

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



Ильина Маргарита Борисовна

**Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой
(*Rubus caesius* L.)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент
Сергунова Екатерина Вячеславовна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	15
1.1. Семейство Розоцветные (<i>Rosaceae</i>).....	15
1.2. Ботаническое описание семейства	15
1.3. Род <i>Rubus</i> L.	17
1.3.1. Ботаническая характеристика рода	18
1.3.2. Характеристика некоторых видов, их использование в пищевой промышленности и медицине.....	19
1.4. Ежевика сизая (<i>Rubus caesius</i> L.).....	22
1.4.1. Распространение.....	22
1.4.2. Морфологическая характеристика	23
1.4.3. Химический состав ежевики сизой	24
1.4.4. Фармакологическая активность и применение ежевики сизой.....	29
1.5. Методы анализа биологически активных соединений в лекарственном растительном сырье.....	30
1.5.1. Химические методы анализа.....	30
1.5.2. Физико-химические методы анализа	32
1.5.3. Физические методы анализа	34
1.5.4. Биологические методы анализа	35
1.5.5. Иные перспективные методы.....	35
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	38
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1. Объект исследования	39
2.2. Макро- и микроскопический анализ	39
2.3. Качественный анализ биологически активных веществ.....	40
2.4. Количественная оценка биологически активных веществ	41
2.4.1. Аскорбиновая кислота	41

2.4.2. Дубильные вещества.....	42
2.4.3. Органические кислоты.....	42
2.4.4. Флавоноиды	42
2.4.5. Свободные сахара.....	43
2.4.6. Полисахариды.....	43
2.4.7. Анализ групп биологически активных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	43
2.4.8. Применение метода капиллярного электрофореза в анализе аминокислот и витаминов	45
2.4.9. Анализ минерального состава.....	47
2.4.10. Определение суммы экстрактивных веществ	48
2.5. Установление показателей доброкачественности	48
2.6. Изучение антирадикальной активности.....	48
2.7. Изучение противовоспалительной активности.....	49
2.8. Определение антимикробной активности	50
2.8.1. Изучение бактериостатической активности.....	50
2.8.2. Изучение фунгистатической активности.....	51
2.9. Статистическая обработка данных.....	52
2.10. Характеристика использованных в ходе исследования реактивов.....	52
ГЛАВА 3. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ ЛИСТЬЕВ	
СИЗОЙ ЛИСТЬЕВ	54
3.1. Анализ внешних признаков (макроскопический анализ)	54
3.2. Изучение анатомо-диагностических признаков	56
3.3. Обнаружение основных групп биологически активных веществ в ежевики сизой листьях.....	61
3.3.1. Качественные реакции.....	61
3.3.2. Тонкослойная хроматография.....	62
3.4. Установление содержания биологически активных веществ в ежевики сизой листьях.....	67

3.4.1. Разработка методики определения содержания суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях	67
3.4.2. Установление суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях	72
3.4.3. Анализ фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	74
3.4.4. Анализ дубильных веществ	75
3.4.5. Анализ органических кислот	76
3.4.6. Определение содержания органических кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	77
3.4.7. Анализ витаминов	79
3.4.8. Определение содержания водорастворимых витаминов и рутина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	81
3.4.9. Анализ витаминов методом капиллярного электрофореза.....	82
3.4.10. Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу	89
3.4.11. Определение содержания полисахаридов	91
3.4.12. Анализ аминокислот методом капиллярного электрофореза.....	92
3.4.13. Определение минерального состава.....	94
3.4.14. Определение суммы экстрактивных веществ	96
3.5. Определение показателей качества ежевики сизой листьев.....	96
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	99
ГЛАВА 4. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ ЛИСТЬЕВ	101
4.1. Изготовление	101
4.2. Анализ водного извлечения на основе ежевики сизой листьев	102
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	106
ГЛАВА 5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ	107
5.1. Острая токсичность	107
5.2. Антирадикальная активность	107
5.3. Противовоспалительная активность.....	109

5.4. Антимикробная активность	110
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	137
Приложение А. Проект фармакопейной статьи «Ежевики сизой листья – <i>Rubi caesii folia</i> ».....	138
Приложение Б. Инструкция по сбору и сушке ежевики сизой листьев	144
Приложение В. Акт внедрения результатов диссертации в деятельность Испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы».....	147
Приложение Г. Акт внедрения результатов диссертационной работы в научно-исследовательскую деятельность ООО “Сайнтифик Комплайнс”	148
Приложение Д. Акт внедрения основных результатов диссертации в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).	149
Приложение Е. Выписка из протокола очередного заседания Локального этического Комитета.....	150

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Поиск новых источников биологически активных веществ (далее – БАВ), их всестороннее изучение с целью дальнейшего внедрения в официальную медицину, разработка на их основе новых лекарственных растительных препаратов актуальны в условиях импортозамещения, цель которого – стабилизация экономики страны, поддержка отечественных производителей. Особый акцент делается на виды, давно используемые в народной медицине.

Одним из таких растений является ежевика сизая. Растение известно, как распространенная плодово-ягодная культура, широко культивируется, плоды ежевики нашли свое применение в пищевой промышленности. Помимо прочего, плоды и листья ежевики сизой – средство народной медицины для лечения заболеваний органов пищеварительной и дыхательной систем, в качестве потогонного, жаропонижающего и противовоспалительного средства.

Ежевика сизая (*Rubus caesius* L.) – дикорастущий кустарник семейства розоцветных (*Rosaceae*), повсеместно распространен в Северном полушарии: в Европе (за исключением крайнего Севера), Средней и Малой Азии, Северной Америке. На территории России ежевика сизая произрастает в европейской части страны, в Крыму, на Кавказе. Встречается в зарослях кустарников, по опушкам леса, в оврагах, по берегам рек, вдоль обочин дорог. Несмотря на то, что химический состав всех частей ежевики (листья, плоды, цветки стебли), ее фармакологическая активность и пищевая ценность изучались достаточно хорошо, вся имеющаяся информация не систематизирована и не нашла своего логического завершения. Сведения о растении и его сырье в зарубежных фармакопеех отсутствуют. Только в фармакопее Франции упоминается род *Rubus* без конкретизации отдельных видов.

На российском рынке представлены биологически активные добавки (далее – БАД) фирм “Хорст” (Россия), “Сила природы” (Россия), “Лекрасэт (Россия)”, “Травы Байкала” (Россия), содержащие листья или плоды ежевики сизой.

Широкий ареал произрастания ежевики сизой, ее способность образовывать крупные заросли, обеспеченность дикорастущим сырьем, а также отсутствие систематизированных данных по стандартизации листьев ежевики сизой представляют собой совокупность факторов, позволяющих проводить комплексное фармакогностическое изучение листьев ежевики сизой как перспективного лекарственного средства растительного происхождения.

Степень разработанности темы исследования

В отечественной и зарубежной научной литературе представлены некоторые результаты исследований, направленных, в основном, на изучение состава фенольных соединений (Hering A., Фицева Н.С., Касянчук Е.Ю., Магеррамова С.И и др.), антиоксидантной (Veličković I., Hering A., Grochowski D.M.) и гипогликемической (Schädler V, Дергачева Ж. М.) активности ежевики сизой листьев. Имеются данные по микроскопическому изучению листьев (Мушкина О.В., Шолтанчук О.А.). Научно-исследовательских работ с полным и детальным исследованием листьев ежевики сизой для стандартизации и внедрения в медицинскую практику не было обнаружено.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось фармакогностическое изучение и научное обоснование характеристик подлинности и показателей качества ежевики сизой листьев, как потенциального лекарственного растительного сырья.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить и проанализировать данные литературных источников по растениям рода *Rubus* и по ежевике сизой (*Rubus caesius* L.), в частности.
2. Провести углубленное морфолого-анатомическое исследование ежевики сизой листьев, выявить основные диагностические признаки и разработать критерии подлинности данного сырья.
3. Используя современные физико-химические методы изучить качественный состав БАВ ежевики сизой листьев (дубильных веществ, флавоноидов, органических кислот, витаминов, аминокислот, свободных сахаров и полисахаридов) и провести их количественную оценку.
4. Определить числовые показатели, характеризующие качество ежевики сизой листьев.
5. Изучить возможность получения из ежевики сизой листьев водного извлечения (настоя) и проанализировать его по показателям качества, регламентируемых Государственной фармакопеей Российской Федерации XV изд. (далее – ГФ РФ XV изд.).
6. Провести экспериментальное изучение фармакологической активности водного извлечения из ежевики сизой листьев.

Научная новизна

Установлены характеристики подлинности ежевики сизой листьев, позволяющие идентифицировать сырье среди листьев близкородственных видов. В ходе работы впервые в ежевики сизой листьях был установлен состав витаминов методом высокоэффективной хроматографии (далее – ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (далее – КЭ). Получены более полные данные о содержании в изучаемом сырье свободных сахаров и полисахаридов. Проведен анализ содержания органических кислот двумя методами – алкалометрия и ВЭЖХ. Изучен состав аминокислот в ежевики сизой листьях методом КЭ. Фенольный профиль сырья установлен методами ВЭЖХ, спектрофотометрии (далее – СФМ)

(флавоноидный комплекс) и титриметрией (дубильные вещества). Методом атомно-абсорбционной спектрометрии (далее – ААС) установлено содержание макро- и микроэлементов в сырье.

Была разработана и валидирована методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, методика определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза (мицелярная электроосмотическая хроматография).

Для ежевики сизой листьев, как перспективного лекарственного растительного сырья (далее – ЛРС), впервые экспериментально установлены параметры, характеризующие доброкачественность, среди которых процентное содержание влаги, золы общей и нерастворимой в кислоте хлористоводородной, измельченности, допустимых примесей. На основании полученных данных впервые разработаны проект фармакопейной статьи «Ежевики сизой листья - *Rubi caesii folia*» и проект Инструкции по сбору и сушки ежевики сизой листьев.

Впервые охарактеризовано в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд. водное извлечение, изготовленное из ежевики сизой листьев. Дана количественная оценка некоторых групп БАВ (дубильные вещества, флавоноиды, органические кислоты, витамины) в извлечении.

В ходе изучения извлечения из ежевики сизой листьев доказана антирадикальная, противовоспалительная и антимикробная активность сырья.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе проведенной работы получена новая информация о качественном составе и количественном содержании БАВ ежевики сизой листьев. В результате проведенных исследований установлены и обоснованы показатели подлинности и доброкачественности ежевики сизой листьев, доказана противовоспалительная, антирадикальная, антимикробная активности сырья. Предложены методики

анализа основных групп БАВ в новом ЛРС – ежевики сизой листья, которые включены в проект фармакопейной статьи «Ежевики сизой листья».

На основании полученных результатов разработан проект Инструкции по заготовке и сушке ежевики сизой листьев, включающий информацию об ареале произрастания и природной среде обитания растения, идентификации производящего растения среди близкородственных видов по внешним признакам, основах заготовительного процесса и сушке листьев; макроскопических и числовых показателях сырья, согласно требованиям ГФ РФ XV изд.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования включала поиск, систематизацию и анализ литературных данных, касающихся различных аспектов изученности ежевики сизой листьев. По ходу выполнения работы применялись макро- / микроскопический, химический (титриметрия) и ряд физико-химических методов анализа ЛРС (хроматография, спектрофотометрия). В рамках работы проводились также фармакологические исследования.

Статистическая обработка получаемых результатов проводилась согласно Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания.

Личный вклад автора

Роль в выборе направления исследования, в определении и постановке цели и задач, а также выборе методов исследования отводится автору работы. Автору принадлежит непосредственное участие в анализе литературных источников по выбранной теме исследования, в реализации экспериментальной части работы по морфолого-анатомическому, фитохимическому изучению, а также по установлению показателей доброкачественности ежевики сизой листьев. Автор

принимал участие в получении и анализе полученных хроматограмм (ВЭЖХ) и электрофореграмм (КЭ), в разработке и валидации методик количественного определения флавоноидов и витаминов в сырье, в установлении и анализе фармакологической активности водных извлечений из сырья. Автор лично провел статистическую обработку результатов исследования и подготовил текст научно-исследовательской работы. Диссертант также участвовал в конференциях и подготовке научных публикаций.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты установления основных диагностических признаков ежевики сизой листьев;
2. Результаты качественного анализа и количественной оценки БАВ в ежевики сизой листьях;
3. Результаты валидации разработанных методик определения суммы флавоноидов (метод спектрофотометрии) и водорастворимых витаминов (метод капиллярного электрофореза) в ежевики сизой листьях;
4. Результаты разработки показателей качества сырья и их нормы;
5. Результаты изучения антирадикальной, противовоспалительной, антимикробной активности и оценки безопасности водного извлечения ежевики сизой листьев.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, в частности пунктам 2, 3, 6 паспорта научной специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

В ходе работы было применено поверенное и сертифицированное оборудование: хроматограф ВЭЖХ, система капиллярного электрофореза, спектрофотометр и др. Проводилась валидация применяемых методик по параметрам линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность. Вышеуказанное позволило получить воспроизводимые и достоверные результаты.

Основные полученные в ходе диссертационной работы результаты были представлены на: VIII Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2022), IX Международной научная-методической конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2023), Всероссийской VIII научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, РУДН, 2023), II Научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Современные проблемы фармации» (Самара, 2023), X Международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, ВИЛАР, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (Орехово-Зуево, 2023), II Международной русско-сербской конференции молодых ученых (Москва, Крагуевац, 2024), XXV Международном Съезде ФИТОФАРМ 2024 (Санкт-Петербург, 2024), II Международной научной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии - 2024» (Москва, 2024), I Международной конференции «Инновационные лекарственные средства: от молекулы до пациента» (Москва, 2024), Всероссийской IX научно-практической конференции

«Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, РУДН, 2024).

Апробация научной работы проводилась на межкафедральной конференции Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №9 от 11 «апреля» 2025г.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования по теме диссертации автором опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в журнале, индексируемом в международной базе Scopus, 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 5 публикаций в сборниках материалов Международных и Всероссийских научных и научно-практических конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста. Текст состоит из введения, литературного обзора, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, трех глав основных результатов исследовательской работы, а также заключения, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (146 источников, 60 из которых на иностранном языке) и четырех приложений. В работе приведены 38 рисунков и 39 таблиц.

Внедрение результатов исследования

Разработанная методика количественной оценки суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях внедрена в деятельность испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы» (Акт от 06.08.2024 г.). Методика качественного и количественного определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза в ежевики сизой листьях используется для оценки качества сырья лекарственных растения в ООО «СайнтификКомплайнс» (Акт от 10.09.2024 г.). Полученные в ходе диссертационной работы результаты углубленного изучения внешнего вида и микроскопических признаков, химического состава, фармакологической активности ежевики сизой листьев внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акт № 531 от 01.11.2024 г.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационное исследование было выполнено в рамках плана научно-исследовательской работы кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме: «Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья, лекарственных сборов, лекарственных форм из сырья и разработка методов их стандартизации с учетом влияния антропогенных факторов, оценки качества и сертификации» (гос. регистрация № 01.2.006 06352).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Семейство Розоцветные (*Rosaceae*)

Розоцветные – семейство цветковых двудольных растений, включающее 91 род и 4828 известных видов и распространенное почти по всему земному шару, однако чаще встречаются в Северном полушарии (рисунок 1).

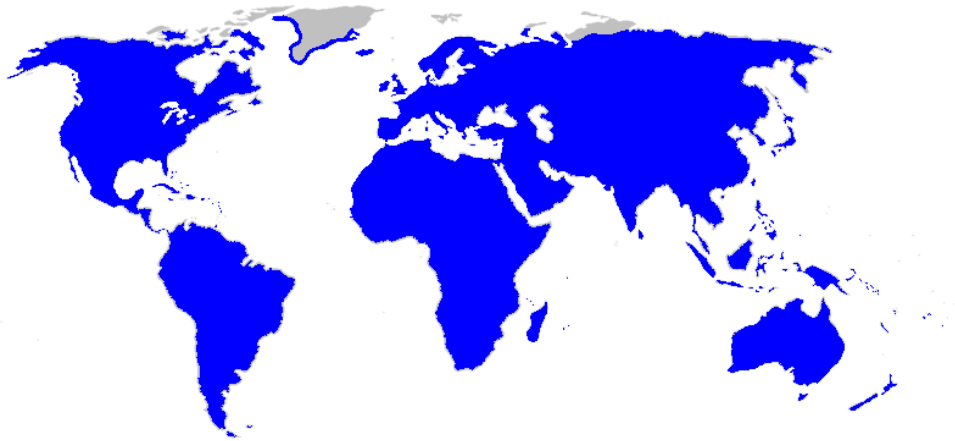


Рисунок 1 – Карта распространения розоцветных [77]

Семейство представлено различные жизненные формы: деревья, кустарники, травы многолетние и однолетние.

1.2. Ботаническое описание семейства

Листья очередные или, реже, супротивные, простые или сложные, часто имеют прилистники.

Цветки симметричные, обоеполые, состоят из чашечки и венчика (рисунок 2). Венчик 5 (реже 3–4 или более 5)-членный, белого, розового, малинового, красного, желтого цветов. Чашечка также 5-членная. Андроцей

многобратственный, состоит из свободных, расположены кругами тычинок в большом количестве или их число превышает в 2–4 раза числа лепестков. Гинецей апо- или ценокарпный. Для розоцветных характерно наличие гипантия – часть цветка, образованная в результате расширения цветоложа и срастания с ним цветочной трубки (сросшие между собой основания чашелистиков, лепестков и тычинок).

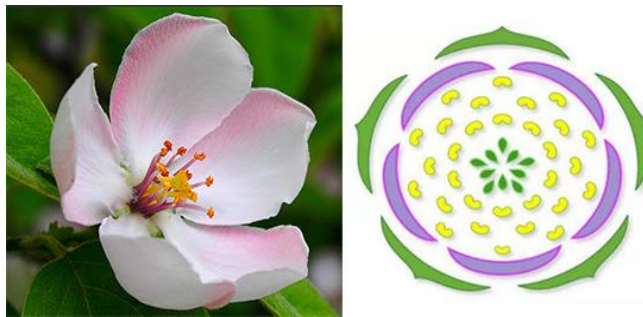


Рисунок 2 – Цветок растений семейства *Rosaceae* [65]

Среди розоцветных встречаются такие соцветия как: простой зонтик, метёлка, кисть щитков, а также одиночные цветки.

Плоды разнообразны: многолистовка, многокостянка, орешек, земляничина, однокостянка, цинародий, яблоко и т.д. Семена чаще без эндосперма, зародыш прямой.

Благодаря своему разнообразию семейство розоцветных считается экономически важным среди культурных растений, поскольку включает яблони, груши, айву, миндаль, персики, абрикосы, сливы, вишню, клубнику, ежевику, малину. Множество видов используется не только в пищевой промышленности, но также обладают фармакологической активностью и используется в медицинской практике во многих странах. 11 родов лекарственных растений, сырьё которых входит в Российскую фармакопею XIV издания относятся к семейству розоцветных, что составляет чуть более 10% от общего количества фармакопейных видов растений. В ГФ РФ XV издания вошло 53 рода ЛР, среди которых 7,5% – представители семейства розоцветных.

1.3. Род *Rubus* L.

Одним из перспективных и интересных родов семейства розоцветные является род *Rubus*, распространенный на всех континентах кроме Антарктиды и включающий в себя, согласно системе APG IV, 1803 подтвержденных видов. В роде *Rubus* выделяют следующие подроды:

- *Anoplobatus* (Focke) Focke (Малиноклен)
- *Chamaebatus* (Focke) Focke
- *Chamaemorus* (Hill) Focke (Морошка)
- *Idaeobatus* (Focke) Focke (Малина)
- *Cylactis* (Raf.) Focke
- *Dalibardastrum* Focke
- *Diemenicus* A.R.Bean
- *Lampobatus* (Focke) Focke
- *Malachobatus* (Focke) Focke
- *Micranthobatus* (Fritsch) Kalkman
- *Orobatus* (Focke) Focke
- *Comaropsis* (Focke) Focke
- *Rubus* (*Eubatus*) или ежевика

В свою очередь подрод *Rubus* делится на секции:

1. Sect. *Allegheniensis*
2. Sect. *Arguti*
3. Sect. *Caesii*
4. Sect. *Canadenses*
5. Sect. *Corylifolii*
6. Sect. *Cuneifolii*
7. Sect. *Flagellares*
8. Sect. *Hispidi*
9. Sect. *Rubus* (*Rubus fruticosus* agg.)

10. Sect. *Setosi*
11. Sect. *Ursini*
12. Sect. *Verotriviales*

1.3.1. Ботаническая характеристика рода

Растения рода *Rubus* чаще представлены кустарниками, но также встречаются и многолетние травы. Побеги могут быть прямостоячими, стелющимися или лазающими.

Листья очередные, черешковые, у большинства видов сложные, состоящие из 3–5 (редко 7) листочков. Морошка (*R.chamaemorus*), костяника хмелелистная (*R.humulifolius*), малина деликатесная (*R.deliciosus*) и некоторые другие виды имеют простые листья. Листовая пластинка листьев или отдельных свободных листочков цельная или лопастная, яйцевидная, обратнояйцевидная или эллиптическая. Жилкование преимущественно перистое, однако также встречается пальчатое. Для представителей рода характерны прилистники, форма, размер которых – один из диагностических признаков при идентификации вида. Стебли и листья покрыты множеством волосков, щетинок и шипов разных размеров и формы. Среди культивируемых видов часто встречаются также и бесшипные сорта.

Цветки актиноморфные, чаще обоеполые, одиночные или собранные в соцветия. Венчик 5 (7)-лепестный, белого, розового, в редких случаях малинового цвета. Чашечка зеленая из 5 чашелистиков. Гипантий плоский или воронковидный. Тычинки и пестики многочисленные.

Плод – пурпурная, жёлтая, сине-фиолетовая, красная или чёрная многокостянка [55,61].

1.3.2. Характеристика некоторых видов, их использование в пищевой промышленности и медицине

Род *Rubus* насчитывает сотни видов, однако наиболее известными, изученными и часто используемыми являются представители подродов *Idaeobatus* (Малина), *Eubatus* (Ежевика), *Chamaemorus* (Морошка) и в меньшей степени *Cylactis*.

1) *Idaeobatus*

Малина обыкновенная (*Rubus idaeus* L.) – дикорастущий или культивируемый кустарник до 2 м высотой с многолетним корневищем. Растение распространено повсеместно в Северном полушарии. Ценность для пищевой промышленности, косметологии и традиционной медицины имеют плоды, используемые в свежем, замороженном или высушенном виде для производства варенья, сока, кондитерских изделий. Плоды богаты сахарами, содержат витамины (А, В, С), органические кислоты, антоцианы (производные цианидина), компоненты дубильных веществ, флавоноидов, а также фенолкарбоновых кислот. Благодаря содержанию фенольных соединений малина обладает антиоксидантным, противовоспалительным действием [89]. Листья малины обыкновенной используются в народной медицине как потогонное средство.

Малина западная (*Rubus occidentalis* L.), она же малина чёрная – дикорастущий кустарник до 2–2,5 м высотой. Распространена в Северном полушарии. Встречается около водоёмов, в оврагах, на лугах, вдоль троп и дорог. Отличается от малины обыкновенной прежде всего окраской плодов (чёрной). Часто путают с ежевикой, однако в отличие от последней плоды отделяются от цветоложа, что является признаком малины. Использование малины западной более ограничено, из плодов получают сок, ликер, винную продукцию. Содержат плоды антоцианы (производных цианидина и пеларгонидина [115], а также флавонолы и органические кислоты.

2) *Cylactis*

Малина арктическая (*Rubus arcticus* L.) – княженика обыкновенная – многолетнее травянистое растение высотой до 30 см, произрастающее в умеренном и холодном поясах Северного полушария. Плоды содержат до 7% сахаров, органические кислоты (лимонная, яблочная), витамин С, дубильные вещества, эфирные масла. Потребляются в свежем и замороженном виде, а также используются при производстве соков, ликёров и варенья. В народной медицине служат в качестве вяжущего, антисептического средства [18].

Костяника каменистая (*Rubus saxatilis* L.) – травянистое многолетнее растение до 30–35 см высотой. Распространена в Северном полушарии, произрастает преимущественно в хвойных лесах. Плоды содержат сахара, пектины, антоцианы, витамин С. В листьях отмечено содержание аминокислот (L-триптофана), флавоноидов, дубильных веществ [107]. В народной медицине применяют при простуде, анемии, заболеваниях органов желудочно-кишечного тракта. В пищевой промышленности из плодов получают морсы, джемы, сироп, варенье и проч.

3) *Chamaemorus*

Морошка (*Rubus Chamaemorus* L.) – травянистое растение, произрастающее в арктической, лесной полосе Северного полушария. Встречается на болотах, среди мхов. Зачастую соседствует с брусникой, клюквой, черникой. В плодах морошки присутствуют сахара (глюкоза, фруктоза), пектиновые вещества и клетчатка [68]. Плоды также содержат бензойную кислоту и её производные. Помимо прочего в плодах морошки обнаружены витамин С и каротиноиды. Среди фенольных соединений были обнаружены эллаготанины (сангуин Н-6), кофейная кислота, проантоцианидины и ряд флавоноидов. Благодаря наличию фенольных соединений плоды проявляют антиоксидантную активность. Имеются также данные об антимикробной активности экстракта плодов и листьев морошки [4, 92].

4) *Rubus*

Подрод *Rubus* (*Eubatus*) включает в себя множество как культивируемых, так и дикорастущих видов ежевики (таблица 1).

Таблица 1 – Примеры дикорастущих и культивируемых видов ежевики

Дикорастущие	Культивируемые
<i>Rubus caesius</i>	<i>Rubus allegheniensis</i>
<i>Rubus nessensis</i>	<i>Rubus armeniacus</i>
<i>Rubus plicatus</i>	<i>Rubus canadenses</i>
<i>Rubus ulmifolius</i>	

Стоит отметить, что данное деление в некоторой степени условно, поскольку часто культивируемые виды при отсутствии должного ухода “дичают”, а дикорастущие напротив переносятся на дачные участки для разведения в качестве культуры.

Для представителей подрода *Rubus* L. характерны основные две формы побегов: прямостоячие (*R. nessensis*) и стелющиеся (*R. caesius*) (рисунок 3).

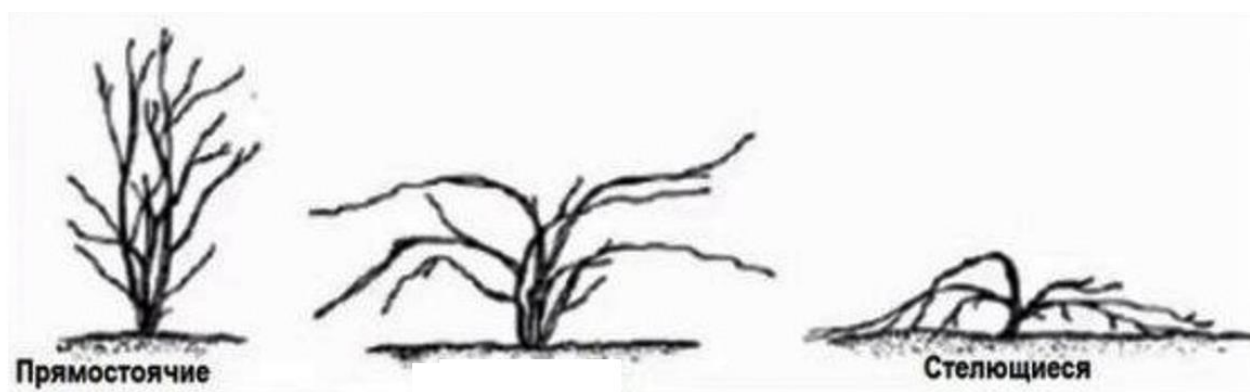


Рисунок 3 – Разновидность форм побегов ежевики [64]

Ежевика аллеганская (*Rubus allegheniensis* Porter) – ежевика из секции *Allegheniensis* – кустарник с прямостоячими побегами до 2 м высотой, со сложными листьями, состоящими из 5 листочков. Данный вид ежевики является наиболее часто встречаемым в культуре [22]. Наиболее распространенным сортом аллеганской ежевики является “Агавам”.

В секцию *Rubus* одноимённого подрода входит большое количество видов ежевики, объединенных под названием “*R. fruticosus*” таких, как *R. nessensis*, *R. armeniacus*, *R. ulmifolius*, *R. plicatus*, *R. hirtus* и другие.

Ежевика неская (*Rubus nessensis* Hall), или Куманика – достаточно распространенный вид умеренного пояса Северного полушария. Встречается как дикорастущее растение в лесах, по берегам рек. Редко выращивается в культуре. Побеги прямостоячие или полустоячие, покрыты шипами. Листья сложные, пятичленные. Плоды – фиолетовые или чёрные блестящие многокостянки [22, 50, 55].

Ежевика вязолистная (*Rubus ulmifolius* Schott) – растение с достигающими 4 м в высоту побегами с крепкими шипами. Листья пятисложные, обратнойцевидные с короткой, заострённой верхушкой. Плоды – шаровидные, блестящие, чёрные многокостянки. Встречается повсеместно на Земном шаре, исключая Антарктиду. Выращивается в качестве культурного растения и произрастает как дикорос. Является объектом некоторых исследований [94, 133], касательно состава биологически активных веществ и биологической активности.

1.4. Ежевика сизая (*Rubus caesius* L.)

1.4.1. Распространение

Один из самых простых видов рода *Rubus*. Вид отнесён к секции *Caesii* подрода *Eubatus* (*Rubus*).



Рисунок 4 – Плодоносящая ежевика сизая [24]

Распространён повсеместно в Северном полушарии: в Северной Америке, Средней и Малой Азии, Европе (за исключением крайнего Севера), на территории Крыма, Кавказа (рисунок 5). Произрастает в оврагах, по берегам рек, вдоль обочин дорог, в зарослях кустарников, на лугах, по опушкам [24, 61].

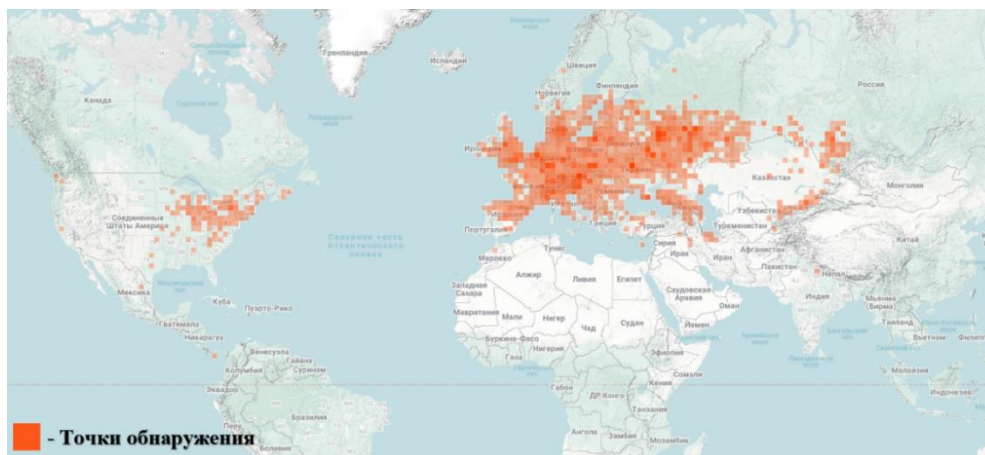


Рисунок 5 – Ареал произрастания и зарегистрированные места нахождения ежевики сизой на карте мира, согласно платформе iNaturalist [26]

1.4.2. Морфологическая характеристика

Ежевика сизая представляет собой кустарник с стелющимися побегами длиной до 1,5-2 (реже 3) метров. Побеги первого года (турионы) – вегетативные, зелёные, не одревесневающие, цилиндрической формы в сечении, покрытые щетинистыми прямыми шипами, расширенными у основания. Побеги второго года жизни – деревянистые, с большим количеством твердых шипов, часто с сизым налётом. Второгодичные побеги отмирают после цветения и плодоношения. Расположение листьев очередное.

Листья сложные, густоопушенные, серовато-зелёные. В составе сложного листа 3, в редких случаях 5, отдельных листочка. Пластинка листа яйцевидная, с двоякозубчатым краем, клиновидным основанием, коротко-заострённой верхушкой и перистым жилкованием. Черешки и главная жилка листа покрыты

перпендикулярно к оси расположенными шипами и множеством мягких щетинок. Листья снабжены двумя широкими (более 3 мм) прилистниками, которые также служат диагностическим признаком растения.

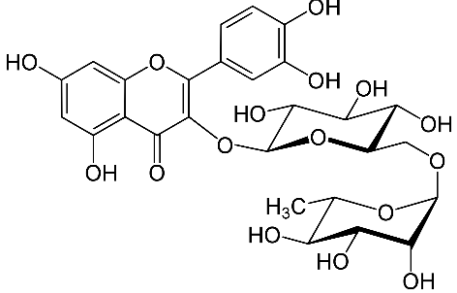
Цветки собраны в щитковидные соцветия, правильные, пятичленные, диаметром до 5 см. Чашечка зелёная, обильно опушенная, с направленными вверх чашелистиками. Венчик состоит из 5 белых лепестков. Тычинки и пестики многочисленные, почти равные по длине. Диапазон периода цветения широкий – с середины мая по конец августа.

Плод – сочная многокостянка, покрытая отличительным сизым налётом (рисунок 4). Плод отделяется с цветоложем, что является одним из отличительных признаков плодов ежевики от плодов малины. Плодоношение начинается в июле и продолжается до августа-сентября [18, 55, 61].

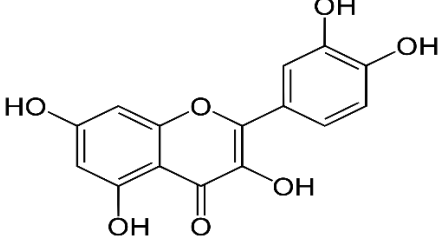
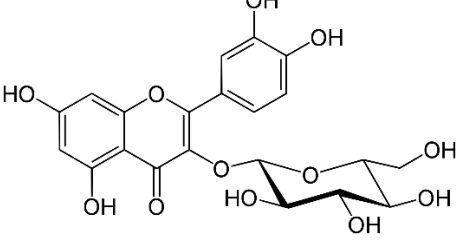
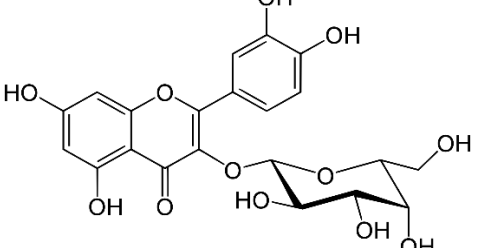
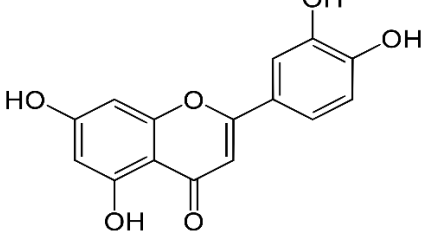
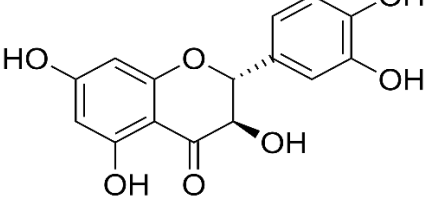
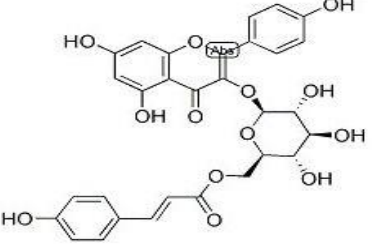
1.4.3. Химический состав ежевики сизой

Данные таблицы 2 демонстрируют химический состав плодов, листьев, стеблей и цветков ежевики сизой, согласно проведенным ранее исследованиям отечественных и зарубежных авторов.

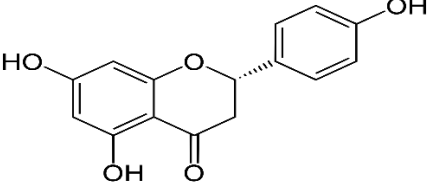
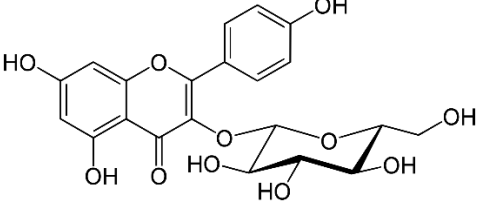
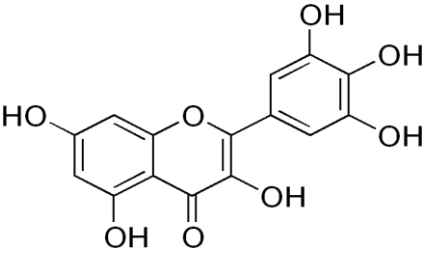
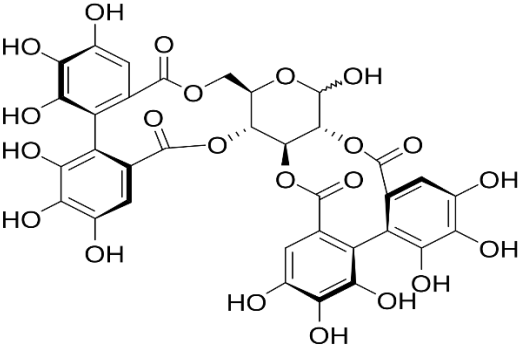
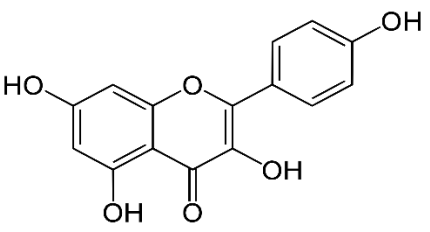
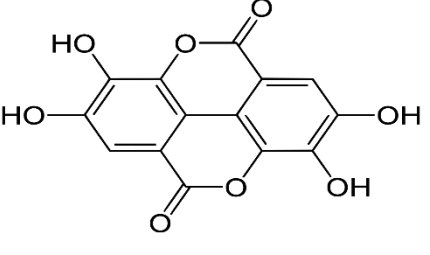
Таблица 2 – Химический состав разных частей ежевики сизой (*R.caesius* L.)

Соединение	Формула	Сырьё	Ссылка на литературный источник
Фенольные соединения			
Рутин		Листья, стебли, цветки, плоды	[126],[110],[138]

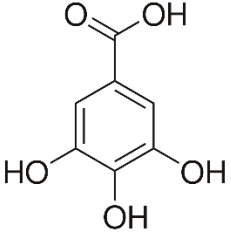
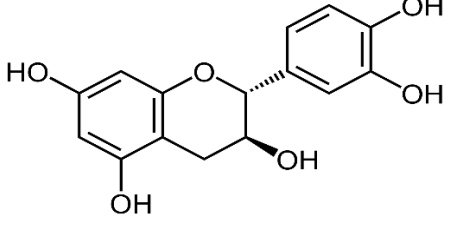
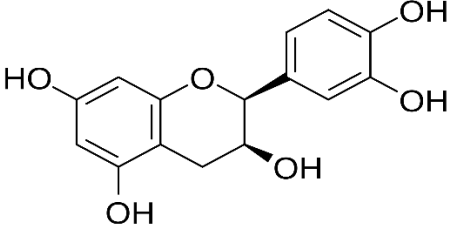
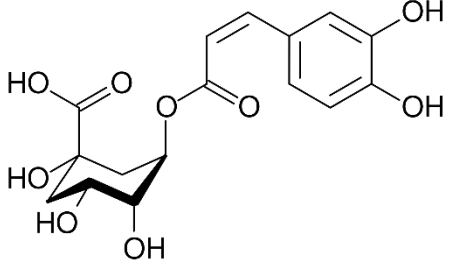
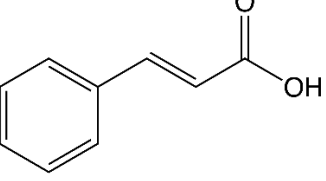
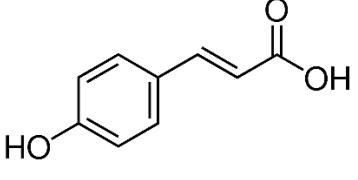
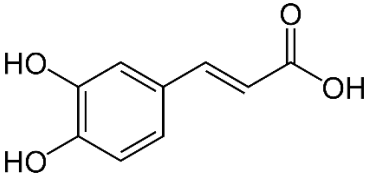
Продолжение Таблицы 2

Кверцетин		Листья, стебли, цветки	[126],[110],[138], [136]
Изокверцетин		Листья, стебли	[126],[110],[136]
Гиперозид		Листья, стебли	[126],[110],[135]
Лютеолин		Листья	[126]
Таксифолин		Листья, стебли	[126]
Тилирозид		Листья, стебли	[126],[110]

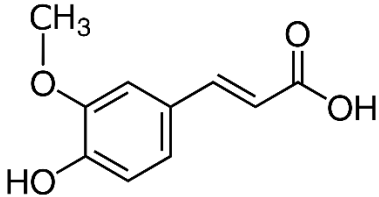
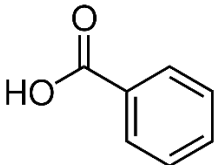
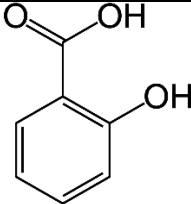
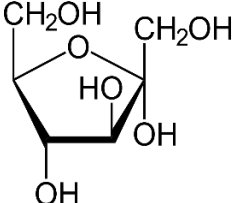
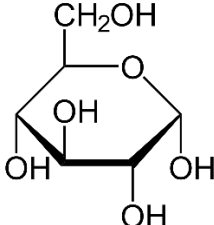
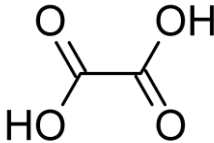
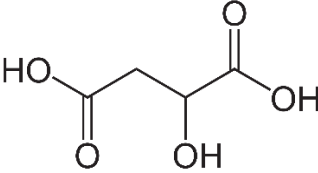
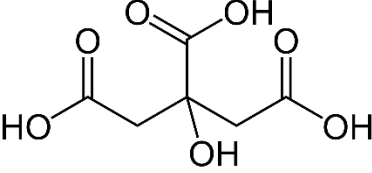
Продолжение Таблицы 2

Нарингенин		Листья, стебли	[126]
Астрагалин		Листья, стебли	[126]
Мирицетин		Листья, цветки	[138]
Педункулагин		Листья	[136]
Кемпферол (производные)		Листья	[110],[136]
Эллаговая кислота		Листья	[110],[138],[136]

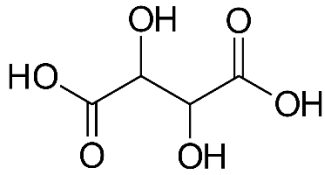
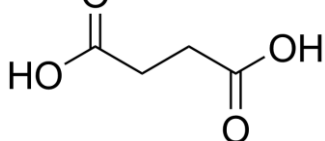
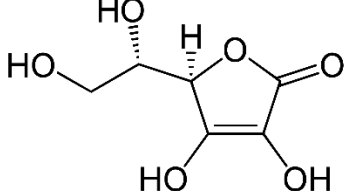
Продолжение Таблицы 2

Галловая кислота		Листья, плоды	[110], [138]
Катехин		Листья, стебли, цветки, плоды	[126],[138]
Эпикатехин		Листья, плоды	[138]
Хлорогеновая кислота		Плоды	[10]
Коричная кислота		Плоды	[10]
Кумаровая кислота		Листья	[110]
Кофейная кислота		Листья, цветки, плоды	[138]

Продолжение Таблицы 2

Феруловая кислота		Листья, плоды	[138]
Бензойная кислота		Плоды	[10]
Салициловая кислота		Плоды	[10]
Сахара			
Фруктоза		Плоды	[53]
Глюкоза			
Органические кислоты			
Щавелевая кислота		Плоды	[10]
Яблочная кислота			
Лимонная кислота			

Продолжение Таблицы 2

Винная кислота			
Янтарная кислота			
Аскорбиновая кислота			

Минеральный состав плодов ежевики сизой представлен в большей степени калием и магнием [70].

1.4.4. Фармакологическая активность и применение ежевики сизой

Благодаря наличию фенольных соединений как плоды, так и листья ежевики сизой обладают антиоксидантной активностью [146], которая обуславливает цитопротекторный, противоопухолевый эффекты. Имеются исследования доказывающие гипогликемическую активность настоя листьев ежевики сизой [19]. Была изучена противодиарейная активность настоя из плодов ежевики [31], сборы, содержащие сырьё ежевики сизой, обладают гипотензивным действием. Ведутся также исследования по изучению противовоспалительной и антибактериальной активностей, некоторые из которых с положительным результатом.

В настоящее время сырьё ежевики сизой нашло применение в народной медицине, где используется в качестве общеукрепляющего, потогонного и противовоспалительного средства. Ежевика сизая зарекомендовала себя как мочегонное средство и используется при заболеваниях органов мочеполовой

системы. Плоды ежевики также применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта за счёт вяжущего действия [28].

На российском рынке имеются БАДы фирм “Хорст” (Россия), “Сила природы” (Россия), “Лекрасэт (Россия)”, “Травы Байкала” (Россия), содержащие листья или плоды ежевики сизой.

1.5. Методы анализа биологически активных соединений в лекарственном растительном сырье

Первоначально в истории человечества основной областью применения растений и их частей для рода человек (*Номо*) была – пища. Со временем человек открыл для себя также их лечебные свойства. Ценность растительного сырья для медицины в прошлом и до сих пор заключается в способности накапливать биологически активные вещества, проявляющие ту или иную фармакологическую активность. Анализ качества ЛРС обязательно включает в себя как обнаружение определенных групп БАВ и их компонентов, так и их количественную оценку. С течением времени создавались новые методы анализа БАВ, а также совершенствовались уже имеющиеся. В настоящий момент выделяют несколько групп методов анализа БАВ: химические, физические, физико-химические и биологические.

1.5.1. Химические методы анализа

С помощью химических методов устанавливают химический состав изучаемого объекта. Различают два вида химического анализа – качественный и количественный. Первый заключается в проведении химической реакции между БАВ в извлечении из сырья и специальным реактивом на эту группу БАВ, в результате чего делается вывод о присутствии или отсутствии искомым соединений

ы сырье. Цель количественного анализа – установить концентрацию обнаруженных веществ. Для этого в химическом анализе существуют методы титриметрии и гравиметрии.

Титриметрия – метод количественного химического анализа, основанный на точном измерении объёма стандартного (титрованного) раствора, израсходованного на реакцию с определяемым веществом [16]. В зависимости от типа химической реакции, протекающей между веществами испытуемого и титрованного растворов выделяют:

1) Кислотно-основное титрование. Метод основан на использовании реакций кислотно-основного взаимодействия (реакций нейтрализации). Данный способ титрования пригоден для количественной оценки соединений с хорошо выраженными кислотными (алкалометрия) / основными (ацидиметрия) свойствами.

Пример: определение суммы органических кислот в плодах рябины обыкновенной (ФС.2.5.0093.18 ГФ РФ XV изд.)

2) Окислительно-восстановительное титрование. В основе метода лежат окислительно-восстановительные реакции, в результате которых происходит изменение окислительно-восстановительного потенциала реакции и наблюдается резкое изменение потенциала вблизи точки эквивалентности. Метод используется для количественного анализа легко окисляемых соединений и групп БАВ сырья.

Пример с использованием редокс-индикаторов: определение аскорбиновой кислоты в плодах шиповника (ФС.2.5.0106.18 ГФ РФ XV изд.), определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин (ОФС.1.5.3.0008 ГФ РФ XV изд. метод 1).

Пример с использованием инструментальных методов для регистрации конечной точки титрования: определение содержания суммы аралозидов в пересчете на аммонийную соль аралозидов А, В, С с усредненной молекулярной массой в корнях аралии маньчжурской (ФС.2.5.0058.18 ГФ РФ XV изд.).

3) Комплексометрия. Метод титриметрии, основанный на образовании комплексов (хелатов) при взаимодействии катионов металлов с комплексонами.

4) Осадительное титрование. В основе лежит реакция образования малорастворимых соединений, выделяющихся из раствора в виде осадка в конечной точке титрования.

Последние 2 вида титриметрии менее популярны в анализе лекарственного растительного сырья.

Гравиметрия – метод, основанный на избирательной различной растворимости биологически активных веществ в воде и неполярных органических растворителях. В результате происходит выделение суммы соединений через их осаждение или получение нерастворимых комплексов с последующим установлением их постоянной массы. Примером применения данного метода служит определение суммы полисахаридов в листьях подорожника большого (ФС.2.5.0032.15 ГФ РФ XV изд.).

1.5.2. Физико-химические методы анализа

В физико-химических методах проводят химические реакции, в результате которых происходит изменение того или иного физического свойства системы [8]. Наиболее распространенными для анализа БАВ в ЛРС группами физико-химических методов являются оптические и хроматография.

Оптические методы

При оптических методах исследуется взаимодействие изучаемого образца с электромагнитным излучением оптического диапазона. Взаимодействие веществ с электромагнитным излучением включает эффекты поглощения (абсорбции), рассеяния, испускания, поляризации и рефракции (преломления).

При поглощении квант излучения с энергией переводит атомы в более высокое энергетическое состояние. [8]. Среди оптических методов, при которых наблюдается этот эффект – колориметрия, фотоколориметрия, спектрофотометрия. Большую популярность в анализе ЛРС имеет последний из них.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра – это метод молекулярной абсорбционной спектроскопии, основанный на измерениях и изучении спектров поглощения электромагнитного излучения молекулами в оптической области [16]. Метод используется для исследования содержания в сырье светопоглощающих (часто окрашенных) соединений. Примеры использования в оценке качества ЛРС: определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве пустырника (ФС.2.5.0034.15 ГФ РФ XV изд.), определение содержания берберина в корнях барбариса обыкновенного (ФС 42-1152-78), определение суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту в листьях сенны (ФС.2.5.0038.15 ГФ РФ XV изд.).

Хроматография

Согласно определению ГФ РФ XV изд., хроматографией называется метод разделения смеси соединений, основанный на их перераспределении между двумя фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направленное движение. По технике выполнения выделяют колоночную хроматографию, когда разделение компонентов смеси происходит в специальных колонках, и плоскостную хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (бумажная хроматография) или в тонком слое сорбента (тонкослойная хроматография, далее – ТСХ). Основная цель бумажной хроматографии и ТСХ – обнаружение конкретных соединений в ЛРС (качественный анализ), тогда как варианты колоночной хроматографии служат также для проведения количественного определения компонентов изучаемых групп БАВ в сырье.

Колоночная хроматография имеет собственную классификацию по природе подвижной фазы:

1) Газовая хроматография – это один из вариантов хроматографии, в котором подвижная фаза представлена газом, проходящем через неподвижную фазу. Данный метод применим для разделения легко летучих веществ таких, как эфирные масла [44].

2) Жидкостная хроматография – метод разделения смеси соединений, в котором в качестве подвижной фазы используется жидкость. Метод пригоден для

разделения более широкого круга веществ, нежели газовая хроматография [12]. Современным и популярным методом для эффективного разделения смеси веществ является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В анализе ЛПС данный метод является фармакопейным при определении суммы сесквитерпеновых кислот в корневищах с корнями валерианы лекарственной (ФС.2.5.0009 ГФ РФ XV изд.), суммы фурукумаринов в плодах амми большой (ФС.2.5.0111 ГФ РФ XV изд.), диосгенина в корневищах с корнями диоскореи nipпонской (ФС.2.5.0114 ГФ РФ XV изд.), кумарина в траве донника (ФС.2.5.0011.15 ГФ РФ XIV изд.).

1.5.3. Физические методы анализа

Физическими называются методы, при проведении которых происходит регистрация аналитического сигнала неких физических свойств (ядерные, спектральные, оптические) без проведения химической реакции [80]. Среди них спектроскопия (ультрафиолетовая, атомно-абсорбционная, атомно-эмиссионная, атомно-флуоресцентная, рентгеновская), рентгено-флуоресцентный метод, масс-спектрометрия и др. Перечисленные методы используются как в качественном, так и в количественном анализе.

Атомно-абсорбционная спектрометрия представляет собой инструментальный метод количественного элементного анализа, который применяется для определения концентрации химических элементов в испытуемом образце путём измерения величины поглощения (абсорбции) электромагнитного излучения атомным паром элемента, генерируемым из испытуемого образца [16].

Метод ААС предназначен для оценки безопасности ЛРС (определение содержания тяжелых металлов и мышьяка (ОФС.1.5.3.0009 ГФ РФ XV изд.) в сырье) и изучения минерального состава ЛРС.

Масс-спектрометрия – метод анализа лекарственных средств, основанный на измерении отношений массы к числу элементарных положительных или

отрицательных зарядов ионов (m/z) в газовой фазе [16]. Метод часто используется в качестве детектора при проведении иных методов анализа, например, хроматографии.

1.5.4. Биологические методы анализа

Биологические методы анализа используются для оценки биологической активности сердечных гликозидов. К ЛРС и лекарственным растительным препаратам (далее – ЛРП), для которых проводится данный метод относятся: листья наперстянки пурпурной, наперстянки шерстистой, травы горлицы весеннего, травы желтушника раскидистого.

Биологическая оценка указанного выше сырья основана на способности сердечных гликозидов в токсических дозах вызывать остановку сердца испытуемых животных. Активность ЛС, содержащих сердечные гликозиды, оценивают в сравнении с активностью стандартного образца (далее – СО) и выражают в единицах действия (ЕД) [ГФ РФ XV изд.]. Для испытаний используются самцы трёх видов лягушек с определенными массами тела: травяная (*Rana temporaria*); водяная – озерная (*Rana ridibunda*) и прудовая (*Rana esculenta*).

Биологическим методом анализа является также определение микробиологической чистоты для оценки безопасности ЛРС. Рекомендуемые требования к допустимому содержанию тех или иных микроорганизмов изложены в ОФС.1.2.4.0002.15 ГФ РФ XV изд.

1.5.5. Иные перспективные методы

Вышеупомянутые методы анализа широко и на протяжении многих лет использовались в изучении состава, качества и безопасности ЛРС. Каждый метод имеет свои достоинства и недостатки, однако все они эффективны для своих целей

и не теряют популярность. Тем не менее, внимание исследователей в области фотохимии направлено на поиск и использование новых методов анализа ЛРС. Одним из таких является, например, электрофорез.

Электрофорез - метод анализа, основанный на способности заряженных частиц, растворенных в электролите, перемещаться под действием электрического поля [16]. Одной из разновидностей данного метода является капиллярный электрофорез, основанный на миграции заряженных частиц в растворе электролита под влиянием создаваемого электрического поля (рисунок 6).

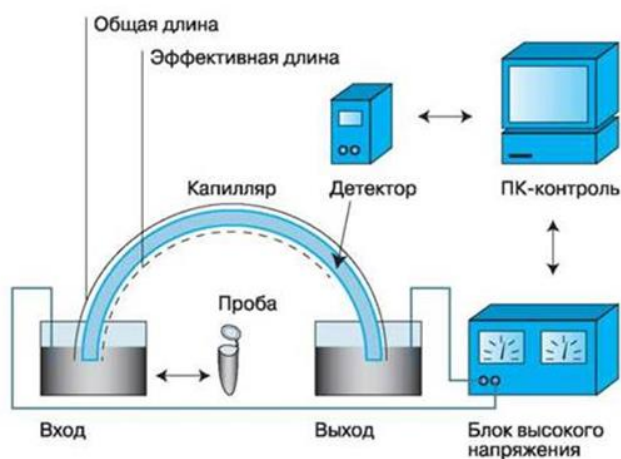


Рисунок 6 – Схема устройства системы капиллярного электрофореза

Часто капиллярный электрофорез сравнивают с высокоэффективной жидкостной хроматографией, так как в обоих методах разделение компонентов смеси веществ происходит в некоем ограниченном пространстве (капилляр / колонка) с участием фоновой / подвижной фазы (буферный раствор или органический растворитель), а для регистрации конечных сигналов используют аналогичные методы детектирования и программы обработки полученных данных [48]. Тем не менее, при равной эффективности разделения, капиллярный электрофорез является более дешевым и доступным способом анализа химического состава БАВ в ЛРС и ЛРП. Данное преимущество делает метод

капиллярного электрофореза интересным и перспективным для использования, более детального изучения и совершенствования.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. В результате анализа литературных данных следует отметить, что род *Rubus* L. является одним из крупнейших родов семейства розоцветных, включая около 1500 видов по всему миру. Особо значимыми для пищевой промышленности и медицины являются представители подродов *Idaeobatus*, включающий различные виды малины, *Eubatus*, объединяющий виды ежевики, а также подроды *Chamaemorus* (морозка), *Cylactis* (княженика, костяника).

2. Анализ литературы показал, что, не смотря на широкое распространение, представители рода *Rubus* изучены в недостаточной степени. Имеется мало публикаций и других информационных источников, в которых полно раскрываются данные относительно химического состава и доказанных фармакологических свойств этих растений. В наибольшей степени в настоящее время изучена только малина обыкновенная, однако интерес исследователей также направлен на виды ежевики, в частности, на ежевику сизую, как один из наиболее распространенных видов.

3. На фармацевтическом рынке РФ присутствуют БАД на основе ежевики сизой. Лекарственных растительных препаратов ежевики сизой в РФ в настоящее время нет.

4. Недостаток экспериментально-полученных данных о химическом составе и фармакологической активности, указывает на актуальность фармакогностического исследования ежевики сизой листьев с целью количественного пополнения перечня отечественного растительного сырья для создания на их основе фитопрепаратов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектом исследования служили полностью развитые листья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), собранные в период наиболее полного развития производящего растения (цветение и плодоношение) с побегов первого и второго годов жизни. Заготовка сырья производилась в Московской области и г.Москвы на территории Ботанического сада ФГБНУ ВИЛАР в июле-августе 2022-2023 гг. Листья очищали от примесей, загрязнений и подвергали воздушно-теневого сушке в течение 7–14 дней.

2.2. Макро- и микроскопический анализ

Макроскопический анализ проводили визуально на белом фоне при дневном свете, согласно ГФ РФ XV изд.

Изучение анатомо-диагностических признаков проводили согласно ОФС.1.5.3.0003 “Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения” ГФ РФ XV изд. Рассматривали микропрепараты листа с поверхности. Просветляющей жидкостью являлся 2,5% раствор NaOH. Анатомо-диагностические признаки листьев изучались с использованием микроскопа Leica DM1000 (Германия) с объективами 10x/0,25, 40x/0,65 и окуляром 10x/20. Вывод изображения на экран осуществлялся через программу “Leica LAS v4.13 Software”.

2.3. Качественный анализ биологически активных веществ

Для проведение качественного анализа БАВ в ежевики сизой листьях использовались качественные реакции и методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ).

В ходе ТСХ-анализа осуществляли выбор оптимальных условий хроматографирования, позволяющие разделить и идентифицировать БАВ в ежевики сизой листьях. Из сырья были приготовлены водные и спиртовые извлечения по фармакопейным методикам. Для анализа органических кислот, аскорбиновой кислоты, аминокислот, сахаров и дубильных веществ была выбрана пластина «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см), для обнаружения флавоноидов использовалась пластинка «Merck» (20*20 см). Объем вводимой пробы на пластинку составлял 10 мкл. Растворы стандартных образцов готовились в концентрации 0,1%.

Для оценки содержания свободных органических кислот была выбрана система этанол 95%: раствор аммиака концентрированный (16: 4,5) [30, 74], в качестве детектора использовали раствор бромкрезолового зеленого (0,2% в спирте). Пробоподготовка проводилась согласно методике количественного определения, изложенной в ФС.2.5.0093.18 ГФ XIV изд. «Рябины обыкновенной плоды».

Для обнаружения аскорбиновой кислоты в качестве подвижной фазы выступала система этилацетат: ледяная уксусная кислота (80:20), детектирование проводили раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,2% в спирте). Пробоподготовка проводилась согласно методике, изложенной в ФС.2.5.0106.18 ГФ XIV изд. «Шиповника плоды».

Для оценки состава свободных аминокислот использовали систему н-бутанол: кислота уксусная ледяная: вода (4: 1: 1), детектором являлся раствор нингидрина (1,0% в спирте). Для подготовки пробы брали 2,5 г сырья (точная

навеска), помещали в коническую колбу на 100 мл, добавляли 50 мл воды, нагревали на водяной бане в течение 30 мин [74].

Подвижной фазой для разделения смеси простых сахаров служила система н-бутанол – уксусная кислота ледяная – эфир – вода (9:6:3:1). Детектором являлся раствор тимола спиртовой 20%. Пробоподготовка осуществлялась согласно методике из ФС.2.5.0025.15 “Лопуха корни”.

Для обнаружения дубильных веществ использовали систему н-бутанол: уксусная кислота ледяная: вода (4:1:3), в качестве детектора использовали раствор железоаммонийных квасцов (1% в спирте). Пробоподготовка проводилась согласно методике количественного определения, изложенной в ОФС. 1.5.3.0008.18 ГФ XIV изд. «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» методом перманганатометрии.

Для обнаружения флавоноидов использовали подвижную фазу 1: этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:2:3); систему 2: хлороформ – спирт – вода (26:16:3), сначала просматривали в ультрафиолетовом (далее – УФ) свете при длине волны 254 нм, затем детектировали раствором алюминия хлорида спиртовым раствором 2%, а потом снова просматривали в УФ-свете при длине волны 365нм. Спиртовые извлечения из сырья были приготовлены согласно методикам, изложенным в ФС.2.5.0069.18 «Горца птичьего (спорыша) трава» и ФС.2.5.0031.15 «Пижмы обыкновенной цветки».

2.4. Количественная оценка биологически активных веществ

2.4.1. Аскорбиновая кислота

Определение содержания кислоты аскорбиновой (витамина С) проводили методом титриметрии. В качестве титрантов выступали раствор 2,6-

дихлорфенолиндофенолята натрия 0,001 М (методика изложена в ФС.2.5.0106.18 ГФ XIV изд. «Шиповника плоды») и раствор йода 0,1 н.

2.4.2. Дубильные вещества

Содержание дубильных веществ оценивали согласно ОФС. 1.5.3.0008 ГФ XV изд. «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах растительного происхождения». В качестве титранта выступал раствор перманганата калия 0,02 М (метод 1).

2.4.3. Органические кислоты

Сумму органических кислот в сырье определяли согласно методике, изложенной в ФС.2.5.0093.18 ГФ XIV изд. «Рябины обыкновенной плоды» методом алкалометрии.

2.4.4. Флавоноиды

Для определения содержания флавоноидов использовали метод спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-2000 (“Спектр”, Россия) по разработанной методике, изложенной в гл.3, п.3.4.1.

2.4.5. Свободные сахара

Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу проводили по реакции с пикриновой кислотой согласно ОФС.1.2.3.0019 “Определение сахаров спектрофотометрическим методом” ГФ РФ XV изд.

2.4.6. Полисахариды

Для определения полисахаридов в сырье использовали гравиметрический метод анализа по методике, изложенной в ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листа» ГФ РФ XIV изд.

2.4.7. Анализ групп биологически активных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для более точного качественного и количественного анализа БАВ был применен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ соединений фенольной природы проводился на хроматографе Nexera-i LC-2040 (Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором.

Условия хроматографического разделения и детектирования:

- Хроматографическая колонка – Grace HPLC-COLUMN, 250x4.6mm platinum C8-EPS 5mm (США);
- Предколонка – Phenomenex SecurityGuard Cartridges Widepore C18 4 × 3,0 мм;
- Температура термостата – 27 °С;

- Подвижная фаза – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему) (элюент А); 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему) (элюент В);
- Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- Объем вводимой пробы – 10 мкл;
- Время регистрации хроматограммы – 40,0 мин;
- Детектирование – УФ-детектор с динамическим изменением длины волны поглощения в ходе анализа от 365 ± 2 нм до 254 ± 2 нм. (таблица 3) [11].

Таблица 3 – Градиент состава подвижной фазы

Время, мин.	А, %	В, %	Длина волны детектирования
0	90	10	365 нм
10	70	30	
15	70	30	254 нм
20	50	50	
30	30	70	
35	90	10	365 нм

Анализ витаминного состава сырья проводился согласно ОФС.1.2.3.0017.15 ГФ XIV изд. методом ВЭЖХ на хроматографе Waters 1525 со спектрофотометрическим детектором Waters 2487. Условия хроматографического разделения и детектирования:

- Хроматографическая колонка – Zorbax Eclipse C18 250x4,6 мм, размер частиц 5 мкм;
 - Температура термостата – 25 °С;
 - Подвижная фаза – Смесь растворов А* и Б** в соотношении 5:3;
- *Раствор А: 0,240 г натрия пентансульфоната и 5 мл уксусной кислоты ледяной в смеси метанол – вода (25:75)
- **Раствор Б: 0,275 г натрия гептансульфоната и 5 мл уксусной кислоты ледяной в смеси метанол – вода (25:75)
- Режим хроматографирования: изократический

- Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- Объем вводимой пробы – 20 мкл;
- Время регистрации хроматограммы – 22,0 мин;
- Детектирование – УФ-детектор при длине волны 280 нм.

Состав органических кислот устанавливали методом обращеннофазной ВЭЖХ с СФМ-детектированием. Условия анализа:

- Хроматограф жидкостной Hitachi Chromaster с УФ-детектором. ПО – МультиХром (версия 3.4)
- Подвижная фаза – фосфатный буфер 0,2М (рН 2,2)
- Колонка – Kromasil C18 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм.
- Температура термостата колонки – 20°C.
- Скорость потока – 1 мл/мин.
- Режим элюирования – изократический.
- Объем вводимой пробы – 20 мкл
- Длина волны детектирования – 210 нм.

2.4.8. Применение метода капиллярного электрофореза в анализе аминокислот и витаминов

Одним из методов эффективного разделения сложных смесей соединений является капиллярный электрофорез. В основе метода лежат электрокинетические явления. В электрическом поле высокого напряжения происходит движение частиц и пассивное движение жидкости, в результате чего, внесенная в капилляр проба разделяется на индивидуальные компоненты. Данный метод анализа обладает общими чертами с высокоэффективной жидкостной хроматографией, однако, в отличии от этого метода, капиллярный электрофорез имеет ряд преимуществ [48]:

- высокая эффективность разделения;

- отсутствие необходимости в использовании дорогостоящих органических растворителей;
- отсутствие колонки;
- простая и недорогая аппаратура;
- низкая себестоимость единичного анализа

Определение качественного и количественного состава аминокислот в ежевики сизой листьях проводился в системе капиллярного электрофореза “Капель – 105М” (Россия). Для подбора наиболее пригодных условий пробоподготовки и разделения аминокислот руководствовались ГОСТ Р 52347-2005, и соответствующим задаче практическим руководством [48].

1,0 г сырья помещали в фарфоровую чашу, добавляли раствор хлористоводородной кислоты 6М выдерживали при температуре 105 – 115°C в течение 16–18 часов с целью проведения гидролиза. Для лучшего разделения аминокислот получали фенилизотиокарбамильные производные.

Условия разделения и анализа:

- Капилляр: длина эффективная / длина общая – 65/75 см, диаметр – 50 мкм;
- Фоновый электролит (рН 7,4): фосфатный буфер 30мМ, раствор β-циклодекстрина 4 мМ;
- Давление ввода пробы: 150 мбар;
- Напряжение: 25кВ;
- Температура системы: 30°C;
- Способы детектирования: УФ, 254 нм.

Анализ водорастворимых витаминов проводился по модифицированной методике из ГОСТ 31483-2012 “Премиксы. Определение содержания витаминов: В1 (тиаминхлорида), В2 (рибофлавина), В3 (пантотеновой кислоты), В5 (никотиновой кислоты и никотиламида), В6 (пиридоксина), Вс (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза” (Глава 3, п.3.4.8).

Условия анализа:

- Система капиллярного электрофореза Капель-104Т;
- Капилляр: 60/50 см, 75 мкм – диаметр;
- Ведущий электролит – боратный буфер + додецилсульфат натрия 8мМ;
- Температура анализа – 40°C;
- Время анализа – 20 мин;
- Ввод пробы – 30 мбар;
- Напряжение – 25Кв, давление – 0 мбар.

2.4.9. Анализ минерального состава

Минеральный состав ежевики сизой листьев изучали методом атомно-адсорбционной спектроскопии на спектрометре “Квант-z”.

Подготовка образцов осуществлялась путем сухой минерализации.

В заранее промытую раствором HNO_3 и водой выпарительную фарфоровую чашку помещали 2,0 (точная навеска) сырья. Пробу сырья выдерживали в растворе спирта этилового 96 % (из расчёта 5 мл спирта на 1 г сырья). Чашки, накрытые часовым стеклом, выдерживали при комнатной температуре в течение 12-48 ч.

Содержимое чаши нагревали на электрической плитке до начала обугливания. Чашки с пробами помещали в холодную электропечь. Минерализацию проводили медленно, повышая температуру электропечи на 50 °С через каждые 30 мин, а доводя ее до 450 °С – продолжали минерализацию до получения золы.

Чашу с золой охлаждали до комнатной температуры и золу смачивали водой и 1 мл раствора азотной кислоты (1 : 1). Затем кислоту выпаривали на и снова помещали чашу с пробой в электропечь, медленно доводя температуру до 300 °С, выдерживали в течение 30 мин. Минерализацию считали законченной, когда зола стала белого цвета и без обугленных частиц. Полученную золу растворяли в азотной кислоте (1 : 1) из расчета 1—5 мл кислоты на навеску в зависимости от

зольности продукта. Раствор выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 1 %-ной азотной до объема 15—20 мл [86].

2.4.10. Определение суммы экстрактивных веществ

Сумму экстрактивных веществ устанавливали согласно ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

2.5. Установление показателей доброкачественности

Определение числовых показателей сырья таких, как потеря в массе при высушивании (влажность), содержание золы, измельченность, а также состав и содержание примесей проводилось согласно ОФС 1.5.3.0007, ОФС.1.2.2.2.0013, ОФС.1.5.3.0005 и ОФС.1.5.3.0004 ГФ РФ XV изд.

2.6. Изучение антирадикальной активности

Для оценки антирадикальной активности водного извлечения из сырья использовалась реакция со свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (далее – ДФПГ). К 2 мл раствора ДФПГ, приготовленного в концентрации 5 мг на 100 мл, прибавляли 2 мл изучаемого образца в различных разведениях [29, 32]. Полученные образцы выдерживали в темном месте в течение получаса, после чего снимали значения оптической плотности на спектрофотометре СФ-2000 (“Спектр”, Россия) относительно воды очищенной при

длине волны 517 нм. Величина антирадикальной активности (далее – АРА) образцов рассчитывалась по формуле:

$$АРА = \frac{(A_0 - A) * 100\%}{A_0},$$

где A_0 – опт. плотностьДФПГ (контроль); A – опт. плотность исследуемого образца сДФПГ.

В качестве препарата сравнения использовали раствор аскорбиновой кислоты фирмы “Мелиген” (Россия), приготовленный в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл.

2.7. Изучение противовоспалительной активности

Определение параметров острой токсичности настоя проводили по методу Кербера [66]. Эксперимент по изучению противовоспалительной активности был проведен в опытах *in vivo* с использованием 90 нелинейных мышах-самцах массой 18–22 г. Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Исследование одобрено биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР (протокол № 84 от 26.09.2022).

Таблица 4 – Группы исследуемых животных при изучении противовоспалительной активности извлечения из ежевики сизой листьев

Группы животных, n=10		Вводимый препарат
№1	Контроль	Вода очищенная
№2	Опыт	Водное извлечение из ежевики сизой листьев
№3	Опыт	Настой календулы лекарственной цветков

Исследования в условиях опытов *in vivo* выполняли согласно Решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 №81 «Об утверждении Правил надлежащей

лабораторной практики ЕАЭС», Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Противовоспалительную активность водного извлечения из ежевики сизой листьев изучали на модели формалинового отёка лап мышей. В качестве препарата сравнения был использован настой цветков календулы лекарственной, приготовленный согласно инструкции производителя сырья (Красногорсклекарства, Россия). Животных делили на 3 группы по 10 особей (таблица 4).

2.8. Определение антимикробной активности

Определение антимикробной (бактерио- и фунгистатической) активности *in vitro* проводили методом двукратных серийных разведений образцов в питательных средах [59]. Патогенные штаммы бактерий *Staphylococcus aureus* 209-R (ATCC 6538), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, а также культуры грибов *Candida albicans* ATCC 10231 и *Microsporium canis* 352 выступали в качестве тест-микроорганизмов.

Питательной средой для установления бактериостатической активности служил мясо-пептидный бульон (МПБ), для изучения фунгистатической активности – жидкая среда Сабуро.

2.8.1. Изучение бактериостатической активности

В первую пробирку помещали 2 мл водного извлечения, добавляли 2 мл питательной среды, для разведения извлечения вдвое. Готовили ряд таких опытных пробирок с 2 мл питательной среды – мясо-пептидным бульоном. Последовательно разводя образцы в питательной среде 1:2, был приготовлен ряд убывающих

разведений. Пробирка со средой без водного извлечения служила контролем. Далее все пробирки засеивали культурами микроорганизмов.

Взвеси бактерий готовили в изотоническом растворе NaCl по бактериальному стандарту мутности ОСО 42-28-85-2022 (10 МЕ) (10^9 микробных тел/мл). Из пробирки №1 с 10^9 микробных тел/мл готовили ряд убывающих концентраций микроорганизмов: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 путём десятикратных разведений в изотоническом растворе NaCl. Далее, в каждую опытную пробирку вносили по 0,2 мл взвеси, содержащей 10^4 микробных тел/мл (рабочая микробная нагрузка). Все посеы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. Опыт проводили в трёх повторностях.

2.8.2. Изучение фунгистатической активности

Образцы готовили аналогично п.2.8.1, но с использованием питательной среды Сабуро. Культуру *Microsporium canis* 352 предварительно растирали в стерильной фарфоровой ступке, смывали в стерильную пробирку изотоническим раствором NaCl. Из полученной густой массы готовили взвесь грибов в изотоническом растворе NaCl по бактериальному стандарту мутности. Затем полученную взвесь разводили изотоническим раствором NaCl в 20 раз. В пробирки засеивали по 0,2 мл полученной взвеси. Все полученные посеы инкубировали при температуре $30\text{--}32^\circ\text{C}$: дрожжеподобные грибы – 24 ч, мицелиальные грибы – 10–14 суток. Опыт проводился в трёх повторностях.

Бактерио- и фунгистатический эффект определяли по минимальному, подавляющему росту бактерий и грибов разведению исследуемого образца, при котором не наблюдали рост микроорганизмов.

2.9. Статистическая обработка данных

Экспериментально полученные результаты работы подвергали статистической обработке согласно требованиям ОФС.1.1.0013 ГФ РФ XV изд. с использованием Microsoft Office Excel (США). Валидация разработанных или модифицированных методик проводилась по ОФС 1.1.0012.15 ГФ РФ XV изд.

В исследованиях фармакологической активности, достоверность различий между изучаемыми группами оценивалась по критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

2.10. Характеристика использованных в ходе исследования реактивов

В ходе работы использовали реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», Россия). Для приготовления подвижной фазы в ТСХ использовали растворители марки х.ч. и сорта «для хроматографии» (ЗАО «Вектон», Россия).

Для проведения анализа соединений фенольной природы методом ВЭЖХ использовались следующие стандартные образцы: СО изорамнетина (99.06%, Vestenbergsgreuth, Германия, номер партии 100004356, годен до 09.2022 г.), СО лютеолина ($\geq 98.0\%$, Merck, Германия, номер партии 0000084920, CAS №491-70-3, годен до 12.2022 г.), СО лютеолин-7-О- β -D-глюкозида ($\geq 98.0\%$, Merck, Германия, CAS № 5373-11-5, годен до 12.2022 г.), СО кемпферола (99.67%, Vestenbergsgreuth, Германия, номер партии 97791112, годен до 01.2023 г.), СО рутина тригидрата ($\geq 94.0\%$, Merck, Германия, CAS № 250249-75-3, годен до 02.2023 г.), СО кемферол-3- β -D-глюкопиранозида ($\geq 97.0\%$, Merck, Германия, CAS № 480-10-4, годен до 12.2023 г.), СО галловой кислоты моногидрата ($\geq 98.0\%$, Merck, Германия, CAS № 5995-86-8, годен до 05.2022 г.), а также реактивы: спирт этиловый (ГОСТ Р 51652-2000), вода деионизированная, ацетонитрил для

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (gradient grade, $\geq 99,9\%$, CAS №75-05-8).

Для изучения состава органических кислот использовали стандартные образцы (производство Sigma-Aldrich): аскорбиновая кислота (CAS 50-81-7, 99%), винная кислота (CAS 87-69-4, $\geq 99,5\%$), гидроксипимонной кислоты кальциевая соль (CAS 921226-01-9, $\geq 99\%$), лимонная кислота (CAS 77-92-9, $\geq 99,5\%$), щавелевая кислота (CAS 144-62-7, $\geq 99\%$), яблочная кислота (CAS 6915-15-7, 99%), янтарная кислота (CAS 110-15-6, $\geq 99\%$).

В анализе витаминного профиля сырья использовали стандартные образцы фирмы ООО “ХромЛаб” (Россия): витамин С (аскорбиновая кислота), не менее 99%, витамин РР(никотинамид), не менее 99%, витамин РР (никотиновая кислота), не менее 99%, витамин В1 (тиамина гидрохлорид), не менее 99%, витамин В2 (рибофлавин), не менее 99%, витамин В6 пиридоксина гидрохлорид), не менее 99%.

Оценка антирадикальной активности проводилась с реактивом DPPH, Free Radical (Merck, Германия, CAS № 1898-66-4, годен до 06.2022).

ГЛАВА 3. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ ЛИСТЬЕВ

3.1. Анализ внешних признаков (макроскопический анализ)

Согласно ОФС.1.5.1.0003 “Листья”, при анализе листьев рассматривают следующие анатомо-диагностические признаки:

- 1) Строение;
- 2) Форма;
- 3) Размер;
- 4) Глубина рассечения;
- 5) Характер основания;
- 6) Характер края;
- 7) Наличие черешка и его размеры;
- 8) Характер поверхности черешка;
- 9) Наличие влагалища, прилистников, их характеристика и размеры;
- 10) Опушение;
- 11) Жилкование;
- 12) Наличие железок и других выделительных образований на эпидерме или наличие вместилищ в мезофилле;
- 13) Цвет;
- 14) Запах;
- 15) Вкус.

Растительное сырье “Ежевики сизой листья (*Folia rubi caesii*)” представляет собой высушенные сложные листья, состоящие из 3 листочков, 2 из которых короткочерешковые, а один (конечный) на более длинном (до 2 см) черешочке. Листья часто снабжены ланцетными прилистниками (рисунок 7).



Рисунок 7 – Цельные листья ежевики сизой

Основными отличительными внешними признаками ежевики сизой листьев являются:

- Размер – до 15 см (длина), до 12 см (ширина);
- Строение листьев – тройчатосложные;
- Яйцевидная / ромбическая форма основания;
- Двоякозубчатый край;
- Клиновидная форма основания;
- Коротко-заостренная верхушка (не более 0,5 см);
- Жилкование перистонервное;
- Листья опушенные, более обильно с нижней стороны;
- Зеленый или серовато-зеленый цвет листовой пластины;
- Слабовыраженный запах;
- Горьковатый или кисловато-горький, вяжущий (у водного извлечения) вкус.

3.2. Изучение анатомо-диагностических признаков

При исследовании микропрепарата листа с поверхности были рассмотрены следующие анатомо-диагностические структуры:

- трихомы, включающие простые и железистые (головчатые) волоски;
- устьичный комплекс;
- клетки эпидермы;
- кристаллические включения мезофилла.

При рассмотрении микропрепарата листа с поверхности видны извилистые, как с нижней, так и с верхней стороны листа, клетки эпидермы размером 30 мкм в длину и 10 мкм в ширину (рисунок 8). Устьица овальной, почти округлой формы, длиной, в среднем, 20 мкм и шириной 15 мкм окружены 4–6 околоустьичными клетками равного размера (аномоцитный устьичный комплекс). Устьица встречаются на нижней эпидерме листа с частотой от 70 до 140 на 1 мм². [38].

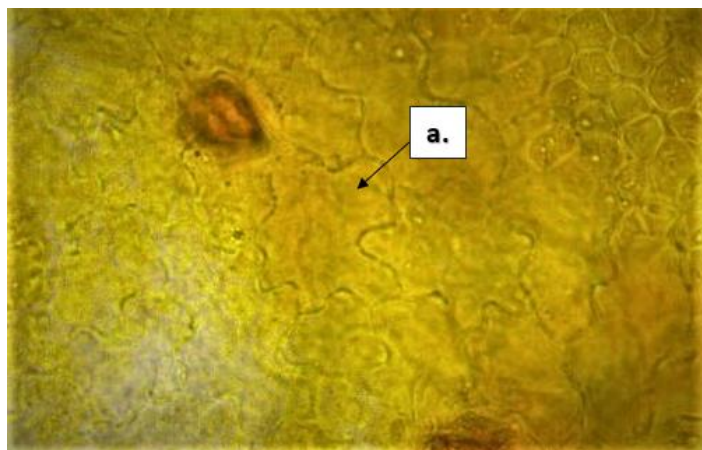


Рисунок 8 – Клетки эпидермы ежевики сизой листьев (а), увеличение x400 [38]

Простые волоски листа ежевики сизой представлены двумя типами:

- простые одноклеточные, среди которых встречаются более длинные (до 1 мм) с округлым основанием (рисунок 11 б.) и более мелкие (100–400 мкм) с расширенным, ближе к треугольной форме основанием (рисунок 11 а.);
- простые одноклеточные, сросшиеся у основания волоски (рисунок 12).

На верхней эпидерме из простых волосков встречаются, преимущественно, простые одноклеточные с частотой от 22 ± 8 на 1 мм^2 (рисунок 9). Нижняя сторона листа более опушена (рисунок 10), на эпидерме встречаются как простые одноклеточные (19 ± 5 на 1 мм^2), так и множество перепутывающихся между собой простых одноклеточных, сросшихся между собой по 2 или 4 волосков в количестве 10 ± 7 на 1 мм^2 [38].

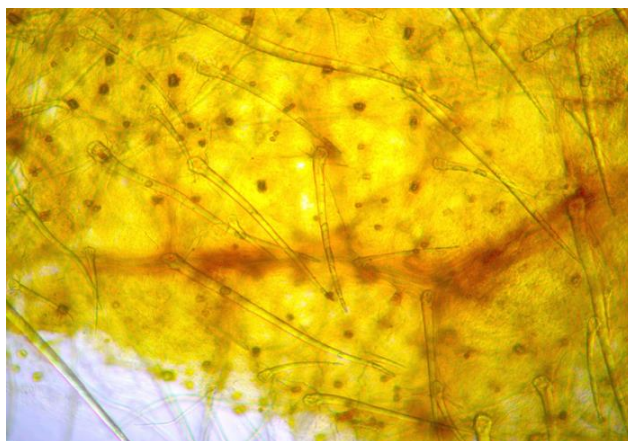


Рисунок 9 – Простые волоски верхней эпидермы ежевики сизой листьев, увеличение $\times 100$ [35]

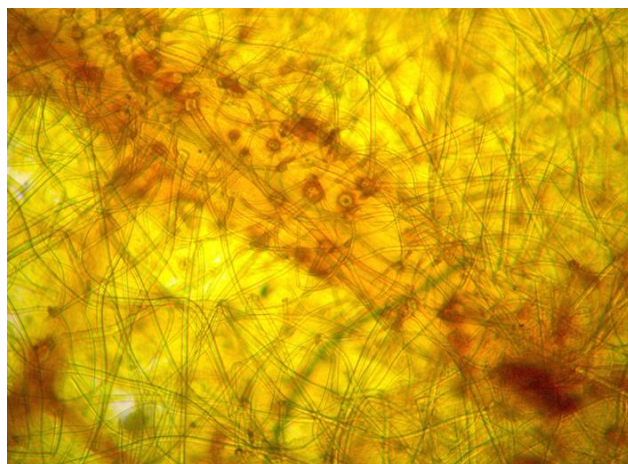


Рисунок 10 – Простые волоски нижней эпидермы ежевики сизой листьев, увеличение $\times 100$ [35]

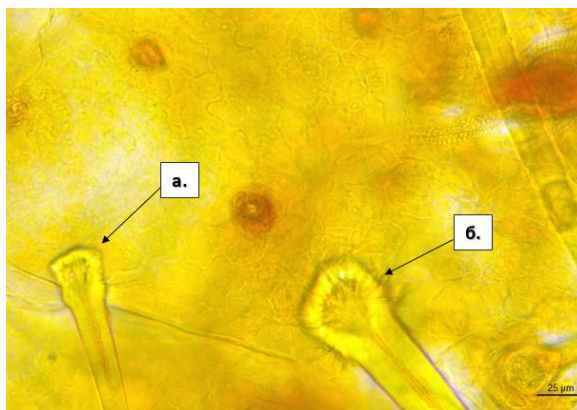


Рисунок 11 – Разные основания простых одноклеточных волосков ежевики сизой листьев, увеличение $\times 400$ [38]

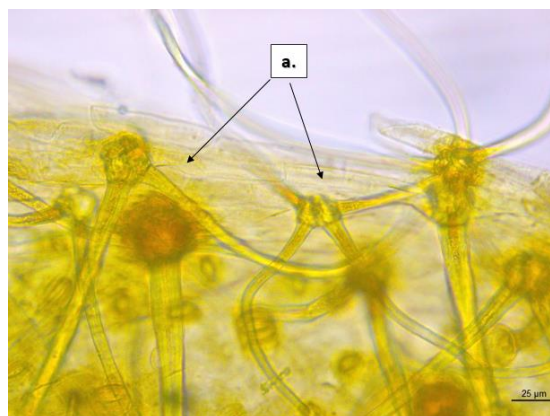


Рисунок 12 – Простые одноклеточные, сросшиеся у основания волоски нижней эпидермы ежевики сизой листьев (а), увеличение $\times 400$ [38]

Железистые волоски листа локализируются по жилке, имеют 1-, чаще 2-рядную ножку и округлую головку. Длина железистых волосков варьирует от 60 до 85 мкм. Диаметр головки – 35–45 мкм (рисунок 13). Частота встречаемости на верхней эпидерме – 6 ± 1 , на нижней – 2 ± 1 на 1 мм^2 .

В мезофилле листа встречаются кубические одиночные кристаллы и друзы оксалата кальция в количестве от 3 до 9 на 1 мм^2 размером 11 ± 6 мкм (рисунок 14).

При исследовании анатомического строения ежевики сизой листьев на поперечном срезе был установлен тип строения листа – дорсовентральный (рисунок 15). Под эпидермой расположены два ряда столбчатого мезофилла, ниже располагаются 4–5 рядов губчатого мезофилла.

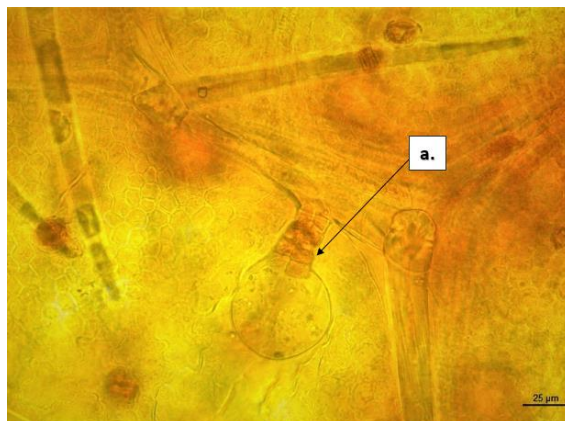


Рисунок 13 – Железистые (головчатый) волосок ежевики сизой листьев (а), увеличение $\times 400$ [35]

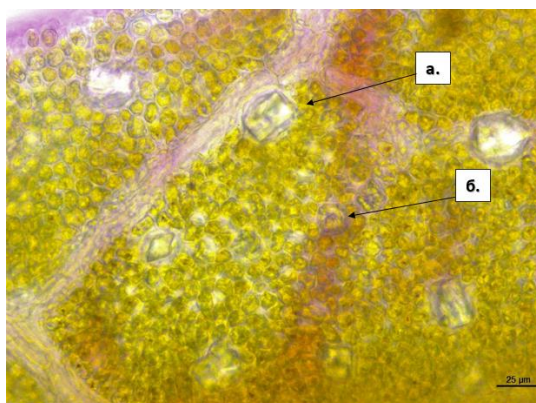


Рисунок 14 – Кристаллы (а) и друзы (б) оксалата кальция в мезофилле ежевики сизой листьев, увеличение $\times 400$ [35]

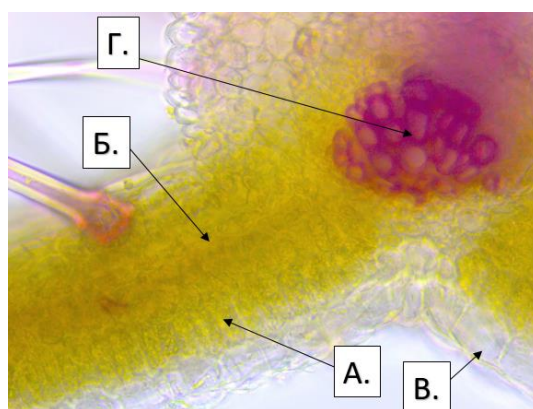


Рисунок 15 – Анатомическое строение ежевики сизой листьев увеличение $\times 400$:
А – столбчатый мезофилл, Б – губчатый мезофилл, В – клетки эпидермы с кутикулой, Г – проводящий пучок жилки листа [35]

Анатомическое изучение черешка проводилось путём приготовления поперечных срезов в базальной, медиальной и апикальной частях (рисунок 16). Форма поперечных срезов меняется в зависимости от части черешка: в базальной части более округлая, ближе к медиальной части – подковообразная (округлая с одной стороны, с выемкой, образующей два ребра – с другой).



Рисунок 16 – Поперечные срезы черешка: а – базальная часть, б, в – медиальная часть, г – апикальная часть

Проводящая система представлена сосудисто-волокнистыми пучками (далее – СВП) в количестве 3–7. Ближе к апикальной части СВП, расположенные в ребрах, могут разбиваться на 2–3 (рисунок 16 – г.). СВП - открытые биколатеральные, могут быть окружены друзами оксалата кальция. Флоэмную часть пучка облегают группа склеренхимных клеток с утолщенными стенками (лубяные волокна). Центральную часть черешка занимает основная паренхима с клетками неоднородного размера. Под эпидермой расположены 2 ряда пластинчатой колленхимы. На эпидерме встречается большое количество простых и железистых волосков, а также крупных шипов. Базальная часть черешка почти не опушена.

Результаты макро- и микроскопического анализа позволили выявить и уточнить диагностически-значимые признаки, позволяющие идентифицировать сырье: строение, опушение, цвет и характер края листьев, наличие волосков, простых и железистых, наличие кубических кристаллов и друз оксалата кальция в мезофилле листа.

3.3. Обнаружение основных групп биологически активных веществ в ежевики сизой листьях

Для обнаружения БАВ в изучаемом объекте были проведены качественные цветные реакции (таблица 5), а также метод хроматографии в тонком слое сорбента.

3.3.1. Качественные реакции

Таблица 5 – Результаты качественных цветных реакций на извлечения ежевики сизой листьев

№	Реактив	Результат	Обнаруженная группа БАВ
1	Раствор железоаммонийных квасцов 1%	Синее, переходящее в черное окрашивание извлечения	Дубильные вещества (гидролизуемые)
	10% раствор свинца среднего ацетата при одновременном добавлении 10% раствора кислоты уксусной	Белый осадок, не растворимый в кислоте уксусной	
2	Раствор алюминия хлорида 2% в спирте этиловом 70%	Жёлто-салатовая окраска извлечения с зеленой флуоресценцией в УФ-свете	Флавоноиды
3.	Спирт этиловый 96%	Выпадение белых хлопьев в осадок при стоянии	Полисахариды

Качественные реакции на алкалоиды и сапонины дали отрицательный результат.

3.3.2. Тонкослойная хроматография

В результате проведенных исследований, в извлечениях из ежевики сизой листьев были обнаружены аскорбиновая кислота (рисунок 17), органические кислоты: лимонная, винная, янтарная (рисунок 18), заменимые аминокислоты: β -аланин, L-глутамин, глицин и незаменимая аминокислота L-треонин (рисунок 19), свободные сахара: глюкоза, фруктоза, рамноза, галактоза, мальтоза, лактоза, ксилоза, раффиноза (рисунок 20), а также соединения фенольной природы: танин, галловая кислота, рутин, цинарозид (рисунки 21–23).

Результаты исследования с условиями проведения представлены в таблице 6.

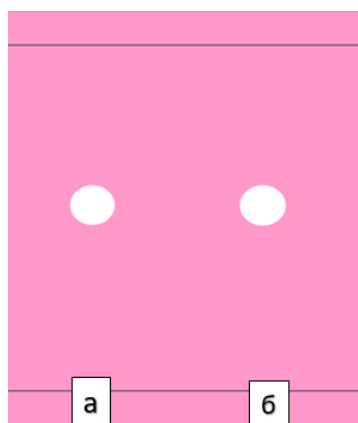


Рисунок 17 – Схема хроматограммы аскорбиновой кислоты в ежевики сизой листьях (*R.caesius* L.). а – извлечение из сырья, б – СО аскорбиновой кислоты ($R_f=0,62$)

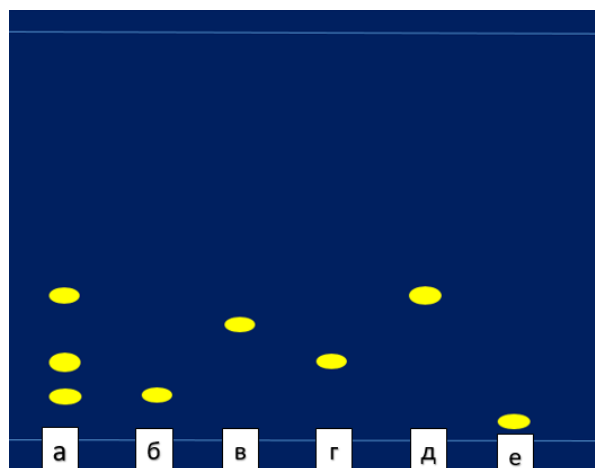


Рисунок 18 – Схема хроматограммы органических кислот в ежевики сизой листьях (*R.caesius L.*):

а – извлечение из сырья, б – СО лимонной кислоты ($R_f=0,10$), в – СО яблочной кислоты ($R_f=0,34$), г – СО винной кислоты ($R_f=0,18$), д – СО янтарной кислоты ($R_f=0,40$), е – СО щавелевой кислоты ($R_f=0,05$)

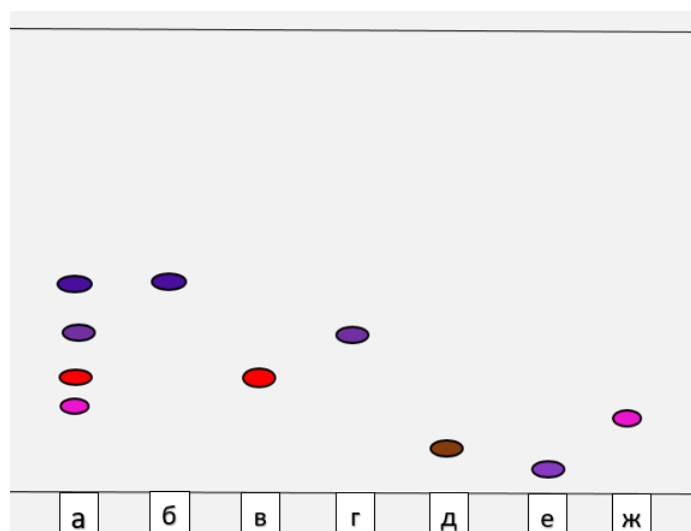


Рисунок 19 – Схема хроматограммы аминокислот в ежевики сизой листьях (*R.caesius L.*):

а – извлечение из сырья, б – СО β -аланина ($R_f=0,42$), в – СО L-треонина ($R_f=0,35$), г – СО L-глутамина ($R_f=0,40$), д – СО L-пролина ($R_f=0,28$), е – СО L-аспарагина ($R_f=0,16$), ж – СО глицина ($R_f=0,33$)

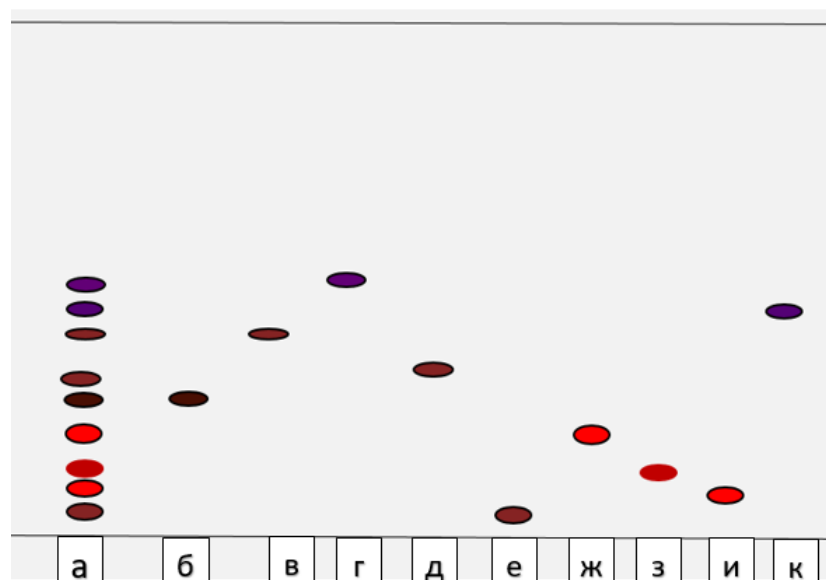


Рисунок 20 – Схема хроматограммы свободных сахаров в ежевики сизой листьев (*R.caesius* L.):

а – извлечение из сырья, б – СО фруктозы ($R_f=0,383$), в – СО маннозы ($R_f=0,402$), г – СО рамнозы ($R_f=0,548$), д – СО галактозы ($R_f=0,393$), е – СО глюкозы ($R_f=0,089$), ж –СО мальтозы ($R_f=0,243$), з – СО лактозы ($R_f=0,149$), и – СО раффинозы ($R_f=0,102$), к – СО ксилоза ($R_f=0,452$)

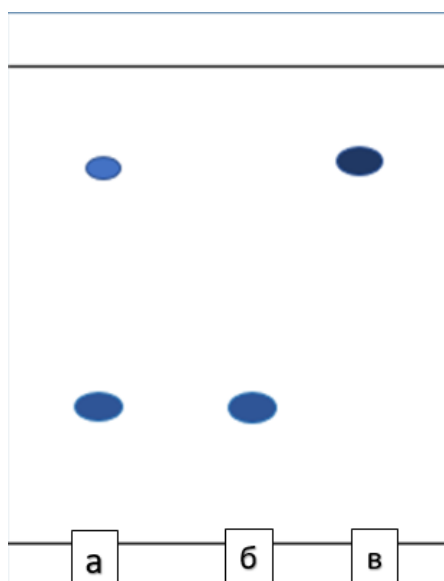


Рисунок 21 – Схема хроматограммы дубильных веществ в ежевики сизой листьях (*R.caesius* L.):

а – извлечение из сырья, б – СО танина ($R_f=0.37$), в – СО галловой кислоты ($R_f=0.71$)

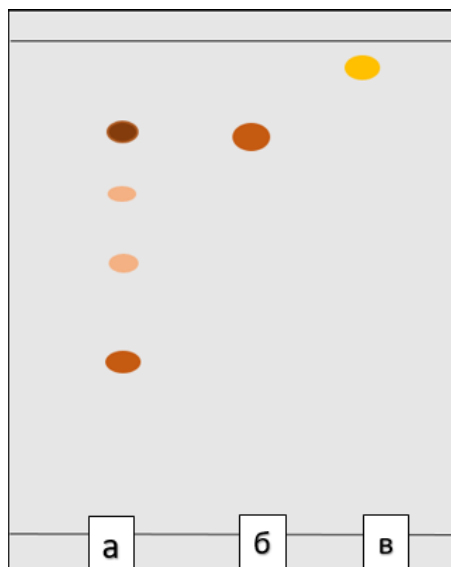


Рисунок 22 – Схема хроматограммы флавоноидов в ежевики сизой листьях (*R. caesius* L.) после детектирования $AlCl_3$. Подвижная фаза (далее – ПФ): этилацетат – муравьиная кислота – вода (10: 2: 3):
а – извлечение из сырья, б – СО рутина ($R_f=0.78$), в – СО кверцетина ($R_f=0.94$)

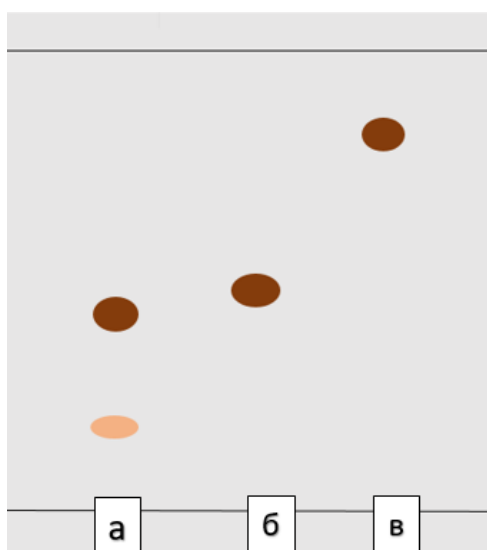


Рисунок 23 – Схема хроматограммы флавоноидов в ежевики сизой листьях (*R. caesius* L.) после детектирования $AlCl_3$. ПФ: хлороформ- спирт – вода (26:16:3):
а – извлечение из сырья, б – СО цинарозида ($R_f=0.48$), в – СО лютеолина ($R_f=0.81$)

Таблица 6 – Результаты и условия проведения тонкослойной хроматографии в изучении биологически активных веществ в ежевики сизой листьях

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Детектор	Зоны	Идентифицированные БАВ в сравнении с СО
Силикагель Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см)	Этанол 95% : раствор аммиака концентрированный (16: 4,5)	Раствор бромкрезолового зеленого (0,2% в спирте)	Жёлтые пятна на синем фоне	Лимонная, винная, янтарная
Силикагель Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см)	Этилацетат: ледяная уксусная кислота (80:20)	Раствор 2,6-дихлорфенол-индофолята натрия (0,2% в спирте)	Белое пятно на розовом фоне	Аскорбиновая кислота
Силикагель Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см)	н-бутанол: кислота уксусная ледяная: вода (4: 1: 1)	Раствор нингидрина (1,0% в спирте)	На белом фоне – от желто-оранжевых до розово-красных пятен	β-Аланин, L-Треонин, L-Глутамин Глицин
Силикагель Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см)	н-бутанол – уксусная кислота ледяная-эфир – вода (9 : 6 : 3: 1)	Раствор тимола 20% спиртовой	На белом фоне – от розово-фиолетовых до вишнево-коричневых пятен	Фруктоза, Манноза, Рамноза, Галактоза, Глюкоза, Мальтоза, Лактоза, Раффиноза, Ксилоза
Силикагель Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см)	н-бутанол: уксусная кислота ледяная:вода (4: 1: 3)	Раствор железоаммонийных квасцов (1% в спирте)	На белом фоне – серо-синие пятна	Танин, галловая кислота
Силикагель Merck» (20*20 см)	Этилацетат – муравьиная кислота – вода (10: 2: 3)	Раствор алюминия хлорида спиртовой 2%, УФ-свет	На белом фоне –желто-зеленая флуоресценция	Рутин
Силикагель Merck» (20*20 см)	Хлороформ–спирт – вода (26:16:3)	Раствор алюминия хлорида спиртовой 2%, УФ-свет	На белом фоне –коричневое пятно	Циннарозид

3.4. Установление содержания биологически активных веществ в ежевики сизой листьях

3.4.1. Разработка методики определения содержания суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях

С целью разработки методики определения содержания суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях изучалось влияние степени измельченности сырья, времени экстракции, концентрации экстрагента, соотношения сырьё : экстрагент, объемов аликвоты извлечения и спиртового раствора алюминия хлорида (таблица 7). Поскольку максимум спектра поглощения спиртового извлечения из сырья после добавления раствора алюминия хлорида совпал с максимумом поглощения комплекса раствора СО рутин с алюминия хлоридом (рисунок 24), то определение суммы флавоноидов в сырье было решено проводить в пересчете на рутин [42].

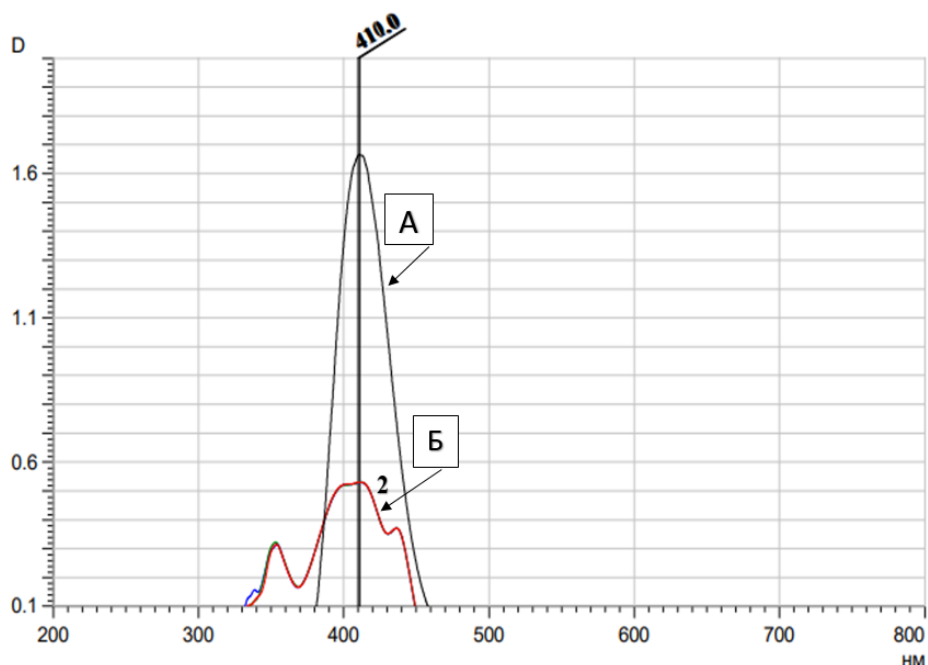


Рисунок 24 – Спектры поглощения спиртового извлечения из ежевики сизой листьев (Б) и раствора СО рутин (А) после комплексообразования с $AlCl_3$ [42]

Таблица 7 – Содержание суммы флавоноидов в ежевики сизой при разных условиях экстракции ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,3020$)

Условия экстрагирования	Сумма флавоноидов, %
Соотношения сырьё : экстрагент	
1:50	$0,74 \pm 0,02$
1:100	$0,66 \pm 0,04$
Время экстракции	
30 мин.	$0,58 \pm 0,05$
60 мин.	$0,74 \pm 0,02$
90 мин.	$0,56 \pm 0,01$
Концентрация спирта этилового	
30%	$0,30 \pm 0,02$
40%	$0,33 \pm 0,03$
50%	$0,33 \pm 0,01$
70%	$0,66 \pm 0,03$
95%	$0,19 \pm 0,02$
Размер частиц сырья	
1 мм	$0,82 \pm 0,04$
2 мм	$0,70 \pm 0,06$
3 мм	$0,67 \pm 0,03$
5 мм	$0,80 \pm 0,01$
Соотношение объемов аликвоты извлечения и спиртового раствора алюминия хлорида 2%, мл	
2 : 2	$0,49 \pm 0,04$
2 : 4	$0,47 \pm 0,06$
4 : 2	$0,68 \pm 0,02$
4 : 4	$0,75 \pm 0,01$

Таким образом, были подобраны оптимальные условия проведения экстракции для получения большего содержания суммы флавоноидов: соотношение сырьё : спирт этиловый – 1:50 (данное соотношения имеет еще одно преимущество – меньший расход экстрагента), время экстракции – 60 мин.,

концентрация спирта этилового – 70%, размер частиц сырья – 1 мм, объем аликвоты извлечения из сырья – 4 мл, объем 2% раствора $AlCl_3$ – 4 мл.

На основании результатов проведенных выше исследований была разработана методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в ежевики сизой листьях:

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного до размера частиц 1 мм сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают на водяной бане в течение 1 ч. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

4,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,5 мл уксусной кислоты 30% и доводят объем раствора до метки спиртом 96 %, перемешивают (раствор Б). Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 4,0 мл раствора А, 0,5 мл уксусной кислоты 30%, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{A \times 50 \times 25 \times 100}{A^{1\%}_{1\text{см}} \times a \times 4 \times (100 - W)},$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора А;

$A^{1\%}_{1\text{см}}$ – удельный показатель поглощения комплекса СО рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Для доказательства пригодности проводилась валидация данной методики по таким показателям, как линейность, повторяемость, правильность, внутрилабораторная прецизионность.

С целью изучения линейности методики строили график зависимости оптической плотности (далее – ОП) от объема аликвоты извлечения из сырья. Для этого разные объемы аликвот (от 2 мл до 10 мл) помещали в мерные колбы на 25 мл, добавляли 4 мл спиртового 2% раствора $AlCl_3$, 0,5 мл уксусной кислоты 30% и доводили объем раствора до метки спиртом 96%, перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 410 нм. Результаты определения линейности и график линейной зависимости представлены в таблице 8 и на рисунке 25.

Таблица 8 – Результаты определения линейности

Аликвота, мл	2	4	6	8	10
ОП	0,176	0,500	0,726	0,916	1,147

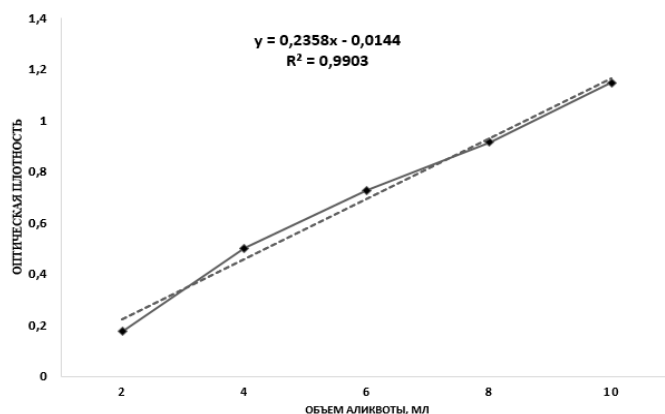


Рисунок 25 – График линейной зависимости оптической плотности от объема аликвоты извлечения из сырья

Как видно из графика, коэффициент корреляции составил 0,9903, что соответствует линейности разработанной методики ($R \geq 0,99$).

Повторяемость методики устанавливали в шести последовательных измерениях в аналогичных условиях, одним и тем же аналитиком на одном оборудовании. Полученные результаты представлены в таблице 9. Значение RSD в данном случае составило 4,54%.

Таблица 9 – Результаты повторяемости методики (P=95%, t(P;f)=2,57)

Сумма флавоноидов в пересчете на рутин в ежевики сизой листьях, %	\bar{x} , %	s^2	s	Δx	ε , %	RSD, %
0,67 0,77 0,73 0,76 0,71 0,72	0,73	0,001089	0,026667	0,03	4,97	4,54

Таблица 10 – Определение правильности (n = 3, f = 2, P = 95 %, T (f, P) = 4,3020)

ОП извлечения из ежевики сизой листьев	Добавлено, опт.плотность	Получено теоретически, опт плотность	Получено практически, опт.плотность	Ошибка,%
0,5172	0,1640	0,6812	0,6644	97,5
			0,7167	105,2
			0,6689	98,2
0,5172	0,3280	0,8450	0,8510	100,7
			0,8413	99,5
			0,8315	98,4
0,5172	0,6560	1,1730	1,1960	101,9
			1,2030	102,5
			1,1890	101,3
Среднее значение открываемости, %				100,6
RSD, %				2,3
Ошибка,%				2,44

Оценку правильности методики проводили путем добавления к полученному извлечению из сырья необходимого количества стандартного образца для получения оптической плотности раствора рутина в размере 32%, 63% и 127% от

величины оптической плотности самого извлечения. Результаты представлены в таблице 10.

Полученные данные укладываются в интервал от 97,5% до 105,2%, а среднее значение выхода составило 100,6% при относительной ошибке 2,44%.

Внутрилабораторная прецизионность проводилась в одной лаборатории, на двух разных оборудованьях, двумя исполнителями в разные дни (таблица 11). Полученное в данных условиях значение относительного стандартного отклонения равняется 1,75%, что подтверждает прецизионность методики.

Результаты исследований доказали валидность разработанной методики определения суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях по следующим показателям: линейность, повторяемость, правильность и внутрилабораторная прецизионность. Относительное стандартное отклонение (RSD) во всех параметрах не превышало 5%.

Таблица 11 – Оценка прецизионности

	Содержание флавоноидов в ежевики сизой листьях, %	
	Прибор 1	Прибор 2
Аналитик №1	0,710	0,720
	0,708	0,717
	0,710	0,739
Аналитик №2	0,704	0,725
	0,705	0,740
	0,705	0,730
Среднее значение, %	0,718	
RSD,%	1,75	

3.4.2. Установление суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях

По разработанной методике (п.3.4.1) была определена сумма флавоноидов в пересчете на рутин в ежевики сизой листьях, а также изучено влияние подачи ультразвука (далее – УЗ) на степень экстракции флавоноидов из сырья.

Таблица 12 – Условия проведения определения содержания суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях под действием ультразвука

Размер частиц сырья	Соотношение сырье : спирт этиловый 70%	Температура	Время	Объем аликвоты	Объем раствора алюминия хлорида 2%	Длина волны определения суммы флавоноидов
1мм	1 : 50	50–60°C	30 мин	4 мл	4 мл	410 нм
		20–25°C	30 мин			
		50–60°C	60 мин			

Для сравнения было приготовлено извлечение согласно п.3.4.1, без воздействия УЗ, а также извлечения в условиях, указанных в таблице 12.

Таблица 13 – Сравнительный анализ содержания суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях при разных условиях экстракции

Условия экстрагирования	Сумма флавоноидов, %
1) Без ультразвука 60 мин	0,72 ± 0,02
2) Под действием ультразвука:	
-30 мин. при нагревании	0,73 ± 0,03
-60 мин при нагревании	0,74 ± 0,06
-30 мин. без нагревания	0,26 ± 0,04

Исходя из полученных результатов (таблица 13) установлено, что подача ультразвука при нагревании в течение 30 минут способствует выходу эквивалентного или большего содержания флавоноидов из сырья, чем при экстракции стандартным способом (без УЗ) по вышеизложенной разработанной методике (п.3.4.1), что может позволить сократить время экстракции.

3.4.3. Анализ фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для получения более полных данных относительно фенольного профиля проводили определение индивидуальных соединений в ежевики сизой листьях методом ВЭЖХ.

В результате ВЭЖХ-УФ анализа спиртовых извлечений из ежевики сизой листьев из 31 обнаруженных компонентов было идентифицировано 7 соединений фенольной природы: рутин, изорамнетин, кемпферол, цинарозид, астрагалин, галловая кислота и нарциссин (рисунок 26).

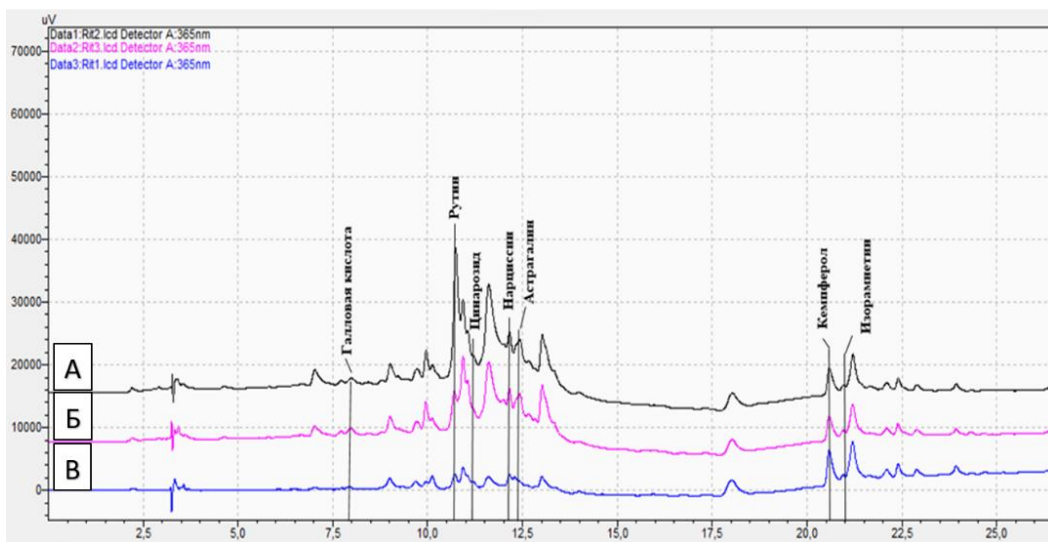


Рисунок 26 – Хроматограмма фенольных соединений в спиртовых извлечениях из ежевики сизой листьев: А – извлечение 50% спиртом, Б – извлечение 96% спиртом, В – извлечение 70% спиртом

Количественное содержание указанных компонентов в ежевики сизой листьях в пересчёте на сухое сырьё при извлечении спиртом этиловым различной концентрации представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Содержание (%) фенольных соединений в ежевики сизой листьях ($n = 5$, $f = 4$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 2,776$)

Соединение	Время удерживания, мин	Содержание, мг%		
		50% спирт	70% спирт	96% спирт
Галловая кислота	7,9	$2,0 \pm 0,4$	$13,3 \pm 0,2$	$12,6 \pm 0,2$
Рутин	10,6	$10,0 \pm 0,2$	$114,1 \pm 3,3$	$29,0 \pm 1,5$
Цинарозид	11,2	$5,0 \pm 0,1$	$21,2 \pm 2,1$	$9,0 \pm 0,2$
Нарциссин	12,1	$6,1 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$
Астрагалин	12,3	$6,0 \pm 0,2$	$20,0 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,1$
Кемпферол	20,6	$16,1 \pm 0,8$	$15,0 \pm 0,4$	$13,0 \pm 0,3$
Изорамнетин	21,0	$35,0 \pm 1,2$	$41,0 \pm 0,3$	$30,0 \pm 1,3$

Установлено, что преобладающим компонентом фенольных соединений в ежевики сизой листьях является рутин.

3.4.4. Анализ дубильных веществ

В ежевики сизой листьях была определена сумма дубильных веществ в пересчете на танин методом перманганатометрии.

В колбу вместимостью 500 мл, помещали 2,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц – 2 мм, добавляли 250 мл воды и кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин, периодически перемешивая. Полученное извлечение охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводили объем раствора водой до метки.

В коническую колбу вместимостью 1 л помещали 25,0 мл полученного водного извлечения, прибавляли 500 мл воды, 25 мл 0,1% раствора индигокармина и титровали при постоянном перемешивании калия перманганата (KMnO_4) раствором 0,02 М до золотисто-жёлтого окрашивания.

Параллельно проводили контрольный опыт.

Результаты определения суммы дубильных веществ в ежевики сизой листьях представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты количественного определения дубильных веществ в ежевики сизой листьях ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,3020$)

Содержание, %	\bar{x} , %	s^2	s	Δx	RSD, %
9,69 10,10 10,24	10,01	0,05447	0,23338	0,26	2,65

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин в ежевики сизой листьях – $10,01 \pm 0,26 \%$ ($n = 3$; $p = 0,95$).

3.4.5. Анализ органических кислот

Количественное определение органических кислот в ежевики сизой листьях проводили титриметрическим методом – алкалиметрией.

Методика

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц 1 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Полученное извлечение охлаждали до комнатной температуры, фильтровали в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили объем содержимого колбы водой до метки, после чего тщательно перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 20 мл свежeproкипяченной воды, 1 мл фенолфталеина раствора спиртового 1 %, 2 мл метиленового синего раствора спиртового 0,1 % и титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида до лилово-синего окрашивания в пене.

Результаты количественного определения органических кислот представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты количественной оценки органических кислот в ежевики сизой листьях ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95\%$, $T(f, P) = 4,3020$)

Содержание, %	\bar{x} , %	s^2	s	Δx	RSD, %
1,48 1,45 1,39	1,44	0,00140	0,03742	0,04	2,94

Определенное методом нейтрализации количество органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в ежевики сизой листьях составило $1,44 \pm 0,04\%$.

3.4.6. Определение содержания органических кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для детального исследования компонентного состава органических кислот в ежевики сизой листьях применялся метод обращеннофазной ВЭЖХ.

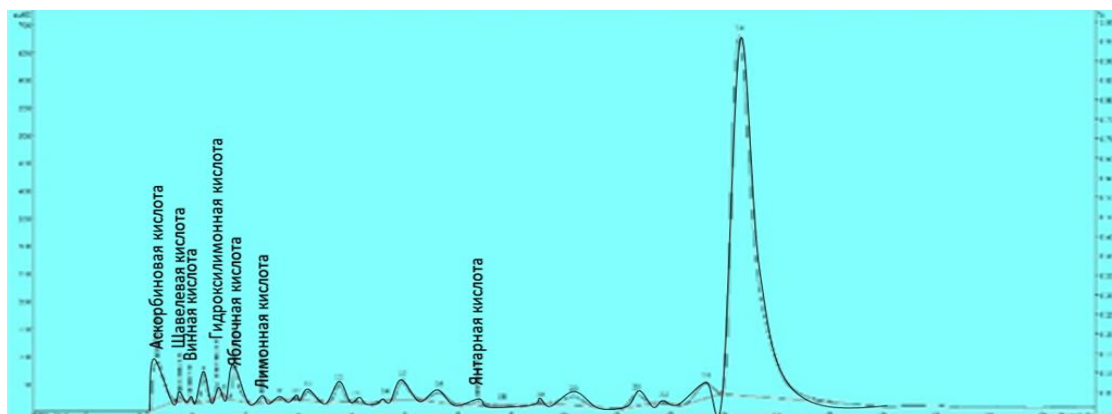


Рисунок 27 – Хроматограмма органических кислот в водном извлечении из ежевики сизой листьев. Время удерживания аскорбиновой кислоты – 2,02, щавелевой кислоты – 2,33, винной кислоты – 2,73, гидроксylimонной кислоты – 3,50, яблочной кислоты – 3,61, лимонной кислоты – 4,26, янтарной кислоты – 8,13 мин.

Готовили извлечения из сырья водное и спиртовое (концентрация спирта этилового – 70%) в соотношении сырье : экстрагент – 1:50. Нагревали в течение полчаса на кипящей водяной бане с обратным холодильником, после охлаждения фильтровали и доводили водой дистиллированной до метки [75].

В результате получена хроматограмма (рисунок 27), на которой идентифицированы следующие соединения: аскорбиновая, щавелевая, винная, гидроксимионная, яблочная, лимонная и янтарная кислоты.

Результаты количественного определения представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Содержание органических кислот в ежевики сизой листьях, установленное методом ВЭЖХ-анализа

Соединение	Спиртовое извлечение	Водное извлечение
Аскорбиновая кислота, %	1,21 ± 0,02	0,99 ± 0,03
Щавелевая кислота, %	0,011 ± 0,004	0,0091 ± 0,0010
Винная кислота, %	0,053 ± 0,003	0,037 ± 0,004
Гидроксимионная кислота, %	0,13 ± 0,06	0,270 ± 0,005
Яблочная кислота, %	0,41 ± 0,05	1,99 ± 0,07
Лимонная кислота, %	0,75 ± 0,08	0,25 ± 0,04
Янтарная кислота, %	0,062 ± 0,003	0,59 ± 0,04

Таким образом, методика пробоподготовки при применении метода кислотно-основного титрования приводит к значительному снижению суммы органических кислот, в результате чего титриметрическое определение данной группы БАВ дало сильно заниженный результат. Суммарное значение содержания идентифицированных кислот методом ВЭЖХ в водном извлечении составляет более 4%, в спиртовом – 2,6 %. Преобладающими органическими кислотами являются аскорбиновая, яблочная (в водном извлечении) и лимонная (в спиртовом извлечении).

3.4.7. Анализ витаминов

Количественное определение витаминов в ежевики сизой листьях проводилось как титриметрическими методами (аскорбиновая кислота), так и методом ВЭЖХ (водорастворимые витамины и рутин).

В анализе аскорбиновой кислоты методом титриметрии для сравнения были выбраны две методики:

- 1) Окислительно-восстановительное титрование с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия 0,044% (фармакопейный метод)
- 2) Йодометрией после извлечения аскорбиновой кислоты из сырья раствором HCl.

Методика 1

Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия 0,001М: 0,22 г 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия растворяли в 500 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды при энергичном взбалтывании (для растворения навески раствор оставляют на ночь). Раствор фильтровали в мерную колбу вместимостью 1 л и доводили объем раствора до метки. Срок годности раствора не более 7 суток при условии хранения в холодном, темном месте.

Установка титра: Несколько кристаллов (3–5) аскорбиновой кислоты растворяли в 50 мл 2% раствора серной кислоты; 5 мл полученного раствора титровали из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия до появления розового окрашивания, исчезающего в течение 1–2 минут. Другие 5 мл этого же раствора аскорбиновой кислоты титровали раствором калия йодата 0,001 М в присутствии нескольких (около 2 мг) кристаллов калия йодида и 2–3 капель раствора крахмала до появления голубого окрашивания.

Поправочный коэффициент вычисляли по формуле:

$$K = \frac{V}{V_1},$$

Где V – объем раствора калия йодата 0,001 М, пошедшего на титрование, в мл

V_i – объем раствора 2,6-дихлорфеноиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, в мл

Аналитическую пробу сырья грубо измельчали и около 20,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в фарфоровую ступку, тщательно растирали со стеклянным порошком (около 5,0 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивали в течение 10 минут. Затем смесь размешивали и извлечение фильтровали.

1,0 мл полученного фильтрата помещали в колбу для титрования вместимостью 100 мл. добавляли 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 2%, 13 мл воды, перемешивали и титровали из микробюретки 0,001 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30–60 с. Титрование продолжалось не более 2 минут. В случае интенсивного окрашивания фильтрата или высокого содержания в нем аскорбиновой кислоты (расход 0,001 раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия более 2 мл, обнаруженного пробным титрованием), исходное извлечение разбавляли водой в 2 и более раза.

Методика 2

Точную навеску измельченного сырья (6 г) растирали в ступке с 20 мл 2%-ной соляной кислоты до образования гомогенной массы в течение 10 минут. Полученную массу переносили из ступки (через стеклянную палочку и воронку) в мерную колбу на 100 мл. Ступку сполоснули несколько раз 1%-ной щавелевой кислотой, и раствор выливали в ту же колбу. Содержимое колбы доводили до метки 1%-ной щавелевой кислотой, перемешивали и выдерживали в течение 10 мин. Затем содержимое колбы фильтровали в сухую колбу. 10 мл фильтрата помещали в коническую колбу для титрования, добавляли 2 мл раствора крахмала 1% и титровали раствором йода 0,1 н до устойчивого синего окрашивания [79].

Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты в ежевики сизой листьях представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Содержание аскорбиновой кислоты в ежевики сизой листьях различными методами титрования ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,3020$) [33]

Метод	\bar{x} , %	s^2	s	Δx	RSD,%
ОВ-титрование с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия	0,068	0,00001	0,00294	0,003	4,90
Йодометрия	0,29	0,00029	0,01700	0,02	6,71

Из полученных данных следует, что большее содержание аскорбиновой кислоты в ежевики сизой листьях обнаружено при йодометрическом титровании после извлечения аскорбиновой кислоты из сырья раствором хлористоводородной кислоты 2%. Недостатком данного метода является большая относительная ошибка эксперимента [33].

3.4.8. Определение содержания водорастворимых витаминов и рутина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В результате ВЭЖХ-анализа в водном извлечении из ежевики сизой листьев из 16 обнаруженных соединений было идентифицировано 5 водорастворимых витаминов группы В, витамин С и витамин Р (рутин) (рисунок 28).

Результаты количественного определения витаминов, обнаруженных в водном извлечении из ежевики сизой листьев представлены в таблице 19.

Преобладающими витаминами в ежевики сизой листьях являются витамин С (аскорбиновая кислота) и витамин Р (рутин), содержание которых составило 774 и 40,9 мг% соответственно. Из водорастворимых витаминов группы В наибольшее содержание наблюдается у витамина В3 – $11,89 \pm 0,2$ мг% [41].

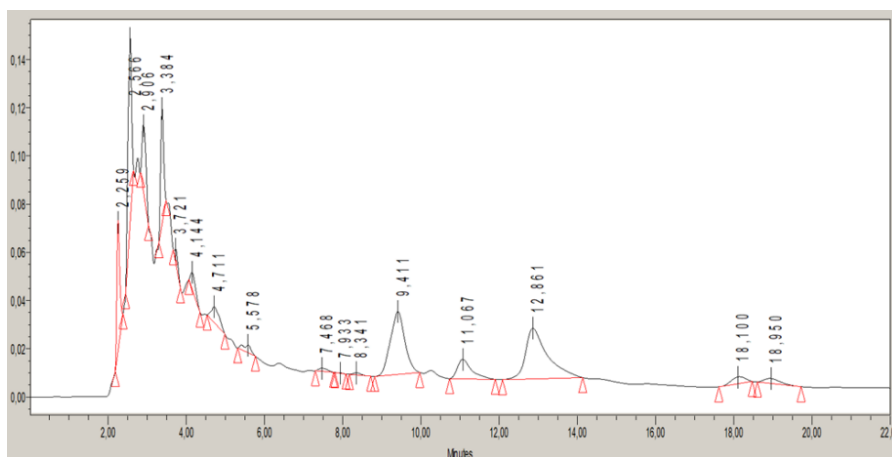


Рисунок 28 – Хроматограмма витаминов в ежевики сизой листьях (*R.caesius* L.).
 Время удерживания витамина С – 2,906 мин., витамина В3 – 3,284 мин., витамина Вс – 3,721 мин., витамина В6 – 4,711 мин., витамина В2 – 5,578 мин., витамина В1 – 8,341 мин., рутина – 11,067 мин. [41]

Таблица 19 – Содержание витаминов в ежевики сизой листьях, в пересчёте на сухое сырьё (n = 3, f = 2, P = 95 %, T (f, P) = 4,302) [41]

Соединение	Время удерживания, мин	Содержание, мг%
Витамин С (аскорбиновая кислота)	2,906 ± 0,24	774,74 ± 0,05
Витамин В3 (никотинамид)	3,284 ± 0,03	11,89 ± 0,2
Витамин Вс (фолиевая кислота)	3,721 ± 0,13	0,65 ± 0,006
Витамин В6 (пиридоксин)	4,711 ± 0,15	3,09 ± 0,1
Витамин В2 (рибофлавин)	5,578 ± 0,61	0,61 ± 0,01
Витамин В1 (тиамин)	8,341 ± 0,64	1,26 ± 0,05
Витамин Р (рутин)	11,067 ± 0,26	40,9 ± 0,8

3.4.9. Анализ витаминов методом капиллярного электрофореза

Для разработки методики количественного определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза подбирались оптимальные

параметры для лучшей экстракции: размер частиц сырья, время экстрагирования, влияние ультразвука, экстрагент.

Содержание витаминов в сырье определялось в различных условиях, представленных в таблице 20.

Полученные результаты показали, что лучшим экстрагентом для извлечения витаминов группы В и аскорбиновой кислоты является вода очищенная, так как позволяет извлекать не только большее количество указанных соединений, но и те витамины, которые не перешли в иной экстрагент (В2).

При подборе размера частиц сырья, отчетливо видна прямая зависимость между размером частиц и содержанием витаминов.

В ходе эксперимента, выявлено положительное влияние ультразвука на степень экстракции. Более продолжительное воздействие ультразвука в половине случаев дает большее содержание веществ, однако в процессе работы ультразвуковой бани, прибор нагревается, что может неблагоприятно сказываться на содержание БАВ, так как витамины являются термолабильными соединениями. Таким образом, более целесообразно будет проводить экстракцию в течение 30 мин воздействия ультразвука.

Таблица 20 – Подбор условий пробоподготовки

Витамин, мг/г	В6	В2	Аскорбиновая кислота	Никотиновая кислота	В1
Экстрагент					
Извлекающий раствор, согласно ГОСТ Р 5274 (Р-р тетрабората натрия 0,05 М + р-р сульфата натрия 0,1 М)	0,024	–	0,080	0,280	0,030
Вода очищенная	0,040	0,051	0,150	0,300	0,040
Размер частиц сырья, мм					
0,4	0,040	0,054	0,170	0,032	0,033
1	0,041	0,050	0,153	0,300	0,040

Продолжение Таблицы 20

2	0,035	0,041	0,063	0,028	0,035
3	0,030	0,023	0,043	0,028	0,016
5	0,210	0,013	0,017	0,015	–
Влияние УЗ					
Без УЗ	0,039	0,048	0,110	0,031	0,030
УЗ, 60 мин.	0,050	0,048	0,200	0,027	0,025
УЗ, 30 мин.	0,042	0,053	0,185	0,035	0,020

В результате исследования были подобраны параметры для лучшей экстракции водорастворимых витаминов из сырья для определения их содержания методом капиллярного электрофореза:

- Размер частиц сырья – 0,4 мм;
- Экстрагент – вода очищенная;
- Наличие ультразвука;
- Время экстракции – 30 мин.

Учитывая полученные результаты, разработана методика определения содержания водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях:

1,0 г (точная навеска) сырья, с размером частиц 0,4 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, добавляют 25 мл воды деионизированной и помещают на ультразвуковую баню. Экстракцию проводят при комнатной температуре в течение 30 мин. Извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем водой деионизированной до метки. Часть извлечения (около 10 мл) переносят в центрифужную пробирку, и центрифугируют в течение 5 минут при 6000 об/мин. Полученный раствор над осадком отделяют (раствор А) [40].

К 0,5 мл раствора А прибавляют 1,065 мл раствора натрия тетрабората 0,01 М, 0,24 мл раствора кислоты щавелевой 1%, 0,06 мл раствора кислоты хлористоводородной 1%. Полученную смесь перемешивают, 0,5 мл помещают в чистую пробирку типа Эппендорфа.

Условия количественного определения методом капиллярного электрофореза:

- Система капиллярного электрофореза Капель-104Т;
- Капилляр: 60/50 см, диаметр – 75 мкм;
- Ведущий электролит: боратный буфер + додецилсульфат натрия 8мМ;
- Температура анализа – 40°C;
- Время анализа – 20 мин;
- Напряжение – 25Кв, давление – 0 мбар.

Предложенная методика была валидирована по характеристикам: линейность, внутрилабораторная прецизионность, повторяемость, правильность.

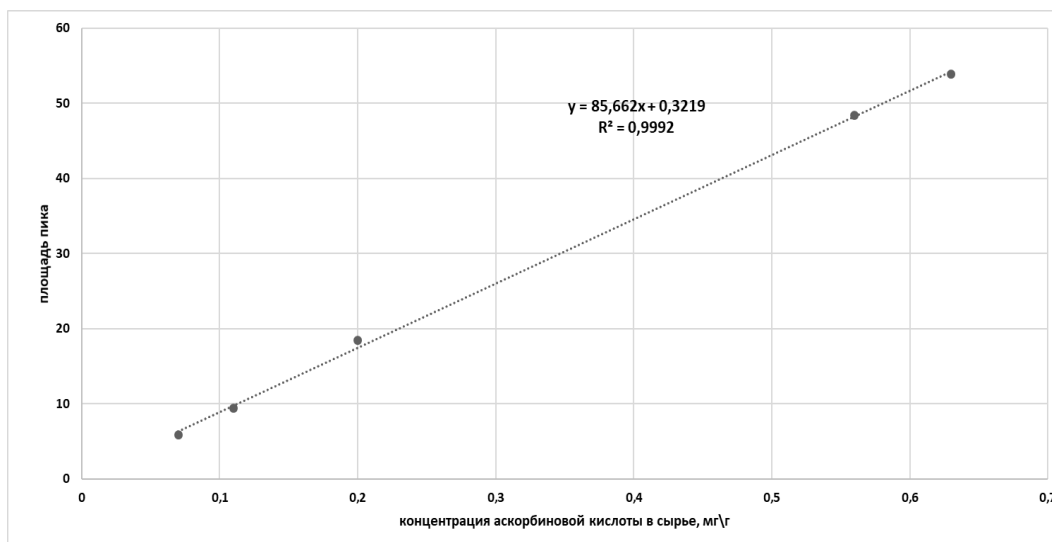


Рисунок – 29 Линейность методики количественного определения водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях [40]

Для изучения линейности методики были взяты аликвоты извлечения в объемах, соответствующих следующим концентрациям аскорбиновой кислоты в растворе: 0.11, 0.2, 0.56, 0.63 мг/г сырья. Была построена зависимость площади пика от концентрации аскорбиновой кислоты, представленная на рис 29.

Для анализа повторяемости методики проводилось определение содержания витаминов в сырье в 6 повторах в течение одного дня одним аналитиком.

Рассчитывали значение RSD времени миграции компонентов витаминного состава и их содержания (таблица 21).

Таблица 21 – Анализ повторяемости методики ($P=95\%$, $t(P;f)=2,57$) [40]

	B6		B2		Аскорбиновая кислота		Никотиновая кислота		B1	
	t, мин	X, мг/г	t, мин	X, мг/г	t, мин	X, мг/г	t, мин	X, мг/г	t, мин	X, мг/г
1	6,98	0,038	8,157	0,052	9,84	0,158	12,512	0,065	15,91	0,037
2	7,1	0,037	8,23	0,051	10,105	0,154	12,763	0,070	16,738	0,039
3	6,785	0,041	8,292	0,055	10,012	0,165	10,992	0,067	15,002	0,038
4	6,627	0,038	8,138	0,051	9,373	0,148	11,115	0,066	15,663	0,04
5	6,687	0,036	8,095	0,048	9,233	0,156	11,212	0,067	16,102	0,036
6	6,834	0,040	7,935	0,055	9,597	0,162	11,920	0,063	16,407	0,04
Среднее	6,835	0,038	8,141	0,055	9,690	0,157	11,752	0,066	15,97	0,038
RSD,%	2,38	4,43	1,38	4,45	3,31	3,49	5,92	3,22	3,46	3,89

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики проводилась в два дня, двумя аналитиками, на одном и том же оборудовании. Определялось значение RSD суммы витаминов B2, B1, аскорбиновой и никотиновой кислот в трех повторностях. Результаты испытания представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95\%$, $T(f, P) = 4,3020$) [40]

	День 1	День 2
Аналитик 1	RSD = 0,93%	RSD = 1,06%
Аналитик 2	RSD = 2,38%	RSD = 3,30%

Для определения правильности методики, к извлечению из ежевики сизой листьев, с заведомо известным содержанием витамина С, добавляли стандартный образец аскорбиновой кислоты в определенном количестве. Полученные результаты показали, что значение относительного стандартного отклонения открываемости составило 90,9% (таблица 23).

Анализ количественного определения водорастворимых витаминов проводился также методом капиллярного электрофореза (рисунок 30).

Таблица 23 – Определение правильности методики [40]

Содержание аскорбиновой кислоты в сырье, мг/г	Добавлено СО аскорбиновой кислоты, мг	Получено теоретически, мг/г	Получено практически, мг/г	Открываемость, %
0,040	0,136	0,176	0,15	85,2
	0,190	0,230	0,21	91,3
	0,272	0,312	0,3	96,1
Среднее значение открываемости, %				90,9
RSD, %				4,91

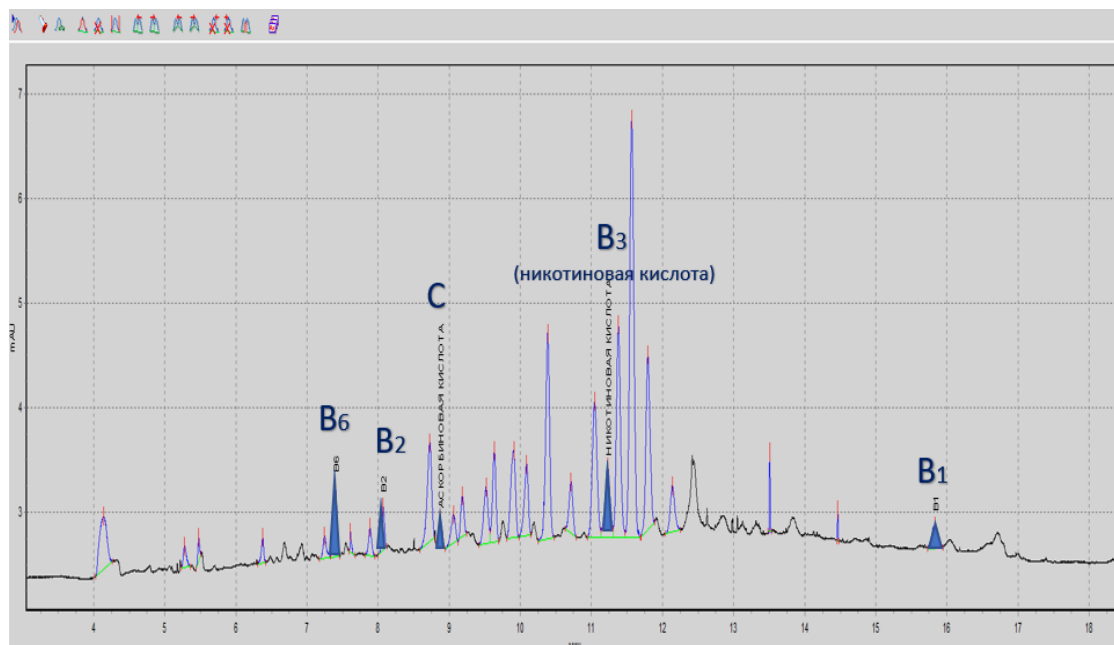


Рисунок 30 – Электрофореграмма водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях (*R. caesius* L.)

В ходе анализа сравнивалось содержание водорастворимых витаминов в сырье, заготовленном в разных местах произрастания. Результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Сравнительное изучения содержания водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях разных мест произрастания

Место произрастания	Содержание, мг/г				
	Аскорбиновая кислота	Никотиновая кислота	Витамин В ₆	Витамин В ₂	Витамин В ₁
Московская обл., Химки	0,89 ± 0,04	0,13 ± 0,01	Не обнаружено	0,036 ± 0,005	0,195 ± 0,01
г.Москва, ФГБНУ ВИЛАР	0,10 ± 0,02	0,57 ± 0,06	0,05 ± 0,02	Не обнаружено	0,35 ± 0,08

В листьях, собранных в Московской области обнаружено большое содержание витамина С. Заготовленное на территории ботанического сада ФГБНУ ВИЛАР сырье богато никотиновой кислотой и витамином В₁.

На основании полученных результатов был проведен сравнительный анализ содержания водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях, определенного разными методами (таблица 25).

Таблица 25 – Разные методы анализа в оценке содержания витаминов в ежевики сизой листьях

Метод анализа	КЭ	ВЭЖХ	ОВ-титрование 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия
Витамин Аскорбиновая кислота, мг%	890,0 ± 4,0	774,74 ± 0,05	68,0 ± 3,0
В3-амид, мг%	–	11,89 ± 0,2	–
В3-кислота, мг%	570,0 ± 6,0	–	
В6, мг%	170,0 ± 4,0	3,09 ± 0,1	
В2, мг%	8,0 ± 2,0	0,61 ± 0,01	
В1, мг%	35,0 ± 8,0	1,26 ± 0,05	
В9, мг%	–	0,65 ± 0,006	

Согласно данным таблица установлено, что при изучении витаминного состава ежевики сизой листьев методом капиллярного электрофореза, содержание

идентифицированных витаминов значительно выше, чем при анализе данных соединений иными методами. Объяснение отмеченной закономерности заключается в различии условий пробоподготовки (отсутствие нагревания при экстракции для анализа витаминов методом КЭ), в использовании образцов сырья разных сроков, мест и условий произрастания.

3.4.10. Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу

Анализ свободных сахаров в ежевики сизой листьях проводили методом спектрофотометрии. Основой метода являлось измерение ОП окрашенных растворов, полученных в результате реакции свободных сахаров с пикриновой кислотой, протекающей с образованием пикраминовой кислоты в результате восстановления сахаром нитрогруппы до аминогруппы.

Методика

Сырьё измельчали до размера частиц 0,5 мм. Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 40 мл воды и 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Содержимое колбы нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживали через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывали 10 мл воды. Марлю с остатками сырья помещали в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяли еще один раз указанным выше способом. Полученное извлечение процеживали через 5 слоев марли в ту же мерную колбу, марлю промывали, доводили объем извлечения водой до метки и перемешали (раствор А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещали 10,0 мл раствора А, прибавляли по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с рН 4,0 – 4,5. Раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл,

доводили объем раствора водой до метки и перемешали. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр (раствор Б), отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %, перемешивая. В эту же мерную колбу помещали 5,0 мл раствора Б и колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем мерную колбу охлаждали до комнатной температуры под струей холодной воды, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали (раствор В).

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 % и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл. Мерную колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры под струей холодной воды, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Оптическую плотность раствора В измеряли относительно раствора сравнения на спектрофотометре при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 10.

Результаты определения представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в ежевики сизой листьях ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,302$)

Содержание сахаров, %	\bar{x} , %	s^2	s	Δx	RSD, %
3,34 3,53 3,62	3,50	0,01362	0,11671	0,13	3,78

Сумма полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в сырье ежевики сизой, определенная методом СФМ, составила $3,50 \pm 0,13\%$ ($n=3$; $p=0,95$).

3.4.11. Определение содержания полисахаридов

Суммарное содержание полисахаридов в ежевики сизой листьях проводили методом гравиметрии по нижеизложенной методике:

Аналитическую пробу сырья измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляли 200 мл нагретой до кипения воды очищенной. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили на электрической плитке в течение 30 мин, периодически перемешивая. Экстракцию повторяли ещё 2 раза, используя по 200 и 100 мл воды соответственно.

Водные извлечения объединяли и фильтровали в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоёв марли, вложенной в стеклянную воронку и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывали водой и доводили объём раствора тем же растворителем до метки (раствор А).

25,0 мл раствора А помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 75 мл спирта 96 %, перемешивали, подогревали на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтровали через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре последовательно промывали 15 мл раствора спирта 96 % в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96 % (1:1). Фильтр с осадком сушили сначала на воздухе, затем при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы.

Таблица 27 – Содержание полисахаридов в ежевики сизой листьях (n = 3, f = 2, P = 95 %, T (f, P) = 4,302)

Содержание, %	\bar{x} , %	s^2	s	Δx	RSD, %
1,43 1,38 1,43	1,41	0,00056	0,02357	0,03	1,89

Результаты количественного определения полисахаридов в ежевики сизой листьях представлено в таблице 27.

В результате, содержание полисахаридов в листьях ежевики сизой составило $1,41 \pm 0,03\%$.

3.4.12. Анализ аминокислот методом капиллярного электрофореза

В результате исследования аминокислотного профиля ежевики сизой листьев методом капиллярного электрофореза была получена электрофореграмма, представленная на рисунке 31.

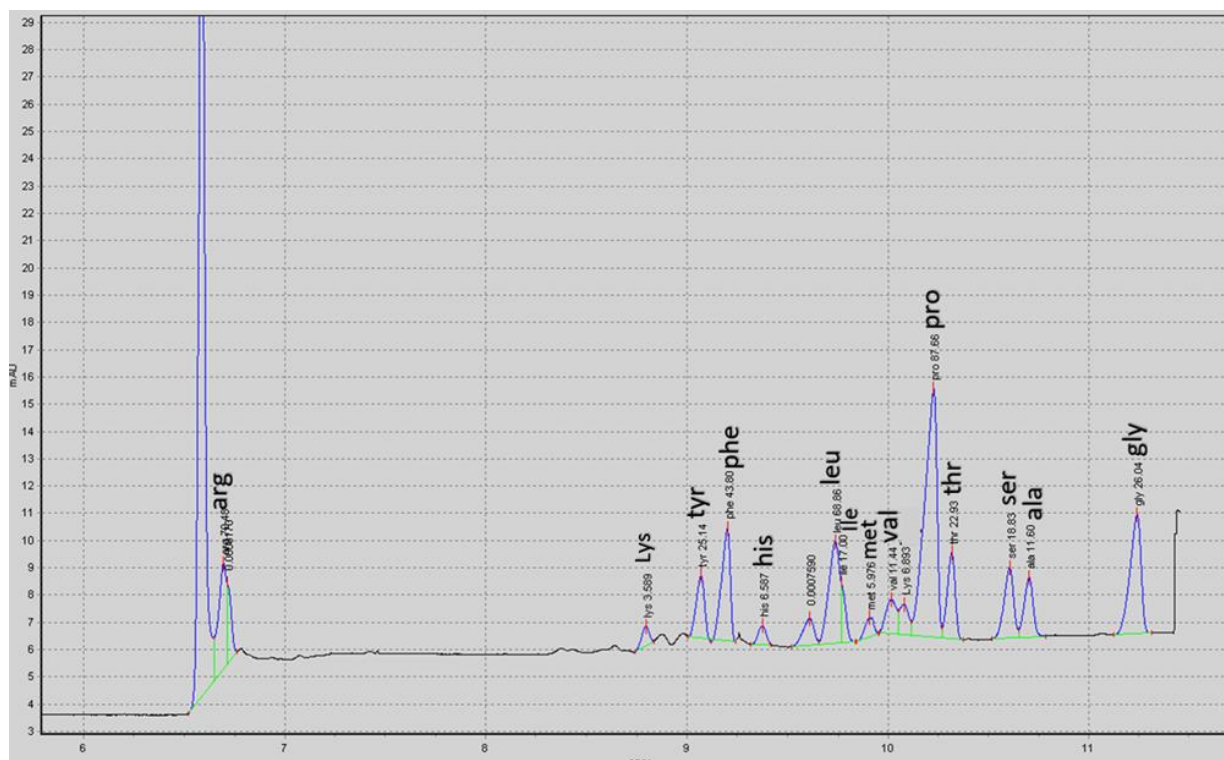


Рисунок 31 – Электрофореграмма аминокислот в ежевики сизой листьях (*R.caesius* L.) [39]

В исследуемом объекте обнаружены заменимые (АЛА, ГЛИ, ПРО, СЕР, ТИР) и незаменимые (АРГ, ВАЛ, ГИС, ИЛЕ, ЛЕЙ, ЛИЗ, МЕТ, ТРЕ, ФЕН) аминокислоты [39].

Процентное содержание указанных соединений в ежевики сизой листьях указано в таблице 28.

Таблица 28 – Содержание заменимых и незаменимых аминокислот в ежевики сизой листьях ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T (f, P) = 4,302$) [39]

Наименование	Содержание, %
Аргинин (АРГ)	$1,05 \pm 0,02$
Лизин (ЛИЗ)	$0,05 \pm 0,01$
Тирозин (ТИР)	$0,37 \pm 0,02$
Фенилаланин (ФЕН)	$0,65 \pm 0,04$
Гистидин (ГИС)	$0,10 \pm 0,02$
Лейцин (ЛЕЙ)	$1,03 \pm 0,04$
Изолейцин (ИЛЕ)	$0,25 \pm 0,01$
Метионин (МЕТ)	$0,09 \pm 0,02$
Валин (ВАЛ)	$0,17 \pm 0,02$
Пролин (ПРО)	$1,31 \pm 0,04$
Треонин (ТРЕ)	$0,34 \pm 0,05$
Серин (СЕР)	$0,28 \pm 0,02$
Аланин (АЛА)	$0,17 \pm 0,02$
Глицин (ГЛИ)	$0,39 \pm 0,04$

Исходя из полученных данных, можно заключить, что в ежевики сизой листьях преобладают такие аминокислоты, как пролин, аргинин, лейцин. Суммарное содержание идентифицированных соединений составило 6,03% [39].

3.4.13. Определение минерального состава

Одним из необходимых шагов в оценке качества ЛРС является установление концентрации тяжелых металлов и мышьяка. Предельно допустимое содержание указанных элементов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах регламентируется ОФС.1.5.3.0009.15 ГФ РФ XV изд. (таблица 29).

Результаты проведенного анализа по установлению концентрации тяжелых металлов и мышьяка с указанием метода минерализации представлены в таблице 30.

Таблица 29 – Предельно допустимое содержание тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП

Элемент	Предельно допустимая концентрация, мг/кг
Hg	0,1
As	0,5
Cd	1,0
Pb	6,0

Таблица 30 – Концентрация тяжелых металлов и мышьяка в ежевики сизой листьях (n = 3, f = 2, P = 95 %, T (f, P) = 4,302)

Элемент	Концентрация, мг/кг	Минерализация
Hg	0,0046 ± 0,0009	Мокрая
As	0,265 ± 0,053	Сухая
Cd	0,058 ± 0,012	Сухая
Pb	0,081 ± 0,016	Сухая

Концентрация тяжелых металлов (Pb, Cd, Hg) и мышьяка (As) в ежевики сизой листьях не превышало предельных допустимых отметок, что доказывает безопасность использования изучаемого сырья.

Был изучен качественный состав макро- и микроэлементов в листьях и проведена их количественная оценка (таблица 31). Элементы являются важной

составляющей для поддержания здоровья организма. Они играют роль в регуляции биохимических процессов, обеспечивают нормальное протекание синтеза белков и активации ферментов, поддержание здоровья нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной системы [39].

Таблица 31 – Содержание макро- и микроэлементов в ежевики сизой листьях ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,302$; тип минерализации – сухая) [39]

Элемент	Содержание, мг/г
Кальций (Ca)	$27,96 \pm 2,80$
Магний (Mg)	$19,66 \pm 1,97$
Калий (K)	$2,43 \pm 0,49$
	Содержание, мг/кг
Железо (Fe)	$159,10 \pm 31,82$
Марганец (Mn)	$146,33 \pm 29,27$
Медь (Cu)	$18,58 \pm 3,72$
Цинк (Zn)	$120,85 \pm 24,17$
Хром (Cr)	$5,06 \pm 1,01$

На основании полученных результатов наблюдается ряд накопления элементов в ежевики сизой листьях в порядке уменьшения их концентрации: Ca (кальций) > Mg (магний) > K (калий) > Fe (железо) \geq Mn (марганец) > Zn (цинк) > Cu (медь) > Cr (хром).

3.4.14. Определение суммы экстрактивных веществ

Показатель «экстрактивные вещества» характеризует содержание в лекарственном растительном сырье всей суммы растворенных соединений, как биологически активных, так и балластных веществ.

В качестве экстрагента в настоящем исследовании выступали вода дистиллированная и спирт этиловый в концентрации 70% и 50%. Полученные результаты представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Сумма экстрактивных веществ в ежевики сизой листьях

Сырьё	Размер частиц	Экстрагент		
		Вода	Спирт этиловый	
Ежевики сизой листья	5 мм		70%	50%
		42,75 ±0,71 %	34,30 ±0,42%	36,70 ±0,26%

Таким образом, установлено, что вода является более предпочтительным экстрагентом для получения бóльшей суммы экстрактивных веществ, что, в свою очередь, свидетельствует о преобладании в сырье водорастворимых соединений.

3.5. Определение показателей качества ежевики сизой листьев

Для стандартизации нового ЛРС необходимо установить показатели качества сырья такие, как потеря в массе при высушивании (влажность), содержание золы, измельченность, а также состав и содержание допустимых примесей.

Установленные показатели, характеризующие качество ежевики сизой листьев представлены в таблице 33.

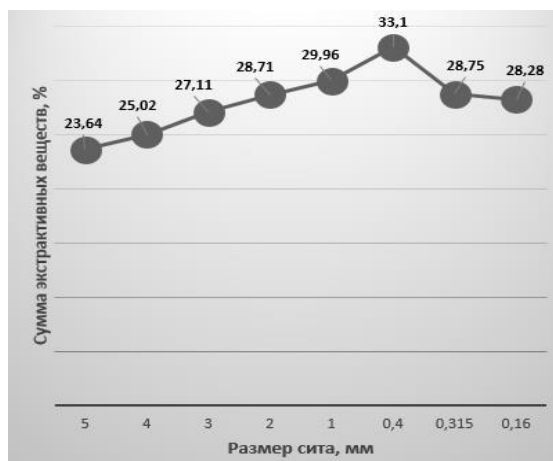


Рисунок 32 – Зависимость суммы экстрактивных веществ, извлекаемых водой из ежевики сизой листьев от размера частиц сырья

Оптимальный размер отверстий сита подбирался экспериментальным путем в зависимости от суммы экстрактивных веществ, извлекаемой из листьев разных фракций измельченности сырья (рисунок 32).

Таблица 33 – Числовые показатели качества ежевики сизой листьев

Показатель доброкачественности	Содержание
Влажность	12,5 ± 0,25%
Зола общая	9,0 ± 0,3%
Зола, нерастворимая в кислоте хлористоводородной 10%	0,82 ± 0,07%
Измельченность	Цельное сырьё: частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,18 мм – 0,36 ± 0,05%; Измельченное сырьё: частиц, не прошедших сито с размером отверстий 5 мм – 6,3 ± 0,1%, частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – 0,36 ± 0,05%
Другие части растения (стебли, цветки и плоды)	11,8 ± 0,3%

Продолжение Таблицы 33

Побуревшие, почерневшие листья	2,80 ± 0,10%
Органическая примесь (части других неядовитых растений)	0,90 ± 0,07%
Минеральная примесь (песок, мелкие камешки, частички почвы)	0,20 ± 0,09%

Таким образом, для стандартизации ежевики сизой листьев предлагаются следующие показатели доброкачественности:

- **Потеря в массе при высушивании (влажность).** Цельное и измельченное сырье – не более 13%
- **Золы общей.** Цельное и измельченное сырье – не более 9%
- **Золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте разведенной 10%.** Цельное и измельченное сырье – не более 1%
- **Измельченность сырья.** Цельное сырье: частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%; измельченное сырьё: частиц, не прошедших сито с размером отверстий 5 мм – не более 7%, частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%
- **Другие части растения (стебли, цветки и плоды).** Цельное и измельченное сырье – не более 12%
- **Побуревшие, почерневшие листья.** Цельное и измельченное сырье – не более 3%
- **Органическая примесь.** Цельное и измельченное сырье – не более 1%
- **Минеральная примесь.** Цельное и измельченное сырье – не более 0,5%

Полученные результаты использованы при разработке проекта фармакопейной статьи на «Ежевики сизой листья» (Приложение А).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В результате макроскопического анализа были уточнены и расширены признаки внешнего вида ежевики сизой листьев, с выделением отличительных: тройчатосложные листья, с короткой заостренной верхушкой, двоякозубчатым краем, серовато-зеленого цвета, более опушенные с нижней стороны; покрытые большим количеством щетинок и шипов черешок и жилки, наличие широких (до 0,5 см) прилистников.

2. При микроскопическом анализе установлены анатомо-диагностические признаки, характерные для ежевики сизой листьев: наличие извилистых клеток эпидермы, аномоцитного устьичного комплекса, простых одноклеточных, сросшихся у основания волосков на нижней эпидерме, простых одноклеточных волосков, среди которых выделяются более длинные (до 1 мм) с округлым основанием и более мелкие (100–400 мкм) с расширенным, ближе к треугольной форме основанием, железистых волосков, с 1- 2-рядной ножкой и округлой головкой, а также наличие кубических кристаллов и друз оксалата кальция в мезофилле листа.

3. Методом хроматографии подтверждено присутствие некоторых групп БАВ в ежевики сизой листьях: танинов, флавоноидов, органических кислот, водорастворимых витаминов, свободных сахаров и полисахаридов, а также аминокислот.

4. В ежевики сизой листьях была проведена количественная оценка содержания танинов ($10,01 \pm 0,26\%$), свободных сахаров ($3,5 \pm 0,13\%$), суммы органических кислот ($1,44 \pm 0,04\%$), полисахаридов ($1,41 \pm 0,03\%$), суммы флавоноидов ($0,72 \pm 0,02\%$) (содержание рутина – $0,114 \pm 0,003\%$), аминокислот – $6,03\%$. Среди водорастворимых витаминов преобладающими в ежевики сизой листьях явились витамин С – $0,77\%$ (ВЭЖХ-анализ), никотиновая кислота (ВЗ) – $0,057\%$ (метод капиллярного электрофореза).

5. Значение в концентрации тяжелых металлов и мышьяка в сырье не превышало предельных допустимых показателей. Преобладающими по количеству макроэлементами в ежевики сизой листьях явились кальций (27,96 мг/г) и магний (19,66 мг/г), преобладающими микроэлементами железо (220,16 мг/г) и марганец (146,33 мг/г).

6. Определены и проанализированы показатели доброкачественности ежевики сизой листьев (потеря в массе при высушивании, процентное содержание золы общей и золы нерастворимой в кислоте хлористоводородной, органической и минеральной примеси, побуревших/почерневших листьев, других частей растения, а также показатели измельченности и содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой, суммы дубильных веществ в пересчете на танин и суммы флавоноидов в пересчете на рутин).

ГЛАВА 4. ИЗГОТОВЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ ЛИСТЬЕВ

4.1. Изготовление

Водные извлечения из сырья представляют собой настои и отвары, изготовление которых регламентируется ОФС.1.4.1.0018 “Настои и отвары” ГФ XV изд. При отсутствии специальных указаний соотношение ЛРС и воды очищенной для изготовления водных извлечений составляет 1:10. Из-за способности ЛРС поглощать некоторое количество экстрагента, следует прибегать к использованию коэффициента водопоглощения (K_v). Данный коэффициент показывает, на сколько следует увеличить массу сырья и объем экстрагента, для получения заданного объема извлечения.

Для ежевики сизой листьев согласно ОФС.1.5.3.0012 ГФ XV изд. был рассчитан расходный коэффициент водопоглощения, значение которого составило $4,4 \pm 0,1$.

Для получения водного извлечения ежевики сизой листья помещали в перфорированный стакан и далее в инфундирку. К сырию добавляли необходимый объем воды, взятый с учетом K_v , помещали на кипящую водяную баню и настаивали в течение 15 мин. Затем инфундирку остужали при комнатной температуре в течение 45 мин. Полученное водное извлечение процеживали, отжимая остаток растительного сырья, и доводили до требуемого объема извлечения водой очищенной.

Объем воды, необходимый для приготовления требуемого количества водного извлечения (V), рассчитывали, как сумму требуемого объема извлечения (V_1) и дополнительного количества воды очищенной, взятого с учетом K_v . В свою очередь, V_1 рассчитывали путем умножения прописанной массы (M) лекарственного растительного сырья на K_v :

$$V = V_1 + M \times K_v.$$

4.2. Анализ водного извлечения на основе ежевики сизой листьев

Были определены характеристики качества полученного водного извлечения: значение рН, вкус, запах, цвет, процент сухого остатка, а также проведена количественная оценка содержания БАВ. Общие результаты представлены в таблицах 34 и 35.

С целью определения сухого остатка, 5 мл полученного водного извлечения выпаривали в выпарительной чаше на водяной бане досуха, сушили в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 100 – 105°С, охлаждали в эксикаторе и взвешивали.

Количественный анализ БАВ в водном извлечении проводился по фармакопейным методикам, изложенных выше (глава 3, п.3.4.2, 3.4.4 – 3.4.6).

Таблица 34 – Результаты анализа водного извлечения из ежевики сизой листьев

Показатель	Результат
Цвет	Темно-коричневый
Запах	Пряный, специфический
Вкус	Кисло-горький, вяжущий
рН	5,6
Сухой остаток,%	2,89 ± 0,2
Содержание суммы дубильных веществ в пересчёте на танин,%	0,43 ± 0,2
Содержание суммы органических кислот (пересчёт на яблочную),%	0,38 ± 0,03
Содержание витамина С, мг%	4,2 ± 0,2
Содержание суммы флавоноидов (пересчёт на лютеолин-7-0-гликозид),%	0,07 ± 0,005

Максимум поглощения водного извлечения после прибавления раствора $AlCl_3$ совпал с максимумом поглощения стандартного образца лютеолина-7-0-гликозида в комплексе с $AlCl_3$, в связи с чем количественное определение

флавоноидов в извлечении проводилось в пересчёте на лютеолин-7-0-гликозид при длине волны 399-400 нм.

Таблица 35 – Содержание витаминов в настое из ежевики сизой листьев, измеренное методом ВЭЖХ ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,302$) [41]

Соединение	Время удерживания, мин	Содержание, мг%
Витамин С (аскорбиновая кислота)	$2,906 \pm 0,24$	$67,79 \pm 0,004$
Витамин В3 (никотинамид)	$3,284 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,02$
Витамин Вс (фолиевая кислота)	$3,721 \pm 0,13$	$0,057 \pm 0,003$
Витамин В6 (пиридоксин)	$4,711 \pm 0,15$	$0,27 \pm 0,01$
Витамин В2 (рибофлавин)	$5,578 \pm 0,61$	$0,053 \pm 0,001$
Витамин В1 (тиамин)	$8,341 \pm 0,64$	$0,11 \pm 0,004$
Витамин Р (рутин)	$11,067 \pm 0,26$	$3,58 \pm 0,07$

Результаты количественного анализа БАВ в настое в сравнении с исследуемым содержанием БАВ в сырье показали, что в водное извлечение переходит 26,4% органических кислот, 6,2% аскорбиновой кислоты, 4,3% дубильных веществ и 3,6% флавоноидов (рисунок 33). Количество водорастворимых витаминов (группа В) и рутина в водном извлечении в 11,4 ниже, чем их содержание в пересчёте на сухое сырьё (рисунок 34).

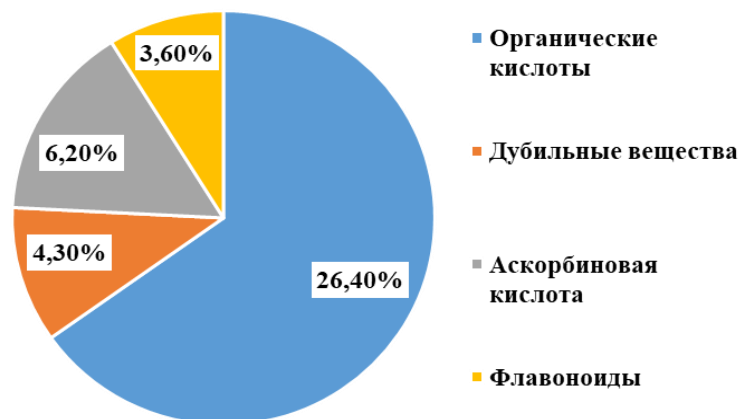


Рисунок 33 – Процент перехода различных групп БАВ в водное извлечение из сырья

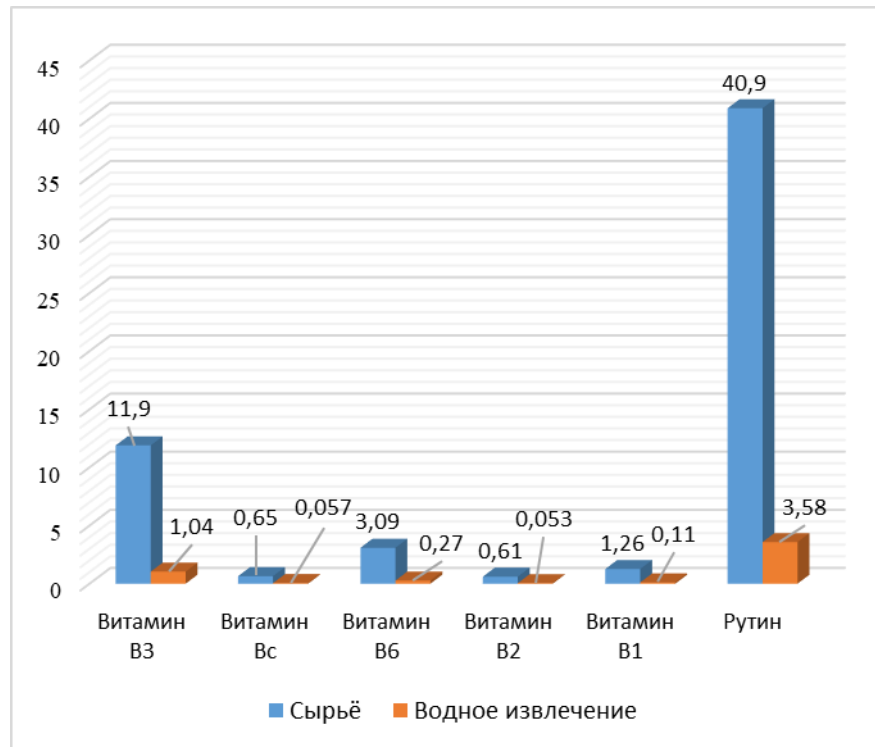


Рисунок 34 – Содержание водорастворимых витаминов и рутина в ежевики сизой листьях и в извлечении из сырья, определенное методом ВЭЖХ, мг% [41]

Зная значения суточной потребности организма взрослого человека в водорастворимых витаминах и рутине, можно посчитать процент найденного содержания витаминов в водном извлечении от этого значения [41].

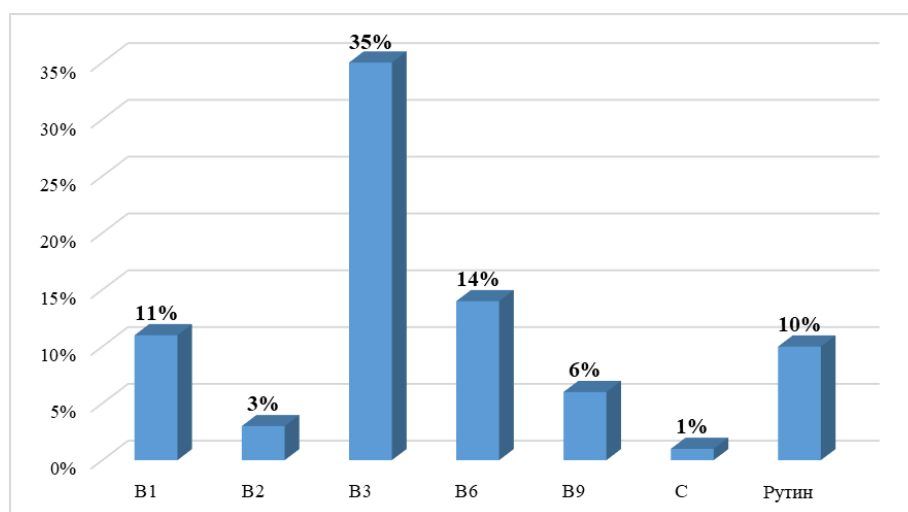


Рисунок 35 – Процентное содержание витаминов в водном извлечении из ежевики сизой листьев (*R.caesius* L.) от минимального значения суточной потребности организма в указанных соединениях [41]

Как видно из рисунка 35, при одноразовом приёме водного извлечения из ежевики сизой листьев суточная потребность человека в витаминах не достигается [41]. Меньше всего удовлетворится потребность в аскорбиновой кислоте – 1%. Больше значение процентного содержания водорастворимого витамина от суточной потребности – 35% (для витамина В3). Причиной небольшого перехода витаминов из листьев в водное извлечение является, вероятно, нагревание в технологии изготовления. В связи с термолабильностью витаминов необходимо решать вопрос выбора технологии получения водного извлечения, что требует дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Проведен анализ водного извлечения из ежевики сизой листьев. Были определены характерные цвет, запах и вкус извлечения, измерено значение рН, которое составило 5,6, найдено содержание сухого остатка – 2,89%.

2. В водном извлечении из ежевики сизой листьев титриметрически определена содержание дубильных веществ (в пересчете на танин) – 0,43%, органических кислот (в пересчете на яблочную) – 0,38%, аскорбиновой кислоты – 0,0042%, а также методом спектрофотометрии определена сумма флавоноидов (в пересчете на лютеолин-7-0-гликозид) – 0,07%.

3. Методом ВЭЖХ проведен анализ содержания водорастворимых витаминов в водном извлечении из ежевики сизой листьев. Преобладающим витамином является витамин С (кислота аскорбиновая), содержание которого – 67,79 мг%.

4. Изучена степень перехода некоторых групп БАВ из сырья в водное извлечение на его основе. Установлено, что в извлечение переходит 4,3% дубильных веществ, 26,4% органических кислот, 6,2% аскорбиновой кислоты и 3,6% флавоноидов. Водорастворимых витаминов и рутина, определенных методом ВЭЖХ в водном извлечении в 11,4 ниже, чем в сырье.

ГЛАВА 5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

5.1. Острая токсичность

На первом этапе фармакологических исследований изучались параметры острой токсичности водного извлечения из ежевики сизой листьев по методу Кербера. Было выявлено, что у мышей всех групп в течение всего срока наблюдения (14 дней) не было клинических признаков интоксикации. Клинико-функциональный статус у всех животных не имел отклонений от физиологического состояния, присущего мышам данной возрастной группы. В течение опытного периода гибели мышей в опытных группах не было. Животные были активны, охотно поедали корм, адекватно реагировали на внешние раздражители. Животные контрольной группы также оставались клинически здоровыми.

Таким образом, при изучении острой токсичности водного извлечения из ежевики сизой листьев не установлены показатели ЛД₅₀, так как введенные дозы исследуемого водного извлечения в желудок мышам не вызывали гибели животных. В соответствии с классификацией токсичности химических веществ представленное на исследование извлечение из ежевики сизой листьев является малотоксичным веществом [5].

5.2. Антирадикальная активность

Измерение антирадикальной активности проводилось *in vitro* путём проведения реакции ДФПГ с антирадикалом, в результате чего происходит восстановление ДФПГ и снижается ОП раствора [32].

На основании полученных результатов изучения антирадикальной активности водного извлечения из ежевики сизой листьев (таблица 36) была построена зависимость процента связывания радикала от концентрации извлечения

(сухой остаток, мкг/мл) (рисунок 36). Оптимальные значения разведений получали экспериментальным путём.

Таблица 36 – Антирадикальная активность водного извлечения из ежевики сизой листьев ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95\%$, $T(f, P) = 4,302$)

Разведение*	Концентрация извлечения, мкг/мл	% связывания радикалаДФПГ	IC50, мкг/мл
1:160	82,5	$17,9 \pm 0,28$	$43,6 \pm 0,4$
1:320	41,2	$26,8 \pm 3,05$	
1:640	20,6	$42,3 \pm 0,37$	
1:800	16,5	$47,0 \pm 0,3$	
1:4000	3,3	$77,3 \pm 0,46$	

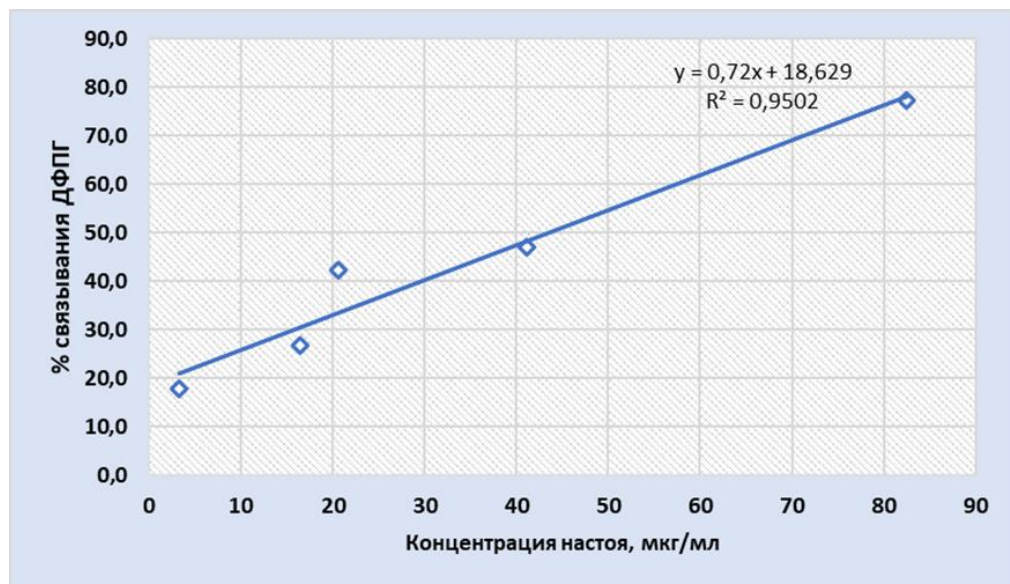


Рисунок 36 – Зависимость процента связывания свободного радикалаДФПГ от концентрации извлечения ежевики сизой листьев

Таким образом, значение IC50 водного извлечения из ежевики сизой листьев составило $43,6 \pm 0,4$ мкг/мл, что лишь в 1,5 раза ниже антирадикальной активности раствора аскорбиновой кислоты (препарат сравнения) (таблица 37).

Антирадикальная активность водного извлечения ежевики сизой листьев оценивается как высокая даже при больших разведениях, что свидетельствует о высоком содержании в сырье соединений фенольной природы (флавоноидов, дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот), витаминов (витамин С) [126].

Таблица 37 – Антиадикальная активность раствора аскорбиновой кислоты ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95 \%$, $T(f, P) = 4,302$)

Концентрация, мкг/мл	% связывания радикала ДФПГ, %	IC50, мкг/мл
100	$93,2 \pm 1,8$	$29,1 \pm 0,64$
50	$76,0 \pm 1,0$	
10	$49,1 \pm 3,1$	
5	$33,3 \pm 2,3$	
1	$13,0 \pm 0,9$	

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, учитывая, что авторы изучали антирадикальную активность ежевики сизой, собранной в разное время [126].

5.3. Противовоспалительная активность

В исследовании по изучению противовоспалительной активности участвовало 90 мышей-самцов.

Таблица 38 – Результаты изучения противовоспалительной активности объектов исследования при четырёхдневном введении мышам

Группы животных, $n=10$	Противовоспалительный эффект	% угнетения отёка
Контрольная	$114,5 \pm 5,1$	–
Извлечение из листьев ежевики	$90,6 \pm 3,3$	21
Настой цветков календулы	$89,2 \pm 1,8$	22

Объект исследования и препарат сравнения вводили мышам в дозе 17 мл/кг внутрижелудочно согласно инструкции и коэффициенту пересчёта доз [59]. Формалиновый отёк вызывали однократным введением 0,05 мл 1% формалина под

апоневроз задней правой лапки мыши через час после последнего введения препаратов. Вещества вводили в течение 4 дней до введения формалина. Через 3 часа после введения формалина проводили определение антиэкссудативного эффекта с использованием формулы:

$$\% \text{ угнетения отёка} = \frac{P_k - P_o}{P_k} \times 100,$$

где P_k – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных контрольной группы; P_o – разность масс лапок с отёком и без отёка у опытной группы.

Полученные результаты представлены в таблице 38.

Как видно из таблицы, водное извлечение ежевики сизой листьев при четырёхдневном введении обладало противовоспалительным действием: формалиновый отёк уменьшался на 21% по сравнению с контрольной группой животных, в то время как настой цветков календулы уменьшал формалиновый отёк на 22% по сравнению с контрольной группой. Очевидно, что под влиянием БАВ, прежде всего фенольной природы, содержащихся в ежевики сизой листьях, проявляется их противовоспалительная активность, что подтверждается литературными данными [126].

5.4. Антимикробная активность

В результате изучения бактериостатической активности установлено, что водное извлечение из ежевики сизой листьев, обладало умеренным бактериостатическим действием в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 209-Р и грамотрицательных бактерий *Proteus vulgaris* АТСС в разведении 1:16, в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* АТСС 25922 – 1:8 и *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027 – 1:64.

При изучении фунгистатического действия извлечения из ежевики сизой листьев установлено, что оно обладало умеренной фунгистатической активностью в отношении мицелиального гриба *Microsporum canis* 352 – в разведении 1:16 и

слабой активностью в отношении дрожжеподобного гриба *Candida albicans* ATCC 10231 в разведении 1:4.

Результаты изучения бактериостатической и фунгистатической активности представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Результаты изучения антимикробной активности водного извлечения в опытах *in vitro*

Объект исследования	<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6896	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Microsporium canis</i> 352
Разведение извлечения	1:16	1:8 част. 1:16	1:16 част. 1:32	1:64	1:4	1:16

Полученные данные свидетельствуют о том, что водное извлечение из ежевики сизой листьев обладает как бактериостатической активностью в отношении патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий в разведении 1:8–1:64, так и фунгистатической активностью в отношении мицелиальных и дрожжеподобных грибов в разведении 1:4–1:16.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Изучены антирадикальная, противовоспалительная и антимикробная активности водного извлечения из ежевики сизой листьев. В результате исследования все указанные свойства были доказаны.

2. Значение IC₅₀ (антирадикальная активность) водного извлечения составило $43,6 \pm 0,4$ мкг/мл. В сравнении с препаратом сравнения – раствором аскорбиновой кислоты – антирадикальная активность водного извлечения из ежевики сизой листьев оценивается как высокая.

3. Установлено, что водного извлечение из ежевики сизой листьев при четырёхдневном введении обладало противовоспалительным действием (снижение формалинового отёка на 21%).

4. Показано, что водное извлечение из ежевики сизой листьев обладало умеренным бактериостатическим действием в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

5. При изучении фунгистатического действия водного извлечения из ежевики сизой листьев установлено, что оно обладало умеренной фунгистатической активностью в отношении мицелиального гриба *Microsporium canis* и слабой активностью в отношении дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных комплексных фармакогностических исследований был разработан новый вид лекарственного растительного сырья «Ежевики сизой листья».

Основные результаты экспериментальных исследований ежевики сизой листьев нашли отражение в следующих выводах:

1. Проведенный информационный анализ показал, что степень изученности ежевики сизой листьев в настоящее время недостаточна. На российском рынке ЛРП ежевики сизой отсутствуют; нормативная документация, регламентирующая качество сырья не разработана. В связи с этим, требуется детальное изучение ежевики сизой листьев с последующей стандартизацией сырья.

2. В результате проведенных исследований уточнены и расширены характеристики внешнего вида и анатомо-диагностические признаки ежевики сизой листьев, позволяющие осуществить идентификацию сырья, такие как строение листа (сложный, тройчатый), характер верхушки (коротко-заостренная), наличие широкого прилистника, обильное опушение, цвет (сероватый); наличие простых, сросшихся у основания волосков, железистых волосков, извилистая форма клеток эпидермы, кубические кристаллы оксалата кальция в мезофилле. Дана биометрическая характеристика выявленных признаков и проведена их визуализация.

3. Физико-химическими методами изучен состав БАВ ежевики сизой листьев. Доказано наличие некоторых флавоноидов (рутин, цинарозид), дубильных веществ (галловая кислота и танин), некоторого ряда органических кислот (лимонная, винная и янтарная), полисахаридов и свободных сахаров, незаменимых и заменимых аминокислот и водорастворимых витаминов (аскорбиновая кислота и витамины группы В). Установлено содержание упомянутых групп БАВ различными фармакопейными методами анализа: суммы флавоноидов – 0,72% (СФМ), суммы дубильных веществ – 10,01% (перманганатометрия), аскорбиновой

кислоты (витамина С) – 0,067%, 0,77%, 0,089% (титриметрия, ВЭЖХ, и КЭ соответственно), водорастворимых витаминов группы В – суммарно 0,0175% и 0,117% (ВЭЖХ и КЭ соответственно), органических кислот – 1,44% и 4,1% (титриметрия и ВЭЖХ соответственно), свободных сахаров – 3,5% (СФМ), полисахаридов – 1,41% (гравиметрия), аминокислот – 6,03% (КЭ). Установлен минеральный состав сырья: Са (27,96 мг/г), Mg (19,66мг/г), К (4,36 мг/г), Fe (220,16мг/кг), Mn (146,33мг/кг), Zn (120,85мг/кг), Cu (50,76мг/г), Cr (5,06мг/кг).

4. Определены числовые показатели ежевики сизой листьев: влажность, зола общая и нерастворимая в хлористоводородной кислоте, измельченность, допустимые примеси, содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин, суммы флавоноидов в пересчете на рутин, экстрактивных веществ, извлекаемых водой.

5. Проведен анализ водного извлечения ежевики сизой листьев в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд., дана его характеристика, определены числовые показатели (рН=5,6, сухой остаток=2,89%, содержание дубильных веществ – 0,43%, органических кислот – 0,38%, витамина С (аскорбиновой кислоты) – 4,2мг%, флавоноидов – 0,07%).

6. Установлено, что водное извлечение ежевики сизой листьев относится к практически нетоксичным. Экспериментально доказана противовоспалительная, антимикробная и антирадикальная активность водного извлечения ежевики сизой листьев. Установлено, что водное извлечение ежевики сизой листьев обладало противовоспалительным действием (снижение формалинового отёка на 21%); проявляло умеренное бактериостатическое действие в отношении грам(+) бактерий *Staphylococcus aureus* и грам(-) бактерий *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также фунгистатическую активность в отношении *Microsporum canis* и слабую активность в отношении *Candida albicans*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в ходе настоящей диссертационной работы результаты качественного и количественного анализа БАВ, установления характеристик подлинности и доброкачественности ежевики сизой листьев могут быть использованы для научно-исследовательской деятельности в испытательных лабораториях. Данные фармакологических исследований и оценки безопасности служат основой для создания новых ЛРП. Результаты исследования расширяют представление о растениях рода *Rubus* и новом ЛРС – ежевики сизой листьях. На основе полученных результатов исследования был разработан проект фармакопейной статьи «Ежевики сизой листья – *Rubi caesii folia*», а также инструкция по заготовке и сушке сырья.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты диссертационной работы могут являться основой для исследований по разработке оптимальной лекарственной формы из ежевики сизой листьев, по выявлению не изученных в рамках данной работы фармакологических свойств сырья и по модификации аналитических методик количественного определения БАВ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ААС – атомно-адсорбционная спектроскопия
- АРА – антирадикальная активность
- БАВ – биологически активные вещества
- БАД – биологически активная добавка
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГФ РФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации
- ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
- КЭ – капиллярный электрофорез
- ЛРП – лекарственный растительный препарат
- ЛРС – лекарственное растительное сырье
- ОП – оптическая плотность
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПФ – подвижная фаза
- СВП – сосудисто-волокнистые пучки
- СО – стандартный образец
- СФМ – спектрофотометрия
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УЗ – ультразвук
- УФ – ультрафиолет
- ФС – фармакопейная статья

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ перспективных лекарственных растений для создания антиоксидантного лечебно-профилактического фитосбора / О.В. Демешко, А.П. Домарев, В.Н. Ковалев [и др.] // Вестник фармации. – 2019. – №. 3 (85). – С. 82–87.
2. Антиоксидантные и мембранопротекторные свойства фитопрепаратов полученных из растительного сырья / Р.С. Утегалиева, М.К. Мурзахметова, А.Н. Аралбаева, А.Т. Маматаева // Znanstvena Misel. – 2021. – №. 54. – С. 18–21.
3. Антоцианы плодов представителей растений семейства Rosaceae и Ericaceae и их антиоксидантная активность / В. Н. Решетников, Н. Ю. Колбас, О. В. Чижик [и др.] // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. В 2-х частях, Минск, Беларусь, 06–08 июня 2017 года. Том Часть 2. – Минск, Беларусь: Медисонт, 2017. – С. 106-108.
4. Аюгова, А. С. Фармакогностический анализ морошки обыкновенной листьев (*Rubus chamaemorus* L.) / А. С. Аюгова // Молодая фармация - потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 14 марта – 18 2022 года. – Санкт-Петербург: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2022. – С. 68-76.
5. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – №. 3. – С. 32–34.
6. Брежнева, Т. А. Получение и исследование состава экстракционных фитопрепаратов листьев ежевики садовой / Т. А. Брежнева, М. В. Попова, А. И.

Сливкин // Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений: Материалы Международной научно-практической конференции, Симферополь, 13–14 июня 2019 года / Научный редактор В.С. Паштецкий. Ответственные редакторы Л.А. Радченко, Н.В. Невкрытая. – Симферополь: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2019. – С. 222-225.

7. Брежнева, Т. А. Листья ежевики разных сортов как перспективный источник биологически активных веществ - антиоксидантов / Т. А. Брежнева, М. В. Попова, А. И. Сливкин // Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства" по направлению "Метаболомика и качество жизни: Материалы II Международной научной конференции, Москва, 06–07 июня 2019 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2019. – С. 66-71.

8. Васина, Я.А. Теоретические основы аналитической химии. [Текст]: учеб. пос. / Я.А. Васина, И.Л. Смельцова; Нижегород. гос. архитектур. - строит. ун-т – Н. Новгород: ННГАСУ, 2022 – 58 с, ил. 17 ISBN 978-5-528-00505-8.

9. Вдовенко-Мартынова, Н.Н. Разработка норм качества листьев ежевики *Rubus caesius* (L.) / Н.Н. Вдовенко-Мартынова, С.Н. Степанюк - Текст: непосредственный // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Центрально-Чернозёмного научного центра РАМН и отделения РАЕН, посвящённой 76-летию Курского государственного медицинского университета / КГМУ – Курск, 2011. – С. 212.

10. Вдовенко-Мартынова, Н.Н. Фармакогностическое исследование плодов ежевики сизой *Rubus caesius* (L.) флоры Северного Кавказа / Н.Н. Вдовенко-Мартынова, Н.В. Кобыльченко, Т.И. Блинова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №. 1. – С. 372–372.

11. Выделение, идентификация и количественное определение антраценпроизводных методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей

рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации / А.М. Полуянов, А.Ю. Соколова, Е.А. Малашенко // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11. – №. 4. – С. 216–225.

12. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Методические указания к лабораторной работе. – Метод. указания / Казан. нац. иссл.технол. ун-т; Сост.: Р.И. Саяхов, Е.А. Кривошеев. Казань, 2020 –21 с.

13. ГОСТ 31483-2012 "Премиксы. Определение содержания витаминов: В1 (тиаминхлорида), В2 (рибофлавина), В3 (пантотеновой кислоты), В5 (никотиновой кислоты и никотинамида), В6 (пиридоксина), Вс (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза": утвержден и введен в действие приказом Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 8 октября 2012 г. N 471-ст ГОСТ Р 52741 – 2007 отменен с 1 июля 2013: введен впервые: 01.07.2013 (Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу) // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200095471> (дата обращения: 10.09.2024).

14. Государственная фармакопея РФ XIII издания. Минздрав РФ [Официальный сайт]. URL: <http://www.femb.ru/feml>. Москва, 2015.

15. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Минздрав РФ [Официальный сайт]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>. Москва, 2018.

16. Государственная фармакопея РФ XV изд. Минздрав РФ [Официальный сайт]. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>. Москва, 2023.

17. Грюнер, Л.А. Микроскульптурные и морфометрические признаки листьев и пыльцы некоторых представителей подрода ежевики / Л.А. Грюнер, С.М. Мотылёва, Л.Г. Семёнова // Современное садоводство—Contemporary horticulture. – 2016. – №. 1 (17). – С. 63–71.

18. Губанов, И.А. Дикорастущие полезные растения СССР / отв. ред. Т. А. Работнов. / И.А. Губанов, И.Л. Крылова, В.Л. Тихонова — М.: Мысль, 1976. — С. 171. — 360 с. — Текст: непосредственный.

19. Дергачева, Ж.М. Гипогликемическая активность настоя из листьев ежевики сизой на модели аллоксан-индуцированного сахарного диабета у крыс / Ж.М. Дергачева, Н.С. Гурина, А.Ю. Мизуло // Рецепт. – 2014. – №. 1. – С. 93–97.
20. Джабоева, А.С. Фенольный комплекс дикорастущей ежевики / А.С. Джабоева, Р.М. Жилова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2006. – №. 1. – С. 30–32.
21. Джабоева, А.С. Фенольный комплекс дикорастущей ежевики / А.С. Джабоева, Р.М. Жилова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2006. – №. 1. – С. 30–32.
22. Дубовик, Д.В. Род *Rubus* L. (Rosaceae Juss.) во флоре Беларуси / Д.В. Дубовик – Текст: непосредственный // Ботаника (исследования): сборник научных трудов / Национальная академия наук Беларуси – Минск, 2018. – С. 7–31.
23. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника / О.В. Евдокимова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – №. 2. – С. 155–160.
24. Ежевика сизая – *Rubus caesius* // ecosystema.ru [сайт]. Режим доступа – URL: <https://ecosystema.ru/08nature/fruits/038.htm> (дата обращения: 21.06.2022).
25. Ежевика сизая – *Rubus caesius* L. // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров – М.: Т-во науч. Изд. КМК, Ин-т технологических исследований, 2013 – 583с. – Текст: непосредственный.
26. Ежевика Сизая (*Rubus caesius*) // iNaturalist: [сайт]. – URL: <https://www.inaturalist.org/> (дата обращения: 06.01.2025).
27. Жилкина, В.Ю. Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в сборе витаминном / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №. 1. – С. 156–159.

28. Жураев, Ж.М. Лекарственные свойства и применение ежевики сизой в побочных целях (*Rubus caesius*) / Ж.М. Жураев, Д.А.К Асадуллаева // *Science and innovation*. – 2023. – Т. 2. – №. Special Issue 11. – С. 325–329.

29. Иванцова, Л.В. К исследованию антиоксидантной активности листьев персика обыкновенного-*persika vulgaris folia* / Л.В. Иванцова, В.Д. Белоногова, Д.К. Гуляев // *Традиционная медицина*. – 2019. – №. 3 (58) 2019. – С. 10–13.

30. Идентификация органических кислот методом ТСХ в извлечениях из растительных объектов / О.В. Тринеева, И.И. Сафронова, Е.Ф. Сафронова, А.И. Сливкин // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2013. – Т. 13. – №. 6. – С. 896–901.

31. Изучение противодиарейной активности плодов ежевики сизой, произрастающей на территории узбекистана / М.Т. Муллажонова, Ю.А. Исматуллаева, Б.А. Имамалиев, Г.К. Рахимова // *Farmatsevtika jurnali*. – 2017. – Т. 4. – С. 83–86.

32. Изучение флавоноидного состава и антиоксидантной активности ноотропного сбора / Е.А. Доровских, Д.А. Тращенко, Т.Ю. Ковалева, В.А. Ермакова // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2020. – Т. 23. – №. 4. – С. 33–37.

33. Ильина, М. Б. Анализ аскорбиновой кислоты в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / М. Б. Ильина, Е. В. Сергунова // *Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее: Сборник научных материалов IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной году педагога и наставника, Орехово-Зуево, 21 апреля 2023 года*. – Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет, 2023. – С. 96-99.

34. Ильина, М. Б. Изучение соединений фенольной природы и аскорбиновой кислоты в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / М. Б. Ильина // *Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 28 марта – 02 2024 года*. – Санкт-

Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 696-698.

35. Ильина, М. Б. Микроскопический анализ сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / М. Б. Ильина, Е. В. Сергунова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 2022 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2022. – С. 252-257.

36. Ильина, М. Б. Определение содержания суммы флавоноидов в листьях ежевики сизой и аллеганской (*Rubus caesius* L. и *Rubus allegheniensis* Porter) разных форм произрастания / М. Б. Ильина, Е. В. Сергунова // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник научных трудов X Международной научно-практической конференции молодых ученых, Москва, 15–16 декабря 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2022. – С. 231-235.

37. Ильина, М. Б. Применение тонкослойной хроматографии в анализе биологически активных веществ листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / М. Б. Ильина, Е. В. Сергунова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой, Н.А. Дьяковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2023. – С. 263-270.

38. Ильина, М.Б. Сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. nessensis* Hall) / М.Б. Ильина, Е.В.

Сергунова, Н.В. Бобкова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12. – №. 3. – С. 111–117.

39. Ильина, М. Б. Изучение минерального и аминокислотного состава листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2024. – №3. – С. 208–215.

40. Ильина, М.Б. Применение метода капиллярного электрофореза в анализе водорастворимых витаминов представителей рода *Rubus* L. / М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14 – №1. – С. 274–283.

41. Ильина, М.Б. Состав и содержание некоторых витаминов в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) и водных извлечениях на их основе / М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова // Фармация. – 2024. – Т. 73. – №3. – С. 33–37.

42. Ильина, М.Б. Сравнительный анализ биологически активных веществ в листьях и плодах ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова // Фармация. – 2024. – Т.73. – №7. – С. 14–19.

43. Изучение гипогликемической активности плодов ежевики сизой, произрастаемой на территории Узбекистана / Б.А. Имамалиев, Ю.А. Исматуллаева, М.Т. Муллажонова [и др.] // Фармацевтический вестник Узбекистана. – 2022. – №4. – С. 44–47.

44. Исследование эфирного масла сырья хмеля обыкновенного / Г.М. Латыпова, С. Ф. Шафикова, Р. Я. Давлетшина [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20. – №. 2. – С. 87-92.

45. Казначеева, Е.В. Фармакогностическое изучение и стандартизация листа малины (*Rubus idaeus* L.) и сухого экстракта: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02. / Казначеева Елена Вячеславовна; науч. рук. В.Н. Давыдова; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН. – Москва, 2012. – 130 с.

46. Касянук, Е.Ю. Стандартизация листьев ежевики сизой / Е.Ю. Касянук, О.В. Мушкина // Рецепт. – 2018. – Т. 21. – №. 1. – С. 57–66.

47. Касянюк, Е.Ю. Идентификация биологически активных веществ ежевики сизой листьев / Е.Ю. Касянюк – Текст: непосредственный // Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2017: сборник тезисов докладов XXI Междунар. научно-практической конференции студентов и молодых ученых. – Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2017. – С. 1499.
48. Комарова, Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» /Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев // СПб.: ООО «Веда. – 2006. – Т. 212.
49. Красовская, Л.С. Род *Rubus* L. (сем. *Rosaceae* Adans.) Восточной Европы и Кавказа: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05. / Красовская Людмила Степановна; науч. рук. Р.В. Камелин; Российская академия наук Ботанический институт В.Л. Комарова – Санкт-Петербург, 2002. – 226 с.
50. Лавренов, В.К. Современная энциклопедия лекарственных растений. / В.К. Лавренов – Москва: ОЛМА Медиа Групп, 2009. – 272 с. – Текст: непосредственный.
51. Леонтьева, Л.И. Особенности накопления меди в органах и тканях ежевики (подрод *Eubatus* Focke) в зависимости от условий минерального питания / Л.И. Леонтьева, Л.А. Грюнер // Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. 48. – №. 1. – С. 153–156.
52. Лук'янова, Л.В. Изучение влияния сухого экстракта из побегов ежевики сизой на фибринолитическую систему крови / Л.В. Лук'янова, В.А. Волковой // Вісник фармації. – 2009. – №. 3. – С. 76–78.
53. Магеррамова, С.И. К. Химический состав и пищевая ценность ежевики, произрастающей в азербайджанской республике, и их зависимость от вида и региона произрастания / С.И.К Магеррамова // Химия растительного сырья. – 2022. – №. 2. – С. 147–156.
54. Магометова, Э.Ш. Изучение аминокислот и органических веществ в листьях ежевики сизой / Э.Ш. Магометова, С.Л. Аджихметова // Новая наука: Теоретический и практический взгляд. – 2017. – Т. 2. – №. 4. – С. 160–161.

55. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. / П.Ф. Маевский — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. — 635 с., ил. — Текст: непосредственный.
56. Макарова, Д.Л. Сравнительный фармакогностический анализ листьев и плодов малины обыкновенной / Д.Л. Макарова // *Journal of Siberian Medical Sciences*. — 2015. — №. 4. — С. 16.
57. Мелкадзе, Р.Г. Характеристики состава листа ежевики кавказской (*Rubus caucasicus* L.) как сырья для производства чая / Р.Г. Мелкадзе Н.Ш Чиковани, Э.З Кахниашвили // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2008. — Т. 44. - № 6. — С. 714–719.
58. Изучение противовоспалительной активности растительной композиции «Ангиофитон» / В. М. Мирович, А. В. Цыренжапов, А. А. Посохина, С. А. Петухова // *Инновационные технологии в фармации: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня со дня рождения профессора Л.А. Усова, Иркутск, 16–17 октября 2020 года / Иркутский государственный медицинский университет; Под общей редакцией Е. Г. Приваловой. — Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2020. — С. 154-157.*
59. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / А.Н. Миронов; — Москва: Гриф и К. 2012. — 944 с. — Текст: непосредственный.
60. Мушкина, О.В. Микроскопические диагностические признаки листьев ежевики сизой / О.В. Мушкина, О.А. Шолтанюк — Текст: непосредственный // *Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы XII международной конференции. — Минск: Белорусский государственный университет, 2014. — С. 69–71.*
61. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. 2007–2024. [Электронный ресурс] — URL: <https://www.plantarium.ru/> (дата обращения: 02.08.2024).

62. Плоды фейхоа и ежевики-сырье для производства функциональных напитков / Е.А. Сосюра, О.П. Преснякова, Т.И. Гугучкина, Б.В. Бурцев // Пиво и напитки. – 2013. – №. 1. – С. 16–19.
63. Сравнительное изучение морфолого-анатомических признаков листьев ежевики разных сортов / М. В. Попова, Т. А. Брежнева, А. И. Сливкин, Г. Ю. Шестакова // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник трудов Седьмой научной конференции с международным участием, Москва, 19 декабря 2019 года. – Москва: ФГБНУ ВИЛАР, 2019. – С. 277-284.
64. Садовая ежевика: определяемся с видом и сортом // dacha.help [сайт]. Режим доступа – URL: <https://dacha.help/frukty-i-yagody/vidy-i-sorta-ezheviki> (дата обращения: 17.06.2022).
65. Семейство Розоцветные // Bio-lessons: [сайт]. – URL: <https://bio-lessons.ru/semejstvo-rozocvetnye/> (дата обращения: 24.07.2023).
66. Сернов, Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура. – М.: Медицина, 2000. – 352 с. – Текст: непосредственный.
67. Содержание и фармакологические свойства биологически активных компонентов ежевики / И.В. Сафронова, И.А. Гольдина, К.В. Гайдунь, В.А. Козлов // Инновации и продовольственная безопасность. – 2017. – №. 4. – С. 96–106.
68. Страх, Я.Л. Химический состав и биологическая активность метаболитов *Rubus chamaemorus* L. / Я.Л. Страх, О.С. Игнатовец // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2022. – Т. 67. – №. 3. – С. 321–331.
69. Стурова, И.В. Определение витамина В1 в растительных премиксах методами зонного капиллярного электрофореза и флуориметрии / И.В. Стурова, Н.В. Комарова, Н.Ю. Страшила, А.В. Калач // Химия растительного сырья. – 2007. – №. 4. – С. 121–122.
70. Табаторович, А.Н. Анализ химического состава и показателей качества ягодных полуфабрикатов для кондитерского производства / А.Н. Табаторович, Е.Б. Табала // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2021. – №. 9 (174). – С. 161–169.

71. Тринеева, О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор) / О.В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №. 4. – С. 180–197.

72. Тринеева, О.В. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – №. 1. – С. 164–169.

73. Тринеева, О.В. Определения простых сахаров в лекарственном растительном сырье методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Химия растительного сырья. – 2020. – №. 1. – С. 215–222.

74. Тринеева, О.В. Состав метаболома крапивы двудомной, произрастающей на территории центрального черноземья (обзор) / О.В. Тринеева, А.Н. Сливкин, Е.Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. – 2022. – №. 2. – С. 5–18.

75. Тутельян, В.А. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / В.А. Тутельян, К.И. Эллер – М: «Династия», 2010. – 180 с. – Текст: непосредственный.

76. Уэйли, А.К. Фитохимический анализ листьев морозники обыкновенной (*Rubus chamaemorus* L.): дис. ... канд. фарм. наук: 3.4.2. / Уэйли Андрей Кеннет; науч. рук. В.Г. Лужанин; Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет – Санкт-Петербург., 2021. – 114 с.

77. Файл:Map-Rosaceae.PNG // Wikimedia Commons [сайт]. Режим доступа – URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Map-Rosaceae.PNG> (дата обращения: 02.08.2023).

78. Фармакопея Евразийского экономического союза [Офиц.сайт]. – URL:<https://eec.eaeunion.org/comission/department/deptexreg/formirovanieobshchikh-runkov/pharmacopoeia/>.

79. Федулов, Ю.П. Методическое указание к лабораторным занятиям по биохимии растений с основами теории для студентов агробиологических специальностей / Ю.П. Федулов, К.А. Доценко, Я.К. Госунов – Краснодар, КубГАУ, – 2013 – 83 с. Текст: непосредственный.

80. Физико - химические методы анализа: Учеб. пособие / Н.М.Дубова, Т.М.Гиндуллина, Г.Н.Сутягина, Е.И.Короткова. – Томск: Изд.ТПУ, 1999 – 123с.

81. Фицева, Н. С. Определение количественного содержания флавоноидов в ежевики сизой листьях методом спектрофотометрии / Н. С. Фицева // Молодежь и медицинская наука: Материалы VII Всероссийской межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, Тверь, 05 декабря 2019 года / Редколлегия: М.Н. Калинкин [и др.]. – Тверь: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Тверской государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2020. – С. 597-600.

82. Фицева, Н.С. Качественный и количественный анализ флавоноидов ежевики сизой / Н.С. Фицева // Студенты и молодые ученые БГМУ – медицинской науке и здравоохранению Республики Беларусь: сборник научных трудов студентов и молодых учёных. – Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2020. – С. 164–166.

83. Химический состав и биологическая активность некоторых представителей семейств Asteraceae, Primulaceae, Grossulariaceae и Rosaceae / Н.М. Червонная, С.Л. Аджиахметова, Д.И. Поздняков [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2020. – №. 11–1(101). – С. 179–184.

84. Чугунова, О.В. Исследование антиоксидантной активности и ее изменения при хранении плодово-ягодного сырья Свердловской области / О.В. Чугунова, Н.В. Заворохина, А.В. Вяткин // Аграрный вестник Урала. – 2019. – №. 11 (190). – С. 59–65.

85. Экспериментальная оценка противовоспалительной активности растений семейства астровых флоры Восточной Сибири / Е.Г. Горячкина, А.В.

Цыренжапов, О.И. Мазунова, Г.М. Федосеева // Вестник Бурятского государственного университета. Философия. – 2012. – №. SC. – С. 63–67.

86. Эллер, К.И. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище / К.И Эллер, В.В. Пименова // Москва. – 2004. – 240 с. – Текст: непосредственный.

87. Anthocyanins from *Rubus fruticosus* L. and *Morus nigra* L. applied as food colorants: A natural alternative / E.N. Vega, A.K. Molina, C. Pereira [et al.] // *Plants* – 2021. – Vol.10. – № 6. – P. 1181.

88. Antihypoxic and anti-ischemic properties of the North Caucasus flora plant extracts / D.I. Pozdnyakov, A.E. Pozdnyakova, S.L. Adzhiahmetova [et al.] // *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*. – 2019. – Vol. 18. – №. 5. – P. 504–517.

89. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of phenolic compound family extracted from raspberries (*Rubus idaeus*): A general review / A.V. Lopez-Corona, I. Valencia-Espinosa, F.A. González-Sánchez [et al.] // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11. – №. 6. – P. 1192.

90. Aqueous extracts of lingonberry and blackberry leaves identified by high-content screening beneficially act on cholesterol metabolism / C. Röhrli, S. Steinbauer, R. Bauer [et al.] // *Food & Function*. – 2021. – Vol. 12. – №. 21. – P. 10432–10442.

91. Assessment of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of blackberry wines / D. Amidžić Klarić, I. Klarić, A. Mornar [et al.] // *Foods*. – 2020. – Vol. 9. – №. 11. – P. 1623.

92. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens / L.J. Nohynek, H.L. Alakomi, M.P. Kähkönen [et al.] // *Nutrition and cancer*. – 2006. – Vol. 54. – №. 1. – P. 18–32.

93. Bhuyan, B.A review on the phytochemical, pharmacological and traditional profile on the *Rubus* genus in north-eastern and western parts of India / B. Bhuyan, A. Dutta // *Curr Trends Pharm Res*. – 2021. – Vol. 8. – №. 1. – P. 73–84.

94. Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages / M. Schulz, S.K.T. Seraglio, F. Della Betta [et al.] // *Food research international*. – 2019. – Vol. 122. – P. 627–634.
95. Blackberry and blueberry anthocyanin supplementation counteract high-fat-diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and inflammation and accelerating energy expenditure / T. Wu, Y. Gao, X. Guo [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 9.
96. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania / Vitor C. Chaves, Mayara S.P. Soares, Luiza Spohr [et al.] // *Neuroscience Letters*. – Vol.714. –2020. – P. 134566.
97. Blackberry leaves as new functional food? Screening antioxidant, anti-inflammatory and microbiological activities in correlation with phytochemical analysis / M. Paczkowska-Walendowska, A. Gościński, D. Szymanowska [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – №. 12. – P. 1945.
98. Blackberry polyphenols: Review of composition, quantity, and health impacts from in vitro and in vivo studies / J.A. Robinson, J.E. Bierwirth, P. Greenspan [et al.] // *Journal of Food Bioactives*. – 2020. – Vol. 9. – P.40–51.
99. CD39/NTPDase-1 expression and activity in human umbilical vein endothelial cells are differentially regulated by leaf extracts from *Rubus caesius* and *Rubus idaeus* / D. Dudzinska, B. Luzak, M. Boncler [et al.] // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2014. – T. 19. – C. 361–380.
100. Chemical and mineral characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of blackberries grown in an organic system / R.S. Souza, C.R. Martins, L.E.C. Antunes [et al.] // *Comunicata Scientiae*. – 2020. – Vol. 11. – P. e3272–e3272.
101. Cock, I.E. *Medicinal Plant Images* / I.E. Cock // *Pharmacognosy Communications*. – 2013. – Vol. 3. – №1. – P. 54–57.
102. *Compte rendu de la première sortie botanique du groupe Rubus de la SBOcc: le Haut-Languedoc* / L. Belhacène C. Gritti, L. Sirvent [et al.] // *Carnets botaniques*. – 2021. – №75. – P. 1–15.

103. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus L. species* / J. Oszmiański, A. Wojdyło, P. Nowicka [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – №. 3. – P. 4951–4966.
104. Fruit quality characteristics and biochemical composition of fully ripe blackberries harvested at different times / M. Mikulic-Petkovsek, R. Veberic, M. Hudina [et al.] // *Foods*. – 2021. – Vol. 10. – №. 7. – P. 1581.
105. Geffray, B. Application de l'analyse factorielle des correspondances à l'étude de la variabilité dans des populations naturelles de Ronces (*Rubus fruticosus L.*) / B. Geffray // *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*. – 1985. – Vol. 132. – №. 1. – P. 51–63.
106. Golovinskaia, O. Review of functional and pharmacological activities of berries / O. Golovinskaia, C.K. Wang // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №. 13. – P. 3904.
107. Gudej, J. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L. species* / J. Gudej, M. Tomczyk // *Archives of pharmacal research*. – 2004. – Vol. 27. – P. 1114–1119.
108. Identification of blackberry (*Rubus fruticosus*) volatiles as *Drosophila suzukii* attractants / P. Dewitte, V. Van Kerckvoorde, T. Beliën [et al.] // *Insects*. – 2021. – Vol. 12. – №. 5. – P. 417.
109. Immunomodulatory properties of blackberry anthocyanins in THP-1 derived macrophages / E. Cenk, C. Schmutz, G. Pahlke [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – №. 19. – P. 10483.
110. In vitro antiproliferative and antioxidant effects of extracts from *Rubus caesius* leaves and their quality evaluation / D.M. Grochowski, R. Paduch, A. Wiater [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 2016. P. 8.
111. Investigation of the anti-inflammatory effect of the dry extract from the herb of *Stachys sieboldii* Miq / L. Slobodianiuk, L. Budniak, S. Marchyshyn [et al.] // *Pharmacologyonline*. – 2021. – Vol. 2. – P. 590–597.

112. Khadgi, A. Morphological characterization of prickled and prickle-free *Rubus* using scanning electron microscopy / A. Khadgi, C.A. Weber // *HortScience*. – 2020. – Vol. 55. – №. 5. – P. 676–683.
113. Koczka, N. Element composition, total phenolics and antioxidant activity of wild and cultivated blackberry (*Rubus fruticosus* L.) fruits and leaves during the harvest time / N. Koczka, E. Stefanovits-Banyai, E. Prokaj // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. – 2018. – Vol. 46. – №. 2. – P. 563–569.
114. Krzepińko, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of raspberry, blackberry and raspberry-blackberry hybrid leaf buds // A. Krzepińko, R. Prażak, A. Świącilo / *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №. 2. – P. 327.
115. Liquid chromatographic quadrupole time-of-flight mass spectrometric untargeted profiling of (poly) phenolic compounds in *Rubus idaeus* L. and *Rubus occidentalis* L. fruits and their comparative evaluation / L. Renai, C.V.A. Scordo, U. Chiuminatto [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – №. 5. – P. 704.
116. Low sugar jellies of berry fruits: The impact of low vs. high temperature regime on their chemical composition and antioxidant activity / M. Simonovic, S. Ostojic, D. Micic [et al.] // *Natural product research*. – 2021. – Vol. 35. – №. 2. – P. 337–341.
117. Meng, Q. Study on supergenus *Rubus* L.: Edible, medicinal, and phylogenetic characterization / Q. Meng, H. Manghwar, W. Hu // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – №. 9. – P. 1211.
118. Micro-morphology of *Rubus* L. Sub-genus *Rubus* L. in North of Iran / R. Kasalkheh, E. Jorjani, H. Sabouri [et al.] // *Applied Biology*. – 2018. – Vol. 31. – №. 3. – P. 115–125.
119. Misimović, M. Effects of different plant extracts on the mineral content of blackberry leaf (*R. fruticosus*) in organic production / M. Misimović, Ž. Lakić, Z. Maličević // *Agriculture & Forestry/Poljoprivreda i Sumarstvo*. – 2020. – Vol. 66. – №. 1.
120. Morphological studies of developing *Rubus* prickles suggest that they are modified glandular trichomes / A.A. Kellogg, T.J. Branaman, N.M. Jones [et al.] // *Botany*. – 2011. – Vol. 89. – №. 4. – P. 217–226.

121. Neuropharmacological effects of methanolic extracts of *Rubus fruticosus* L / M. Riaz, M. Zia-Ul-Haq, N. Ur-Rahman [et al.] // Turkish journal of medical sciences. – 2014. – Vol. 44. – №. 3. – P. 454–460.

122. Okatan, V. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated berry species: A comparative study / V. Okatan // Folia Horticulturae. – 2020. – Vol. 32. – №. 1. – P. 79–85.

123. Ozola, B. Antioxidant content of dark colored berries / B. Ozola, M. Dūma // Agronomy Research. – 2020. – Vol.18. – №S3. – P. 1844–1852.

124. Phenolic profiling of berries waste and determination of their antioxidant potential / Y. Jiang, V. Subbiah, H. Wu [et al.] // Journal of Food Quality. – 2022. – Vol. 2022. – p.16.

125. Phytochemical characterization of commercial processed blueberry, blackberry, blackcurrant, cranberry, and raspberry and their antioxidant activity / Z. Diaconeasa, C.I. Iuhas, H. Ayvaz [et al.] //Antioxidants. – 2019. – Vol. 8. – №. 11. – P. 540.

126. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, Antihyaluronidase and Antimicrobial Activity of Young Leaves and Stem Extracts from *Rubus caesius* L / A. Hering, J. Stefanowicz-Hajduk, R. Hałas [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – №. 19. – P. 6181.

127. Protective effects of the fruit extract of raspberry (*Rubus fruticosus* L.) on pituitary-gonadal axis and testicular histopathology in streptozotocin induced diabetic male rats / N. Amini, A. Shiravi, N. Mirazi [et al.] //Avicenna journal of phytomedicine. – 2021. – Vol. 11. – №. 2. – P. 199.

128. Rai, D.K. A Review on Chromatography–Mass Spectrometry Applications on Anthocyanin and Ellagitannin Metabolites of Blackberries and Raspberries / D.K. Rai, K. Tzima // Foods. – 2021. – Vol. 10. – №. 9. – P. 2150.

129. Researches upon the Heavy Metals Content of *Rubus caesius* L.(Rosaceae) / R. Ioncică, M.V. Bubulică, L. Chirigiu [et al.] // Curr. Health Sci. J. – 2010. – Vol. 36. – №. 1. – P. 48–51.

130. Riaz, M. Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus* / M. Riaz, M. Ahmad, N. Rahman // *J. Med. Plants Res.* – 2011. – Vol. 5. – №. 24. – P. 5920–5924.
131. *Rubus* – A Review of its Phytochemical and Pharmacological Profile / G.O. Rocabado, L.M. Bedoya, M.J. Abad [et al.] // *Natural Product Communications.* – 2008. – Vol 3. – №3. – P. 423–436.
132. *Rubus ellipticus* Sm. *Rubus foliolosus* Weihe & Nees *Rubus fruticosus* L. *Rubus irritans* Focke Rosaceae / L. Khaniya, R. Bhattarai, H.A. Jan [et al.] // *Ethnobotany of the Himalayas.* – Cham: Springer International Publishing, 2021. – P. 1717–1733.
133. *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses / M Zia-Ul-Haq, M. Riaz, V. De Feo [et al.] // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19. – №. 8. – P. 10998–11029.
134. *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties / L.P. da Silva, E. Pereira, T.C.S.P. Pires [et al.] // *Food research international.* – 2019. – Vol. 119. – P. 34–43.
135. Schädler, V. *Rubus caesius* L. Leaves: Pharmacognostic analysis and the study of hypoglycemic activity / V. Schädler, S. Dergatschewa // *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology.* – 2017. – Vol. 7. – №. 5. – P. 501.
136. Secondary metabolites of *Rubus caesius* (Rosaceae) / D.M. Grochowski, J.W. Strawa, S. Granica [et al.] // *Biochemical systematics and ecology.* – 2020. – Vol. 92. – P. 104111.
137. Stagos, D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts / D. Stagos // *Antioxidants.* – 2019. – Vol. 9. – №. 1. – P. 19.
138. Stoenescu, A.M. Determination of phenolic compounds using HPLC-UV method in wild fruit species / A.M. Stoenescu, I. Trandafir, S. Cosmulescu // *Horticulturae.* – 2022. – Vol. 8. – №. 2. – P. 84.
139. Stompor-Chrzan, E. Effect of aqueous extracts of aspen, black currant, folded blackberry and walnut leaves on development of pathogenic fungi / E. Stompor-Chrzan // *Plant protection science-prague.* – 2002. – Vol. 38. – P. 623–625.

140. Sultana, N. Plants of genus *Rubus* as a source of pharmaceuticals / N. Sultana // *CPQ Nutrition*. – 2018. – Vol. 3. – №. 1. – P. 1–71.
141. Tekin, Z. Evaluation of *Rubus caesius* L. fruit different maturity stages on phytochemical properties and antioxidant activity / Z. Tekin, F. Küçükbay // *Journal of Essential oil & Plant Composition*. – 2022. – Vol. 1. - №1. – P. 6–13.
142. The influence of *Rubus idaeus* and *Rubus caesius* leaf extracts on platelet aggregation in whole blood. Cross-talk of platelets and neutrophils / D. Dudzinska, K. Bednarska, M. Boncler [et al.] // *Platelets*. – 2016. – Vol. 27. – №. 5. – P. 433–439.
143. Tomczyk, M. Polyphenolic compounds from *Rubus saxatilis* / M. Tomczyk, J. Gudej // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2005. – Vol. 41. – P. 349–351.
144. Turker, A.U. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey / A.U. Turker, A.B. Yildirim, F.P. Karakas // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2012. – Vol. 26. – №. 1. – P. 2765–2772.
145. Veličković, I. In vitro antioxidant activity of dewberry (*Rubus caesius* L. var. *aquaticus* Weihe. & Nees.) leaf extracts / I. Veličković, S. Grujić, A. Džamić // *Archives of Biological Sciences*. – 2015. – Vol. 67. – №. 4. – P. 1323–1330.
146. Ziemlewska, A. Assessment of cytotoxicity and antioxidant properties of berry leaves as by-products with potential application in cosmetic and pharmaceutical products / A. Ziemlewska, M. Zagórska-Dziok, Z. Nizioł-Łukaszewska // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – №. 1. – P. 3240.

ПРИЛОЖЕНИЯ

- А. Проект фармакопейной статьи “Ежевика сизой листья – *Rubi caesii folia*”
- Б. Проект “Инструкция по сбору и сушке ежевики сизой листьев”
- В. Акт внедрения результатов диссертации в деятельность Испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы»
- Г. Акт внедрения результатов диссертационной работы в научно-исследовательскую деятельность ООО “Сайнтифик Комплайнс”
- Д. Акт внедрения основных результатов диссертации в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).
- Е. Выписка из протокола очередного заседания Локального этического Комитета.

Приложение А. Проект фармакопейной статьи «Ежевика сизой листья – *Rubi caesii folia*»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ежевика сизой листья – *Rubi caesii folia*

ФС – Вводится впервые

Заготовленные в период цветения и плодоношения, высушенные листья дикорастущего растения ежевики сизой – *Rubus caesius* L. сем. розоцветных – Rosaceae.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырьё. Листья цельные, сложные, состоящие из 3 листочков, черешковые, длиной до 15 см, шириной до 12 см. Листовые пластины отдельных листочков яйцевидные с короткой (до 0,5 см) верхушкой и клиновидным основанием, двоякозубчатым краем, перистым жилкованием. Пластинка листа опушена по всей поверхности. Черешок ребристый, покрытый множеством шипов и щетинок. Цвет листьев – зеленый или серовато-зеленый, с нижней стороны светло-зеленый. Запах – невыраженный. Вкус водного извлечения – кисловато-горький, вяжущий.

Измельчённое сырьё. Кусочки различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет – серовато-зеленый, запах – невыраженный, вкус водного извлечения – кисловато-горький, вяжущий.

Микроскопические признаки. Цельное сырьё, измельченное сырьё. При рассмотрении листа с поверхности должны наблюдаться извилистые с двух сторон

клетки эпидермы размером 30 мкм в длину и 10 мкм в ширину. Устьичный комплекс аномоцитного типа. Устьица овальной, почти округлой формы, длиной 20 мкм и шириной 15 мкм, расположены преимущественно с нижней стороны листа.

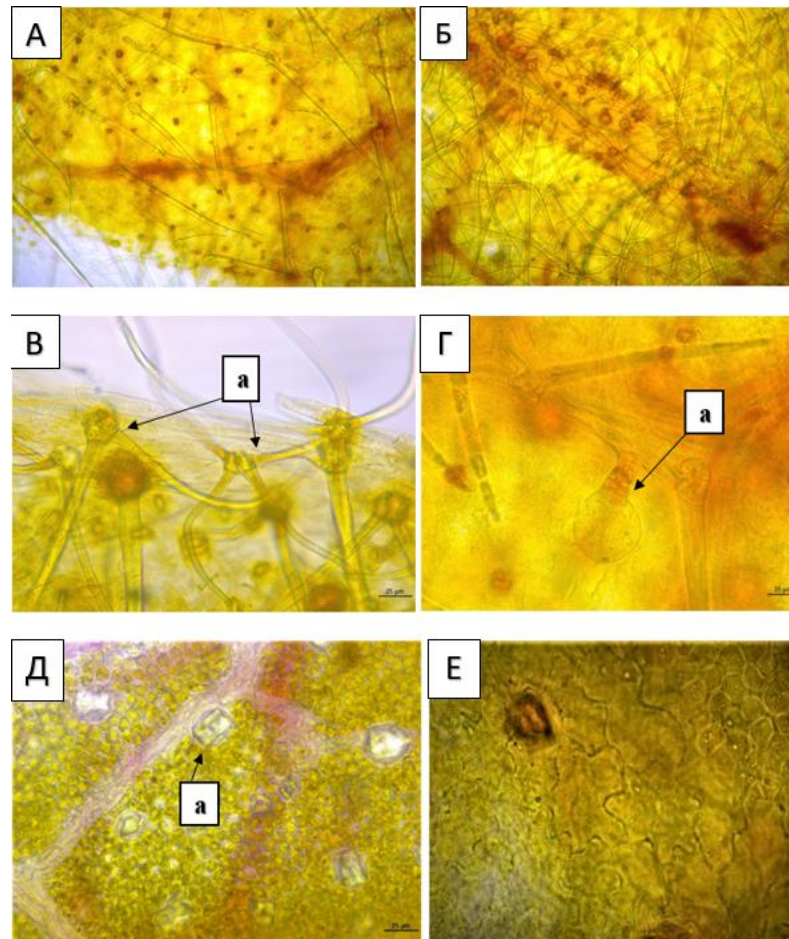


Рисунок А.1 – Ежевики сизой листья

А – Простые волоски верхней ($\times 100$); Б – простые волоски нижней эпидермы ($\times 100$); В – фрагмент края нижней эпидермы с простыми, сросшимися у основания (а) волосками ($\times 100$);

Г – фрагмент эпидермы с головчатым (а) волоском с двухрядной ножкой ($\times 400$);
 Д – включения оксалата кальция в мезофилле: а – кубические кристаллы ($\times 400$); Е – эпидерма с клетками извилистой формы ($\times 400$)

На верхней эпидерме встречаются с частотой от 22 ± 8 на 1 мм^2 простые одноклеточные волоски, среди которых выделяются более длинные (до 1 мм) с округлым основанием и более мелкие (100-400 мкм) с расширенным, ближе к

треугольной форме основанием. Нижняя сторона листа более опушена, на эпидерме встречаются как простые одноклеточные (19 ± 5 на 1 мм^2), так и множество перепутывающихся между собой простых одноклеточных, сросшихся у основания по 2 или 4 волосков в количестве 10 ± 7 на 1 мм^2 . По жилке листа встречаются железистые волоски, имеющие 1-, чаще 2-рядную ножку и округлую головку. Длина железистых волосков варьирует от 60 до 85 мкм., диаметр головки – 35–45 мкм. Частота встречаемости на верхней эпидерме – 6 ± 1 , на нижней – 2 ± 1 на 1 мм^2 .

В мезофилле листа встречаются кубические одиночные кристаллы и друзы оксалата кальция в количестве от 3 до 9 на 1 мм^2 .

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Раствор СО (рутина). Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 70 % при нагревании и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г измельченного сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70% и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане 60 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10×10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 5 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (10:2:3) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронтом растворителей не менее 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают раствором алюминия хлорида 2% спиртового,

выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 3 – 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-оранжевого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: 1 зона адсорбции с флуоресценцией оранжевого или желтого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО рутина, 3 зоны адсорбции с флуоресценцией желтого–оранжевого цвета, расположенных ниже зоны СО рутина.

2. Качественная реакция

Около 1,0 г листьев, измельченных до размера 3 мм, кипятят в течение 2 – 3 мин с 10 мл воды, охлаждают и фильтруют. К 1 мл фильтрата прибавляют 2 –3 капли железа (III) аммония сульфата раствора 1% должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 13%.

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 9%.

Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1%.

Измельченность сырья. Цельное сырье: частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%; измельченное сырьё: частиц, не прошедших сито с размером отверстий 5 мм – не более 7%, частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%.

Посторонние примеси

Другие части растения (стебли, цветки, плоды) – не более 12%

Сырьё, изменившее окраску – не более 3%

Органическая примесь – не более 1%

Минеральная примесь – 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».

Остаточные количества пестицидов

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов 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 в пересчете на танин – не менее 10%, экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 43%, суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,7%.

Определение дубильных веществ в пересчете на танин проводят в соответствии с требованиями ОФС "Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах" (метод 1).

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагент – вода очищенная).

Сумма флавоноидов

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного до размера частиц 1 мм сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %, колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают на водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 1 ч. Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

4,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, 0,5 мл уксусной кислоты 30% и доводят объем раствора до метки спиртом 96 %, перемешивают

(раствор Б). Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 4,0 мл раствора А, 0,5 мл уксусной кислоты 30%, доведенный спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{A \times 50 \times 25 \times 100}{A^{1\%}_{1\text{см}} \times a \times 4 \times (100 - W)},$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора А;

$A^{1\%}_{1\text{см}}$ – удельный показатель поглощения комплекса СО рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 260;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

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

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

Приложение Б. Инструкция по сбору и сушке ежевики сизой листьев

Ежевика сизая – *Rubus caesius* L. – двулетний дикорастущий кустарник рода *Rubus* семейства розоцветные – *Rosaceae*.

Побеги стелющиеся 2-3 м длиной, покрытые многочисленными шипами. Листья 3- (редко 5-) сложные размером до 17 см в длину и до 15 см в ширину, снабженные широкими эллиптическими прилистниками (до 0,5 см). Цвет листьев светло-зеленый сверху и серовато-зеленый (за счёт обильного опушения) снизу. Характер края – двоякозубчатый, верхушка коротко-заостренная, основание округлой формы. Эпидерма листьев обильно опушена. Цветки ежевики сизой белые, актиноморфные, пятичленные, собраны в щитки. Плод – сочная многокостянка, синего или фиолетового цвета, покрытая интенсивным сизым налётом.

Основными местами произрастания ежевики сизой являются овраги, опушки и/или поляны лиственных лесов. Способна образовывать крупные заросли вдоль дорог, тропинок, рек. Распространена в Европейской части России, на Кавказе и в Средней Азии.

Время цветения с середины мая по август, плодоношения – с июня по октябрь.

Среди родственных видов ежевики сизой, схожих по внешним признакам встречаются ежевика неская (*Rubus nessensis* Hall.), малина обыкновенная (*Rubus idaeus* L.), ежевика кавказская (*Rubus caucasicus* Focke), малина западная (*Rubus occidentalis* L.). Малина обыкновенная отличается цветом плодов, пятичленными листьями и более обильным, войлочным опушением нижней поверхности листьев. Малина западная не имеет на плодах характерного сизого налёта, плоды легко отделяются от цветоложа при сборе. Стебли более крупные, широкие. Соцветие – зонтик, реже – кисть. Ежевика сизая имеет сложные листья, состоящие чаще из 5 листочков. Верхушка листьев более заостренная, длинная. Прилистники более тонкие, нитевидные. Плоды не имеют сизого налёта. Отличительной чертой

ежевики кавказкой являются более ланцетная, вытянутая форма отдельных листочков, обильное покрытие стеблей шипами, более крупные черные, блестящие плоды, без сизого налёта.

Сырьем ежевики сизой являются листья. Сбор производится в период наиболее полного развития растения, который приходится на цветение и плодоношение. Также, именно в эту фазу минимизируется риск заготовки сырья от близкородственных видов, так как наиболее отличительным признаком ежевики сизой являются характерный цвет плодов. Листья срезают секатором или ножом отдельно, или вместе со стеблями с последующим их отделением. Заготовку рекомендуется проводить в плотных перчатках во избежание травмы рук от шипов.

Сушат листья воздушно-теневого сушкой, в сухом, проветриваемом помещении в течение 1–2 недели, периодически переворачивая. Искусственная сушка производится в сушилках при температуре 50–60°C. Признаком окончания сушки является характерный треск при разломе черешка, и легкое истирание листьев руками без остаточных следов на пальцах.

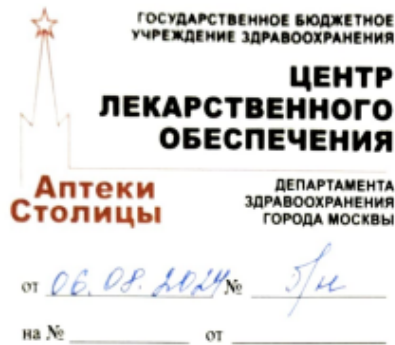
Таким образом, сырьё ежевики сизой – цельные высушенные листья. Листья тройчатосложные, ромбической формы, с двоякозубчатым характером края, нервноперистым жилкованием, коротко-заостренной верхушкой, округлым основанием, размером до 15 см в длину и до 12 см в ширину, обильно опушенные (рисунок Б.1). Цвет листьев серовато-зеленый, запах невыраженный, вкус горько-кислый, вяжущий. Числовые показатели: потеря в массе при высушивании (влажность) – не более 13%, зола общая – не более 9%, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте 10% – не более 1%, частицы, проходящие сквозь сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%, частицы, не проходящие сквозь сито с размером отверстий 5 мм – не более 7%, другие части растения (стебли, цветки и плоды) – не более 12%, побуревшие, почерневшие листья – не более 3%, органическая примесь – не более 1%, минеральная примесь – не более 0,5%.



Рисунок Б.1 – Внешний вид ежевики сизой листьев

Сырьё упаковывают в льно-джуто-кенафные, тканевые или бумажные многослойные мешки по 40 кг. Хранение осуществляют в зонах для основного хранения сырья (общая группа хранения): относительная влажность воздуха не более 65%, комнатная температура, свободная циркуляция воздуха. Срок годности – 3 года.

**Приложение В. Акт внедрения результатов диссертации в деятельность
Испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения
здравоохранения города Москвы «Центр лекарственного обеспечения
Департамента здравоохранения города Москвы»**



Акт внедрения

результатов научно-исследовательской работы Ильиной Маргариты Борисовны в работу испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы»

Предмет внедрения: методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растительном сырье ежевики сизой.

Разработчики методики: Ильина М.Б. – аспирант кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Сергунова Е.В. – д.фарм.н., профессор, доцент по кафедре фармакогнозии.

Цель внедрения: подтверждение возможности использования методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом спектрофотометрии в листьях ежевики сизой, предложенной в ходе выполнения диссертационного исследования на тему «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.)».

Результаты внедрения: методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин апробирована, валидирована и успешно внедрена в работу испытательной лаборатории. Методика рекомендована для включения в проект нормативной документации для оценки качества сырья ежевики сизой.

Заведующий лабораторией – провизор



Г.Р. Айсина

Приложение Г. Акт внедрения результатов диссертационной работы в научно-исследовательскую деятельность ООО «Сайнтифик Комплайнс»



Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс»
 ОГРН 1237700156099, ИНН 9728089480, КПП 772701001
 Юр. адрес: 117149, город Москва, Симферопольский б-р, д. 8, помещ. 1/2



Исх. №32-24

УТВЕРЖДЕНО

Генеральный директор

ООО «СК»



А.М. Полуянов

«10» сентября 2024 г.

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

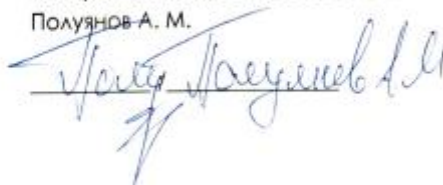
Мы, нижеподписавшиеся, генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс» (ООО «СК») Полуянов Андрей Михайлович, заведующий аналитической лабораторией ООО «СК» Медведев Юрий Владимирович удостоверяем факт внедрения методики качественного и количественного определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза в растительном сырье – листья ежевики сизой. Данная методика была разработана в ходе выполнения диссертационного исследования на тему «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.)» аспирантом кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Ильиной Маргаритой Борисовной.

Данная методика используется для оценки качества сырья лекарственных растений в ООО «СК».

Заведующий аналитической
 лабораторией ООО «СК»
 Медведев Ю. В.



Генеральный директор ООО «СК»
 Полуянов А. М.



Приложение Д. Акт внедрения основных результатов диссертации в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

УТВЕРЖДАЮ
 Проректор по учебно-воспитательной работе
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
 Минздрава России (Сеченовский Университет)

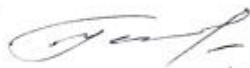
 Литвинова Т.М.
 20__ г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Ильиной Маргариты Борисовны в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Ильиной Маргариты Борисовны на тему «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой (Rubus caesius L.)» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания при изучении дисциплин «Фармакогнозия», «Ботаника», «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», читаемых студентам и ординаторам по специальностям 33.05.01 «Фармация», 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия».

Директор Института фармации им. А.П. Нелюбина
 д.ф.н., профессор



Г.В. Раменская

Заведующий кафедрой фармацевтического естествознания
 д.ф.н., доцент



А.Н. Луферов

Заведующий учебной частью
 кафедры фармацевтического естествознания
 д.ф.н., доцент



Н.В. Бобкова

Начальник Учебного управления
 к.м.н



Л.Ю. Юдина

**Приложение Е. Выписка из протокола очередного заседания Локального
этического Комитета**

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)



**ЛОКАЛЬНЫЙ
ЭТИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ**

119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8

тел.: 8(495)622-97-06, факс: 8(495)622-97-56,
iec@staff.sechenov.ru

**Выписка из протокола № 22-21
очередного заседания
Локального этического Комитета
от 09.12.2021**

Присутствовали:

Председатель Комитета - Николенко В.Н.
Заместитель председателя Комитета – Реброва Е.Л.
Члены Комитета: Ермолаева И.И., Бердникова Н.Г., Борисова Н.И., Дубоград Е.В.,
Золкина И.В., Смолярчук Е.А., Спивак Л.Г., Субботина О.А.

Кворум есть, заседание считается правомочным.

Слушали: рассмотрение исследования в рамках диссертационной работы «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.)» (исполнитель – Ильина Маргарита Борисовна).

Постановили: одобрить исследование в рамках диссертационной работы «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.)» (исполнитель – Ильина Маргарита Борисовна).

Обсуждение и голосование состоялось с использованием электронных средств связи

Выписка верна.

Заместитель председателя Комитета
27.12.2021

