0,25 мм). Условия хроматографирования стандартные, широко используемые при анализе извлечений из растительного сырья [18].

Для надежной идентификации выявленных веществ нами были применены стандартные образцы коммерчески доступных веществ «Sigma-Aldrich», «Phytolab», «Ph. Eur. Reference Standard».

Обработку полученных результатов проводили с применением программного обеспечения «Qualitative analysis B.07.00» компании Agilent.

### **2.3. Определение товароведческих показателей листьев ольхи**

Оценку товароведческих показателей листьев ольхи серой и ольхи черной осуществляли, руководствуясь требованиями фармакопейных статей, представленных на Рисунке 22.

ПОКАЗАТЕЛЬ	НД	ОБОРУДОВАНИЕ
Влагосодержание	ОФС 1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»	Шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80п
Зола общая	ОФС.1.2.2.2.0013.15 Зола общая	Печь муфельная LF-2\13-G2
Зола, нерастворимая в 10% HCl	ОФС 1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»	Беззольный фильтр (Белая лента, МЕЛИОР XXI)
Измельченность /примеси	ОФС 1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Набор сит с отверстиями 2,5, 2, 1, 0,5, 0,25
Коэффициент водопоглощения	ОФС.1.5.3.0012 Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья	Аппарат инфундирный с перфорированным дном

Рисунок 22 – Характеристика методов, используемых при оценке товароведческих показателей

Отбор проб исследуемого сырья для проведения товароведческого анализа осуществляли в соответствии с рекомендациями ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [43].

#### 2.4. Определение антимикробной активности исследуемого сырья

В научной литературе имеются сведения, характеризующие наличие у представителей рода *Alnus* антимикробной активности, рассмотренные в разделе 1.5. нашей диссертационной работы [65, 109, 123, 136] Наличие антимикробного действия экстракта листьев ольхи черной, произрастающей в Республике Беларусь в отношении *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* была установлена в исследованиях Моисеева Д.В. [23]. Однако, как известно, химический состав и зональность произрастания могут влиять на фармакологические свойства растения,

что обуславливает важность изучения антимикробного действия видов ольхи, произрастающих в Центральном регионе Российской Федерации.

Оценку антимикробного действия извлечений из листьев ольхи серой и черной проводили на основе данных методических указаний, включенных в «Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования» под редакцией М. О. Биргера (Москва, изд. «Медицина», 1982) с использованием метода диффузии в агар на плотной питательной среде. В ходе исследования нами были использованы стандартные штаммы тест-микроорганизмов, наиболее распространенные в качестве индикаторных при оценке антимикробной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на его основе [43].

## **2.5 Валидация применяемых в ходе исследования методик, статистическая обработка полученных экспериментальных данных**

Валидацию методик, применяемых в ходе определения групп БАВ, которые планируется включить в разрабатываемую нормативную документацию на листья ольхи серой и черной проводили согласно ОФС.1.1.0012. «Валидация аналитических методик». Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013. «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний», для обработки массива полученных экспериментальных данных использовался пакет ПО Microsoft Office Excel 2010. Метрологические характеристики методик анализа представлены далее [43].

Метрологические характеристики методики определения БАВ в двух видах ольхи ( $n = 5$ ,  $P_x = 0,95$ ,  $t(p,f) = 2,776$ ) [43],

$n$  – число повторных испытаний;

$\bar{X}$  – среднее значение из числа повторностей,  $\bar{X} = \frac{\sum_i^n x_i}{n}$ ;

$P_x$  – доверительная вероятность;

$t(P, f)$  – критерий Стьюдента;

$S_x^2$  – дисперсия;

$S_x$  – стандартное отклонение;

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}};$$

$S_{\bar{X}}$  – стандартное отклонение среднего результата,  $S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$ ;

$\Delta x$  – доверительный интервал,  $\Delta x = \frac{t(P,f) \times S_x}{\sqrt{n}}$ ;

$\bar{\varepsilon}$  – относительная ошибка определения,  $\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta x}{\bar{X}} \times 100\%$

## **2.6. Разработка методического подхода к анализу листьев ольхи серой и черной на основе системного анализа нормативной документации и научной литературы**

Обобщая проработанные литературные данные и принципы создания нормативной документации на лекарственное растительное сырье (ОФС), нами предложены подходы к исследованию нового перспективного сырья – листья ольхи серой и черной, содержащие сложный комплекс биологически активных веществ и обладающих широким спектром фармакологической активности, включающие использование сырья в свежем, замороженном и высушенном виде с определением для всех предлагаемых групп совокупности методов определения макро- и микродиагностических признаков сырья, проведения фитохимического и товароведческого анализа, определения антимикробной активности листьев двух видов на стандартных штаммах тест-микроорганизмов, наиболее распространенных в качестве индикаторных при оценке антимикробной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на его основе, с последующей оценкой показателей качества извлечений из сырья и разработкой проекта нормативной документации .

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ *ALNUS INCANA* (L.) *MOENCH* И *ALNUS GLUTINOSA* (L.) *GAERTN***

Учитывая отсутствие нормативной документации, характеризующей качество листьев ольхи видов серая и черная в Российской Федерации нами проводилось изучение морфолого-анатомических признаков сырья с учетом их вариабельности, обусловленной возможным влиянием метода консервации в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0003. «Листья» и ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [43].

#### **3.1. Изучение внешних признаков сырья ольхи серой и черной**

Для оценки внешних признаков листьев ольхи серой и ольхи черной изучались в свежесобранном виде, высушенными и замороженными. Анализ образцов свежих листьев ольхи проводили непосредственно после заготовки сырья. Высушенные листья ольхи изучаемых видов размягчали, помещая на 3-5 минут в теплую воду, затем увлажненные листья аккуратно расправляли на стеклянной пластинке и после чего проводили оценку внешних признаков, отмечая диагностически значимые. Анализ замороженных листьев проводили после предварительно проведенного размораживания сырья в холодильнике в температурном режиме 5-7°C в течение 120 минут или выдерживания в теплой воде, после чего листья ольхи серой и черной изучались невооруженным глазом при дневном освещении, с использованием лупы (10x) или стереомикроскопа. Результаты анализа представлены в Таблицах 4, 5.

Таблица 4 – Морфометрические показатели листьев ольхи серой

Вид сырья		Длина листа, см	Ширина листа, см	Средняя масса свежего листа, г
<b>Ольха серая-<i>Alnus incana</i> (L.) <i>Moench</i></b>	Тверская область	4,2-10,4	2,3-6,8	0,74
	Московская область (Сергиев Посад)	3,6-9,8	2,4 – 7,1	0,73
	Декоративного растения, крупномеры «Сады Семирамиды»	4,1-10,7	2,8-7,2	0,78
<b>Высушенные листья ольхи серой</b>		3,5-9,4	2,3-6,8	0,31

Таблица 5 – Морфометрические показатели листьев ольхи черной

Вид сырья		Длина листа, см	Ширина листа, см	Средняя масса листа, г
<b>Ольха черная- <i>Alnus glutinosa</i> (L.) <i>Gaerth.</i></b>	Тверская область	4,5-11,2	3,0-8,8	0,78
	Московская область (Сергиев Посад)	4,3-11,1	3,2 – 8,3	0,75
	декоративное растение, крупномер, сорт «Imperials»	4,8-11,6	3,1-8,9	0,79
<b>Высушенные листья ольхи черной</b>		4,2-10,9	3,0-8,6.	0,33

<b>ПРИЗНАК</b>	<b>Alnus incana Moench</b>	<b>Alnus glutinosa Gaerth</b>
<b>Строение и размер листьев</b>	Листья простые, черешковые, длина листа составляет от 4 до 11,5 см, ширина листа от 3,5 до 7 см, черешок до 2 см.	Листья простые, черешковые, длина листа составляет от 2,5 до 12,5 см, ширина - от 2,5 до 6 см, черешок длиной до 3,5 см
<b>Форма</b>	<b>Яйцевидная или овальная форма</b>	<b>Широкообратнояйцевидная или почти округлая</b>
<b>Верхушка, основание и влагалище листа</b>	Основание округлое или широко-клиновидное, верхушка листа клиновидно суженная, иногда чуть заостренная, реже притупленная, влагалище отсутствует	Основание клиновидное цельнокрайное, верхушка притупленная или выемчатая, влагалище отсутствует
<b>Край листа</b>	<b>Край листа остродвойкопильчатый</b>	<b>Городчато-пильчатый край листа</b>
<b>Жилкование листа</b>	Жилкование перистое, количество жилок составляет 7-11 (иногда встречается 13)	Жилкование перистое, количество жилок составляет 5-7 (иногда встречается 9)
<b>Опушение</b>	<b>Нижняя часть листа опушена</b>	<b>Почти отсутствует (редкие волоски по жилкам листа)</b>
<b>Цвет</b>	Листья с верхней стороны зеленые, блестящие, с нижней стороны светло-зеленые с выраженным, особенно по жилкам, опушением	Листья с верхней стороны темно-зеленые, блестящие, с нижней стороны светло-зеленые
<b>Запах, вкус</b>	<b>Запах слабый, травянистый, вкус вяжущий</b>	<b>Запах слабый, травянистый, вкус вяжущий</b>

Рисунок 23 – Сравнение внешних признаков листьев ольхи [43]

В результате проведенных исследований листьев ольхи видов серая и черная были установлены наиболее существенные признаки, характеризующие внешний вид сырья. Установлено, что внешний вид сырья, свежего, высушенного (выдерживание во влажной камере и расправление образца) или замороженного (размораживание сырья в холодильнике в температурном режиме 5-7°C в течение 120 минут или выдерживание в воде комнатной температуры с последующим расправлением), после предварительной пробоподготовки, практически не отличаются. При смачивании поверхности листа свежего, высушенного или замороженного (лучше визуализируется на нижней светлой поверхности) каплей раствора железоаммонийных квасцов развивается черно-зеленое окрашивание [43].

Измельченное сырье, характеристика которого представлена на Рисунке 24, представляет собой отдельные кусочки листьев разной формы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, отличных по цвету фрагментов [43].

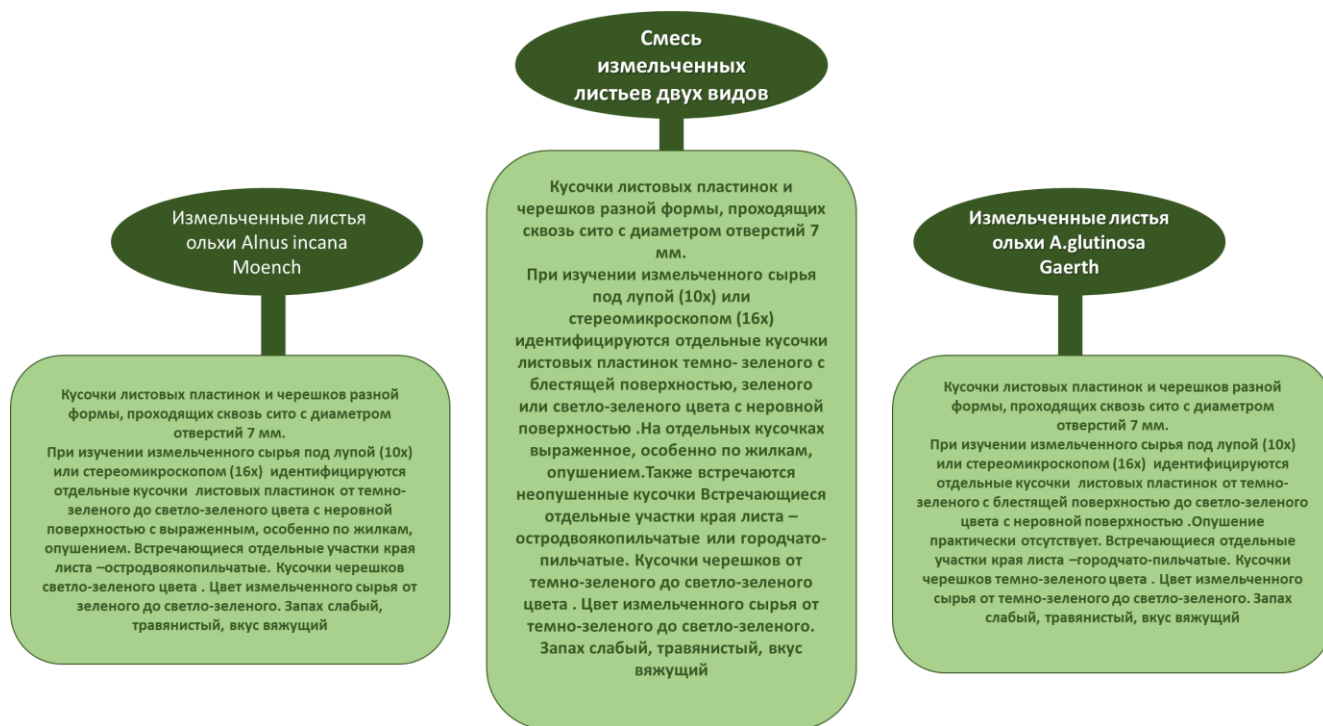


Рисунок 24 – Сравнение внешних признаков измельченных листьев ольхи видов серая и черная и видовой смеси

Порошок листьев, характеристика которого приводится на Рисунке 25, представляет собой кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, для порошка листьев ольхи серой и черной существенно отличается цветовой фон объектов.



Рисунок 25 – Сравнение внешних признаков порошка листьев ольхи видов серая и черная и видовой смеси

### 3.2. Изучение микроскопических признаков листьев ольхи серой и черной

Анализ научной литературы показал недостаточность данных, подтвержденных фотографиями микропрепаратов, по анатомо-диагностической характеристике листьев ольхи черной и серой, которые могли бы быть использованы при составлении раздела «Микроскопия» [43].

Отсутствуют данные по анализу анатомо-диагностических признаков свежего и замороженного сырья, а также измельченного сырья и порошка листьев. Учитывая вышеизложенное, нами было проведено анатомо-диагностическое исследование цельных и измельченных листьев ольхи черной и серой свежих, высушенных и консервированных замораживанием [43].

### 3.2.1. Изучение микродиагностических признаков свежих, высушенных и замороженных листьев ольхи

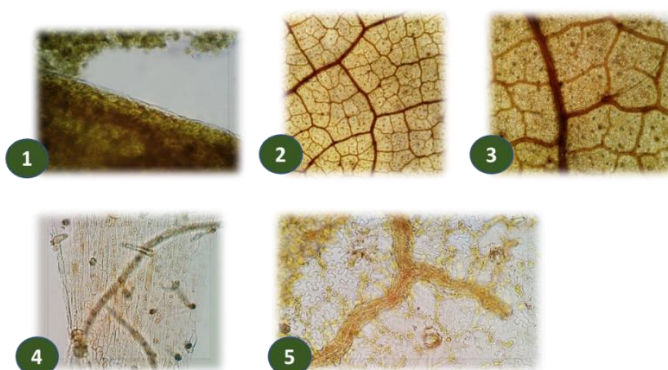
При анализе анатомо-диагностических признаков листьев ольхи фармакопейных видов микропрепараты готовили в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Листья ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench)**

Клетки эпидермиса верхней стороны листа крупные, многоугольные, крупные, с нижней стороны листа-извилистые

**Листья ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn)**

Клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольные с утолщением оболочек, с нижней стороны листа- значительно мельче, извилистые



Верхняя сторона листа с поверхности ольхи черной. ув×10 -1, ольхи серой ув×10 - 2, ольхи серой ув×140 - 3 эпидермальные клетки ольхи серой верхней части листовой пластинки. ув×40 - 4  
Нижний эпидермис листа с поверхности ольхи серой и устьица аномоцитного типа. ув×100 - 5

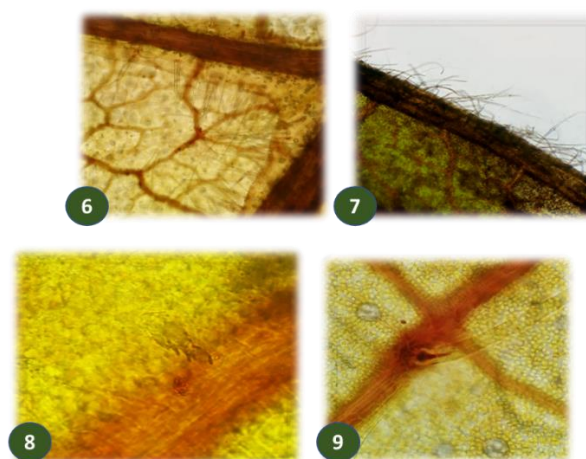
Рисунок 26 – Клетки эпидермиса и устьичный комплекс

На нижней стороне листа располагаются простые толстостенные волоски, особенно часто расположенные вдоль жилок - 6

Нижняя сторона листа с поверхности ольхи серой. ув×10  
Обильное опушение края листа простыми волосками у основания листовой пластинки. ув×10 - 7

Простой тонкостенный волосок с коричневым содержимым на верхней стороне листа. ув×40 - 8

Простой толстостенный волосок на нижней стороне листа. ув×40 - 9



**Листья ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench)**

Присутствуют простые одноклеточные тонко- и толстостенные волоски

**Листья ольхи черной (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn)**

Присутствуют простые волоски, максимально сосредоточенные по крупным жилкам

Рисунок 27 – Типы волосков [31]

Анализ данных микроскопического исследования листьев ольхи черной и серой выявил, в основном, идентичность признаков у данных видов, среди которых диагностическое значение имеют: размер и форма клеток эпидермиса, тип устьичного комплекса, расположение и строение волосков, железок с 5-клеточной головкой, наличие друз кальция оксалата в мезофилле и секреторные включения, расположенные вдоль жилки листа. Межвидовые отличия проявляются в особенностях строения и локализации простых волосков, и количестве друз оксалата кальция [31].

*Желёзка на короткой ножке с головкой из пяти клеток с коричневым содержимым, вид сбоку. ув×100 – 10*

*Желёзка с коричневым содержимым до - 11 и после окрашивания ЖАК - 12. ув×40, Секреторные включения, заполненные коричневым содержимым. ув×10 - 13, ув×40 - 14,*

*Бурые секреторные включения вдоль жилки. ув×100 – 15*

*Железки ольхи серой – 16,17 и черной - 18*

*Листья ольхи серой (Alnus incana (L.) Moench)*

*железки с 5-клеточной головкой, заполненной темно-коричневым содержимым*

*Листья ольхи черной (Alnus glutinosa (L.) Gaertn)*

*Встречаются железки с 5-клеточной головкой с бурым содержимым*

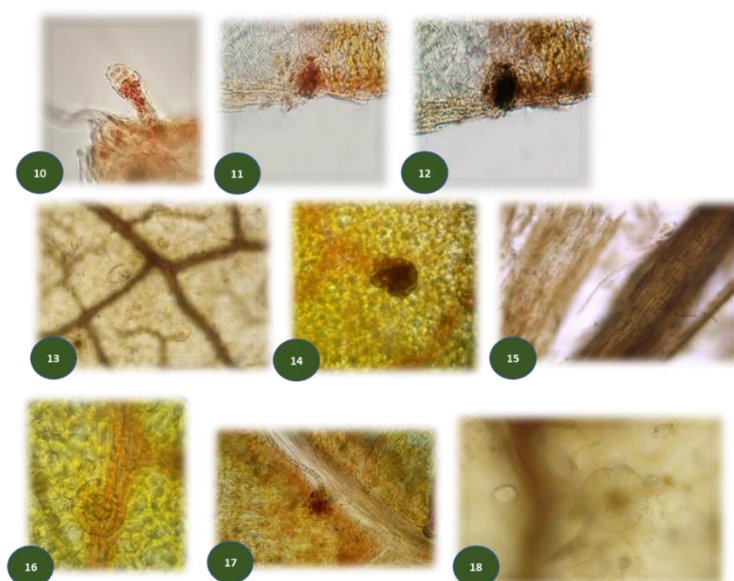
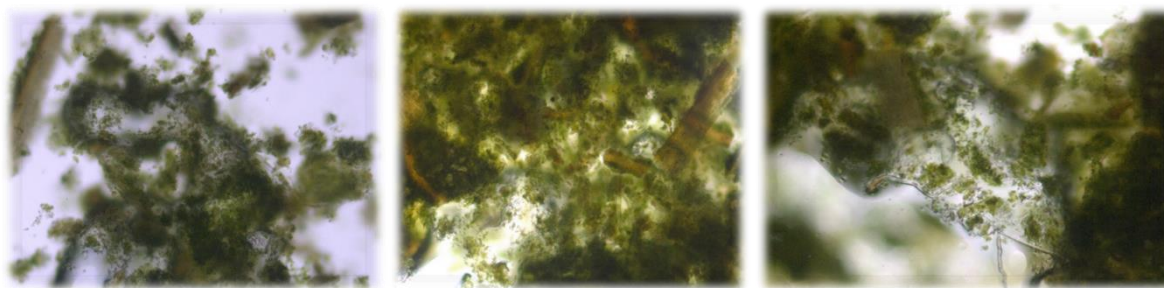
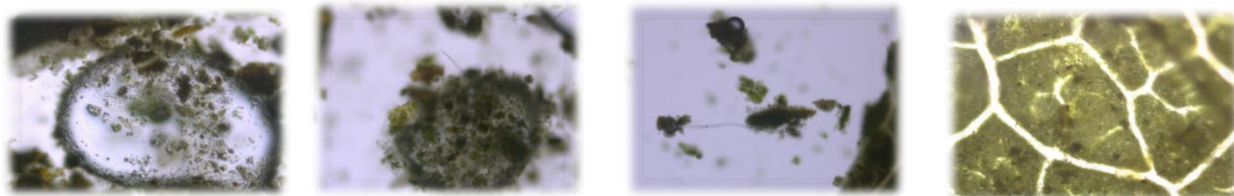


Рисунок 28 – Железки [31]

В измельченном и порошокванном сырье присутствуют отдельные разрозненные диагностические признаки, в своей совокупности, позволяющие идентифицировать сырье- листья ольхи без видовой принадлежности [31]. На основании полученных данных нами представлено описание цельного сырья и порошка листьев ольхи серой и черной.



*Порошок листьев ольхи черной*



*Порошок листьев ольхи серой*

Рисунок 29 – Порошок двух видов листьев ольхи [31]

### 3.3. Выводы к Главе 3

1. Изучены внешние признаки листьев ольхи серой и черной, установлены характерные макродиагностические признаки, а также линейные размеры листьев растения. Листья ольхи серой яйцевидной или широкоэллиптической формы с клиновидносуженной верхушкой с округлым основанием листа, край листа остродвоякопильчатый, жилкование перистое, количество жилок 7-13. Цвет листьев с верхней стороны зеленый, с нижней- серовато-зеленый, по жилкам характерно опушение. Листья ольхи черной широкообратнояйцевидные, реже почти округлые верхушка листа притуплена, край листовой пластинки городчато-пильчатый. Жилкование перистое. Жилок наблюдается от 5 до 9. Верхняя поверхность листьев темно-зеленого цвета, блестящая, нижняя поверхность – светло – зеленая с единичными волосками по жилкам. Установлено, что внешний вид сырья, свежего, высушенного (выдерживание во влажной камере и расправление образца) или замороженного (размораживание сырья в холодильнике в температурном режиме 5-7°C в течение 120 минут или выдерживание в воде

комнатной температуры с последующим расправлением) , после предварительной пробоподготовки, практически не отличаются [43].

Измельченное сырье представляет собой отдельные кусочки листьев разной формы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, отличных по цвету фрагментов [43].

Порошок листьев представляет собой кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм., для порошка листьев ольхи серой и черной существенно отличается цветовой фон объектов. При смачивании поверхности листа (лучше визуализируется на нижней светлой поверхности) каплей раствора железоаммонийных квасцов развивается черно-зеленое окрашивание.

2. Проведено изучение микроскопических анатомо-диагностических признаков листьев ольхи серой и черной; выявлена , в основном, идентичность признаков у данных видов, среди которых диагностическое значение имеют: размер и форма клеток эпидермиса, тип устьичного комплекса ( аномоцитный ), расположение и строение волосков, железок с 5-клеточной головкой, наличие друз кальция оксалата в мезофилле и секреторные включения, расположенные вдоль жилки листа. Межвидовые отличия проявляются в особенностях строения и локализации простых волосков и количестве друз оксалата кальция. В измельченном и порошкованном сырье присутствуют отдельные разрозненные диагностические признаки, в своей совокупности, позволяющие идентифицировать сырье – листья ольхи без видовой принадлежности [43].

3. В ходе исследования выявлено, что способ консервации не оказывает влияние на встречаемость анатомо-диагностических признаков листьев ольхи серой и черной, которые присутствуют во всех исследованных образцах и могут быть включены в соответствующие разделы разрабатываемой нормативной документации.

## **ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ**

Как показано в обзоре литературы, листья ольхи серой и черной представляют собой сырье, по содержанию биологически активных веществ, не уступающее фармакопейному сырью-Соплодия Ольхи (*Fructus Alni*), при этом их заготовка не сопряжена с сложностями и ограничениями временного характера в отличие от соплодий [175, 179]. Вместе с тем, имеющиеся данные носят, как правило констатационный характер, наблюдается отсутствие систематичности в исследованиях химических компонентов листьев ольхи, произрастающих в Российской Федерации. Данные факторы препятствуют формированию показателей качества сырья для включения в нормативные документы. Разработка современных методов идентификации и количественной оценки БАВ листьев ольхи позволит создать соответствующую современным требованиям НД, что в свою очередь будет способствовать появлению новых фитопрепаратов на основе извлечений из изучаемого сырья.

### **4.1. Результаты предварительного качественного группового анализа биологически активных веществ листьев ольхи черной и серой свежих, высушенных, замороженных**

На начальном этапе исследований нами был проведен предварительный анализа групп БАВ листьев ольхи серой и черной, для которого нами были использованы извлечения из изучаемых образцов. Для получения извлечений нами использовались в качестве экстрагентов вода очищенная и водно-спиртовые смеси с разным содержанием этилового спирта, приготовленные в соответствии с требованиями ГФ XV издания [43].

Водные и водно-спиртовые извлечения из листьев ольхи серой и черной использовались для проведения качественных реакции на группы БАВ с использованием традиционных фармакопейных реактивов, рекомендованных в Государственных Фармакопеях IX-XV издания, а также подробно описанных в монографии Гринкевич Н.И.; Сафронич Л. Н. Результаты качественного, предварительного анализа на наличие основных групп БАВ в водных и водно-спиртовых извлечениях из листьев ольхи серой и черной свежих, а также подвергшихся консервации высушиванием и заморозкой, представлены в таблице 6. Как видно из данных таблицы для всех изучаемых видов сырья предварительно подтверждено наличие таких групп БАВ, как дубильные вещества, флавоноиды, полисахариды, сапонины [31, 43].

Таблица 6 – Основные группы БАВ, выявленные в ходе предварительного химического анализа листьев ольхи серой и черной в свежем (С), высушенном (В) и замороженном (З) виде

Объект исследования			Дубильные вещества				Флавоноиды				Полисахариды	Сапонины			
			с желатином	с FeCl <sub>3</sub>	с бромной водой	с антипирином	Цианидиновая	Цианидиновая по Бриангу	С NaOH	С AlCl <sub>3</sub>	осаждения	пнообразования	Реакция Лафона	С раствором холестерина	
Определено при анализе извлечений	Листья ольхи черной	свежие	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
		замороженное	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
		высушенное	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Листья ольхи серой	свежие	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	замороженное	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	высушенное	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
Листья смеси	свежие	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	замороженное	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	высушенное	водное	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		спиртовое	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	

## 4.2. Оценка содержания экстрактивных веществ в листьях ольхи серой и черной

Анализируя данные проведенных исследований по оценке количественного содержания в исследуемом сырье – листьях ольхи серой и черной разных способов консервации и свежих экстрактивных веществ следует отметить максимальный выход БАВ при использовании в качестве экстрагентов воды и спирта 45% [43]. Данные, полученные при определении экстрактивных веществ по методике Британской Травяной Фармакопеи существенно ниже, что может быть объяснено использованием смешанного экстрагента – хлороформной воды, отсутствием нагревания и использованием на стадии извлечения экстрактивных веществ длительного встряхивания. Данные анализа представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Результаты определения экстрактивных веществ в листьях ольхи с использованием различных растворителей

Объект исследования	Экстрагент: вода очищенная	Экстрагент: вода хлороформная	Спирт этиловый 45%	Спирт этиловый 70%	Спирт этиловый 96%	Хлороформ	Смесь хлороформ: метанол 1:1	Ацетон трил
Листья ольхи черной свежие	26.4	11.9	27.7	23,31	13.34	6,2	14.3	3.8
Листья ольхи черной заморож.	24.4	10.6	25.9	21.91	12.3	5.9	14.1	3.6
Листья ольхи черной высуш.	21.1	10.1	22.6	20,31	11.7	5.6	13.2	3.5
Листья ольхи серой свежие	25,3	9.8	26.1	24.43	14.30	7.1	15.9	4.3
Листья ольхи серой заморож	23.4	9.1	24.5	23.21	13.09	6.7	15.4	4.2
Листья ольхи серой высуш.	20.3	8.7	22.3	21,10	11,18	6.2	14.8	3.9
Листья ольхи - видовая смесь	21.1	9.4	23.4	20,54	10,54	7.1	14.3	3.7

Анализ проб подтверждает перспективность как использования высушенного сырья листьев ольхи серой и черной, так и возможность получения экстракционных препаратов на его основе. Несмотря на существенное преобладание гидрофильной фракции в исследуемых объектах, также вызывает интерес дальнейшее исследование гидрофобных фракций сырья.

#### 4.3. Определение содержания комплекса хлорофилла и каротиноидов в листьях ольхи

Проведенный нами качественный анализ исследуемых извлечений методом ТСХ позволил выявить 7 пятен, характерных для всех изучаемых образцов ольхи, для одного из них не обнаружено свечение в УФ-свете. Путем сопоставления значений  $R_f$  обнаруженных пятен с значениями  $R_f$  стандартных образцов в-каротина - CAS 7235-40-7 Alfa-Aesar ( $R_f = 0,79$ ) и хлорофилла - CAS 479-61-8 Sigma- Aldrich ( $R_f=0,12$ ) подтверждено наличие данных веществ. Результаты хроматографического анализа пигментов листьев ольхи представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Результаты ТСХ-анализа хлорофиллов и каротиноидов листьев ольхи видов серая и черная

Объект исследования		Значение величины $R_f$ обнаруженных веществ						
		1	2	3	4	5	6	7
Листья ольхи серой	свежие	0,79	0,60	0,39	0,29	0,22	0,18	0,13
	замороженные	0,78	0,61	0,37	0,31	0,24	0,19	0,14
	высушенные	0,78	0,62	0,38	0,31	0,21	0,18	0,13
Листья ольхи черной	свежие	0,81	0,57	0,41	0,32	0,24	0,21	0,12
	замороженные	0,79	0,58	0,43	0,31	0,26	0,20	0,13
	высушенные	0,79	0,59	0,43	0,31	0,26	0,22	0,14
Видовая смесь листьев	свежие	0,80	0,60	0,40	0,30.	0,21	0,17	0,10
	замороженные	0,81	0,61	0,39	0,32	0,23	0,18.	0,11
	высушенные	0,78	0,59	0,41	0,31	0,22	0,17	0,12

Результаты ТСХ-анализа хлорофиллов и каротиноидов листьев ольхи видов серая и черная подтвердили идентичность состава пигментов в независимости от вида исследуемого объекта и от способа консервации.

Анализ спектральных характеристик (рисунок) объединенного спиртового извлечения из листьев ольхи серой и черной продемонстрировал основные максимумы поглощения при 280 и 320 нм, характерные для гидроксикоричных кислот и фенольных производных, 440 нм, характерные для каротиноидов и 667 нм, присущие хлорофиллу. Поскольку максимумы поглощения каротиноидов и хлорофиллов в извлечениях из листьев ольхи серой и черной не пересекаются, возможно прямое спектрофотометрическое определение.

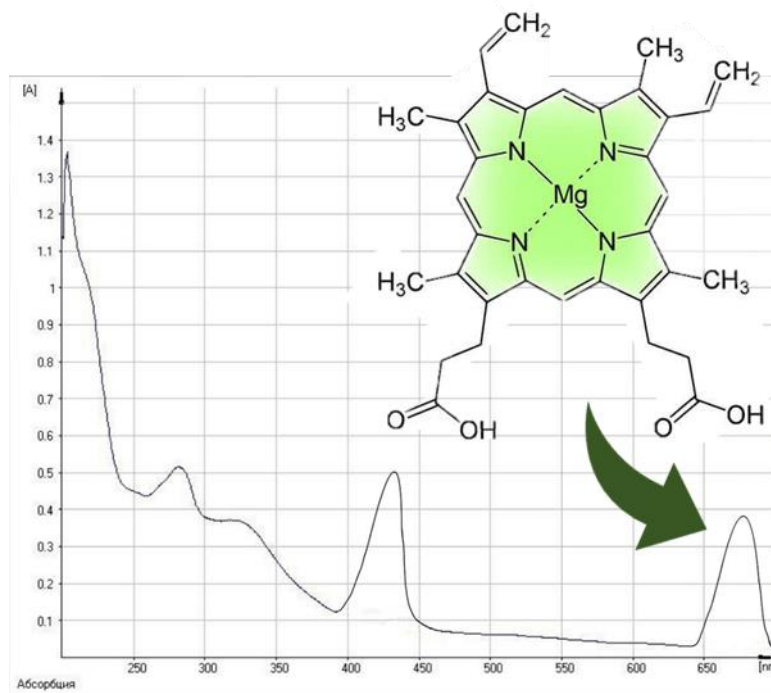


Рисунок 30 – УФ-спектр объединенного спиртового извлечения из видовой смеси листьев ольхи [43]

Результаты количественного определения пигментов в листьях ольхи представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Результаты количественного определения пигментов в листьях ольхи

Определяемое вещество, %	Расчетная формула	Объект исследования								
		Листья ольхи серой			Листья ольхи черной			Смесь листьев фармакопейных видов		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Сумма хлорофиллов	$X = \frac{A \times 250000}{m \times 944,5 \times 2 \times (100 - W)}$ <p>A-оптическая плотность исследуемого извлечения при соответствующем максимуме поглощения;  m- масса сырья, г.;  W-потеря в массе при высушивании сырья, %;  944,5-удельный показатель поглощения хлорофилла при 667 нм</p>	1,8 7	1,8 1	1,7 6	1,9 5	1,92	1,85	1,88	1,81	1,73
Сумма каротиноидов	$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times 1000}{2592 \times a \times (100 - W)}$ <p>2592 – удельный показатель поглощение β-каротина  a – навеска сырья  W – потеря в массе при высушивании  A – оптическая плотность, испытуемого раствора</p>	0,7 7	0,7 4	0,7 3	0,8 6	0,82	0,80	0,76	0,78	0,71

Как видно из данных проведенного анализа, способ консервации несущественно влияет на содержание пигментов в сырье, при этом листья ольхи

обоих видов могут рассматриваться как перспективный источник получения порфириновых производных.

#### **4.4. Идентификация и количественная оценка флавоноидов и фенолкарбоновых кислот листьев ольхи**

Проведенный нами анализ источников научной литературы подтвердил, что листья ольхи серой и черной могут рассматриваться в качестве источника фенолкарбоновых кислот, присутствующих в некоторых видах ольхи в существенных количествах [120, 174]. Пути биосинтеза фенолкарбоновых кислот в растительном организме часто сопровождаются образованием гликозидированных производных, а также сложноэфирных связей, вследствие чего в сырье содержатся как свободные фенолкарбоновые кислоты, так и их многочисленные производные.

С учетом возможного присутствия гликозидированных и замещенных производных для выявления фенолкарбоновых кислот в листьях ольхи серой и черной, пробоподготовка включала стадию щелочного гидролиза.

Анализ качественного состава этилацетатных фракций с использованием ТСХ проводился в системах, описанных для разделения смеси флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в растительном сырье. Наилучшее разделение было достигнуто при использовании подвижной фазы в н-бутанол – уксусная кислота – вода (40: 12: 28). По окончании разделения хроматограммы высушивали и отмечали зоны адсорбции разделенных веществ в УФ-свете [40]. На хроматограмме извлечений из листьев ольхи серой были обнаружены 7 зон с значением  $R_f$  от 0,34 до 0,68; на хроматограмме извлечений из листьев ольхи черной выявлены 8 зон [43].

Общий вид хроматограммы приведен на рисунке.

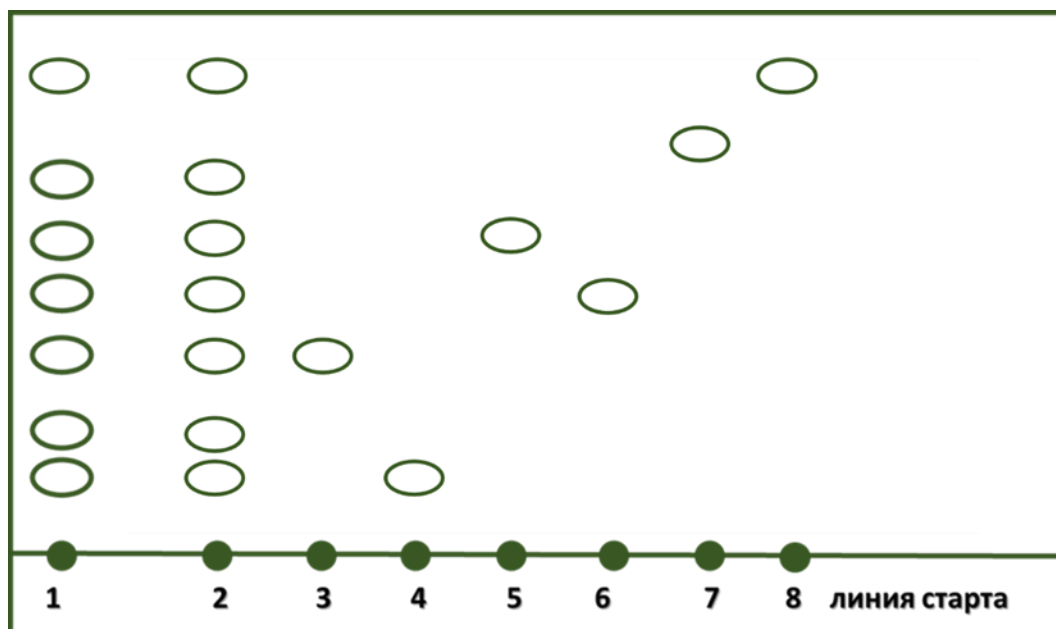


Рисунок 31 – Схема хроматограммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот извлечений из листьев ольхи черной и серой: 1 - Извлечение из листьев ольхи серой ; 2 - Извлечение из листьев ольхи черной ; 3 - 3,4,5-триоксибензойная кислота (галловая); 4 - 3,4-диоксикоричная кислота (кофейная); 5 – рутин; 6 – катехин; 7 – кверцетин; 8 - 3-транс-кофеилхиновая кислота (хлорогеновая) [43]

Таблица 10 – Результаты исследования флавоноидов и фенолкарбоновых кислот извлечений из листьев ольхи серой и черной, а также настойки и жидких экстрактов из исследуемого сырья методом ТСХ в системе н-бутанол: уксусная кислота: вода (40:12:28) [43]

Объект исследования	Значение Rf обнаруженных пятен	Идентифицировано	Неидентифицирован
Извлечение из листьев ольхи серой	0,34 0,37 0,45 0,49 0,57 0,61 0,68	Кофейная; – Галловая; Катехин; Рутин; – Хлорогеновая	Вещество с Rf=0,37  Вещество с Rf=0,61
Извлечение из листьев ольхи черной	0,34 0,36 0,45 0,49 0,57 0,62 0,67 0,70	Кофейная; – Галловая; Катехин; Рутин; – Хлорогеновая –	Вещество с Rf=0,36 Вещество с Rf=0,62

Продолжение Таблицы 10

Настойка листьев ольхи серой	0,34	Кофейная; – Галловая; Катехин; Рутин – Хлорогеновая	Вещество с Rf=0,37  Вещество с Rf=0,61
	0,37		
	0,45		
	0,49		
	0,57		
	0,61		
	0,66		
Настойка листьев ольхи черной	0,34	Кофейная; Галловая; Катехин; Рутин; – Хлорогеновая – –	Вещество с Rf=0,36 Вещество с Rf=0,62
	0,36		
	0,45		
	0,49		
	0,57		
	0,62		
	0,65		
0,70			
Экстракт листьев ольхи серой	0,34	Кофейная; – Галловая; Катехин; Рутин – Хлорогеновая	Вещество с Rf=0,37 Вещество с Rf=0,61
	0,37		
	0,45		
	0,49		
	0,57		
	0,61		
	0,68		
Экстракт листьев ольхи черной	0,34	Кофейная; – Галловая; Катехин; Рутин; – Хлорогеновая –	Вещество с Rf=0,36 Вещество с Rf=0,62
	0,36		
	0,45		
	0,49		
	0,57		
	0,62		
	0,66		
0,71			
ГСО рутина (ФС 42-2508-87)	0,48	–	–
СО катехина (№CAS 154-23-4)	0,61	–	–
СО галловой кислоты (№ CAS 59-95-86-8)	0,33	–	–
СО кофейной кислоты ( Dr. Ehrenstorfer GmbH)	0,45	–	–
СО кверцетин ( № CAS 6151-25-3)	0,63	–	–
СО хлорогеновой кислоты (Ph.Eur.Reference Standard)	0,66	–	–

Общее число зон на хроматограммах извлечений из ольхи серой разных способов консервации и свежих составило 7, ольхи черной - 8. Таким образом, очевидно, что качественный состав веществ фенольной природы при использовании высушивания и заморозки не отличается от свежих образцов.

Так же для анализа флавоноидного состава извлечений из листьев ольхи серой и черной нами использовалась методика ТСХ, используемая при стандартизации листьев березы (ФС.2.5.0005.15.), включающая извлечение БАВ из сырья спиртом этиловым 40% при нагревании с обратным холодильником в течение 15 минут, в качестве стандартов использовали СО рутина и гиперозида, система растворителей хлороформ- спирт этиловый 96%- вода очищенная [43]. При просматривании хроматограммы в УФ-свете при 254 нм обнаруживаются зоны адсорбции фиолетового цвета на уровне зон адсорбции стандартных образцов рутина и гиперозида. После обработки хроматограмм свежеприготовленным раствором диазореактива и выдерживании хроматограмм в сушильном шкафу при 110 С в течение 5 минут обнаруживаются зоны адсорбции оранжевого цвета на уровне зон адсорбции рутина и гиперозида.

Для валидации выбранных хроматографических методик использовали метод оценки специфичности используемой хроматографической системы. Выявление специфичности методики оценки качественного состава веществ фенольной природы проводили по совпадению между собой основных зон адсорбций в образцах извлечений из исследуемых образцов листьев ольхи серой и черной в свежем, высушенном и замороженном виде [43].

Оценку приемлемости методики определяли по совпадению зон адсорбций, анализируемых образцов сырья – листья ольхи серой и черной описанию предложенной методики. Проведенные контрольные эксперименты подтвердили совпадения между собой зон адсорбции исследуемых образцов, а также их соответствие предложенным нами методикам. Поскольку извлечения из листьев ольхи серой, черной и видовой смеси демонстрировали наличие зон адсорбции на уровне адсорбции СО рутина нами было предложено использование методики

количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, как коммерчески более доступный стандартный образец [43].

Для проведения количественной оценки содержания веществ полифенольной природы воспользовались методом спектрофотометрического анализа в пересчете на рутин, широко используемом в анализе лекарственного растительного сырья [43].

Для анализа использовался прибор SPECORD 250Analytik Jena AG (производство Германии); кюветы кварцевые; диапазон длин волн 240-500 нм. Пробоподготовка сырья проводилась по стандартной методике, широко используемой в фармацевтическом анализе, для свежих и замороженных листьев ольхи серой и черной применялось истирание в ступке с стеклянным порошком, высушенные листья измельчались до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм [43].

В качестве стандартного образца применяли ГСО Рутин (ФС 42-2508-87). УФ-спектр ГСО рутина в спирте этиловом представлен на Рисунке 20 [43].

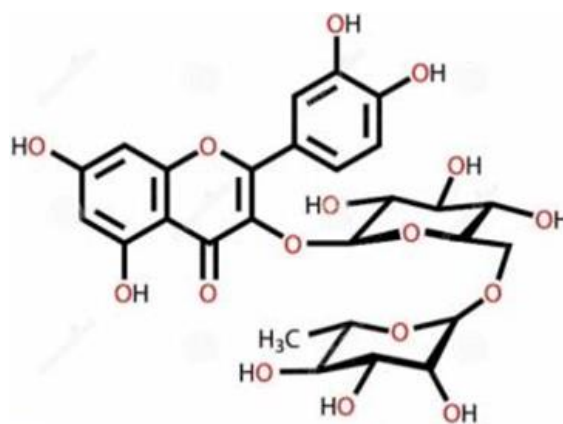
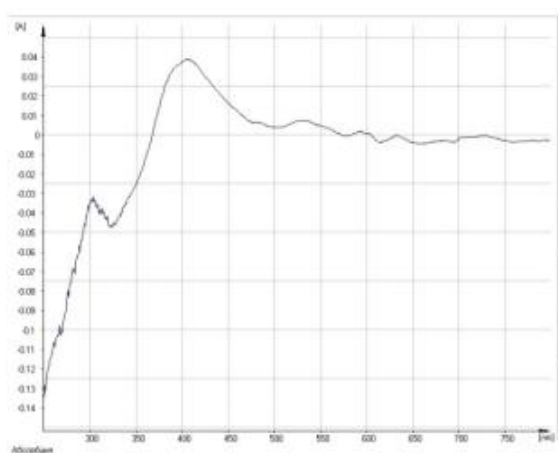


Рисунок 32 – Общий вид УФ-спектра исследуемого извлечения из смеси листьев ольхи серой и черной [43]

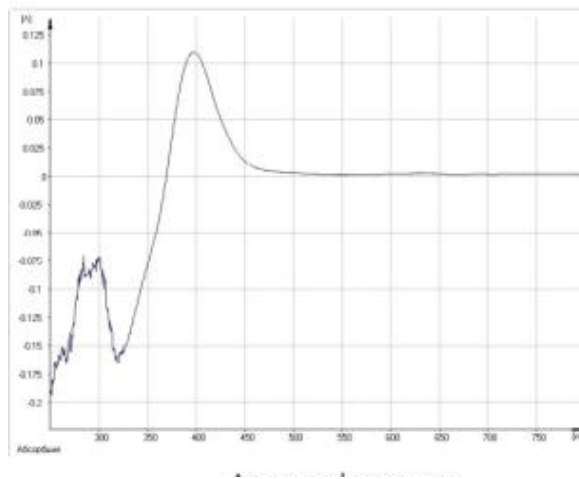


Рисунок 33 – Общий вид УФ-спектр СО Рутина [43]

Учитывая многочисленные литературные данные, подтверждающие непосредственную связь между содержанием в сырье листьев ольхи серой и черной флавоноидов и фармакологической активностью, а также планируя включить метод количественной оценки суммарного содержания флавоноидов в разрабатываемую нормативную документацию на листья смеси видов ольхи, осуществили валидацию предлагаемой методики. Линейность методики проверяли на пяти отобранных экспериментальных точках (значениях концентрации). Анализируемые растворы получали увеличением аликвотной доли, составившей 0,75; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 мл соответственно. На графике представлена зависимость величины оптической плотности от взятых аликвот на анализ и от содержания флавоноидов в сырье соответственно. Как видно, из данных графика, значение коэффициента корреляции, который представляет собой критерий приемлемости линейности, составил 0,9905, т.е. демонстрирует значение близкое к 1, что в свою очередь, подтверждает наличие линейной зависимости между значением величины оптической плотности исследуемых образцов и действующих веществ. Таким образом, выполненные анализы по показателю «Линейность» демонстрируют наличие линейной зависимости между содержанием рутина в исследуемых образцах и получаемым значением оптической плотности, что позволяет рекомендовать методику для количественной оценки суммы флавоноидов в пересчете на рутин для оценки доброкачественности листьев ольхи [43].

Таблица 11 – Результаты подтверждения линейности методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов [43]

№	V образца для анализа, мл	D
1	0,75	0,1188
2	1,00	0,2275
3	1,50	0,4448
4	2,00	0,5533
5	2,50	0,6920

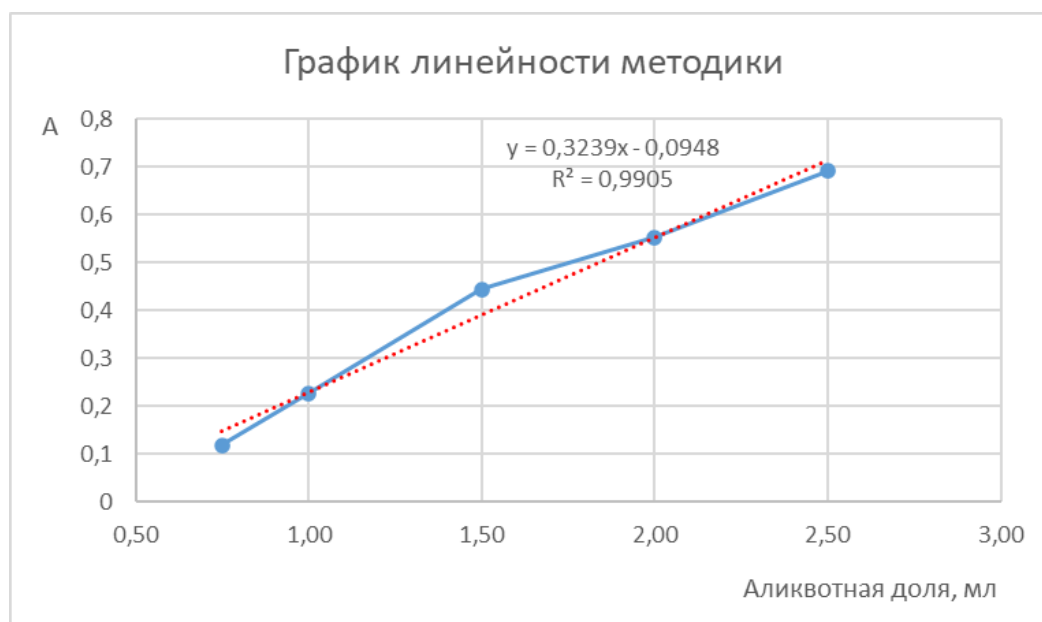


Рисунок 34 – Результат проверки линейности методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин [43]

Воспроизводимость выбранной методики оценивалась по показателю прецизионности при выполнении анализов в одинаковых условиях. Рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD) [31].

Таблица 12 – Воспроизводимость методики СФМ содержания суммы флавоноидов в листьях ольхи [31, 43]

Повторность	∑ флавоноидов в пересчете на рутин (в смеси видов, входящих в ГФ Российской Федерации)		
	№ 1	№ 2	№ 3
1	2.380	2,374	2,378
2	2.383	2,371	2,375
3	2.381	2,377	2.376
X <sub>ср</sub>	2.381	2,374	2.376
RSD, %	0,26	0,63	0,45

Таблица 13 – Повторяемость методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в листьях ольхи

Номер образца		1	2	3	4	5	6	
Содержание флавоноидов, %		2,380	2,423	2,405	2,412	2,392	2,409	
<i>f</i>	X <sub>ср</sub>	S <sup>2</sup>	S	ΔX	ΔX <sub>ср</sub>	t (99%)	ε, %	RSD, %
5	2,4035	0.0003319	0,0182	0,0299	0,0166	4,03	1.25	0,69

Таблица 14 – Результаты определения правильности методики определения флавоноидов в листьях ольхи

Номер образца	Суммарное содержание флавоноидов в пробе, г	Добавлено СО рутин, г	Ожидаемое содержание, г	Полученное содержание, г	Открываемость, %
1	0,0238	0,01	0,0338	0,0329	97,34
2	0,0238	0,02	0,0438	0,0457	104,33
3	0,0238	0,03	0,0538	0,0535	99,44
4	0,0241	0,01	0,0341	0,0337	98,83
5	0,0241	0,02	0,0441	0,0432	97,96
6	0,0241	0,03	0,0541	0,0550	101,66
7	0,0246	0,01	0,0346	0,0352	101,73
8	0,0246	0,02	0,0446	0,0441	98,88
9	0,0246	0,03	0,0546	0,0533	97,62
RSD, % = 1,169					

Для проведения исследований по оценке повторяемости выбранной методики мы провели шесть параллельных замеров. Полученные данные использовали для расчета величин стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения. Относительное стандартное отклонение составило 0,69%, что не превышает 3%, т.е. можно считать, что систематическая ошибка отсутствует. Эти данные позволяют считать, что выбранная нами методика обладает прецизионностью в условиях повторяемости эксперимента. Воспроизводимость методики проверяли два аналитика на трех исследуемых образцах в трех повторностях. Для оценки правильности методики вносили в экспериментальные образцы точно измеренные добавки стандартного образца рутина с использованием девяти определений [43].

Для выявления качественного состава извлечений использовали методику ВЭЖХ. Хроматографический анализ этанольного извлечения из листьев ольхи серой и черной, заготовленных в различные фазы вегетации, показал идентичность биологически активных веществ, состав которых представлен в таблице 20 и на рисунке 23 [43]. Таким образом, в составе фенольной фракции листьев ольхи серой и черной из 21 соединения при наличии имеющихся образцов стандартов были идентифицированы 10 - вещества флавоноидной природы (рутин, гиперозид, кверцетин, катехин и лютеолин) и фенолкарбоновые кислоты (галловая, хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная, эллаговая) [31, 43].

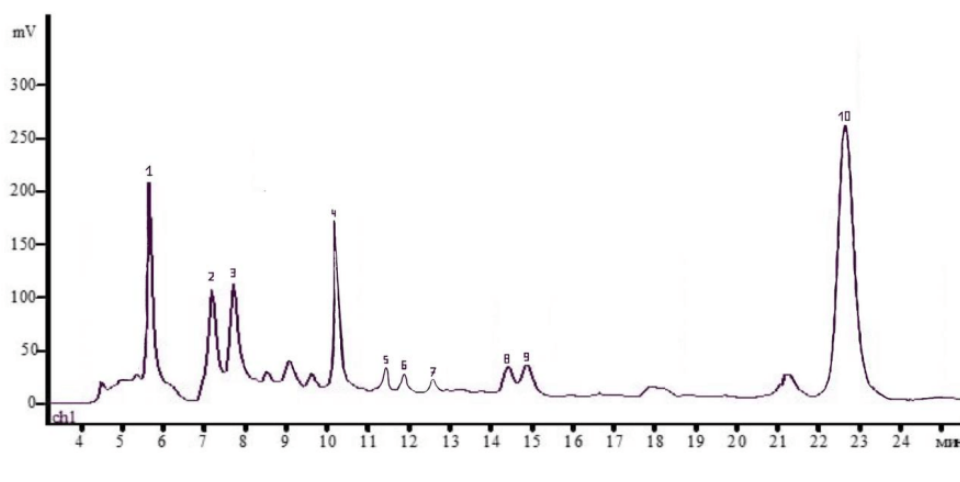


Рисунок 35 – Хроматограмма спиртового извлечения из листьев ольхи черной методом ВЭЖХ при 280 нм (70% спирт этиловый) [43]

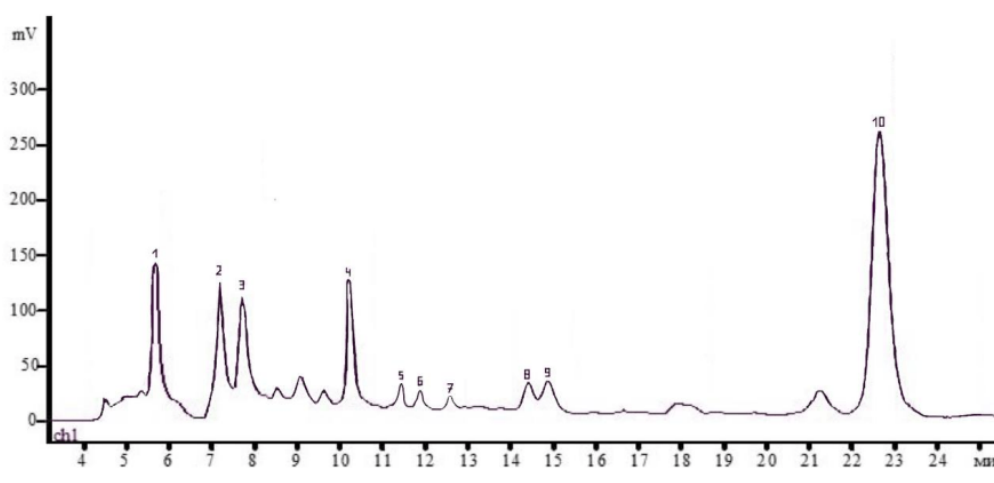


Рисунок 36 – Хроматограмма спиртового извлечения из листьев ольхи серой методом ВЭЖХ при 280 нм (70% спирт этиловый) [43]

Таблица 15 – Результаты исследования фенольных соединений в сухом и свежем сырье – листья ольхи

№	Время, мин	Площадь, S	Высота, mAU	Название
1	5,900	2286,71	2,92	Галловая кислота
2	7,224	1652,11	1,87	Кофейная кислота
3	7,903	1464,34	1,49	Рутин
4	10,11	2088,28	2,90	Гиперозид
5	11,509	1341,89	1,42	Кверцетин
6	11,850	1093,01	1,13	Лютеолин
7	12,589	531,60	0,96	Катехин
8	14,385	562,90	1,09	Хлорогеновая кислота
9	15,388	588,45	1,21	Неохлорогеновая кислота
10	23,192	7422,06	10,31	Эллаговая кислота

Статистическая обработка данных пяти параллельных измерений показала, что количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях ольхи в пересчете на кислоту кофейную составило 1,664 (листья ольхи черной) и 1,741 (листья ольхи серой) при заготовке сырья в июле-августе. Ошибка единичного измерения составила 0,85-0,90% (Таблицы 16, 17) [43].

Таблица 16 – Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в листьях ольхи в пересчете на кислоту кофейную в июле-августе [43]

№	Исследуемый объект	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	Листья ольхи серой	1,741 ± 0,90
2	Листья ольхи черной	1,664 ± 0,85

Таблица 17 – Результаты определения содержания гидроксикоричных кислот в листьях ольхи в пересчёте на кислоту кофейную в период сентябрь-октябрь [43]

№	Исследуемый объект	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	Листья ольхи серой	1,279 ± 0,94
2	Листья ольхи черной	1,421 ± 0,80

Статистическая обработка данных пяти параллельных измерений показала, что количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях ольхи составляет 1,279-1,421 в осенний период. Снижение содержания фенолкарбоновых кислот к осеннему периоду составило 10,6%, что не является критически значимым

и позволяет рассматривать позднюю заготовку листьев ольхи серой и черной, что оптимально с точки зрения сохранения биомассива растений.

#### **4.5. Идентификация и количественная оценка органических кислот листьев ольхи**

Анализ литературы показывает рост интереса ученых к изучению качественного состава и количественного содержания органических кислот в различных видах сырья. Были проведены исследования ряда лекарственных растений, в ходе которых было установлено наличие во многих исследуемых объектах винной, лимонной, молочной, фумаровой, щавелевой, яблочной и янтарной кислот [17]. Однако, нами не обнаружены данные литературы, посвященные анализу карбоновых кислот в листьях ольхи серой и черной. Определение карбоновых кислот проводили в водных извлечениях из листьев ольхи серой и черной [43].

Предварительный анализ состава органических кислот осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10x15см) в системе растворителей наиболее часто применяемых для анализа органических кислот [43]:

\*этиловый спирт 95% - концентрированный р-р аммиака (16:4,5);

\*этилацетат-кислота уксусная-кислота муравьиная – вода (100:11:11:25).

Лучшее разделение и качество разделяемых зон было достигнуто при использовании хроматографической системы этилацетат-кислота уксусная-кислота муравьиная – вода (100:11:11:25), что обусловило наш дальнейший выбор для исследования органических кислот в извлечениях из листьев ольхи серой и черной [43].

Насыщение хроматографической камеры парами подвижной фазы осуществляли в течение получаса. Обнаружение зон адсорбции исследуемых веществ осуществляли, используя раствор бромкрезолового зеленого 0,2% с последующим прогреванием пластинок в сушильном шкафу в изотермическом

режиме. Органические кислоты детектировались на хроматограммах как желтые пятна на синем фоне. В качестве стандартных образцов были использованы этандиовая, 2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая, 2-гидрокси-бутандиовая и бутандиовая кислоты [43].

Результаты хроматографического разделения органических кислот в исследуемом сырье представлены в Таблице 18.

Таблица 18 – Результаты хроматографического анализ органических кислот в листьях ольхи

Объект исследования	Значения Rf	Выявленные органические кислоты
Листья ольхи серой	0,11 0,14 0,34 0,40 0,78 0,81 0,91	Не идентифицировано Щавелевая Не идентифицировано Лимонная Яблочная Не идентифицировано Янтарная
Листья ольхи черной	0,12 0,15 0,34 0,40 0,77 0,90	Не идентифицировано Щавелевая Не идентифицировано Лимонная Яблочная Янтарная

## Продолжение Таблицы 18

Видовая смесь листьев ольхи	0,11	Не идентифицировано
	0,15	Щавелевая
	0,33	Не идентифицировано
	0,41	Лимонная
	0,78	Яблочная
	0,83	Не идентифицировано
	0,90	Янтарная

Анализ качественного состава и количественного содержания карбоновых кислот в образцах исследуемого сырья осуществляли по методике Кузьменко А.Н. [56] методом ионо-эксклюзионной хроматографии [43].

В ходе исследования было установлено, что листья ольхи серой и черной содержат одинаковый набор карбоновых кислот (Таблица 19).

Таблица 19 – Результаты определения качественного и количественного состава органических кислот в листьях ольхи серой и черной, мг/100 г

Наименование органической кислоты	Содержание органических кислот, мг/100 г		
	Листья ольхи серой	Листья ольхи черной	Смесь листьев двух видов
Щавелевая	124,5	131,6	126,1
Малоновая	21,3	24,9	22,6
Яблочная	1043,2	1027,9	1031,6
Янтарная	438,0	441,3	440,8

## Продолжение Таблицы 19

Лимонная	607,8	609,3	607,9
Фумаровая	37,6	42,1	40,4
Азелаиновая	28,4	24,9	25,8

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что максимальным количеством во всех образцах характеризуется кислота яблочная, содержание которой составляет во всех образцах от 1027,9 мг/100 г до 1043,2 мг/100 г [43].

Поскольку доминирующей в профиле органических кислот извлечений из листьев ольхи является кислота яблочная, для оценки суммарного содержания свободных органических кислот в анализируемом сырье нами была выбрана методика «Определение содержания свободных органических кислот» (ГФ Х1., ст.38 Fructus Rozae) в пересчете на яблочную кислоту. Результаты количественной оценки содержания свободных органических кислот методом алкалиметрического титрования и метрологические характеристики выбранной методики представлены в Таблице 20 [43].

Таблица 20 – Результаты количественной оценки содержания свободных органических кислот методом кислотно-основного титрования в листьях ольхи [43]

Вид сырья		X, %	P, %	t (P, f)	S	Sx	$\Delta X$	E, %
Листья ольхи серой	Свежие	2.11	95	2.78	0.00045	0.0212	0.0264	1.25
	Замороженные	1,76	95	2.78	0.00035	0.0187	0.0232	2.33
	Высушенные	1.05	95	2.78	0.00060	0.0245	0.0305	2.90
Листья ольхи черной	Свежие	2.23	95	2.78	0.00040	0.0200	0.02486	1.12
	Замороженные	1,79	95	2.78	0.00045	0.0212	0.02637	1.47
	Высушенные	0,99	95	2.78	0.00035	0.0187	0.02326	2.35
Смесь листьев ольхи	Свежие	2.15	95	2.78	0.00035	0.0187	0.0233	1.08
	Замороженные	1,75	95	2.78	0.00045	0.0212	0.0264	1.51
	Высушенный	1.01	95	2.78	0.00050	0.0223	0.0278	2.75

Полученные данные демонстрируют достаточно высокий уровень падения содержания карбоновых кислот, который наблюдается при использовании сушки в качестве метода консервации и составляет 50,2 % для листьев ольхи серой, 55,6 % для листьев ольхи черной, 53,0 % для смеси сырья. Использование листьев ольхи в качестве источника карбоновых кислот для коррекции метаболизма, на наш взгляд, целесообразно в свежем или замороженном виде.

#### **4.6. Результаты аминокислотного анализа листьев ольхи**

Для подтверждения содержания аминокислот в извлечениях из листьев ольхи серой и черной, а также смеси сырья нами использовался водный настой, к которому добавлялся раствор нингидрина 0,1% свежеприготовленный, объединенные объемы нагревали, развивалась интенсивная фиолетовая окраска, что свидетельствовало о присутствии в извлечении аминокислот. Также положительные результаты были получены при проведении биуретовой реакции.

Нами исследовался аминокислотный состав листьев ольхи серой и черной методом ВЭЖХ после пробоподготовки широко используемой при анализе ЛРС [105, 138] (Таблица 21).

Как видно из данных таблицы, аминокислотный состав исследуемых объектов до и после гидролиза не изменяется и представлен 17 аминокислотами

Таблица 21 – Аминокислотный состав листьев ольхи

Определяемая аминокислота		Количественное содержание аминокислот в изучаемых образцах					
Обозначение	Название	Листья ольхи серой		Листья ольхи черной			Смесь листьев двух видов
		До гидролиза	После гидролиза	До гидролиза	После гидролиза	До гидролиза	
<b>Моноаминомонокарбоновые аминокислоты</b>							
Ala (A)	$\alpha$ -аминопропионовая	0.04	0.14	0.07	0.16	0.05	0.14
Val(V)	$\alpha$ -аминоизовалериановая	0.22	0.64	0.21	0.63	0.22	0.63
Gly (G)	$\alpha$ -аминоуксусная	0.19	0.69	0.15	0.63	0.15	0.64
Ile (I)	$\alpha$ -амино- $\beta$ -этил- $\beta$ -пропионовая	следы	0.34	следы	0.32	следы	0.33
Leu (L)	$\alpha$ -аминоизокапроновая	0.13	1.07	0.17	1.12	0.14	1.09
Met (M)	$\alpha$ -амино- $\gamma$ -метилтиол-н-масляная	0.06	0.18	0.04	0.15	0.06	0.18
Ser (S)	$\alpha$ -амино- $\beta$ -оксипропионовая	0.05	0.61	0.04	0.58	0.05	0.59
Tyr (Y)	$\alpha$ -амин- $\beta$ -оксифенилпропионовая	0.01	0.47	0.03	0.54	0.03	0.53
Trp (W)	$\alpha$ -амино- $\beta$ -оксимасляная	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Phe (F)	$\alpha$ -амино- $\beta$ -фенилпропионовая	0.26	0.74	0.28	0.76	0.26	0.75
<b>Моноаминодикарбоновые аминокислоты</b>							
Asp(D)	$\alpha$ -аминоянтранная	0.11	1.31	0.13	1.36	0.12	1.32
Glu(E)	$\alpha$ -аминоглутаровая	0.29	1.34	0.29	1.35	0.28	1.35
<b>Диаминомонокарбоновые кислоты</b>							
Arg(R)	$\alpha$ -амино- $\sigma$ -гуанидил-нвалериановая	0.19	0.72	0.22	0.76	0.20	0.73
Lys(K)	$\alpha$ , $\epsilon$ - аминокапроновая	0.18	0.76	0.15	0.68	0.15	0.71
<b>Гетероциклические аминокислоты</b>							
His(H)	$\alpha$ -амино- $\beta$ -имидазол-пропионовая	следы	0.32	следы	0.35	следы	0.33
Pro (P)	Пирролидин- $\alpha$ -карбоновая	0.18	0.65	0.34	0.79	0.19	0.75

Количественное содержание аминокислот в исследуемых объектах возрастает в следующей последовательности: Trp (W) < His(H) < Ile (I) < Tyr (Y) < Ala (A) < Ser (S) < Met (M) < Asp(D) < Leu (L) < Gly (G) < Lys(K) = Pro (P) < Arg(R) < Val(V) < Phe (F) < Glu(E) для свободных аминокислот.

Доминантными до гидролиза в исследуемых объектах являются глутаминовая кислота и фенилаланин, после гидролиза – аспарагиновая, глутаминовая кислоты и лейцин, в следовых количества для всех видов сырья наблюдается триптофан, изолейцин, гистидин, причем содержание изолейцина и гистидина возрастает после проведения гидролиза, что свидетельствует о присутствии данных аминокислот в основном в связанном в виде низкомолекулярных пептидов виде [43]. Наиболее сильно варьирует содержание аминокислоты пролин, являющейся признанным совместимым осморегулятором у высших растений, изменение содержания которого происходит наиболее интенсивно при наличии влияния абиогенных стресс-факторов, что отмечалось при изучении других растительных объектов [14].

#### **4.7. Результаты оценки содержания полисахаридов в листьях ольхи серой и черной**

Как известно, многие виды лекарственного растительного сырья, стандартизация которых осуществляется по разнообразным классам БАВ, содержат ценный комплекс веществ полисахаридной природы, которые в свою очередь оказывают существенное влияние на совокупный фармакологический эффект сырья, однако, нами не обнаружено информации, характеризующей состав моносахаридов, а также суммарное содержание полисахаридов в листьях ольхи серой и черной. Предварительные реакции Бертрена (выпадение красно-кирпичного осадка) и положительный результат реакции с а-нафтолом, подтвердили наличие в водном извлечении из листьев ольхи серой и черной сахаров в свободном виде и гликозидированных форм. Данные пробы, как известно, из литературных данных широко используются на предварительном

этапе анализа растительных объектов как источников свободных сахаров, а также полисахаридов [22, 51, 52]. Изучение качественного состава состава моносахаридов листьев ольхи серой и черной проводили методом ВЭЖХ. В ходе анализа идентифицированы глюкоза (7,1 мин), галактоза (7,9 мин), фруктоза (9,8 мин.). Состав сахаров идентичен для извлечений из листьев ольхи серой и ольхи черной.

Общий вид хроматограмм представлен на Рисунках 37, 38.

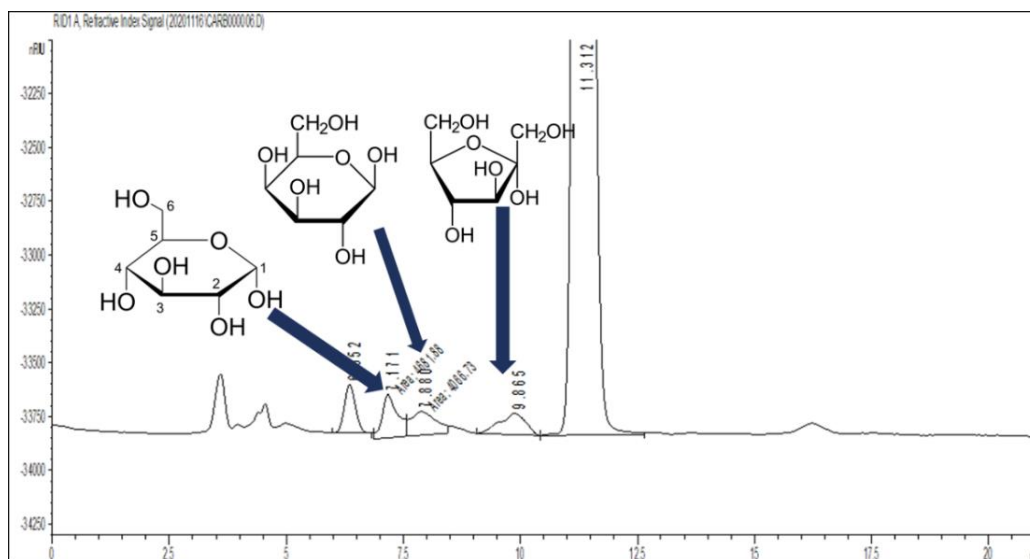


Рисунок 37 – Общий вид хроматограммы свободных сахаров листьев ольхи серой

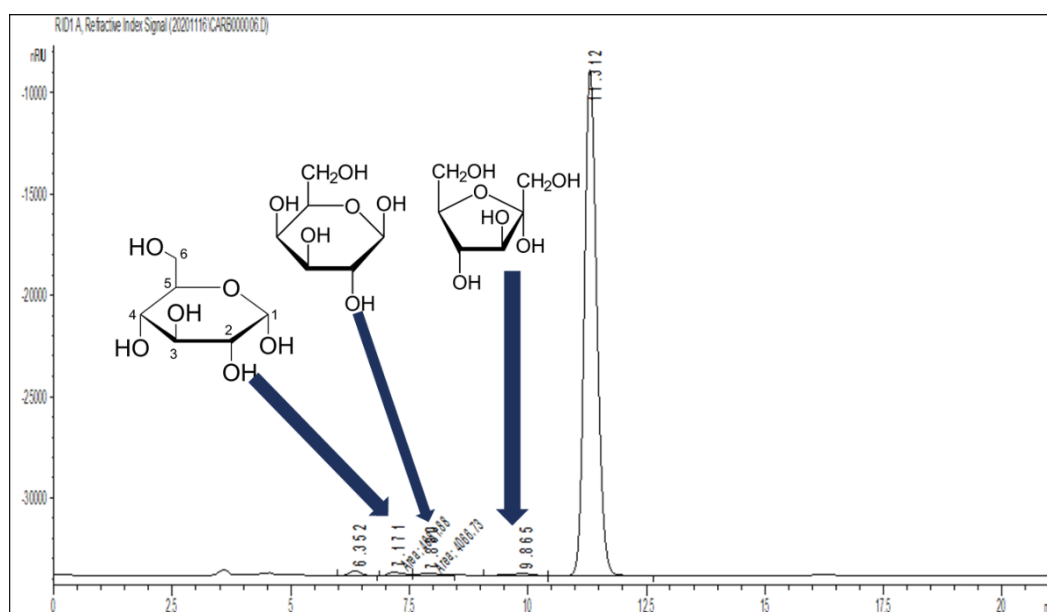


Рисунок 38 – Общий вид хроматограммы свободных сахаров листьев ольхи черной

Учитывая отсутствие литературных данных, характеризующих количественное содержание в листьях ольхи серой и черной полисахаридов, нами проведено их определение в соответствии с требованиями ГФ XV (ФС.2.5.0032.15) гравиметрическим методом. Комплекс водорастворимых полисахаридов представляет собой аморфный порошок бежевого цвета, хорошо растворимый в воде, растворах кислот и щелочей. Значение водородного показателя (рН) водного раствора полисахаридного комплекса листьев ольхи серой составляет 5,58, листьев ольхи черной - 5,42.

Результаты количественной оценки содержания полисахаридов в листьях ольхи серой и черной представлены в Таблице 22.

Таблица 22 – Оценка содержания полисахаридов в листьях ольхи серой и черной

Объект исследования	Способ консервации	X, %	P, %	T (P; f)	S2	S	X	E, %
Листья ольхи серой	свежие	3,90	95	2.78	0.000175	0.01323	0.0164	0,42
	прошедшие заморозку	3,73	95	2.78	0.000260	0.01612	0.0157	0.52
	высушенные	3,60	95	2.78	0.000500	0.02236	0.0278	0.77
Листья ольхи черной	свежие	3.45	95	2.78	0.000212	0.01456	0.0181	0.52
	прошедшие заморозку	3.28	95	2.78	0.000154	0.01241	0.0154	0.47
	высушенные	3.14	95	2.78	0.000500	0.02236	0.0278	0.88

Изменения в содержании полисахаридного комплекса при использовании различных видов консервации не представляются существенными. Так консервация методом ускоренной заморозки приводит к снижению суммарного содержания полисахаридов на 4,4% в сырье листьев ольхи серой и 4,9% в листьях ольхи черной, теневая сушка сырья вызывает снижение содержания полисахаридов на 7,8% в листьях ольхи серой и на 9,0% в листьях ольхи черной. Потери, таким образом, наблюдаются и при высушивании, и использовании ускоренной

заморозки, но в количественном отношении потери полисахаридов в сырье листьев ольхи серой и черной не являются критическими.

#### **4.8. Идентификация и количественная оценка содержания тритерпеновых сапонинов в исследуемом сырье**

Качественные реакции на сапонины дали положительный результат со всеми исследуемыми образцами [8].

В дальнейшем присутствие веществ сапониновой природы подтвердили методом ТСХ. Поскольку данных научной литературы по идентификации и количественному определению фракции тритерпеновых сапонинов в сырье ольхи, произрастающей на территории Российской Федерации нами не обнаружено, анализ данной группы веществ проводили в сравнении для листьев ольхи видов серая и черная, а также видовой смеси. Были отобраны образцы сырья, как заготовленного от дикорастущих деревьев, так и от декоративных вида.

Результаты идентификации тритерпеновых сапонинов в спиртовых извлечениях из листьев фармакопейных видов ольхи в различных системах растворителей, применяемых при анализе ЛРС [4, 8] представлены в Таблице 23.

Таблица 23 – Результаты идентификации тритерпеновых сапонинов в спиртовых извлечениях из соплодий и листьев ольхи

Система растворителей	Исследуемое сырье		Визуализация на хроматограмме		Значение Rf пятна, совпавшее с СО олеаноловой кислоты
			Окраска пятен после нагревания пластинок		
Хлороформ-спирт этиловый 96%-вода очищенная (13: 6: 1)	Ольхи черной листья	Свежее	6 пятен насыщенно розового цвета		0,46
		Замороженное	6 пятен насыщенно розового цвета		0,47
		Высушенное	6 пятен малинового цвета		0,45
	Ольхи серой листья	Свежее	6 пятен насыщенно розового цвета		0,47
		Замороженное	6 пятен насыщенно розового цвета		0,44
		Высушенное	6 пятен красновато-розового цвета		0,43
	Смесь листьев	Свежее	6 пятен насыщенно розового цвета		0,44
		Замороженное	6 пятен насыщенно розового цвета		0,44
		Высушенное	6 пятен розовато-вишневого цвета		0,43
Н-бутанол-кислота уксусная- вода очищенная (10: 3: 5)	Ольхи черной листья	Свежее	6 пятен бледно-розового цвета		0,67
		Замороженное	6 пятен бледно-розового цвета		0,66
		Высушенное	6 пятен бледно-розового цвета		0,66
	Ольхи серой листья	Свежее	6 пятен бледно-розового цвета		0,68
		Замороженное	6 пятен бледно-розового цвета		0,68
		Высушенное	6 пятен бледно-розового цвета		0,67
	Смесь листьев	Свежее	6 пятен бледно-розового цвета		0,67
		Замороженное	6 пятен бледно-розового цвета		0,67
		Высушенное	6 пятен бледно-розового цвета		0,66

## Продолжение Таблицы 23

Бензол – диметилкетон (3:1)	Ольхи листья	черной	Свежее	4 пятна розового, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,50
			Замороженное	4 пятна розово-вишневого, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,49
			Высушенное	4 пятна розового-вишневого, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,48
	Ольхи листья	серой	Свежее	4 пятна розового, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,52
			Замороженное	4 пятна розового, постепенно переходящего в грязно-синий цвета	0,51
			Высушенное	4 пятна розового, постепенно переходящего в грязно-синий цвета	0,49
	Смесь листьев		Свежее	4 пятна розово-вишневого, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,50
			Замороженное	4 пятна розово-вишневого, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,48
			Высушенное	4 пятна розово-вишневого, постепенно переходящего в фиолетовый цвета	0,48

Как видно из полученных данных во всех исследуемых образцах идентифицирована олеаноловая кислота.

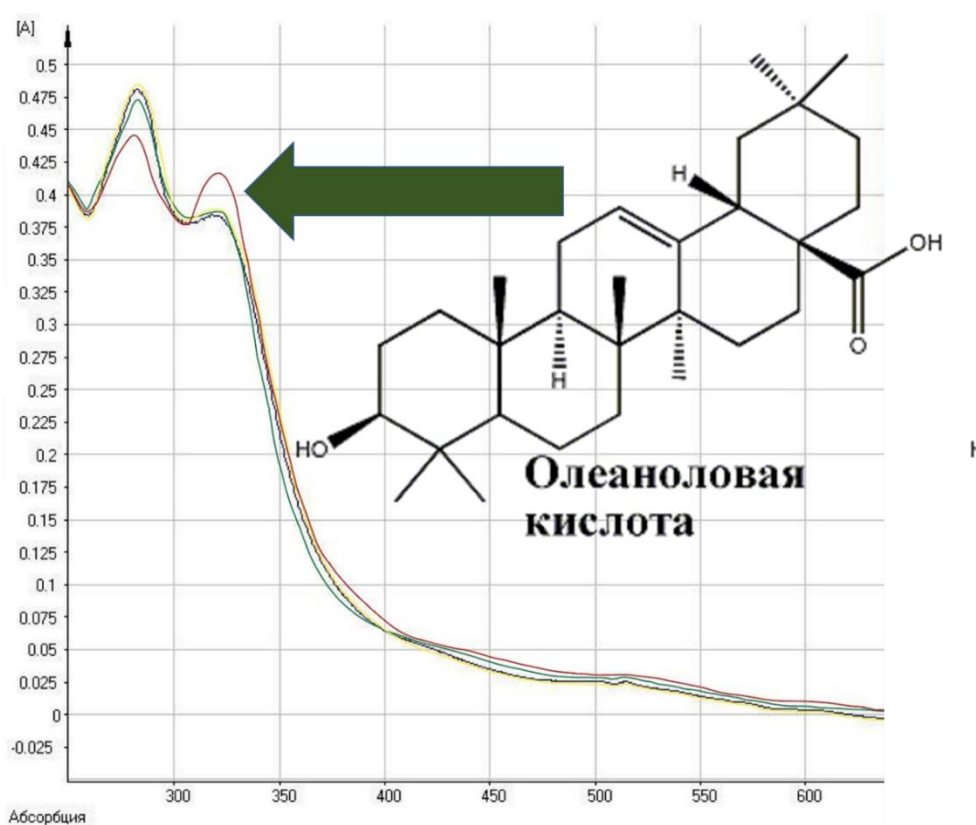


Рисунок 39 – УФ - спектры продукта реакции стандартного образца олеаноловой кислоты с концентрированной кислотой серной, а также очищенных извлечений из листьев ольхи черной и серой после реакции с концентрированной серной кислотой

Количественное определение суммарного содержания сапонинов проводили по методике, основанной на способности к поглощению продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой в УФ-части спектра при 320 нм [8].

Результаты анализа представлены в Таблице 24.

Таблица 24 – Количественное определение суммы тритерпеновых сапонинов в листьях ольхи в пересчете на олеаноловую кислоту

Объект исследования		X, %	P, %	t (P; f)	S2	S	X	E, %
Листья ольхи черной	свежие	1,301	95	2,78	0,00016	0,0126	0,016	1,23
	Прошедшие заморозку	1,269	95	2,78	0,00015	0,012	0,015	1,18
	высушенные	1,236	95	2,78	0,00017	0,013	0,016	1,31
Листья ольхи серой	свежие	1,188	95	2,78	0,00018	0,013	0,017	1,40
	Прошедшие заморозку	1,163	95	2,78	0,00021	0,014	0,017	1,46
	высушенные	1,101	95	2,78	0,00017	0,013	0,016	1,47
Смесь фармакопейных видов ольхи	Свежие	1,289	95	2,78	0,00029	0,017	0,021	1,64
	Прошедшие заморозку	1,257	95	2,78	0,00031	0,018	0,022	1,74
	Высушенные	1,224	95	2,78	0,00033	0,018	0,023	1,85

В ходе статистической обработки данных пяти параллельных измерений по всем исследуемым объектам было выявлено, что содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую составляет для листьев от 1,101 (высушенные листья ольхи серой) до 1,301 (свежие листья ольхи черной) %. Ошибка единичного измерения колеблется от 1,18 до 1,85% [8, 31].

#### 4.9. Анализ дубильных веществ в листьях ольхи

Дубильные веществ в исследуемых образцах листьев ольхи серой и черной выявили на стадии предварительного анализа сырья с реактивами, наиболее широко используемыми при подтверждении дубильных веществ в ЛРС: растворами железо-аммониевых квасцов, желатина, антипирина. На основании

данных научной литературы, в которых рассматривается возможность применения для идентификации дубильных веществ 1% раствора коллагена, проводились реакции с использованием данного реактива, на основании полученных результатов было показано, что дубильные вещества были идентифицированы в листьях ольхи серой и черной, контролем служило извлечение из измельченных соплодий ольхи (Красногорсклексредства) [43]. Следует отметить, что наиболее выражено реакция с раствором коллагена протекала в извлечениях из свежего сырья.

При проведении ТСХ нами использовалась система растворителей муравьиная кислота безводная-этилацетат –толуол (10:30:60), использование которой давало наилучшие результаты при исследовании дубильных веществ в работах предыдущих авторов [6]. Детектирование зон адсорбции осуществляли в УФ- свете при длине волны 250 и 365 нм с последующей обработкой раствором квасцов железоаммонийных [43]. ТСХ анализ позволил выявить в водном извлечении из листьев ольхи 4 пятна с значениями  $R_f$  0,21; 0,43; 0,66; 0,78, среди которых путем сравнения окраски и коэффициента подвижности с СО галловой кислоты и катехина были идентифицированы данные вещества. Результаты ТСХ спиртовых извлечений из листьев ольхи продемонстрировали наличие 6 пятен с значениями  $R_f$  0,23; 0,29; 0,48; 0,65; 0,72; 0,79; 0,95. Результаты хроматографирования СО также подтвердили наличие галловой кислоты и катехина в листьях ольхи серой и черной.

Полученные нами данные ТСХ анализа веществ дубильной природы в исследуемых образцах листьев ольхи серой и черной могут быть использованы при разработке раздела «Качественные реакции» в нормативной документации на исследуемое сырье.

Результаты титриметрического анализа, направленного на оценку содержания дубильных веществ представлены в Таблице 25.

Таблица 25 – Количественное определение суммы дубильных веществ в листьях ольхи серой и черной осуществляли методом перманганатометрического титрования

Объект исследования		X, %	P, %	T (P;f)	S2	S	X	E, %
Листья ольхи серой	свежие	6.24	95	2.78	0.00160	0.0400	0.0497	0.80
	Прошедшие заморозку	5.89	95	2.78	0.00368	0.0607	0.0745	1,28
	высушенные	5.78	95	2.78	0.00500	0.0707	0.0879	1.52
Листья ольхи черной	свежие	6.62	95	2.78	0.00180	0.0424	0.0527	0.79
	Прошедшие заморозку	6.50	95	2.78	0.00345	0.0587	0.0730	1.12
	высушенные	6.31	95	2.78	0.00620	0.0787	0.0978	1.55
Смесь фармакопейных видов ольхи	свежие	6,44	95	2.78	0,00174	0.0417	0.0519	0.81
	Прошедшие заморозку	6.11	95	2.78	0.00424	0.0651	0.0809	1.32
	высушенные	5.81	95	2.78	0.00536	0.0732	0.0910	1,57

Так же нами было проведено определение содержания веществ полифенольной природы методом Фолина-Чикалтеу (*Folin-Ciocalteu*), широко применяемым для изучения пищевых растений и продуктов их переработки [43].

Таблица 26 – Количественное определение суммы полифенольных веществ в листьях ольхи методом Фолина-Чикалтеу

Объект исследования		X, %	P, %	T (P; f)	S2	S	X	E, %
Листья ольхи серой	Свежие	8,146	95	2,78	0.00028	0.0167	0.0208	0.26
	Прошедшие заморозку	7,866	95	2,78	0.00043	0.0207	0.0258	0.33
	Высушенные	7,342	95	2,78	0.00077	0.02775	0.0345	0.47
Листья ольхи черной	свежие	9,938	95	2,78	0.00022	0.0148	0.0184	0.19
	Прошедшие заморозку	9,635	95	2,78	0.00038	0.0195	0.0242	0.25
	высушенные	8,858	95	2,78	0.00407	0.06379	0.0793	0.89
Смесь фармакопейных видов ольхи	свежие	8,479	95	2,78	0,00076	0.0276	0.0343	0.41
	Прошедшие заморозку	8,226	95	2,78	0,00091	0.0302	0,0375	0,46
	высушенные	7,997	95	2,78	0.00128	0.0358	0.0445	0.56

Анализ полученных данных на примере смеси фармакопейных видов ольхи демонстрирует снижение определяемых веществ, как при использовании фармакопейного метода перманганатометрического титрования, так и метода Фолина-Чикалтеу. Причем в первом случае падение содержания дубильных веществ составило 5,0 % при замораживании сырья и 9,8 % при его высушивании, в случае использования для анализа метода Фолина-Чикалтеу снижение содержания полифенолов составило 3,0 % при замораживании сырья и 5,7% в случае сушки.

#### **4.10. Определение веществ-маркеров листьев ольхи серой и черной**

Учитывая вероятность использования нового вида сырья листья ольхи серой и ольхи черной в измельченном виде, для надежной инструментальной идентификации подлинности сырья во избежание пересортицы или фальсификации, мы сочли целесообразным выявить редкие вещества, возможно, не играющие важной фармакологической роли, но способные выступать в роли специфических веществ-маркеров, характерных для конкретного вида сырья. Как известно, это направление исследований в настоящее время рассматривается как одно из важнейших в системе стандартизации ЛРС, что неоднократно подчеркивалось в директивах Совета Евразийской экономической комиссии «Требования к исследованию стабильности средств из лекарственного растительного сырья» [42].

Общий вид хромато-масс-спектра извлечений из листьев ольхи черной с использованием 95% спирта в качестве экстрагента представлен на рисунке. Следует отметить, что состав изучаемых соединений для ольхи двух видов практически совпадает, представлен 28 соединениями, среди которых в качестве веществ- «маркеров» могут рассматриваться хумулан-1,6-диен-3-ол, лупеол (ольха черная), лупеон (ольха серая),  $\beta$ -амирин, гамма-ситостерол, транс-лонгипинокарвеол [31].

Впервые в извлечении из листьев ольхи серой и черной установлено наличие эвгенола, ранее описанного только для сырья *Alnus pendula* [31].

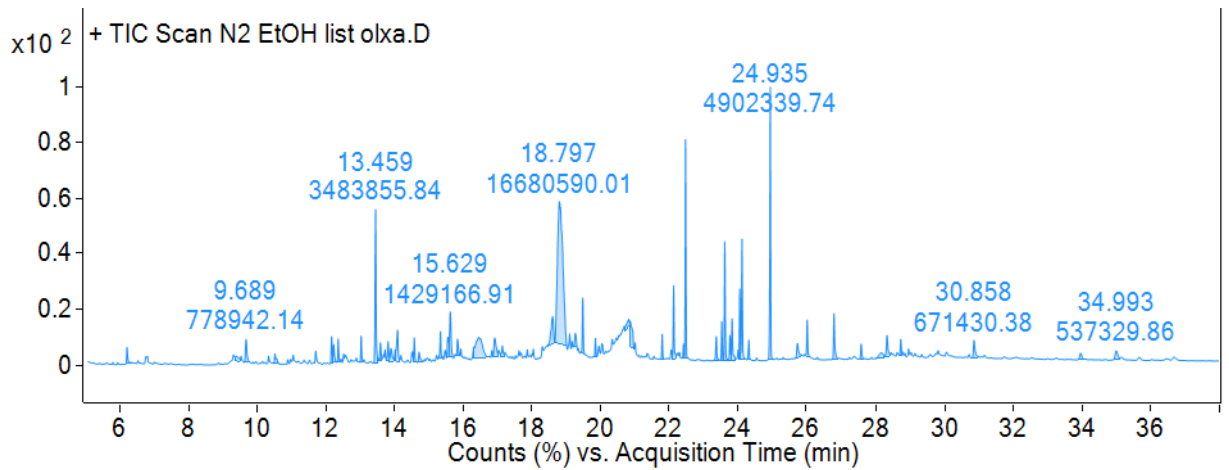


Рисунок 40 – Масс-спектр извлечения из листьев ольхи 95% спиртом этиловым [31]

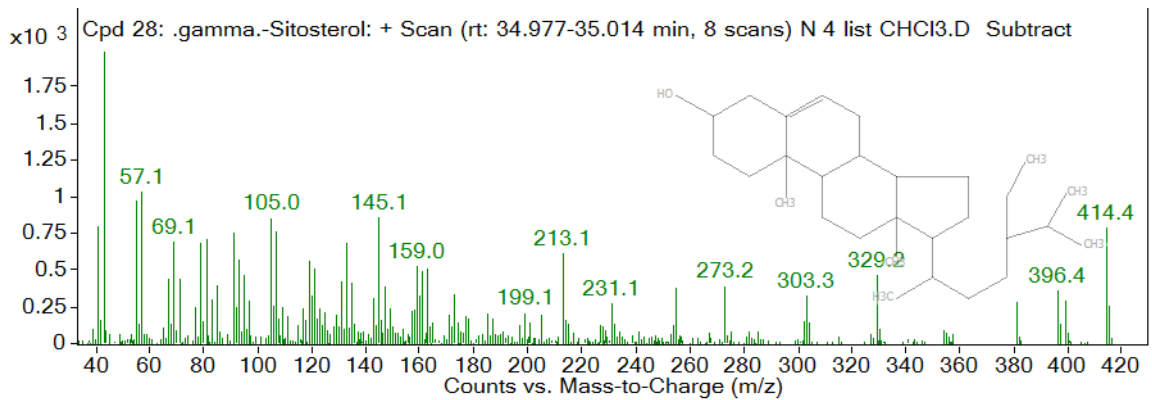


Рисунок 41 – Масс-спектр гамма-ситостерола

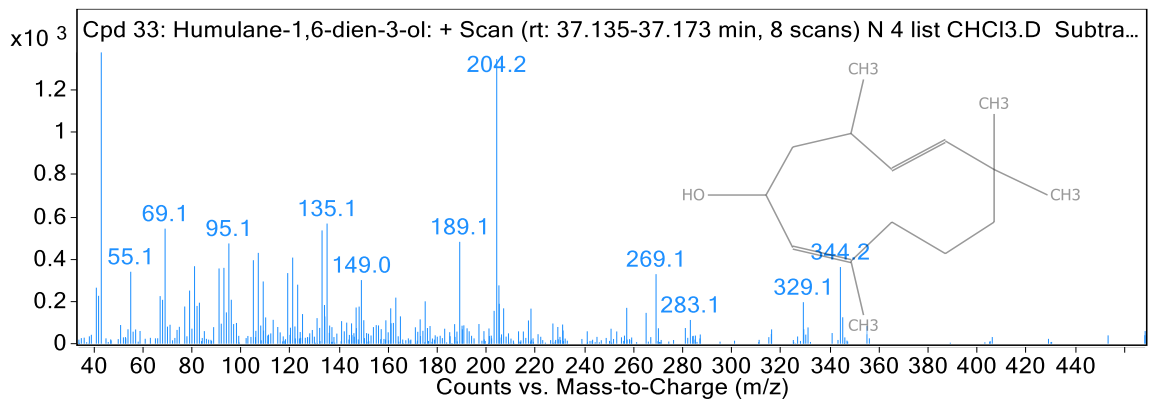


Рисунок 42 – Масс-спектр хумулан-1,6-диен-3-ола

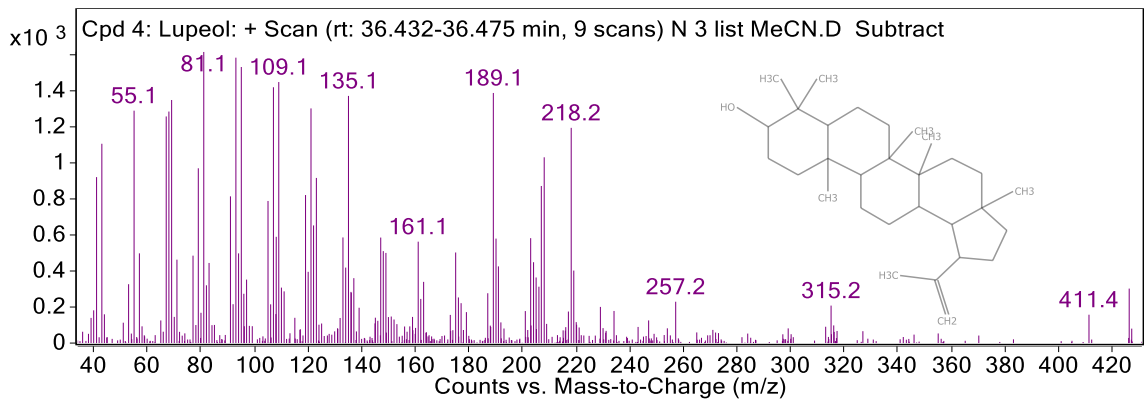


Рисунок 43 – Масс-спектр лупеола

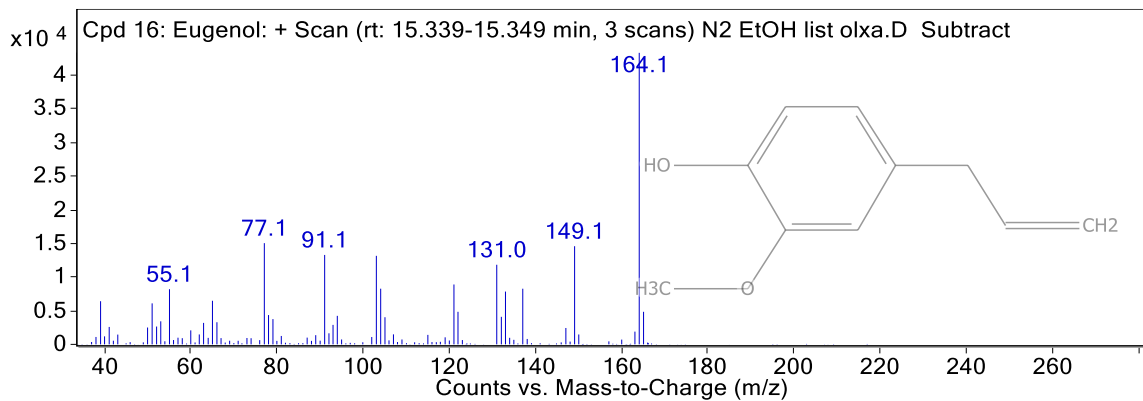


Рисунок 44 – Масс-спектр эвгенола

Таблица 27 – Характеристика основных веществ «маркеров», в извлечении из листьев ольхи черной, полученном экстракцией 95% спиртом этиловым

RT	Area Sum %	Name	DB Formula
6.242	1.11	Furfural - фурфурол	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
11.778	3.04	Hexanoic acid, 2-ethyl- 2-этил-гексановая кислота,	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
12.176	1.54	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- 4H-Пиран-4-он, 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
12.369	0.68	Carbamic acid, methyl-, ethyl ester - метил-этиловый эфир Карбаминовой кислоты	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
13.443	6.32	5-Hydroxymethylfurfural - 5- Гидроксиметилфурфурол	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
13.593	1.38	2,4-Pentanedione, 3-methyl- 3-метил-2,4-Пентандион	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
13.679	0.66	Succinic acid, 2-hydroxy-3-methyl-, diethyl ester - 2- гидрокси-3-метил-, диэтиловый эфир янтарной кислоты	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
13.894	0.8	Butanoic acid, 2-oxo- 2-оксо-Бутановая кислота,	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>

## Продолжение Таблицы 27

14.12	8.12	Malic Acid - Яблочная кислота	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
14.581	1.29	Acetic acid, hex-3-yl ester - Уксусная кислота, гекс-3-ил эфир	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
15.607	6.34	Ethyl .beta.-d-ribose - Этил .бета.-d-рибозид	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
16.783	1.11	1-Dodecanol - 1-Додеканол	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O
16.896	0.86	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde -5-Метил-2-тиофенкарбоновый альдегид	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> OS
18.545	3.13	Ethyl .alpha.-d-glucopyranoside - Этил .альфа.-d-глюкопиранозид	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
18.749	30.58	Ethyl .alpha.-d-glucopyranoside - Этил .альфа.-d-глюкопиранозид	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
19.479	0.67	Longipinocarveol, trans- Лонгипинокарвеол, транс-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
21.353	3.59	1-Hexadecanol 1-Гексадеканол	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O
21.793	0.64	Hexadecanoic acid, methyl ester -Гексадекановая кислота, метиловый эфир	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
22.116	1.75	n-Hexadecanoic acid - n-гексадекановая кислота	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
22.47	2.54	Hexadecanoic acid, ethyl ester - Гексадекановая кислота, этиловый эфир	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>

Таблица 28 – Характеристика основных веществ «маркеров», в извлечении из листьев ольхи черной, полученном экстракцией ацетонитрилом

RT	Area Sum %	Name	DB Formula
6.242	1.11	Furfural - фурфурол	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
11.778	3.04	Hexanoic acid, 2-ethyl- 2-этил-Гексановая кислота,	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
12.176	1.54	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- 4H-Пиран-4-он, 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
12.369	0.68	Carbamic acid, methyl-, ethyl ester - метил-этиловый эфир Карбаминовой кислоты	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
13.443	6.32	5-Hydroxymethylfurfural - 5-Гидроксиметилфурфурол	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
13.593	1.38	2,4-Pentanedione, 3-methyl- 3-метил-2,4-Пентандион	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
13.679	0.66	Succinic acid, 2-hydroxy-3-methyl-, diethyl ester - 2-гидрокси-3-метил-, диэтиловый эфир янтарной кислоты	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
13.894	0.8	Butanoic acid, 2-oxo- 2-оксо-Бутановая кислота,	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
14.12	8.12	Malic Acid - Яблочная кислота	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>

## Продолжение Таблицы 28

14.581	1.29	Acetic acid, hex-3-yl ester - Уксусная кислота, гекс-3-ил эфир	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
15.607	6.34	Ethyl .beta.-d-ribose - Этил .бета.-d-рибозид	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
16.783	1.11	Eugenol, эвгенол	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
16.896	0.86	5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde -5-Метил-2-тиофенкарбоновый альдегид	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>S</sub>
18.545	3.13	Ethyl .alpha.-d-glucopyranoside - Этил .альфа.-d-глюкопиранозид	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
18.749	30.58	Ethyl .alpha.-d-glucopyranoside - Этил .альфа.-d-глюкопиранозид	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
19.479	0.67	Longipinocarveol, trans- Лонгипинокарвеол, транс-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
21.353	3.59	1-Hexadecanol - 1-Гексадеканол	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O
21.793	0.64	Hexadecanoic acid, methyl ester -Гексадекановая кислота, метиловый эфир	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
22.116	1.75	n-Hexadecanoic acid - n-гексадекановая кислота	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
22.47	2.54	Hexadecanoic acid, ethyl ester - Гексадекановая кислота, этиловый эфир	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
24.049	0.79	9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester - 9,12-Октадекадиеновая кислота, этиловый эфир	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
24.93	3.04	Tributyl acetylcitrate - Трибутилацетилцитрат	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>
26.788	1.32	Behenic alcohol - Бегенический спирт	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O
28.334	1.45	1-Decanol, 2-hexyl-1-Деканол, 2-гексил-	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O
30.718	2.16	4,8,13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol, 1,5,9-trimethyl-12-(1-methylethyl)- 4,8,13-Циклотетрадекатриен-1,3-диол, 1,5,9-триметил-12-(1-метилэтил)-	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
32.533	1.44	1,1,6-trimethyl-3-methylene-2-(3,6,9,13-tetramethyl-6-ethenyl-10,14-dimethylene-pentadec-4-enyl)cyclohexane	C <sub>33</sub> H <sub>56</sub>
35.154	5.26	A'-Neogammacer-22(29)-en-3-one	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O
36.029	3.16	Lup-20(29)-en-3-one – лупен 29-Зон	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O

#### 4.11. Итоговая оценка зависимости содержания биологически активных веществ листьев ольхи видов серая и черная (свежих, высушенных и замороженных) от консервации

Подводя итог проведенных исследований по оценке количественного содержания в исследуемом сырье – листьях ольхи серой и черной разных способов консервации и свежих основных групп БАВ, представленных тритерпеновыми сапонинами, органическими и фенолкарбоновыми кислотами, полисахаридами, флавоноидами, дубильными веществами, а также оценке суммарного содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой (результаты количественного определения представлены в таблице), следует отметить, что максимальное содержание всех групп веществ ожидаемо характерно для свежего сырья [43]. Вместе с тем влияние консервации высушиванием и особенно замораживанием приводит к не критичному снижению содержания действующих веществ.

Таблица 29 – Содержание БАВ в исследуемых листьях ольхи серой и черной [31]

Объект исследования		Содержание %					
		Полисахариды	Фенолкарбоновые кислоты	Тритерпеновые сапонины	Дубильные вещества	Флавоноиды	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом этиловым
Листья Ольхи серой	Свежие	4,34	1,68	1,28	6,24	2,84	25,3
	Замороженные	4,21	1,49	1,26	5,89	2,62	23,4
	Высушенные	4,07	1,27	1,23	5,78	2,38	20,31
Листья Ольхи черной	Свежие	4,89	1,86	1,39	6,62	2,63	26,4
	Замороженные	4,78	1,69	1,37	6,50	2,45	24,4
	Высушенные	4,53	1,42	1,34	6,31	2,24	21,1

При анализе экспериментальных данных о количественной оценке тритерпеновых сапонинов, полисахаридов, органических кислот, дубильных веществ, флавоноидов и экстрактивных веществ в свежих, высушенных и замороженных листьях ольхи фармакопейных видов был рассчитан процент снижения содержания по сравнению с базовыми показателями, установленными для свежего сырья. Замораживание листьев ольхи привело к уменьшению общего содержания полисахаридов, составившему 2,25% для ольхи черной и 3,00% для ольхи серой. Снижение содержания фенолкарбоновых кислот составило 9,14% и 11,3% соответственно, а снижение содержания тритерпеновых сапонинов оказалось равным 1,44% и 1,56%. Потеря содержания дубильных веществ составила от 2,8% до 9,8%, а флавоноидов – от 8,0% до 13,3%. Анализ высушенных листьев ольхи также показал снижение содержания полисахаридов, которое составило 7,4% для листьев ольхи черной и 6,22% для листьев ольхи серой. Снижение содержания фенолкарбоновых кислот составило 23,66% и 24,40%, снижение содержания тритерпеновых сапонинов – 3,60% и 3,91%, потеря содержания дубильных веществ составила от 6,8% до 11,4%, а флавоноидов – от 24,4% до 26,1% [31, 43].

#### **4.12. Выводы к Главе 4**

1. Проведен сравнительный анализ состава основных групп биологически активных веществ (БАВ) свежих, замороженных и высушенных листьев ольхи серой и черной с применением сочетания рутинных и современных физико-химических методов анализа [43]. Впервые для исследуемого сырья был установлен состав свободных органических кислот, который включает яблочную, лимонную, щавелевую, малоновую, фумаровую и янтарную кислоты. Анализ фракции, содержащей фенольные соединения из листьев ольхи, позволил идентифицировать по сравнению со стандартными образцами флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты, в составе которых: хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная, галловая и эллаговая кислоты, а также рутин, гиперозид, лютеолин,

катехин и кверцетин. Впервые установлен состав свободных сахаров листьев ольхи серой и черной, представленный глюкозой, галактозой и фруктозой. Методом аминокислотного анализа идентифицированы 17 аминокислот до и после гидролиза, доминирующими до гидролиза являются глутаминовая кислота и фенилаланин, после гидролиза – аспарагиновая, глутаминовая кислоты и лейцин, в следовых количествах для всех видов сырья наблюдается триптофан, изолейцин, гистидин, причем содержание изолейцина и гистидина возрастает после проведения гидролиза, что свидетельствует о присутствии данных аминокислот в основном в связанном виде низкомолекулярных пептидов [43].

2. В ходе проведенных исследований для свежего, замороженного и высушенного сырья ольхи видов серая и черная были определены идентичные группы биологически активных веществ, что доказывает отсутствие влияния выбранного способа консервации (сушка, замораживание) на качественный состав выбранных групп веществ в анализируемом сырье.

3. Отобраны методики количественного определения основных групп БАВ (суммарного содержания тритерпеновых соединений, полисахаридов, органических кислот, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, дубильных веществ) путем сопоставления данных научной литературы и собственных исследований листьев ольхи серой и черной [43].

4. Проведено определение качественного состава и количественного содержания основных БАВ (тритерпеновых сапонинов, флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, суммарного содержания полисахаридов) в листьях ольхи разных способов консервации. Методом хромато-масс-спектрометрии проведено изучение веществ-маркеров в этанольном, хлороформном и ацетонитриловом извлечении из сырья. Установлено, что состав изучаемых соединений для ольхи двух видов практически совпадает, представлен 28 соединениями, среди которых в качестве веществ-«маркеров» могут рассматриваться хумулан-1,6-диен-3-ол, лупеол (ольха черная), лупеон (ольха серая),  $\beta$ -амирин,  $\gamma$ -ситостерол, транс-лонгипинокарвеол. Впервые в извлечении из листьев ольхи серой и черной установлено наличие 4-аллил-2-

метоксифенола (эвгенола), присутствие которого в научной литературе подтверждалось ранее только для сырья *Alnus pendula* [31].

5. Разработаны и апробированы методики подтверждения подлинности и оценки количественного содержания флавоноидов, содержание которых составило в свежих листьях до 2,51%, в замороженных листьях до 2,31%, тритерпеновых сапонинов, содержание которых варьирует от 1,23 до 1,39% в пересчете на олеаноловую кислоту [31].

## ГЛАВА 5. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ

### 5.1. Разработка показателей качества нового лекарственного растительного сырья – листья ольхи

С целью стандартизации исследуемого сырья листья ольхи серой и черной были экспериментально определены товароведческие показатели.

К количественным характеристикам, определяющим качество сырья, относятся влажность, общая зола и зола, нерастворимая в 10% растворе хлороводородной кислоты, содержание примесей и экстрактивных веществ, которые определялись в соответствии с требованиями методик ГФ XV изданий. Проведенные исследования позволили установить показатели качества листьев ольхи серой и черной [36], представленные в Таблицах 37-40 [43].

С учетом перспектив применения экстракционных препаратов из исследуемого сырья в медицинской практике, содержание «экстрактивных веществ» было определено при экстракции 70% этиловым спиртом.

Анализ микробиологической чистоты, проводимый в соответствии с «Требованиями к микробиологической чистоте фармацевтических субстанций растительного происхождения, лекарственных растительных препаратов и экстрактов, используемых для их получения (203010004-2019)» показал, что образцы листьев ольхи серой и черной полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к ЛРС, а содержание микроорганизмов в исследуемых листьях ольхи серой и черной находится в значениях, рекомендуемых нормативной документацией [43].

Таблица 30 – Оценка показателей влажности листьев ольхи

Объект исследования	Влажность X ср., %	$S^2$	S	$\Delta x$	E отн %
Листья ольхи серой	12,8	0,0215	0,1466	0,1823	1,42
Листья ольхи черной	11,5	0,0165	0,1285	0,1597	1,39
Смесь листьев фармакопейных видов	12,3	0,0245	0,1565	0,1946	1,58

Таблица 31 – Результаты определения золы общей в листьях ольхи

Объект исследований	Содержание золы в сырье X ср., %	$S^2$	S	$\Delta x$	E отн %
Листья ольхи серой	4.6	0.01135	0.1065	0,1325	2,88
Листья ольхи черной	4.4	0,01045	0,1022	0,1271	2,90
Смесь ольхи фармакопейных видов	4.3	0,02300	0,1516	0,1885	4,38

Таблица 32 – Результаты определения золы нерастворимой в 10% кислоте хлористоводородной в сырье листья ольхи

Объект исследований	Содержание золы, нерастворимой в 10 HCl в сырье X ср., %	$S^2$	S	$\Delta x$	E отн %
Листья ольхи серой	0,26	0.00007	0.0084	0,0104	4,00
Листья ольхи черной	0,28	0,00005	0,0071	0,0088	3,14
Смесь ольхи фармакопейных видов	0,25	0,00004	0.0063	0,0079	3.15

Таблица 33 – Результаты оценки числовых показателей и микробиологической частоты в листьях ольхи серой и черной [31]

Анализ	Показатели	Содержание		
		Листья Ольхи черной	Листья Ольхи серой	Смесь листьев
Числовые показатели	Листья, утратившие естественную окраску	2,5 - 2,8	1,9 - 2,6	2,3 - 2,7
	Частицы, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм	3,4 - 3,8	3,0 - 3,6	3,1 - 3,7
	Органическая примесь	1,2 - 1,7	1,6 - 2,1	1,5 - 1,7
	Минеральная примесь	0,1 - 0,4	0 - 0,3	0,1 - 0,4
	Влажность	10,8 - 11,5	12,0 - 12,8	11,5 – 12,3
	Зола общая	3,6 – 4,4	4,2 - 4,6	3,8 - 4,3
	Зола нерастворимая в 10% кислоте соляной	0,15 - 0,28	0,23 - 0,26	0,19 - 0,25
	Содержание флавоноидов	2,38	2,24	2,26

Продолжение Таблицы 33

Числовые показатели	Содержание дубильных веществ	5,78	6,31	5,86
	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом	20,31	21,10	20,54
Микробиологическая чистота	Аэробные бактерии	1,1x10,4	1,6	1,5
	Дрожжевые и плесневые грибы	0,7x10,2	0,9	0,7
	<i>Escherichia coli</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Salmonella</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Содержание радионуклидов (Sr-90)		–	–	–

## 5.2. Изучение технологических параметров листьев ольхи серой и черной

Учитывая отсутствие в научной литературе данных, характеризующих технологические показатели нового сырья- листа ольхи , а также современные тенденции в получении лекарственных форм путем непосредственного таблетирования тонкоизмельченного растительного сырья нами были получены порошки листьев ольхи серой и черной, а также их видовой смеси, проходящие сквозь сито с диаметром 1 мм , для которых было проведено определение удельной массы, насыпной массы, объемной массы, пористости, порозности, свободного объема слоя сырья [38].

Также проведено определение коэффициентов поглощения экстрагентов (мл\г) листьями ольхи серой и черной для воды очищенной, спирта этилового 45%, 70%, 96%. Использование технологических параметров на этапе планирования производства направлено на обеспечение его рентабельности и высокой эффективности [59].

Результаты анализа технологических параметров нового вида сырья- листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.) Moench и *A. glutinosa* (L.) Gaertn., измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром 1 мм, выполненного по установленным методикам, представлены в Таблицах 34,35.

Таблица 34 – Результаты оценки технологических параметров листьев ольхи [38]

Определяемый параметр	Анализ листья ОЧ	Анализ листьев ОС	Анализ смеси
Удельная масса ( $d_y$ , г/см <sup>3</sup> )	1,43±0,04	1,40±0,02	1,41±0,04
Насыпная масса ( $d_n$ , г/см <sup>3</sup> )	0,24±0,01	0,21±0,01	0,22±0,03
Объемная масса ( $d_0$ , г/см <sup>3</sup> )	0,47±0,02	0,43±0,04	0,45±0,03
Пористость ( $P_c$ )	0,67±0,03	0,69±0,03	0,68±0,01
Порозность ( $P_{ш}$ )	0,49±0,01	0,51±0,01	0,51±0,03
Свободный объем слоя сырья ( $V$ )	0,83±0,01	0,85±0,02	0,84±0,02

Таблица 35 – Коэффициенты поглощения экстрагентов сырьем листьев ольхи черной и серой

Экстрагент	$\alpha$ экстрагента листьями ОЧ, мл\г	$\alpha$ экстрагента листьями ОС, мл\г
H <sub>2</sub> O (очищ.)	4,49±0,04	4,42±0,04
45% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	3,79±0,03	3,76±0,02
70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	3,18±0,04	3,22±0,04
96% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	2,67±0,03	2,71±0,04

### 5.3. Изучение адсорбционной способности измельченного шрота листьев ольхи

Учитывая перспективы использования листьев ольхи серой и черной для производства экстракционных препаратов, мы посчитали целесообразным исследовать возможность реализации безотходной технологии переработки данного сырья и оценить потенциал жмыха, образующегося после экстракции, как возможного источника адсорбционных средств. Применение жмыха в качестве сырья для разработки энтеросорбентов может привести к снижению себестоимости производства за счет внедрения безотходных технологий и расширения ассортимента адсорбционных лекарственных средств [32, 41]. Поскольку в доступной литературе отсутствуют данные о адсорбционной способности жмыха соплодий ольхи, мы также включили соплодия в наш эксперимент.

Жмых листьев ольхи серой и черной, а также жмых соплодий ольхи (смесь обоих видов), реализуемый в соответствии с ФС *Fructus Alni*, был получен в процессе переработки указанного сырья для выделения экстракционных препаратов. Сырье высушивалось в изотермическом режиме при температуре 105 °С и подвергалось измельчению в мельнице-ступке Pulveri-sette (Fritsch, Германия). Измельченные жмыхи фракционировались с использованием набора сит, при этом отбирались фракции с размером частиц не более 0,5 мм. В качестве потенциальных сорбентов использовались как непосредственно измельченные образцы, так и

образцы, прошедшие дополнительную обработку с применением стандартных методов, направленных на увеличение пористости получаемого сорбента. Характеристика исследуемых образцов, предназначенных для использования в роли сорбентов, представлена на Рисунке 45 [32].

Исследуемый образец	Внешние признаки	Способ получения
Порошок жмыха соплодий ольхи фармакопейных видов	Порошок темно-коричневого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец представляет собой жмых соплодий ольхи, после получения из сырья экстракционного препарата
Порошок жмыха листьев ольхи <i>Alnus incana</i>	Порошок грязно-зеленого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец представляет собой жмых листьев ольхи <i>Alnus incana</i> , после получения из сырья экстракционного препарата
Порошок жмыха листьев ольхи <i>Alnus glutinosa</i>	Порошок буро-зеленого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец представляет собой жмых листьев ольхи <i>Alnus glutinosa</i> , после получения из сырья экстракционного препарата
Образец А	Порошок темного черно-коричневого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец получен обработкой жмыха соплодий ольхи раствором натрия гидроксида 1% в течение 1 часа с последующим отмыванием водой дистиллированной, нейтрализацией раствором кислоты хлороводородной 1% до нейтральной среды
Образец В	Порошок темно-коричневого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец получен обработкой жмыха листьев ольхи раствором натрия гидроксида 1% в течение 1 часа с последующим отмыванием водой дистиллированной, нейтрализацией раствором кислоты хлороводородной 1% до нейтральной среды
Образец С	Порошок черно-коричневого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец получен выдерживанием измельченного жмыха соплодий ольхи в воде дистиллированной в течение 120 минут при комнатной температуре, с последующим замораживанием в соответствии с методикой ГОСТ 54683-2011, путем ускоренного понижения температуры ниже криоскопической с образованием внутри продукта температуры -18С после чего субстанцию размораживали и высушивали в изотермическом режиме
Образец Д	Порошок буро-коричневого цвета с своеобразным запахом и сильно вяжущим вкусом	Образец получен выдерживанием измельченного жмыха соплодий ольхи в воде дистиллированной в течение 120 минут при комнатной температуре, с последующим замораживанием в соответствии с методикой ГОСТ 54683-2011, путем ускоренного понижения температуры ниже криоскопической с образованием внутри продукта температуры -18С после чего субстанцию размораживали и высушивали в изотермическом режиме

Рисунок 45 – Характеристика исследуемых образцов

В качестве веществ маркеров для оценки показателя адсорбционной активности исследуемых образцов нами использовались 0,15 % раствор метиленового синего и 0,6% раствор желатина [32].

Оценка адсорбционной активности по метиленовому синему проводилась в соответствии с методикой ФС 42-3246-95 «Таблетки активированного угля». К точно взвешенной порции исследуемого образца добавлялся раствор метиленового синего. Затем колбы с содержимым помещались на лабораторный шейкер и

встряхивались при заданной средней скорости 150 колебательных движений в минуту. По окончании взаимодействия между сорбатом и сорбентом рабочие растворы фильтровались, после чего проводилось определение оптической плотности на спектрофотометре Specord при длине волны 664 нм, по сравнению с значением оптической плотности исходного раствора (раствора-сравнения) метиленового синего [32].

Значение адсорбционной способности рассчитывали по формуле [32]:

$$X = \frac{(D_0 - D) \cdot a \cdot 50}{m \cdot (1 - 0,01 \cdot W)}, \text{ где}$$

$D_0$  – значение оптической плотности раствора метиленового синего,  $D$  – значение оптической плотности исследуемого раствора,  $m$  – масса исследуемого образца, г.,  $a$  – содержание метиленового синего в растворе сравнения,  $W$  – значение влагосодержания исследуемого образца, %, 50 – объем используемого раствора метиленового синего, мл.

Оценка адсорбционной способности в отношении желатина проводилась с использованием методики ФС 42-3731-99 «Полисорб», модифицированной В.И. Решетниковым [52]. Точные навески исследуемых образцов помещались в раствор желатина и оставлялись на 60 минут, после чего смесь центрифугировалась. Содержание непрореагировавшего белка в растворе желатина определялось с использованием биуретовой реакции. Результаты анализа адсорбционной способности исследуемых образцов, а также растворов, широко используемых в медицинской практике энтеросорбентов «Полифепан» и микрокристаллической целлюлозы представлены в Таблице 36 [32].

Таблица 36 – Адсорбционная способность (АС) исследуемых образцов [32]

Объект исследования	Содержание влаги, %	АС по метиленовому синему, мг\г	АС по желатину, мг\г
Порошок жмыха соплодий ольхи фармакопейных видов	5,8	42,6	101,9
Порошок жмыха листьев ольхи <i>Alnus incana</i> .	9,7	32,8	87,5

## Продолжение Таблицы 36

Порошок жмыха листьев ольхи <i>Alnus glutinosa</i> .	8,2	34,9	90,4
Образец А	9,5	49,9	112,6
Образец В	9,9	38,1	95,9
Образец С	11,3	47,8	124,2
Образец Д	10,7	40,5	94,7
Полифепан	3,7	44,3	94,1
МКЦ	2,3	41,9_+1,7	99,4+2,8

Согласно данным литературы, сорбенты растительного происхождения обладают способностью интегрировать молекулярные и комплексообразующие механизмы сорбции благодаря наличию микропористой структуры частиц и функциональных групп на их поверхности [3]. Это приводит к умеренной сорбции для среднемолекулярных веществ, таких как метиленовый синий, и белковых маркеров. Как видно из представленных в таблице данных, все исследуемые образцы показывают умеренную адсорбционную способность, значения которой сопоставимы с показателями традиционных адсорбентов. Применение технологий, направленных на увеличение пористости получаемых сорбентов, позволило повысить адсорбционную способность на 17,14% по метиленовому синему и на 10,5% по желатину для образца, полученного обработкой жмыха соплодий ольхи 1% раствором натрия гидроксида в течение 1 часа, с последующим промыванием дистиллированной водой и нейтрализацией 1% раствором хлороводородной кислоты до нейтральной среды. Аналогичным образом, показатели увеличились на 12,2% и 21,9% для образца, полученного выдерживанием измельченного жмыха соплодий ольхи в дистиллированной воде в течение 120 минут при комнатной температуре с последующим замораживанием, в соответствии с методикой ГОСТ 54683-2011, по сравнению с исходным жмыхом. Для жмыхов листьев ольхи серой и черной аналогичные результаты составили 16,2% и 9,2% (по первому методу пробоподготовки) и 23,5% и 16,0% (по второму методу) по отношению к

метиленовому синему, а также 9,6% и 6,1% (первый способ) и 8,2% и 4,8% (второй способ) по сравнению с маркером желатина [32].

В ходе проведенного исследования были получены образцы жмыхов соплодий и листьев ольхи видов *Alnus incana* и *A. glutinosa*, которые могут рассматриваться как потенциальные отходы фармацевтического производства, требующие утилизации [32]. Оценена их адсорбционная способность по метиленовому синему и желатину, сопоставленная с аналогичными показателями традиционных энтеросорбентов – препарата «Полифепан» и микрокристаллической целлюлозы. Сравнение полученных данных позволяет рассмотреть исследуемое сырье как перспективный источник для производства энтеросорбентов с применением безотходной технологии [32].

#### **5.4. Определение антимикробной активности извлечений из листьев ольхи серой и черной**

Исследование антимикробной активности извлечений из листьев ольхи серой и черной (настой, настойка, жидкий экстракт) проводилось с использованием метода диффузии в агар на плотной питательной среде. Питательная среда готовилась из сухого компонента, произведенного промышленным способом, в соответствии с инструкциями производителя. Оценка антимикробной активности исследуемых экстрактов осуществлялась путем сравнения зон ингибирования роста тестовых микроорганизмов [43].

Полученные результаты определения антимикробной активности представлены в Таблице 37.

Таблица 37 – Результаты определения антимикробной активности извлечений из листьев ольхи серой и черной

Наименование культуры микроорганизма	Величина зоны задержки роста, мм					
	Листья ольхи черной			Листья ольхи серой		
	Настой	Настойка	Жидкий экстракт	Настой	Настойка	Жидкий экстракт
<i>Staphylococcus aureus</i> (209)	12	17	19	10	15	17
<i>Staphylococcus aureus</i> (Tupe)	11	18	17	10	19	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Wood - 46	12	16	13	11	20	15
<i>Escherichia coli</i> 675	8	12	8	6	11	9
<i>Salmonella typhimurium</i>	9	13	12	8	14	11
<i>Shigella sonnei</i> 3d	8	18	15	6	13	9
<i>Bacillus subtilis</i> L2	11	22	19	11	25	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	13	11	8	16	13
<i>Candida albicans</i>	8	17	13	8	15	12

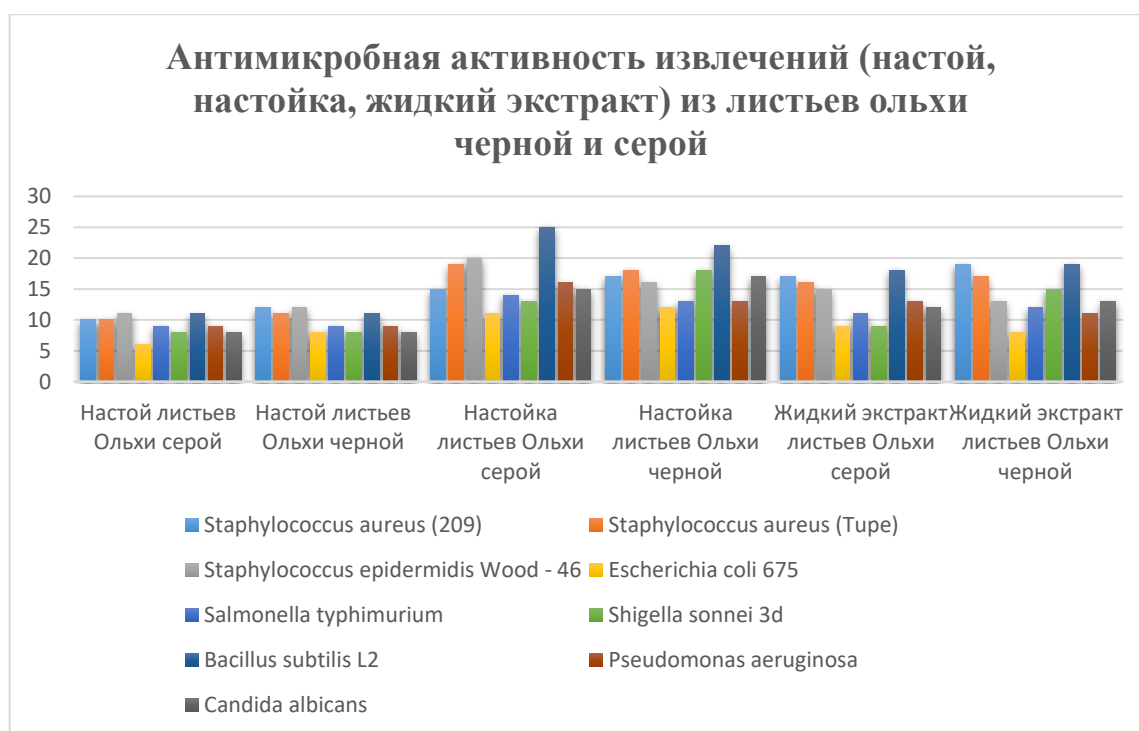


Рисунок 46 – Результаты оценки антимикробной активности извлечений из листьев ольхи черной и серой

В ходе проведенных исследований было установлено, что все изученные экстракты из листьев ольхи серой и черной проявляют значительное антимикробное действие против *Staphylococcus aureus* (209), *Staphylococcus aureus* (Type), *Staphylococcus epidermidis* Wood – 46, а также умеренную активность по отношению к *Escherichia coli* 675, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* 3d, *Bacillus subtilis* L2, *Bacillus anthracoides* – 1 и *Pseudomonas aeruginosa* [50]. Таким образом, результаты тестирования антимикробной активности свидетельствуют о том, что настойки из листьев ольхи обладают наибольшими антимикробными свойствами, тогда как жидкий экстракт и настой из данного сырья также демонстрируют антибактериальную активность, хотя и в меньшей степени.

### 5.5. Выводы к Главе 5

1. Выполнено определение товароведческих характеристик для нового лекарственного растительного сырья — листьев ольхи, а также установлены нормы, рекомендуемые для включения в разрабатываемый проект нормативной документации «Ольхи листья».

2. Проведена оценка технологических показателей качества измельченного сырья листьев ольхи серой и черной, таких как удельная масса, насыпная масса, объемная масса, пористость, порозность, свободный объема слоя сырья. Также проведено определение коэффициентов поглощения экстрагентов листьями ольхи серой и черной для воды очищенной, спирта этилового 45%, 70%, 96%.

3. В ходе проведенного исследования были получены образцы жмыхов сырья соплодий и листьев ольхи видов *Alnus incana* и *A. glutinosa*, которые могут рассматриваться как потенциальные отходы фармацевтического производства, требующие утилизации. Проведена оценка их адсорбционной способности по метиленовому синему и желатину, сравненная с аналогичными показателями традиционных энтеросорбентов — препарата «Полифепан» и микрокристаллической целлюлозы. Проведенная технологическая обработка жмыхов, направленная на увеличение пористости получаемых сорбентов,

позволила повысить адсорбционную способность исследуемых образцов по метиленовому синему и н по желатину [32]. Полученные результаты позволяют прогнозировать возможность безотходной переработки листьев ольхи с использованием отхода производства жмыха ольхи для создания инновационного растительного энтеросорбента.

4. В ходе изучения антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из листьев ольхи серой и черной, полученных в соответствии с требованиями ГФ XV (настой, настойка и жидкий экстракт), установлено наличие значительного антимикробного действия всех изученных объектов в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* Wood – 46, а также умеренную активность против *Escherichia coli* 675, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* 3d, *Bacillus subtilis* L2, *Bacillus anthracoides* – 1 и *Pseudomonas aeruginosa* [43]. Отмечается максимальная эффективность извлечения, приготовленного в соответствии с требованиями ОФС Настойки.

## ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ОЛЬХИ

### 6.1. Оценка влияния некоторых параметров на показатели качества водных извлечений из листьев ольхи разных способов консервации

Получение водных извлечений из высушенных листьев ольхи серой и черной регулируется общей фармакопейной статьей ГФ 15 изд., ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары». В настоящее время отсутствует нормативная документация, регулирующая технологию получения водных извлечений из свежего и замороженного растительного сырья – листьев ольхи серой и черной [54]. Учитывая это, был проведен анализ условий извлечения водных экстрактов из свежесобранных и замороженных листьев фармакопейных видов ольхи, с целью определения оптимальных показателей качества. Для оценки влияния измельченности растительного сырья на степень извлечения комплекса активных веществ из свежих и замороженных листьев ольхи были получены настои в соотношении сырье : экстрагент 1 : 20 в соответствии с рекомендациями инструкции по применению. Листья использовались в цельном и измельченном виде, при этом измельчение производилось до размеров частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 7 мм. Степень извлечения активных веществ определялась по показателю сухого остатка. Результаты исследования представлены в Таблице 46 [43].

Водные извлечения из сырья получали в соотношении 1:10 в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары». Оценка качества полученных водных извлечений из листьев ольхи фармакопейных видов проводилась по таким показателям, как описание, рН, содержание сухого остатка, содержание дубильных веществ и содержание флавоноидов. Для определения рН использовался рН-метр модели рН 211 Microprocessor. Содержание дубильных веществ определялось методом перманганатометрического титрования. Количественное содержание флавоноидов определялось спектрофотометрическим методом. Для изучения

влияния размера частиц на качество водного извлечения листа ольхи измельчались до размеров частиц 2, 3, 5, 7 и 10 мм. В полученных водных извлечениях проводилась оценка содержания сухого остатка, дубильных веществ и флавоноидов. Оценка суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в водных извлечениях из листьев ольхи осуществлялась по следующей методике: 5 мл водного извлечения помещали в мерную колбу объемом 25 мл и доводили объем до метки 70% спиртом этиловым с осторожным перемешиванием (раствор А). Из раствора А точно отмеривались аликвоты по 5 мл, которые переносились в мерные колбы объемом 25 мл. В одну из колб добавляли 6 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, в другую – такой же объем 70% этилового спирта. Содержание суммарных флавоноидов в исследуемых водных извлечениях рассчитывалось в пересчете на рутин.

Водные извлечения из изучаемых листьев ольхи являются жидкостями коричневого или зеленовато-коричневого оттенка, с легким травянистым запахом и вяжущим вкусом [34]. В процессе исследования влияния размера частиц на качество экстракта было установлено, что оптимальный размер измельчения составляет 3 мм, что обеспечивает наибольший выход активных компонентов. Результаты анализа представлены в Таблице 38.

Таблица 38 – Анализ влияния измельченности листьев ольхи на показатели качества водного извлечения [34]

Объект исследования	Размер частиц, мм	Сухой остаток, %	Содержание дубильных веществ, %	Содержание флавоноидов, %
Листья ольхи <i>Alnus incana</i> (L.) Moench (Московская область)	2	2,18 ±0,07	0,827±0,001	0,075±0,002
	3	2,18±0,05	0,831±0,005	0,076±0,003
	5	2,18±0,04	0,826±0,003	0,076±0,001
	7	2,14±0,06	0,817±0,004	0,073±0,004
	10	2.11±0,02	0,816±0,003	0,071±0,003
Листья ольхи <i>Alnus incana</i> (L.) Moench (Тверская область)	2	2,16±0,07	0,829±0,005	0,079±0,002
	3	2.17±0,02	0,830±0,003	0,079±0,003
	5	2,17±0,06	0,829±0,002	0,078±0,001
	7	2,13±0,02	0,818±0,004	0,074±0,002
	10	2.12±0,05	0,815±0,006	0,071±0,002
Листья ольхи <i>A. glutinosa</i> (L.) Gaerth (Московская область)	2	2,34±0,03	0,811±0,003	0,071±0,002
	3	2,33±0,03	0,812±0,006	0,071±0,001
	5	2,33±0,02	0,812±0,002	0,070±0,005
	7	2,31±0,06	0,807±0,002	0,067±0,002
	10	2,31±0,04	0,803±0,004	0,065±0,002
Листья ольхи <i>A. glutinosa</i> (L.) Gaerth (Тверская область)	2	2,27±0,03	0,812±0,004	0,069±0,001
	3	2,28±0,02	0,813±0,003	0,070±0,001
	5	2,27±0,02	0,813±0,003	0,069±0,003
	7	2,24±0,03	0,806±0,004	0,065±0,001
	10	2,23±0,04	0,801±0,002	0,064±0,002
Смесь листьев	2	2,24±0,02	0,811±0,004	0,071±0,001
	3	2,24±0,04	0,812±0,003	0,073±0,001
	5	2,23±0,04	0,812±0,003	0,072±0,002
	7	2,21±0,03	0,810±0,004	0,068±0,002
	10	2,20±0,02	0,809±0,002	0,067±0,002

Как следует из данных таблицы, максимальные показатели выхода сухого остатка и дубильных веществ наблюдаются в водных экстрактах, полученных из листьев ольхи, измельченных до размеров 3 и 5 мм. При размерах частиц 2 и 7 мм эти показатели остаются практически неизменными, тогда как использование более крупных частиц приводит к некоторому снижению их содержания. Содержание флавоноидов при изменении степени измельченности сырья практически не варьируется.

Таким образом, для производства водных экстрактов из листьев фармакопейных видов ольхи оптимальными являются размеры частиц в диапазоне 3-5 мм, так как данная степень измельчения обеспечивает максимальный выход активных веществ.

С целью оценки влияния режима настаивания на качество получаемого водного экстракта настои из листьев ольхи были приготовлены с использованием режимов, представленных на Рисунке 47 [34].



Рисунок 47 – Используемые режимы настаивания для выявления их влияния на качество водного извлечения из листьев ольхи

Таблица 39 – Анализ влияния режима настаивания на показатели качества водного извлечения из листьев ольхи

Режим получения водного извлечения	Описание	pH	Сухой остаток, %	Содержание дубильных веществ, %	Содержание флавоноидов, %
В соответствии с рекомендациям и ОФС.1.4.1.0018 .15 «Настои и отвары».	Желтовато-коричневая прозрачная жидкость со слабой опалесценцией с специфическим травянистым запахом и сильно-вяжущим вкусом	3,77	2,62±0,04	0,67±0,001	0,046±0,003
При нагревании при температуре 100 С в течение 15 минут с последующим охлаждением в течение 45 минут;	Желтовато-коричневая прозрачная жидкость со слабой опалесценцией с специфическим травянистым запахом и сильно-вяжущим вкусом	3,78	2,69±0,03	0,69±0,004	0,048±0,005
С использованием настаивания в термосе в течение 12 часов;	Желтовато-коричневая прозрачная жидкость с специфическим травянистым запахом и сильно-вяжущим вкусом	3,79	2,54±0,04	0,61±0,005	0,039±0,001
Заливанием сырья кипящей водой с последующим настаиванием до охлаждения	Зеленовато-коричневая прозрачная жидкость с специфическим травянистым запахом и сильно-вяжущим вкусом	3,79	2,42±0,06	0,59±0,002	0,033±0,002

Качество водных экстрактов оценивалось по количеству сухого остатка, а также по содержанию дубильных веществ и флавоноидов [2]. Наивысший выход сухого остатка был зафиксирован при нагревании при температуре 100°C, однако содержание дубильных веществ и флавоноидов оставалось практически неизменным [43]. Увеличение выхода сухого остатка в условиях высокой температуры может объясняться извлечением дополнительных веществ. Таким образом, для получения водного экстракта из листьев ольхи рекомендуется использовать режим, указанный в Государственной фармакопее.

Таблица 40 – Содержание сухого остатка водных извлечений из свежих, замороженных и высушенных листьев ольхи серой и черной [34, 43]

Используемое для	Сухой остаток, %	
	Листья ольхи серой	Листья ольхи черной
Настои из свежего сырья		
Цельное сырье	2,62 ± 0,03	1,17 ± 0,05
Измельченное сырье	1,83 ± 0,06	1,92 ± 0,05
Настои из замороженного сырья		
Цельное сырье	1,04 ± 0,06	1,08 ± 0,04
Измельченное сырье	1,67 ± 0,05	1,74 ± 0,03
Настои из высушенного сырья		
Цельное сырье	0,98±0,03	1,01±0,05
Измельченное сырье	1,38±0,04	1,45±0,03

Данные таблицы показывают, что настои, полученные из измельченных листьев ольхи, имеют более высокие значения сухого остатка по сравнению с водными экстрактами, полученными из цельного или грубо нарезанного сырья. Учитывая опыт использования отваров и настоев из высушенных листьев, а также результаты предыдущих исследований, проведенных на свежих и замороженных

источниках сырья с соотношениями сырье : экстрагент 1 : 20 (в соответствии с инструкцией) и 1 : 10 (по методике фармакопей), мы пришли к выводу, что для оптимального получения водных извлечений из свежих и замороженных листьев ольхи серой и черной целесообразно использовать настои из измельченного растительного сырья в соотношениях 1 : 10 и 1 : 20 [43].

## 6.2. Сравнительный анализ некоторых показателей качества водных извлечений из листьев ольхи серой и черной

Для экспериментальной оценки содержания биологически активных веществ были получены отвары из листьев ольхи серой и черной. Изготовление водных экстрактов из высушенных листьев фармакопейных видов проводилось в соответствии с требованиями фармакопейной методики, с использованием соотношения сырье - экстрагент 1 : 10 из измельченного сырья. Для всех полученных водных экстрактов были определены органолептические характеристики, такие как цвет, прозрачность, запах, вкус и pH. Результаты этих определений представлены в Таблице 41 [43].

Таблица 41 – Органолептические характеристики и значения pH водных извлечений из листьев ольхи [43]

Показатели	Вид сырья					
	Листья ольхи серой			Листья ольхи черной		
	Свежие	Высуш.	Заморож.	Свежие	Высуш.	Заморож.
Цвет	Насыщенный зеленовато-коричневый с зеленоватой опалесценцией	Насыщенный желто-коричневый с зеленоватой опалесценцией	Насыщенный коричневый с зеленоватой опалесценцией	Насыщенный зеленовато-коричневый с зеленоватой опалесценцией	Насыщенный желто-коричневый с зеленоватой опалесценцией	Насыщенный желто-коричневый с зеленоватой опалесценцией

Продолжение Таблицы 41

Прозрачность	Прозрачный со слабой опалесценцией	Прозрачный со слабой опалесценцией	Прозрачный со слабой опалесценцией	Прозрачный со слабой опалесценцией	Прозрачный со слабой опалесценцией	Прозрачный со слабой опалесценцией
Запах	Специфический, травянистый	Специфический, травянистый	Специфический, травянистый	Специфический, травянистый	Специфический, травянистый	Специфический, травянистый
Вкус	горьковатый, сильно вяжущий	горьковатый, сильно вяжущий	горьковатый, сильно вяжущий	горьковатый, сильно вяжущий	горьковатый, сильно вяжущий	горьковатый, сильно вяжущий
pH	3,75	3,79	3,78	3,77	3,79	3,79

Полученные извлечения представляли собой окрашенные прозрачные или слабо опалесцирующие жидкости со специфическим запахом, горьковатым вяжущим вкусом и кислой реакцией среды [43]. Для всех исследуемых водных извлечений было подтверждено наличие качественными реакциями и с использованием ТСХ тех же групп БАВ, которые были подтверждены ранее при изучении исходного сырья листа ольхи серой и черной. Для гармонизации показателей, характеризующих качество исходного сырья и получаемого на его основе водного извлечения была проведена оценка содержания основных групп БАВ (дубильные вещества, флавоноиды) с использованием методов, рассмотренных в 4-й главе. Результаты анализа водных извлечений из листьев ольхи серой, черной и видовой смеси представлены в Таблице 41.

Как следует из данных таблицы, все основные группы БАВ, определяемые в исходном сырье, переходят в водные извлечения, причем видовой принадлежности не оказывает существенного влияния, что позволяет рассматривать возможность использования двух видов ольхи для приготовления из сырья водных извлечений.

### 6.3. Особенности получения и оценка показателей качества водно-спиртового извлечения из листьев ольхи серой и черной

Перед началом экстрагирования сырье подвергали измельчению. Для приготовления извлечения использовалось сырье, частицы которого проходили через сито с диаметром отверстий 2 мм. Как известно, в качестве экстрагента для извлечения активных компонентов из лекарственного растительного сырья применяют этанол в концентрациях от 30% до 90%. В данном исследовании был использован этиловый спирт с концентрацией 70%, поскольку согласно данным литературы, это обеспечивает оптимальное извлечение биологически активных веществ.

Результаты оценки некоторых показателей качества водно-спиртовых извлечений из листьев ольхи серой и черной представлены в Таблице 42.

Таблица 42 – Результаты определения сухого остатка, плотности и водородного показателя водно-спиртовых извлечений из сырья листьев ольхи серой и черной

Объект исследования	pH	Плотность, г/мл	Сухой остаток, %
Водно-спиртовое извлечение из листьев ольхи серой	3,04	0,965	8,15 ± 0,14
Водно-спиртовое извлечение из листьев ольхи черной	3,11	0,961	7,92 ± 0,10
Водно-спиртовое извлечение из смеси листьев ольхи изучаемых видов	3,32	0,948	7,62 ± 0,11

В ходе качественного анализа биологически активных веществ с применением метода тонкослойной хроматографии, основанного на методиках, ранее использованных для исследования исходного сырья, в водно-спиртовых

листьев ольхи серой и черной были обнаружены флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты, выявленные ранее в исходном сырье.

Исследование полифенольного комплекса настоек листьев двух видов ольхи проводилось с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в ранее описанных условиях. Полученные хроматографические профили совпадают с профилями исходного сырья.

#### **6.4. Выводы к Главе 6**

1. В ходе проведенных исследований изучено влияние степени измельчения и условий настаивания листьев ольхи на качество получаемых водных извлечений, что позволило выявить оптимальный показатель измельченности сырья, позволяющий достичь максимального выхода БАВ в получаемое водное извлечение.

2. В результате сравнительного анализа водных извлечений, полученных из свежего, замороженного и высушенного сырья листьев ольхи, установлено, что извлечения из свежих и замороженных листьев по органолептическим характеристикам, содержанию сухого остатка, значению рН, а также количественным показателям основных групп биологически активных веществ аналогичны извлечениям, полученным из высушенного сырья [43].

3. На лабораторном оборудовании получена настойка из листьев ольхи серой и черной, для которой проведено определение значения водородного показателя, плотности, сухого остатка [31].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом данной работы является разработка показателей качества листьев ольхи серой и черной как перспективного растительного сырья, обладающего антимикробным действием. Установлено близкое значение, как содержания биологически активных веществ в листьях ольхи серой и черной, произрастающих в Московской и Тверской областях, так и антимикробного действия в отношении использованных в эксперименте тест-культур микроорганизмов, что позволяет осуществлять стандартизацию данного сырья с использованием единых показателей качества.

## ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое изучение научной литературы и патентной документации, позволяющее выявить спектр современных требований к качеству листьев ольхи черной и серой, и продемонстрировать востребованность средств антимикробного действия растительного происхождения на фоне тенденции роста резистентных штаммов микроорганизмов.

2. Проведен анализ анатомо-морфологического строения цельного и измельченного растительного сырья - листья ольхи черной и серой свежих, замороженных и высушенных, на основании которого выявлены важнейшие диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию данного сырья и подготовлены рекомендации для включения в раздел «Определение подлинности», планируемой НД.

3. Определен качественный состав и количественное содержание основных БАВ (тритерпеновых сапонинов, флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, суммарного содержания полисахаридов) в листьях ольхи разных способов консервации. Методом хромато-масс-спектрометрии изучены в хлороформном и ацетонитрильном извлечении из сырья. Установлено, что состав соединений для ольхи двух видов практически совпадает и представлен 28 соединениями, среди которых в качестве характерных веществ (маркеров) могут рассматриваться хумулан-1,6-диен-3-ол, лупеол (ольха черная), лупеон (ольха серая),  $\beta$ -амирин,  $\gamma$ -ситостерол, транс-лонгипинокарвеол. Впервые в извлечении из листьев ольхи серой и черной установлено наличие эвгенола, ранее описанного только для сырья *Alnus pendula*. Разработаны и апробированы методики подтверждения подлинности и оценки количественного содержания флавоноидов, содержание которых составило в свежих листьях до 2,51%, в замороженных листьях до 2,31%, тритерпеновых сапонинов, содержание которых варьирует от 1,23 до 1,39% в пересчете на олеаноловую кислоту.

4. Определены показатели качества листьев ольхи серой и черной. Учитывая близкие значения числовых показателей листьев ольхи двух видов, проведено

определение числовых показателей на смесь листьев, установлены их нормы для включения в проект ФС «Ольхи листья».

5. Получены водные и водно-спиртовые извлечения из листьев ольхи серой и черной, в которых был установлен качественный состав и проведено количественное определение дубильных веществ, флавоноидов, тритерпеновых сапонинов. Изучена антимикробная активность извлечений из листьев ольхи. Установлено, что все изучаемые извлечения из листьев ольхи проявляют антимикробное действие в отношении 9 штаммов микроорганизмов.

6. Оценена адсорбционная способность образцов жмыхов сырья соплодий и листьев ольхи видов *Alnus incana* и *A. glutinosa* по метиленовому синему и желатину, по сравнению с аналогичными показателями традиционных энтеросорбентов – препарата «Полифепан» и микрокристаллической целлюлозы. Технологическая обработка жмыхов, направленная на увеличение пористости получаемых сорбентов, позволила повысить их адсорбционную способность. Полученные результаты позволяют прогнозировать возможность безотходной переработки листьев ольхи с использованием жмыха ольхи для создания инновационного растительного энтеросорбента.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследования позволяют эффективно и рационально использовать в медицине и фармацевтической практике новое растительное сырье – листья ольхи серой и черной. Разработанные в ходе исследований подходы к стандартизации сырья могут быть использованы в учебном процессе по курсу «Фармакогнозия» для высших учебных заведений. Особо важным представляется, приводимое автором научное обоснование введения в отечественную номенклатуру листьев ольхи серой и черной, что позволит расширить ассортимент российского растительного сырья.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Проведенные исследования могут использоваться для разработки лекарственных и гигиенических средств антимикробного действия на основе извлечений из предлагаемого вида сырья-листья ольхи серой и черной, а также последующего совершенствования методов определения подлинности и доброкачественности данных средств.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аврач, А.С. Тонкослойная хроматография в анализе плодов лекарственных растений семейства Розоцветные / А.С. Аврач, И.А. Самылина, Е.В. Сергунова // Фармация. – 2014. – № 2. – С. 15-18.
2. Анализ современных подходов к идентификации и количественной оценке дубильных веществ / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова, С.В. Чернова, В.С. Карташов. – Текст: непосредственный // Сборник статей XXX международного научно-исследовательского конкурса. – Пенза: Наука и Просвещение, 2019. – С. 135-138.
3. Анализ энтеросорбентов, представленных в розничном звене фармацевтического рынка / Г.А. Галкина, Е.И. Грибкова, М.М. Курашов, Е.М. Раснер // Фармация. – 2017. – № 66(6). – С. 38-42.
4. Анисимов, М.М. О биологической роли тритерпеновых гликозидов / М.М. Анисимов, В.Я. Чирва // Успехи современной биологии. – 1980. – Т.90. – № 3(6). – С. 351-364.
5. Дикусар, Е.А. Синтез и изучение фунгицидной активности аммониевых солей глицирризиновой кислоты / Е.А. Дикусар // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – С.53-56.
6. Василенко, Ю.К. Сравнительное исследование гипополипидимических свойств тритерпеноидов / Ю.К. Василенко, В.Д. Пономарев, Э.Т. Оганесян // Химико-фармацевтический журнал. – 1981. – № 5. – С. 50-53.
7. Дроговоз, С.М. Влияние полифенольных комплексов из растений на течение экспериментального гепатита / С.М. Дроговоз, С.М. Николаев // Фармация. – 1983. – № 4. – С. 74-75.
8. Идентификация и количественное определение тритерпеновых сапонинов в соплодиях и листьях ольхи различных видов / Г. В. Нестеров, Т. М. Литвинова, В. Н. Матвеев, Н.В. Нестерова, Ф.Ш. Сулейманова // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2022. – Т. 63. – № 1. – С. 76-82.

9. Изучение состава растительного лекарственного сбора методом газожидкостной хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием / А. Н. Кузьменко, Е. Б. Пашкова, А. В. Пирогов [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2010. – Т. 51. – № 2. – С. 132-138.
10. Изучение качественного состава извлечений из листьев ольхи *Alnus incana* (L.) Moench и *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова, Т.Ю. Ковалева, Н.В. Бобкова. – Текст: непосредственный // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации: сборник статей XXVII Международной научно-практической конференции. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2019. – 274 с.
11. Ковнер, С.Р. История медицины средних веков / С.Р. Ковнер // 1883. – С. 50-55.
12. Комаров, В.Л. Флора СССР. В 30-ти томах, т.5 / В.Л. Комаров; – Москва : Издательство АН СССР, 1936. – С. 306-319.
13. Компендиум – лекарственные препараты (2017) Альтабор (Altabor). – URL : [https://compendium.com.ua/info/172719/al\\_tabor/](https://compendium.com.ua/info/172719/al_tabor/).
14. Кузнецов, В.В. Пролин при стрессе: Биологическая роль, метаболизм, регуляция / В.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.
15. Кузьменко, А.Н. Алгоритм выбора веществ-маркеров при газохроматографическом анализе лекарственного растительного сырья / А. Н. Кузьменко, И. И. Краснюк Мл., А. В. Пирогов // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2014. – Т. 55. – № 4. – С. 214-218.
16. Кузьменко, А.Н. Изучение компонентного состава растительного лекарственного сбора / А. Н. Кузьменко // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2009. – Т. 50. – № 3. – С. 212-216.
17. Кузьменко, А. Н. Определение карбоновых кислот в лекарственных растениях методом ион-эксклюзионной хроматографии / А. Н. Кузьменко, В. А. Попков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – № 4. – С. 8-10.

18. Кузьменко, А.Н. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных сборов хроматографическими методами / А.Н. Кузьменко, В.Ю. Решетняк. – Москва: Изд. Московского Университета, 2010. – 99 с.
19. Куркин, В. А. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации / В. А. Куркин, И. К. Петрухина, А. С. Акушская // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 8-4. – С. 898-902.
20. Кушнер, М.А. Разработка подходов к комплексной переработке и утилизации коры ольхи / М.А. Кушнер, Т.С. Селивестрова // *Химия растительного сырья*. – 2020. – № 3. – С. 171-178.
21. Марахова, А.И. Исследования по определению содержания суммы органических кислот в настоях из лекарственного растительного сырья // *Фармация в XXI веке : эстафета поколений* / А.И. Марахова, А.В. Кузнецов, Н.Н. Федоровский. – Тезисы докладов межвузовской конференции. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 33.
22. Методологические подходы к использованию спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, Т.А. Скалозубова, А.С. Аврач, А.А. Сорокина, Е.В. Сергунова // *Journal of Siberian Medical Sciences*. – 2011. – № 5. – С. 34-41.
23. Моисеев, Д.В. Антимикробная активность растительного сырья, содержащего фенольные соединения, в зависимости от типа упаковки и температурных режимов хранения. Технология получения лекарств / Д.В. Моисеев // *Вестник ВГМУ*. – 2014. – Т. 13. – №5. – С. 129-132.
24. Моисеев, Д.В. Изменение содержания фенольных соединений в листьях ольхи черной под действием различных факторов / Д.В. Моисеев // *Химия растительного сырья*. – 2015. – № 3. – С. 91-96.
25. Моисеев, Д.В. Противовоспалительная активность растительного сырья при различных условиях хранения. Тезисы докладов IV научно- практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья

- природного происхождения в медицине» / Д.В. Моисеев // Электронное приложение к журналу «Сеченовский вестник». – 2016. – №2 (24). – С. 13-15.
26. Мушкина, О.В. Влияние экстрактов из листьев ольхи серой и ольхи черной на биохимические показатели крови при генерализованном воспалении / О.В. Мушкина, С.А. Гурин // Веснік віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта. – 2010. – № 5 (59). – С. 45-48.
27. Мушкина, О.В. Стандартизация листьев ольхи серой и листьев ольхи черной / О.В. Мушкина // Вестник ВГМУ. – 2008. – Т. 7. – № 2. – С.1-10.
28. Нестеров, Г.В. Анализ полисахаридов ольхи видов *Alnus incana* Moench и *A. glutinosa* Gaerth / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова // Наукосфера. – 2021. – №11(2). – С. 16-18.
29. Нестеров, Г. В. Влияние процесса ферментации на показатели качества листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.) Moench и *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth / Г. В. Нестеров, Т. М. Литвинова, С. В. Кондрашев // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 67-71.
30. Нестеров, Г.В. Изучение морфологических признаков листьев ольхи фармакопейных видов / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова, Л.А. Васалатий // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2021. – №7 (23). – С. 129-134. – Текст: непосредственный.
31. Нестеров, Г. В. Изучение показателей качества листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.) Moench; *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. : научный доклад об основных результатах диссертационной работы ... кандидата фармацевтических наук : 3.4.2. / Нестеров Георгий Викторович; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2022. – 29 с.
32. Нестеров, Г. В. Изучение сорбционных свойств отходов переработки плодов и листьев ольхи видов *Alnus incana*(l.) Moench *A.glutinosa* (l.) Gaerth / Г. В. Нестеров, Т. М. Литвинова // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2021. – Т. 23. – № 12. – С. 112-118.

33. Нестеров, Г.В. Использование метода тонкослойной хроматографии для определения подлинности соплодий и листьев ольхи разных видов / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова, С.В. Чернова // Наукосфера. – 2021. – № 6-1. – С. 40-43.
34. Нестеров, Г.В. Оценка влияния режима изготовления на качество водных извлечений из листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.) Moench и *A. Glutinosa* (L.) Gaerth / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2021. – №3(33). – С. 49-54. – Текст: непосредственный.
35. Нестеров, Г.В. Оценка содержания суммы полифенольных соединений в сухом экстракте листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.) *Alnus glutnosa* (L.) Gaertn / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова // Материалы международной научно-практической конференции «современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». – Ташкент, 2021. – С. 154-155.
36. Нестеров, Г.В. Сравнительная оценка товароведческих показателей листьев ольхи разных видов / Г.В. Нестеров, Т.М. Литвинова // Фармацевтическое дело и технология лекарств. – 2020. – № 6. – С. 73-78. – Текст: непосредственный.
37. Нестеров, Г.В. Сравнительный анализ некоторых показателей качества жидкого экстракта соплодий и листьев ольхи фармакопейных видов / Г.В. Нестеров // Новые проблемы медицинской науки и перспективы их решений. XVI научно-практическая конференция молодых учёных и студентов с международным участием ГОУ “ТГМУ им. Абуали ибни Сино”, посвященная 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021). – Душанбе, 2021. – С.354.
38. Нестеров, Г.В. Сравнительный анализ некоторых товароведческих характеристик и технологических параметров листьев ольхи серой и черной / Г.В. Нестеров, Н.В. Нестерова // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2021. – №2(23). – С. 69-73. – Текст: непосредственный.
39. Нестерова, Н.В. Изучение адсорбционной способности и возможности совершенствованная рецептуры коктейлей для здорового питания *Magic of life* / Н.В. Нестерова // Инновационные технологии в науке и образовании: сборник материалов VII Международной научно-практической конференции (Чебоксары,

- 24 июля 2016 г.) / редкол.: О.Н. Широков [и др.]. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2016. – С. 27-31.
40. Нестерова, Н. В. Изучение качественного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот настойки матричной гомеопатической листьев яблони лесной / Н. В. Нестерова, И. А. Самылина // Гомеопатический ежегодник - 2019 : Сборник материалов XXIX научно-практической конференции, Москва, 25–26 января 2019 года. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Техполиграфцентр", 2019. – С. 192-194.
41. Нестерова, Н.В. Изучение сорбционной способности и фитохимический анализ жомы плодов яблони лесной и домашней / Н.В. Нестерова, Е.А. Абизов // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №4. – С.40-47.
42. Нестерова, Н. В. Сравнительное изучение веществ - маркеров ацетонитриловой фракции листьев и плодов яблони лесной / Н. В. Нестерова, И. А. Самылина, В. Н. Матвеев // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т. 61. – № 1. – С. 65-71.
43. Нестерова, Н. В. Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья *Malus sylvestris* : Яблони лесной : диссертация ... кандидата фармацевтических наук : 14.04.02 / Нестерова Надежда Викторовна; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2019. – 247 с.
44. Нестерова, О.В. Количественное определение полисахаридов в траве золотарника канадского спектрофотометрическим и гравиметрическим методами / О.В. Нестерова, Ф.Ш. Сулейманова // Достижения вузовской науки 2018: сборник статей IV Международного научно-исследовательского конкурса. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2018. – С. 192-194.
45. Николаева, В.Г. Растения, применяемые народами СССР для лечения инфицированных ран / В.Г. Николаева // Фармация. – 1979. – №5. – С. 46-49.
46. Патент RU 2256463 С1 Российская Федерация, МПК А 61 К 35/78, А 61 Р 1/16. Сбор лекарственных растений для комплексной терапии заболеваний печени и

желчевыводящих путей при хронических интоксикациях, связанных с производственными (техногенными) и бытовыми токсическими воздействиями : № 2004119647/15, заявл. 28.06.2004 : опубл. 20.07.2005 / Гордеев М.В., Воронков Ю.П., Иванов А.А., Фархутдинов Р.Г. [и др.] // Patents.Google : официальный сайт. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2256463C1/ru>.

47. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций); под редакцией А.П. Шретера. – Москва : Медицина, 1985. – 328с.

48. Практикум по фармакогнозии: учебное пособие для вузов / В.Н. Ковалев, Н.В. Попова, В.С. Кисличенко [и др.] / Харьков, 2004. – 512с.

49. Разработка и валидация методики количественного определения фенолкарбоновых (гидроксикоричных) кислот в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, И.Н. Аверцева, В.Ю. Решетняк // Химическая технология. – 2019. – № 6. – С. 252-256. – DOI: 10.31044/1684-5811-2019-20-6-252-256.

50. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сборник научных трудов. – Ижевск : ООО «Принт», 2017. – Вып. 72. – 448 с. – ISBN 978-5-9631-0650-1.

51. Разработка технологии получения сухого экстракта из околоплодников *Styrax officinalis* L. методом циркуляционной экстракции / З. Хамама, А.С. Хомик, С.С. Суслина, А.А. Савосина, Д.В. Радева // Сборник научных трудов по итогам IV Международной научно-практической конференции - Актуальные проблемы и достижения в медицине. – Самара, 2017. – С. 110-113.

52. Решетников, В.И. Оценка адсорбционной способности энтеросорбентов и их лекарственных форм / В.И. Решетников // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – № 37(50). – С. 28-32.

53. Сербина, Н.А. Противоязвенная активность и некоторые стороны механизма действия фитопрепарата Альтан : автореф. дис. ...канд. биол. наук : 14.00.25 / Сербина Наталья Анатольевна ; Всероссийский научный центр по безопасности биол. актив. веществ. – Купавна, 2004. – 22 с.

54. Сергунова, Е. В. Изучение состава биологически активных веществ лекарственного растительного сырья различных способов консервации и лекарственных препаратов на его основе : диссертация ... доктора фармацевтических наук : 14.04.02 / Сергунова Екатерина Вячеславовна; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2016. – 242 с.
55. Сергунова, Е.В. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях / Е.В. Сергунова, А.И. Марахова, А.С. Аврач // Фармация. – 2013. – № 4. – С. 8-11.
56. Современные требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения / Е.И. Саканян, Е.Л. Ковалева, Л.Н. Фролова, В.В. Шелестова // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С.170-178.
57. Сравнительный анализ химического состава растительного сырья *Iris sibirica* L. / Н.Г. Базарнова, Л.И. Тихомирова, И.И. Синицина, И.В. Афанасенкова // Химия растительного сырья. – 2017. – № 4. – С. 137-144.
58. Страйер, Л. Биохимия : в 3-х томах / Л. Страйер ; под. ред. акад. С.Е. Северина. – Москва : Мир, 1984-1985.
59. Сулейманова, Ф.Ш. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья травы золотарника канадского (*S. canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Сеченовский вестник. – 2018. – № 3 (33). – С. 64-68.
60. Темиргалиева, Э.М. Солодка в комплексной терапии аллергодерматозов / Э.М. Темиргалиева, О.А. Митковская, А.А. Толыбекова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – №3. – С.33-36.
61. Фармакопей.рф : сайт : ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-13/1/1-1/1-1-5/?vers=679>.

62. Фармакопея.рф : сайт : ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru>.
63. Фармакопея.рф : сайт : ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-5/1-5-3/opredelenie-soderzhaniya-dubilnykh-veshchestv-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennykh-rast/>.
64. Федосеева, Л.М. Изучение сапонинов в подземных органах ферулы хермонской / Л.М. Федосеева, Б. Д. Балтах // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С.181-184.
65. Федченкова, Ю.А. Антимикробная активность субстанций, полученных из сырья растений семейства Березовые / Ю.А. Федченкова, Е.М. Савинова // Annals of Mechnikov Institute. – 2016. – № 4. – С.84-87.
66. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов // 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЕОТАР-Медиа, 2013. – 528 с.
67. Хворост, О.П. Сравнительная оценка содержания дубильных веществ у *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn / О.П. Хворост // Растительные ресурсы. – 1986. – Т.22. – № 2. – С. 258-261.
68. Шилова Н.В. Влияние экстрактов ольхи клейкой на развитие перевиваемых опухолей в условиях цитостатической терапии : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.25 / Шилова Наталья Владимировна ; Научно-исследовательский институт фармакологии Томского научного центра СО РАМН. – Томск, 2005. – 24 с.
69. Вплив препарату «Альтабор» на показники імунологічного аналізу крові людини і динаміку температури тіла при дослідженні протівірусної ефективності: зб. наук. праць співробітників / В.Є. Доброва, Т.В. Саєнко, А.С. Шаламай, Т.В. Крутьських // НМАПО імені П.Л. Шупика. – 2013. – № 22(2). – С. 26–31.
70. Жалсрай, Алдармаа. Исследование нейропротективных свойств извлечений из лекарственных растений при моделях заболеваний центральной нервной системы: дис.д. биолог. наук : 14.03.06/ Алдармаа Жалсрай; ФГБНУ «Томский

национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наукю – 2019. – 312 с.

71. Зузук, Б.М. Вільха сіра, вільха біла *Alnus incana* (L.) Moench Аналітичний огляд / Б.М. Зузук // Провизор . – 2017. – № 9. – С. 37-41.

72. Крутських, Т.В. Теоретичне та експериментальне обґрунтування складу та технології лікарських засобів на основі субстанції «Альтабор»: диссертация ... докт. фарм. наук / Крутських Тетяна; Національний фармацевтичний університет. – Львів, 2016. – 442 с.

73. Попова, О.І. Клінічна ефективність альтабору в комплексному лікуванні герпетичної інфекції порожнини рота / О.І. Попова // Украинский медицинский альманах. – 2013. – № 16(1). – С. 154–156.

74. Рыбалко, С. Вивчення антивірусної активності препарату Альтабор на експериментальній моделі інфекції, спричиненої вірусом гепатиту С, в культурі клітин / С. Рыбалко // Вісн. фармак. фармац.: інф.-аналіт. журн. – 2010. – № 3. – С. 29-36.

75. A comprehensive investigation of anti-inflammatory diarylheptanoids from the leaves of *Alnus formosana* / Y.C. Lai, C.K. Chen, W.W. Lin, S.S. Lee // *Phytochemistry*. – 2012. – № 73. – P. 84-94.

76.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity by cyclic diarylheptanoids from *Alnus sieboldiana* / K. Chiba, H. Ichizawa, S. Kawai, T. Nishida // *J. Wood Chem. Technol.* – 2013. – № 33. – P. 44-51.

77. A new diarylheptanoid and a rare dammarane triterpenoid from *Alnus nepalensis*. / M.G. Phan, T.T.C. Truong, T.S. Phan, K. Matsunami, K. Otsuka // *Chem. Nat. Comp.* – 2011. – № 47. – P. 735-737.

78. A new diarylheptanoid derivative from *Alnus japonica* / S.R.M. Ibrahim, M.A. Fouad, A. Abdel-Lateff [et al.] // *Nat. Prod. Res.* – 2014. – № 28. – P. 1765-1771.

79. A new diarylheptanoid from the bark of *Alnus japonica* / N.H. Tunga, J.C. Ra, D.H. Sohnc, Y.H. Kima // *J. Asian Nat. Prod. Res.* – 2010. – № 12. – P. 921–924.

80. A new diarylheptanoid glycoside from the stem bark of *Alnus hirsuta* and protective effects of diarylheptanoid derivatives in human HepG2 cells / D. Park, H.J. Kim, S.Y. Jung [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 2010. – № 58. – P. 238-241.
81. Acero, N. Effect on tumor necrosis factor- production and antioxidant ability of black alder, as factors related to its anti-inflammatory properties / N. Acero, D.M. Mingarro // *J. Med. Food.* – 2012. – № 15. – P. 542–548.
82. Aldulaimi, O.A. General Overview of Phenolics from Plant to Laboratory, Good Antibacterials or Not / O.A. Aldulaimi // *Pharmacogn Rev.* – 2017. – № 11(22). – P. 123-127. – Doi: 10.4103/phrev.phrev\_43\_16.
83. Alnusins A and B from the leaves of *Alnus sieboldiana* / M. Ishimatsu, T. Tanaka, G.I. Nonaka, I. Nishioka // *Phytochemistry.* – 1989. – № 28. – P. 3179–3184.
84. Analysis of chemical components from ethy acetate layer of *Alnus nepalensis* D. Don / Z. Chen, L.J. Li, J.G. Zhang, [et al.] // *Yunnan Chem. Tech.* – 2011. – № 38. – P. 14-17.
85. Anti-adipogenic activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* bark extracts, Part I: Sites and mechanisms of action / L.C. Martineau, J. Hervé, A. Muhammad [et al.] // *Planta Med.* – 2010. – № 76. – P. 1439-1446.
86. Anti-adipogenic activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* bark extracts, Part II: bioassay-guided identification of actives salicortin and oregonin / L.C. Martineau, A. Muhammad, A. Saleem [et al.] // *Planta Med.* – 2010. – № 76. – P. 1519-1524.
87. Anti-adipogenic diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* f. *sibirica* on 3T3-L1 cells / M. Lee, J.Y. Song, Y.W. Chin, S.H. Sung // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – № 23. – P. 2069-2073.
88. Antibacterial activity of bark of *Alnus pendula* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J.G. Choi, M.W. Lee, S.E. Choi [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol.* – 2012. – № 16. – P. 853-859.
89. Anti-inflammatory activities, triterpenoids, and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *argute* / M.I. Aguilar, R. Rovelo, J.G. Verjan [et al.] // *Pharm. Biol.* – 2011. – № 49. – P.1052–1057.

90. Anti-influenza diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica*. / N.H. Tung, N.J. Kwon, J.H. Kim [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – № 10. – P. 1000–1003.
91. Antifibrotic constituents of *Alnus firma* on hepatic stellate cells / M. Lee, M.K. Lee, Y.C. Kim, S.H. Sung // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – № 21. – P. 2906-2910.
92. Antifilarial diarylheptanoids from *Alnus nepalensis* leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India / D. Yadav, S.C. Singh, R.K. Verma [et al.] // *Phytomedicine.* – 2013. – № 20. – P. 124-132.
93. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Alnus rugosa* L. aerial parts and identification of the bioactive components / K. Rashed, A. C' iric', J. Glamoc'lija [et al.] // *Ind. Crop. Prod.* – 2014. – № 59. – P. 189-196.
94. Antioxidant effects of diarylheptanoid derivatives from *Alnus japonica* on human LDL oxidation / W.S. Lee, J.Y. Kim, K.R. Im, K.H. Cho [et al.] // *Planta Med.* – 2005. – № 71. – P. 295-299.
95. Antioxidative activity of diarylheptanoids from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) and their interaction with anticancer drugs / J. Dini'c, M. Novakovi'c, A. Podolski-Reni'c,; S. Stojkovi'c [et al.] // *Planta Med.* – 2014. – № 80. – P. 1088–1096.
96. Antioxidative and hepatoprotective diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica* / N.H. Tung, S.K. Kim, G.C. Ra [et al.] // *Planta Med.* – 2010. – № 76. – P. 626-629.
97. Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in *Lagerstroemia speciosa* leaves toward human rhinoviruses / S.W. Park, M.J. Kwon, J.Y. Yoo [et al.] // *BMC Complement. Altern. Med.* – 2014. – № 14. – P. 171.
98. Aoki, T. Triterpenoids, diarylheptanoids and their glycosides in the flowers of *Alnus* species / T. Aoki, S. Ohta, T. Suga // *Phytochemistry.* – 1990. – № 11. – P. 3611–3614.
99. Atopic dermatitis-like skin lesions reduced by topical application and intraperitoneal injection of hirsutenone in NC/Nga mice / M.S. Jeong, S.E. Choi, J.Y. Kim, J.S. Kim [et al.] // *Clin. Dev. Immunol.* – 2010. – № 2010. – P. 618517.
100. Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by centrifugal partition chromatography /

A. Abedini, S. Chollet, A. Angelis [et al.] // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2016. – № 1029-1030. – P. 121-127.

101. Bioactivity of hirsutanolol, oregonin and genkwanin isolated from the seeds of *Alnus gultinosa* (Betulaceae) / Y. Kumarasamy, P.J. Cox, M. Jaspars, L. Nahar, S.D. Sarker // *Nat. Prod. Commun.* – 2006. – № 1. – P. 641-644.

102. C31-secodammarane-type triterpenoid saponins from the flowers of *Alnus pendula* / T. Suga, T. Aoki, Y. Kawad, S. Ohta, E. Ohta // *Phytochemistry.* – 1984. – № 23. – P. 1297-1299.

103. Chemical constituents from *Alnus formosana* burk. II. Polar constituents from the leaves / S.S. Lee, S.C. Chen, C.K. Chen [et al.] // *Nat. Prod. Commun.* – 2006. – № 1. – P. 461-464.

104. Chemical constituents of *Alnus firma* and their inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia / M.A. Lee, H.K. Lee, S.H. Kim [et al.] // *Planta Med.* – 2010. – № 76. – P. 1007–1010.

105. Chemo-protective and regenerative effects of diarylheptanoids from the bark of black alder (*Alnus glutinosa*) in human normal keratinocytes / J. Dinić, T. Ranelović, T. Stanković, M. Dragoj [et al.] // *Fitoterapia.* – 2015. – № 105. – P. 169-176.

106. Chen, J. *Diarylheptanoid Glycosides from Red Alder Bark* / J. Chen ; Oregon State University, 1996. – 111 p.

107. Chen, J. Phenolic diarylheptanones from *Alnus rubra* bark / J. Chen, J.J. Karchesy R.F. González-Laredo // *Planta Med.* – 1998. – № 64. – P. 74–75.

108. Chena, J. Minor diarylheptanoid glycosides of *Alnus rubra* bark / J. Chena, R.F. González-Laredo, J.J. Karchesy // *Phytochemistry.* – 2000. – № 53. – P. 971–973.

109. Cho, K.J. *Method of Making Health Drink for Reducing Hangover Using Alnus japonica Extract and Green Tea Leaf Extract* / K.J. Cho // Korea Patent KR 2006023093, 13 March 2006.

110. Cytotoxic activities of diarylheptanoids from *Alnus japonica* / S.E. Choi, K.H. Kim, J.H. Kwon [et al.] // *Arch. Pharm. Res.* – 2018. – № 31. – P. 1287-1289.

111. Cytotoxic activity of hirsutanone, a diarylheptanoid isolated from *Alnus glutinosa* leaves / A.J. León-Gonzalez, N. Acero, D. Muñoz-Mingarro [et al.] // *Phytomedicine*. – 2014. – № 21. – P. 866-870.
112. Diarylheptanoid hirsutenon prevents tumor necrosis factor--stimulated production of inflammatory mediators in human keratinocytes through NF- $\kappa$ B inhibition / S.C. Lee, H.H. Ko, S.J. Seo [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2009. – № 9. – P. 1097-1104.
113. Diarylheptanoids, flavonoids, stilbenoids, sesquiterpenoids and a phenanthrene from *Alnus maximowiczii* / M. Tori, A. Hashimoto, K. Hirose, Y. Asakawa // *Phytochemistry*. – 1995. – № 40. – P. 1263-1264.
114. Diarylheptanoids from *Alnus glutinosa* bark and their chemoprotective effect on human lymphocytes DNA / M. Novaković, M. Stanković, I. Vučković, N. Todorović [et al.] // *Planta Med.* – 2013. – № 79. – P. 499-505.
115. Diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit the NF- $\kappa$ B activation and NO and TNF-production / W.Y. Jin, X.F. Cai, M.K. Na [et al.] // *Biol. Pharm. Bul.* – 2007. – № 30. – P. 810-813.
116. Diarylheptanoids from *Alnus japonica* inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndromecoronavirus / J.Y. Park, H.J. Jeong, J.H. Kim, [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2012. – № 35. – P. 2036-2042.
117. Diarylheptanoids from *Alnus nepalensis* attenuates LPS-induced inflammation in macrophages and endotoxic shock in mice / A. Saxena, D. Yadav, A.K. Maurya [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2016. – № 30. – P. 129–136.
118. Diarylheptanoids from green alder bark and their potential for DNA protection / M. Novakovic, M. Stancovic, I. Vucovic [et al.] // *Chem.Biodivers.* – 2014. – № 11. – P. 872-885.
119. Diarylheptanoids from the bark of *Alnus pendula* Matsumura / S.E. Choi, K.H. Park, M.H. Kim [et al.] // *Nat. Prod. Sci.* – 2012. – № 18. – P. 106-110.
120. Diarylheptanoids from the bark of black alder inhibit the growth of sensitive and multi-drug resistant non-small cell lung carcinoma cells / M. Novaković, M. Pešić, S. Trifunović [et al.] // *Phytochemistry*. – 2014. – № 97. – P. 46-54.

121. Diarylheptanoids with in vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hisuta* / M.W. Lee, N.Y. Kim, M.S. Park [et al.] // *Planta Med.* – 2000. – № 66(6). – P. 551-553.
122. Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica* / M.W. Lee, T. Tanaka, G.I. Nonaka, I. Nishioka // *Phytochemistry*. – 1992. – № 31. – P. 2835-2839.
123. Effect of *Alnus japonica* extract on a model of atopic dermatitis in NC/Nga mice / S.E. Choi, K.H. Park, M.S. Jeong [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2011. – № 136. – P. 406-413.
124. Effect of Tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* on the ERK and PI3K pathways in C6 glioma cells / X.Z. Dong, C.L. Huang, B.Y. Yu, Y. Hu [et al.] // *Phytomedicine*. – 2014. – № 21. – P. 1178–1188.
125. Effect of topical application and intraperitoneal injection of oregonin on atopic dermatitis in NC/Nga mice / S.E. Choi, M.S. Jeong, M.J. Kang [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2010. – № 19. – P. 37-43.
126. Effects of diarylheptanoids on the tumor necrosis factor-induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells / J.M. Han, W.S. Lee, J.R. Kim, J. Son [et al.] // *J Agric Food Chem.* – 2007. – № 55(23). – P. 9457-9464. – Doi: 10.1021/jf072157h.
127. Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes / Y.B. Yu, H. Miyashiro, N. Nakamura [et al.] // *Arch. Pharm. Res.* – 2007. – № 30. – P. 820-826.
128. Ellagic acid: biological properties and biotechnological development for production processes / L. Sepúlveda, A. Ascacio, R. Rodríguez-Herrera [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* – 2011. – № 10(22).
129. Elucidation of antioxidant properties of wood bark derived saturated diarylheptanoides : a comprehensive (DFT-supported) understanding / J. Ponomarenko, P. Trouillas, N. Martin [et al.] // *Phytochemistry*. – 2014. – № 103. – P. 178-187.
130. Facilitated skin permeation of oregonin by elastic liposomal formulations and suppression of atopic dermatitis in NC/Nga mice / M.J. Kang, J.Y. Eum, M.S. Jeong, [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2010. – № 33. – P. 100-106.

131. Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Available online. – URL : <http://frps.eflora.cn/frps/Alnus> (accessed on 23 June 2011).
132. Fujinori, H. Flavones from *Alnus rubra* Bong. seed coat / H. Fujinori, T.G.H. Neil // Bull. FFPRI . – 2003. – № 2. – P. 85–91.
133. Glucosidase inhibition activity by cyclic diarylheptanoids from *Alnus sieboldiana* / K. Chiba, H. Ichizawa, S. Kawai, T. Nishida // J. Wood Chem. Technol. – 2013. – № 33. – P. 44-51.
134. Glutinoin, a novel antioxidative ellagitannin from *Alnus glutinosa* cones with glutinoic acid dilactone moiety / S.A. Ivanova, K. Nomura, I.L. Malfanova, L.R. Ptitsyn // Nat. Prod. Res. – 2012. – № 26. – P. 1806-1816.
135. Hashimoto, T. Five new diarylheptanoids from the male flowers of *Alnus sieboldiana* / T. Hashimoto, M. Tori, Y. Asakawa // Chem. Pharm. Bull. – 1986. – № 34. – P.1846-1849.
136. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Alnus japonica* extracts on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats / T.K. Sang, D.K. Jung, S.H. Ahn [et al.] // Phytother Res. – 2004. – № 18. – P. 971–975.
137. Hu, W.C. Antioxidative activity and anti-inflammatory effects of diarylheptanoids isolated from *Alnus hirsuta* / W.C. Hu, M.H. Wang // J. Wood Sci. – 2011. – № 57. – P. 323-330.
138. Hu, W.C. Diarylheptanoid from *Alnus hirsuta* improves glucose metabolism via insulin signal transduction in human hepatocarcinoma (HepG2) cells. / W.C. Hu, M.H. Wang // Biotechnol. Bioproc. Eng. – 2011. – № 16. – P. 120-126.
139. In vitro synergistic potentials of novel antibacterial combination therapies against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / M.A. Hossain, H.C. Park, K.J. Lee, S.W. Park [et al.] // BMC Microbiol. – 2020. – № 20(1). – P.118. – Doi: 10.1186/s12866-020-01810-x.
140. Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by betulinic acid from *Alnus hirsuta* / M.Y. Chung, M.C. Rho, Lee, S.W. [et al.] // Planta Med. – 2006. – № 72. – P. 267-269.
141. Ko, E.K. Oregonin from the stems and leaves of Korean *Alnus* species (Betulaceae) / E.K. Ko, H. Choi // J. Chem. Pharm. Res. – 2015. – № 7. – P. 234-238.

142. Kotlov, I. Modeling of Forest Communities Spatial Structure at the Regional Level through Remote Sensing and Field Sampling: Constraints and solutions / I. Kotlov, T. Chernenkova // *Forests*. – 2020. – № 11(10). – P. 1088. – Doi: 10.3390/f11101088.
143. Kristich, C.J. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance / C.J. Kristich, L.B. Rice, C.A. Arias // 2014 Feb 6. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. – PMID: 24649502.
144. Lee, M.W. Diarylheptanoids with in vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory activity from *Alnus hirsute* / M.W. Lee, N.Y. Kim, M.S. Park // *Planta Med*. – 2000. – № 66(6). – P. 551-553.
145. Lipińska, L. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review / L. Lipińska, E. Klewicka, M. Sójka // *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. – 2014. – № 13(3). – P. 289-299.
146. Lv, H. Naturally occurring diarylheptanoids / H. Lv, G. She // *Rec. Nat. Prod*. – 2012. – № 6. – P. 321-333.
147. Mangiferonic acid, 22-hydroxyhopan-3-one, and physcion as specific chemical markers for *Alnus nepalensis* / M.J. Phan, T.S. Phan, T.T.C. Truong [et al.] // *Biochem. Syst. Ecol*. – 2010. – № 38. – P. 1065-1068.
148. Melanogenesis inhibitory activities of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* Turcz in B16 mouse melanoma cell / S.M. Cho, Y.M. Kwon, S.M. Cho [et al.] // *Arch. Pharm. Res*. – 2002. – № 25. – P. 885-888.
149. New diarylheptanoid from the barks of *Alnus japonica* Steudel / H.J. Kim, K.H. Kim, S.H. Yeom, M.K. Kim [et al.] // *Chin. Chem. Lett*. – 2005. – № 16. – P. 1337-1340.
150. New diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their antioxidative activity. / M. Kuroyanagl, M. Shimomae, Y. Nagashima [et al.] // *Chem. Pharm. Bull*. – 2005. – 53. – P. 1519-1523.
151. Nonphenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*: a novel type of topical anti-inflammatory agents: structure-activity relationship / P. Claeson, U. Pongprayoon, T. Sematong [et al.] // *Planta Med*. – 1996. – № 62(3). – P. 236-240.

152. Ohmoto, T. Constituents of Pollen. IX. Pollen of *Alnus sieboldiana* Matsum / T. Ohmoto, T. Nikaido // *Shoyakugaku Zasshi*. – 1980. – № 34. – P. 316-320.
153. Oregonin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS gene transcription and upregulates HO-1 expression in macrophages and microglia / C.J. Lee, S.S. Lee, S.C. Chen, F.M. Ho [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – № 146. – P. 378-388.
154. Oregonin reduces lipid accumulation and proinflammatory responses in primary human macrophages / A. Lundqvist, L.U. Magnusson, C. Ullstrom, J. Krasilnikova [et al.] // *Biochem. Bioph. Res. Commun.* – 2015. – № 458. – P. 693-699.
155. Phytochemical, antioxidant and hepatoprotective effects of *Alnus nitida* bark in carbon tetrachloride challenged Sprague Dawley rats / M. Sajid, M.R. Khan, N.A. Shah [et al.] // *BMC Complem. Altern. Med.* – 2016. – № 16. – P. 268.
156. Plattner, R. Detection of brassinolide and castasterone in *Alnus glutinosa* (European Alder) pollen by mass spectrometry/mass spectrometry / R. Plattner, S.L. Taylo, M.D. Grove // *J. Nat. Prod.* – 1986. – № 49. – P. 540-545.
157. Preparative isolation and purification of antioxidative diarylheptanoid derivatives from *Alnus japonica* by high-speed counter-current chromatography / S.S. Lim, M.Y. Lee, H.R. Ahn [et al.] // *J. Sep. Sci.* – 2011. – № 34. – P. 3344-3352.
158. Ra, J.C. Antioxidative and Hepatoprotective Compositions Containing Diarylheptanoids from *Alnus japonica* / J.C. Ra, Y.H. Kim, D.H. Sohn // U.S. Patent 2011/0144039 A1, 16 June 2011.
159. Rao, A.V. Dietary saponins and human health / A.V. Rao // *Saponins in food, feedstuffs and medical plants: Proceeding of the Phytochemical Society of Europe* ; Kluwer Academic Publishers, 2000. – Vol.45. – P. 255-270.
160. Saponins: Properties, Applications and Processing / Ozlem Guclu-Ustundag and Giuseppe Mazza // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2007. – № 47(3). – P. 231-258.
161. Sati, S.C. Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus* / S.C. Sati, N. Sati, O.P. Sati // *Phcog. Rev.* – 2011. – № 5. – P. 174-183.
162. Septama, A.W. Synergistic effect of artocarpin on antibacterial activity of some antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

and *Escherichia coli* / A.W. Septama, P. Panichayupakaranant // *Pharm Biol.* – 2016. – № 54(4). – P. 686-691. – Doi: 10.3109/13880209.2015.1072566.

163. Sprag, S.G. Biological activities and distribution of plant saponins / S.G. Sprag, M.E. Light, J. van Staden // *J.Ethnopharmacol.* – 2004. – Vol. 94. – № 2-3. – P. 219-243.

164. Structural differences in diarylheptanoids analogues from *Alnus viridis* and *Alnus glutinosa* influence their activity and selectivity towards cancer cells / J. Dinić, M. Novaković, A.P. Renić, V. Vajs [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2016. – № 249. – P. 36-45.

165. Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees / G. Telysheva, T. Dizhbite, O. Bikovens [et al.] // *Holzforschung.* 2011. – № 65. – P. 623-629.

166. Structure of alnusiin and bicornin, new hydrolyzable tannins, having a monolactonized tergalloyl group / T. Yoshida, K. Yazaki, M.U. Memon [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 1989. – № 37. – P. 2655-2660.

167. Study on antidepressant components of sucrose ester from *Polygala tenuifolia* / H.H. Tu, P. Liu, L. Ma [et al.] // *Chin. J. Chin. Mater. Med.* – 2008. – № 33. – P. 1278-1280.

168. Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn / A. Felföldi-Gáva, S. Szarka, B. Simándi [et al.] // *J. Supercrit. Fluids.* – 2012. – № 61. – P.55-61.

169. Synergism of the Combination of Traditional Antibiotics and Novel Phenolic Compounds against *Escherichia coli* / M.A. Hossain, H.C. Park, S.W. Park, S.C. Park [et al.] // *Pathogens.* – 2020. – № 9(10). – P. 811. – Doi: 10.3390/pathogens9100811.

170. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / L. Sanhueza, R. Melo, R. Montero [et al.] // *PLoS One.* – 2017. № 12(2). – P. e0172273. – Doi: 10.1371/journal.pone.0172273.

171. Suga, T. New C31-secodammarane-type triterpenoids, alnuseric acid and alnuseride, in the male flowers of *Alnus serrulata* / T. Suga, T. Hirata // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1979. – № 52. – P. 1153-1155.

172. Takashi, S. Diarylheptanoids of *Alnus hirsuta* Turcz. (Betulaceae) / S. Takashi // Research Bulletins of the College Experiment Forests Hokkaido University: Hokkaido, Japan, 1985. – Vol. 42. – P. 191-205.
173. The diarylheptanoid hirsutenone sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin via modulation of apoptosis-inducing factor and X-linked inhibitor of apoptosis / L. Farrand, J.Y. Kim, B.S. Byun, A. Im-aram [et al.] // J. Biol. Chem. –2014. – № 289. – P. 1723-1731.
174. The Genus *Alnus*, A Comprehensive Outline of Its Chemical Constituents and Biological Activities / Xueyang Ren, Ting He, Yanli Chang [et al.] // Molecules . –2017. – № 22. – P. 138.
175. The structures of four diarylheptanoid glycosides from the female flowers of *Alnus serrulatoidea* / S. Ohta, T. Aoki, T. Hirata, T. Suga // J. Chem. Soc. Perkin Trans. – 1984. – №M1. – P. 1635-1642.
176. Three new diarylheptanoid glycosides from *Alnus japonica* / H. Wada, H. Tachibana, H. Fuchino, N. Takana // Chem. Pharm. Bull. – 1998. – № 46. – P. 1054-1055.
177. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench and *Alnus viridis* (Chaix) DC. extracts / S. Dahija, J. Cakar, D. Vidic, M. Maksimovic, A. Paric // Nat. Prod. Res. – 2014. – № 28. – P. 2317-2320.
178. Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells / W.Y. Jin, X.F. Cai, M.K. Na [et al.] // Arch. Pharm. Res. – 2017. – № 30. – P. 412-418.
179. Triterpenoids and other constituents from the far-Eastern species of *Alnus* / N.I. Uvarova, G.I. Oshitok, N.I. Suprunov, G.B. Elyakov // Phytochemistry. – 1972. – № 11. – P. 741-743.
180. Two acylated diarylheptanoid glycosides from red alder bark / R.F. González-Laredo, R.F. Helm, R.F. Helm [et al.] // J. Nat. Prod. – 1998. – № 61. – P. 1292–1294.
181. Wollenweber, E. Flavonoids from *Alnus crispa*, *A. japonica*, *A. koehnei* and *A. sinuata* / E. Wollenweber // Phytochemistry. – 1974. – № 13. – P. 2318-2319.

182. Yadav, D. Simultaneous quantification of diarylheptanoids in *Alnus nepalensis* using a validated HPTLC method / D. Yadav, M.M. Gupta / J. Chromatogr. Sci. – 2013. – № 52. – P. 905-910.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Проект ФС «Ольхи листья – *Alni folia*»МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Ольхи листья – *Alni folia*

ФС - Вводится впервые

---

Собранные в период вегетации (июнь-сентябрь), высушенные листья, дикорастущих деревьев ольхи серой - *Alnus incana (L.) Moench.*, и ольхи черной - *Alnus glutinosa (L.) Gaertn.*, семейство Березовые – Betulaceae.

## ПОДЛИННОСТЬ

**Внешние признаки.** *Цельное сырье.* Листья цельные или частично-измельченные простые, черешковые, длиной от 3,5 до до 12,5 см, шириной от 2,5 до 7 см.

Яйцевидная или овальная форма с округлым или широко-клиновидным основанием и клиновидно суженной верхушкой листа (*A. incana Moench*) или широкообратнояйцевидная или почти округлая форма с клиновидным цельнокрайным основанием, и притупленной или выемчатой верхушкой (*A. glutinosa Gaerth*). Край листа остродвоякопильчатый у *A. incana Moench*, городчато-пильчатый у *A. glutinosa Gaerth*, жилкование перистое.

Цвет листьев с верхней стороны темно-зеленый, блестящий, с нижней – светло-зеленый, запах – слабый травянистый, вкус водного извлечения – слегка вяжущий.

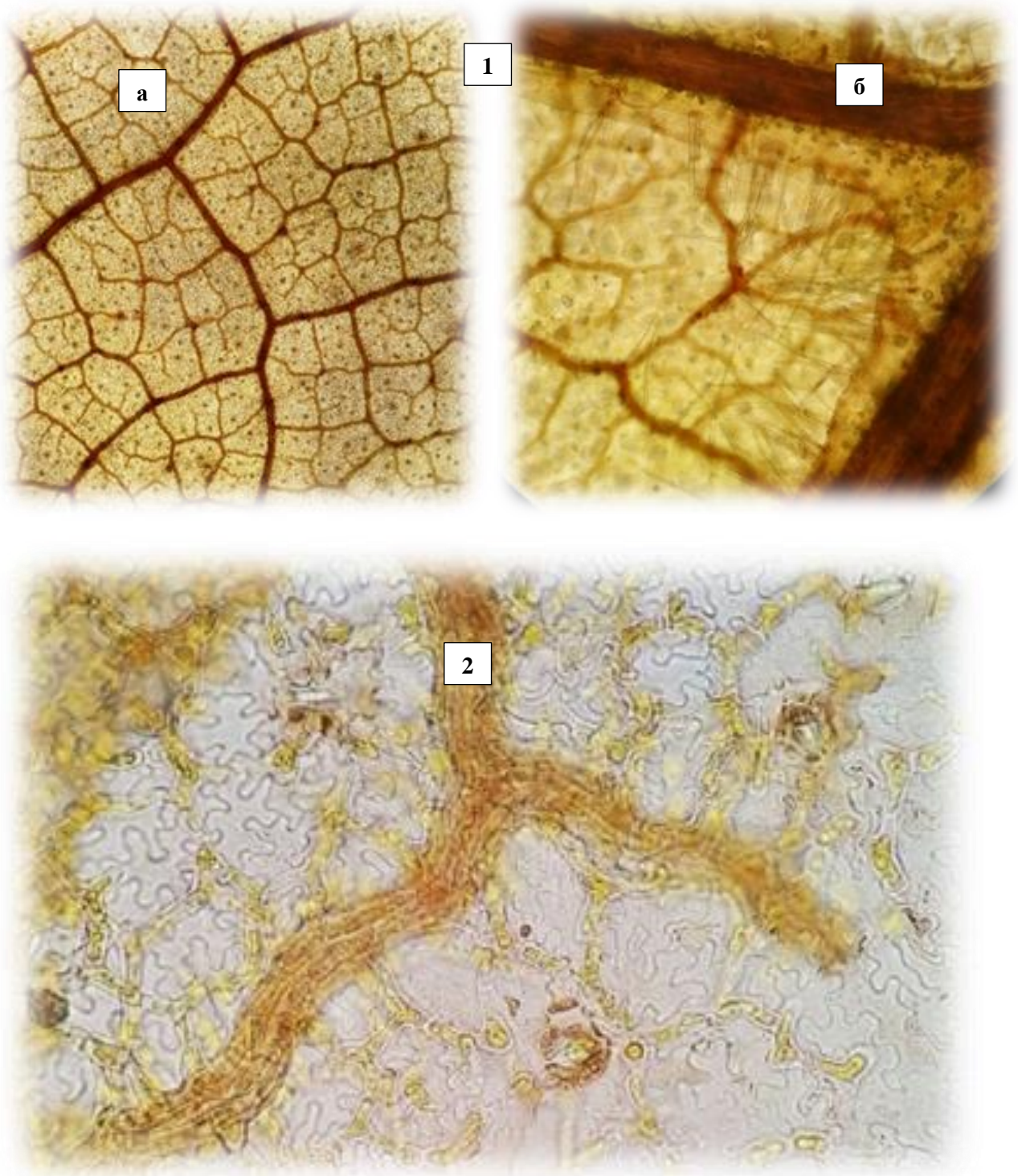
*Измельченное сырье.* Смесь кусочков листовых пластинок и черешков разной формы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм.

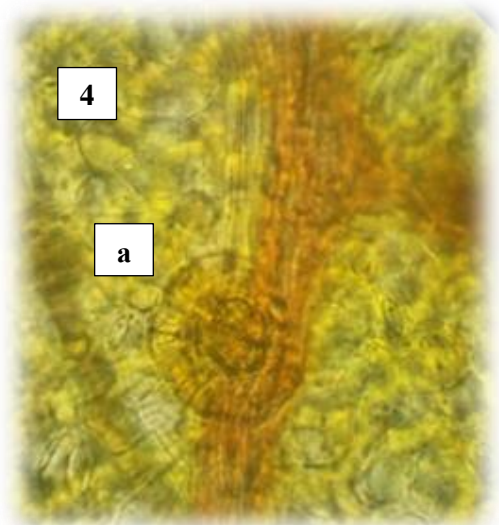
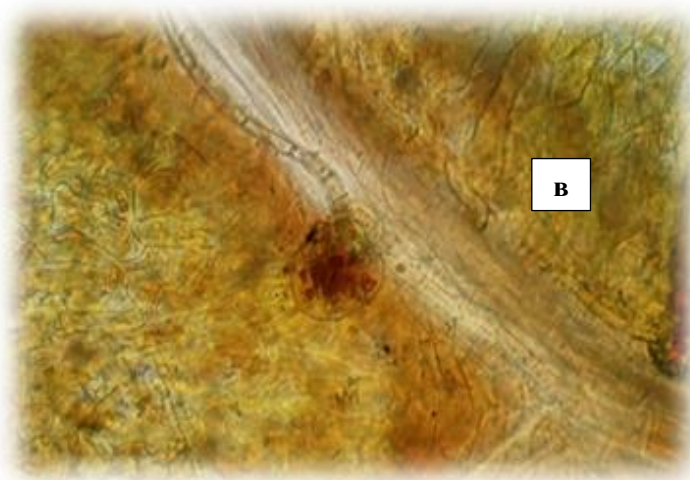
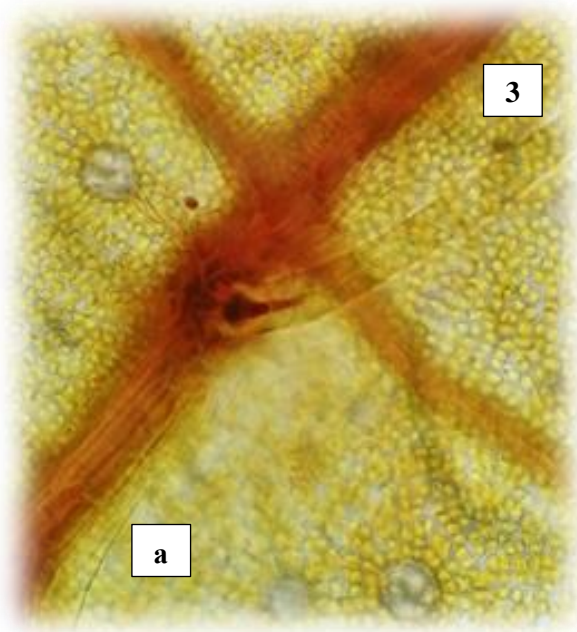
При изучении измельченного сырья под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) идентифицируются отдельные кусочки листовых пластинок темно-зеленого с блестящей поверхностью, зеленого или светло-зеленого цвета с неровной поверхностью. На отдельных кусочках выраженное, особенно по жилкам, опушением. Так же встречаются неопушенные кусочки. Встречающиеся отдельные участки края листа –остродвоякопильчатые или городчато-пильчатые. Кусочки черешков от темно-зеленого до светло-зеленого цвета. Цвет измельченного сырья от темно-зеленого до светло-зеленого. Запах слабый, травянистый, вкус вяжущий.

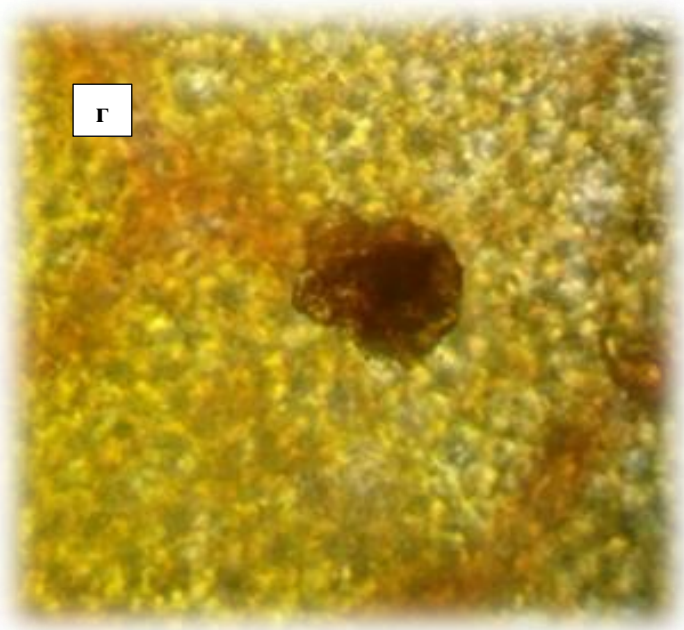
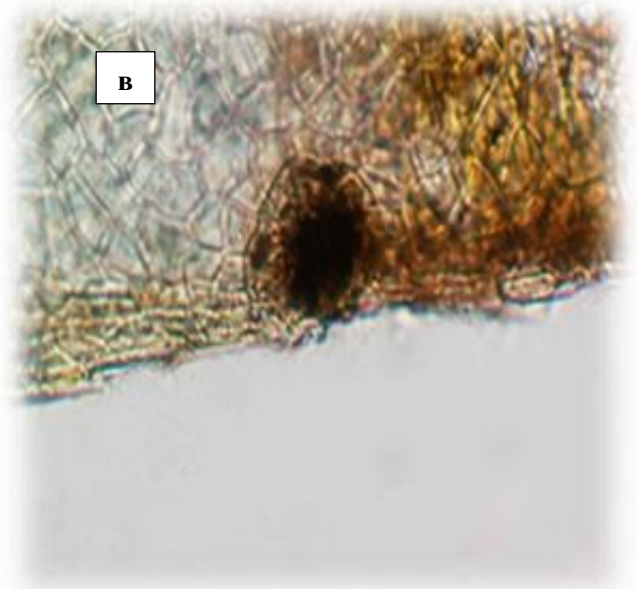
*Порошок.* Порошок листьев представляет собой кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При изучении порошка под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) идентифицируются отдельные кусочки листовых пластинок от зеленого до светло-зеленого цвета с неровной поверхностью с выраженным, особенно по жилкам, опушением. Встречающиеся отдельные участки края листа –остродвоякопильчатые. Кусочки черешков светло-зеленого цвета. Цвет порошокванного сырья от зеленого до светло-зеленого. Запах слабый, травянистый, вкус вяжущий

*Микроскопические признаки. Цельное, измельченное сырье и порошок.* Клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольные с утолщением оболочек, с нижней стороны листа- значительно мельче, извилистые. Аномоцитный устьичный комплекс, устьица овальные, окружены 4-9 клетками. Устьица чаще располагаются на нижней стороне листовой пластины. Присутствуют простые одноклеточные тонко – и толстостенные волоски. Встречаются железки с 5-клеточной головкой, заполненной темно-коричневым содержимым. Секреторные включения с бурым содержимым располагаются вдоль жилок листа, окрашивание микропрепарата раствором судана 111 приводит к развитию интенсивной красной окраски секреторного содержимого. Присутствуют множественные друзы оксалата кальция.

В измельченном и порошкованном сырье присутствуют отдельные разрозненные диагностические признаки, в своей совокупности, позволяющие идентифицировать сырье- листья ольхи без видовой принадлежности.







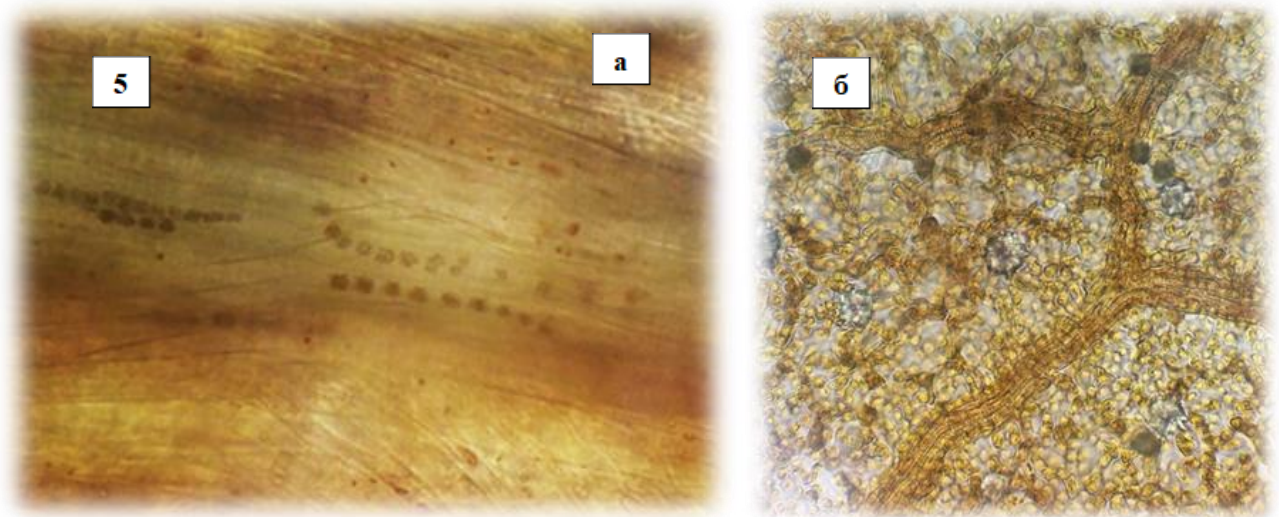


Рисунок А.1 – Ольхи листья: 1 – Фрагмент верхней стороны листа с поверхности ольхи серой: а – ув×10, б –ув×40 (б); 2 – Фрамент нижнего эпидермиса листа с поверхности устьица аномоцитного типа. ув×100; 3 – Простые волоски: а – простой толстостенный волосок на нижней стороне листа. ув×40, б – обильное опушение края листа простыми волосками у основания листовой пластины. ув×10, в – простой толстостенный волосок, вдоль жилки; 4 – Железки: а – желёзка на короткой ножке с головкой из пяти клеток, вид сверху. ув×100, б – желёзка на короткой ножке с головкой из пяти клеток с коричневым содержимым, вид сбоку. ув×100, в – желёзка с коричневым содержимым после окрашивания ЖАК ув×40, г – секреторные включения, заполненные коричневым содержимым ув×40; 5 – Друзы оксалата кальция: а – ув×40, б – ув×100

## Определение основных групп биологически активных веществ

### *Тонкослойная хроматография*

#### *Приготовление растворов.*

*Раствор СО (рутин).* Около 0,001 г рутина растворяют в 10 мл спирта 96%. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл спирта и нагревают с обратным холодильником при умеренном кипении на электроплитке с закрытой спиралью в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10×15 см наносят 6 мкл испытуемого раствора, 10 мкл раствора стандартного образца (СО) рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч смесью растворителей н-бутанол: уксусная кислота: вода (40:12:28) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80-90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться доминирующая зона адсорбции на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

К 2-3 мл фильтрата приливают 0,5 мл железа (III) аммония сульфата раствора 1%; должно появиться черно-синее окрашивание (дубильные вещества)

## ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 13%

**Зола общая.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5%

**Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте.**

*Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,3 %

**Посторонние примеси**

**Листья, изменившие окраску (пожелтевшие, потемневшие, почерневшие).** *Цельное сырье* – не более 3%

**Кусочки листьев, изменившие окраску (потемневшие, почерневшие).**

*Измельченное сырье* – не более 3%

**Органическая примесь.** *Цельное сырье* – не более 2,5 %.

**Минеральная примесь.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5%.

**Тяжелые металлы.** 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».

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

**Количественное определение.** *Цельное сырье, измельченное сырье:*

*Содержание дубильных веществ – не менее 2%*

*Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом – не менее 22%*

*Сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2 %*

*Приготовление растворов.*

Раствор СО рутин. Около 0,1 г (точная навеска) СО рутин, предварительно высушенного при температуре до 130 °С в течение 3 ч, помещают в колбу объемом 25 мл, растворяют в спирте 70 % в при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутин). Срок хранения: 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутин, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доведенного спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, перемешивают. (раствор Б СО рутин).

Пробоподготовка включала измельчение аналитической пробы сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченных листьев ольхи засыпали в коническую колбу, снабженную шлифом емкостью 250 мл, добавляли 100 мл спирта этилового 70%. Колбу аккуратно присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане в течение 90 минут, осуществляя периодическое встряхивание с целью смывания частиц сырья со стенок экстракционной колбы. По окончании времени экстракции

колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, промытый предварительно спиртом этиловым 70%. Первые 10-15 мл фильтрата отбрасывали. Из полученного таким образом извлечения аналитической пипеткой отбирали 2.0 мл испытуемого раствора и переносили в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляли 5 мл алюминия хлорида раствора алюминия хлорида 5% в этиловом спирте 70% и по истечении 10 минут вносили 1 мл этановой кислоты 3%. Объем доводили до метки спиртом этиловым 70% и оставляли на 30 минут для стабилизации образующегося комплекса. По истечении 30 минут измеряли оптическую плотность исследуемого раствора в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм.

Оценку суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин для абсолютно сухого сырья рассчитывали с учетом удельного показателя поглощения, рассчитанного для продукта реакции комплексообразования рутина с алюминия хлоридом:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A^0 \times a \times 2 \times (100 - W)}$$

Где А – значение показателя оптической плотности испытуемого извлечения;

А – значение удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, значение которого принимается за 260;

а – навеска сырья, взятого для анализа, гр.;

W – Влажность сырья, %

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** Осуществляется с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья». Упаковка. В ящики с отверстиями в боковых стенках и крышках по 0,5 кг нетто. Транспортирование. Свежесобранное сырье следует отправлять для переработки немедленно после сбора любым видом транспорта.

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