

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АФФУФ АБДУЛКАРИМ БАШАР

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЯКОРЦЕВ
СТЕЛЮЩИХСЯ *TRIBULUS TERRESTRIS L.*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В
РОССИИ, СОПРЕДЕЛЬНЫХ ГОСУДАРСТВАХ И СИРИЙСКОЙ
АРАБСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
доцент Белоногова В.Д.

Пермь – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Ведение.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ – <i>TRIBULI TERRESTRIS</i> <i>HERBA</i>.....	11
1.1. СИСТЕМАТИКА РОДА <i>TRIBULUS</i> L.....	11
1.2. АРЕАЛ И МЕСТО ОБИТАНИЯ.....	12
1.3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВИДОВ РОДА «ЯКОРЦЫ».....	13
1.3.1. Морфологические признаки якорцев стелющихся.....	13
1.3.2. Отличительные признаки представителей рода «ЯКОРЦЫ».....	16
1.4. АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ.....	21
1.4.1. Анатомическое строение листа.....	21
1.4.2. Анатомическое строение стебля.....	21
1.4.3. Анатомическое строение цветка.....	22
1.4.4. Анатомическое строение корня.....	22
1.4.5. Анатомическое строение плода.....	22
1.5. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ.....	22
1.6. ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	30
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....	35
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	36
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36

	2.2.	МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
	2.2.1.	Макроскопический и микроскопический анализ.....	37
	2.2.2.	Фитохимический анализ.....	39
	2.2.2.1.	Качественные химические реакции на основные группы биологически активных веществ.....	39
	2.2.2.2.	Качественный анализ методом ТСХ на сапонины и флавоноиды	40
	2.2.2.3.	Качественный и количественный анализ методом ВЭЖХ на сапонины	41
	2.2.2.4.	Элементный анализ.....	42
	2.2.3.	Методики стандартизации лекарственного растительного сырья	43
	2.2.3.1.	Методы отбора проб для анализа.....	43
	2.2.3.2.	Определение числовых показателей качества сырья.....	43
	2.2.3.3.	Количественное определение сапонинов.....	44
	2.2.3.4.	Количественное определение суммы флавоноидов.....	46
Глава	3.	МОРФОЛОГО – АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ.....	47
	3.1.	РЕЗУЛЬТАТЫ МАКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	47
	3.2.	РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	51
	3.2.1.	Анатомическое строение листа.....	51
	3.2.2.	Анатомическое строение стебля.....	61
	3.2.3.	Анатомическое строение цветка.....	71
	3.2.4.	Анатомическое строение корня.....	80
		ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	89
Глава	4.	ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ.....	90
	4.1.	РЕЗУЛЬТАТЫ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	90

	4.2.	РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	93
	4.3.	РЕЗУЛЬТАТЫ КАЧЕСТВЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ.....	99
	4.4.	РЕЗУЛЬТАТЫ ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА.....	100
		ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4.....	108
Глава	5.	РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ	109
	5.1.	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЯКОРЦАХ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЕ.....	109
	5.1.1.	Обоснование выбора метода.....	109
	5.1.2.	Выбор аналитической длины волны.....	109
	5.1.3.	Выбор экстрагента.....	112
	5.1.4.	Определение степени измельченности сырья.....	112
	5.1.5.	Время и кратность экстракции.....	113
	5.1.6.	Изучение условий реакции комплексообразования.....	114
	5.1.7.	Изучение устойчивости комплекса флавоноидов с хромогенным реактивом.....	115
	5.2.	РАСЧЕТ ОШИБКИ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ.....	116
	5.3.	МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЯКОРЦАХ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЕ.....	118
	5.4.	ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ.....	119
	5.4.1.	Линейность.....	120
	5.4.2.	Повторяемость.....	121

	5.4.3.	Внутрилабораторная воспроизводимость.....	122
	5.4.4.	Межлабораторная воспроизводимость.....	122
	5.4.5.	Правильность методики.....	124
		ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....	126
Глава	6.	СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ.....	127
	6.1.	РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛАЖНОСТИ.....	127
	6.2.	РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЛЫ ОБЩЕЙ.....	127
	6.3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЛЫ НЕРАСТВОРИМОЙ В ХЛОРИСТОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТЕ.....	128
	6.4.	РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ САПОНИНОВ.....	128
	6.5.	РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ.....,	129
	6.6.	РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	130
		ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.....	133
		ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	134
		СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	137
		СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	138
		ПРИЛОЖЕНИЕ.....	156
		Приложение А. Проекты нормативной документации.....	157
		Приложение Б. Акты внедрения. Отчет по валидации методики количественного определения суммы флавоноидов.....	245

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Исследования по обнаружению новых источников эффективных и безопасных лекарственных препаратов растительного происхождения является актуальной задачей.

Одним из перспективных видов лекарственного растительного сырья является трава якорцев стелющихся – *Tribuli terrestris herba*.

В Российской Федерации якорцы стелющиеся – *Tribulus terrestris L.* Распространены в степной и полупустынной зонах Европейской части, являются сорным растением. Растут в полупустынях Средней Азии, в Казахстане, Узбекистане, Таджикистане, Дагестане, Азербайджане, в странах Ближнего и Среднего Востока (Сирия, Бахрейн, Ирак, Иран, Йемен, Катар, Кувейт, Ливан, Оман, Палестина, Саудовская Аравия, Объединенные Арабские Эмираты, Турция, Ливан), Северной Африки (Марокко, Алжир, Египет, Ливия, Судан), в южной части Болгарии, в Австралии и Индии.

Трава якорцев стелющихся обладает гиполипидемическим, общетонизирующим, обезболивающим, противовоспалительным и мочегонным действием. Используется для стимуляции функции половых желез, лечения андрологических заболеваний, способствует естественному производству тестостерона, а также стимулирует секрецию желудочного сока и усиливают перистальтику кишечника.

Богатый химический состав сырья является основой для создания перспективных растительных препаратов, обогащенных сапонинами и флавоноидами.

Для эффективности использования лекарственных средств важно установить видовую принадлежность исходного сырья, провести качественную и количественную оценку содержания в нем наиболее перспективных групп биологически активных веществ, обуславливающих фармакологическое действие.

Нормативный документ на сырье якорцев стелющихся ВФС 42-827-79 не соответствует современным требованиям. В разделе «Внешние признаки», дано описание только цельного сырья, в разделе «Микроскопические признаки»

указано описание только анатомических признаков листа. Нет описания анатомических признаков других органов растения составляющих морфологическую группу «трава». Нет микрофотографий, что затрудняет диагностику сырья. В разделе «Определение основных групп биологически активных веществ» приведена тонкослойная хроматография только для определения фураностаноловых гликозидов, нет тонкослойной хроматографии для флавоноидов. Оценка качества сырья предусмотрена также только по фураностаноловым гликозидам. Однако, якорцев стелющихся трава содержит комплекс биологически активных веществ (стероидные сапонины: диосцин, протодиосцин, трибестин, прототрибестин, метилпрототрибестин, метилпротодиосцин, псевдопротодиосцин, трибулозин и др., флавоноиды, фенол-карбоновые кислоты, алкалоиды, каротиноиды, высшие жирные кислоты), поэтому, исходя из путей использования сырья, необходимо дополнить оценку качества сырья по установлению содержания экстрактивных веществ и суммы флавоноидов. В связи с этим ВФС 42-827-79 «Якорцев стелющихся трава» подлежит доработке, поэтому необходимость комплексного фармакогностического исследования якорцев стелющихся травы актуальна.

Степень разработанности темы. Исследования по изучению якорцев стелющихся травы проводились отечественными и зарубежными учеными. Были изучены сырьевая база и химический состав якорцев стелющихся. Доказано наличие стероидных сапонинов и веществ фенольной природы. Из якорцев стелющихся травы болгарской компанией АО «Софарма» получен препарат «Трибестан», который оказывает общетонизирующее действие, стимулирует функции половой системы. У мужчин восстанавливает и улучшает сексуальное либидо, удлиняет время эрекции. Стимулирует сперматогенез, увеличивая количество сперматозоидов и их подвижность. Обладает гиполипидемическим действием. Действующий нормативный документ не позволяет объективно проводить оценку качества сырья, так как не соответствует современным требованиям.

Цель работы: фармакогностическое исследование якорцев стелющихся, произрастающих в России, сопредельных государствах, Сирийской Арабской республике и стандартизация сырья.

Задачи исследования:

1. Провести анализ литературных данных о видах рода *Tribulus L.*
2. Изучить морфологические и анатомические признаки якорцев стелющихся травы (лист, стебель, цветок, корень) и выявить основные анатомо-диагностические признаки, выполнить микрофотографии указанных органов
3. Провести фитохимический анализ на основные группы биологически активных веществ и разработать дополнительные показатели оценки качества сырья.
4. Провести стандартизацию и разработать нормативный документ на якорцев стелющихся траву – *Tribulus terrestris herba*.

Научная новизна. Впервые проведено анатомическое исследование травы якорцев стелющихся по органам (лист, стебель, цветок и корень), выполнены микрофотографии. Определены основные биометрические показатели анатомических и морфологических признаков. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии определено наличие стероидных сапонинов (диосцин и протодиосцин). Предложен метод тонкослойной хроматографии для определения подлинности флавоноидов. Определен элементный состав якорцев стелющихся травы. Впервые определено содержание действующих веществ (суммы флавоноидов) и разработана методика их количественного определения в сырье якорцев стелющихся, заготовленных в разных регионах. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. Подобран экстрагент, который максимально извлекает экстрактивные вещества и определено количество экстрактивных веществ в сырье якорцев стелющихся. Проведена стандартизация сырья якорцев стелющихся. На основе результатов исследования разработан проект фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава – *Tribuli terrestris herba*», который отправлен на рассмотрение в

федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения».

Теоретическая и практическая значимость работы. Согласно современным требованиям проведена стандартизация сырья и разработан проект фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава – *Tribulus terrestris herba*».

Составлены и переведены на английский язык методики идентификации и оценки качества сырья якорцев стелющихся для использования в практике Министерства Здравоохранения Сирийской Арабской Республики.

Материалы диссертации используются в курсе дисциплины «Фармакогнозия» при обучении студентов 3 – 4 курса на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Материалы диссертации используются в учебном процессе в лаборатории института биохимической технологии и нанотехнологии Российского университета дружбы народов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3,5 паспорта специальности. Пункт 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; пункт 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производство и потребление»; пункт 5 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты макроскопического и микроскопического анализа якорцев стелющихся травы.
2. Результаты фитохимического исследования якорцев стелющихся травы: качественные химические реакции на основные группы биологически активных веществ; высокоэффективная жидкостная хроматография на стероидные сапонины (диосцин и протодиосцин), исследования элементного состава якорцев стелющихся травы.
3. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве.
4. Результаты исследований по стандартизации якорцев стелющихся травы.

Апробация работы.

Основные результаты исследования легли в основу 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки России, 1 – в библиографической и реферативной базе данных « SCOPUS».

Личный вклад автора. Автором выполнены исследования по изучению морфолого – анатомических признаков якорцев стелющихся травы. Выявлены диагностические анатомические признаки, выполнены микрофотографии, определены основные биометрические показатели анатомических признаков якорцев стелющихся травы. Изучен элементный состав якорцев стелющихся травы. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве. Проведена стандартизация, разработаны показатели качества, составлен проект фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава – *Tribulus terrestris herba*». Автором подготовлены статьи для публикации, проект нормативной документации, автореферат и текст диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 247 страницах машинописного текста, содержит 58 таблиц и 43 рисунка; состоит из введения, шести глав, заключения и выводов, списка использованных литературных источников, включающего 144 наименований, в том числе 48 на иностранном языке, 2 приложений.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ

TRIBULI TERRESTRIS HERBA

1.1. СИСТЕМАТИКА РОДА TRIBULUS L.

Род Якорцы – *Tribulus* L. Семейства Парнолистниковые – *Zygophyllaceae* включает до 20 видов растений [12]. Родовое наименование *Tribulus* происходит от греческого названия растения «tribolos», которое переводится как «шип, зубец» [40, 53].

К роду якорцы относятся травянистые растения с лежачими разветвленными стеблями, парноперистыми листьями с 3 – 10 парами листочков. Прилистники от ланцетовидной до шиловидной формы. Листочки удлинненно-яйцевидные или эллиптические. Одиночные мелкие цветки, желтые или редко белые, находятся в пазухах листьев. У представителей рода имеется характерный плод: ценокарпный, сухой, дробный, распадающийся на пять плодиков, снабженных снаружи колючками и шипиками или несущие по краям гребенчато – зубчатые крылья [12,16,28,29].

К данному роду относятся виды:

1. *Tribulus alatus* Del. (*Tribulus longipetalus* subsp. *Longipetalus*, *Tribulus mollis* Ehrenbg Boiss *macropterus*.) [12,13,28,93,136]
2. *Tribulus bimucronatus* Viv. – Якорцы двуостроконечные (*Tribulus parvispinus* Presl., *Tribulus pentandrus* Forssk.)
3. *Tribulus cistoides* L.
4. *Tribulus megistopterus* Kralik
5. *Tribulus ochroleucus* (Maire) Ozendra
6. *Tribulus terrestris* L. – Якорцы стелющиеся [12,16, 28, 29]

В Российской Федерации в научной медицине применяется только один вид – *Tribulus terrestris* L., сырьем которого является трава – *Tribuli terrestris herba* [17]. Видовой эпитет *terrestris* образован от латинского *terrestre* — наземный, так как стебли растения стелются по земле [40, 53].

В ряде стран, например, в Японии и Индии сырьем якорцев стелющихся для получения лекарственных средств являются плоды [115, 116, 137].

1.2. АРЕАЛ И МЕСТО ОБИТАНИЯ

Сырьевая база якорцев стелющихся обеспечена дикорастущими растениями. Родина – Северная Африка. Растение является космополитом, произрастает на всех континентах – в Южной Европе, Южной Азии, Северной Африке (Марокко, Алжир, Египет, Ливия, Судан), северной Австралии, предпочитает сухие песчаные почвы [2, 5, 15, 40, 53, 93, 114].

Встречаются в полупустынях Средней Азии, в Казахстане, Узбекистане, Таджикистане, Дагестане, Азербайджане [33], в южной части Болгарии [128], в Индии [137], в странах Ближнего и Среднего Востока (Сирия, Бахрейн, Ирак, Иран, Йемен, Катар, Кувейт, Ливан, Оман, Палестина, Саудовская Аравия, Объединенные Арабские Эмираты, Турция, Ливан).

На территории Российской Федерации якорцы стелющиеся произрастают в Европейской части, Северном Кавказе, Западной и Восточной Сибири, Крыму. Являются сорным растением. Растут в сухих, песчаных и каменистых степях на глинисто – иловатых, солончаковых, супесчаных почвах, влажных лугах, по долинам рек, у дорог.

Tribulus macropterus, *Tribulus ochroleucus* распространены по всей Средней Азии, кроме Памира, и в Египте, растут на песчаных равнинах [54].

Tribulus pentandrus, *Tribulus bimucronatus*, *Tribulus parvispinus*, *Tribulus 12purious*, *Tribulus megistopterus*, *Tribulus alatus* распространены на территории Египта [134].

1.3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВИДОВ РОДА ЯКОРЦЫ

1.3.1. Морфологические признаки якорцев стелющихся

На основании литературных данных [12,31,40,41,46 – 48,53,72,75,79, 93,123,144] нами составлено морфологическое описание якорцев стелющихся.

Якорцы стелющиеся (*Tríbulus terréstris* L., семейство парнолистниковые – *Zygophytlaceae*) — однолетнее коротко опушенное травянистое растение. Имеет стержневую корневую систему до 2,6 м с сетью волокнистых боковых корней. Стебли с короткими междуузлиями распростерты по земле, от основания ветвистые, длиной 10 – 120 (300) см (рис.1). Листья супротивные, парно – перистосложные, длиной 3-8 см, с 6-8 парами мелких продолговатых (ланцетных) листочков, имеют цельный край. Цветки, немногочисленные, мелкие, одиночные, правильные, желтые, на коротких, вверх стоящих цветоножках, диаметром 1 – 1,2 см, расположены в пазухах листьев. Околоцветник, легко опадающий пятичленный, чашечка состоит из 5 яйцевидно-ланцетных, длинно заостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков длиной 4 – 5 мм, шириной 1 – 1,3 мм. Лепестков венчика 5, они обратнойяйцевидной формы, длиной 5 – 7 мм, шириной около 3 мм, тычинок 10 штук (рис. 2).

Плод — дисковидный, ценокарпный, сухой, дробный распадающийся при созревании на 5 звездчато расположенных угловатых мерикарпиев (плодиков) (рис. 3, А).

Плодики трехгранноклиновидные, твердые, с наружной стороны бугорчатые, покрытые мелкими и крупными щетинистыми волосками и с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов; 2 верхних шипа более длинные, 2 нижних – короткие (рис. 3, Б).



Рис.1. Якорцы стелющиеся, общий вид растения.



Рис.2. Листья, цветок якорцев стелющихся.

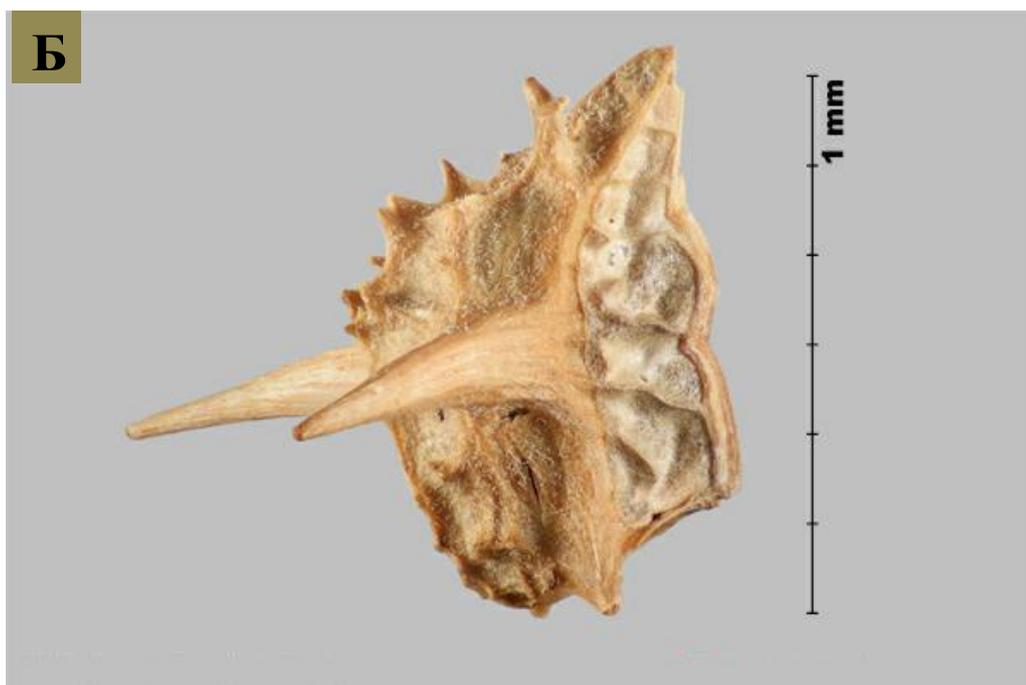


Рис.3. Плоды якорцев стелющихся.

1.3.2. Отличительные признаки представителей рода якорцы

Tribulus alatus Del. (T. longipetalus subsp., T. macropterus Boiss.)

Однолетнее или двулетнее травянистое растение. Листья 1 – 4,5 см длиной, зеленые на верхней стороне и темно-зеленые на нижней, листочков 4 – 6 пар, прилистники ланцетовидной формы. Стебель цилиндрической формы, длиной от 20 до 60 см. Цветки желтые диаметром 8 – 15 мм. Чашелистики ланцетные 4 – 6 мм длиной, шириной 1,5 – 3 мм, острые. Лепестки венчика яйцевидно – продолговатые, длиной 4 – 6 мм, шириной 2 – 3 мм, на вершине усеченные или мелковолнистые. Плоды маленькие (6 – 8 мм в диаметре) шаровидные, опушенные, каждый плод состоит из 5 плодиков и имеет два широких крыла, крылья мерикарпиев шириной 4-8 мм, зубчато – неровные, опушенные (рис. 4) [28,54,134,136].

Tribulus bimucronatus Viv. (T. parvispinus, T. pentandrus)

Однолетнее травянистое растение оливково – зеленого цвета, имеет опушение. Листья 2,5 – 3,5 см длиной. Листочков сложного листа 3 – 5 пар, они неравнобокие; прилистники опадающие, ланцетовидной формы. Цветки маленькие до 8 мм в диаметре. Чашелистики ланцетные 2 – 4 мм длиной и 1,5 мм шириной. Лепестки венчика желтые 3 – 4 мм длиной и 2 мм шириной. Плоды дисковидные, мерикарпии шиповидные, у которых 2 – 4 шипа, 2 из которых недоразвиты или редуцированы, и которые могут сокращаться до бугров (рис.5).

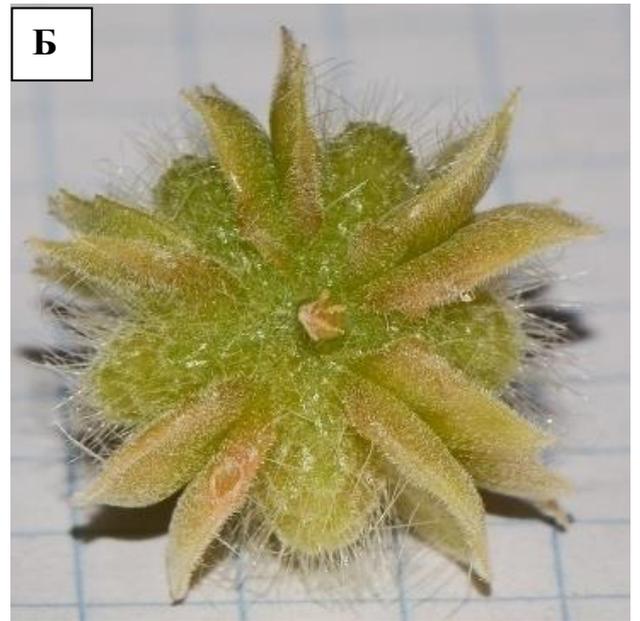


Рис.4. *Tribulus alatus* Del. (*T. longipetalus*, *T. Macropterus* Boiss.): А – цветок, Б – плод.



Рис.5. *Tribulus bimucronatus* Viv. (*T. parvispinus*, *T. Pentandrus*): А – цветок, Б – плод, В – общий вид растения.

Tribulus cistoides L.

Многолетнее растение с густо опушенным стеблем. Листья супротивные до 10 см длиной, с 8 – 14 парами листочков, с прилистниками. Листочки имеют длину 2 – 7 мм, удлинено – обратнояйцевидные – продолговатые. Снизу шелковисто – опушенные, голые с верхней стороны. Цветки одиночные 3 см в диаметре. Пять чашелистиков ланцетовидной формы 5 – 12 мм длиной. Пять лепестков обратнояйцевидной формы 8 – 10 мм длиной и 4 – 5 мм шириной. Плод дисковидный, распадается на четыре или пять мерикарпиев. Каждый мерикарпий с двумя боковыми шипами длиной 5 – 10 мм и двумя базальными шипами, длиной 2 мм (рис.6).

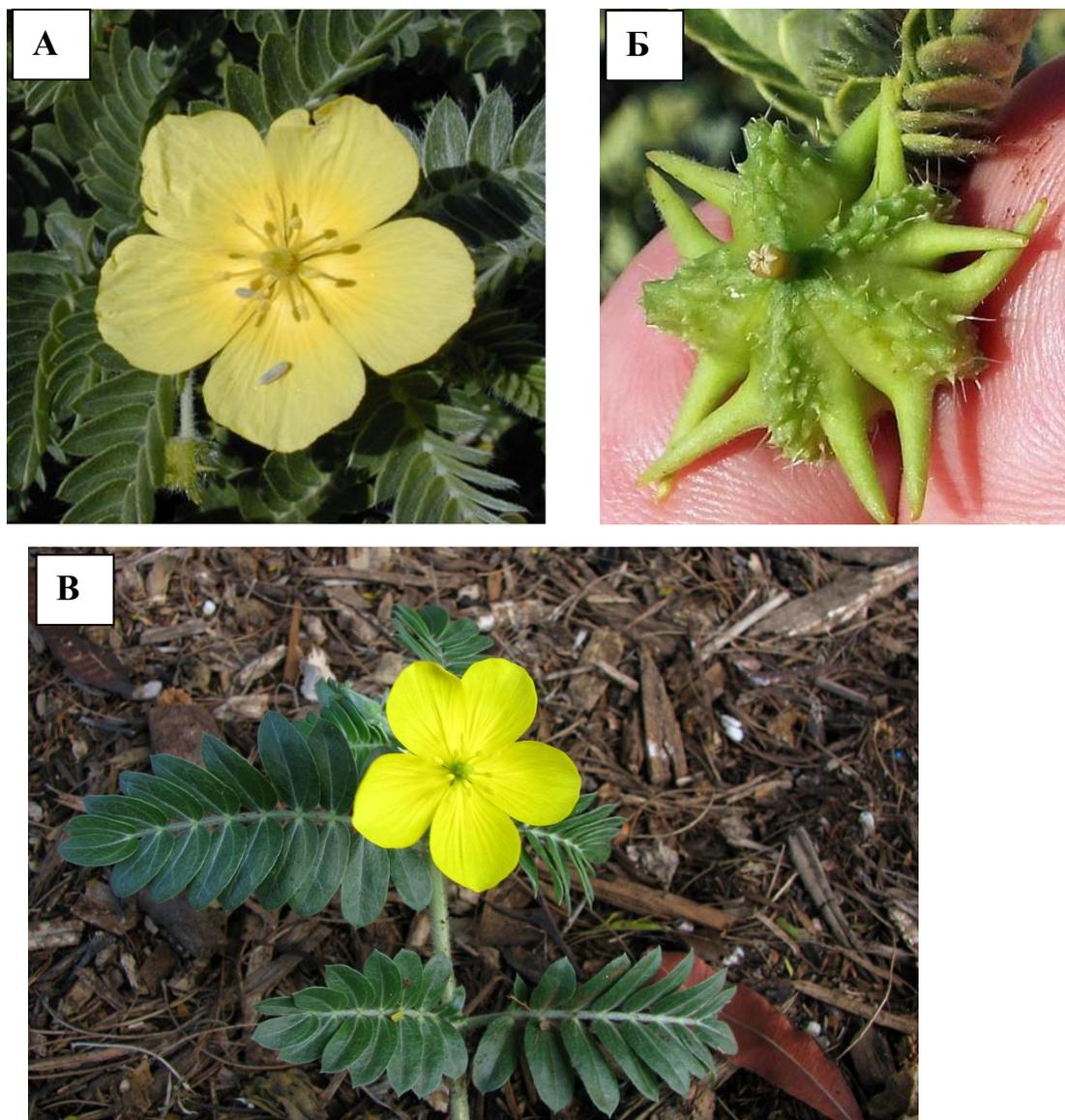


Рис.6. *Tribulus cistoides* L.: А – цветок, Б – плод, В – общий вид растения.

Tribulus megistopterus Kralik.

Многолетнее травянистое растение. Стебель разветвленный оливково-зеленого цвета 30 – 60 см длиной. Листья сложные, состоят из 5 – 7 пар листочков. Длина листочков 5 – 10 мм, поверхность листочков опушена; прилистники опадающие, ланцетовидной формы. Цветки желтые. Мерикарпии плодов с шипами, имеют слабое опушение, крупнее, чем у *Tribulus terrestris* (рис.7).

Tribulus ochroleucus (Maire) Ozendra.

Однолетнее травянистое растение. Листья сидячие 2 – 2,5 см в длину покрыты густыми мягкими прижатыми волосками с яйцевидными прилистниками. Листочков 4 – 6 пар, продолговато – эллиптические, длиной 4 – 5 мм. Цветки бледно – желтые, диаметром 10 – 12 мм. Чашелистики ланцетные, 4 мм длиной. Лепестки венчика яйцевидные, длиной 5-6 мм, шириной 3 – 4 мм. Тычинок 10. Плоды пирамидальные 10 – 15 мм в диаметре, мерикарпии без шипов и крыльев, не остистые, густо волосистые (рис.8).



Рис.7. Плоды *Tribulus megistopterus*
Kralik.



Рис.8. Плоды *Tribulus ochroleucus*.

1.4. АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ

В литературе встречается описание анатомического строения листа, цветков, плодов, стеблей и корней якорцев стелющихся.

1.4.1. Анатомическое строение листа

Контур клеток верхнего эпидермиса слабоизвилистый, нижнего – сильноизвилистый с редкими четковидными утолщениями оболочки в углах изгибов. За счет хорошо развитой кутикулы уменьшается испарение воды. Листочки имеют палисадную паренхиму с относительно небольшими межклетниками, которая состоит из одного слоя столбчатых, равномерно расположенных, тонкостенных паренхимных клеток, удлиненных под прямым углом к каждой поверхности и содержащих хлоропласты. Такое расположение обеспечивает максимальную скорость эффективности фотосинтеза [17, 95, 111, 128]. Звездообразные друзы встречаются повсюду в средней части пластинки, в клетках мезофилла, расположенных между сосудистыми пучками [88, 97, 128].

Устьица расположены с обеих сторон листа, окружены 3-5 околостоматными клетками (аномоцитный тип). Преимущественно на нижней стороне листочка и по краю встречаются длинные простые одноклеточные волоски. У места прикрепления волоска клетки эпидермиса расположены радиально, образуя розетку [27, 40, 47, 97, 111, 112, 121, 128].

1.4.2. Анатомическое строение стебля

Стебель покрыт однорядным эпидермисом с небольшими клетками, на поверхности которых расположена толстая кутикула. Кора состоит из 6-9 слоев паренхимы, клетки которой изодиаметрической формы с небольшими межклетниками. Склеренхима расположена большими группами клеток. Вторичная флоэма и ксилема развиты хорошо. Сердцевина большая с 8-11 слоями тонкостенных, паренхимных клеток, с малым межклеточным пространством [97, 111, 112, 128].

1.4.3. Анатомическое строение цветка

Клетки венчика многоугольные, изодиаметрические и покрыты кутикулой. Эпидермис чашелистиков состоит из изодиаметрических клеток со слегка волнистыми стенками, покрытыми гладкой кутикулой. Присутствуют устьица аномоцитного типа, а также многочисленные одноклеточные волоски разной длины. Клетки с друзами встречаются и в лепестках, и в чашелистиках. Пыльца сферической формы, серого цвета с сетчатой поверхностью [121].

1.4.4. Анатомическое строение корня

Корень покрыт тонким слоем перидермы, состоящий из 2 – 3 слоев прямоугольных клеток. Ниже перидермы наблюдаются большие группы склеренхимы и небольшое количество паренхимы. Клетки паренхимы разные по форме и размеру: от овальной до эллиптической. Проводящая система сосудистой ткани представлена вторичной флоэмой, камбием и более широкой зоной вторичной ксилемы, которая расположена радиально. Клетки располагаются плотно [111, 128, 134]. Кристаллы оксалата кальция (друзы) многочисленны и располагаются в лучах флоэмы [97, 128].

1.4.5. Анатомическое строение плода

Экзокарпий плода состоит из однослойного эпидермиса, мезокарпий – из паренхимы и склеренхимы, эндокарпий – из многослойных волокнистых клеток. Между мезокарпием и эндокарпием однослойная ткань, содержащая одиночные кристаллы оксалата кальция (друзы). Семядоли семян содержат капли масла и алейроновые зерна, а иногда и крахмальные зерна [115, 116, 137, 138].

1.5. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ

Анализ литературных источников показал, что в сырье якорцев содержатся:

1. *Стероиды*: диосцин, протодиосцин, трибестин, прототрибестин,

метилпроторибестин, метилпротодиосцин, псевдопротодиосцин, трибулозин, кикиба – сапонин, протограциллин, террестрозид F, террестронеозид, прегна – 4,6 – диен – 3,12,20 – трион, 25[®] – спиростан – 4ен – 3,12 – дион, 25[®] – спиростан – 3,12 – дион, 25[®] – спиростан – 3,6,12 – трион, 25[®] – спиростан – 3,5 – диен – 12 – он, 25[®] – спиростан – 2 β , 3 α – диол – 4 – ен – 12 – он, 25[®] – спиростан – 24 β – ол – 4 – ен – 3,12 – дион, 25 – спиростанзил – (1 \rightarrow 3) – β – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – галактопиранозид, гекогенин – 3-O – β – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 2) – β – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – галактопиранозид, гекогенин – 3 – O – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – D – галактопиранозид, 3 – O – { β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 2) – [β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 3)] – β – D – глюкипиранозил – (1 \rightarrow 4) – [α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – D – галактопиранозил} – 26 – O – β – глюкопиранозил – 22 – метокси – 3 – O – { β – D – ксилопиранозил (1 \rightarrow 3) – [β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 2) – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4)]} – [α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – D – галактопиранозид (террестронеозид А).

В корнях, надземных частях, плодах — диосгенин; в корнях, надземных частях, цветках, плодах — гекогенин; в корнях, надземных частях — неотигогенин; в корнях, цветках — β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин; в надземных частях, цветках — рускогенин; в надземных частях, плодах — протодиосцин, террестрозин К, 22 – O – метилпротодиосцин – ацеталь; в надземных частях – β – D – глюкозид β – ситостерина, тигогенин, гитогенин, неогитогенин, неогекогенин, хлорогенин, сарсапогенин, неогекогенин – 3 – O – β – D – глюкопиранозид, трибулозин, террестрозид, 25[®] – фурост – 5(6) – ен – 3 β ,16,26 – триол – 3 – O – { α – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2) – [α – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 4)] – β – глюкопиранозид} (трибол), тигогенин – 3 – O – { β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 2) – [β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 3)] – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – [α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – D – галактопиранозид}; в цветках — 5,6 – дигидропротодиосцин, неопротодиосцин, террестерозид,

спироста- 3,5 – диен, 26 – O – β – D – глюкопиранозил – 22 – метокси – (25S) – 5 α – фурустан – 2 α , 3 β , 26 – триола – 3 – O – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 2) – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – D – галактопиранозид, 26 – O – β – D – галактопиранозид (25R) – 5 α – фуруст – 20(22) – ен – 12 – он – 3 β , 26 – диола; в плодах — 25R – спирост – 4 – ен – 3, 12 – дион, 26 – O – β – D – глюкопиранозил – (25R) – 5 α – фурустан – 12 – он – 3 β , 22 α , 26 – триол – 3 – O – [β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 2) – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – D – галактопиранозид], 26 – O – β – D – глюкопиранозил – (25R) – 5 α – фуруст – 20(22) – ен – 2 α , 3 β , 26 – триол – 3 – O – [β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 2) – O – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – D – галактопиранозид], (25R,S) – 5 α – спиростан – 12 – он – 3 β – ол – 3 – O – { β – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 2) – [β – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 3)] – β – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – [α – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – галактопиранозид}, 26 – O – β – глюкопиранозил – (25S) – 5 α – фурустан – 12 – он – 3 β , 22 α , 26 – триол – 3 – O – β – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 2) – β – галактопиранозид, 26 – O – β – глюкопиранозил – (25S') – 5 α – фурустан – 12 – он – 3 β , 22 α , 26 – триол – 3 – O – { β – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – [α – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – галактопиранозид}, 26 – O – β – D – глюкопиранозил – (25R) – 5 α – фуруст – 3 β , 22 α , 26 – триол – 3 – O – [β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 3)] – [β – D – ксилопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – [α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2)] – β – D – галактопиранозид (трибулозид А), (23S, 25S) – 5 α – спиростан – 24 – он – 3 β , 23 – диол – 3 – O – { α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2) – O – [β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4)] – β – D – галактопиранозид}, (24S', 25S) – 5 α – спиростан – β – D, 24 – диол – 3 – O – { α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2) – O – [β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4)] – β – D – галактопиранозид}, 26 – O – β – D – глюкопиранозил – (25R) – 5 α – фурустан – 2 α , 3 β , 22 α , 26 – тетраол – 3 – O – { β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 2) – O – β – D – глюкопиранозил – (1 \rightarrow 4) – β – D – галактопиранозид}, 26 – O – β – D – глюкопиранозил – (25S) – 5 α – фурустан – 12 – он – 22 – метокси – 3 β , 26 – диол – 3 – O – { α – L – рамнопиранозил – (1 \rightarrow 2) – O – [β

– D – глюкопиранозил – (1→4)] – β – D – галактопиранозид}, 26 – O – β – D – глюкопиранозил – (25R) – 5α – фуруст – 20(22) – ен – 2α, 3β, 26 – триол – 3 – O – β – D – галактопиранозил – (1→2) – β – D – глюкопиранозил – (1→2) – β – D – галактопиранозид (трибуфурозид В), 26 – O – β – D – глюкопиранозид (25R) – 5α – фуруст – 20(22) – ен – 12 – он – 3β, 26 – диола (трибуфурозид С), 3 – O – {β – D – ксилопиранозил – (1→3) – [β – D – ксилопиранозил – (1→2)] – (β – D – глюкопиранозил – (1→4) – [α – L – рамнопиранозил – (1→2)] – [β – D – галактопиранозил]} – 26 – O – β – D – глюкопиранозил – 5α – фуруст – 12 – он – 22 – метокси – 3β, 26 – диол (террестрозид А), 3 – O – {β – D – ксилопиранозил – (1→3) – [β – D – ксилопиранозил – (1→2)] – β – D – глюкопиранозил – (1→4) – [α – L – рамнопиранозил – (1→2)] – β – D – галактопиранозил} – 26 – O – β – D – глюкопиранозил – 5α – фуруст – 22 – метокси – 3β, 26 – диол (террестрозид В) [74, 104, 105].

Наибольшее количество фурустаноловых гликозидов содержится в цветках (до 3,05%) и листьях (до 2,9%), наименьшее — в корнях (до 1,08%), зрелых плодах (до 0,48%) и стеблях диаметром более 2,5 мм (до 0,25%) [78, 93, 97].

2. *Флавоноиды*: в надземных частях и плодах – астрагалин, 3-рутинозид и 3-генциобиозид кемпферола, 3-генциобиозид изорамнетина, трибулозид; в надземных частях – рутин; в листьях – 3-*n*-кумароилглюкозид, 3-О-рамнозилглюкозид, и 3-генциобиозидо-7-глюкозид кемпферола, 3-глюкозид, 3-генциобиозид, 3-генциобиозид, 3-рамнозилгенциобиозид и 3-генциобиозидо-7-глюкозид кверцетина, 3-глюкозид, 3-рутинозид, 3-*n*-кумароил глюкозид, 3-генциотриозид, 3,7-диглюкозид, 3-генциобиозидо-7-глюкозид и 3-генциотриозидо-7-глюкозид изорамнетина; в цветках – кемпферол, кверцетин, 3-О-рамнозид кверцетина [24 – 26, 74, 87, 89, 90, 101,127].

3. *Фенолкарбоновые кислоты.* В плодах – феруловая, *n*-гидроксibenзойная кислота [74].

4. *Алкалоиды и другие азотсодержащие соединения.* Гармол, гармалин, гармалол, тетрагидроноргарман, норгарман, тетрагидрогарман. В надземной части – гарман, в плодах – террестрибисамид, трибулусамиды А, В, трибулусимид С, трибулустерин, *N-n*-кумароилтирамин, *N-транс*-кумароилтирамин, *N-транс*-ферулоилтирамин, террестриамид, ацетат аурантиамида, ксантозин, *N-транс*-кофеоилтирамин, в семенах – гармин [74].

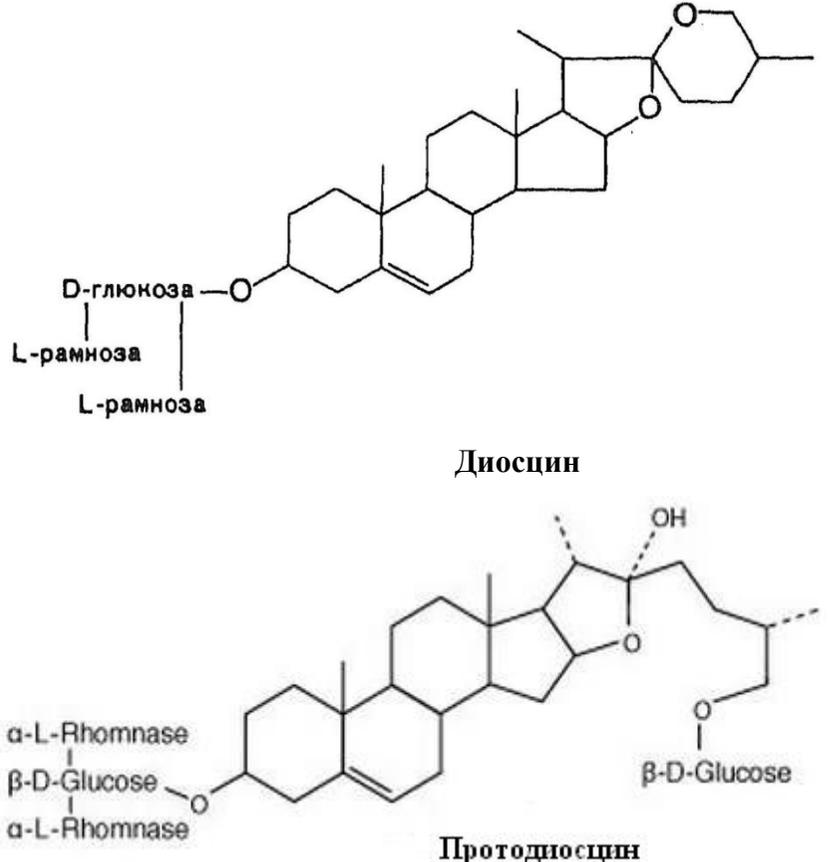
5. *Каротиноиды.* В листьях – α -каротин [74].

6. *Высшие жирные кислоты.* В плодах – олеиновая кислота [74, 80].

Наиболее распространенные соединения представлены в таблице 1.

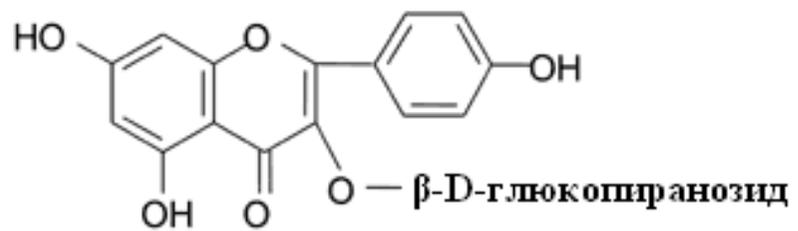
Таблица 1

Химический состав якорцев стелющихся травы

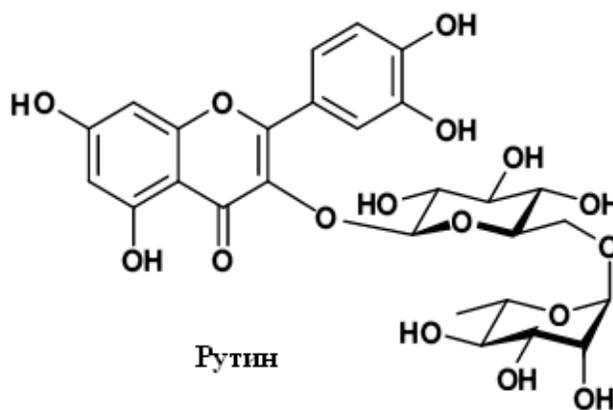
№ п/ п	Название группы БАВ	Название соединения Формула	Ссылка на литературный источник
1.	Стероиды	 <p style="text-align: center;">Диосцин</p> <p style="text-align: center;">Протодиосцин</p>	24, 25, 35, 40, 73, 83, 110, 120, 124,135, 140

2. Флавоноиды

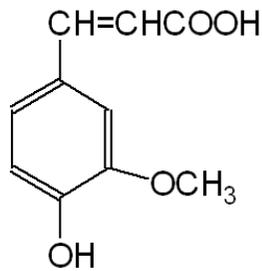
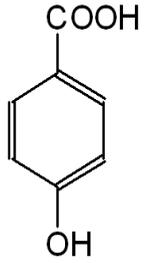
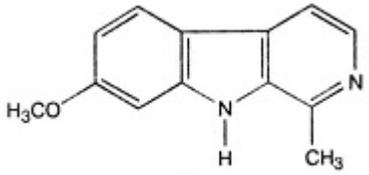
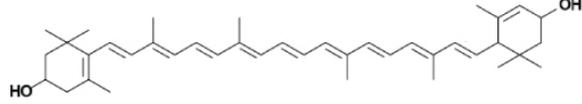
36, 87, 89, 101, 127



Астрагалин



Рутин

3.	Фенол-карбоновые кислоты	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> $\text{CH}=\text{CHCOOH}$  <p>Феруловая кислота</p> </div> <div style="text-align: center;"> COOH  <p>п-гидроксibenзойная кислота</p> </div> </div>	24, 25, 74
4.	Алкалоиды	 <p>Гармин</p>	25, 25, 74
5.	Каротиноиды	 <p>α-каротин</p>	137
6.	Высшие жирные кислоты	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ <p>Олеиновая кислота</p>	137, 138

1.6. ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Якорцев стелющихся трава используется как сырье для получения лекарственных растительных препаратов.

Трава якорцев стелющихся обладает гипохолестеринэмическим, стимулирующим функцию половых желез, обезболивающим, общетонизирующим, противовоспалительным, гепатопротекторным, антигипертензивным, иммуномодулирующим, антиоксидантным и мочегонным действием, а также стимулируют секрецию желудочного сока, усиливают перистальтику кишечника [3,4, 40, 41, 47, 48, 53, 77, 79, 86, 96, 98,122,143]. Кроме того, трава обладает антибактериальным действием и противогрибковой активностью [107] против флуконазол устойчивых грибков *Candida* [117]. Другие исследования в пробирке так же показали, как противогрибковые так и антибактериальные свойства якорцев стелющихся [131]. Обладает свойствами афродизиака [133].

Из надземных частей якорцев стелющихся грузинскими учеными ранее был получен новогаленовый препарат – Трибуспонин (tribusponin), состоящий из суммы стероидных сапонинов, снижающий уровень холестерина в крови и увеличивающий лецитин/холестериновый коэффициент [34].

На основе стероидных сапонинов фураностанолового типа болгарской компанией АО «Софарма» создан препарат «Трибестан».

В состав 1 таблетки **Трибестан** входит сухой экстракт травы якорцев стелющихся 250,0 мг с соотношением фураностаноловых сапонинов в пересчете на протодиосцин – не менее 112,5 мг [23].

Препарат обладает гиполипидемическим, общетонизирующим, стимулирующим функцию половых желез действием, используется для лечения андрологических заболеваний (мужского бесплодия, возрастного андрогенного дефицита, эректильной дисфункции и общего репродуктивного здоровья мужчин) [20-23, 76, 114].

Российской компанией ЗАО «ЭВАЛАР» из травы якорцев стелющихся получают препарат «**ЭФФЕКС Трибулус**».

В состав 1 таблетки **ЭФФЕКС Трибулус** входит сухой экстракт травы якорцев стелющихся 250,0 мг с содержанием суммы фураностаноловых сапонинов в пересчете на протодиосцин и сухое вещество 45%. Лекарственный препарат оказывает общетонизирующее действие и стимулирует функции половой системы. У мужчин восстанавливает и улучшает сексуальное либидо, удлиняет время эрекции. Стимулирует сперматогенез, увеличивая количество сперматозоидов и их подвижность. Также обладает гиполипидемическим эффектом, причем у пациентов с липопротеинемией снижает общий холестерин и липопротеиды низкой плотности, не влияет на значения сывороточных триглицеридов и липопротеидов высокой плотности [23].

Экстракт якорцев стелющихся входит в состав комплексных препаратов «**Фитовит**», «**Спеман**», «**Спеман форте**».

Американская компания «Nature's Sunshine» выпускает биологически активную добавку «**Босвеллия плюс**»

В состав 1 капсулы **Босвеллия плюс** входят:

а) Экстракты: мирры (1:5) (*Commifora mukul*) – 50 мг; босвеллии (1:3) (*Boswellia serrata*) – 35 мг; паэдерии (1:12) (*Paederia foetida*) – 30 мг; прутняка (1:5) (*Vitex egundo*) – 30 мг; пажитника сенного (1:10) (*Trigonella foenum-graecum*) – 10 мг; Корень ашваганды (*Withania somnifera*) – 65 мг; Корень сассапарили (*Smilax china*) – 40 мг; Кора холарбены (*Holarrbena antidysenterica*) – 30 мг

б) Смесь из трав – 120 мг: Сельдерея пахучий (*Apium graveolens*); Боярышник (Boerhaavia diffusa); Сидя сердцелистная (*Sida cordifolia*); Айован (*Trachyspermum ammi*); Якорцы стелющиеся (*Tribulus terrestris*); Сыть круглая (*Cyperus rotundus*); Тиноспора сердцелистная (*Tinospora cordifolia*).

Оказывает мощное противовоспалительное действие. Помогает в восстановлении повреждённых кровеносных сосудов и микроциркуляции.

Улучшает доступ крови в ткани и к воспалённым суставам и стимулирует питание опорно-двигательного аппарата [126].

Американская компания «RSP Nutrition» из плодов якорцев стелющихся выпускает биологически активную добавку «**Tribulus Terrestris Hormone optimization**».

В 1 капсуле **Tribulus Terrestris Hormone optimization** содержится 800 мг извлечения из плодов якорцев стелющихся. Является спортивным питанием. Способствует естественному производству тестостерона. Ускоряет повышение синтеза белка. Способствует восстановлению массы нежировой ткани и восстановлению после физических нагрузок. Способствует стимуляции сексуального влечения. Безопасно как для мужчин, так и для женщин [113].

Якорцы стелющиеся используются также в форме водных извлечений в традиционной медицине Монголии при заболеваниях нервной системы, в качестве обезболивающего и мочегонного средства, для растворения камней в почках, а также при атеросклерозе, сопровождающемся гипертонией и стенокардией [11].

В традиционной китайской медицине, плоды якорцев использовались для лечения глаз, отеков, вздутия живота, патологических болей и сексуальной дисфункции. Якорцы описываются как очень ценное лекарственное средство в Shern-Nong фармакопее (самая старая известная фармакологическая работа в Китае) для восстановления угнетенной печени, лечения уплотнений в груди, мастита, метеоризма, острого конъюнктивита, головной боли и витилиго [103].

В исследовании, проведенном в Египте в 2015 году в группе мужчин старшей возрастной группы, страдающих возрастным андрогенным дефицитом, применение экстракта якорцев стелющихся травы три раза в день по 250 мг на протяжении трёх месяцев показало статистически значимую разницу в увеличении уровня тестостерона (общего и свободного) [130].

Исследование, проведенное в Иране в 2016 году, в лабораторных условиях, на человеческих сперматозоидах показало улучшение различных параметров мужской спермы, таких как подвижность, криволинейная скорость, жизнеспособность [119].

Другое исследование, проведенное в Бразилии в 2016 году, на 65 мужчинах, показало значительное увеличение качества спермы, в особенности увеличение концентрации и подвижности [132].

Рандомизированное, двойное, слепое, плацебо-контролируемое исследование, проведенное в 2014 году, подтвердило высокую эффективность применения якорцев стелющихся для лечения сексуальной дисфункции у женщин [102].

В 2016 году, ученые из Ирана, решили проверить эффективность применения якорцев стелющихся травы, как способа лечения диабета применяемого в народе. Этанольный экстракт якорцев, который они использовали, показал высокую эффективность в снижении уровня глюкозы, по сравнению с плацебо у женщин больных диабетом 2 типа [125]. Механизм снижения сахара по всей видимости связан с ингибированием активности α-глюкозидазы в тонком кишечнике [108,129]. Так же был найден легкий ингибирующий альфа-амилазу эффект, не зависящий от дозы, что говорит о эффективности применения очень маленькими дозировками [129].

Исследования в пробирке клеток сердца и целых сердец животных, показало, что вещества из якорцев стелющихся обладают защитным эффектом на ткани сердца [142], был обнаружен, так же, нейропротекторный эффект стероидных сапонинов якорцев стелющихся [141].

Якорцы стелющиеся широко применяются в народной медицине многих стран [103]. Отвар и настой травы рекомендуется в народной медицине Востока как тонизирующее, слабительное и мочегонное средство, при гонорее, головных болях, конъюнктивитах [4]. В народной медицине Болгарии растение используется для лечения импотенции [103]. В Непале местными травниками, в виде отвара внутрь, при инфекциях мочеполового тракта [100].

В индийской медицине отвар якорцев используют при болях внизу спины, радикулите, воспалении органов малого таза и крестца, сухом кашле и расстройствах дыхания [118].

Народная медицина Киргизии якорцев стелющихся траву применяет как ранозаживляющее и мочегонное средство [41].

Порошок высушенных плодов якорцев стелющихся в народной медицине Средней Азии курят при сифилисе, гонорее, кроме того они рекомендуют варить корни якорцев в молоке и пить при хронической малярии в качестве средства, снимающего чувство общей усталости, слабости [41].

В тибетской медицине использовали якорцы стелющиеся в составе многокомпонентных рецептов при лечении отравлений [50].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературных источников показал богатый состав биологически активных веществ в сырье якорцев стелющихся.

2. На основании данных литературы по медицинскому использованию якорцев стелющихся в научной и народной медицине разных стран, установлено, что в основном медицинское использование связывают с группой стероидных сапонинов.

3. Несмотря на богатый состав БАВ в сырье, научной медициной используется только препарат «трибестан», в основном содержащий стероидные сапонины, остальные средства на основе экстракта травы выпускаются в виде БАД.

4. Отсутствие современной нормативной документации не позволяет проводить достоверную оценку качества сырья с учетом последних требований регуляторных органов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы пяти партий якорцев стелющихся травы, упакованных в бумажные пакеты были заложены на хранение в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С для определения стабильности показателей качества и подтверждения срока годности в соответствии с ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [71].

Исследования проводили на индивидуальных образцах травы якорцев стелющихся – *Tribuli terrestris herba*, сем. *Zygophyllaceae*, собранных в Российской Федерации: в республике Крым и ботаническом саду ВИЛАР; в Молдове, Сирии и также промышленных образцах фирмы Harraz производства Египет, заготовленных в течение 2016 – 2019 г.г. Объекты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Образцы якорцев стелющихся

№	Место сбора	Тип образца	Дата сбора
1	Российская Федерация, ботанический сад ВИЛАР, г. Москва	индивидуальный сбор	2016 г.
2	Российская Федерация, Крым, бухта Ласпи, вершина горы Кушкая	индивидуальный сбор	2017 г.
3	Республика Молдова, окрестности г. Кишинев	индивидуальный сбор	2017 г.
4	Сирийская Арабская Республика, окрестности г. Дамаск	индивидуальный сбор	2018 г.
5	Сирийская Арабская Республика, окрестности г. Дамаск	индивидуальный сбор	2019 г.
6	Российская Федерация, Крым, поселок Никита	индивидуальный сбор	2019 г.
7	Египет, Harraz «SPICES, HERBS and NATURAL OIL»	промышленный	2016 г.
8	Египет, Harraz «Planta medical group»	промышленный	2016 г.

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1. Макроскопический и микроскопический анализ

Макроскопический и микроскопический анализ проводили по методикам Государственной фармакопеи XIV издания [66-70].

При проведении макроскопического анализа сравнивали морфологические признаки образцов сырья с признаками, указанными в разделе «Внешние признаки» нормативного документа [17].

Для этого сухую траву размачивали, погружая ее на несколько минут в горячую воду. Подготовленную к анализу траву раскладывали на стеклянной пластинке, тщательно расправляя стебель, листья, цветки, плоды. Рассматривали невооруженным глазом и с помощью лупы.

При определении внешних признаков травы обращали внимание на строение листьев, стеблей, цветков, плодов и корней [66-69].

Для проведения микроскопического анализа образцы сырья разделяли по органам (листья, стебли, цветки, корни).

При анализе листьев брали их цельные части или кусочки пластинки листа с краем и жилкой.

Несколько кусочков сырья помещали в колбу или пробирку, прибавляли натрия гидроксида раствор 5 %, разведенный водой (1:1), и кипятили в течение 5 – 7 мин., не допуская сильного размягчения. Затем содержимое переливали в стеклянный стакан, жидкость сливали через 2 – 4 слоя марли, которой закрывали стакан, и сырье тщательно промывали водой, каждый раз сливая воду через ту же марлю. Содержимое стакана переносили в небольшом количестве воды в чашку Петри. Частицы сырья, оставшиеся на марле, смывали в ту же чашку Петри. Из воды кусочки вынимали скальпелем или лопаточкой и помещали на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата.

Кусочки сырья, просветленные и помещенные на предметное стекло, разделяли скальпелем или препаровальными иглами на две части, одну из них осторожно переворачивали.

Объект накрывали покровным стеклом, при необходимости слегка сверху придавливали чистым обратным концом препаровальной иглы и слегка подогревали до удаления пузырьков воздуха, после охлаждения рассматривали лист с обеих сторон под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. При разных увеличениях, пользуясь макро – и микровинтом, исследовали верхний и нижний эпидермис, а также глубинные структуры листа, расположенные под эпидермисом (паренхима, включения, сосуды и т.д.).

Для анализа цветков брали его составляющие: чашечку, венчик.

Способ просветления использовали тот же, что и для листьев. Тонкие лепестки кипятили в натрия гидроксида растворе 5 % не более 1 мин. И готовили микропрепараты.

Для анализа стеблей и корней готовили поперечные срезы.

Небольшие куски органов помещали в холодную воду и выдерживали около 1 суток, затем помещали в смесь спирта 95 % и глицерина (1:1) на 3 суток. Делали поперечные срезы, которые окрашивали сафранином, и готовили микропрепараты в растворе хлоралгидрата. Рассматривали анатомо-диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении [70].

Изучение анатомических признаков проводили с помощью микроскопа «Биомед 6», увеличение 640х, 400х, 160х.

Для микрофотографирования использовали цифровую камеру DCM 510, программа Scope Photo.

Размеры клеток измеряли с помощью окуляр-микрометра. Результаты обработали в программе Microsoft Excel.

2.2.2. Фитохимический анализ

2.2.2.1. Качественные химические реакции на основные группы биологически активных веществ

Качественный анализ проводили по стандартным методикам. Наличие действующих веществ устанавливали с помощью общепринятых качественных реакций.

Флавоноиды – проба Синода; проба Брианта; с алюминия хлоридом раствором 2% в 96% спирте и раствором щелочи 10%; с раствором железа(III) хлорида 0,5%.

Для проведения качественных реакций на флавоноиды готовили извлечения на 80% спирте [18,84,85].

Для получения извлечения 1,0 измельченного сырья помещали в коническую колбу со шлифом, добавляли 10 мл спирта 80 % – ного, кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Фильтровали, упаривали до концентрации 1:5. Полученное извлечение использовали для качественных реакций [84].

1. Цианидиновая реакция (проба Shinoda)

К извлечению прибавляют 1 мл спирта 96%, 0,1 г порошка магния и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной.

2. Проба Брианта

В пробирку, где проводилась проба Синода, добавляют октанол и встряхивают: если окраска перешла в октанол, то в сырье содержатся только агликоны, которые растворимы в октаноле, если окраска осталась в водной фазе – в сырье только гликозиды, если окрасились оба слоя, в сырье присутствуют флавоноиды как в виде гликозидов, так и в виде агликонов.

3. Реакция с алюминия хлоридом раствором 2% в 96% спирте

К 1 мл извлечения прибавляют 2 мл раствора алюминия хлорида раствора 2% – ного в 96% спирте и 7 мл спирта 96%.

Флавоноиды образуют хелатные комплексы за счет водородных связей, возникающих между карбонильной и окси-группой, желтого цвета с желто – зеленую флуоресценцию.

4. Реакция с раствором щелочи 10%

К извлечению добавляют несколько капель спиртового раствора щелочи 10%. Флавоноиды образуют феноляты желтого цвета.

5. Реакция с раствором железа(III) хлорида 0,5%

К извлечению добавляют 0,5 мл раствора железа (III) хлорида 0,5%.

Флавоноиды образуют комплексные соединения, окрашенные в черносиний цвет если в кольце В три гидроксильные группы и в зелёный, если в кольце В две гидроксильные группы.

Фенолкарбоновые кислоты. Для проведения качественных реакций на фенолкарбоновые кислоты готовили водное извлечение в соотношении 1:10, и проводили реакцию с железа (III) аммония сульфатом [84,85].

Алкалоиды. Для проведения качественных реакций на алкалоиды готовили уксуснокислое извлечение по методике: 0,5 г сырья настаивали на водяной бане с 5 мл 5% раствора уксусной кислоты, фильтровали. С полученным извлечением проводили реакции с общеалкалоидными осадительными реактивами: реактив Бушарда, реактив Вагнера, реактив Драгендорфа, реактив Бертрана, раствор танина [18,84,85].

2.2.2.2. Качественный анализ на сапонины и флавоноиды методом ТСХ

Для проведения качественного анализа:

на сапонины использовали методику, приведенную в ВФС 42-827-79 [8,17,42]. Хроматографирование осуществляли в системе растворителей хлороформ – метанол – вода (61:32:7). Полученные хроматограммы высушивали и опрыскивали 1% раствором парадиметиламинобензальдегида в 4 моль/л метанольном растворе кислоты хлористоводородной. Нагревали в сушильном шкафу при 60° С в течение 2 – 3 минут. Появляются четыре розовых пятна (фуростаноловые гликозиды)

на флавоноиды использовали методику количественного определения суммы флавоноидов разработанную нами, приведенную в главе 5. Хроматографирование осуществляли в системе растворителей муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80). Детектирование веществ на хроматограммах осуществляли путем просматривания в видимом и УФ – свете, до и после обработки хромогенными реактивами. При проявлении хроматограмм алюминия хлорида раствором 2% в 96% спирте флавоноидные вещества приобретали в видимом свете желто-зеленую окраску.

2.2.2.3. Качественный и количественный анализ методом ВЭЖХ

Исследования были проведены на базе лаборатории «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Министерства здравоохранения Российской Федерации [10].

Пробоподготовка объекта

Около 0,5 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу объемом 100 мл и заливали 25 мл метанола (х.ч.), далее проводили экстракцию содержимого колбы на ультразвуковой бане в течение 30 минут при температуре 30 ± 1 °С. 1 мл полученного извлечения переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали в течение 5 минут при 10 000 об/мин.

50 мкл супернатанта помещали в виалу объемом 2 мл, добавляли 950 мкл метанола и перемешивали. Объем анализируемой пробы составил 5 мкл.

Исследование методом ВЭЖХ – МС/МС

Анализ осуществляли на жидкостном хроматомасс-спектрометре «LCMS – 8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с источником двойной ионизации DUIS (Shimadzu).

Разделение осуществляли на хроматографической колонке Luna 5u C18(2) (2,1×150 mm 3,5 – Micron) при температуре 40°С.

- элюент: 0,1% раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил (30:70);
- режим элюирования: градиентный;
- скорость потока подвижной фазы: 0,4 мл/мин.

Условия масс-спектрометрического анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3

Условия масс-спектрометрического анализа

Интерфейс	DUIS (электроспрей + химическая ионизация)
Поток газа-распылителя	3 L/min
Поток нагревающего газа	10 L/min
Поток осушающего газа	10 L/min
Температура интерфейса	300 °C
Температура DL	200 °C
Температура Heat Block	400 °C
Расход газа – осушителя	10 л/мин
Напряжение на капилляре	4000 В
Полярность источника ионизации	Положительная
Энергия соударительной ячейки	30 эВ

Детектирование образующихся ионов проводили в режиме MRM (мониторинга множественных реакций). Ионные переходы для диосцина составили 869,50→415,00; для протодиосцина 1031,5→415,0. Обработка хроматографической информации осуществлялась с помощью программного обеспечения «LabSolutions» (Shimadzu).

2.2.2.4. Элементный анализ

Изучение элементного состава проводили с использованием рентгено-флюоресцентного метода, рекомендованного для исследования элементного состава лекарственного сырья Государственной Фармакопеей XIV издания [62]. Подготовку образцов сырья проводили по следующей методике: навеску около 10 г сухого сырья измельчали до порошкообразного состояния, помещали в тигель и сжигали на плитке до прекращения дымления. Тигли помещали в муфельную печь при температуре 500 °C, выдерживали в муфельной печи около 2 ч, до полного озоления и отсутствия черной угольной массы. После полного

охлаждения тиглей добавляли азотную кислоту 50% и выпаривали её на плитке с закрытой спиралью, в вытяжном шкафу, избегая разбрызгивания, затем помещали в муфельную печь при температуре 500 °С на 2 ч. После охлаждения тигля, в зольном остатке проводили определение качественного и количественного состава элементов на рентгенофлуоресцентном спектрометре QUANT'X компании Thermo Scientific. Определение проводили в трехкратной повторности [10]. Обработка результатов проводилась с использованием системы Microsoft Excel. Для сравнения анализа результатов использовали критерий Стьюдента с оценкой достоверности отличий ($p < 0,05$) [30]. Так же использовали язык статистического программирования R CRAN.

2.2.3. Методики стандартизации лекарственного растительного сырья

2.2.3.1. Методы отбора проб для анализа

Отбор проб для товароведческого анализа сырья якорцев стелющихся проводили в соответствии с ГФ XIV ОФС.1.1.0004.15 «Отбор проб» [63].

2.2.3.2. Определение числовых показателей качества сырья

Определение числовых показателей (влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание экстрактивных веществ, примеси) проводили по методикам ГФ XIV, статьи ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [59]; ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая» [57]; ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» [58]; ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [60].

2.2.3.3. Количественное определение сапонинов

Количественное определение сапонинов проводили по методике [42]:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл метилового спирта и вносят остеклованный перемешивающий стержень. Колбу с содержимым взвешивают с точностью до 0,01 г, нагревают на водяной бане с магнитной мешалкой до кипения и кипятят в течение 1 часа. Затем охлаждают до комнатной температуры и взвешивают. Потерь в массе пополняют метиловым спиртом, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 10 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят до метки метиловым спиртом и тщательно перемешивают (раствор А). 5 мл раствора А переносят в стеклянную пробирку, прибавляют 5 мл 1% раствора пара – диметиламинобензальдегида в 4н растворе хлористоводородной кислоты в метиловом спирте (раствор Б). Пробирку закрывают стеклянной пробкой, встряхивают и нагревают в течение 2 часов в ультротермостате при температуре $58 \pm 0,5$ °С. Раствор охлаждают водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность при длине волны 516 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл 4н раствора хлористоводородной кислоты в метиловом спирте, который также выдерживают в ультротермостате при $58 \pm 0,5$ °С. Содержание фураностаноловых гликозидов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \times 0,009401 \times 50 \times 10 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W) \times k}, \text{ где}$$

C – количество кобальта хлорида, найденного по калибровочному графику в граммах; 0,009401 – коэффициент пересчета концентрации кобальта хлорида на концентрацию фураностаноловых гликозидов; m – масса сырья в граммах; W –

потеря в массе при высушивании сырья в процентах; k – поправочный коэффициент на титр хлористоводородной кислоты.

Построение калибровочного графика. Точную навеску 5,0000г кобальта хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, прибавляют 1 каплю концентрированной хлористоводородной кислоты и доводят объем до метки водой. В мерные колбы вместимостью 25 мл отбирают бюреткой по 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 и 15 мл исходного раствора и доводят объем раствора до метки водой. Полученные растворы содержат соответственно 5,10,15,20,25,30 мг кобальта хлорида в 1 мл. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. По результатам измерения оптической плотности растворов строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс содержание кобальта хлорида в граммах в 1 мл, на оси ординат – оптическую плотность раствора.

Примечание.

1 . Приготовление 4н раствора кислоты хлористоводородной. 340 мл концентрированной кислоты хлористоводородной (плотность 1,19) разбавляют метиловым спиртом до 1 л. *Установка титра.* 12 мл приготовленного раствора вносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора до метки метиловым спиртом и тщательно перемешивают (получают 0,5н раствор хлористоводородной кислоты в метиловом спирте). Далее поступают, как указано при установке титра 0,5 н раствора хлористоводородной кислоты.

2. Приготовление 1% раствора пара-диметиламинобензальдегида. 5г пара-диметиламинобензальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют около 200 мл 4 н раствора кислоты хлористоводородной в метиловом спирте и после растворения осадка объем доводят до метки 4н раствором кислоты хлористоводородной в метиловом спирте.

2.3.3.4. Количественное определение суммы флавоноидов

Для выявления условий количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве использовали дифференциальный спектрофотометрический метод анализа, широко применяемый в настоящее время для фармакопейных видов сырья и суммарных фитохимических препаратов.

Метод спектрофотометрического определения основан на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служит для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений.

Спектральные исследования проводили в диапазоне длин волн 350 – 430 нм с шагом 1 нм. Для измерения оптической плотности использовали кюветы с толщиной слоя 10 мм, УФ – спектры этанольных извлечений из сырья и спектры адсорбции с алюминия хлорида раствором 2% в 96% спирте снимали с помощью спектрофотометра СФ – 2000 [65].

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО – АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ

3.1. РЕЗУЛЬТАТЫ МАКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Образцы якорцев стелющихся травы, заготовленные в Крыму (2017г, 2019г), Молдове (2017г), ботаническом саду ВИЛАР (2016г), Сирии (2018г, 2019г) имеют общие морфологические признаки: парноперистосложные листья с узкими острыми прилистниками. Листочки продолговатые длиной от 5,60 до 9,60 мм, шириной от 2,00 до 4,90 мм (табл. 5), опушенные большей частью с нижней стороны. Цвет листочков с верхней стороны – зеленый, с нижней – беловато-зеленый. Цветки, мелкие, одиночные, правильные, желтые. Плоды — ценокарпные, сухие, дробные, дисковидной формы, распадаются при созревании на 5 звездчато расположенных угловатых плодиков, с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов соломенно-зеленого цвета диаметром от 9,0 до 16,00 мм (табл. 4) (рис. 9).



Рис.9. Якорцев стелющихся трава.

Таблица 4

Средние значения морфологических признаков
образцов травы якорцев стелющихся

Образец		ВИЛАР	Крым	Молдова	Сирия	Сирия	Крым
Признак		2016 г	2017 г	2017 г	2018 г	2019 г	2019 г
		M±m, мм	M±m, мм	M±m, мм	M±m, мм	M±m, мм	M±m, мм
плод	диаметр	9,74 ± 0,17	9,00 ± 0,15	9,20 ± 0,21	14,65 ± 0,99	16,00 ± 1,10	9,89 ± 0,21
	верхняя пара шипов	4,15 ± 0,13	4,73 ± 0,12	4,43 ± 0,15	4,43 ± 0,43	5,46 ± 0,49	4,60 ± 0,27
	нижняя пара шипов	1,96 ± 0,10	2,93 ± 0,14	1,79 ± 0,17	1,86 ± 0,18	3,03 ± 0,41	2,70 ± 0,27
листочек сложного листа	длина	9,60 ± 0,07	6,50 ± 0,04	7,40 ± 0,03	5,60 ± 0,42	5,70 ± 0,54	6,80 ± 0,05
	ширина	4,90 ± 0,10	2,70 ± 0,01	2,90 ± 0,01	2,23 ± 0,16	2,00 ± 0,16	2,30 ± 0,02

Примечание: М – среднее значение, m – среднее отклонение.

Указанные образцы соответствуют по морфологическим признакам сырью якорцев стелющихся.

Промышленный образец сырья Harraz «SPICES, HERBS and NATURAL OIL» состоит из сухих плодов пирамидальной формы без крыльев и без шипов. Данный образец по морфологическим признакам плодов соответствует виду *Tribulus ochroleucus*. Также в образце присутствует большое количество стеблей с колючками, которые не характерны для стеблей якорцев стелющихся (рис.10).

По морфологическим признакам данный образец не является травой якорцев стелющихся.



Рис.10. Образец Harraz «SPICES, HERBS and NATURAL OIL»:

1 – промышленная упаковка, 2 – внешний вид промышленного образца, 3 – плоды, 4 – кусочки стебля с колючками.

Промышленный образец сырья Harraz «Planta medical group» состоит только из плодов: ценокарпных, сухих, дробных, распадающихся при созревании на 5 звездчато расположенных угловатых плодиков, покрытых острыми шипами. Также нами в образце были обнаружены семена клещевины, зерновки злака, камешек, листья и плоды неизвестного растения (рис.11).



Рис.11. Образец Harraz «Planta medical group»: 1 – промышленная упаковка, 2 – внешний вид промышленного образца, 3 – промышленного образца плоды, 4 – семена клещевины, 5 – неизвестное растение, камешек, 6 – зерновки злака.

По морфологическим признакам плодов данный образец можно отнести к роду якорцы, однако из-за отсутствия в образце листьев и цветков, определить его принадлежность к определенному виду не представляется возможным.

Так как подлинность промышленных образцов сырья нами не подтверждена в дальнейших исследованиях данные образцы мы не использовали.

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

При проведении микроскопического анализа, мы готовили по 30 микропрепаратов листа, стебля, цветка, корня с каждого образца.

Образцы якорцев стелющихся Крым (2017г, 2019г), Молдова (2017г), ботанический сад ВИЛАР (2016г), Сирия (2018г, 2019г) характеризуются общими анатомическими признаками [1].

3.2.1. Анатомическое строение листа

Клетки эпидермиса продолговатой, реже круглой формы, контур клеток слабоизвилистый, имеются утолщения в углах клеток. Устьица расположены с обеих сторон листа, больше их встречается на нижней стороне листа. Устьица окружены 3 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) (рис. 12). По краю и по всей поверхности листа, с нижней и верхней стороны, расположены простые одноклеточные волоски разной длины (длинные, средние, короткие) и ширины (рис.13 – 14). На верхушке листа преимущественно встречаются короткие волоски (рис.15). У места прикрепления волоска клетки эпидермы располагаются радиально, образуя розетку (рис.16). В мезофилле листа встречаются кристаллы оксалата кальция – друзы (рис.17).

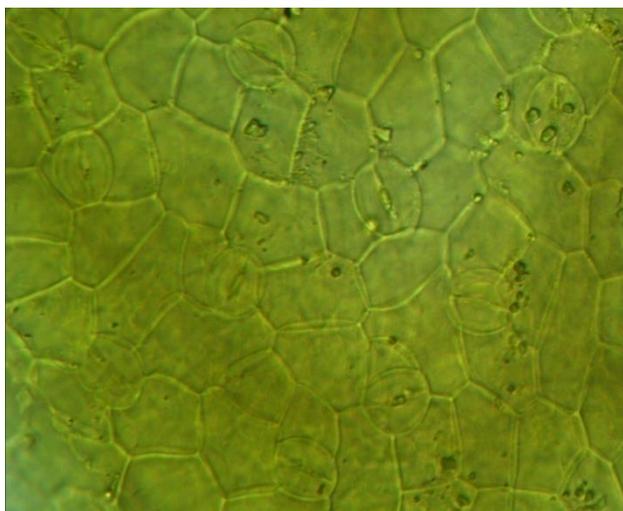


Рис.12. Устьица аномоцитного типа.



Рис.13. Волоски по краю листа.

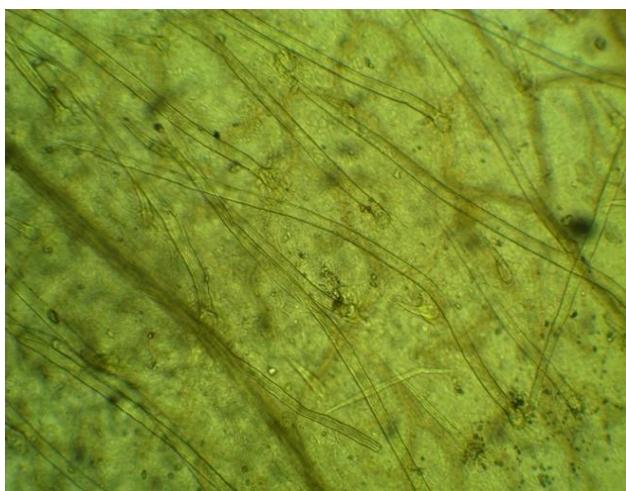


Рис.14. Волоски по поверхности листа.



Рис.15. Волоски у верхушки листа.

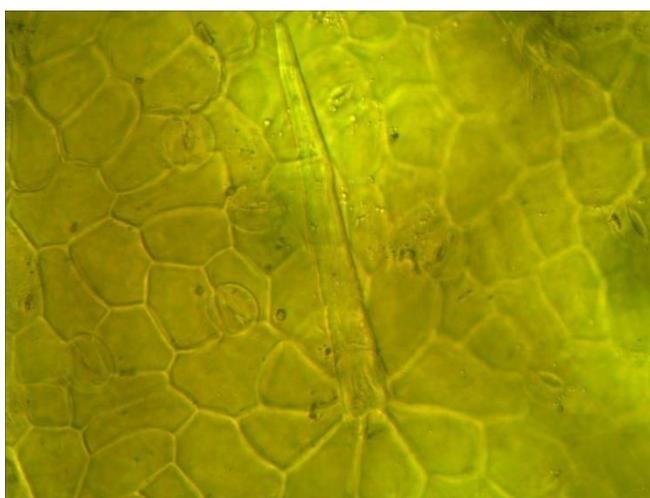


Рис.16. Радиальное расположение клеток эпидермы.

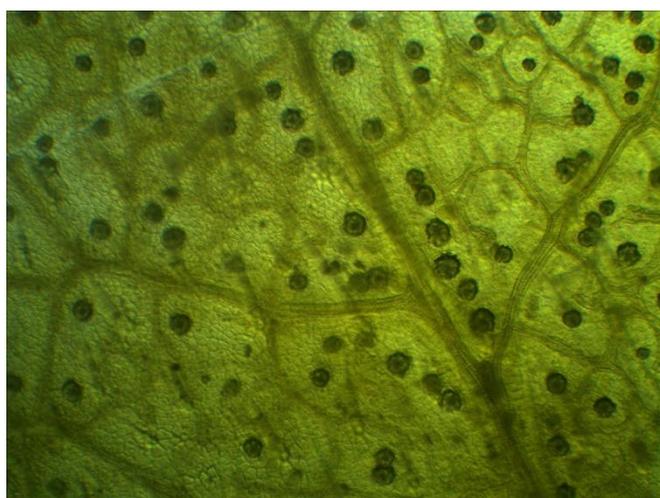


Рис.17. Кристаллы оксалата кальция – друзы.

При изучении анатомических признаков листа проводили измерения волосков, клеток эпидермиса, устьиц и друз (табл. 5 – 10).

Таблица 5

Анатомические признаки листа, образец ВИЛАР 2016 г

№ п/п Признак	Размеры волоска						Клетки эпидермиса, мкм		Устьица, мкм		Друзы, мкм
	длинный, мкм		средний, мкм		короткий, мкм		l	b	l	b	d
	l	b	l	B	L	b					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	752	20	492	16	168	12	20	13	15	13	18
2	776	16	416	12	88	12	17	10	19	15	24
3	664	16	576	12	144	16	24	15	18	14	20
4	1184	20	608	16	112	12	22	17	21	17	24
5	724	20	312	20	104	12	19	17	21	14	28
6	812	16	400	12	108	12	22	16	17	15	18
7	908	20	404	12	64	16	19	14	19	14	16
8	980	16	444	12	252	16	24	13	13	11	20
9	704	16	308	12	144	12	17	11	14	14	20
10	1156	20	588	16	128	12	18	11	18	12	24
11	728	16	432	12	112	12	34	13	20	13	24
12	896	20	328	16	136	16	22	14	19	15	24
13	752	16	384	12	188	12	21	16	16	13	28
14	1084	20	512	20	92	12	20	12	19	11	18
15	844	20	428	16	76	8	26	13	17	14	18
16	832	20	388	12	120	12	19	14	21	15	20
17	724	16	360	12	156	16	24	15	16	16	24
18	756	12	508	16	228	16	17	13	16	12	24
19	912	16	524	12	128	12	20	16	18	14	14
20	828	24	412	16	128	12	24	12	20	14	28
21	852	20	536	20	68	8	16	13	13	12	28
22	716	16	428	12	188	12	23	9	13	14	24
23	868	16	416	16	200	16	20	18	12	14	18
24	1092	20	408	16	64	12	15	8	11	12	18
25	924	16	444	16	92	12	30	20	9	8	20
26	1188	20	348	20	252	16	22	17	10	8	24
27	1004	20	548	16	248	12	23	21	17	17	28
28	796	20	440	12	224	8	15	12	15	12	30
29	1040	20	480	20	56	12	18	12	16	13	32
30	1220	20	420	12	96	12	16	14	16	15	32
M	890,53	18,27	443,07	14,80	138,80	12,67	20,90	13,97	16,30	13,37	22,93
m	29,78	0,46	14,55	0,55	10,86	0,43	0,78	0,55	0,60	0,39	1,79

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, M – среднее значение, m – среднее отклонение.

Таблица 6

Анатомические признаки листа, образец Крым 2017 г

№ п/п Признак	Размеры волоска						Клетки эпидермиса, Мкм		Устьица, мкм		Друзы, мкм
	длинный, мкм		средний, мкм		короткий, мкм		l	B	l	b	d
	l	b	L	B	L	b					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	824	12	496	16	256	12	23	15	18	15	32
2	660	16	528	16	144	12	21	14	18	17	36
3	768	20	512	20	88	8	23	18	13	18	40
4	812	28	492	12	108	12	36	15	18	16	44
5	892	40	472	16	212	16	27	21	18	17	36
6	780	36	568	16	168	12	27	19	15	16	28
7	848	16	484	12	104	8	29	18	17	15	24
8	720	16	464	24	72	8	26	22	21	17	28
9	668	16	480	20	68	8	24	15	23	15	16
10	900	20	608	16	192	12	14	13	19	17	24
11	680	16	612	20	60	8	31	14	22	17	28
12	816	16	540	12	192	12	39	16	16	17	16
13	676	16	596	16	216	16	19	21	14	14	12
14	676	16	528	16	180	12	34	16	23	16	20
15	688	32	628	20	176	8	26	16	21	14	23
16	688	24	620	16	80	8	27	18	22	17	18
17	732	16	380	28	68	12	39	18	19	19	14
18	832	16	376	16	132	12	24	13	17	14	19
19	780	12	384	16	112	12	23	19	15	17	22
20	796	16	464	20	180	12	34	17	22	17	19
21	708	16	332	16	96	16	25	15	21	15	21
22	848	12	320	12	72	8	37	18	18	14	14
23	864	12	312	16	68	8	25	16	20	16	18
24	1188	12	300	12	120	12	30	24	21	19	17
25	1108	12	568	16	72	12	22	15	18	22	29
26	680	16	568	16	44	12	23	22	22	18	15
27	664	16	588	20	64	8	18	11	21	19	27
28	748	20	596	16	56	8	20	15	14	15	31
29	984	24	516	16	36	8	25	13	17	14	20
30	696	16	468	16	84	12	13	11	16	17	25
М	790,80	18,53	493,33	16,80	117,33	10,80	25,29	16,06	18,03	15,94	23,68
м	23,51	1,29	17,99	0,65	10,90	0,48	1,22	0,59	0,52	0,34	1,45

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, М – среднее значение, м – среднее отклонение

Таблица 7

Анатомические признаки листа, образец Молдова 2017 г

№ п/п	Размеры волоска						Клетки эпидермиса, Мкм		Устьица, мкм		Друзы, мкм
	длинный, мкм		средний, мкм		короткий, мкм		l	B	l	b	d
	l	b	L	B	L	b					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	772	16	556	16	268	16	21	14	15	17	35
2	740	20	400	16	156	12	19	16	17	15	27
3	648	16	568	16	164	12	24	20	20	18	32
4	892	16	588	12	108	12	25	14	18	17	19
5	660	16	472	16	224	12	21	22	16	16	23
6	656	20	364	16	132	12	26	18	19	16	34
7	1088	28	292	12	164	12	28	16	17	17	24
8	656	16	444	20	96	12	24	24	20	16	26
9	728	16	400	20	140	16	22	18	22	15	16
10	900	20	528	24	168	12	24	14	17	14	15
11	792	12	344	12	252	16	28	16	18	16	28
12	912	28	500	12	164	12	36	20	18	13	15
13	784	24	432	16	272	16	22	18	19	18	14
14	712	16	368	12	136	12	32	18	17	16	24
15	1180	56	592	20	112	8	20	14	19	17	25
16	960	20	496	12	156	12	24	14	16	17	16
17	788	16	540	12	144	8	40	16	20	17	16
18	1228	20	372	16	204	16	20	18	18	15	17
19	732	24	496	16	168	16	22	20	18	16	25
20	1016	20	508	16	96	12	24	22	18	16	23
21	1012	16	420	20	156	12	22	16	19	15	20
22	852	20	636	24	112	8	22	20	17	16	29
23	1020	16	608	32	124	16	24	22	19	15	20
24	1184	20	672	32	256	16	28	26	19	17	21
25	828	20	592	20	156	12	24	20	22	16	24
26	656	16	452	16	188	12	24	20	18	17	15
27	944	16	548	24	272	16	20	18	20	20	24
28	740	20	588	20	124	12	24	16	21	19	21
29	932	16	540	16	216	12	22	20	22	17	20
30	872	16	400	20	248	16	16	18	21	15	18
M	862,80	19,87	490,53	17,87	172,53	12,93	24,26	18,26	18,06	15,77	21,31
m	30,59	1,42	17,64	0,97	10,04	0,46	1,82	1,15	0,68	0,58	1,24

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, M – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 8

Анатомические признаки листа, образец Сирия 2018 г

№ п/п	Размеры волоска						Клетки эпидермиса, Мкм		Устьица, мкм		Друзы, мкм
	длинный, мкм		средний, мкм		короткий, мкм		l	B	l	b	d
	l	b	L	B	L	b					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	860	30	460	22	135	24	34	28	18	20	30
2	986	38	344	16	226	22	28	24	18	20	40
3	648	30	486	20	248	18	30	26	22	18	34
4	666	32	362	16	140	12	24	20	24	20	32
5	830	38	486	30	108	18	32	24	20	18	30
6	532	28	400	26	150	16	36	24	20	18	30
7	522	20	340	14	266	14	26	26	20	20	28
8	830	30	368	30	132	12	34	20	18	16	26
9	728	18	310	18	138	16	32	26	24	22	28
10	1000	38	314	18	112	18	24	28	18	20	26
11	695	40	398	20	202	18	26	30	20	18	28
12	578	30	446	14	233	20	32	26	24	22	32
13	634	32	454	26	106	20	34	30	18	16	30
14	748	24	379	24	108	16	28	24	22	20	34
15	965	24	358	30	214	26	36	24	24	22	30
16	986	28	318	26	226	18	34	24	20	18	28
17	845	26	412	30	108	22	34	20	20	18	28
18	542	30	324	24	204	18	32	28	18	16	34
19	999	32	324	16	98	30	28	26	18	16	28
20	962	38	366	26	104	18	30	26	24	22	20
21	812	14	394	30	136	30	32	24	24	22	28
22	930	18	485	30	182	16	26	22	22	16	36
23	810	20	400	18	206	18	30	28	22	18	28
24	898	24	342	16	266	24	28	30	26	24	28
25	758	26	420	24	260	22	24	20	20	18	32
26	630	30	445	24	160	18	32	24	20	16	34
27	1010	16	356	24	196	14	34	26	20	18	26
28	645	24	430	30	106	20	30	30	18	16	24
29	1211	32	488	22	200	20	30	22	18	14	26
30	635	24	422	22	236	14	30	24	20	18	30
М	796,50	27,80	394,36	22,86	173,53	19,06	30,66	25,13	20,66	18,66	29,60
m	65,18	2,58	21,15	2,00	21,13	1,68	1,40	1,13	0,90	0,90	1,45

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 9

Анатомические признаки листа, образец Сирия 2019 г

№ п/п	Пыльца	Размеры волоска					Клетки эпидермиса, Мкм		Устьица, мкм		Друзы, мкм	
		длинный, мкм		средний, мкм		короткий, мкм		l	B	l	b	d
		l	b	l	B	L	b					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	864	32	480	16	160	16	32	24	20	16	40	
2	960	40	304	32	240	24	32	20	24	16	32	
3	640	32	480	24	240	16	28	20	20	20	24	
4	656	32	352	16	48	8	20	20	20	16	24	
5	832	40	496	32	80	8	36	28	24	24	32	
6	576	32	400	24	176	16	32	20	24	20	16	
7	512	16	320	16	272	16	24	20	24	20	32	
8	832	32	320	32	144	8	32	28	24	24	24	
9	720	16	368	16	128	16	28	24	20	20	20	
10	1008	40	304	16	80	16	32	28	20	16	28	
11	800	40	400	16	208	24	32	32	20	20	32	
12	560	32	448	24	208	16	36	28	20	16	40	
13	640	32	496	24	96	16	36	28	24	20	32	
14	736	24	384	24	128	16	32	20	20	16	36	
15	960	24	352	32	240	24	28	28	20	16	28	
16	976	32	320	24	256	16	28	20	24	20	28	
17	848	24	400	24	80	24	36	24	24	20	28	
18	512	32	304	16	208	24	36	32	24	20	36	
19	1008	32	320	24	208	32	36	24	24	16	32	
20	960	40	368	24	80	24	40	16	20	20	24	
21	832	16	400	32	176	16	32	28	20	20	32	
22	960	16	496	32	192	16	20	20	20	16	32	
23	816	16	416	16	208	8	24	20	20	16	24	
24	1152	24	352	24	256	16	24	20	24	16	20	
25	752	24	432	24	160	24	28	20	20	20	40	
26	640	32	448	16	80	16	36	20	24	20	36	
27	1280	24	384	24	96	16	36	20	24	16	20	
28	640	16	400	32	96	16	32	24	20	20	28	
29	1200	24	496	24	208	16	24	20	20	16	28	
30	640	32	432	24	256	24	32	20	24	20	40	
М	817,06	28,26	395,73	23,46	166,93	17,60	30,80	23,20	21,86	18,53	29,60	
m	75,02	3,01	23,89	2,20	25,23	2,13	1,92	1,58	0,75	0,91	2,43	

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 10

Анатомические признаки листа, образец Крым 2019 г

№ П/П	Пыльца	Размеры волоска					Клетки эпидермиса, Мкм		Устьица, мкм		Друзы, мкм	
		длинный, мкм		средний, мкм		короткий, мкм		l	B	l	b	d
		l	b	l	B	L	b					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	816	32	352	8	128	16	32	28	20	20	32	
2	720	24	384	19,2	96	8	40	28	16	16	28	
3	576	24	400	16	64	8	48	24	20	16	36	
4	512	17,6	352	19,2	112	16	32	32	24	20	32	
5	672	16	368	32	64	8	32	36	20	20	24	
6	720	33,6	352	16	144	8	36	24	24	16	32	
7	880	32	400	16	240	16	36	24	20	16	40	
8	544	16	480	24	144	16	48	24	24	16	24	
9	640	24	432	16	288	16	48	48	20	12	32	
10	672	32	480	19,2	288	8	48	32	24	20	16	
11	800	32	384	16	256	8	52	20	16	16	19,2	
12	720	33,6	416	16	160	8	40	24	12	12	24	
13	1040	36	304	16	240	8	40	28	16	12	33,6	
14	992	48	496	16	272	8	28	28	20	16	32	
15	1040	40	432	16	288	8	52	28	16	16	40	
16	1328	40	432	16	160	8	32	40	24	20	35,2	
17	736	16	464	16	224	24	28	24	20	16	40	
18	512	32	480	32	240	16	32	24	20	16	48	
19	800	32	480	24	192	16	40	24	20	16	40	
20	720	32	432	16	256	16	44	28	20	20	35,2	
21	640	32	368	8	288	8	52	44	20	20	40	
22	592	32	416	32	192	8	56	32	20	20	35,2	
23	800	16	416	16	208	8	40	40	24	16	48	
24	560	16	320	16	256	16	44	40	20	16	48	
25	560	32	480	24	256	24	48	24	20	16	40	
26	752	48	480	32	256	16	60	36	20	20	36,8	
27	720	32	448	32	80	16	40	40	20	12	40	
28	1280	48	368	16	208	24	52	28	20	16	35,2	
29	560	30,4	480	24	48	16	40	32	24	24	36,8	
30	1040	48	352	16	160	16	40	32	20	20	32	
М	764,76	30,84	414,86	19,52	193,60	13,06	42,00	30,53	20,13	17,06	34,50	
m	79,33	3,70	20,48	2,52	28,21	1,99	3,18	2,64	1,07	1,10	2,91	

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Проанализировав полученные данные, мы составили таблицу минимальных и максимальных значений анатомических признаков листа (табл. 11).

Таблица 11

Минимальные и максимальные значения анатомических признаков листа

Образец		ВИЛАР 2016 г мкм	Крым 2017 г Мкм	Молдова 2017 г Мкм	Сирия 2018 г Мкм	Сирия 2019 г мкм	Крым 2019 г мкм
волосок длинный	<i>l</i>	664 – 1220	660 – 1188	648 – 1228	522 – 1211	512 – 1200	512 – 1328
	<i>b</i>	12 – 24	12 – 40	12 – 56	14 – 40	16 – 40	16 – 48
волосок средний	<i>l</i>	308 – 608	300 – 628	292 – 672	310 – 488	304 – 496	320 – 496
	<i>b</i>	12 – 20	12 – 28	12 – 32	14 – 30	16 – 32	8 – 32
волосок короткий	<i>l</i>	56 – 252	36 – 256	96 – 272	98 – 266	48 – 272	48 – 288
	<i>b</i>	8 – 16	8 – 16	8 – 16	12 – 30	8 – 32	8 – 24
клетки эпидермы	<i>l</i>	15 – 34	13 – 39	16 – 40	24 – 36	20 – 40	28 – 60
	<i>b</i>	8 – 21	11 – 24	14 – 26	20 – 30	16 – 32	20 – 44
устыца	<i>l</i>	9 – 21	13 – 23	15 – 22	18 – 26	20 – 24	12 – 24
	<i>b</i>	8 – 17	14 – 22	13 – 20	14 – 24	16 – 24	12 – 24
друзы	<i>d</i>	16 – 32	12 – 44	14 – 35	20 – 40	16 – 40	16 – 48

После определений, мы вывели средние значения измеренных анатомических признаков листа. Данные привели в таблице 12

Таблица 12

Средние значения анатомических признаков листа

Образец		ВИЛАР 2016 г	Крым 2017 г	Молдова 2017 г	Сирия 2018 г	Сирия 2019 г	Крым 2019 г
Признак		М ± m, мкм					
волосок длинный	<i>l</i>	890,53 ± 29,78	790,80 ± 23,51	862,80 ± 30,59	796,50 ± 65,18	817,06 ± 75,02	764,76 ± 79,33
	<i>b</i>	18,27 ± 0,46	18,53 ± 1,29	19,87 ± 1,42	27,80 ± 2,58	28,26 ± 3,01	30,84 ± 3,70
волосок средний	<i>l</i>	443,07 ± 14,55	493,33 ± 17,99	490,53 ± 17,64	394,36 ± 21,15	395,73 ± 23,89	414,86 ± 20,48
	<i>b</i>	14,80 ± 0,55	16,80 ± 0,65	17,87 ± 0,97	22,86 ± 2,00	23,46 ± 2,20	19,52 ± 2,52
волосок короткий	<i>l</i>	138,80 ± 10,86	117,33 ± 10,90	172,53 ± 10,04	173,53 ± 21,13	166,93 ± 25,23	193,60 ± 28, 21
	<i>b</i>	12,67 ± 0,43	10,80 ± 0,48	12,93 ± 0,46	19,06 ± 1,68	17,60 ± 2,13	13,06 ± 1,93
клетки эпидермы	<i>l</i>	20,90 ± 0,78	25,29 ± 1,22	24,26 ± 1,82	30,66 ± 1,40	30,80 ± 1,92	42,00 ± 3,18
	<i>b</i>	13,97 ± 0,55	16,06 ± 0,59	18,26 ± 1,15	25,13 ± 1,13	23,20 ± 1,58	30,53 ± 2,64
устыца	<i>l</i>	16,30 ± 0,60	18,03 ± 0,52	18,06 ± 0,68	20,66 ± 0,90	21,86 ± 0,75	20,13 ± 1,07
	<i>b</i>	13,37 ± 0,39	15,94 ± 0,34	15,77 ± 0,58	18,66 ± 0,90	18,53 ± 0,91	17,06 ± 1,10
друзы	<i>d</i>	22,93 ± 1,79	23,68 ± 1,45	21,31 ± 1,24	29,60 ± 1,45	29,60 ± 2,43	34,50 ± 2,91

Таким образом, измеренные нами размеры анатомических признаков (волосков, клеток эпидермы, устьиц, друз) исследуемых образцов находятся в близких пределах.

3.2.2. Анатомическое строение стебля

Покровная ткань стебля – эпидермис, корорый покрыт слоем кутикулы. Первичная кора состоит из 5 – 8 слоев паренхимы. Перицикл из 4 – 7 слоев клеток склеренхимы с небольшими межклетниками. Проводящая система – непучкового строения. Сердцевина большая состоит из паренхимных клеток (рис.18).

В первичной коре и сердцевине обнаружены кристаллы оксалата кальция – друзы, встречаются редко (рис.19).

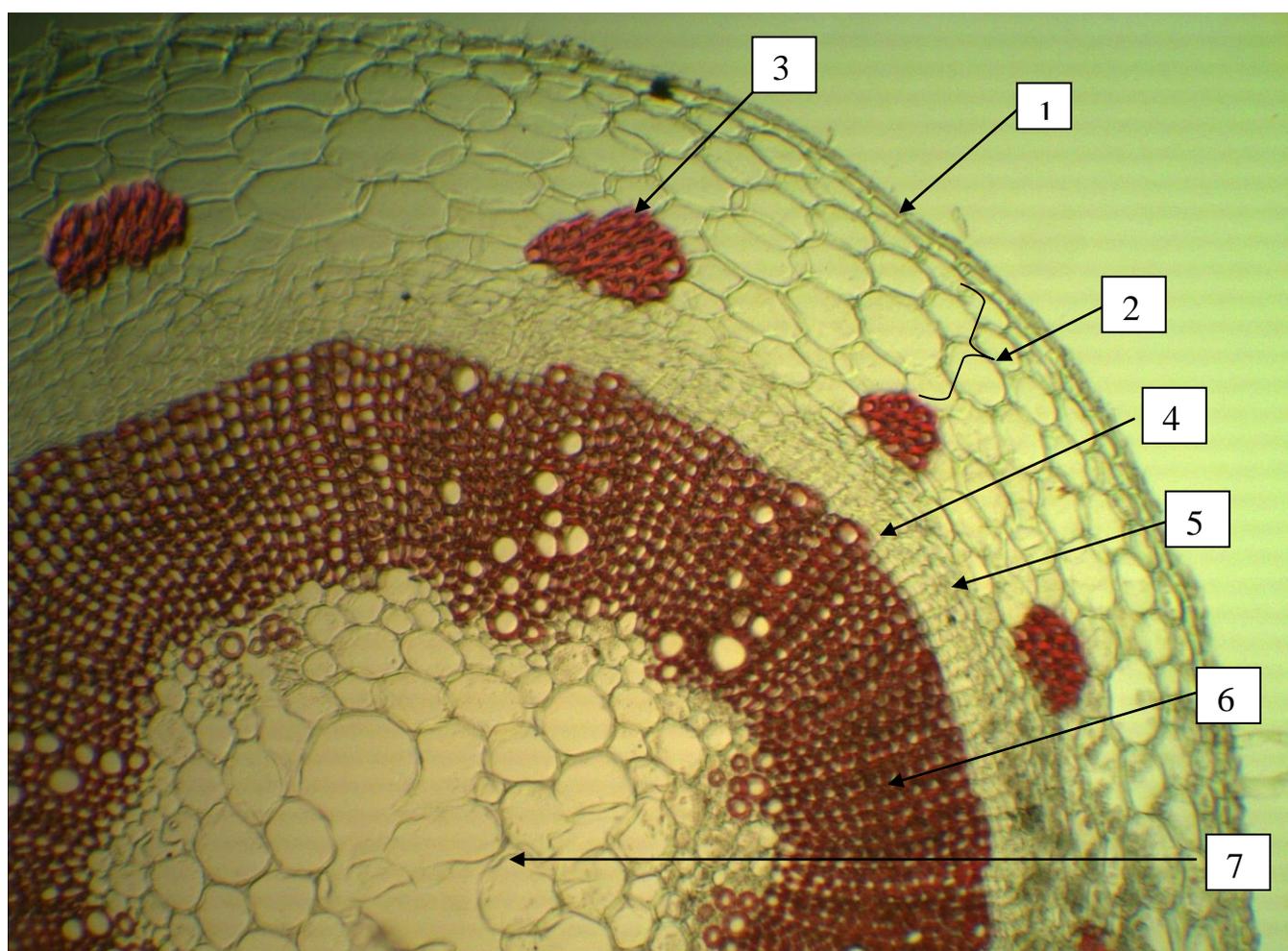


Рис.18. Общий вид поперечного среза стебля якорцев стелющихся:

1 – эпидермис, 2 – первичная кора, 3 – перицикл, 4 – камбий, 5 – флоэма, 6 – ксилема,
7 – сердцевина

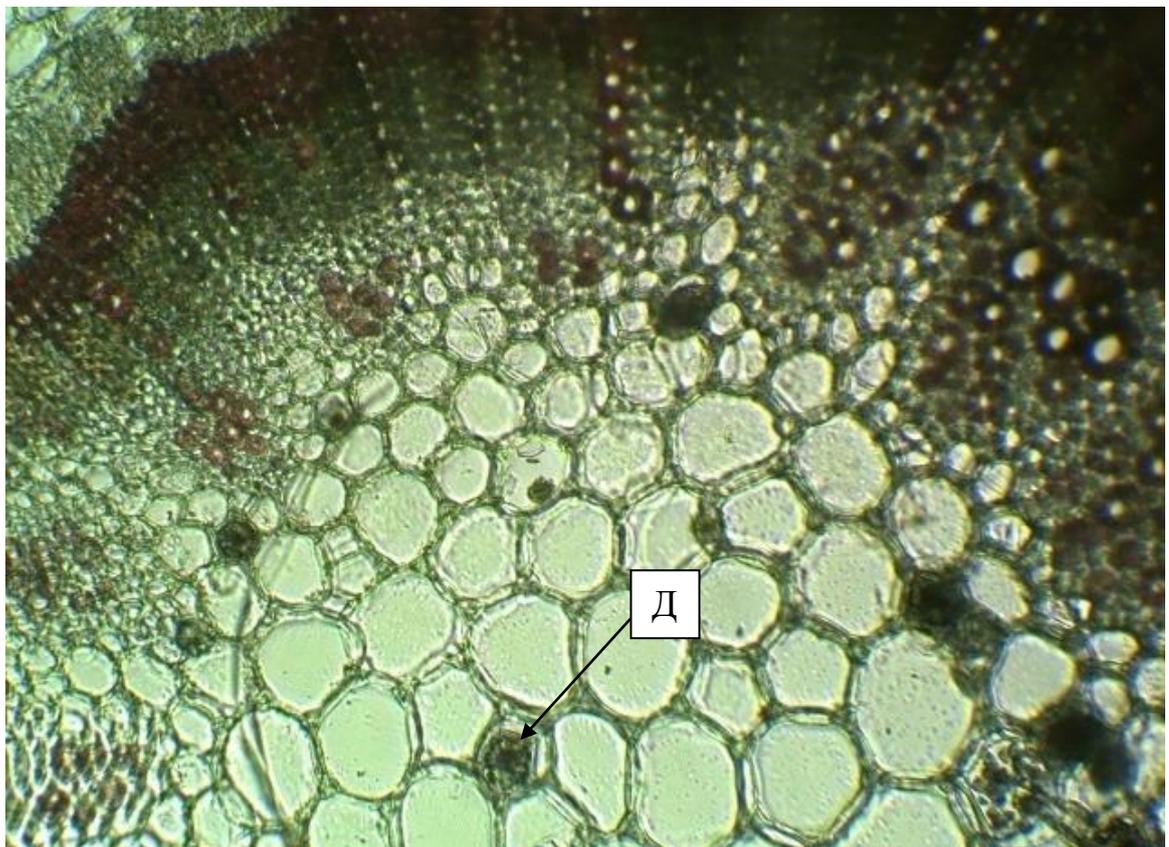
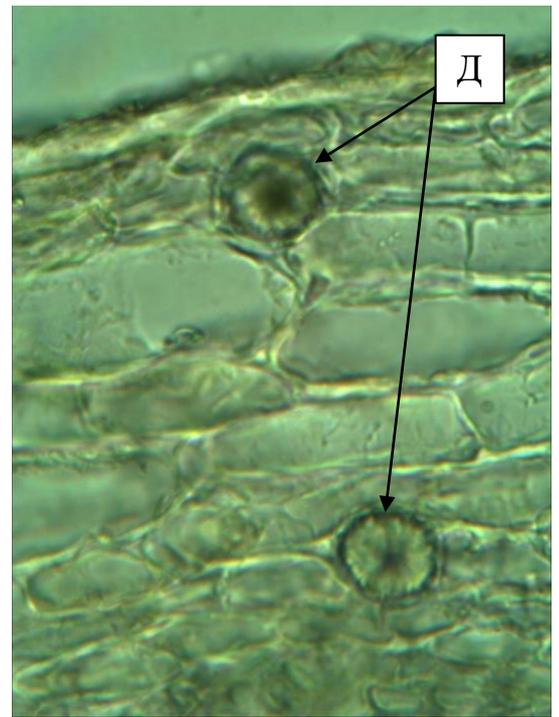
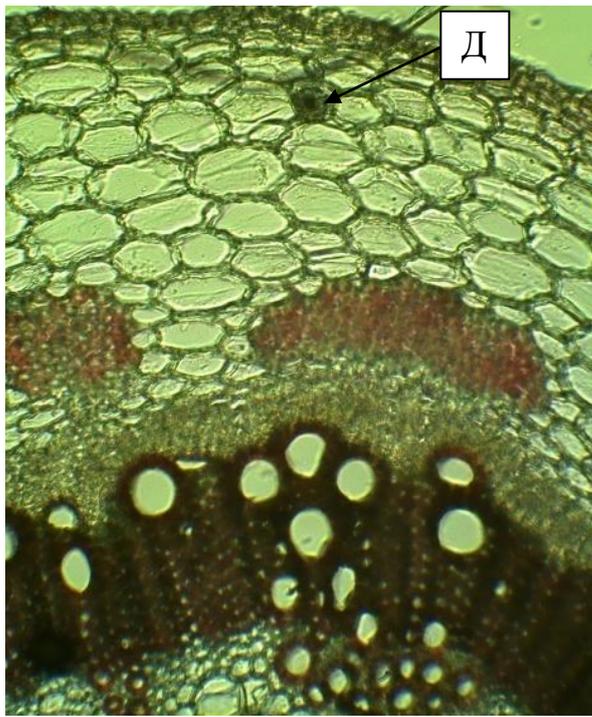


Рис.19. Общий вид стебля якорцев стелющихся: Д – кристаллы оксалата кальция (друзы).

При изучении анатомических признаков стебля проводили измерения толщины первичной коры, перидикла, флоэмы, ксилемы, радиуса стеблей и диаметр кристаллов оксалата кальция – друз (табл. 13 – 18).

Таблица 13

Анатомические признаки стебля, образец ВИЛАР 2016 г

Признак № п/п	Толщина первичной коры, мкм	Перицикл, мкм	Флоэма, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6	7
1	170	70	100	480	1400	36
2	150	70	80	330	1250	24
3	240	140	120	430	1450	28
4	250	130	120	300	1510	24
5	320	180	100	340	1500	44
6	160	130	80	380	1520	16
7	120	100	80	400	1440	32
8	170	70	70	940	1100	28
9	110	70	110	370	1340	28
10	220	200	90	330	1650	40
11	170	100	110	350	1530	32
12	130	80	160	430	1520	24
13	130	110	180	420	1350	44
14	220	90	450	580	1440	28
15	150	50	80	330	1020	32
16	130	60	70	400	1420	30
17	350	160	90	350	1610	18
18	200	80	50	460	1050	28
19	180	80	90	470	1400	26
20	200	130	130	400	1500	26
21	150	50	220	620	1320	20
22	220	140	130	460	1520	32
23	180	70	110	450	1430	32
24	150	80	130	480	1450	24
25	130	100	90	440	1250	24
26	160	50	80	280	1200	24
27	130	110	130	70	1230	28
28	130	70	110	420	1420	20
29	250	130	130	490	1750	32
30	220	140	80	380	1470	32
М	183,00	101,33	119,00	419,33	1401,33	28,53
m	10,56	7,17	13,08	25,35	30,69	2,50

Примечание: М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 14

Анатомические признаки стебля, образец Крым 2017 г

Признак № п/п	Толщина первичной коры, мкм	Перицикл, Мкм	Флоэма, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6	7
1	100	80	76	320	900	24
2	92	96	68	288	1500	26
3	96	64	60	336	830	18
4	64	76	56	292	650	32
5	100	64	96	240	850	32
6	212	136	120	236	1230	24
7	172	120	84	320	1160	28
8	348	196	112	304	1220	18
9	112	92	88	224	1160	18
10	280	204	124	252	1440	20
11	140	56	64	116	600	20
12	100	52	40	88	700	20
13	96	72	56	92	700	24
14	100	76	60	232	720	24
15	164	84	68	96	780	30
16	360	168	108	260	1440	32
17	60	92	64	256	950	32
18	88	64	56	100	640	28
19	72	68	52	184	750	28
20	108	68	80	216	980	24
21	104	56	84	220	960	24
22	88	76	124	288	1100	24
23	104	64	96	212	1000	18
24	84	72	68	96	650	16
25	392	200	72	260	1510	20
26	132	84	80	288	1030	20
27	76	60	88	188	1050	24
28	72	64	100	320	710	24
29	128	56	68	100	680	28
30	92	68	56	332	850	32
М	137,87	90,93	78,93	225,20	958,00	24,40
м	16,43	8,13	4,15	14,94	50,16	1,84

Примечание: М – среднее значение, м – среднее отклонение

Таблица 15

Анатомические признаки стебля, образец Молдова 2017 г

Признак № п/п	Толщина первичной коры, мкм	Перицикл, мкм	Флоэма, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6	7
1	240	196	80	608	1930	18
2	176	136	96	496	2000	20
3	244	152	108	360	2300	20
4	200	116	44	400	2240	24
5	108	136	36	164	1300	26
6	136	100	40	148	930	18
7	184	128	44	288	1430	32
8	232	136	52	404	1850	32
9	300	144	68	344	1640	30
10	144	108	24	228	1100	24
11	224	116	48	360	1400	26
12	240	108	56	228	1310	28
13	156	84	48	108	880	20
14	216	104	60	152	920	20
15	160	92	64	112	880	24
16	204	120	48	168	980	24
17	244	156	80	276	1560	24
18	168	120	72	280	1530	32
19	164	92	52	108	930	32
20	160	100	36	112	900	18
21	232	168	96	520	2100	20
22	216	116	120	372	1940	20
23	300	88	60	428	2000	24
24	180	120	52	264	2100	26
25	148	128	36	152	960	28
26	160	120	72	256	1000	28
27	312	160	56	400	1700	18
28	200	108	64	164	950	18
29	208	100	60	144	900	28
30	144	120	64	204	1240	28
М	200,00	122,40	61,20	274,93	1430,00	24,33
m	9,26	4,69	4,05	24,88	87,98	1,78

Примечание: М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 16

Анатомические признаки стебля, образец Сирия 2018 г

Признак № п/п	Толщина первичной коры, мкм	Перицикл, мкм	Флоэма, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6	7
1	100	102	44	900	1600	32
2	106	116	42	700	1560	40
3	88	103	32	780	1740	48
4	74	102	28	834	1800	26
5	90	98	44	834	1820	32
6	120	94	44	750	1840	32
7	88	118	42	1000	1600	28
8	130	114	34	1000	2010	30
9	120	118	36	930	1700	30
10	84	114	36	870	1700	32
11	124	112	36	750	1500	34
12	100	84	64	860	1440	34
13	94	78	44	1000	1780	32
14	88	90	32	788	1560	30
15	98	140	44	820	1800	30
16	110	108	48	840	1700	28
17	116	102	48	840	1600	34
18	90	110	32	718	1600	30
19	114	96	32	636	1780	30
20	110	96	32	875	1660	32
21	88	100	32	834	1760	32
22	120	100	48	788	1480	28
23	110	94	46	916	1650	28
24	112	140	46	625	1600	30
25	98	110	30	634	1700	30
26	114	124	38	734	1700	30
27	112	124	46	776	1700	34
28	110	94	48	648	1400	26
29	98	118	38	700	1500	32
30	102	116	38	960	1500	32
М	103,60	107,16	40,13	811,33	1659,33	31,53
m	5,10	5,41	2,90	40,95	50,85	1,55

Примечание: М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 17

Анатомические признаки стебля, образец Сирия 2019 г

Признак № п/п	Толщина первичной коры, мкм	Перицикл, мкм	Флоэма, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6	7
1	96	112	32	800	1800	28
2	104	96	64	624	1800	26
3	64	112	64	880	1800	26
4	64	112	32	928	1760	28
5	80	96	48	928	1800	28
6	128	96	64	704	2000	32
7	48	128	48	1012	3600	36
8	144	144	48	940	2000	24
9	96	80	64	848	1600	40
10	80	80	64	896	1800	28
11	128	112	64	736	1600	32
12	96	64	80	800	1400	24
13	80	80	64	1008	2000	36
14	64	80	32	760	1440	28
15	80	160	80	800	1800	20
16	112	128	64	880	1600	20
17	112	112	64	720	1600	28
18	96	112	48	608	1600	40
19	144	80	48	640	1880	32
20	112	112	48	952	1440	24
21	96	112	48	852	1360	48
22	112	112	80	688	2080	24
23	80	64	64	928	1600	36
24	80	160	80	608	1800	28
25	96	112	32	640	1600	40
26	144	144	48	752	1800	28
27	96	128	64	880	1600	32
28	96	80	64	640	1600	40
29	80	128	32	712	1400	48
30	112	96	48	968	1400	32
М	97,33	107,73	56,00	804,40	1752,00	31,20
м	9,15	9,53	5,60	47,36	149,86	2,72

Примечание: М – среднее значение, м – среднее отклонение

Таблица 18

Анатомические признаки стебля, образец Крым 2019 г

Признак № п/п	Толщина первичной коры, мкм	Перицикл, мкм	Флоэма, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6	7
1	96	128	16	320	928	32
2	80	64	24	256	1040	30
3	128	80	32	304	1040	32
4	64	96	24	240	1080	28
5	96	96	16	288	1000	24
6	80	64	48	240	1040	24
7	80	64	16	304	1000	18
8	80	80	32	288	1000	18
9	64	96	32	240	960	18
10	96	80	32	224	1080	20
11	96	80	24	272	1000	20
12	80	80	32	240	1000	32
13	80	64	32	240	1040	32
14	96	64	16	240	960	18
15	80	80	32	272	1040	18
16	80	64	24	272	1000	18
17	80	80	24	272	1000	24
18	96	80	32	288	960	24
19	64	80	32	320	960	20
20	80	80	16	304	920	20
21	96	64	32	320	1040	32
22	80	96	32	288	960	34
23	80	64	16	240	1000	24
24	64	80	24	240	960	24
25	80	80	24	256	1000	20
26	80	96	24	288	960	18
27	80	64	32	224	1000	18
28	80	80	32	272	1040	24
29	96	80	24	208	1000	32
30	64	48	24	240	920	36
М	83,20	78,40	26,66	266,66	997,60	24,40
м	5,06	5,73	2,75	11,77	15,96	2,24

Примечание: М – среднее значение, м – среднее отклонение

Проанализировав полученные данные, мы составили таблицу минимальных и максимальных значений анатомических признаков стебля (табл. 19).

Таблица 19

Минимальные и максимальные значения анатомических признаков стебля

Образец Признак	ВИЛАР 2016 г	Крым 2017 г	Молдова 2017 г	Сирия 2018 г	Сирия 2019 г	Крым 2019 г
	мкм	мкм	мкм	Мкм	мкм	мкм
толщина первичной коры	110 – 350	60 – 392	108 – 312	74 – 130	48 – 144	64 – 128
толщина перидикла	50 – 200	52 – 204	84 – 196	78 – 140	64 – 160	48 – 128
толщина флоэмы	50 – 450	40 – 124	24 – 120	28 – 64	32 – 80	16 – 48
толщина ксилемы	70 – 940	88 – 336	108 – 608	625 – 1000	608 – 1012	208 – 320
диаметр друз	16 – 44	16 – 32	18 – 32	26 – 48	20 – 48	18 – 36
радиус стебля	1020 – 1750	650 – 1510	880 – 2300	1400 – 2010	1360 – 3600	920 – 1080

После определений мы вывели средние значения измеренных анатомических признаков стебля. Данные привели в таблице 20.

Таблица 20

Средние значения анатомических признаков стебля

Образец Признак	ВИЛАР 2016 г		Крым 2017 г		Молдова 2017 г		Сирия 2018 г		Сирия 2019 г		Крым 2019 г	
	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %
толщина первичной коры	200,00 ± 9,26	13,99	137,87 ± 16,43	14,39	183,00 ± 10,56	13,06	103,60 ± 5,10	6,24	97,33 ± 9,15	5,55	83,20 ± 5,06	3,83
толщина перицикла	122,40 ± 4,69	8,56	90,93 ± 8,13	9,49	101,33 ± 7,17	7,23	107,16 ± 5,41	6,45	107,73 ± 9,53	6,15	78,40 ± 5,73	7,86
толщина флоэмы	61,20 ± 4,05	4,28	78,93 ± 4,15	8,24	119,00 ± 13,08	8,49	40,13 ± 2,90	2,42	56,00 ± 5,60	3,20	26,66 ± 2,75	2,67
толщина ксилемы	274,93 ± 24,88	19,23	225,20 ± 14,94	23,51	419,33 ± 25,35	29,92	811,33 ± 4,95	48,89	804,40 ± 47,36	45,91	266,66 ± 11,73	26,73
диаметр друз	28,53 ± 2,50		24,40 ± 1,84		24,33 ± 1,78		31,53 ± 1,50		31,20 ± 2,72		24,40 ± 2,24	
радиус стебля	1430,00 ± 87,98		958,00 ± 50,16		1401,33 ± 30,69		1659,33 ± 50,85		1752,00 ± 149,86		997,60 ± 15,96	

Примечание: М- среднее значение, m- среднее отклонение

Таким образом, по соотношениям толщины первичной коры, перицикла, флоэмы и ксилемы к общему радиусу стебля данные образцы не отличаются друг от друга.

3.2.3. Анатомическое строение цветка

Клетки венчика многоугольные, изодиаметрические. Эпидермис чашелистиков состоит из клеток со слегка волнистыми стенками, расположены близко друг к другу, покрыты гладкой кутикулой. В структуре чашелистиков присутствуют устьица аномоцитного типа, многочисленные одноклеточные волоски разной длины расположены по поверхности чашелистика и по его краю. В препаратах цветков была обнаружена пыльца сферической формы и друзы оксалата кальция (рис.20).

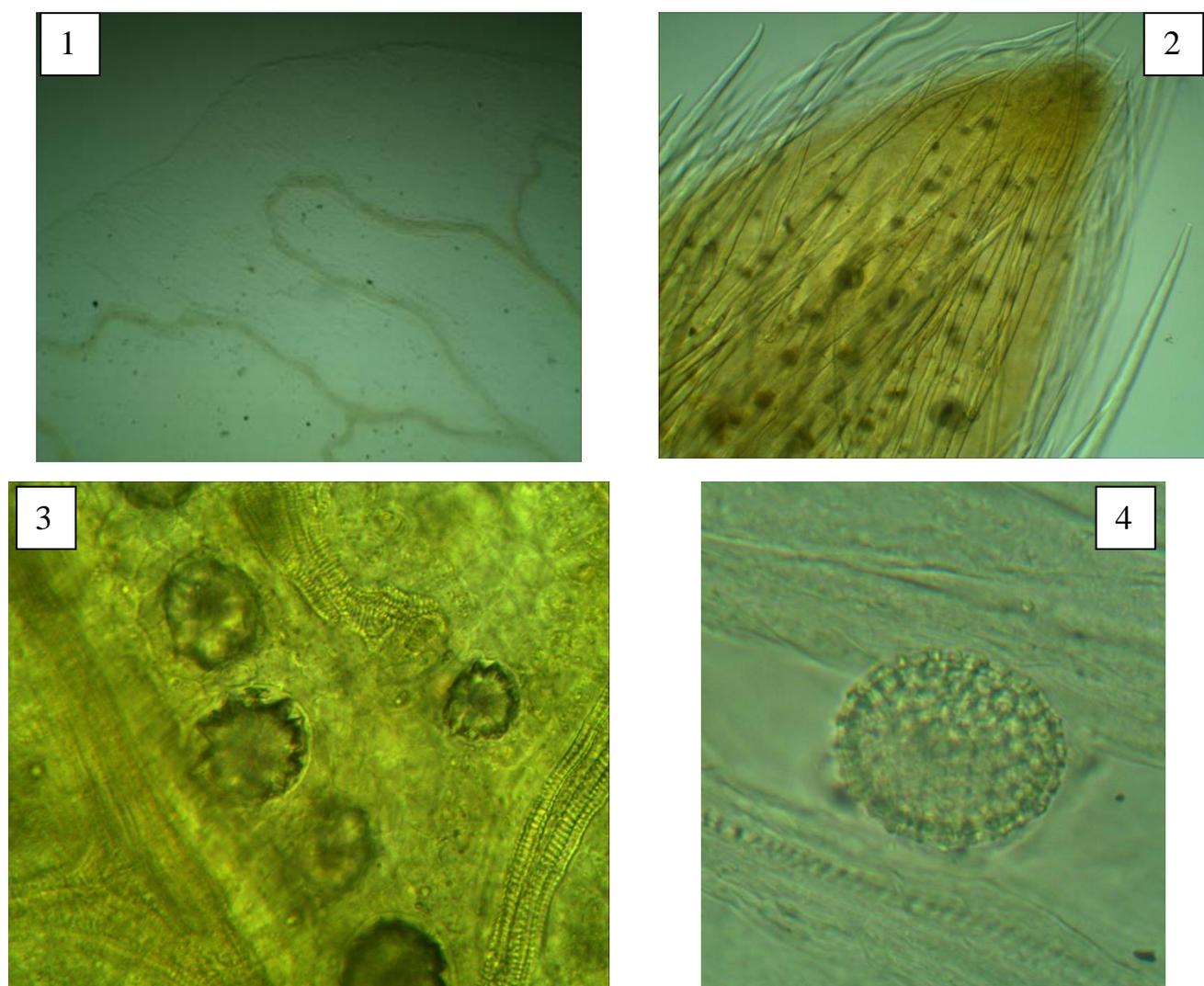


Рис.20. Цветок якорцев стелющихся: 1 – лепесток венчика, 2 – чашелистик, опушенный волосками, 3 – чашелистик с друзами, 4 – пыльца.

При изучении анатомических признаков цветка проводили измерения волосков чашелистика по поверхности и по краю, кристаллов оксалата кальция – друз, пыльцы, клеток эпидермы и устьиц (табл. 21 – 26).

Таблица 21

Анатомические признаки цветка, образец ВИЛАР 2016 г

Признак № п/п	Волосок по поверхности чашелистика, мкм		Волосок по краю чашелистика, Мкм		Пыль-ца, мкм	Клетки эпидермы чашелистика, мкм		Устьице, мкм		Друзы, мкм
	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>		<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	956	48	316	8	44	26	15	14	10	12
2	1068	32	40	4	40	20	15	17	11	12
3	428	12	48	4	52	20	15	17	13	14
4	688	36	260	8	48	22	15	20	17	16
5	944	24	296	12	40	55	10	18	17	12
6	476	12	292	12	44	21	14	18	16	16
7	372	12	200	12	46	29	17	18	12	16
8	136	12	272	8	42	21	10	20	12	12
9	360	20	336	8	42	16	17	20	14	17
10	100	16	200	8	40	30	22	17	13	16
11	552	16	232	12	40	42	20	20	13	14
12	56	8	240	12	40	36	20	19	14	14
13	340	16	136	16	48	40	20	20	17	12
14	480	36	292	8	46	40	16	16	14	15
15	768	32	216	4	40	27	10	20	10	13
16	492	20	368	8	42	28	10	21	11	14
17	320	16	76	8	48	30	10	22	10	14
18	188	12	80	12	40	27	14	20	13	16
19	712	32	120	12	46	34	14	19	20	12
20	100	8	80	8	40	26	15	18	15	16
21	428	16	356	16	40	28	14	19	13	16
22	696	12	196	12	48	30	15	20	15	14
23	92	8	132	4	46	30	13	21	15	14
24	312	8	176	8	42	35	19	22	15	14
25	708	24	92	4	42	35	14	19	15	15
26	400	20	228	8	50	30	17	17	15	13
27	328	16	96	12	48	20	22	20	15	17
28	1088	28	176	16	48	35	17	17	15	12
29	960	36	328	12	38	35	15	20	14	12
30	516	8	196	8	40	40	17	16	15	14
М	502,13	19,87	202,53	9,47	43,60	30,27	15,40	18,83	13,97	14,13
м	54,83	1,94	17,65	0,65	1,43	1,52	0,62	0,34	0,42	0,62

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *М* – среднее значение, *м* – среднее отклонение

Таблица 22

Анатомические признаки цветка, образец Крым 2017 г

Признак № п/п	Волосок по поверхности чашелистика, мкм		Волосок по краю чашелистика, Мкм		Пыль-ца, Мкм	Клетки эпидермы чашелистика, мкм		Устьице, мкм		Друзы, мкм
	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>		<i>D</i>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	512	12	740	20	38	20	16	18	10	14
2	312	12	600	12	44	24	15	18	10	14
3	336	8	608	16	38	22	14	20	14	15
4	172	8	428	12	46	30	15	20	15	16
5	332	12	456	12	40	22	10	16	13	13
6	88	12	444	40	40	34	14	17	12	12
7	52	8	776	36	44	38	16	19	13	14
8	128	12	840	28	44	36	20	19	16	14
9	368	8	384	16	48	27	10	18	16	15
10	316	8	296	16	46	28	10	22	15	15
11	684	12	248	12	38	30	18	20	15	12
12	512	12	272	16	42	32	18	20	15	13
13	188	8	1180	32	48	28	18	18	10	16
14	356	12	740	16	48	26	20	18	17	16
15	692	16	500	16	38	36	20	17	17	17
16	440	20	80	12	40	36	20	14	18	13
17	280	12	96	12	42	38	20	20	14	14
18	672	12	1056	32	42	40	16	17	13	15
19	676	16	260	12	42	24	18	18	12	15
20	88	12	344	8	48	26	18	18	12	15
21	72	8	228	8	46	38	14	20	12	13
22	428	16	168	12	42	40	10	20	10	14
23	472	12	1148	28	48	35	10	22	13	14
24	344	12	536	16	38	27	22	24	14	15
25	428	8	348	12	42	28	20	19	15	16
26	332	8	640	32	46	34	18	17	15	16
27	152	8	384	4	48	34	14	18	15	17
28	428	16	252	8	48	36	20	20	15	14
29	56	8	488	12	46	32	22	20	15	15
30	728	20	396	8	44	32	15	22	15	14
М	351,26	11,70	481,04	17,33	43,47	31,10	16,37	18,97	13,83	13,91
м	41,21	0,71	57,83	1,90	3,60	2,13	1,39	0,76	0,81	0,81

Примечание: l – длина, b – ширина, d – диаметр, М – среднее значение, м – среднее отклонение

Таблица 23

Анатомические признаки цветка, образец Молдова 2017 г

Признак № п/п	Волосок по поверхности чашелистика, мкм		Волосок по краю чашелистика, Мкм		Пыль-ца, Мкм	Клетки эпидермы чашелистика, мкм		Устьице, мкм		Дру-зы, мкм
	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>		<i>D</i>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1048	32	204	8	36	24	18	16	12	20
2	708	24	372	12	42	20	18	22	14	23
3	744	20	168	12	42	30	14	22	13	18
4	1104	36	252	12	46	32	16	18	15	17
5	804	40	352	16	46	38	18	20	14	17
6	432	28	236	12	46	35	14	15	14	20
7	456	24	196	12	38	37	17	24	12	22
8	768	36	364	8	40	34	18	20	10	18
9	572	16	164	12	42	24	18	20	10	24
10	428	20	256	12	40	26	10	18	10	21
11	720	16	212	8	40	28	10	16	12	24
12	636	24	212	12	38	35	12	16	12	17
13	716	36	316	16	36	32	12	22	12	15
14	508	32	184	8	36	32	12	20	15	15
15	336	20	256	20	42	20	10	24	16	16
16	316	16	168	12	44	20	15	23	14	20
17	332	12	196	12	44	24	16	19	12	14
18	212	16	52	8	46	28	10	18	10	16
19	100	12	208	12	36	32	12	20	10	20
20	896	28	224	12	38	30	14	20	15	12
21	392	12	152	12	46	24	14	16	15	12,4
22	680	20	236	16	42	24	16	16	15	20
23	512	16	272	12	42	26	18	16	13	16
24	328	16	144	12	38	28	18	22	14	28
25	532	20	268	16	46	30	16	22	15	12
26	536	20	248	12	44	30	14	24	16	32
27	548	24	132	8	42	24	14	18	15	20
28	856	36	224	8	42	24	16	17	14	32
29	508	16	92	12	42	26	18	20	13	16
30	1096	32	284	12	42	28	18	20	12	20
М	594,13	23,33	221,47	11,87	41,60	28,10	14,87	19,47	13,13	19,25
m	46,06	1,52	13,51	0,52	1,28	1,86	1,05	1,01	0,70	0,93

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *M* – среднее значение, *m* – среднее отклонение

Таблица 24

Анатомические признаки цветка, образец Сирия 2018 г

Признак № п/п	Волосок по поверхности чашелистика, мкм		Волосок по краю чашелистика, Мкм		Пыль-ца, Мкм	Клетки эпидермы чашелистика, мкм		Устьице, мкм		Друзы, мкм
	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>		<i>D</i>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	730	26	424	14	48	50	18	18	20	18
2	625	26	500	20	46	54	18	16	18	18
3	810	26	312	20	46	54	18	18	18	18
4	540	32	268	16	46	58	16	20	18	20
5	820	24	428	16	44	58	16	16	14	20
6	780	17	318	16	44	58	12	18	16	16
7	750	34	212	18	44	60	12	20	18	24
8	838	32	216	18	44	44	12	20	20	24
9	864	32	315	22	44	50	20	18	20	18
10	715	26	412	22	44	48	10	17	20	18
11	825	26	178	22	42	32	20	22	20	16
12	568	30	134	14	42	56	20	22	20	20
13	995	30	128	15	42	38	14	18	16	24
14	755	23	106	18	44	38	16	18	16	24
15	638	20	110	18	44	38	20	16	16	18
16	478	22	180	16	46	44	12	16	16	18
17	518	22	126	22	46	48	20	26	22	20
18	575	18	188	22	48	44	20	24	20	20
19	784	18	224	24	48	32	18	14	16	24
20	1180	20	134	24	48	44	20	16	18	24
21	736	24	196	24	40	34	16	16	14	24
22	666	24	196	16	42	34	16	18	18	16
23	538	24	204	18	44	42	18	16	18	18
24	648	30	166	20	44	34	20	16	18	16
25	878	30	184	20	48	34	20	18	16	20
26	656	28	416	18	46	34	20	18	16	24
27	814	28	348	18	44	36	22	20	18	22
28	738	28	226	22	46	42	22	20	20	22
29	510	24	112	24	48	40	20	20	20	24
30	440	24	158	24	48	40	22	20	18	24
М	717,07	25,60	237,30	19,10	45,00	43,93	17,60	18,50	17,93	20,40
m	58,37	1,68	41,50	1,17	8,83	3,32	1,26	0,98	0,75	1,12

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *М* – среднее значение, *m* – среднее отклонение

Таблица 25

Анатомические признаки цветка, образец Сирия 2019 г

Признак № п/п	Волосок по поверхности чашелистика, мкм		Волосок по краю чашелистика, Мкм		Пыль-ца, Мкм	Клетки эпидермы чашелистика, мкм		Устьице, мкм		Друзы, мкм
	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>		<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	634	28	356	16	42	50	20	18	20	24
2	845	30	534	16	42	48	18	18	16	22
3	880	24	214	16	42	60	16	16	18	20
4	590	24	106	18	44	46	16	24	22	20
5	776	28	108	18	44	46	18	20	20	26
6	814	30	334	18	48	32	18	20	20	26
7	724	20	198	18	42	44	20	20	20	20
8	838	28	110	22	42	48	20	22	20	24
9	910	28	235	16	42	52	20	22	20	24
10	826	28	318	24	46	56	18	18	18	24
11	680	30	438	22	46	44	18	18	20	28
12	624	30	240	16	46	48	16	18	20	20
13	1000	30	138	16	48	48	16	20	22	30
14	614	24	110	18	42	36	16	20	22	28
15	612	24	106	20	48	38	20	20	22	26
16	454	26	212	20	48	40	18	20	22	24
17	546	26	214	20	48	44	20	16	18	24
18	574	26	188	22	48	46	20	26	22	24
19	730	24	334	16	48	56	22	24	22	20
20	1115	24	328	18	42	60	16	24	22	18
21	782	32	149	20	42	56	18	20	20	20
22	734	24	274	16	44	60	20	20	18	20
23	650	30	218	18	46	44	20	20	18	24
24	788	32	206	20	46	44	22	18	18	28
25	765	32	196	22	48	48	24	20	20	28
26	622	32	178	22	48	46	24	20	20	32
27	796	24	410	24	48	52	24	18	16	20
28	532	24	135	18	48	54	22	18	16	30
29	510	24	156	20	48	54	24	18	18	24
30	502	24	110	18	48	60	24	18	18	24
М	715,57	27,00	228,43	18,93	45,47	48,67	19,60	19,80	19,60	24,07
м	57,47	1,22	41,11	0,93	0,98	2,71	1,00	0,88	0,72	1,35

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *М* – среднее значение, *м* – среднее отклонение

Таблица 26

Анатомические признаки цветка, образец Крым 2019 г

Признак № п/п	Волосок по поверхности чашелистика, мкм		Волосок по краю чашелистика, Мкм		Пыль-ца, Мкм	Клетки эпидермы чашелистика, мкм		Устьице, мкм		Друзы, мкм
	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>		<i>D</i>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>l</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	848	32	448	16	48	44	12	20	20	13
2	512	24	528	16	48	52	20	20	20	13
3	816	24	112	16	64	56	12	20	20	12
4	560	24	80	16	48	60	16	20	16	15
5	800	32	112	16	40	60	16	28	16	16
6	944	32	416	24	48	48	16	24	20	18
7	704	17,6	192	16	48	48	12	20	20	14
8	848	32	80	16	48	40	12	20	16	13
9	880	32	240	16	48	40	8	20	20	15
10	816	24	336	16	48	32	20	20	16	15
11	656	24	464	24	48	28	12	16	16	16
12	592	32	160	16	48	60	12	20	16	18
13	1008	32	144	16	48	52	16	20	16	18
14	560	24	80	16	48	36	16	20	16	18
15	688	32	96	16	48	36	16	20	20	16
16	304	32	112	24	48	40	12	20	16	15
17	528	24	80	16	48	24	20	24	20	14
18	560	24	160	16	40	48	20	20	20	14
19	752	24	240	16	42	32	20	20	16	12
20	1296	32	336	24	42	20	20	24	16	18
21	624	24	144	24	44	48	12	20	20	16
22	688	24	288	24	48	36	20	20	20	16
23	528	32	208	24	44	28	12	20	16	18
24	640	32	208	8	44	44	20	20	20	18
25	800	32	176	16	48	32	16	20	20	14
26	652	32	192	16	48	32	24	20	16	15
27	800	32	512	24	42	32	20	20	20	15
28	544	24	240	16	44	36	16	24	20	15
29	512	32	176	16	44	44	16	20	16	14
30	480	32	80	16	44	40	12	20	20	16
М	698,00	28,32	221,33	17,86	46,60	40,93	15,86	20,80	18,13	15,33
m	72,37	1,65	50,75	1,50	1,59	4,01	1,44	0,82	0,75	0,69

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *M* – среднее значение, *m* – среднее отклонение

Проанализировав полученные данные, мы составили таблицу минимальных и максимальных значений анатомических признаков цветка (табл. 27).

Таблица 27

Минимальные и максимальные значения анатомических признаков цветка

Образец		ВИЛАР 2016 г	Крым 2017 г	Молдова 2017 г	Сирия 2018 г	Сирия 2019 г	Крым 2019 г
Признак		мкм	Мкм	Мкм	мкм	мкм	мкм
волосок по поверхности чашелистика	<i>l</i>	56 – 1088	52 – 692	100 – 1104	440 – 1180	502 – 1115	304 – 1296
	<i>b</i>	8 – 48	8 – 20	12 – 40	17 – 34	20 – 32	17,6 – 32
волосок по краю	<i>l</i>	40 – 368	80 – 1180	52 – 372	106 – 500	106 – 534	80 – 528
	<i>b</i>	4 – 16	4 – 40	8 – 20	14 – 24	16 – 24	8 – 24
друзы	<i>d</i>	12 – 17	12 – 17	12 – 32	16 – 24	18 – 32	12 – 18
пыльца	<i>d</i>	38 – 52	38 – 48	36 – 46	40 – 48	42 – 48	40 – 64
клетки эпидермы	<i>l</i>	16 – 55	20 – 40	20 – 38	32 – 60	32 – 60	20 – 60
	<i>b</i>	10 – 22	10 – 22	10 – 18	10 – 22	16 – 24	8 – 24
устыица	<i>l</i>	14 – 22	14 – 24	16 – 24	14 – 26	16 – 26	16 – 28
	<i>b</i>	10 – 20	10 – 18	10 – 16	14 – 22	16 – 22	16 – 20

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *M* – среднее значение, *m* – среднее отклонение

После определений мы вывели средние значения измеренных анатомических признаков цветка. Данные привели в таблице 28.

Таблица 28

Средние значения анатомических признаков цветка

Образец		ВИЛАР 2016 г	Крым 2017 г	Молдова 2017 г	Сирия 2018 г	Сирия 2019 г	Крым 2019 г
Признак		М ± m, мкм					
волосок по поверхности чашелистика	<i>l</i>	502,13 ± 54,83	351,26 ± 41,21	594,13 ± 46,06	717,07 ± 58,37	715,57 ± 57,47	698,00 ± 72,37
	<i>b</i>	19,87 ± 1,94	11,70 ± 0,71	23,33 ± 1,52	25,60 ± 1,68	27,00 ± 1,22	28,32 ± 1,65
волосок по краю	<i>l</i>	202,53 ± 17,65	481,04 ± 57,83	221,47 ± 13,51	237,30 ± 41,50	228,43 ± 41,11	221,33 ± 50,75
	<i>b</i>	9,47 ± 0,65	17,33 ± 1,90	11,87 ± 0,52	19,10 ± 1,17	18,93 ± 0,93	17,86 ± 1,50
друзы	<i>d</i>	14,13 ± 0,62	13,91 ± 0,81	19,25 ± 0,93	20,40 ± 1,12	24,07 ± 1,35	15,33 ± 0,69
пыльца	<i>d</i>	43,60 ± 1,43	43,47 ± 3,60	41,60 ± 1,28	45,00 ± 8,83	45,47 ± 0,98	46,60 ± 1,59
клетки эпидермы	<i>l</i>	30,27 ± 1,52	31,10 ± 2,13	28,10 ± 1,86	43,93 ± 3,32	48,67 ± 2,71	40,93 ± 4,01
	<i>b</i>	15,40 ± 0,62	16,37 ± 1,39	14,87 ± 1,05	17,60 ± 1,26	19,60 ± 1,00	15,86 ± 1,44
устьица	<i>l</i>	18,83 ± 0,34	18,97 ± 0,76	19,47 ± 1,01	18,50 ± 0,98	19,80 ± 0,88	20,80 ± 0,82
	<i>b</i>	13,97 ± 0,42	13,83 ± 0,81	13,13 ± 0,70	17,93 ± 0,75	19,60 ± 0,72	18,13 ± 0,75

Примечание: *l* – длина, *b* – ширина, *d* – диаметр, *M* – среднее значение, *m* – среднее отклонение

Таким образом, измеренные нами размеры анатомических признаков цветка находятся в близких пределах.

3.2.4. Анатомическое строение корня

Корень (рис.21) покрыт тонким слоем перидермы. Во вторичной коре находятся большие группы клеток склеренхимы и небольшое количество паренхимы. Клетки паренхимы прямоугольной формы с извилистым контуром. Проводящая система непучкового строения состоит из вторичной флоэмы, камбия и более широкой зоны вторичной ксилемы. Кристаллы оксалата кальция – друзы располагаются в корковой зоне корня.

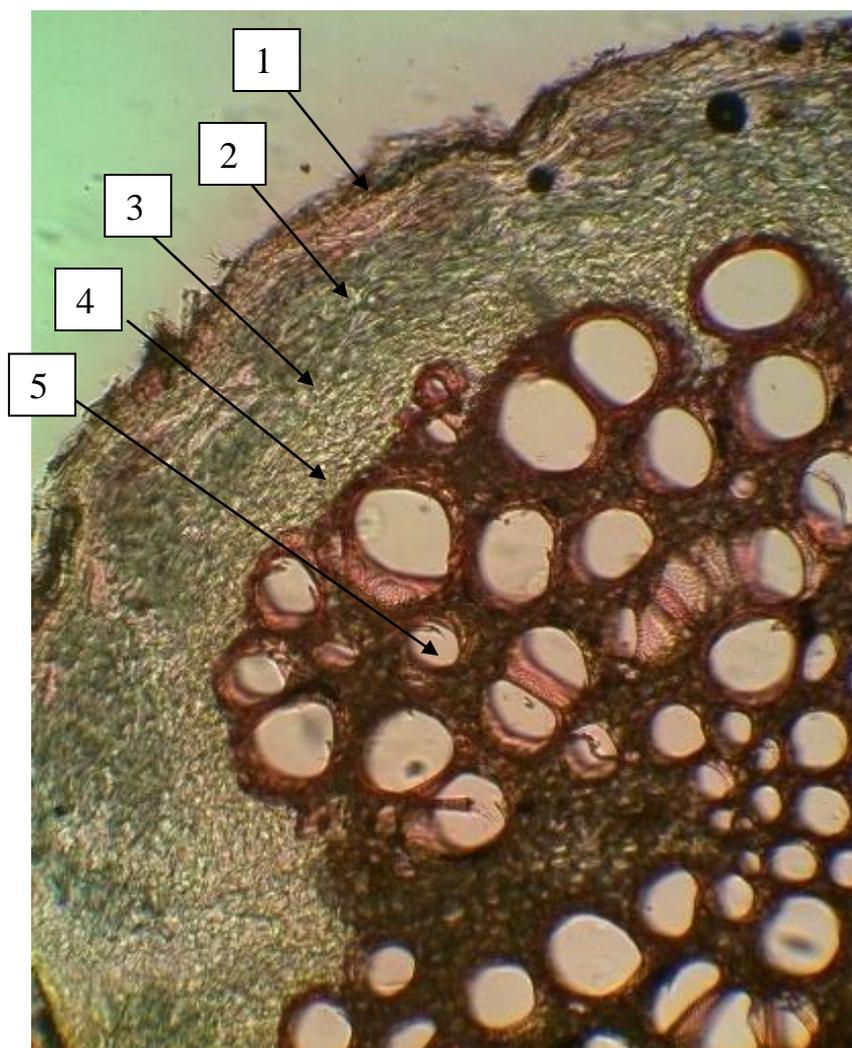


Рис.21. Общий вид поперечного среза корня якорцев стелющихся: 1 – перидерма, 2 – вторичная кора, 3 – вторичная флоэма, 4 – камбий, 5 – вторичная ксилема.

При изучении анатомических признаков корня проводили измерения толщины перидермы, коры, ксилемы и радиус корней, и измеряли диаметр кристаллов оксалата кальция – друз (табл. 29 – 34).

Таблица 29

Анатомические признаки корня, образец ВИЛАР 2016 г

Признак № п/п	Перидерма, мкм	Кора, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6
1	28	204	500	820	20
2	20	220	500	860	32
3	16	292	750	950	19
4	52	356	650	1110	21
5	40	416	700	1200	19
6	28	196	630	930	25
7	44	184	460	790	24
8	32	280	480	700	24
9	36	240	420	720	20
10	52	460	750	1270	18
11	40	200	650	850	18
12	64	460	620	1120	20
13	16	360	640	850	24
14	20	260	550	1030	24
15	20	188	520	730	30
16	48	368	600	1090	20
17	44	288	580	1070	20
18	92	328	620	1090	24
19	40	400	650	1110	24
20	64	352	580	1030	24
21	60	360	650	1050	32
22	44	340	650	1050	32
23	40	400	540	920	20
24	56	332	540	1050	18
25	48	308	640	1000	18
26	32	320	560	930	20
27	84	372	690	1270	24
28	40	336	600	1060	20
29	80	444	600	1200	24
30	44	320	620	1010	24
М	44,13	319,47	598,00	995,33	22,73
m	3,52	14,80	14,61	28,34	1,57

Примечание: d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 30

Анатомические признаки корня, образец Крым 2017 г

Признак № п/п	Перидерма, мкм	Кора, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6
1	56	340	276	640	18
2	44	428	650	1050	24
3	60	516	590	1160	16
4	72	400	710	1110	30
5	40	396	230	610	24
6	52	400	860	1160	24
7	28	272	280	960	18
8	40	432	270	970	20
9	24	320	240	550	20
10	44	316	300	540	20
11	56	496	860	1380	32
12	44	432	270	650	18
13	36	440	700	1040	22
14	28	392	300	750	22
15	44	404	660	1170	24
16	20	312	310	670	24
17	48	360	300	670	18
18	64	284	350	630	18
19	48	356	630	1050	18
20	60	440	720	1260	20
21	56	440	550	950	32
22	80	312	670	2100	20
23	56	416	660	1030	18
24	48	400	560	2040	24
25	64	420	840	1350	24
26	44	444	380	1020	22
27	80	336	680	1090	22
28	52	356	540	1950	22
29	44	356	530	1930	18
30	68	380	700	1070	30
М	50,00	386,53	520,53	1085,00	22,07
м	2,74	10,82	37,77	79,73	1,61

Примечание: М – среднее значение, м – среднее отклонение

Таблица 31

Анатомические признаки корня, образец Молдова 2017 г

Признак № п/п	Перидерма, мкм	Кора, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6
1	110	320	1070	1660	27
2	90	520	1300	1950	19
3	70	420	840	1420	28
4	110	490	770	1480	19
5	60	600	1040	1690	25
6	110	330	1090	1590	30
7	90	400	1190	1820	38
8	110	270	910	1610	27
9	90	410	1130	1800	34
10	70	430	780	1380	22
11	110	340	1090	1540	29
12	50	440	1470	1960	30
13	120	400	1200	1720	20
14	70	460	990	1540	11
15	120	430	920	1520	13
16	110	350	1010	1580	20
17	110	310	1170	1600	24
18	80	370	970	1420	16
19	80	430	940	1550	20
20	90	360	960	1600	32
21	110	580	1410	2100	24
22	80	690	1280	2000	24
23	70	590	890	1550	30
24	100	570	1117	1840	20
25	130	770	1460	2360	20
26	120	990	1300	2400	16
27	100	690	1490	2280	18
28	60	800	1420	2280	20
29	110	1060	1520	2700	24
30	120	700	1300	2120	24
М	95,00	517,33	1469,33	1802,00	23,48
m	3,95	36,18	336,92	62,33	2,32

Примечание: d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 32

Анатомические признаки корня, образец Сирия 2018 г

Признак № п/п	Перидерма, мкм	Кора, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6
1	140	580	1900	2900	24
2	144	610	1800	3100	24
3	155	512	1700	2800	24
4	120	670	1740	2900	30
5	188	500	1650	3000	28
6	166	360	1900	3100	26
7	118	540	1800	2900	26
8	190	540	1700	2800	24
9	96	612	1980	3000	24
10	110	820	1700	2600	26
11	98	700	980	3000	28
12	114	510	2000	3200	28
13	118	605	1500	2000	30
14	198	610	1700	2800	32
15	95	490	1650	2700	32
16	183	390	1400	2600	24
17	165	780	1700	2800	32
18	242	500	1600	2880	32
19	168	900	1700	3000	24
20	198	500	1800	3000	28
21	167	540	1600	2900	28
22	85	486	1000	1900	32
23	114	500	1700	2100	32
24	189	720	1900	2500	32
25	120	540	1500	2800	24
26	126	488	1600	2900	24
27	211	510	1550	2800	26
28	110	500	1600	2950	28
29	103	600	1700	3000	32
30	104	600	1700	3100	30
М	141,57	573,77	1658,33	2801,00	27,40
m	15,58	44,29	85,32	117,46	1,19

Примечание: d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 33

Анатомические признаки корня, образец Сирия 2019 г

Признак № п/п	Перидерма, мкм	Кора, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6
1	120	600	1800	2800	36
2	120	600	1880	3120	32
3	160	480	1480	2680	24
4	160	680	1720	3000	24
5	200	480	1800	3000	20
6	160	320	2080	3080	28
7	120	600	2200	3200	24
8	240	520	1880	3200	24
9	80	600	1760	2800	24
10	120	800	2400	3600	24
11	80	680	1680	2600	24
12	120	480	800	1600	24
13	120	600	1720	2720	24
14	200	600	1400	2400	32
15	80	480	1800	2880	24
16	200	400	1680	2600	32
17	160	840	1320	2600	32
18	240	480	1800	3000	24
19	160	960	1800	3120	32
20	200	400	1860	3000	33,6
21	200	560	1760	3000	32
22	80	480	880	1680	32
23	120	520	1920	3200	24
24	200	680	2000	3280	32
25	120	480	1680	2720	24
26	120	560	1800	3000	24
27	200	480	1880	2920	16
28	94	500	1600	2650	20
29	85	510	1500	2000	20
30	110	514	1540	2010	20
М	145,63	562,80	1714,00	2782,00	26,19
m	18,38	50,00	121,10	172,09	1,90

Примечание: d – диаметр, М – среднее значение, m – среднее отклонение

Таблица 34

Анатомические признаки корня, образец Крым 2019 г

Признак № п/п	Перидерма, мкм	Кора, мкм	Ксилема, мкм	Радиус, мкм	Друзы, мкм
1	2	3	4	5	6
1	112	592	1408	2680	16
2	80	512	1200	2000	20
3	96	512	1040	1920	24
4	96	480	1040	2080	20
5	64	480	960	1800	24
6	64	800	1520	2480	20
7	112	352	1008	1600	20
8	160	720	1840	3200	32
9	144	880	1600	2600	28
10	80	520	1000	1680	24
11	112	432	1280	2000	36
12	80	448	1000	1520	20
13	80	480	1072	1880	24
14	80	600	1200	2000	20
15	120	560	1160	1920	28
16	80	480	1080	1880	12
17	100	640	1200	2000	28
18	80	320	640	1200	20
19	80	400	920	1480	32
20	76	320	600	1200	20
21	80	320	640	1168	24
22	120	720	2520	3400	28
23	60	680	1200	2000	32
24	96	320	640	1200	20
25	160	520	960	1800	20
26	90	450	1211	1800	16
27	110	510	1450	1900	18
28	88	580	1700	1950	18
29	84	476	1820	1920	20
30	95	485	1900	2400	20
М	95,97	519,63	1226,97	1955,27	22,80
m	9,54	52,58	160,01	197,52	2,07

Примечание: d - диаметр, М - среднее значение, m - среднее отклонение

Проанализировав полученные данные, мы составили таблицу минимальных и максимальных значений анатомических признаков корня (табл. 35).

Таблица 35

Минимальные и максимальные значения анатомических признаков корня

Образец	ВИЛАР 2016 г	Крым 2017 г	Молдова 2017 г	Сирия 2018 г	Сирия 2019 г	Крым 2019 г
Признак	мкм	мкм	Мкм	мкм	мкм	мкм
толщина перидермы	16 – 92	20 – 80	50 – 130	85 – 242	80 – 240	60 – 160
толщина коры	184 – 460	272 – 516	270 – 1060	390 – 900	320 – 960	320 – 880
толщина ксилемы	420 – 750	230 – 860	770 – 1520	980 – 1980	880 – 2400	600 – 2520
радиус корня	700 – 1270	540 – 1950	1380 – 2700	1900 – 3200	1600 – 3280	1168 – 3400
диаметр друз	18 – 32	16 – 32	11 – 38	24 – 32	16 – 36	12 – 36

После определений мы вывели средние значения измеренных анатомических признаков стебля. Данные привели в таблице 36.

Таблица 36

Средние значения анатомических признаков корня

Образец Признак	ВИЛАР 2016 г		Крым 2017 г		Молдова 2017 г		Сирия 2018 г		Сирия 2019 г		Крым 2019 г	
	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %	М±m, мкм	Соотношение признака к радиусу стебля, %
толщина перидермы	44,13 ± 3,52	4,43	50,00 ± 2,74	4,61	95,00 ± 3,95	5,27	141,57 ± 15,58	5,05	145,63 ± 18,38	5,23	95,97 ± 9,54	4,91
толщина коры	319,47 ± 14,80	32,10	386,53 ± 10,82	35,62	517,33 ± 36,18	28,71	573,77 ± 44,29	20,48	562,80 ± 50,00	20,23	519,63 ± 52,58	26,57
толщина ксилемы	598,00 ± 14,61	60,08	520,53 ± 37,77	47,97	1469,33 ± 336,92	81,54	1658,33 ± 85,32	59,20	1714,00 ± 121,10	61,61	1226,97 ± 160,01	62,75
радиус корня	995,33 ± 28,34		1085,00 ± 79,73		1802,00 ± 62,33		2801,00 ± 117,46		2782,00 ± 172,09		1955,27 ± 197,52	
диаметр друз	22,73 ± 1,57		22,07 ± 1,61		23,48 ± 2,32		27,40 ± 1,19		26,19 ± 1,90		22,80 ± 2,07	

Примечание: М - среднее значение, m - среднее отклонение

Таким образом, по соотношениям перидермы, коры и ксилемы к общему радиусу корня данные образцы не отличаются.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Изучены морфологические и анатомические признаки якорцев стелющихся травы. Основными анатомо – диагностическими признаками являются: простые одноклеточные волоски на листьях и чашелистиках; непучковый тип проводящей системы стеблей и корней; возможное наличие друз во всех органах растения.
2. Определены основные биометрические параметры анатомических признаков:
 - листа: простые волоски длиной от $117,33 \pm 10,90$ мкм до $890,53 \pm 29,78$ мкм и шириной от $10,80 \pm 0,48$ мкм до $18,27 \pm 0,46$ мкм; клетки эпидермы длиной от $20,90 \pm 0,78$ мкм до $42,00 \pm 3,18$ мкм и шириной от $13,97 \pm 0,55$ мкм до $30,53 \pm 2,64$ мкм; устьица длиной от $16,30 \pm 0,60$ мкм до $21,86 \pm 0,75$ мкм и шириной от $13,37 \pm 0,39$ мкм до $18,66 \pm 0,90$ мкм; друзы диаметром от $21,31 \pm 1,24$ мкм до $34,50 \pm 2,91$ мкм.
 - стебля: толщина первичной коры от $83,20 \pm 5,06$ мкм до $200,00 \pm 9,26$ мкм; толщина перидермы от $78,40 \pm 5,73$ мкм до $122,40 \pm 4,69$ мкм; толщина флоэмы от $26,66 \pm 2,75$ мкм до $119,00 \pm 13,08$ мкм; толщина ксилемы от $225,20 \pm 14,94$ мкм до $274,93 \pm 24,88$ мкм; друзы диаметром от $24,33 \pm 1,78$ мкм до $31,53 \pm 1,50$ мкм; радиус стебля от $958,00 \pm 50,16$ мкм до $1752,00 \pm 149,86$ мкм.
 - цветка: волоски по поверхности чашелистика длиной от $351,26 \pm 41,21$ мкм до $717,07 \pm 58,37$ мкм и шириной от $11,70 \pm 0,71$ мкм до $28,32 \pm 1,65$ мкм; волоски по краю чашелистиков длиной от $202,53 \pm 17,65$ мкм до $481,04 \pm 57,83$ мкм и шириной от $9,47 \pm 0,65$ мкм до $19,10 \pm 1,17$ мкм; друзы диаметром от $13,91 \pm 0,81$ мкм до $24,07 \pm 1,35$ мкм; пыльца диаметром от $41,60 \pm 1,28$ мкм до $46,60 \pm 1,59$ мкм; клетки эпидермы длиной от $28,10 \pm 1,86$ мкм до $49,67 \pm 2,71$ мкм и шириной от $14,87 \pm 1,05$ мкм до $19,60 \pm 1,00$ мкм; устьица длиной от $18,83 \pm 0,34$ мкм до $20,80 \pm 0,82$ мкм и шириной от $13,13 \pm 0,70$ мкм до $19,60 \pm 0,72$ мкм.
 - корня: толщина перидермы от $44,13 \pm 3,52$ мкм до $145,63 \pm 18,38$ мкм; толщина коры от $319,47 \pm 14,80$ мкм до $573,77 \pm 44,29$ мкм; толщина ксилемы от $520,53 \pm 37,77$ мкм до $1714,00 \pm 121,10$ мкм; радиус корня от $995,33 \pm 28,34$ мкм до $2801,00 \pm 117,46$ мкм; друзы диаметром от $22,07 \pm 1,61$ мкм до $27,40 \pm 1,19$ мкм.
3. Проведенные исследования использованы при составлении нормативной документации на сырье для разделов «Внешние признаки» и «Микроскопия» для Государственной Фармакопеи Российской Федерации, статья «Якорцев стелющихся трава – *Tribuli terrestris herba*».

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЫ

Нами изучен качественный состав сырья якорцев стелющихся на содержание природных биологически активных соединений, которые устанавливали с помощью методов хроматографии и качественных химических реакций.

4.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В результате проведенного хроматографического исследования, согласно методикам, приведенным в главе 2, в якорцах стелющихся траве были обнаружены:

1. Сапонины.

Система растворителей: хлороформ – метанол – вода (61:32:7), проявитель – 1% раствор пара-диметиламинобензальдегида в метанольном растворе кислоты хлористоводородной (рис. 22) [17].

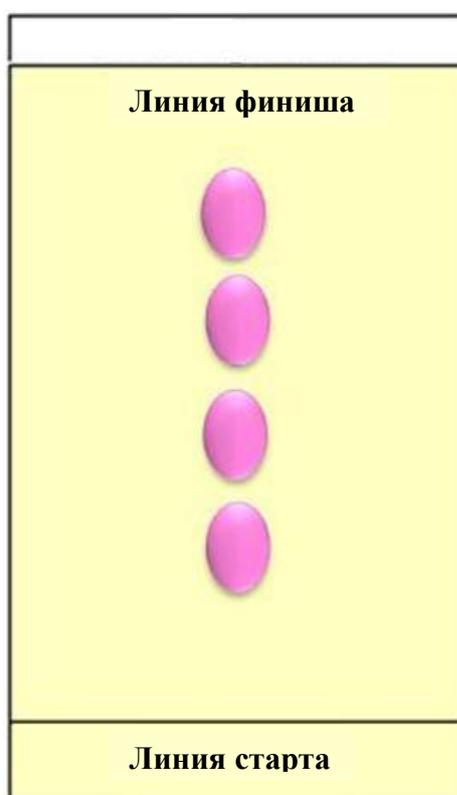


Рис. 22. Схема хроматограммы извлечения из якорцев стелющихся травы.

На хроматограмме наблюдали четыре пятна розового цвета (фуростаноловые гликозиды).

2. Флавоноиды.

Согласно современным требованиям составления нормативного документа, раздел «Определение основных групп биологически активных веществ», для подтверждения подлинности сырья необходимо включать метод тонкослойной хроматографии. Так как, кроме сапонинов, якорцев стелющихся трава содержит и флавоноиды, с целью их разделения мы подбирали условия для хроматографии.

- Plates for Thin Layer Chromatography – хроматографические пластинки ПТСХ-П-А-УФ аналитические марки Sorbfil (100x150 мм), сорбент силикагель СТХ-1А, подложка – полиэтилентерефталат.
- Пластинки для тонкослойной хроматографии Silufol, сорбент Silpearl – широкопористый силикагель с люминисцентным индикатором, подложка – алюминиевая фольга.
- Объемы 0,02 – 0,1 мл.
- Системы растворителей [36, 139]:

1. 15% раствор уксусной кислоты
2. Уксусная кислота – бутанол – вода (4:1:5)
3. Этилацетат – метанол (8:2)
4. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (60:12:18)
5. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (26:6:8)
6. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (80:20)
7. Этилацетат – метанол - вода (30:6:3)
8. Этилацетат – метанол - вода (1:2:1)
9. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – хлороформ (2:1:2)
10. Муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80)
11. Этилацетат – уксусная кислота – вода (70:10:20)

Результаты исследований [7] показали, что флавоноиды якорцев стелющихся лучше разделяются на пластинке Silufol, сорбент Silpearl – широкопористый силикагель с люминисцентным индикатором, подложка – алюминиевая фольга в системе растворителей муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80). Поэтому данная система была предложена нами для хроматографического определения флавоноидов. Оптимальный объем наносимого извлечения 0,02 мл.

Идентификацию флавоноидов проводили со стандартным образцом рутином. Хроматограмму проявляли алюминия хлорида раствором 2% в 96% спирте. После высушивания флавоноиды обнаруживали в УФ – свете по желто – зеленой флуоресценции на уровне стандартного образца рутина ($R_f = 5,83$) (рис. 23).

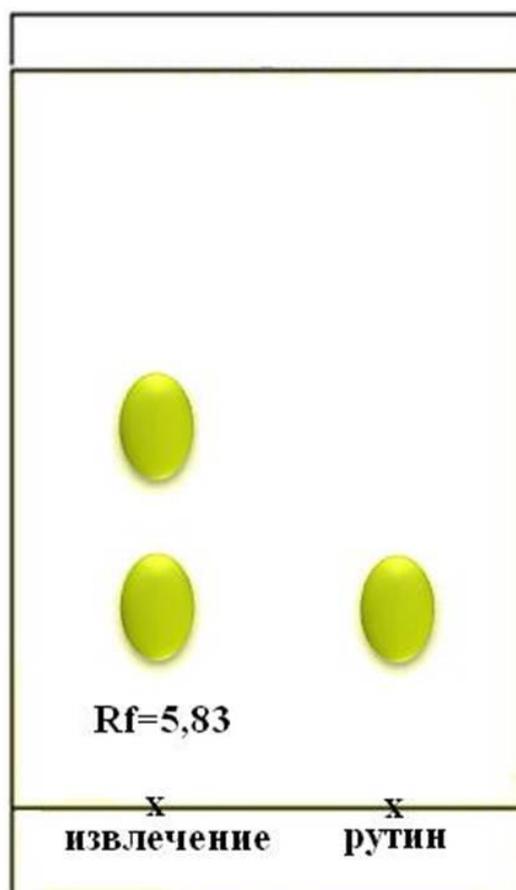


Рис. 23. Схема хроматограммы извлечения из якорцев стелющихся травы.

4.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в исследуемых образцах было подтверждено наличие диосцина и протодиосцина [10,49] (таблица 38, рис. 24 – 29). Идентификацию диосцина и протодиосцина на хроматограммах проводили по временам удерживания в сравнении со стандартными образцами. Времена удерживания протодиосцина и диосцина составили соответственно $4,93 \pm 0,03$ и $8,86 \pm 0,03$ мин.

Дополнительные пики, наблюдаемые на хроматограммах извлечений, соответствовали соэкстрактивным соединениям, хорошо отделены и не мешали определению целевых аналитов.

Кроме качественного определения сапонинов методом ВЭЖХ проводили количественную оценку сапонинов в растительном сырье. Для этого использовали метод внешнего стандарта.

Максимальное содержание диосцина наблюдается в образце сырья, заготовленном в Крыму – $1,90 \pm 0,02$ ($p < 0,05$), а минимальное – в образце из питомника ВИЛАР. Между содержанием диосцина в образцах, заготовленных в Крыму и Сирии, статистически значимых различий не обнаружено. Наибольшее количество протодиосцина так же обнаружено в образце из Крыма – $15,59 \pm 0,28$ ($p < 0,05$), а минимальное – в образце из Молдовы (табл. 37).

Таблица 37

Результаты количественного определения диосцина и протодиосцина в образцах

Образец	Содержание диосцина, мг (в 1 г сырья) X ср. \pm SD	Содержание протодиосцина, мг (в 1 г сырья) X ср. \pm SD
Молдова (2017 г)	$0,27 \pm 0,011^*$	$3,17 \pm 0,13^*$
Крым (2017 г)	$1,90 \pm 0,02$	$15,59 \pm 0,28^*$
Сирия (2018 г)	$1,67 \pm 0,04^*$	$3,80 \pm 0,11^*$
ВИЛАР (2016 г)	$0,09 \pm 0,02^*$	$1,44 \pm 0,38^*$

* достоверность различий $p < 0,05$

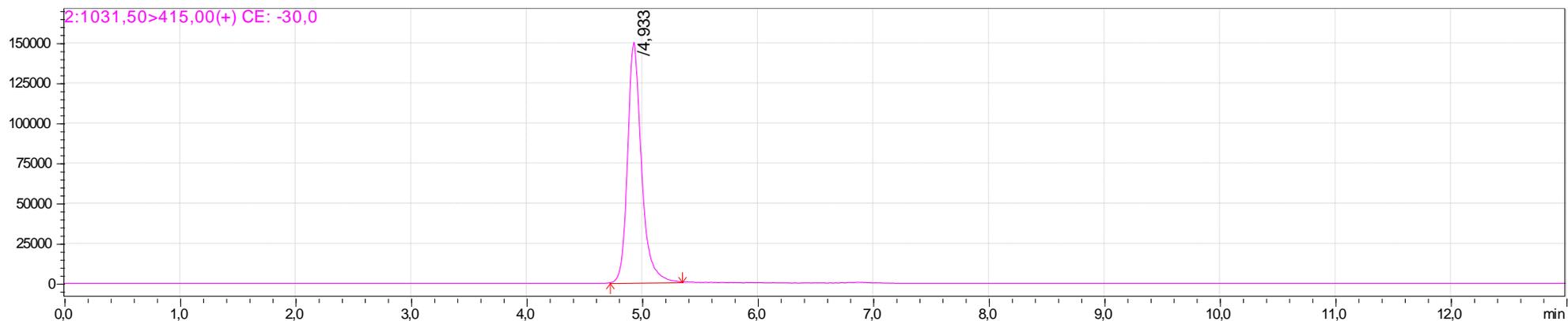


Рис. 24. Хроматограмма раствора стандартного образца протодиосцина (1333 нг/мл).

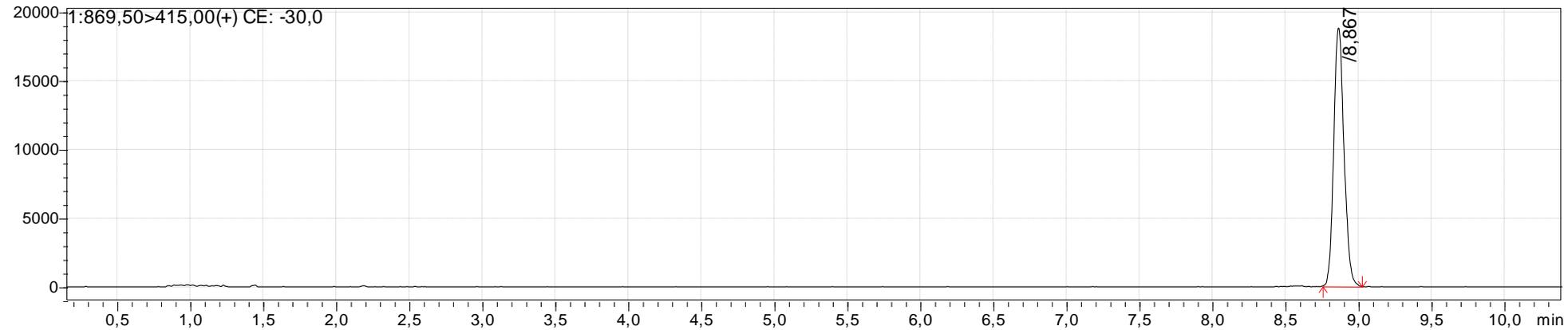


Рис. 25. Хроматограмма раствора стандартного образца диосцина (900 нг/мл).

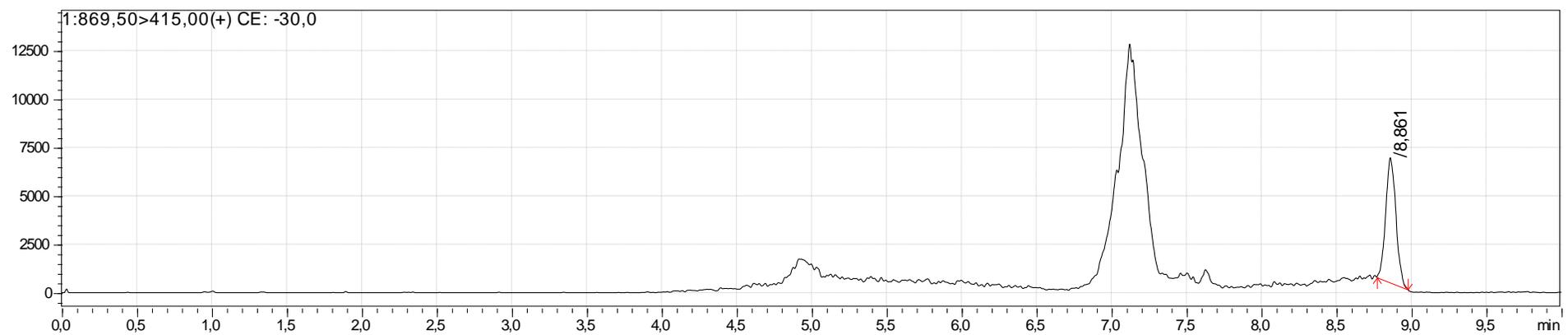
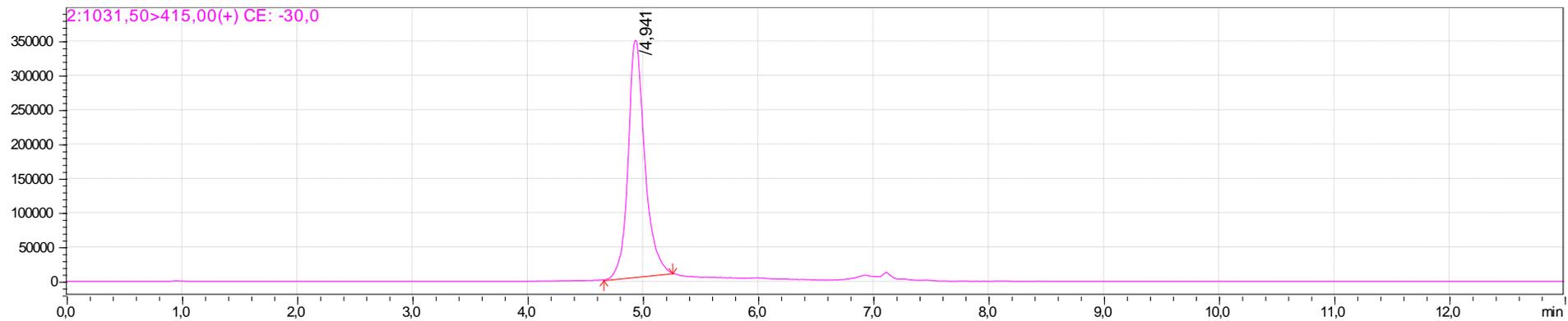


Рис. 26. Хроматограммы раствора образца из Молдовы протодиосцин (верхний), диосцин (нижний).

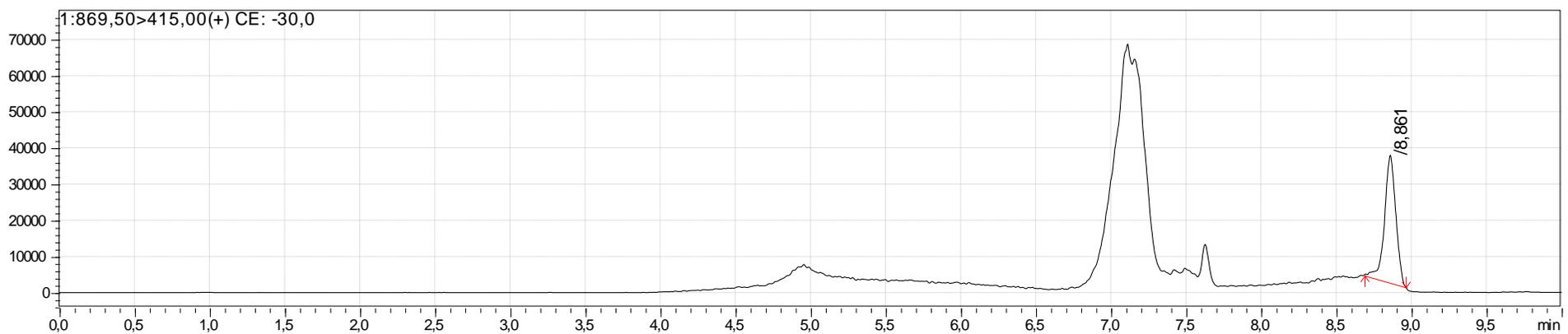
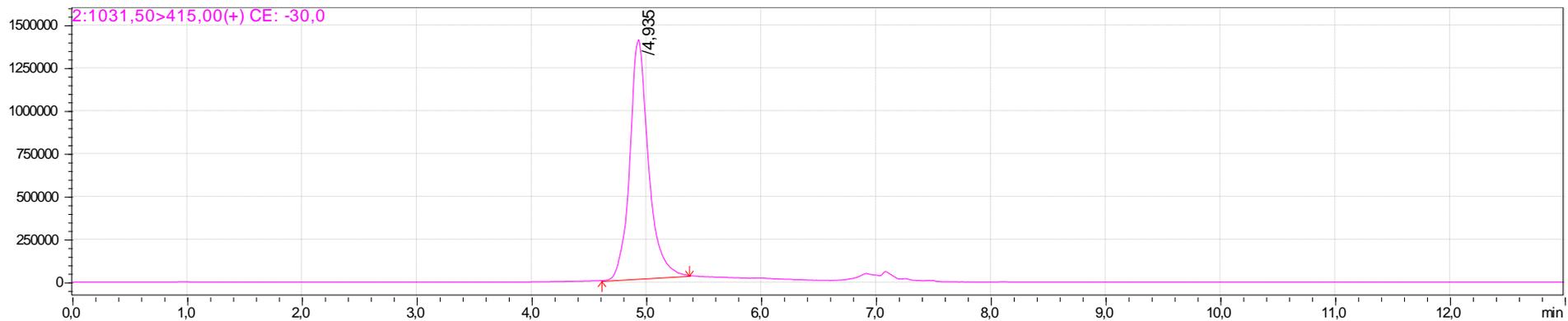


Рис. 27. Хроматограммы раствора образца из Крыма (2017 г) протодиосцин (верхний), диосцин (нижний)

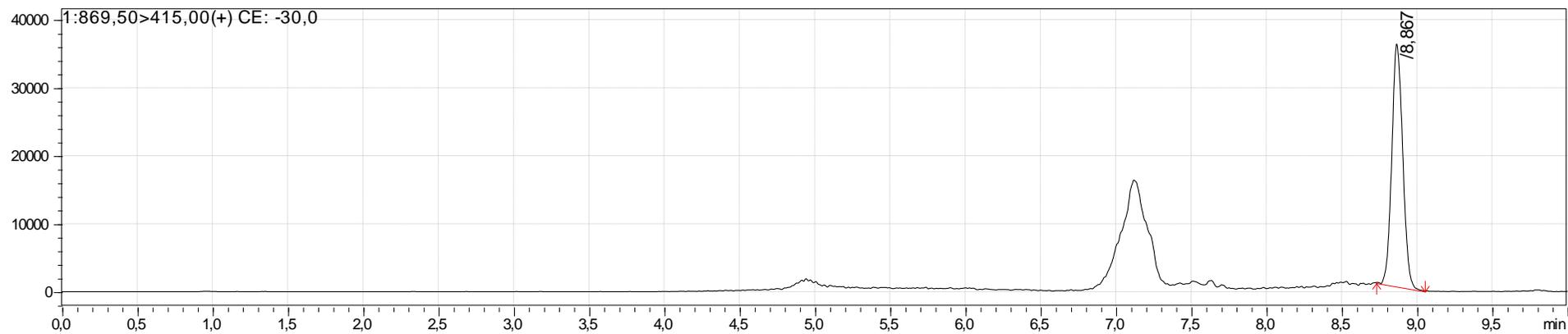
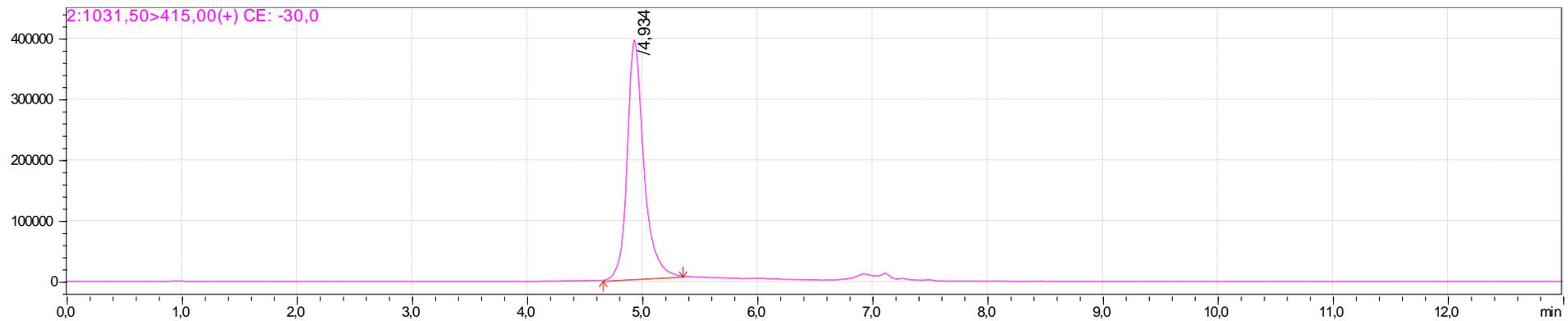


Рис. 28. Хроматограммы раствора образца из Сирии (2018 г) протодиосцин (верхний), диосцин (нижний).

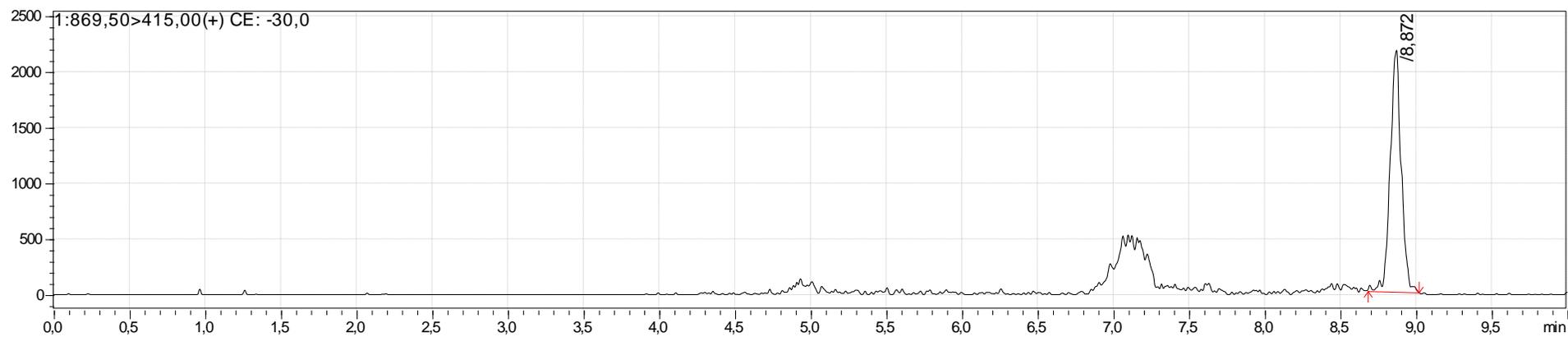
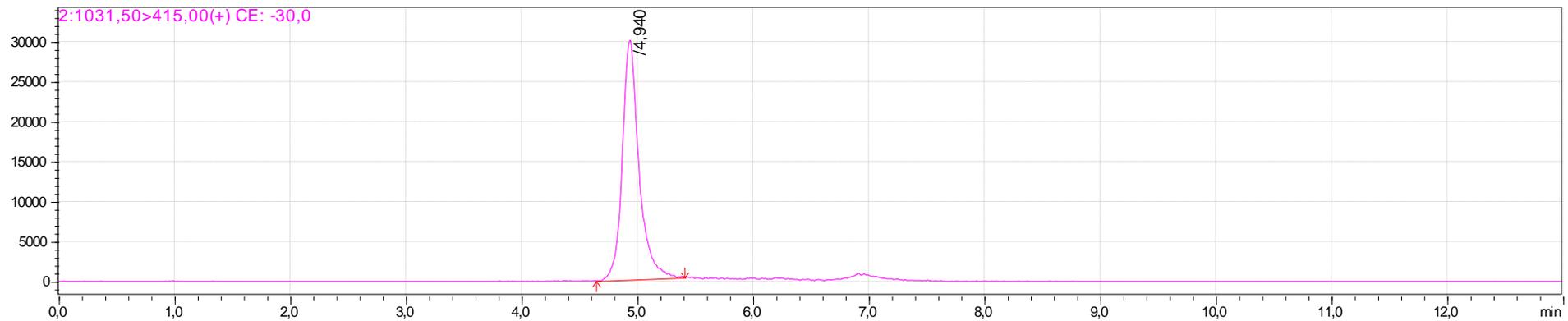


Рис. 29. Хроматограммы раствора образца из ВИЛАР протодиосцин (верхний), диосцин (нижний).

4.3. РЕЗУЛЬТАТЫ КАЧЕСТВЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

По литературным сведениям в сырье якорцев стелющихся содержатся сапонины, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, алкалоиды. Мы провели реакции на указанные группы БАВ (табл. 38, рис. 30).

Таблица 38

Результаты качественных химических реакций на основные группы БАВ

№ п/п	Группа БАВ	Название реактива/реакции	Эффект реакции
1.	Флавоноиды	Проба Синода	Розовое окрашивание
2.		Проба Брианта	Водный слой – розового цвета Слой октанола – розового цвета
3.		Раствор алюминия хлорида 2% в 96% спирте	Желто-зеленое окрашивание
4.		Раствор натрия гидроксида спиртовой 10%	Желтое окрашивание
5.		Раствора железа (III) хлорида 0,5%	Зеленое окрашивание
6.	Фенолкарбоновые кислоты	Раствор железа (III) аммония сульфат	Зеленое окрашивание
7.	Алкалоиды	Реактив Вагнера	Бурый осадок
8.		Реактив Драгендорфа	Бурый осадок
9.		Реактив Майера	Бело-желтый аморфный осадок
10.		Реактив Бушарда	Бурый осадок
11.		Раствор танина водный 5%	Бурый осадок



Рис. 30. Результаты качественных реакций на алкалоиды.

На основании проведенных качественных химических реакций [7] в сырье якорцев стелющихся нами подтверждено наличие флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и алкалоидов.

4.4.РЕЗУЛЬТАТЫ ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Лекарственные растения являются ценным источником микроэлементов [14,19,44,45,51,52]. В последнее время появилось много работ, посвященных изучению элементного состава растений [43,55,91,92,94].

Макро и микроэлементный состав якорцев стелющихся представлен 20 элементами [10] (табл. 39).

Таблица 39

Элементный состав якорцев стелющихся травы

№ п/п	Элемент	% от общего содержания элементов в образцах, в пересчете на воздушно-сухое сырье			
		Сирия (2018)	Крым (2017)	Молдова (2017)	ВИЛАР (2016)
1	2	3	4	5	6
Макроэлементы					
1	Na	7,7 ± 0,154	3,2 ± 0,255	3,5±0,6	4,3±0,211
2	K	50,708±0,562	64,65±0,386	63,97±0,3	36,273±0,42
3	Mg	0,47±0,089	0,498±0,056	0,576±0,042	0,314±0,01
4	P	0,696±0,1	0,878±0,098	0,876±0,08	0,345±0,04
5	S	1,433±0,132	1,0989±0,124	1,0833±0,2	1,023±0,111
6	Ca	37,830±0,542	27,22±0,231	26,982±0,214	46,594±0,35
Микроэлементы					
7	Cu	0,0323±0,001	0,0163±0,004	0,0176±0,001	0,01811±0,002
8	Zn	0,0685±0,008	0,0959±0,007	0,0738±0,003	0,0536±0,011
9	Al	0,6±0,079	0,628±0,048	0,736±0,045	1,555±0,124
10	Si	0,458±0,058	0,656±0,072	0,957±0,043	0,908±0,062
11	Ti	0,0559±0,001	0,1337±0,007	0,1431±0,008	0,630±0,075
12	Cr	0	0	0,0075±0,002	0,016±0,001

1	2	3	4	5	6
13	Mn	0,0459±0,01	0,0648±0,004	0,0672±0,008	0,2146±0,008
14	Fe	0,3556±0,088	0,8804±0,07	0,9616±0,054	0,4736±0,045
15	Co	0	0	0	0
16	Ni	0,0038±0,002	0	0	0,011±0,001
17	Pb	0	0	0	0,0112±0,003
18	Mo	0	0	0	0
19	Sn	0	0	0	0
20	Ba	0	0	0	0

Результаты статистической обработки представлены в таблице 40.

Таблица 40.

Статистическая обработка результатов анализа элементного состава

	Df	Sums of Sqs	Mean Sqs	FM model	R ²	Pr (>F)
Group	3	0,158631	0,052877	951,25	0,9972	0,001
Residuals	8	0,000445	0,000056	0,0028		
Total	11	0,159075	1			

Визуализацию результатов проводили с помощью неметрического многомерного шкалирования. Для построения шкалирования применено расстояние Брэя (также известного как мера Сьёренсена), выполнено центрирование и прокрустово вращение до минимизации стресс-функции.

На рисунке 31 представлено взаимное расположение проб в сокращенном пространстве признаков и вклад каждого из исследованных элементов в главные координаты.

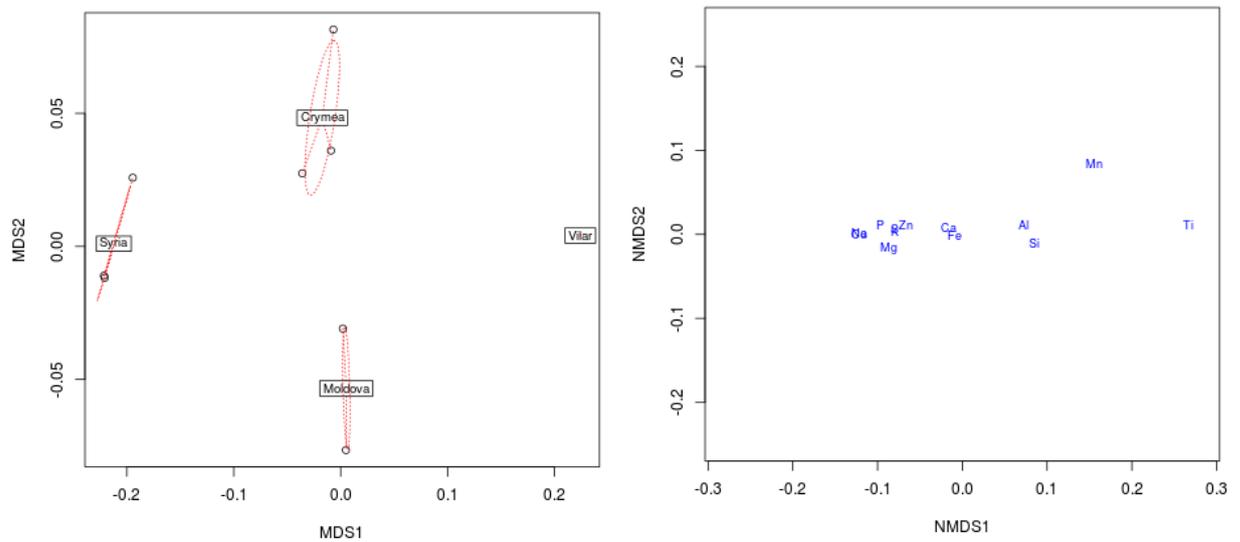


Рис. 31. Взаимное расположение проб и вклад каждого из исследованных элементов в главные координаты.

В результате элементного анализа образцов якорцев стелющихся травы установлено, что среди макроэлементов во всех исследуемых образцах в наибольшем количестве накапливаются калий и кальций, на их долю приходится около 90% от общего содержания элементов в растении. В траве якорцев стелющихся присутствуют эссенциальные элементы, без которых организм не может нормально расти и развиваться, такие как: железо, медь, цинк, марганец, хром, молибден.

Распределение макро и микроэлементов в растении существенно различается в зависимости от места и условий произрастания.

Так, например, содержание титана в образце из ВИЛАР в 6 раз выше, чем в остальных образцах (рис. 32). Большое содержание титана, в данном образце связано с условиями произрастания растения (культивируемое на питомнике ВИЛАР). Минимальное накопление титана наблюдается в образце из Сирии.

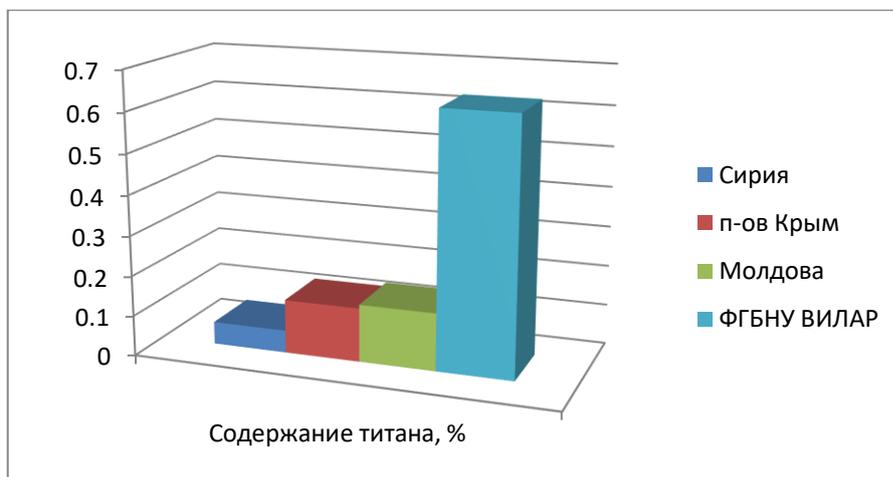


Рис. 32. Содержание титана (Ti) в образцах якорцев стелющихся травы.

Содержание цинка оказалось выше в образце, собранном в Крыму (Рис. 33), а минимальное содержание в образце из питомника ВИЛАР.

Цинк входит в состав металлоферментов, имеет важное значение для роста человека, развития и функционирования иммунной системы, дефицит этого микроэлемента ухудшает общий иммунитет и снижает устойчивость к инфекции [32,82,109,118,130].

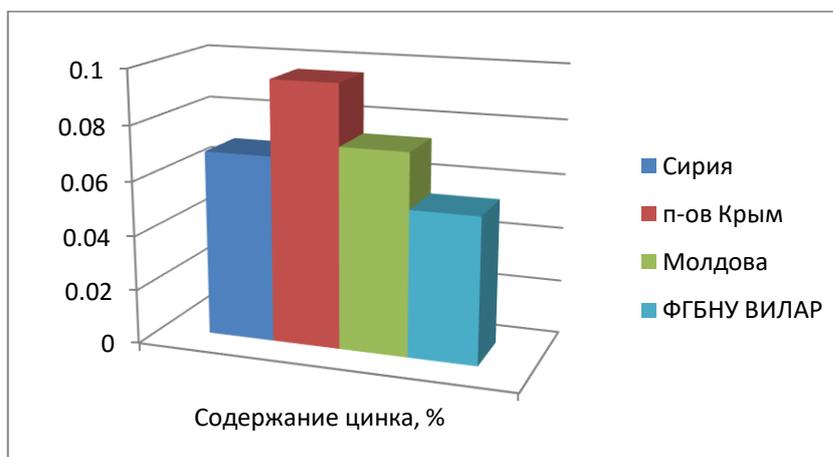


Рис. 33. Содержание цинка (Zn) в образцах якорцев стелющихся травы.

Содержание марганца оказалось наибольшим в образце из ВИЛАР (рис. 34), а в образце из Сирии - минимальное.

Марганец принимает активное участие в обмене веществ, улучшает физиологические процессы. Участвует в окислительных процессах, в

восстановлении нитратов в процессе фотосинтеза, а также в антагонизме между марганцем и другими элементами [101].

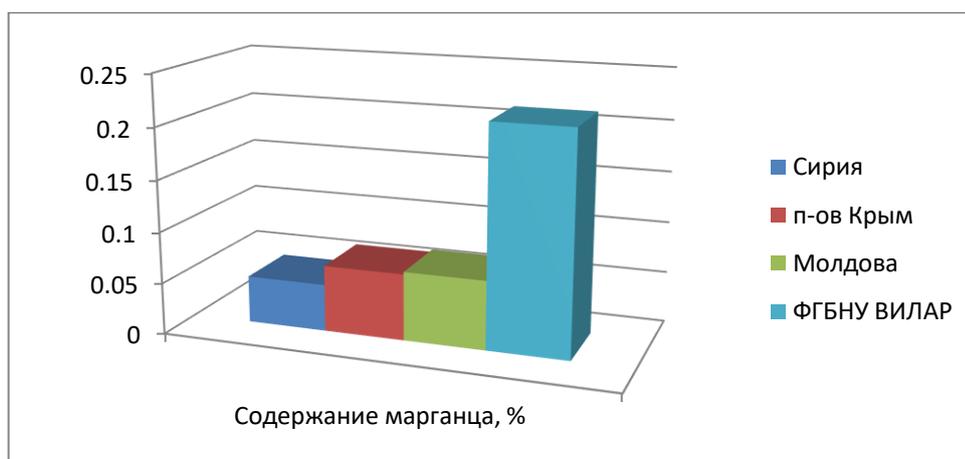


Рис. 34. Содержание марганца (Mn) в образцах якорцев стелющихся травы.

Многочисленные исследования показали наличие определенной зависимости между содержанием железа и марганца. При отсутствии марганца в растении накапливается избыток активного закисного железа [38,39,101]. Похожая зависимость наблюдается и в исследуемых образцах.

Органические соединения, в состав которых входит железо, необходимы в биохимических процессах, происходящих при дыхании и фотосинтезе. Каталитическое действие железа связано с его способностью менять степень окисления. Соединения железа являются переносчиками электронов в биохимических процессах, поскольку входят в состав ферментов дигидрогеназ и цитохромов. Железо участвует в биосинтезе хлорофилла, поэтому ограничение его поступления приводит к тяжелым заболеваниям, в частности к хлорозу [101,119].

Содержание железа оказалось выше в образце, собранном в Молдове (рис. 35). В меньшей степени железо накапливается в образце, собранном в Сирии (2018г).

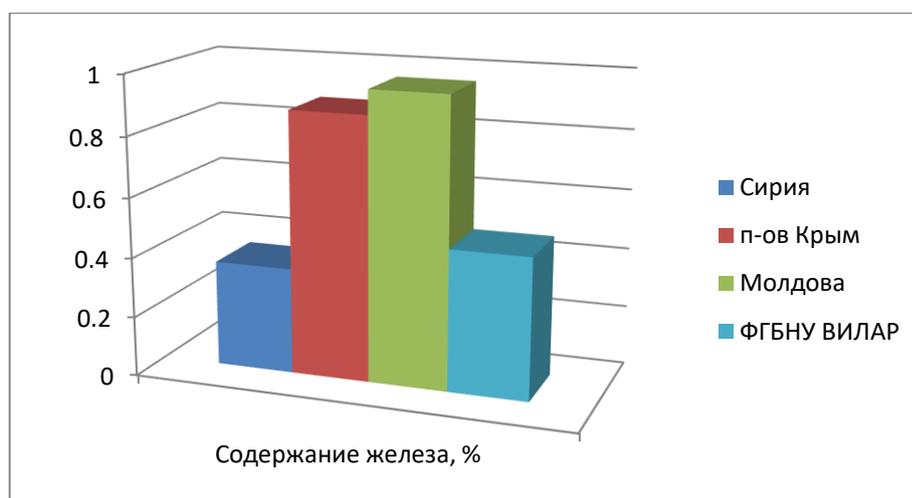


Рис. 35. Содержание железа (Fe) в образцах якорцев стелющихся травы.

Содержание кремния оказалось выше в образце из Молдовы (рис. 36), а минимальное в образце из Сирии.

Кремний необходим для нормального функционирования соединительной ткани, желез внутренней секреции, различных тканей и органов [102,132].

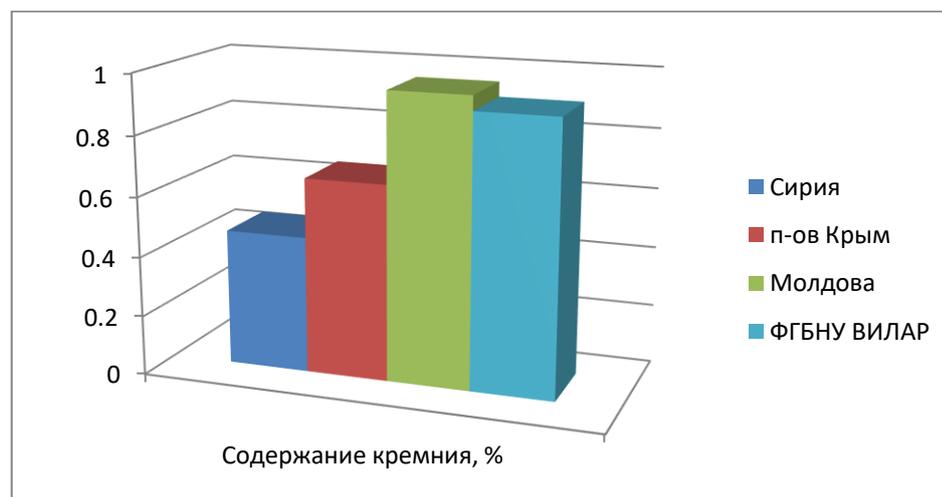


Рис. 36. Содержание кремния (Si) в образцах якорцев стелющихся травы.

Содержание алюминия в образце из ВИЛАР оказалось в 2 раза выше чем, в других образцах. В остальных образцах содержание алюминия

примерно одинаковое (рис. 37). В организме человека алюминий участвует в построении эпителиальной и соединительной ткани, в регенерации костей, в минеральном обмене и др. [37,106]. Стоит отметить, так же что высокое содержание алюминия может оказывать негативное действие на организм человека, поскольку при избыточном его поступлении может проявляться воздействие на центральную нервную систему, прогрессирование болезни Альцгеймера и депрессии [37].

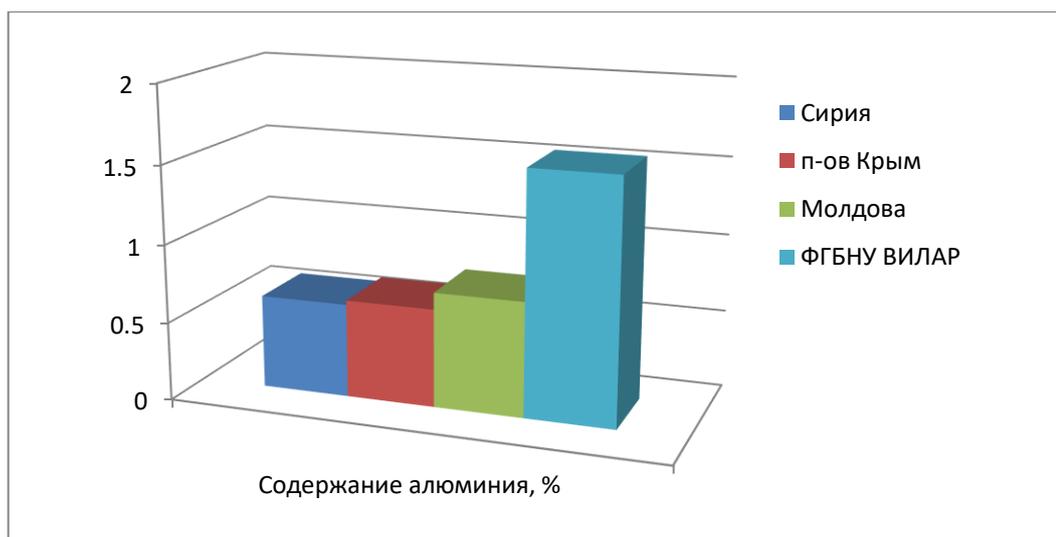


Рис. 37. Содержание кремния (Al) в образцах якорцев стелющихся травы.

Согласно ОФС.1.5.3.0009.15. «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»[62], предельно допустимая концентрация (ПДК) свинца 6,0 мг/кг. Установлено, что в образцах из Сирии, Крыма и Молдовы свинец не был обнаружен. Содержание свинца в образце, заготовленном, в питомнике ФГБНУ ВИЛАР не превышает предельно допустимую концентрацию.

На основании полученных результатов были составлены ряды биологического поглощения химических элементов для якорцев стелющихся травы:

Образец, заготовленный в Сирии (2018 г):

K>Ca>Na>S>P>Al>Mg>Si>Fe>Zn>Ti>Mn>Cu>Ni.

Образец, заготовленный на полуострове Крым (2017 г):

K>Ca>Na>S>Fe>P>Si>Al>Mg>Ti>Zn>Mn>Cu.

Образец, заготовленный в Молдове (2017 г):

K>Ca>Na>S>Fe>Si>P>Al>Mg>Ti>Zn>Mn>Cu>Cr.

Образец, заготовленный на питомнике ВИЛАР (2016 г):

Ca>K>Na>Al>S>Si>Ti>Fe>P>Mg>Mn>Zn>Cu>Cr>Pb>Cu.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. С помощью качественных химических реакций определены основные группы БАВ: флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, алкалоиды.
2. Методом тонкослойной хроматографии подтверждено наличие сапонинов в траве якорцев стелющихся. Подобраны условия для хроматографического разделения флавоноидов методом ТСХ в сырье.
3. В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ – МС/МС в исследуемых образцах обнаружены диосцин и протодиосцин; установлено их количественное содержание.
4. Проведенное исследование элементного состава якорцев стелющихся травы показало, что места обитания (географические зоны), в которых осуществлялся сбор исследованных образцов сырья, влияют на накопление элементов растением. С учетом полученных данных составлены ряды биологического поглощения для образцов каждого места произрастания.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ

5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЯКОРЦАХ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЕ

Методику количественного определения разрабатывали на объединенном образце якорцев стелющихся травы, полученном путем смешивания в равных количествах образцов, указанных в главе 2.

5.1.1. Обоснование выбора метода

Для определения количественного содержания флавоноидов в сырье использовали дифференциальный спектрофотометрический метод, так как он является экспрессным, высокочувствительным и точным (ошибка 2,5 – 5%) [9,65].

Для определения оптической плотности используют 2 варианта:

1. Измерение оптической плотности по собственному поглощению флавоноидов – основано на свойстве молекул этих веществ избирательно поглощать электромагнитное излучение.
2. Измерение оптической плотности комплекса, полученного при взаимодействии суммы флавоноидов с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте.

При разработке методики количественного определения использовали методику количественного определения суммы флавоноидов в зверобое траве [81].

5.1.2. Выбор аналитической длины волны

Флавоноиды имеют две полосы – это интервалы длин волн с основными максимумами поглощения: 250 – 270 нм (II полоса) и 350 – 430

нм (I полоса). Комплекс флавоноидов с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте обнаруживает батохромный сдвиг полос поглощения примерно на 50 – 60 нм. За аналитическую длину волны принимают максимум в длинноволновой части спектра.

Измерение оптической плотности проводили в интервале длин волн от 350 нм до 430 нм.

Для определения аналитической длины волны были изучены УФ – спектры спиртовых извлечений сырья якорцев стелющихся и Стандартного образца (СО) рутина (табл. 41).

Таблица 41

Спектральные характеристики (λ_{max}) извлечений в УФ области

№	Условия определения	Длина волны, нм
1	Извлечение из якорцев стелющихся травы на 50% спирте	371 нм
2	Дифференциальный спектр спиртового извлечения якорцев стелющихся травы с раствором алюминия хлорида 2% спиртовым в 96% спирте	410 нм
3	Спектр спиртового раствора СО рутина с раствором алюминия хлорида 2% спиртовым в 96% спирте	411 нм

Из таблицы 42 видно, что собственный спектр спиртового извлечения из якорцев стелющихся травы имеет максимум при длине волны 371 нм. Дифференциальный спектр того же извлечения с алюминия хлоридом имеет максимум при длине 410 ± 2 нм. Максимум в этом интервале характерен для СО рутина.

На рисунке 38 изображена дифференциальная кривая поглощения извлечения якорцев стелющихся травы, которая имеет максимум при 410 ± 2 нм. Для сравнения СО рутина в присутствии алюминия хлорида имеет тот же максимум при длине волны $\lambda = 410 \pm 2$ нм (рис. 39), что дает возможность использовать данную длину волны в качестве аналитической.

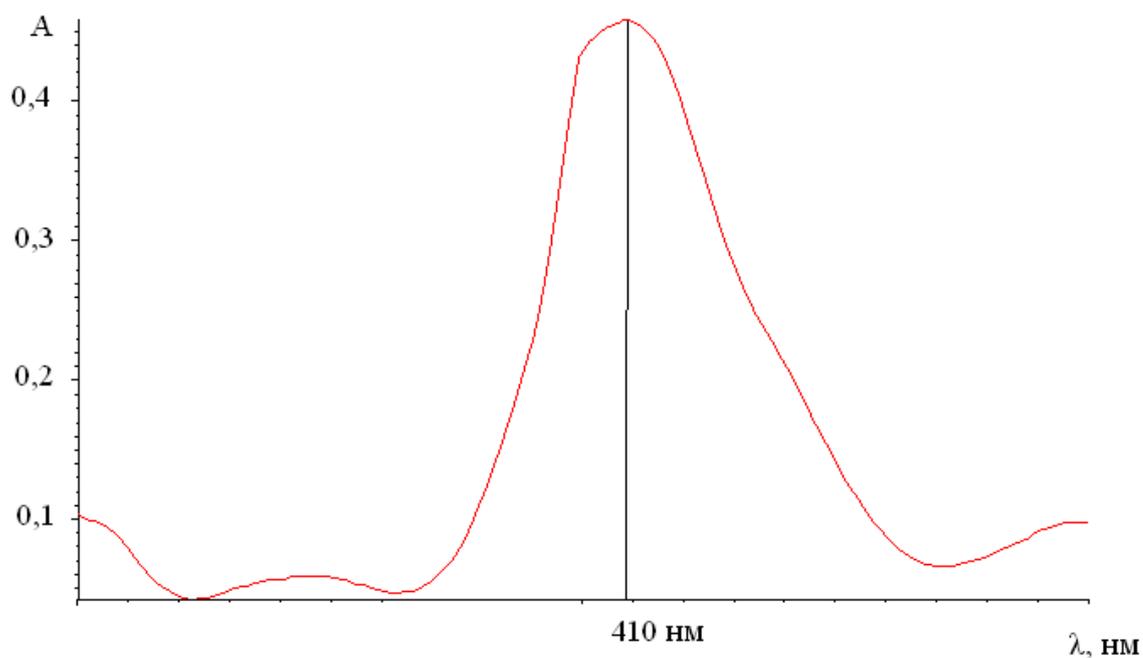


Рис. 38. УФ – спектр извлечения комплекса суммы флавоноидов якорцев стелющихся травы с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте.

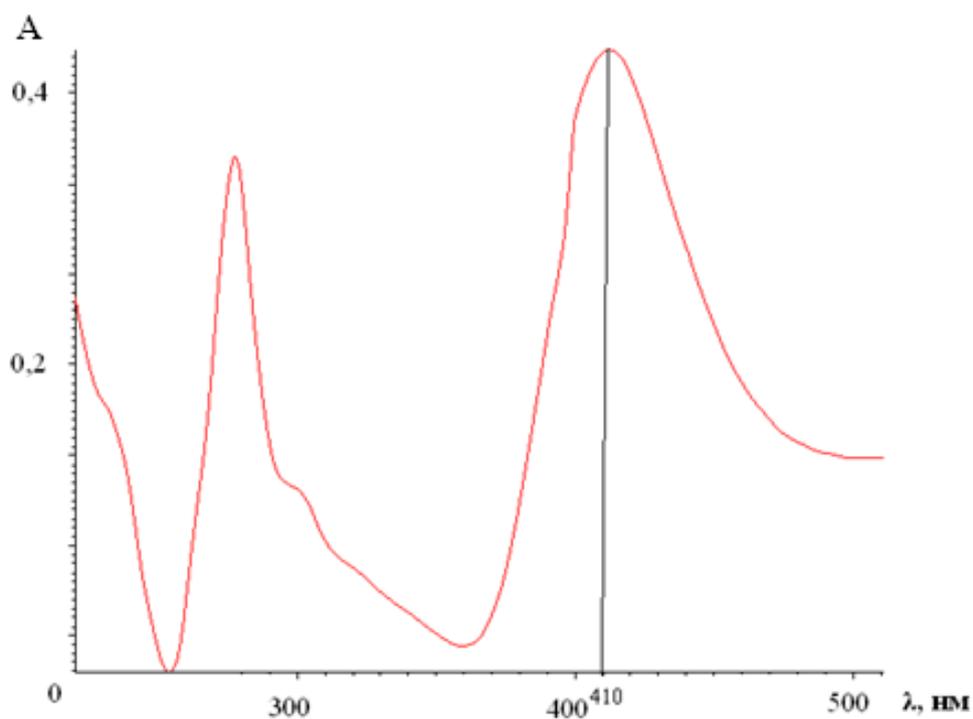


Рис. 39. УФ – спектр комплекса раствора СО рутина с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте.

В дальнейшем расчет суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве проводили в пересчете на оптическую плотность СО рутина.

5.1.3. Выбор экстрагента

При разработке оптимальных условий выбора экстрагента для максимального извлечения флавоноидов из сырья использовали воду очищенную и спирт различной концентрации. Результаты исследования представлены в таблице 42.

Таблица 42

Содержание суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве
в зависимости от экстрагента

№ п/п	Экстрагент	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
1	Вода очищенная	0,1659	0,498
Концентрация спирта, %			
2	50	0,1730	0,519
3	70	0,2432	0,730
4	80	0,2986	0,896
5	90	0,1405	0,412

На основании проведенных исследований установлено, что наибольшее количество флавоноидов экстрагируется 80% спиртом, поэтому он был выбран в качестве экстрагента для дальнейших исследований.

5.1.4. Определение степени измельченности сырья

Изучено влияние степени измельченности сырья на максимальный выход флавоноидов из якорцев стелющихся травы. Результаты представлены в таблице 43.

Таблица 43

Зависимость содержания флавоноидов от степени измельченности сырья

Степень измельченности, мм	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
1,0	0,1921	0,1525 ± 0,08
2,0	0,5345	1,1862 ± 0,04
3,0	0,3108	0,9323 ± 0,10
5,0	0,3625	1,1748 ± 0,12
7,0	0,5242	1,1450 ± 0,04
8,0	0,4881	1,4642 ± 0,06

Исследования показали, что максимальная оптическая плотность и наибольший выход суммы флавоноидов из сырья наблюдается при степени измельченности 2 мм. Таким образом, в дальнейшем, использовали сырье со степенью измельченности сырья 2 мм.

5.1.5. Время и кратность экстракции

С целью определения оптимального времени и кратности экстракции было проведено экстрагирование из сырья флавоноидов 80% спиртом:

1. Однократная экстракция в течение 30 мин.
2. Однократная экстракция в течение 45 мин.
3. Однократная экстракция в течение 60 мин.
4. Двухкратная экстракция по 30 мин.
5. Трехкратная экстракция по 30 минут

Результаты исследований представлены в таблице 44.

Таблица 44

Зависимость содержания суммы флавоноидов от режима экстракции

Время экстракции однократной, мин	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
30	0,1896	0,5687 ± 0,08
45	0,2328	0,6998 ± 0,08
60	0,3041	0,9122 ± 0,06
Двухкратная экстракция по 30 минут	0,1692	0,5075 ± 0,02
Трехкратная экстракция по 30 минут	0,1519	0,4557 ± 0,10

Максимальное содержание суммы флавоноидов определено при однократной экстракции в течение 60 мин.

5.1.6. Изучение условий реакции комплексообразования

Для определения полноты протекания реакции и устойчивости комплекса флавоноидов с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте проведен анализ спиртовых извлечений с различными вариантами соотношений: извлечение – хромогенный реактив.

При проведении спектрофотометрических определений, согласно ГФ XIV, величина оптической плотности должна быть в пределах от 0,2 до 0,8 [65].

Для максимального образования определяемого комплекса флавоноидов необходим достаточный избыток реактива, что обеспечивает устойчивость комплекса. Варианты исследованных соотношений представлены в таблице 45.

Таблица 45

Зависимость оптической плотности от соотношения извлечения (раствор А) и раствора алюминия хлорида 2% в 96% спирте

№ п/п	Соотношение извлечения и реактива	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
1	1:1	0,2618	0,7854 ± 0,10
2	1:2	0,2859	0,8576 ± 0,14
3	1:3	0,2658	0,7973 ± 0,08
4	2:2	0,4450	1,3349 ± 0,10
5	2:3	0,4404	1,3211 ± 0,04
6	2:4	0,4525	1,3574 ± 0,06
7	2:5	0,5265	1,5794 ± 0,04
8	2:6	0,4249	1,2746 ± 0,18
9	2:7	0,4020	1,2060 ± 0,12

Анализ показал, что оптимальным соотношением объема раствора А и раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте является соотношение 2:5, при котором наблюдается максимальная плотность и наибольшее содержание суммы флавоноидов.

5.1.7. Изучение устойчивости комплекса флавоноидов с хромогенным реактивом

При проведении спектрофотометрических измерений необходимо учитывать, что образование хелатных комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия протекает во времени. Полное прохождение этой реакции характеризуется устойчивостью фотометрируемого раствора по величине оптической плотности в течение определенного времени. Это время устойчивости комплекса. Его практическое значение важно при проведении нескольких анализов одновременно или при необходимости их повторения.

Для проведения этого анализа измеряли величину оптической плотности фотометрируемого раствора через каждые 10 минут в течение 1 часа с момента получения комплекса. Стабильность комплекса суммы флавоноидов с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте наблюдается через 15 минут после начала реакции и сохраняет ее в течение 1 часа (рис. 40).

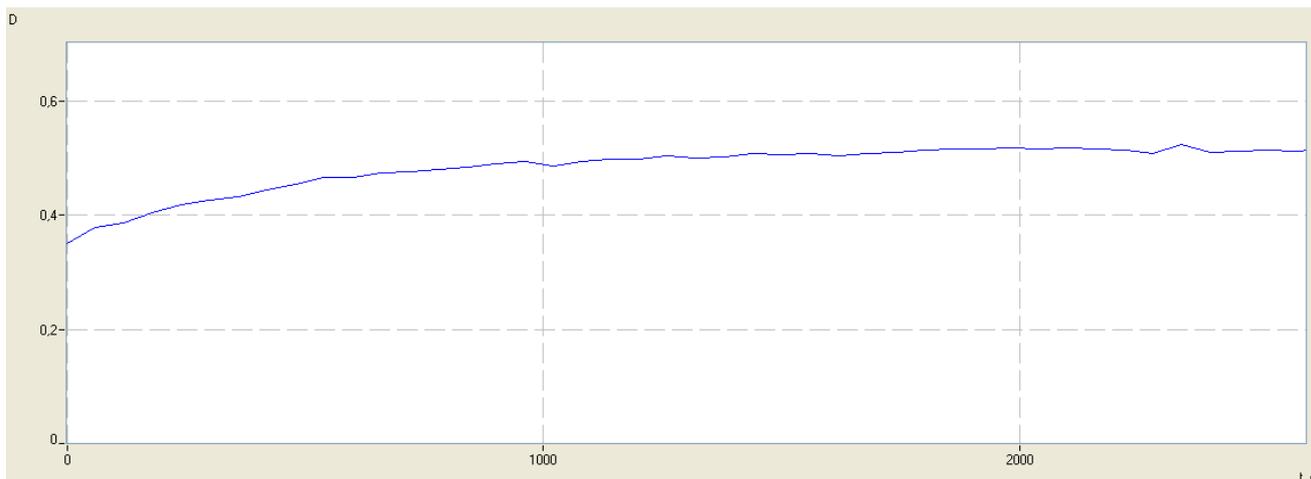


Рис. 40. Устойчивость комплекса суммы флавоноидов с раствором алюминия хлорида 2% в 96% спирте во времени.

5.2. РАСЧЕТ ОШИБКИ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ

Для расчета ошибки метода результаты исследования обрабатывали статистически по методикам ГФ XIV [64], пользуясь программой STAT.

Реакция комплексообразования флавоноидов с раствором алюминия хлорида 2% спиртовым в 96% спирте достаточно специфична и избирательна, сам спектрофотометрический метод анализа высокочувствителен и точен, относительная ошибка метода не должна превышать 3 – 5%.

Для определения относительной ошибки метода готовили извлечения из объединенного образца и раствора сравнения в 5 – кратной повторности по методике, приведенной в главе 5, пункт 5.1.2.1.

Результаты статистической обработки полученных данных представлены в таблице 46.

Таблица 46

Метрологическая характеристика метода

N	F	\bar{x}	S²	S	P,%	t(p,f)	$\Delta\bar{x}$	ε	δ,%
5	4	2,086	0,0596	0,2441	95	2,78	0,03	0,77	2,89

где:

n – количество повторностей

f – число степеней свободы ($n - 1$)

\bar{x} - среднее арифметическое

S² - дисперсия

S – стандартное отклонение

P,% - доверительная вероятность

t (p,f) – критерий Стьюдента (табличное значение)

$\Delta\bar{x}$ - ошибка среднего арифметического

ε – относительная ошибка результата отдельного определения

δ – относительная величина систематической ошибки.

Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения (2,89 %) при доверительной вероятности 95%. Это свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики.

5.3. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЯКОРЦАХ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВЕ

На основании полученных результатов нами предложена методика количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве.

Методика [9]:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл 80 % спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр «Filtrak» в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. После охлаждения фильтр промывают 80% спиртом, доводят объем извлечения до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл раствора алюминия хлорида 2% в 96% спирте, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки 96% спиртом. Через 15 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ – 2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 96% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность (раствор Б) испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность (раствор Б) СО рутина;

a – навеска сырья в граммах;

a_0 – навеска СО рутина в граммах;

P – содержание основного вещества в СО рутина в %;

W – потеря в массе при высушивании в %.

Приготовление СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96% спирта, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А) СО рутина. 2 мл раствора А СО рутина, 1 капля уксусной кислоты 5%, 5 мл раствора алюминия хлорида 2% в 96% спирте, помещают в мерную колбу, вместимостью 25 мл и доводят 96% спиртом до метки (раствор Б) СО рутина, где A – оптическая плотность испытуемого раствора.

5.4. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ

При проведении валидационных исследований были установлены характеристики разработанной методики [6]: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность [56].

5.4.1. Линейность

Линейность определяли на пяти уровнях концентрации. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме:

первый уровень: аликвота раствора А 1 мл – объем раствора Б 2,5 мл (50%);

второй уровень: аликвота раствора А 1,5 мл – объем раствора Б 3,75 мл (75%);

третий уровень: аликвота раствора А 2,0 мл – объем раствора Б 5,0 мл (100%);

четвертый уровень: аликвота раствора А 2,5 мл – объем раствора Б 6,25 мл (125%);

пятый уровень: аликвота раствора А 3,0 мл – объем раствора Б 7,5 мл (150%).

Критерий приемлемости – коэффициент корреляции составил 0,995 (рис. 41).

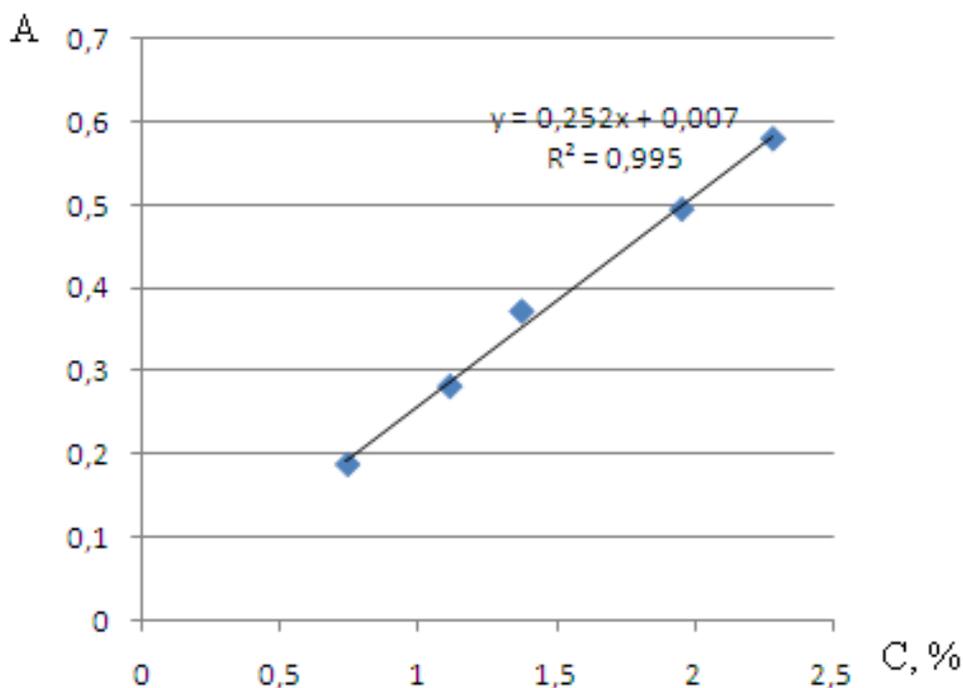


Рис. 41. Зависимость оптической плотности раствора от объема исследуемого извлечения.

На основании полученных данных можно утверждать, что соблюдается линейная зависимость между величинами оптической плотности и содержанием суммы флавоноидов в извлечениях из якорцев стелющихся травы в интервале концентраций 50 – 150% от номинального значения определяемой величины.

5.4.2. Повторяемость

Повторяемость методики определяли в десятикратной повторности, в одной лаборатории в идентичных условиях, с использованием одного и того же оборудования, одним и тем же исследователем, в пределах короткого промежутка времени. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения RSD, которое не должно превышать 10% (табл. 47).

Таблица 47

Определение повторяемости разработанной методики

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в якорцах стелющихся траве, %
1	1,54
2	1,56
3	1,52
4	1,47
5	1,59
6	1,72
7	1,58
8	1,58
9	1,65
10	1,58
Среднее значение	1,58
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,069 %

5.4.3. Внутрिलाбораторная воспроизводимость

Внутрिलाбораторную воспроизводимость методики определяли два провизора – аналитика кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА. Исследования проводили на трех образцах в трехкратной повторности на спектрофотометре СФ – 2000 (табл. 48).

Таблица 48

Определение внутрिलाбораторной воспроизводимости методики

Повторность	Аналитик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в образцах травы якорцев стелющихся, %		
		Молдова, окрестности г. Кишинев, 2017 г	Сирия, окрестности г. Дамаск, 2018 г	Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва, 2016 г
1	1	1,18	1,12	1,90
2	1	1,10	1,15	1,52
3	1	0,95	1,19	1,75
4	2	1,17	1,23	1,62
5	2	0,94	1,19	1,32
6	2	1,18	1,12	1,69
Среднее значение		1,09	1,17	1,64
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		0,113 %	0,044 %	0,194 %

5.4.4. Межлабораторная воспроизводимость

Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах (ботанический сад ВИЛАР г. Москва, 2016 г; Молдова, окрестности г. Кишинев 2017 г; Сирия, окрестности г. Дамаск, 2018 г) в трехкратной повторности в двух лабораториях (на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА на спектрофотометре СФ – 2000 и в лаборатории РИЦ «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА на спектрофотометре

SHIMADZU UV – 1800). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15% (табл. 49).

Таблица 49

Результаты определения межлабораторной воспроизводимости

№ п/п	Место сбора	Повторность	Содержание суммы флавоноидов, %	
			СФ-2000 кафедра фармакогнозии с курсом ботаники	UV-1800 SHIMADZU РИЦ «Фарматест»
1	Молдова, окрестности г. Кишинев	1	1,36	1,41
		2	1,36	1,37
		3	1,35	1,40
		Среднее значение	1,36	1,39
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,006	0,021
2	Сирия, окрестности г. Дамаск	1	1,18	1,29
		2	1,29	1,25
		3	1,23	1,23
		Среднее значение	1,23	1,26
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,055	0,031
3	Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва	1	1,65	1,72
		2	1,67	1,75
		3	1,68	1,82
		Среднее значение	1,67	1,76
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,015 %	0,051 %

Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%.

5.4.5. Правильность методики

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору непосредственно в извлечение из якорцев стелющихся травы (табл. 50).

Таблица 50

Определение правильности методики

№ п/п	Место сбора	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, мг	Добавлено СО рутин, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %
1	Молдова, окрестности г. Кишинев	10,8	0,05	10,85	10,90	0,46
		10,8	0,1	10,90	11,10	1,83
		10,8	0,15	10,95	11,13	1,64
2	Сирия, окрестности г. Дамаск	11,5	0,05	11,55	11,70	1,30
		11,5	0,1	11,60	11,78	1,55
		11,5	0,15	11,65	11,95	2,57
3	Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва	17,6	0,05	17,65	17,67	0,11
		17,6	0,1	17,70	18,03	1,86
		17,6	0,15	17,75	17,95	1,13

Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 2,89% (табл. 51).

Таблица 51

Метрологическая характеристика метода

n	f	\bar{x}	S²	S	P,%	t(p,f)	$\Delta\bar{x}$	ε	δ,%
5	4	2,086	0,0596	0,2441	95	2,78	0,03	0,77	2,89

где:

n – количество повторностей

f – число степеней свободы ($n - 1$)

\bar{x} - среднее арифметическое

S² - дисперсия

S – стандартное отклонение

P,% - доверительная вероятность

t (p,f) – критерий Стьюдента (табличное значение)

$\Delta\bar{x}$ - ошибка среднего арифметического

ε – относительная ошибка результата отдельного определения

δ – относительная величина систематической ошибки

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Разработана методика и определены параметры количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве в пересчете на рутин с использованием дифференциальной спектрофотометрии: длина волны – 410 нм, экстрагент – 80 % спирт, время однократной экстракции – 60 минут, измельченность сырья – 2 мм, оптимальное соотношение объема извлечения и 2 % спиртового раствора алюминия хлорида – 2:5, время образования устойчивого комплекса – 15 минут.
2. Методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин является валидной. Не требует дорогостоящих реактивов, является точной, воспроизводимой и доступной, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья.

ГЛАВА 6. СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ

6.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЛАЖНОСТИ

Влажность – один из критериев оценки качества сырья. Повышенное содержания влаги в сырье приведёт к его порче. Определение проводили по методикам ГФ XIV, статья ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [59]. Полученные нами данные представлены в таблице 52.

Таблица 52

Показатели влажности исследуемых образцов

Образец	Влажность, %	по НД
ВИЛАР, 2016 г	$5,90 \pm 0,02$	не более 13%
Молдова, 2017 г	$7,60 \pm 0,04$	
Крым, 2017 г	$6,52 \pm 0,08$	
Сирия, 2018 г	$6,20 \pm 0,02$	
Сирия, 2019 г	$6,90 \pm 0,06$	
Крым, 2019 г	$6,60 \pm 0,06$	

6.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЛЫ ОБЩЕЙ

Определение золы общей проводили по методике ГФ XIV, ОФС 1.2.2.2.0013.15 [57]. Полученные нами данные представлены в таблице 53.

Таблица 53

Содержание золы общей

Образец	Зола общая, %	по НД
ВИЛАР, 2016 г	$14,12 \pm 0,04$	не более 16 %
Молдова, 2017 г	$13,82 \pm 0,06$	
Крым, 2017 г	$13,15 \pm 0,04$	
Сирия, 2018 г	$12,98 \pm 0,08$	
Сирия, 2019 г	$14,83 \pm 0,02$	
Крым, 2019 г	$11,01 \pm 0,04$	

6.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОЛЫ НЕРАСТВОРИМОЙ В ХЛОРИСТОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТЕ

Траву якорцев стелющихся собирают с корнями, кроме того, сырьё имеет опушение. Поэтому нами предложен показатель «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте».

Определение золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте проводили по методике ГФ XIV, ОФС 1.5.3.0005.15 [58]. Результаты определения представлены в таблице 54.

Таблица 54

Содержание золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте

Образец	Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, %
ВИЛАР, 2016 г	1,41 ± 0,10
Молдова, 2017 г	0,99 ± 0,08
Крым, 2017 г	0,68 ± 0,02
Сирия, 2018 г	1,03 ± 0,02
Сирия, 2019 г	1,05 ± 0,12
Крым, 2019 г	0,20 ± 0,04

На основании полученных данных, считаем необходимым нормировать показатель:

«Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» – «Цельное сырьё, измельчённое сырьё – не более 1,5 %».

6.4. РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ САПОНИНОВ

Количественное определение сапонинов проводили по методике [42]. Данные представлены в таблице 55, рисунок 5.

Таблица 55

Содержание фураностаноловых гликозидов в образцах

Образец	Фураностаноловые гликозиды, %	по НД
ВИЛАР, 2016 г	$0,85 \pm 0,04$	не менее 0,7 %
Молдова, 2017 г	$0,95 \pm 0,08$	
Крым, 2017 г	$0,88 \pm 0,10$	
Сирия, 2018 г	$1,01 \pm 0,06$	
Сирия, 2019 г	$1,02 \pm 0,02$	
Крым, 2019 г	$0,84 \pm 0,04$	

Содержание сапонинов в исследованных образцах якорцев стелющихся составило от $0,84 \pm 0,04$ до $1,02 \pm 0,02$ %.

6.5. РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ

Количественное определение суммы флавоноидов проводили по методике, разработанной нами [9].

Данные представлены в таблице 56, рисунке 42.

Таблица 56

Содержание суммы флавоноидов в образцах

Образец	Сумма флавоноидов, %
ВИЛАР, 2016 г	$1,67 \pm 0,06$
Молдова, 2017 г	$1,36 \pm 0,02$
Крым, 2017 г	$1,25 \pm 0,02$
Сирия, 2018 г	$1,23 \pm 0,08$
Сирия, 2019 г	$1,18 \pm 0,04$
Крым, 2019 г	$1,22 \pm 0,04$

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследованных образцах якорцев стелющихся составило от $1,18 \pm 0,04$ до $1,67 \pm 0,06$ %. Исходя из этого, показатель количественного содержания предлагаем нормировать:

Цельное сырьё, измельченное сырьё: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %.

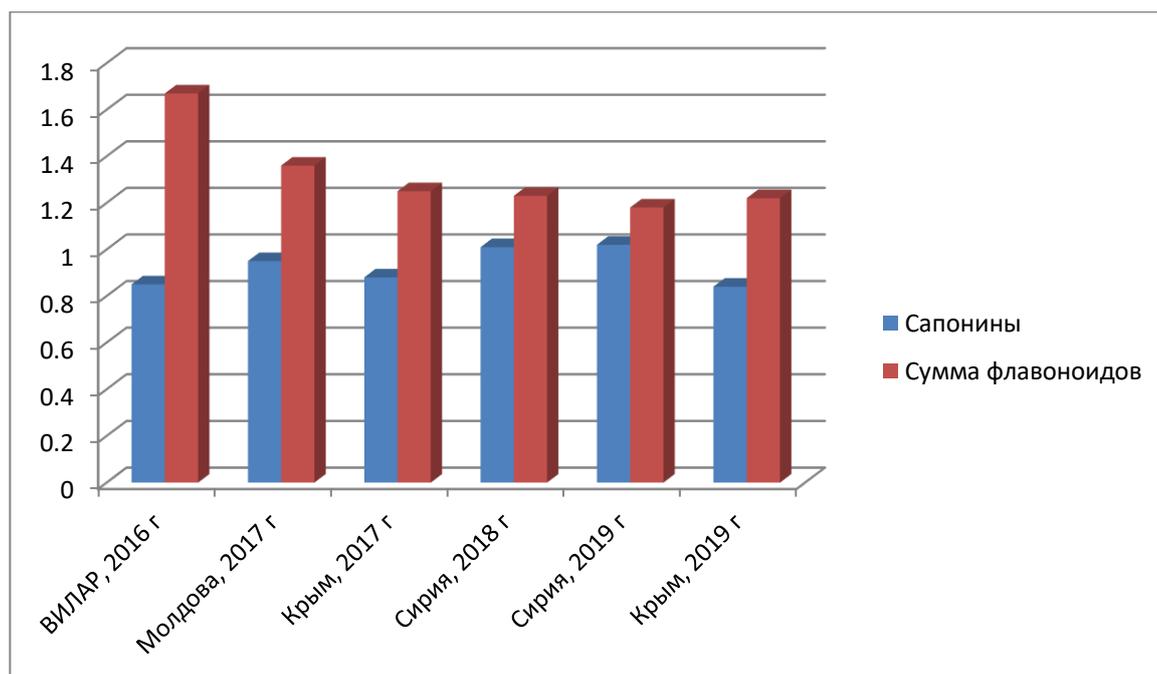


Рис. 42. Содержание сапонинов и суммы флавоноидов в образцах якорцев стелющихся травы.

6.6. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Экстрактивные вещества определяли по методике общей фармакопейной статьи ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XIV метод 1, учитывая, что лекарственное растительное сырье используется для получения экстракта [61].

Выбор экстрагента устанавливали на объединенном образце, полученном путем смешивания в равных количествах образцов сырья. Для подбора экстрагента использовали: воду очищенную, спирт 50, 70, 80, 90 – процентной концентрации [99].

Исследования по выбору экстрагента показали, что максимальное количество экстрактивных веществ, извлекается 50% спиртом (табл. 57), поэтому данный экстрагент использовали в последующем при разработке количественного определения экстрактивных веществ в исследуемых образцах.

Таблица 57

Выбор экстрагента для определения содержания экстрактивных веществ в якорцах стелющихся траве

№	Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %
1	Вода очищенная	25,28 ± 0,05 %
2	спирт 50 %	26,79 ± 0,03 %
3	спирт 70 %	24,12 ± 0,09 %
4	спирт 80 %	22,36 ± 0,04 %
5	спирт 90 %	16,81 ± 0,09 %

Следующим этапом исследования было определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом в исследуемых образцах (табл. 58, рис. 43) [99].

Таблица 58

Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом в образцах
якорцев стелющихся травы

Образец	Содержание экстрактивных веществ, %
Крым, 2017 г	22,58 ± 0,04 %
Молдова, 2017 г	22,06 ± 0,03 %
ВИЛАР, 2016 г	16,62 ± 0,07 %
Сирия, 2018 г	16,13 ± 0,04 %
Сирия, 2019 г	25,75 ± 0,05 %
Крым, 2019 г	30,12 ± 0,03 %

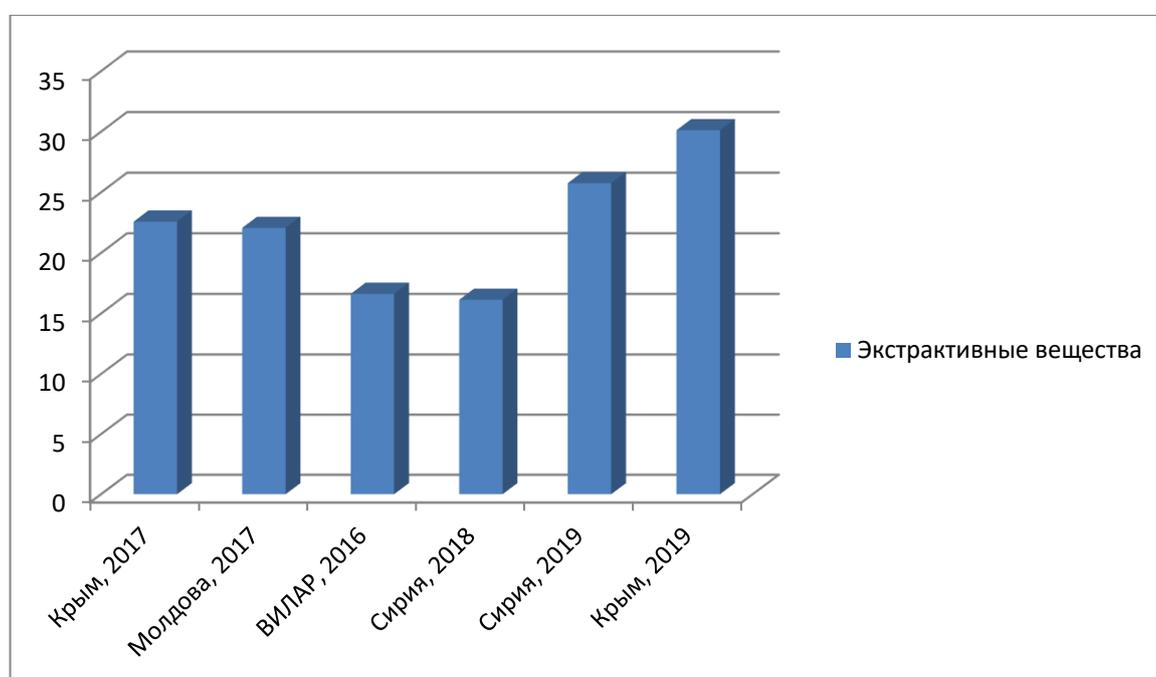


Рис. 43. Содержание экстрактивных веществ в образцах якорцев стелющихся травы.

Содержание экстрактивных веществ в исследованных образцах якорцев стелющихся составило от $16,13 \pm 0,04$ до $30,12 \pm 0,03$ %. Исходя из этого, показатель количественного содержания предлагаем нормировать:

Цельное сырьё, измельченное сырьё: содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом – не менее 16 %.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. Проведена стандартизация сырья якорцев стелющихся по показателям: влажность ($5,90 \pm 0,02 - 7,60 \pm 0,04$ %), зола общая ($11,01 \pm 0,04 - 14,83 \pm 0,02$ %), содержание сапонинов ($0,84 \pm 0,04$ до $1,02 \pm 0,02$ %).
2. Определено содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин в исследованных образцах, которое составило от $1,18 \pm 0,04$ до $1,67 \pm 0,06$ %.
3. Установлено содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом в исследованных образцах, которое составило от $16,13 \pm 0,04$ до $30,12 \pm 0,03$ %.
4. Предложены показатели «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте», не более 1,5 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом – не менее 16 %; содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, не менее 1 %. Показатель «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» предложен впервые.
5. Разработан проект ФС «Якорцев стелющихся трава».

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено морфолого – анатомическое исследование, которое позволило выявить основные анатомо – морфологические признаки якорцев стелющихся травы: простые одноклеточные волоски на листьях и чашелистиках; непучковый тип проводящей системы стеблей и корней; наличие друз во всех органах растения. Определены основные биометрические параметры анатомических признаков и выполнены микрофотографии:

- листа: простые волоски длиной от $117,33 \pm 10,90$ мкм до $890,53 \pm 29,78$ мкм и шириной от $10,80 \pm 0,48$ мкм до $18,27 \pm 0,46$ мкм; клетки эпидермы длиной от $20,90 \pm 0,78$ мкм до $42,00 \pm 3,18$ мкм и шириной от $13,97 \pm 0,55$ мкм до $30,53 \pm 2,64$ мкм; устьица длиной от $16,30 \pm 0,60$ мкм до $21,86 \pm 0,75$ мкм и шириной от $13,37 \pm 0,39$ мкм до $18,66 \pm 0,90$ мкм; друзы диаметром от $21,31 \pm 1,24$ мкм до $34,50 \pm 2,91$ мкм.

- стебля: толщина первичной коры от $83,20 \pm 5,06$ мкм до $200,00 \pm 9,26$ мкм; толщина перицикла от $78,40 \pm 5,73$ мкм до $122,40 \pm 4,69$ мкм; толщина флоэмы от $26,66 \pm 2,75$ мкм до $119,00 \pm 13,08$ мкм; толщина ксилемы от $225,20 \pm 14,94$ мкм до $274,93 \pm 24,88$ мкм; друзы диаметром от $24,33 \pm 1,78$ мкм до $31,53 \pm 1,50$ мкм; радиус стебля от $958,00 \pm 50,16$ мкм до $1752,00 \pm 149,86$ мкм.

- цветка: волоски по поверхности чашелистика длиной от $351,26 \pm 41,21$ мкм до $717,07 \pm 58,37$ мкм и шириной от $11,70 \pm 0,71$ мкм до $28,32 \pm 1,65$ мкм; волоски по краю чашелистиков длиной от $202,53 \pm 17,65$ мкм до $481,04 \pm 57,83$ мкм и шириной от $9,47 \pm 0,65$ мкм до $19,10 \pm 1,17$ мкм; друзы диаметром от $13,91 \pm 0,81$ мкм до $24,07 \pm 1,35$ мкм; пыльца диаметром от $41,60 \pm 1,28$ мкм до $46,60 \pm 1,59$ мкм; клетки эпидермы длиной от $28,10 \pm 1,86$ мкм до $49,67 \pm 2,71$ мкм и шириной от $14,87 \pm 1,05$ мкм до $19,60 \pm 1,00$ мкм; устьица длиной от $18,83 \pm 0,34$ мкм до $20,80 \pm 0,82$ мкм и шириной от $13,13 \pm 0,70$ мкм до $19,60 \pm 0,72$ мкм.

- корня: толщина перидермы от $44,13 \pm 3,52$ мкм до $145,63 \pm 18,38$ мкм; толщина коры от $319,47 \pm 14,80$ мкм до $573,77 \pm 44,29$ мкм; толщина ксилемы от $520,53 \pm 37,77$ мкм до $1714,00 \pm 121,10$ мкм; радиус корня от $995,33 \pm 28,34$ мкм до $2801,00 \pm 117,46$ мкм; друзы диаметром от $22,07 \pm 1,61$ мкм до $27,40 \pm 1,19$ мкм.

2. Подтверждено наличие сапонинов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и алкалоидов методами тонкослойной хроматографии и с помощью качественных химических реакций.

3. Доказано наличие диосцина и протодиосцина в исследуемых образцах методом ВЭЖХ – МС/МС, их содержание колеблется в пределах: диосцин $0,09 \pm 0,02 - 1,90 \pm 0,02$ мг; протодиосцин $1,44 \pm 0,38 - 15,59 \pm 0,28$ мг.

4. Определен элементный состав *Tribulus terrestris* L. Он представлен 16 элементами, из них 6 макроэлементов (Na, K, Mg, P, S, Ca) и 10 микроэлементов (Cu, Zn, Al, Si, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Pb), составлены ряды биологического поглощения для образцов каждого места произрастания. Доказано влияние мест обитания (географические зоны) на накопление элементов растением.

5. Разработана методика и определены параметры количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве в пересчете на рутин с использованием дифференциальной спектрофотометрии: длина волны – 410 нм, экстрагент – 80 % спирт, время однократной экстракции – 60 минут, измельченность сырья – 2 мм, оптимальное соотношение объема извлечения и 2 % спиртового раствора алюминия хлорида – 2:5, время образования устойчивого комплекса – 15 минут. Доказано, что методика является валидной, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья.

6. Проведена стандартизация сырья якорцев стелющихся по показателям: влажность ($5,90 \pm 0,02 - 7,60 \pm 0,04$ %), зола общая ($11,01 \pm 0,04 - 14,83 \pm 0,02$ %), содержание сапонинов ($0,84 \pm 0,04 - 1,02 \pm 0,02$ %), содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин ($1,18 \pm 0,04 - 1,67 \pm 0,06$ %),

экстрактивных веществ, извлекаемых 50% спиртом ($16,13 \pm 0,04 - 30,12 \pm 0,03$ %).

7. Предложены показатели «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте», не более 1,5 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом – не менее 16 %; содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, не менее 1 %.

8. Разработан проект ФС «ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ ТРАВА».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ВФС – временная фармакопейная статья

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ – государственная фармакопея

MRM – мониторинг множественных реакций

ОФС – общая фармакопейная статья

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова А.Г. Морфолого-анатомическое исследование якорцев стелющихся травы/ А.Г.Анисимова, О.Л. Блинова, В.Д.Белоногова, Абдулкарим Аффиф //Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. - №3 (25) 2019. – С. 26-35.
2. Ареалы лекарственных и родственных им растений СССР, (Атлас) / Под ред. В.М. Шмидта. – Л.: Изд. Ленинградский университет, 1983. – 208 с. Ил. – 1/7, библиогр. – 190 назв.
3. Арзамасцев, А.П. Экология и фармация / А.П. Арзамасцев, С.А. Листов // Фармация. – 1990. – № 4. – С. 1-4.
4. Артеменков, А.А. Использование адаптогенов в реабилитационной практике для коррекции дезадаптивных расстройств /А.А. Артеменков // Актуальные проблемы экологии и здоровья человека : сб. науч. тр. / Череповецкий гос. ун-т. – Череповец, 2016. - С. 81-87.
5. Атлас лекарственных растений России / В. Быков. - М.: ВИЛАР, 2006. – 376 с.
6. Аффиф, Абдулкарим Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве/ Аффиф Абдулкарим, Блинова О.Л., Гилева А.А, Белоногова В.Д., Турьшев А.Ю. // Фармация.– 2020.- Т. 69. – С. 18-23.
7. Аффиф, А. Определение основных групп биологически активных веществ якорцев стелющихся травы А. Аффиф, О.Л. Блинова, А.А. Гилева, В.Д. Белоногова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. – Пермь: ПГФА, 2019. - № 24. – С. 115 – 118.
8. Аффиф, Абдулкарим Башар Современные хроматографические методы определения стероидных сапонинов (обзор методик) / Аффиф Абдулкарим Башар // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. – Пермь: ПГФА, 2018. - № 21. – С. 190 – 191.

9. Аффуф, Абдулкарим Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве/ Аффуф Абдулкарим, Гилева А.А, Блинова О.Л., Белоногова В.Д., Турышев А.Ю.//Фармация.– 2020.- Т. 69. – С. 17-22.
- 10.Аффуф, Абдулкарим Фитохимическое исследование травы якорцев стелющихся / Абдулкарим Аффуф, Ю.Н. Карпенко, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, Е.И. Молохова, О.Л. Блинова, А.А. Гилева // Фармация и фармакология. №6 – 2019. – Т. VII. – С.346 – 355.
11. Байгалмаа, Д. Разработка технологии получения сухого экстракта из якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L) / Д. Байгалмаа, Д. Энхжаргал // Инновационные технологии в фармации: сб. науч. тр. – 2017. – С. 166-168.
- 12.Бобров Е. Г. Семейство *Zygophyllaceae*, род *Tribulus* / Флора СССР. Под ред. Б. К. Шишкина. - Москва: АН СССР, 1949. Т. 14. – с. 194-196.
- 13.Бочанцев, В.П. Заметка о *Tribulus macropterus* Voiss. / В.П. Бочанцев, И.А. Шретер // Новости систематики высших растений т. 18 – 1981. – С. 217-219.
- 14.Бубенчикова, В.Н. Аминокислотный и минеральный состав травы тимьяна блошиного (*Thymus pulegioides* L.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Научные ведомости БелГУ. – 2012. - Вып. 18/2. – Т. 7. – №10 (129). – С. 40-42.
- 15.Власенко, М.В. Влияние лекарственных растений на фитосанитарное состояние пастбищ северо-западного Прикаспия / М.В. Власенко // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. - №5 (43). – С. 199-203.
- 16.Вовк, А.Г. [и др.] Определитель высших растений Крыма / под общей редакцией Н. И. Рубцова. – Л.: Наука, 1972. – 504 с.
- 17.Временная фармакопейная статья 42-827-79. *Herba Tribuli terrestris* - Трава якорцев стелющихся.

- 18.Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук.- Новосибирск: Наука, 1990.- С. 191-198.
- 19.Гиниятуллин, Р. Х. Содержание металлов у лиственницы Сукачева в условиях промышленного загрязнения/ Р.Х. Гиниятуллин, А.А Боталов, А.Ю. Кулагин// Экология. – 1999. – № 1. – С. 26-29.
- 20.Гладчук, Е.А. Роль препарата Трибестан в комплексном лечении эректильной дисфункции у пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы и хроническими обструктивными заболеваниями легких / Е.А. Гладчук, Р.А. Грачёв, П.И. Степанов // Здоровье мужчины. – 2012. - №2. – С. 109 -113.
- 21.Горпинченко, И.И. Исследование эффективности препарата Трибестан в лечении больных эректильной дисфункцией / И.И. Горпинченко, Ю.Н. Гурженко // Здоровье мужчины. – 2008. – № 3. – С. 1–6.
- 22.Горпинченко, И.И. Применение препарата Трибестан в андрологической практике / И.И. Горпинченко, Ю.Н. Гурженко // Здоровье мужчины. – 2010. – № 1. – С. 28-32.
- 23.Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>
- 24.Гречухин, А.И. Биологически активные вещества травы якорцев стелющихся (*tribulus terrestris* l.), произрастающей на территории Астраханской области / А.И. Гречухин, Ю.В. Шур, М.И. Гречухина, И.И. Мулляминова, Е.С. Ласый // Фармацевтические науки: от теории к практике: сб. науч. тр / Астраханский ГМУ. – Астрахань, 2016. – С. 117-119.
- 25.Гречухина, М.И. Изучение фитохимического состава травы Якорцев стелющихся (*Tribulus Terrestris* L.) / М.И. Гречухина, И.И. Мулляминова, Ю.В. Шур, А.И. Гречухин // Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития : сб. науч. тр. – 2016. – С. 460-463.

26. Гречухина, М.И. Биологически активные вещества травы якорцев стелющихся (*Tribulus Terrestris* L.) / М.И. Гречухина, М.Д. Дибирова // Сб. мат. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. – 2016. – С. 83 – 88.
27. Гринкевич, Н.И. Фармакогнозия: Атлас: учебное пособие / Н.И. Гринкевич, Е. Я. Ладыгиной. - М.: Медицина, 1989.
28. Гроссгейм, А.А. Определитель растений Кавказа / А.А. Гроссгейм – М.: Советская наука, 1949. — 376 с.
29. Доброчаева, Д.Н. Определитель высших растений Украины / Д.Н. Доброчева М.И. Котов, Ю.Н. Прокудин [и др.] – Киев: изд. Наук. думка, 1987. – 548 с.
30. Зайцев, Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г.Н. Зайцев. – М.: Наука, 1984. – 434с.
31. Иванова, Н.Л. Изучение анатомо-диагностических признаков сырья «Трава якорцев стелющихся» / Н.Л. Иванова // День фармацевтического факультета ВОЛГГМУ-2016 : сб. науч. тр. - Волгоград, 2016. Вып. 3. – с. 134-137
32. Ильинских, Е.Н. Эпидемиологическая генотоксикология тяжелых металлов и здоровье человека / Е. Н. Ильинских, Л. М. Огородова, П. А. Безруких и др. — Томск: СГМУ, 2003. — 300 с.
33. Искендеров, Г.Б., Изучение стероидных гликозидов якорцев стелющихся, произрастающих в Азербайджане / Г.Б. Искендеров, К.Ф. Гусейнгулиева // Химия растительного сырья. – 2016. – №2. – С. 47–52.
34. Кемертелидзе, Э.П. [и др.] / Э.П. Кемертелидзе [и др.] // Новый антисклеротический препарат Трибуспонин // Новые лекарственные препараты. М.: Медицина, 1981. – С. 119 – 122.
35. Качухашвили, Т.Н. Диосгенин из якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.), произрастающих в Грузии / Т.Н. Качухашвили // Медицинская промышленность СССР. - 1965. - №3. – С . 46–48.

36. Клышев, Л.К. Флавоноиды растений / Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 220 с.
37. Кожин, А.А. Микроэлементозы в патологии человека экологической этиологии / А.А. Кожин, Владимирский Б.М. // Экология человека. - 2013. – с. 56-63.
38. Кононова, С.В. Фармакологические и клинико-экономические аспекты применения лекарственных препаратов железа / С.В. Кононова, [и др.] // Медицинский альманах. - 2010. - №3. - С. 197-201.
39. Копылова, Л.В. Аккумуляция железа и марганца в листьях древесных растений в техногенных районах Забайкальского края // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2010. - т. 12, №1(3). - С. 709-712.
40. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Уч. для студентов фармацевтических вузов / В.А. Куркин – Самара: ООО «ОФОРТ», ГОУВПО «СамГМУ», 2004. – 1180с.
41. Лавренов, В.К. 500 важнейших лекарственных раст./ В.К.Лавренов, Г.В. Лавренова. – М.: ООО «Издательство АСТ». Донецк: «Сталкер», 2003. – 510 с. : 16л ил.
42. Лекарственные растения Государственной фармакопеи / под ред. И.Л. Самылиной, В.А. Северцева. - М.: АНСИ, 2001. - С. 364 – 367.
43. Листов, С.А. О содержании тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье / С.А. Листов, Н.В. Петров, А.П. Арзамасцев // Фармация. – 1990. – №2. – С. 19-25.
44. Ловкова, М.Я. О возможности использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний / М.Я. Ловкова, Г.Н. Бузук, С. Соколова, Л.Н. Дервяго // Микроэлементы в медицине. – 2005. – Т. 6, № 4. – С. 3-9.
45. Лукманова, К.А. Аминокислотный и минеральный состав фитопрепарата люцерон / К.А. Лукманова, В.А. Рябчук, Н.Х. Салихова // Фармация. – 2000. – №1. – С. 25-27.

- 46.Маевский, П.Ф. Флора средней полосы Европейской части СССР/ Под общ. ред. Б.К. Шишкина. - 9-е издание – Л.: Колос, 1964. - 880 с.
- 47.Мазнев, Н. И. Энциклопедия лекарственных растений / Н.И. Мазнев. - 3-е изд., испр. и доп. – М.: Мартин, 2004.
- 48.Минаева, В.Г. Лекарственные растения Сибири / В.Г. Минаева. – 5-е изд., перераб. и доп. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – 431 с.
- 49.Молохова, Е.И. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования диосцина в экстракционных препаратах и *Tribulus terrestris* L. / Е.И. Молохова, Ю.Н. Карпенко, А. Аффуф // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием (13.12.2018 г.): Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки, посвященная 100-летию кафедр: фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармфармацевтической химии. – Пермь: ПГФА, 2018. - №22. – С. 158 – 161.
- 50.Мункуева, С.Д. Пути использования водно-спиртовых экстрактов пищевых растений Забайкалья / С.Д. Мункуева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. - №6 (104). – С. 100-103.
- 51.Муравьева, Д.А. [и др.] Исследование микроэлементного состава объектов растительного происхождения / Д.А. Муравьева, С.Н. Пушкарский, А.А. Круглая [и др.] // Достижения современной фармацевтической науки и образования – практическому здравоохранению: сб. науч.тр. – Пермь, 1997. – 224 с.
- 52.Ноздрюхина, Л.Р. Нарушение микроэлементного состава и пути его коррекции/ Л.Р. Ноздрюхина, Н.И. Гринкевич. – М.: Медицина, 1980. – 278с.
- 53.Носов, А.М., Лекарственные растения / А.М. Носов. – М.: ЭКСМО – Пресс 2001. – 350с.: ил.

54. Определитель растений Средней Азии/ Т.А. Адылов [и др.] – том 7. – Ташкент: «Фан» УзССР, 1983. – 416 с.
55. Определение содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье / И.В. Гравель, Н.В. Петров, И.А. Самылина И.А. [и др.] // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 3-5.
56. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. [Электронное издание] Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=zz
57. ОФС.1.2.2.2.0013.15 Зола общая [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/984/index.html#zoom=z
58. ОФС.1.5.3.0005.15 Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/541/index.html
59. ОФС.1.5.3.0007.15 Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/547/index.html#zoom=z.
60. ОФС.1.5.3.0004.15 Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/535/index.html#zoom=z
61. ОФС.1.5.3.0006.15 Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных

- препаратах [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0006-15-Opredelenie-soderzhaniya-ekstraktivnyh-veshhestv-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatah/>
- 62.ОФС.1.5.3.0009.15.Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. –14издание. – Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/555/index.html
- 63.ОФС.1.1.0005.15 Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0005-15-otbor-prob-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatov/>
64. ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/289/index.html#zoom=z.
65. ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/752/index.html#zoom=z.
- 66.ОФС.1.5.1.0002.15 Травы [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#2/z
- 67.ОФС.1.5.1.0003.15 Листья [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-1-0003-15-listya/>.

- 68.ОФС.1.5.1.0004.15 Цветки [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-1-0004-15-tsvetki/>.
- 69.ОФС.1.5.1.0007.15 Плоды [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-1-0007-15-plody/>.
- 70.ОФС.1.5.3.0003.15 Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0003-15-tehnika-mikroskopicheskogo-i-mikrohimicheskogo-issledovaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatov/>.
- 71.ОФС.1.1.0011.15 Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/271/index.html
- 72.Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: Исп. в народной медицине и быту: Мет. пособие. / Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков. – СПб.: ДЕАН 1998. – 384 с., с ил.
- 73.Перепелица, Э.Д. Химическое изучение стероидных гликозидов *Tribulus terrestris* / Э.Д. Перепелица, П.К. Кинтя // Химия природных соединений. – 1975. - №2. – С. 260–261.
- 74.Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae – Ariaceae / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – С. 102 – 105.

- 75.Самылина, И.А. Атлас лек. растений и сырья: Учебное пособие по фармакогнозии / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – Москва: Авторская академия; Товарищество научн. изданий КМК, 2008. – 318 с.
- 76.Сиренко, Ю.Н. Применение экстракта якорцев стелющихся в комплексном лечении кардиологических пациентов / Ю.Н. Сиренко // Здоров'я України. – Червень 2008. – № 11/1 (Тематичний). – С. 96.
- 77.Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лек. Растениям / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: Медицина, 1984. – 464 с.
- 78.Ставрианиди, А.Н. Применение метода количественного анализа многокомпонентной системы для хроматомасс-спектрометрического определения диосгенина, диосцина и протодиосцина в экстрактах из травы *tribulus terrestris* / А.Н. Ставрианиди [и др.] // Вестник Московского университета. – 2017 . - № 3.Т. 58. – С. 144-153.
- 79.Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и Вьетнама / А.Д. Турова [и др.]. – М.: Медицина, 1997. – 464 с.: ил.
- 80.Умарова, Г.К. Липиды травы якорцев стелющихся, произрастающих в Узбекистане / Г.К. Умарова // Фармация. – 2015. - №6. – С. 19 – 21.
81. ФС.2.5.0015.15 Зверобоя трава [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/892/index.html#zoom=z.
- 82.Халиуллина, С.В. Клиническое значение дефицита цинка в организме ребенка // Вестник современной клинической медицины. - 2013. - Т. 6. Вып. 3. - С. 72-78.
- 83.Ханды, М.Т. Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. - продуцента стероидных гликозидов / М.Т. Ханды [и др.] // Биотехнология. – 2016. - № 4. Т. 32 -С. 21-30.
- 84.Химический анализ биологически активных веществ лекарственного растительного сырья и продуктов животного происхождения: учеб.

- пособие / М.Д. Решетникова, В.Ф. Левинова, А.В. Хлебников и др.; под ред. Г.И. Олешко, 2-е изд. – Пермь. – 2006. 335 с.
85. Химический анализ лекарственных растений / под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высш. шк., 1983. – 175с.
86. Хорлякова, О.В. Современные фитопрепараты для нормализации / регулирования нарушения липидного обмена на фармацевтическом рынке России / В.А. Лазаренко, И.Л. Дроздовой, И.В. Зубковой, О.О. Куриловой // Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития : сб. науч. тр. – Казань, 2016. - С. 295-299.
87. Худенко, П.Е. Флавоноиды в траве якорцев стелющихся / П.Е. Худенко [и др.] // Фармация и фармакология. – 2015. - № 2 (9). – С. 18-23.
88. Худенко, П.Е. Фармакогностическое исследование травы *Tribulus terrestris* L. / П.Е. Худенко, Н.С. Терешина, С.Л. Морохина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2016. - № 2 (12). - С. 45-58.
89. Худенко, П.Е. Химический состав и использование в медицине якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.) / П.Е. Худенко, Н.С. Терешина, С.Л. Морохина // Сборник научн. Трудов третьей научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые и фармация XXI века». – 2015. – С. 416 – 420.
90. Худенко, П.Е. Определение флавоноидов в траве якорцев стелющихся методом ВЭЖХ / П.Е. Худенко, Н.С. Терешина, С.Л. Морохина // Фармация. – 2016. Т.65. - № 5. - С. 19-22.
91. Шестакова, Т.С. Элементный состав травы и экстракционных препаратов очанки / Т.С. Шестакова, В.М. Петриченко, Т.В. Сухинина // Химико-фармацевтический журнал – 2008, № 8. – С. 20-22.
92. Ширшова, Т.И. Содержание макро- и микроэлементов в листьях и плодах некоторых видов рода *Berberis* (Berberidaceae) / Т.И. Ширшова, Л.А. Скупченко // Растительные ресурсы. – 2011. – Т.47, вып.2. – С.123-129.

93. Шретер, И.А. Новое лекарственное растение — якорцы стелющиеся *Tribulus terrestris* L. (распространение, ресурсы, перспективы дальнейшего изучения): автореферат диссертации. – 1986. – 18 с.
94. Элементный состав *Pentaphylloides friticosa* (L.) O. Schwarz, произрастающего в горном Алтае/ Е.П. Храмова, К.П. Куценогий, Н.М. Шкель [и др.] // Растительные ресурсы. – 2000. – Вып. 4. – С. 59-67.
95. Эсау, К. Анатомия растений / К. Эсау. – М.: Изд. «Мир», 1996. – 585с.
96. Яковлев, Г.П. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия / Г.П. Яковлев - Санкт-Петербург: СпецЛит, 2006. – 847 с.
97. A study *Aerva lanata* (L) Juss. and *Tribulus terrestris* L. [Электронный ресурс] // Shodhganga. - Режим доступа: <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/simple-search>
98. Adaikan, G.P. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*/ G.P. Adaikan, K. Gauthaman, N.V. Prasad // The aging male. – 2009. – P. 163-169. <https://doi.org/10.1080/tam.4.3.163.169>.
99. Affouf Abdulkarim Research on comprehensive quality assessment of *tribulus terrestris* grass/ Abdulkarim Affouf, Olga Leonidovna Blinova, Valentina Dmitrievna Belonogova //International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”. - September 14, 2019. Beijing, PRC. – P. 136-139.
100. Anant Gopal Singh An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Terai forest of western Nepal / Anant Gopal Singh, Akhilesh Kumar, Divya Darshan Tewari. // Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. — 2012. — V.8. — P. 19. DOI:10.1186/1746-4269-8-19.
101. Ashwani Kumar. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in North Indian population of *Tribulus terrestris* Linn, by HPLC / Ashwani Kumar // International Journal of Pharma and Bio Sciences. – 2012. Oct, 3(4). – P. 69 – 79.

102. Akhtari, E. Tribulus terrestris for treatment of sexual dysfunction in women: randomized double-blind placebo - controlled study/ E. Akhtari, F. Raisi, M. Keshavarz, H. Hosseini, F. Sohrabvand // Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences. — 2014. — V. 22. — P. 40. DOI:10.1186/2008-2231-22-40
103. Chhatre, S. Phytopharmacological overview of Tribulus terrestris/ S. Chhatre, T. Nesari, G. Somani, D. Kanchan, S. Sathaye // Pharmacognosy Reviews. — 2014. — V. 8. - №15. — P. 45–51. DOI:10.4103/0973-7847.125530.
104. Dincher D. Distribution of steroidal saponins in Tribulus terrestris from different geographical regions / D. Dincher, B. Janda, L. Evstatieva, W. Oleszek, M.R. Aslani, I. Kostova // Phytochemistry. – 2008. - №69. – P. 176 – 186. [https://DOI:10.1016/j.phytochem.2007.07.003](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.003).
105. Dragomir Dincher Distribution of steroidal saponins in Tribulus terrestris from different geographical regions / Dragomir Dincher, Bogdan Janda, Liuba Evstatieva, Wieslaw Oleszek, Mohammad R. Aslani, Ivanka Kostova // Phytochemistry. – 2008. - №69. – P. 176 – 186.
106. Farooq, Azam A review on advancements in ethnomedicine and phytochemistry of Tribulus terrestris - a plant with multiple health benefits / Azam Farooq, Munier Samia, Batoor Maliha, Ahmad Bashir, Abbas Ghazanfar // International Journal of Biosciences. – 2019. - Vol. 14. - №1. - p. 21-37
107. Firas A. Al-Bayati and Hassan F. Al-Mola. Antibacterial and antifungal activities of different parts of Tribulus terrestris L. growing in Iraq / Firas A. Al-Bayati and Hassan F. Al-Mola // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2008. – Feb. - №9 (2). – P. 154 – 159.
108. Ghareeb, D.A. In vitro screening for anti-acetylcholinesterase, anti-oxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants/ Ghareeb D.A., Amani M. D. ElAhwany, Sherif M. El-Mallawany, Ashraf A. Saif // Biotechnology, Biotechnological Equipment. — 2014. — V. 28. - №6. — P. 1155–1164. DOI:10.1080/13102818.2014.969877

109. Ghulam, H. Status of zinc in pulmonary tuberculosis / H. Ghulam, S.M. Kadri, A. Manzoor et al. // *J. Infect. Dev. Ctries.* - 2009. - Vol. 3(5). - P. 365-368.
110. Gheorghiu A., Ionescu-Matiu E. Presence of chlorogenin beside the diosgenin and gitogenin in *Tribulus terrestris* L. / A. Gheorghiu, E. Ionescu-Matiu // *Ann. pharm.* - 1968. - Vol. 26. - P. 745-748.
111. Hameeda Bibi, Muhammad Afzal, Mustafa Kamal et al. Morphological and Anatomical Characteristics of Selected Dicot Xerophytes of District Karak, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan / Bibi Hameeda, Afzal Muhammad [et al.] // *Middle-East Journal of Scientific Research.* - 2015. - vol. 23 (4). - P. 545-557
112. Hatil Hashim Elkamali, Ahlam Salih Eltahir, Ibrahim Saeed Yousif et al. Comparative Anatomical Study of the Stems and Leaflets of *Tribulus longipetalous*, *T. pentandrus* and *T. terrestris* (Zygophyllaceae) / Hatil Hashim Elkamali, Ahlam Salih Eltahir, Ibrahim Saeed Yousif [et al.] // *Open Access Library Journal.* - 2016. - vol. 3.
113. IHerb [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://ru.iherb.com/c/rsp-nutrition>
114. Ivanka Semerdjieva, Elina Yankova-Tsvetkova, Georgi Baldjiev & Petka Yurukova-Grancharova. Pollen and Seed Morphology of *Tribulus Terrestris* L. (Zygophyllaceae) / Ivanka Semerdjieva, Elina Yankova-Tsvetkova [et al.] // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* - 2011. - Volume 25. - p. 2379- 2382.
115. Japanese Pharmacopoeia 15th Edition. - P.1369.
116. Jayanthi A, Deepak M, A. B. Remashree. Pharmacognostic characterization and comparison of fruits of *Tribulus terrestris* L. and *Pedalium murex* L. / A. Jayanthi, M. Deepak, A. B. Remashree // *International Journal of Herbal Medicine.* - 2013. - vol. 1 (4). - P. 29 - 34.
117. Jun-Dong Zhang In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens/ Jun-Dong Zhang, Yong-Bing Cao, Zheng Xu, Hui-

- Hua Sun, Mao-Mao An. // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. — 2005. — V. 28. - №12. — P. 2211–2215.
118. Kevalia, J. Identification of fruits of *Tribulus terrestris* Linn. and *Pedalium murex* Linn.: A pharmacognostical approach / J. Kevalia, B. Patel // *Ayu*. — 2011. — V. 32 - №4. — C. 550–553. DOI:10.4103/0974-8520.96132.
119. Khaleghi, S. *Tribulus terrestris* Extract Improves Human Sperm Parameters In Vitro / S. Khaleghi, M. Bakhtiari, A. Asadmobini, F. Esmaili // *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. — 2016. — P. 2-5. DOI:10.1177/2156587216668110
120. Kock W.T., Enslin P.R. Chemical investigations of photosensitisation diseases of domestic animals. Part I. Isolation and characterisation of steroidal sapogenins from *Tribulus terrestris* / W.T. Kock, P.R. Enslin // *J. S. Afr. Chem. Inst.* – 1958. – Vol. 11, N1. – P. 33–36.
121. Mamdouh, N. Samy Pharmacognostical Studies on Flower of *Tribulus terrestris* L / N. Samy Mamdouh, M. Bishr Mokhtar, A. Ahmed Ahmed, M. Sayed Hanaa and S. Kamel Mohamed // *Journal of pharmacognosy and phytochemistry zdb.* - 2013. – Vol. 1, Issue 5 – P.18-22.
122. Mahmoud, Bahmani Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones/ Bahmani Mahmoud, Baharvand-Ahmadi Babak, Tajeddini Pegah, Rafieian-Kopaei Mahmoud, Naghdi Nasrollah // *Journal of Renal Injury Prevention*. — 2016. — V. 5. - №. 3. — P. 129–133. DOI:10.15171/jrip.2016.27.
123. Mamdouh N. Samy, Mokhtar M. Bishr, Ahmed A. Ahmed, Hanaa M. Sayed and Mohamed S. Kamel. Pharmacognostical Studies on Flower of *Tribulus terrestris* L. / Mamdouh N. Samy, Mokhtar M. Bishr [et al.] // *Journal of pharmacognosy and phytochemistry zdb.* - 2013. – Vol. 1, Issue 5 – P.18-22.
124. Maja Shishovska, Zorica Arsova-Sarafinovska and Shaban Memeti. A Simple Method for Determination of Protodioscin in *Tribulus terrestris* L. and Pharmaceuticals by High-Performance Liquid Chromatography Using Diode-

- Array Detection / Maja Shishovska, Zorica Arsova-Sarafinovska and Shaban Memeti // Journal of Chemical Engineering Research Updates, 2015,2, P.12-21.
125. Nasrin Babadai Samani Efficacy of Tribulus Terrestris Extract on the Serum Glucose and Lipids of Women with Diabetes Mellitus/ Nasrin Babadai Samani, Azam Jokar, Mahmood Soveid, Mojtaba Heydari, Seyed Hamdollah Mosavat // Iranian Journal of Medical Sciences. — 2016. — V. 41. №. 3. — P. 5.
126. Nature's Sunshine Independent Distributor [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://nspworld.org/bad/bosveliya-plyus.html>
127. Noori M. Tribulus Terrestris L. (Zygophyllaceae) Flavonoid Compounds / M. Noori, M.M. Dehshiri, M. R. Zolfaghari // International Journal of Modern Botany. – 2012. - №2. – P. 35-39. <https://doi.org/10.5923/j.ijmb.20120203.01>.
128. Nikolova A., Vassilev A. A Study on Tribulus Terrestris L. Anatomy and Ecological Adaptation - Tribulus Terrestris L. / A. Nikolova, A. Vassilev // Biotechnology & Biotechnological Equipment. - 2011. - Volume 25. – P.2369-2372
129. Pınar Ercan Inhibitory effects of chickpea and Tribulus terrestris on lipase, α -amylase and α -glucosidase / Pınar Ercan, Sedef Nehir El. // Food Chemistry. —2016. — V.205. — C.163–169. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.03.012
130. Roaiah M.F, Pilot Study on the Effect of Botanical Medicine (Tribulus terrestris) on Serum Testosterone Level and Erectile Function in Aging Males With Partial Androgen Deficiency (PADAM)/ Roaiah M.F., El Khayat Y.I., El Din S.F. , Abd El Salam M.A. // Journal of Sex & Marital Therapy. — 2015. — P. 1—5. DOI:10.1080/0092623X.2015.1033579
131. Saman Soleimanpour Antibacterial activity of Tribulus terrestris and its synergistic effect with Capsella bursa-pastoris and Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in-vitro study/ Saman Soleimanpour, Fereshteh Sadat Sedighinia, Akbar Safipour Afshar, Reza Zarif, Kiarash Ghazvini. // Avicenna Journal of Phytomedicine. — 2017. — V. 5. №3. — S. 210–217.

132. Salgado, R. M. Effect of oral administration of Tribulus terrestris extract on semen quality and body fat index of infertile men / R.M. Salgado, M.H. Marques-Silva, E. Gonçalves, A.C. Mathias, J.G. Aguiar // *Andrologia*. — 2016. DOI:10.1111/and.12655
133. Shahid, M. Phytopharmacology of Tribulus terrestris / M. Shahid, M. Riz, M.M.A. Talpur, T. Pirzada // *Journal of biological regulators homeostatic agents*. – V. 30. - №3. – P. 785-788.
134. Shamsou Eman, Rabei Sami, Hamdy Rim. Identifications keys and numerical studies of Zygophyllaceae (S. Str.) and allied families in Egypt / Rabei Sami // *Assiut Univ. J. of Botany*. – 2013. – 42 (2). – P. 79-106.
135. Shishovska, M. A Simple Method for Determination of Protodioscin in Tribulus terrestris L. and Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography Using Diode-Array Detection / M. Shishovska, Z. Arsova-Sarafinovska, S. Memeti // *Journal of Chemical Engineering Research Updates*. - 2015. – V.2. - P.12-21.
136. Shoeib Nagwa, Temraz Abeer, Hassan Madiha. Macroscopic and microscopic characterization of the aerial parts of Tribulus Alatus (Zygophyllaceae) growing in Egypt / Shoeib Nagwa, Temraz Abeer, Hassan Madiha // *International research journal of Pharmacy*. – 2013. – vol. 4 (12). – P. 88-92.
137. Suresh Reddy Yanala, D. Sathyanarayana. Powder microscopic studies of the fruits of Tribulus terrestris Linn collected from different geographical locations of south India—a comparative STUDY / Suresh Reddy Yanala, D. Sathyanarayana // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol 9, Issue 1. – P. 158 – 164.
138. Suresh Reddy Yanala, D. Sathyanarayana, K. Kannan. A Recent Phytochemical Review – Fruits of Tribulus terrestris Linn / Suresh Reddy Yanala, D. Sathyanarayana, K. Kannan // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2016. – Vol. 8 (3). – P. 132 – 140.

139. Shweta, Mathur Production, Isolation and Estimation of Maytenus Emarginata flavonoids in vivo and in vitro / Mathur Shweta, Goswami Asha // International Journal of Science and Research (IJSR). – may, 2014. – P.339 – 342.
140. Tomova M.P., Panova D., Vulfson N.S. Steroid saponins and sapogenins IV. Saponines from Tribulus terrestris / Tomova M.P., Panova D., Vulfson N.S. // Planta Med. – 1974. – Vol. 25, N3. – P. 231–237.
141. Xue-Mei Liu Effects of Tribulus terrestris L. saponion on apoptosis of cortical neurons induced by hypoxia-reoxygenation in rats/ Xue-Mei Liu, Qi-Fu Huang, Yun-Ling Zhang, Jin-Li Lou, Hong-Sheng Liu. // Journal of Chinese Integrative Medicine. — 2008. — V. 6. - №1. — P. 45–50.
142. Wei Sun A triterpene saponin from Tribulus terrestris attenuates apoptosis in cardiocyte via activating PKC signalling transduction pathway/ Wei Sun, Hong Li, Shi-Jie Yang. // Journal of Asian Natural Products Research. — 2017. — V. 10. - №1-2. — S. 39–48. DOI:10.1080/10286020701275846
143. Wenyi Zhu. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of Tribulus terrestris/ Zhu. Wenyi, Du. Yijie, Meng. Hong, Dong. Yinmao, Li Li. // Chemistry Central Journal. – 2017. – №11. – P. 1-16. [https:// doi 10.1186/s13065-017-0289-x](https://doi.org/10.1186/s13065-017-0289-x).
144. William L. Halvorson. Factsheet for Tribulus terrestris L. / William L. Halvorson // Southwest Biological Science Center Sonoran Desert Field Station University of Arizona. – 2003. – 29 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А.

Проекты нормативной документации

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

«Утверждаю»

Ф.И.О.

« ____ » _____ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Якорцев стелющихся трава

Tribuli terrestris herba
порошок.

ФС 42 – XXXXX –
цельная, измельчённая,

Срок введения установлен
с « ____ » _____ г.
Срок действия
до « ____ » _____ г.

Собранная в фазу цветения – плодоношения и высушенная трава с корнями дикорастущего однолетнего травянистого растения якорцев стелющихся – *Tribulus terrestris* L., сем. парнолистниковых – *Zygophyllaceae*.

Издание официальное
воспрещена

Перепечатка

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Якорцев стелющихся трава

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
<i>Внешние признаки</i>	Визуальный, органолептический	В соответствии с ФС
<i>Микроскопия</i>	Микроскопический	В соответствии с ФС
<i>Определение основных групп биологически активных веществ</i>	ТСХ	В соответствии с ФС
<i>Числовые показатели:</i>		
Фуростаноловых гликозидов	Дифференциальная спектрофотометрия	не менее 0,7 %
Суммы флавоноидов, в пересчете на рутин	Дифференциальная спектрофотометрия	не менее 1,0 %
Экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50%	ГФ XIV	не менее 16 %
Влажность	ГФ XIV	не более 13 %
Зола общая	ГФ XIV	не более 16 %
Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте	ГФ XIV	не более 1,5 %
<i>Измельченность:</i>		
<i>Цельное сырье</i> частиц, проходящих сквозь сито d =5 мм	ГФ XIV	не более 5 %
<i>Измельченное сырье</i> частиц, не проходящих сквозь сито d =7 мм	ГФ XIV	не более 2 %
частиц, проходящих сквозь сито d =0,18 мм	ГФ XIV	не более 5 %

1	2	3
<i>Порошок</i>		
частиц, не проходящих сквозь сито d =2 мм	ГФ XIV	не более 5 %
частиц, проходящих сквозь сито d =0,18 мм	ГФ XIV	не более 5 %
Посторонние примеси:		
Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее)	ГФ XIV	не более 1 %
Органическая примесь	ГФ XIV	не более 1 %
Минеральная примесь	ГФ XIV	не более 1 %
Тяжелые металлы	ГФ XIV	В соответствии с ОФС.1.5.3.0009.15
Радионуклиды	ГФ XIV	В соответствии с ОФС.1.5.3.0001.15
Остаточные количества пестицидов	ГФ XIV	В соответствии с ОФС.1.5.3.0011.15
Микробиологическая чистота	ГФ XIV	В соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18
Упаковка, маркировка и транспортирование	ГФ XIV	В соответствии с ОФС.1.1.0019.15
Хранение	ГФ XIV	В соответствии с ОФС.1.1.0011.15
Срок годности	5 лет	
Фармакологическая группа	Андрологическое средство, гипохолестеринэмическое средство	

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Смесь цельных, или частично измельченных стеблей, листьев, цветков, плодов и корней. Стебли длиной 10 – 120 см. Листья парно – перистосложные, длиной 3 – 8 см с 6 – 8 парами мелких продолговатых (ланцетных) листочков. Листочки продолговатые, с цельным краем, длиной от 5,60 до 9,60 мм, шириной от 2,00 до 4,90 мм зеленого цвета с верхней стороны, с нижней – беловато – зеленые, опушенные большей частью с нижней стороны. Цветки немногочисленные, мелкие, одиночные, правильные, желтые, на коротких, вверх стоящих цветоножках, диаметром 1 – 1,2 см, расположены в пазухах листьев. Околоцветник, легко опадающий пятичленный, чашечка состоит из 5 яйцевидно-ланцетных, длинно заостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков длиной 4 – 5 мм, шириной 1 – 1,3 мм. Лепестков венчика 5, они обратнойцевидной формы, длиной 5 – 7 мм, шириной около 3 мм, тычинок 10 штук. Плоды – ценокарпные, сухие, дробные, распадаются при созревании на 5 звездчато расположенных угловатых плодиков (мерикарпиев). Плодики трехгранноклиновидные, твердые, с наружной стороны бугорчатые, покрытые мелкими и крупными щетинистыми волосками, с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов соломенно-зеленого цвета диаметром от 9,0 до 16 мм. Корневая система стержневая с сетью волокнистых корней. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов и корней, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки стеблей и корней зеленовато – желтого цвета. Листочки сложного листа зеленого цвета с верхней стороны, с нижней – беловато-зеленые, опушенные большей частью с нижней стороны, цельные и в виде кусочков

различной формы; Цветки, немногочисленные, мелкие, часто измельчены. Цветки одиночные, правильные, желтые, лепестков венчика 5, они обратнойцевидной формы, чашечка состоит из 5 яйцевидно-ланцетных, длинно заостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков. Кусочки дробных, сухих плодов. Плодики трехгранноклиновидные, твердые, с наружной стороны бугорчатые, покрытые мелкими и крупными щетинистыми волосками, с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов; 2 верхних шипа более длинные, 2 нижних – короткие, светло-зеленого цвета. Цвет измельченного сырья желтовато - зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов и корней зеленовато – желтого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки листьев зеленовато - желтого цвета, кусочки сухих плодов с шипами. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки эпидермиса продолговатой, реже круглой формы, длиной 20,90 – 25,29 мкм, шириной 13,97 – 16,06 мкм, контур клеток слабоизвилистый, имеются утолщения в углах клеток. Устьица длиной 16,30 – 18,06 мкм, шириной 13,37 – 15,94 мкм, расположены с обеих сторон листа, больше их встречается на нижней стороне листа. Устьица окружены 3-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). По всей поверхности листа, с нижней и верхней стороны, расположены простые одноклеточные волоски разной длины (длинные, средние, короткие) и ширины. Длинные волоски длиной 790,80 – 890,53 мкм, шириной 18,27 – 19,87 мкм, средние волоски длиной 443,07 – 493,33 мкм, шириной 14,80 – 17,87 мкм, короткие волоски длиной 117,33 – 172,53 мкм, шириной 16,30 – 18,06 мкм. На верхушке листа преимущественно встречаются короткие волоски.

У места прикрепления волоска клетки эпидермы располагаются радиально, образуя розетку. В мезофилле листа встречаются кристаллы оксалата кальция – друзы, диаметром 21,31 – 23,68 мкм (рис.1).

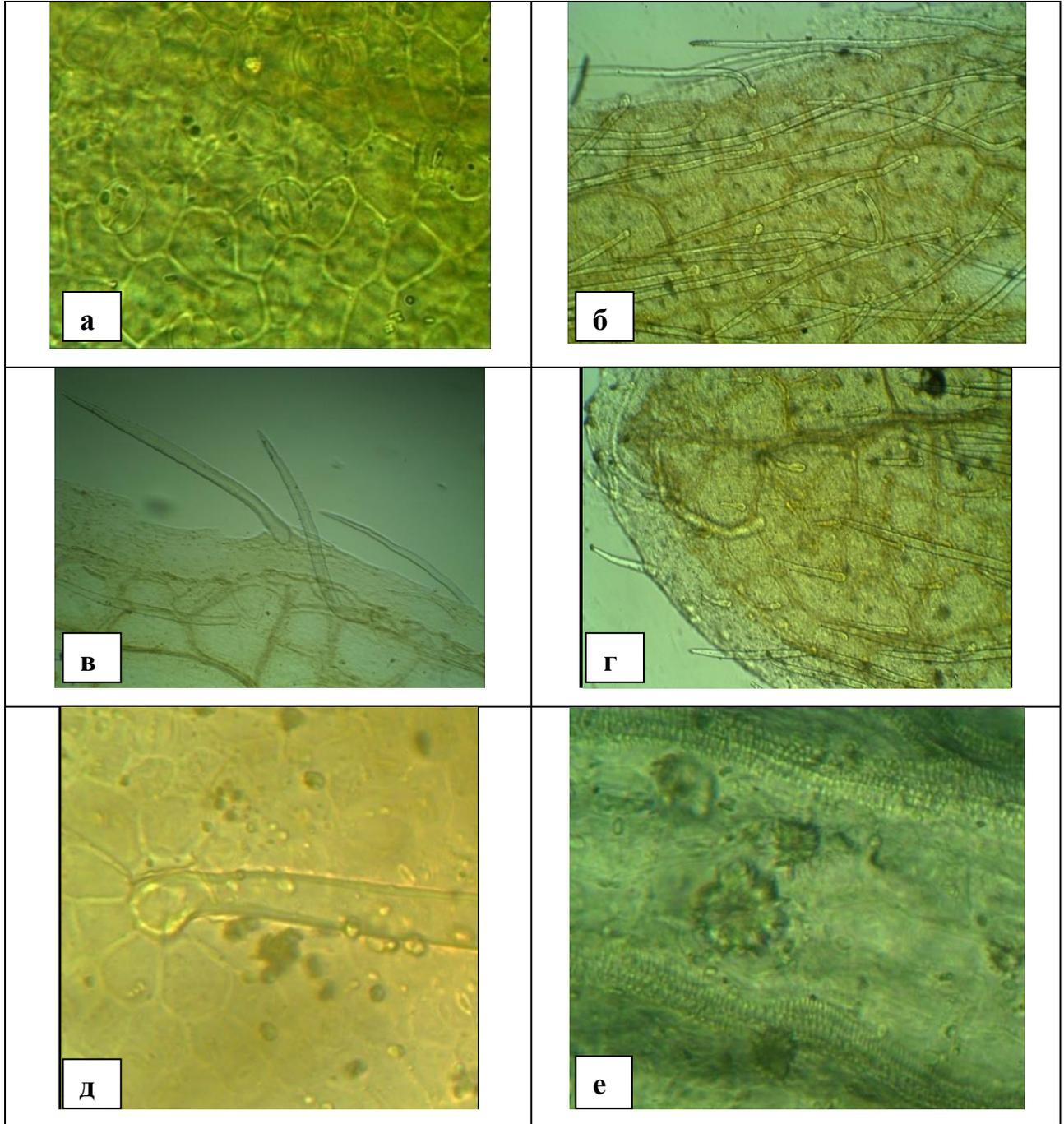


Рисунок 1 – Якорцев стелющихся трава (фрагменты препарата листа, 640х).

а – клетки эпидермиса, устьица аномоцитного типа, б – простые волоски по поверхности листа и по краю, в – простые волоски по краю листа, г – простые волоски на верхушке листа, д – место прикрепления волоска, е – друзы оксалата кальция.

На поперечном срезе стебля (рис.2), (радиус стебля 958,00 – 1430,00 мкм) видна покровная ткань – эпидермис, покрыт слоем кутикулы. Первичная кора состоит из 5 – 8 слоев паренхимы, толщиной 137,87 – 200,00 мкм. Перицикл состоит из 4 – 7 слоев клеток склеренхимы с небольшими межклетниками, толщиной 90,93 – 122,40 мкм. Проводящая система – непучкового строения, ксилема хорошо видна, толщиной 225,20 – 419,23 мкм. Сердцевина большая состоит из паренхимных клеток. В первичной коре и сердцевине возможно наличие друз оксалата кальция.

Клетки эпидермиса венчика многоугольные, изодиаметрические, длиной 30,27 – 34,75 мкм, шириной 15,40 – 19,00 мкм. Эпидермис чашелистиков состоит из клеток со слегка волнистыми стенками, покрытых гладкой кутикулой. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Устьица длиной 18,83 – 23,67 мкм, шириной 13,97 – 17,00 мкм. Одноклеточные волоски разной длины (длиной 202,53 – 481,04, шириной 9,47 – 17,33 мкм) расположены по поверхности чашелистика и по его краю. Друзы диаметром 14,00 -19,25 мкм встречаются и в лепестках и в чашелистиках. В препаратах цветков присутствует пыльца сферической формы диаметром 38,50 – 47,30 мкм (рис.3).

На поперечном срезе корня (радиус корня 995,33 – 1802,00 мкм) видна перидерма, толщиной 44,13 – 50,00 мкм. Во вторичной коре (толщина 319,47 – 517,33 мкм) клетки паренхимы прямоугольной формы с извилистым контуром. Проводящая система непучкового строения состоит из вторичной флоэмы,

камбия и более широкой зоны вторичной ксилемы (толщина ксилемы 520,53 – 1469 мкм). Кристаллы оксалата кальция – друзы, диаметром 22,67 – 24,20 мкм располагаются в корковой зоне корня (рис.4).

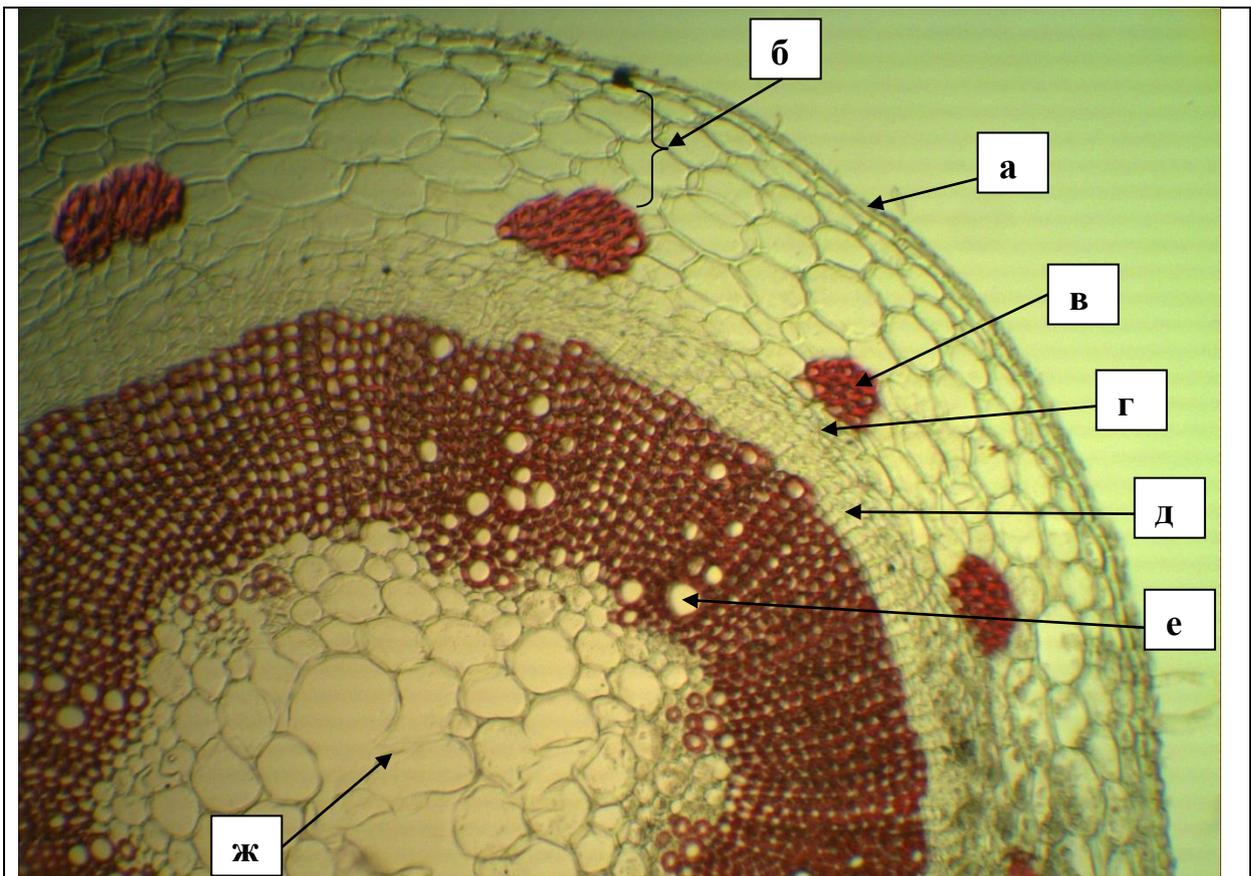


Рисунок 2 – Якорцев стелющихся трава (поперечный срез стебля, 640х).
 а – эпидермис, б – первичная кора, в – перицикл, г – флоэма, д – камбий,
 е – ксилема, ж – сердцевина.

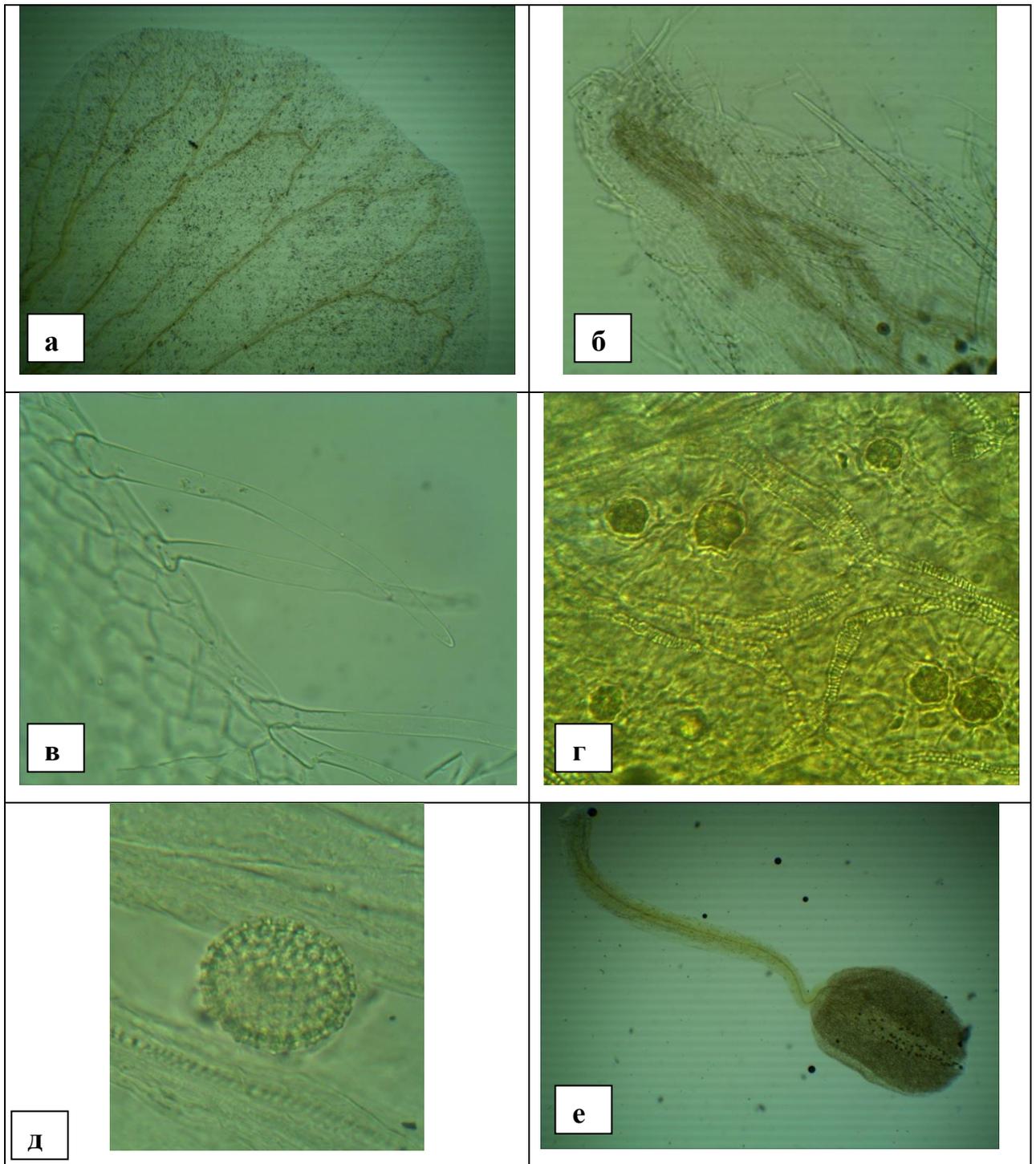


Рис. 3 – Якорцев стелющихся трава (фрагменты препарата цветка, 640х).

а – лепесток венчика, б – чашелистик с волосками по поверхности, в – чашелистик с волосками по краю, г – чашелистик с друзами, д – пыльца, е – тычинка с пыльцой.

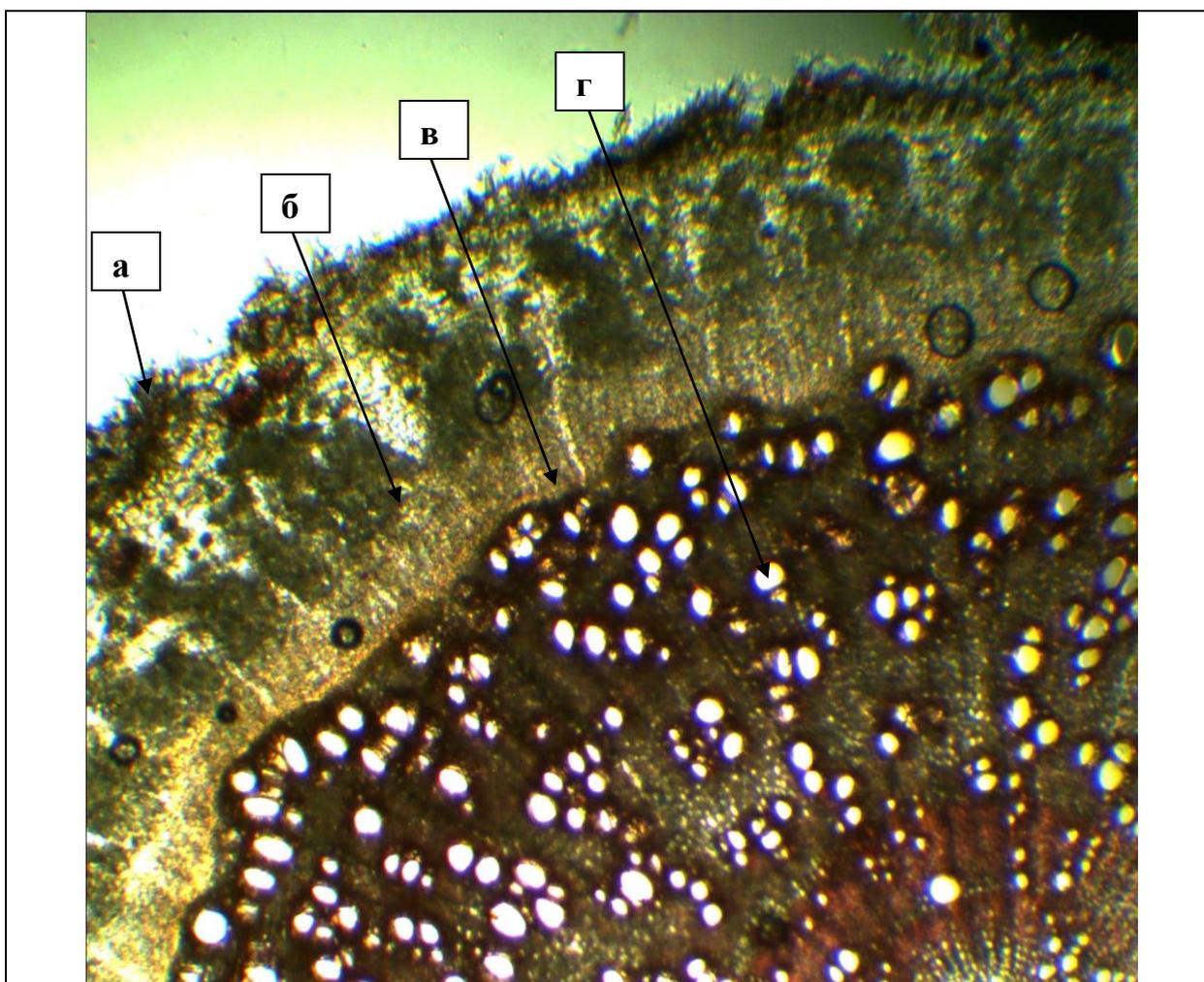


Рисунок 4 – Якорцев стелющихся трава (поперечный срез корня, 640х).
а – перидерма, б – вторичная флоэма, в – камбий, г – вторичная ксилема.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты эпидермиса листовой пластинки, чашечки и венчика. Клетки эпидермиса продолговатой, реже круглой формы, контур клеток слабоизвилистый, имеются утолщения в углах клеток. Устьица окружены 3 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Встречаются простые одноклеточные волоски разной длины. В препаратах цветков присутствует пыльца сферической формы. В мезофилле листа кристаллы оксалата кальция – друзы. Фрагменты эпидермиса стебля с прямыми стенками с трихомами разной длины. Фрагменты пробки корня бурого цвета, обрывки волокон, сетчатые сосуды (рис.5).



Рисунок 5 – Якорцев стелющихся трава (порошок)
фрагмент сетчатых сосудов, 640х.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. с 10 мл спирта 80%, фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

Хроматографируют в тонком слое сорбента в системе хлороформ – метанол – вода (61:32:7). После высушивания хроматограмму опрыскивают 1 % раствором пара-диметиламинобензальдегида в 4 моль/л метанольном растворе хлористоводородной кислоты и нагревают в сушильном шкафу при температуре 60 °С в течение 2 – 3 мин. Появляются четыре розовых пятна (фуростаноловые гликозиды).

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл спирта 80 %, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 мин, затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля размером 15x5 см наносят 0,2 мл испытуемого раствора и параллельно 0,1 мл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет

80-90% длины пластинки от линии старта ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей (под тягой при комнатной температуре). Затем хроматограмму обрабатывают алюминия хлорида раствором 2 % в 96% спирте, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают в УФ – свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться 1 зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне стандартного образца рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 16%.

Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1,5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 2%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5 %.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 1%.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1%.

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. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* фуростаноловых гликозидов – не менее 0,7 %; сумма флавоноидов, в пересчете на рутин – не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 % – не менее 16 %.

Фуростаноловые гликозиды

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл метилового спирта и вносят остеклованный перемешивающий стержень.

Колбу с содержимым взвешивают с точностью до 0,01 г, нагревают на водяной бане с магнитной мешалкой до кипения и кипятят в течение 1 часа. Затем охлаждают до комнатной температуры и взвешивают. Потерь в массе пополняют метиловым спиртом, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 10 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят до метки метиловым спиртом и тщательно перемешивают (раствор А). 5 мл раствора А переносят в стеклянную пробирку, прибавляют 5 мл 1 % раствора пара – диметиламинобензальдегида в 4н растворе хлористоводородной кислоты в метиловом спирте (раствор Б). Пробирку закрывают стеклянной пробкой, встряхивают и нагревают в течение 2 часов в ультротермостате при температуре $58 \pm 0,5$ °С. Раствор охлаждают водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность при длине волны 516 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл 4н раствора хлористоводородной кислоты в метиловом спирте, который также выдерживают в ультротермостате при $58 \pm 0,5$ °С. Содержание фураностаноловых гликозидов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \times 0,009401 \times 50 \times 10 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W) \times k}, \text{ где}$$

C – количество кобальта хлорида, найденного по калибровочному графику в граммах; 0,009401 – коэффициент пересчета концентрации кобальта хлорида на концентрацию фураностаноловых гликозидов; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах; k – поправочный коэффициент на титр хлористоводородной кислоты.

Построение калибровочного графика. Точную навеску 5,0000г кобальта хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, прибавляют 1 каплю концентрированной хлористоводородной кислоты и доводят объем до метки водой. В мерные колбы вместимостью 25 мл отбирают бюреткой по 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 и 15 мл исходного раствора и доводят объем раствора до метки водой. Полученные растворы содержат соответственно 5,10,15,20,25,30 мг кобальта хлорида в 1 мл. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. По результатам измерения оптической плотности растворов строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс содержание кобальта хлорида в граммах в 1 мл, на оси ординат – оптическую плотность раствора.

Примечание.

1 . Приготовление 4н раствора кислоты хлористоводородной. 340 мл концентрированной кислоты хлористоводородной (плотность 1,19) разбавляют метиловым спиртом до 1 л. *Установка титра.* 12 мл приготовленного раствора вносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора до метки метиловым спиртом и тщательно перемешивают (получают 0,5н раствор хлористоводородной кислоты в метиловом спирте). Далее поступают, как указано при установке титра 0,5 н раствора хлористоводородной кислоты.

2. Приготовление 1 % раствора пара-диметиламинобензальдегида. 5 г пара-диметиламинобензальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют около 200 мл 4 н раствора кислоты хлористоводородной в метиловом спирте и после растворения осадка объем доводят до метки 4н раствором кислоты хлористоводородной в метиловом спирте.

Сумма флавоноидов

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл 80 % спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр «Filtrak» в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. После охлаждения фильтр промывают 80 % спиртом, доводят объем извлечения до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл 2 % раствора алюминия хлорида в 96 % этаноле, 1 каплю раствора уксусной кислоты 5 % и доводят объем раствора до метки 96 % спиртом (раствор Б). Через 15 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю раствора уксусной кислоты 5 % и доводят объем раствора 96 % спиртом до метки.

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

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность (раствор Б) испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность (раствор Б) СО рутина;

a – навеска сырья в граммах;

a_0 – навеска СО рутина в граммах;

P – содержание основного вещества в СО рутина в %;

W – потеря в массе при высушивании в %.

Приготовление СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96 % спирта, охлаждают, доводят объем раствора тем

же спиртом до метки и перемешивают (раствор А) СО рутина.

2 мл (раствора А) СО рутина, 1 капля раствора уксусной кислоты 5 %, 5 мл алюминия хлорида раствора 2 % в 96 % спирте, помещают в мерную колбу, вместимостью 25 мл и доводят 96 % спиртом до метки (раствор Б) СО рутина.

Экстрактивные вещества

Определение экстрактивных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья 1 г, экстрагент – спирт 50 %).

Упаковка, маркировка и транспортирование.

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
канд. фарм. наук, доцент



А.Ю. Турьшев
«5» мая 2019 г

Зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
доктор фарм. наук, профессор

Вал В.Д. Белоногова
«5» мая 2019

Доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
кандидат фармацевтических наук

О.Л. Блинова
«5» мая 2019 г
О.Л.

Доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
кандидат фармацевтических наук

А.А. Гилева
«5» мая 2019 г
А.А.

Старший преподаватель кафедры фармакогнозии с
курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

А.Г. Анисимова
«5» мая 2019 г
А.Г.

Аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

Абдулкарим Аффиф
«5» мая 2019 г
Абдулкарим

ОБОСНОВАНИЕ СПЕЦИФИКАЦИИ

Проекта фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Якорцев стелющихся трава»

Проект фармакопейной статьи (ФС) «Якорцев стелющихся трава – *Tribuli terrestris herba*» разработан в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Используют собранную в фазу цветения – плодоношения и высушенную траву с корнями дикорастущего однолетнего травянистого растения якорцев стелющихся – *Tribulus terrestris* L., сем. Парнолистниковых – *Zygophyllaceae*.

Трава якорцев стелющихся содержит стероидные сапонины [10,28] и используется как андрологическое и гипохолестеринемическое средство [5,6,7,29], также содержит флавоноиды [28], которые обладают общетонизирующим, обезболивающим, противовоспалительным и мочегонным действием [2].

Проект ФС оформлен в соответствии с требованиями ГФ XIV, ОСТ 91500.05.001-00 и с учетом современной нормативной документации [9,11-26].

Образцы пяти партий якорцев стелющихся травы, упакованных в бумажные пакеты были заложены на хранение в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С для определения стабильности показателей качества и подтверждения срока годности в соответствии с ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ XIV, т. 1) [26]. Наблюдения велись методами визуального и аналитического контроля. На основании результатов, полученных контрольно-аналитической лабораторией, были подтверждены показатели качества лекарственного растительного сырья и срок годности, указанные в проекте ФС [27].

Описание производящего растения.

Однолетнее травянистое растение. Стебли длиной 10 – 120 см. Листья парно – перистосложные, длиной 3 – 8 см с 6 – 8 парами мелких продолговатых (ланцетных) листочков. Листочки продолговатые длиной от 5,60 до 9,60 мм, шириной от 2,00 до 4,90 мм, опушенные большей частью с нижней стороны. Цвет листочков с верхней стороны - зеленый, с нижней – беловато-зеленый. Цветки немногочисленные, мелкие, одиночные, правильные, желтые, на коротких, вверх стоящих цветоножках, диаметром 1 – 1,2 см, расположены в пазухах листьев. Околоцветник, легко опадающий пятичленный, чашечка состоит из 5 яйцевидно-ланцетных, длинно заостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков длиной 4 – 5 мм, шириной 1 – 1,3 мм. Лепестков венчика 5, они обратнойцевидной формы, длиной 5 – 7 мм, шириной около 3 мм, тычинок 10 штук. Плоды — ценокарпные, сухие, дробные, распадаются при созревании на 5 звездчато расположенных угловатых плодиков (мерикарпиев). Плодики трехгранноклиновидные, твердые, с наружной стороны бугорчатые, покрытые мелкими и крупными щетинистыми волосками, с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов соломенно-зеленого цвета диаметром от 9,0 до 16 мм. Корневая система стержневая с сетью волокнистых корней [4].

ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ И НОРМ

Проект фармакопейной статьи разработан на основании анализа 6 образцов якорцев стелющихся травы, собранных в Российской Федерации (Крым 2017 г, 2019 г и ботанический сад ВИЛАР 2016 г), в Республике Молдова 2017 г и Сирии 2018 г, 2019 г.

При разработке нормативной документации на лекарственное растительное сырье, важное значение имеют исследования, повышающие достоверность методов диагностики сырья.

Подлинность сырья определяли согласно требованиям Государственной фармакопеи XIV издания, ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [17] и ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» [24], ОФС.1.5.1.0003.15 «Листья» [15], ОФС.1.5.1.0004.15 «Цветки» [25] с использованием макроскопического метода анализа [23].

Для установления подлинности сырья изучали:

1. *Строение и размеры листовой пластинки*
2. *Форму листовой пластинки*
3. *Характер основания листовой пластинки*
4. *Характер края листа, наличие черешка, его размеры*
5. *Характер поверхности черешка*
6. *Опушение листа и черешка (обилие и расположение волосков)*
7. *Жилкование листа*
8. *Тип соцветия*
9. *Строение цветка (чашечки и венчика)*
10. *Форму поперечного сечения стебля*
11. *Характер поверхности стебля*

Цвет, запах, вкус сырья с использованием макроскопического метода анализа [24].

Проведенный макроскопический анализ образцов сырья якорцев стелющихся, позволил включить в раздел "Подлинность" следующие признаки для *цельного, измельченного и порошкованного сырья*:

Внешние признаки

Цельное сырье. Сырье исследуют невооруженным глазом с помощью лупы 10х в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья», статья «Травы» [24].

Смесь цельных, или частично измельченных стеблей, листьев, цветков, плодов и корней. Стебли длиной 10-120 см. Листья парно – перистосложные,

длиной 3 – 8 см с 6 – 8 парами мелких продолговатых (ланцетных) листочков. Листочки продолговатые, с цельным краем, длиной от 5,60 до 9,60 мм, шириной от 2,00 до 4,90 мм зеленого цвета с верхней стороны, с нижней – беловато-зеленые, опушенные большей частью с нижней стороны. Цветки немногочисленные, мелкие, одиночные, правильные, желтые, на коротких, вверх стоящих цветоножках, диаметром 1 – 1,2 см, расположены в пазухах листьев. Околоцветник, легко опадающий пятичленный, чашечка состоит из 5 яйцевидно-ланцетных, длинно заостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков длиной 4 – 5 мм, шириной 1 – 1,3 мм. Лепестков венчика 5, они обратнойяцевидной формы, длиной 5 – 7 мм, шириной около 3 мм, тычинок 10 штук. Плоды — ценокарпные, сухие, дробные, распадаются при созревании на 5 звездчато расположенных угловатых плодиков (мерикарпиев). Плодики трехгранноклиновидные, твердые, с наружной стороны бугорчатые, покрытые мелкими и крупными щетинистыми волосками, с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов соломенно-зеленого цвета диаметром от 9,0 до 16 мм. Корневая система стержневая с сетью волокнистых корней.

Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов и корней, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки стеблей и корней зеленовато – желтого цвета. Листочки сложного листа зеленого цвета с верхней стороны, с нижней – беловато-зеленые, опушенные большей частью с нижней стороны, цельные и в виде кусочков различной формы; Цветки, немногочисленные, мелкие, часто измельчены. Цветки одиночные, правильные, желтые, лепестков венчика 5, они обратнойяцевидной формы, чашечка состоит из 5 яйцевидно-ланцетных, длинно заостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков. Кусочки дробных, сухих плодов. Плодики трехгранноклиновидные, твердые, с наружной стороны бугорчатые, покрытые мелкими и крупными

щетинистыми волосками, с двумя парами длинных, острых, горизонтально расходящихся шипов; 2 верхних шипа более длинные, 2 нижних – короткие, светло-зеленого цвета. Цвет измельченного сырья желтовато - зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, плодов и корней зеленовато – желтого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки листьев зеленовато – желтого цвета, кусочки сухих плодов с шипами. Запах слабый. Вкус водного извлечения горький.

Микроскопические признаки

Цельная и измельченная трава. Анализ проводят в соответствии с указаниями статьи «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [23].

Анатомическое строение изучали на растениях среднего габитуса. Для микроскопического анализа были приготовлены временные микропрепараты. Для просветления использовали натрия гидроксида 5% раствор, разведенный водой (1:1), а в качестве включающей жидкости раствор хлоралгидрата.

Изучение проводили с помощью микроскопа Биомед 6 при увеличении 16x10; 16x40. Микрофотографии выполняли цифровой камерой DCM 510, в программе «Score Photo». Микроскопический анализ позволил уточнить особенности анатомического строения [1].

При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки эпидермиса продолговатой, реже круглой формы, длиной 20,90 – 25,29 мкм, шириной 13,97 – 16,06 мкм, контур клеток слабоизвилистый, имеются утолщения в углах клеток. Устьица длиной 16,30 – 18,06 мкм, шириной 13,37 – 15,94 мкм, расположены с обеих сторон листа, больше их встречается на нижней стороне листа. Устьица окружены 3 – 5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). По всей поверхности листа, с нижней и верхней

стороны, расположены простые одноклеточные волоски разной длины (длинные, средние, короткие) и ширины. Длинные волоски длиной 790,80 – 890,53 мкм, шириной 18,27 – 19,87 мкм, средние волоски длиной 443,07 – 493,33 мкм, шириной 14,80 – 17,87 мкм, короткие волоски длиной 117,33 – 172,53 мкм, шириной 16,30 – 18,06 мкм. На верхушке листа преимущественно встречаются короткие волоски. У места прикрепления волоска клетки эпидермы располагаются радиально, образуя розетку. В мезофилле листа встречаются кристаллы оксалата кальция – друзы, диаметром 21,31 – 23,68 мкм (рис.1).

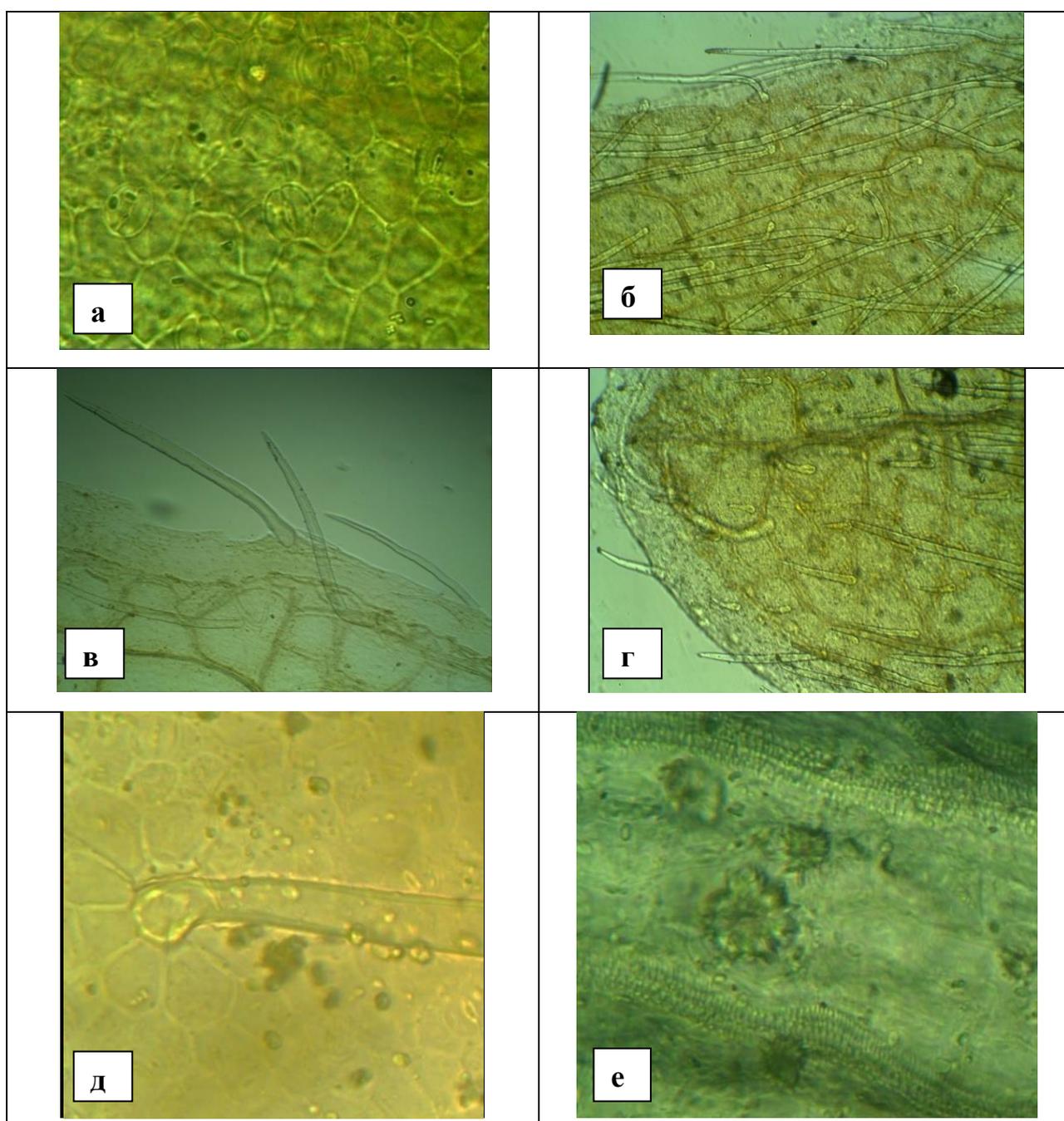


Рисунок 1 – Якорцев стелющихся трава (фрагменты препарата листа, 640х).

а – клетки эпидермиса, устьица аномоцитного типа, б – простые волоски по поверхности листа и по краю, в – простые волоски по краю листа, г – простые волоски на верхушке листа, д - место прикрепления волоска, е – друзы оксалата кальция.

На поперечном срезе стебля (рис.2), (радиус стебля 958,00 – 1430,00 мкм) видна покровная ткань – эпидермис, который покрыт слоем кутикулы. Первичная кора состоит из 5 – 8 слоев паренхимы, толщиной 137,87 – 200,00 мкм. Перицикл состоит из 4 – 7 слоев клеток склеренхимы с небольшими межклетниками, толщиной 90,93 – 122,40 мкм. Проводящая система – непучкового строения, ксилема хорошо видна, толщиной 225,20 – 419,23 мкм. Сердцевина большая состоит из паренхимных клеток. В первичной коре и сердцевине возможно наличие друз оксалата кальция.

Клетки эпидермиса венчика многоугольные, изодиаметрические, длиной 30,27 – 34,75 мкм, шириной 15,40 – 19,00 мкм. Эпидермис чашелистиков состоит из клеток со слегка волнистыми стенками, покрытых гладкой кутикулой. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Устьица длиной 18,83 – 23,67 мкм, шириной 13,97 – 17,00 мкм. Одноклеточные волоски разной длины (длиной 202,53 – 481,04, шириной 9,47 – 17,33 мкм) расположены по поверхности чашелистика и по его краю. Друзы диаметром 14,00 -19,25 мкм встречаются и в лепестках и в чашелистиках. В препаратах цветков присутствует пыльца сферической формы диаметром 38,50 – 47,30 мкм (рис.3).

На поперечном срезе корня (радиус корня 995,33 – 1802,00 мкм) видна перидерма, толщиной 44,13 – 50,00 мкм. Во вторичной коре (толщина 319,47 – 517,33 мкм) клетки паренхимы прямоугольной формы с извилистым контуром. Проводящая система непучкового строения состоит из вторичной флоэмы, камбия и более широкой зоны вторичной ксилемы (толщина ксилемы 520,53 – 1469 мкм). Кристаллы оксалата кальция – друзы, диаметром 22,67 – 24,20 мкм располагаются в корковой зоне корня (рис.4).

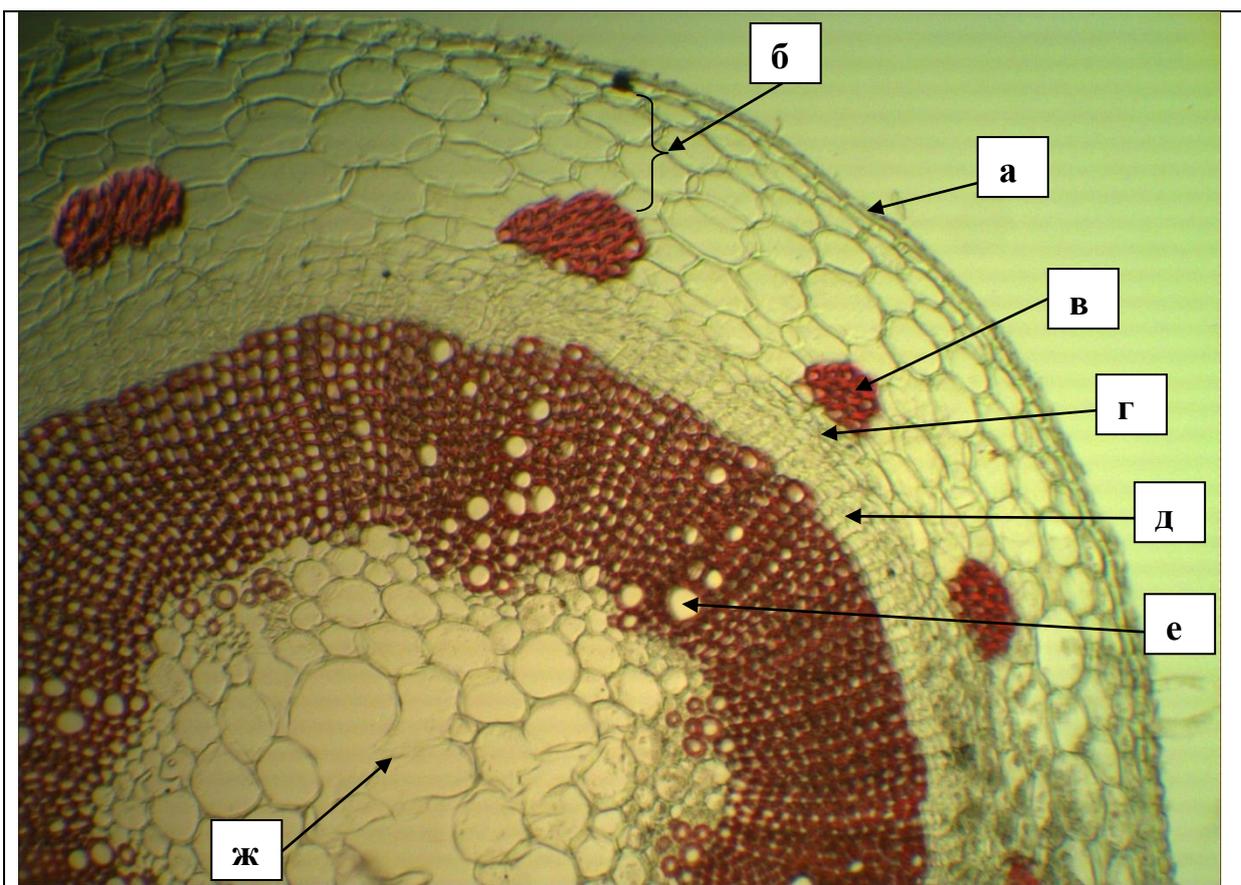


Рисунок 2 – Якорцев стелющихся трава (поперечный срез стебля, 640х).

а – эпидермис, б – первичная кора, в – перицикл, г – флоэма, д – камбий, е – ксилема, ж – сердцевина.

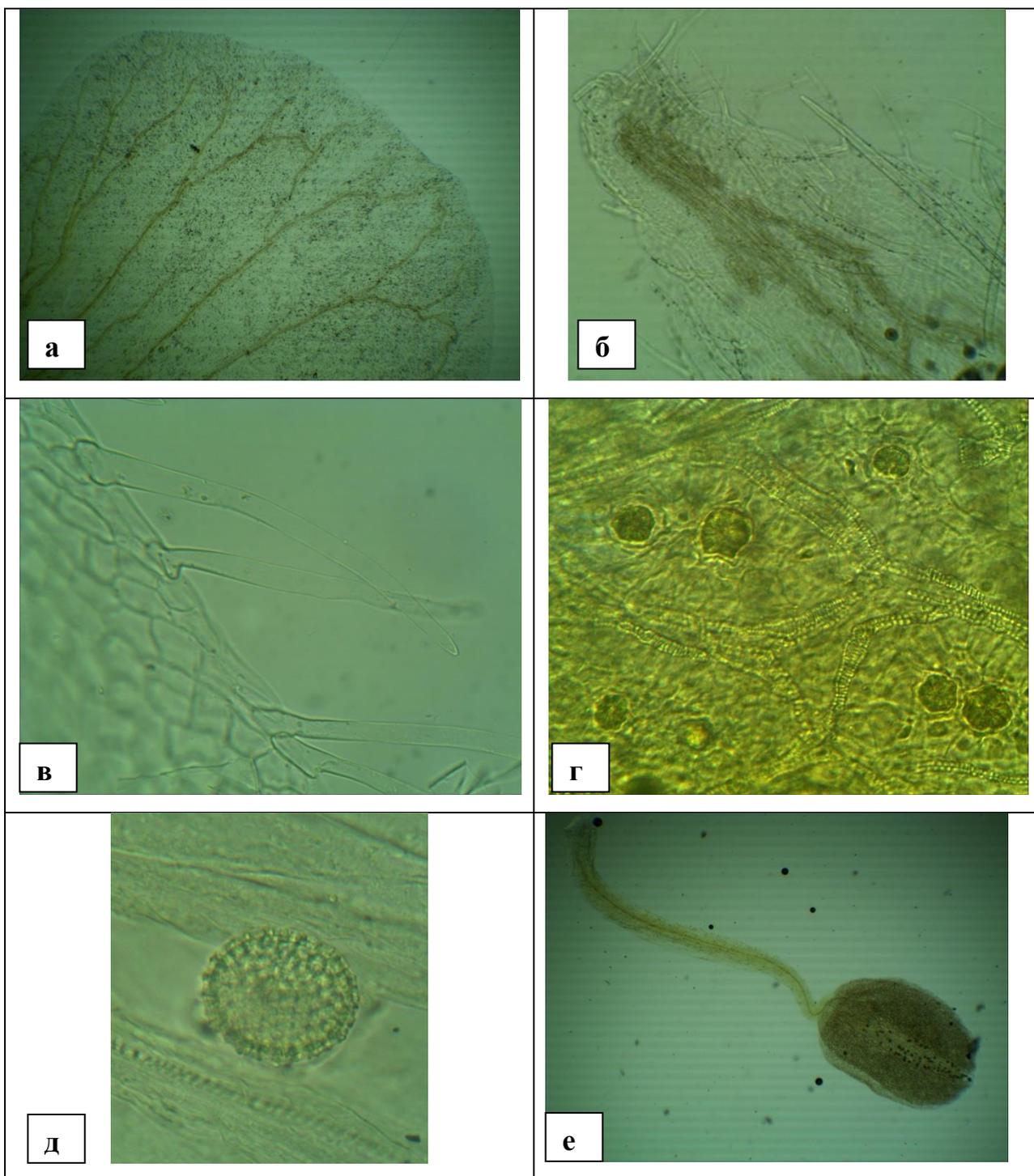


Рис. 3 – Якорцев стелющихся трава (фрагменты препарата цветка, 640х).

а – лепесток венчика, б – чашелистик с волосками по поверхности, в – чашелистик с волосками по краю, г – чашелистик с друзами, д – пыльца, е – тычинка с пылью.

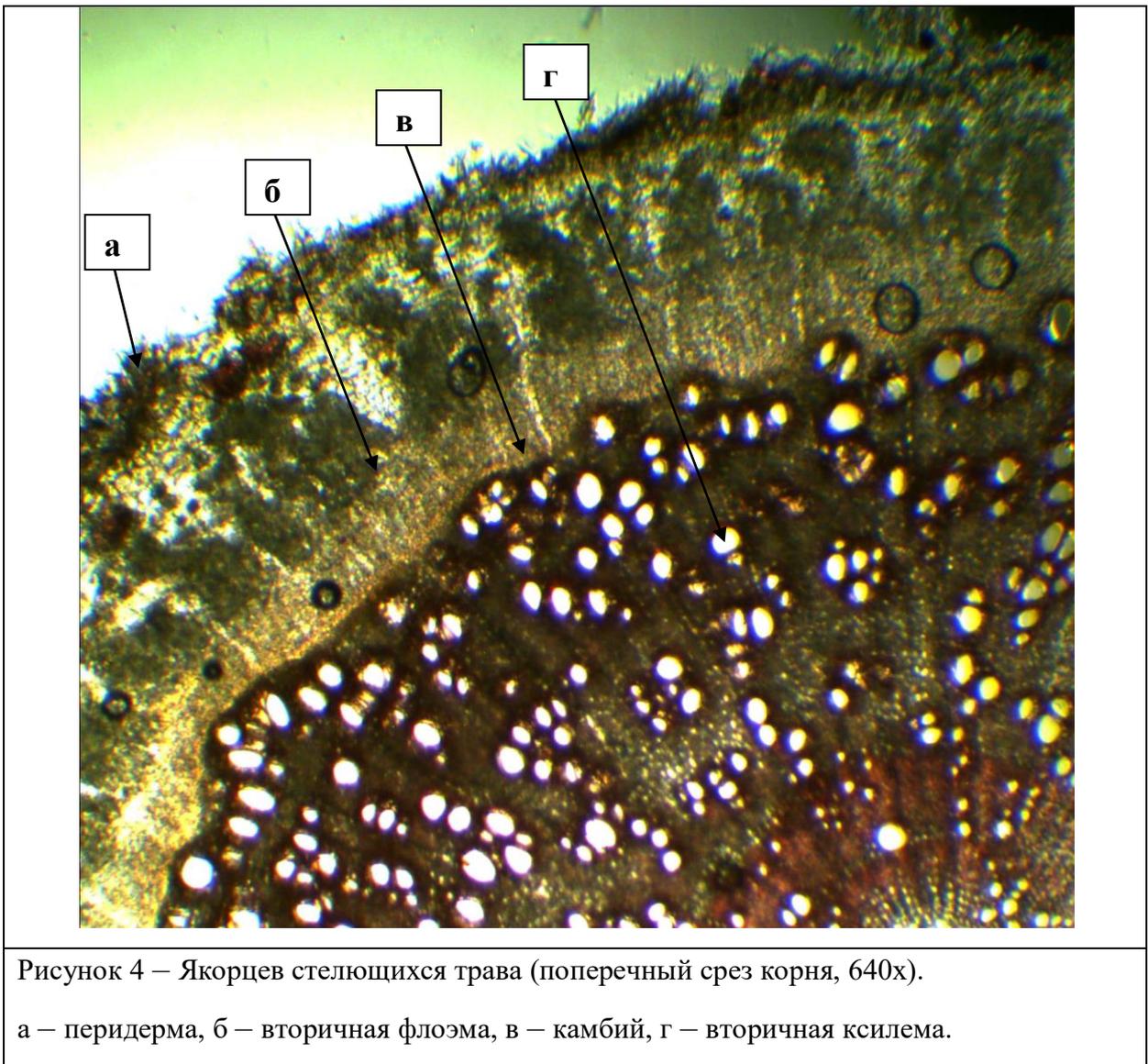


Рисунок 4 – Якорцев стелющихся трава (поперечный срез корня, 640х).

а – перидерма, б – вторичная флоэма, в – камбий, г – вторичная ксилема.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны фрагменты эпидермиса листовой пластинки, чашечки и венчика. Клетки эпидермиса продолговатой, реже круглой формы, контур клеток слабоизвилистый, имеются утолщения в углах клеток. Устьица окружены 3–5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Встречаются простые одноклеточные волоски разной длины. В препаратах цветков присутствует пыльца сферической формы. В мезофилле листа кристаллы оксалата кальция – друзы. Фрагменты эпидермиса стебля с прямыми стенками с трихомами разной длины. Фрагменты пробки корня бурого цвета, обрывки волокон, сетчатые сосуды (рис.5).



Рисунок 5 – Якорцев стелющихся трава (порошок) фрагмент сетчатых сосудов, 640х.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Определение фураностаноловых гликозидов [8]

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. с 10 мл спирта 80%, фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

Хроматографируют в тонком слое сорбента в системе хлороформ – метанол – вода (61:32:7). После высушивания хроматограмму опрыскивают 1% раствором пара-диметиламинобензальдегида в 4 моль/л метанольном растворе хлористоводородной кислоты и нагревают в сушильном шкафу при

температуре 60 °С в течение 2 – 3 мин. Появляются четыре розовых пятна (фуростаноловые гликозиды).

Так как в сырье якорцев стелющихся кроме фуростаноловых гликозидов содержатся и флавоноиды (рутин) [28], мы предлагаем определять подлинность сырья методом тонкослойной хроматографии со стандартным образцом рутином.

Определение флавоноидов

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96%. Срок годности раствора не более 3 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 15 мл спирта 80 %, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 5 мин, затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытываемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля размером 15x5 см наносят 0,2 мл испытуемого раствора и параллельно 0,1 мл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру предварительно насыщенную в течение 40 мин смесью растворителей муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 80 – 90% длины пластинки от линии старта ее вынимают из камеры и сушат до удаления следов растворителей (под тягой при комнатной температуре). Затем хроматограмму обрабатывают алюминия хлорида раствором 2 % в 96 % спирте, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2-3 мин и просматривают в УФ – свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться 1 зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на

уровне стандартного образца рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %. Определение влажности проводили по методике ГФ XIV, ОФС 1.5.3.0007.15 [16].

Влажность – один из критериев оценки качества сырья. Повышенное содержания влаги в сырье приведёт к его порче. Полученные нами данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели влажности исследуемых образцов

Образец	Влажность, не более 13 %
ВИЛАР, 2016 г	5,90 ± 0,02
Молдова, 2017 г	7,60 ± 0,04
Крым, 2017 г	6,52 ± 0,08
Сирия, 2018 г	6,20 ± 0,02
Сирия, 2019 г	6,90 ± 0,06
Крым, 2019 г	6,60 ± 0,06

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 16 %. Определение золы общей проводили по методике ГФ XIV, ОФС 1.2.2.2.0013.15 [13]. Полученные нами данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание золы общей

Образец	Зола общая, %
ВИЛАР, 2016 г	14,12 ± 0,04
Молдова, 2017 г	13,82 ± 0,06
Крым, 2017 г	13,15 ± 0,04
Сирия, 2018 г	12,98 ± 0,08
Сирия, 2019 г	14,83 ± 0,02
Крым, 2019 г	11,01 ± 0,04

Траву якорцев стелющихся собирают с корнями, кроме того, сырьё имеет опушение. Поэтому нами предложен показатель «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте».

Определение золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте проводили по методике ГФ XIV, ОФС 1.5.3.0005.15 [14]. Результаты определения представлены в таблице 3.

Таблица 3

Содержание золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте

Образец	Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, %
ВИЛАР, 2016 г	1,41 ± 0,10
Молдова, 2017 г	0,99 ± 0,08
Крым, 2017 г	0,68 ± 0,02
Сирия, 2018 г	1,03 ± 0,02
Сирия, 2019 г	1,05 ± 0,12
Крым, 2019 г	0,20 ± 0,04

На основании полученных данных, считаем необходимым нормировать показатель:

«Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» – «Цельное сырьё, измельчённое сырьё – не более 1,5 %».

Измельченность сырья.

Цельное сырьё: частиц, проходящих сквозь сито диаметром 5 мм – не более 5 %

Измельчённое сырьё: частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 7 мм – не более 2 %; частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм – не более 5 %.

Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм – не более 5%.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее) – не более 1 %.

Органическая примесь. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %.

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 1 %.

Результаты, подтверждающие количество посторонних примесей в сырье якорцев стелющихся представлены в таблице 4.

Таблица 4

Количество посторонних примесей в сырье

Образец	Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее), %	Органическая примесь, %	Минеральная примесь, %
ВИЛАР, 2016 г	0,15	0,01	0,05
Молдова, 2017 г	0,20	не обнаружено	не обнаружено
Крым, 2017 г	0,20	не обнаружено	0,02
Сирия, 2018 г	0,05	0,30	0,50
Сирия, 2019 г	0,02	0,22	0,66
Крым, 2019 г	0,16	0,05	0,03

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в

лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0011.15 «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* фураностаноловых гликозидов - не менее 0,7 %; сумма флавоноидов, в пересчете на рутин – не менее 1 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50 % – не менее 16 %.

Фураностаноловые гликозиды определяют по методике [8]:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл метилового спирта и вносят остеклованный перемешивающий стержень. Колбу с содержимым взвешивают с точностью до 0,01 г, нагревают на водяной бане с магнитной мешалкой до кипения и кипятят в течение 1 часа. Затем охлаждают до комнатной температуры и взвешивают. Потерь в массе пополняют метиловым спиртом, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 10 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем раствора доводят до метки метиловым спиртом и тщательно перемешивают (раствор А). 5 мл раствора А переносят в стеклянную пробирку, прибавляют 5 мл 1 % раствора пара – диметиламинобензальдегида в 4н растворе хлористоводородной кислоты в метиловом спирте (раствор Б). Пробирку закрывают стеклянной пробкой, встряхивают и нагревают в течение 2 часов в ультротермостате при температуре $58 \pm 0,5$ °С. Раствор охлаждают водой до комнатной температуры и определяют его оптическую плотность при длине волны 516 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 5 мл раствора А и 5 мл 4н раствора хлористоводородной кислоты в метиловом спирте, который также выдерживают в ультротермостате при $58 \pm 0,5$ °С.

Содержание фураностаноловых гликозидов в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \times 0,009401 \times 50 \times 10 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W) \times k}, \text{ где}$$

C – количество кобальта хлорида, найденного по калибровочному графику в граммах; 0,009401 – коэффициент пересчета концентрации кобальта хлорида на концентрацию фураностаноловых гликозидов; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах; k – поправочный коэффициент на титр хлористоводородной кислоты.

Построение калибровочного графика. Точную навеску 5,0000 г кобальта хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, прибавляют 1 каплю концентрированной хлористоводородной кислоты и доводят объем до метки водой. В мерные колбы вместимостью 25 мл отбирают бюреткой по 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 и 15 мл исходного раствора и доводят объем раствора до метки водой. Полученные растворы содержат соответственно 5,10,15,20,25,30 мг кобальта хлорида в 1 мл. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 518 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду. По результатам измерения оптической плотности растворов строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс содержание кобальта хлорида в граммах в 1 мл, на оси ординат – оптическую плотность раствора.

Примечание.

1 . Приготовление 4н раствора кислоты хлористоводородной. 340 мл концентрированной кислоты хлористоводородной (плотность 1,19) разбавляют метиловым спиртом до 1 л. *Установка титра.* 12 мл приготовленного раствора вносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора до метки метиловым спиртом и тщательно перемешивают (получают 0,5 н раствор хлористоводородной кислоты в

метилом спирте). Далее поступают, как указано при установке титра 0,5 н раствора хлористоводородной кислоты.

2. Приготовление 1% раствора пара-диметиламинобензальдегида.

5 г пара-диметиламинобензальдегида помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют около 200 мл 4 н раствора кислоты хлористоводородной в метилом спирте и после растворения осадка объем доводят до метки 4н раствором кислоты хлористоводородной в метилом спирте. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5

Содержание фураностаноловых гликозидов в образцах

Образец	Фураностаноловые гликозиды, %
ВИЛАР, 2016 г	0,85 ± 0,04
Молдова, 2017 г	0,95 ± 0,08
Крым, 2017 г	0,88 ± 0,10
Сирия, 2018 г	1,01 ± 0,06
Сирия, 2019 г	1,02 ± 0,02
Крым, 2019 г	0,84 ± 0,04

Якорцев стелющихся трава содержит комплекс биологически активных веществ (стероидные сапонины: диосцин, протодиосцин, трибестин, прототрибестин, метилпрототрибестин, метилпротодиосцин, псевдопротодиосцин, трибулозин и др., флавоноиды, фенол-карбоновые кислоты, алкалоиды, каротиноиды, высшие жирные кислоты) [28] и учитывая пути использования лекарственного растительного сырья – экстракт в таблетках, необходимо дополнить оценку качества сырья показателями: содержание суммы флавоноидов и экстрактивных веществ.

Разработку методики (**содержание суммы флавоноидов**) проводили на объединенном образце якорцев стелющихся травы, полученном путем смешивания в равных количествах исследуемых образцов.

Спектральные исследования проводили в диапазоне длин волн 350 – 430 нм с шагом 1 нм. Для измерения оптической плотности использовали кюветы с толщиной слоя 10 мм. УФ – спектры этанольных извлечений из сырья и дифференциальные спектры с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида снимали с помощью спектрофотометра СФ – 2000.

Для определения аналитической длины волны были изучены УФ – спектры спиртовых извлечений. Установлено, что собственный спектр этанольного извлечения якорцев стелющихся травы имеет максимум при длине волны 371 нм. Дифференциальный спектр того же извлечения с алюминия хлоридом имеет максимум при длине 410 ± 2 нм (рис. 6), который совпадает с максимумом Государственного стандартного образца рутин - ГСО (рис. 7).

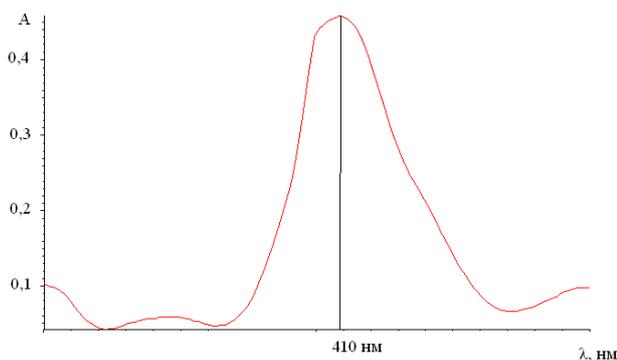


Рисунок 6. УФ – спектр извлечения комплекса суммы флавоноидов якорцев стелющихся травы с алюминия хлоридом

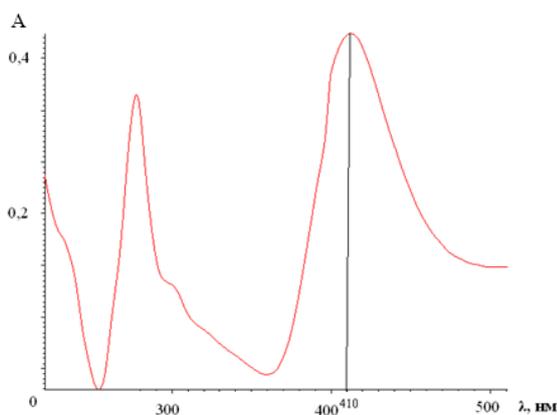


Рисунок 7. УФ – спектр комплекса раствора ГСО рутин с алюминия хлоридом

Для выбора оптимального экстрагента использовали воду очищенную и спирт 50, 70, 80 и 90 % – ной концентрации (табл. 6).

Таблица 6

Содержание суммы флавоноидов в зависимости от экстрагента

№ п/п	Экстрагент	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
1	Вода очищенная	0,1659	0,489 ± 0,04
Концентрация спирта, %			
2	50	0,1730	0,510 ± 0,03
3	70	0,2432	0,717 ± 0,05
4	80	0,2986	0,811 ± 0,02
5	90	0,1405	0,414 ± 0,04

Установлено, что наибольшее количество флавоноидов экстрагируется 80% спиртом, поэтому он был выбран в качестве экстрагента для исследований.

Изучено влияние степени измельченности сырья на максимальный выход флавоноидов из якорцев стелющихся травы. Максимальная оптическая плотность и наибольший выход суммы флавоноидов из сырья наблюдается при степени измельченности 2 мм (табл. 7).

Таблица 7

Зависимость содержания флавоноидов от степени измельченности сырья

Степень измельченности, мм	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание флавоноидов, %
2	0,3602	1,049 ± 0,04
3	0,3187	0,854 ± 0,06
5	0,2879	0,846 ± 0,07
7	0,3579	0,972 ± 0,02

С целью определения оптимального времени и кратности экстракции было проведено экстрагирование: однократно в течение 30, 45 и 60 минут,

двукратно и трехкратно по 30 минут. Максимальное содержание суммы флавоноидов определено при однократной экстракции в течение 60 минут (табл. 8).

Таблица 8

Зависимость содержания суммы флавоноидов от режима экстракции

Время экстракции однократной, мин	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
30	0,1896	0,559 ± 0,05
45	0,2328	0,686 ± 0,04
60	0,3041	0,896 ± 0,03
Двукратная экстракция по 30 минут	0,1692	0,499 ± 0,07
Трехкратная экстракция по 30 минут	0,1519	0,448 ± 0,06

Для определения полноты протекания реакции и устойчивости комплекса флавоноидов с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида проведен анализ спиртовых извлечений с различными вариантами соотношений: извлечение – хромогенный реактив.

Оптимальным соотношением объема исследуемого раствора и 2 % спиртового раствора алюминия хлорида является соотношение 2:5, при котором наблюдается максимальная плотность и наибольшее содержание суммы флавоноидов (табл. 9).

Таблица 9

Зависимость оптической плотности от соотношения извлечения (раствор А) и алюминия хлорида

№ п/п	Соотношение извлечения и реактива	Оптическая плотность, А (среднее значение)	Содержание суммы флавоноидов, %
1.	1:1	0,2210	0,651 ± 0,03
2.	1:2	0,2383	0,702 ± 0,06
3.	1:3	0,2412	0,711 ± 0,01
4.	2:2	0,4270	1,258 ± 0,02
5.	2:3	0,4389	1,293 ± 0,03
6.	2:4	0,4443	1,309 ± 0,04
7.	2:5	0,4709	1,388 ± 0,02
8.	2:6	0,4568	1,346 ± 0,05

Практическое значение при проведении спектрофотометрического измерения имеет время образования хелатного комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия. Для проведения этого анализа измеряли величину оптической плотности фотометрируемого раствора через каждые 10 минут в течение 1 часа с момента получения комплекса. Установлено, что стабильность комплекса с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдается через 15 минут после начала реакции и сохраняет ее в течение 1 часа (рис. 8).

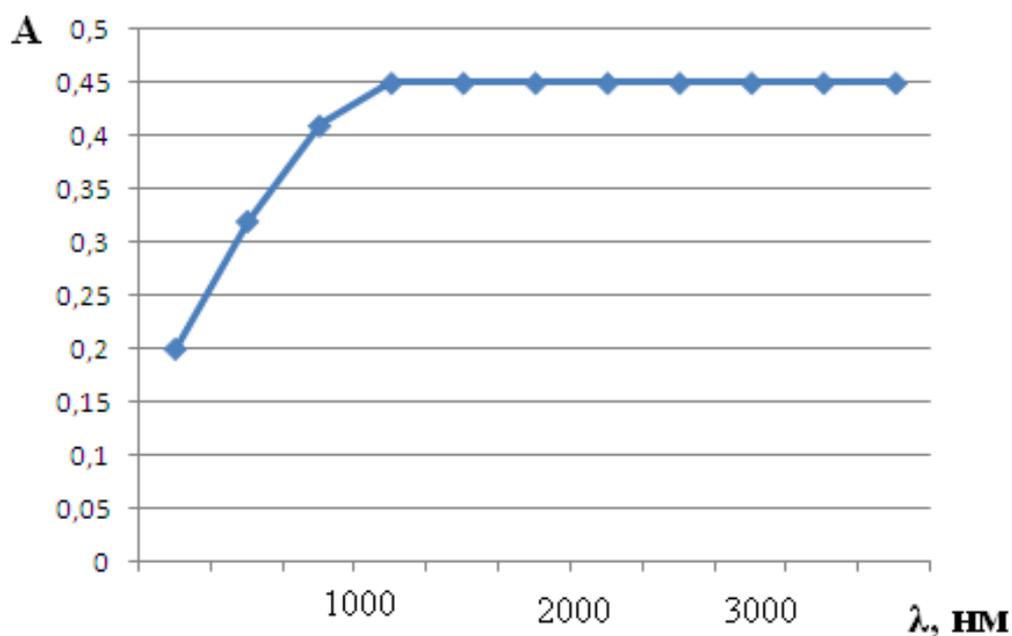


Рисунок 8. Устойчивость комплекса суммы флавоноидов с алюминия хлоридом во времени

На основании полученных данных предлагаем методику количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве.

Методика количественного определения суммы флавоноидов:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл 80 % спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр «Filtrak» в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. После охлаждения фильтр промывают 80 % спиртом, доводят объем извлечения до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 5 мл 2 % раствора алюминия хлорида в 96 % этаноле, 1 каплю

раствора уксусной кислоты 5 % и доводят объем раствора до метки 96 % спиртом (раствор Б). Через 15 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю раствора уксусной кислоты 5 % и доводят объем раствора 96 % спиртом до метки.

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

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где А – оптическая плотность (раствор Б) испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность (раствор Б) СО рутина;

а – навеска сырья в граммах;

a_0 – навеска СО рутина в граммах;

Р – содержание основного вещества в СО рутина в %;

W – потеря в массе при высушивании в %.

Приготовление СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании на водяной бане в 85 мл 96 % спирта, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А) СО рутина.

2 мл (раствора А) СО рутина, 1 капля раствора уксусной кислоты 5 %, 5 мл алюминия хлорида раствора 2 % в 96 % спирте, помещают в мерную колбу, вместимостью 25 мл и доводят 96 % спиртом до метки (раствор Б) СО рутина.

Данные наших исследований по образцам из разных регионов представлены в таблице 10.

Таблица 10

Содержание суммы флавоноидов в образцах

Образец	Сумма флавоноидов, %
ВИЛАР, 2016 г	1,67 ± 0,06
Молдова, 2017 г	1,36 ± 0,02
Крым, 2017 г	1,25 ± 0,02
Сирия, 2018 г	1,23 ± 0,08
Сирия, 2019 г	1,18 ± 0,04
Крым, 2019 г	1,22 ± 0,04

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследованных образцах якорцев стелющихся составило от 1,18 до 1,67 %. Исходя из этого, показатель количественного содержания предлагаем нормировать:

Цельное сырьё, измельченное сырьё: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %.

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов

Методику количественного определения суммы флавоноидов якорцев стелющихся травы валидировали согласно требованиям ОФС. 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», по характеристикам: линейность, прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и правильность.

Линейность определяли на пяти уровнях концентрации. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме:

1 уровень: аликвота раствора А 1 мл – объем раствора Б 2,5 мл (50%);

2 уровень: аликвота раствора А 1,5 мл – объем раствора Б 3,75 мл (75%);

3 уровень: аликвота раствора А 2,0 мл – объем раствора Б 5,0 мл (100%);
4 уровень: аликвота раствора А 2,5 мл – объем раствора Б 6,25 мл (125%);
5 уровень: аликвота раствора А 3,0 мл – объем раствора Б 7,5 мл (150%).
Данные представлены на рисунке 9.

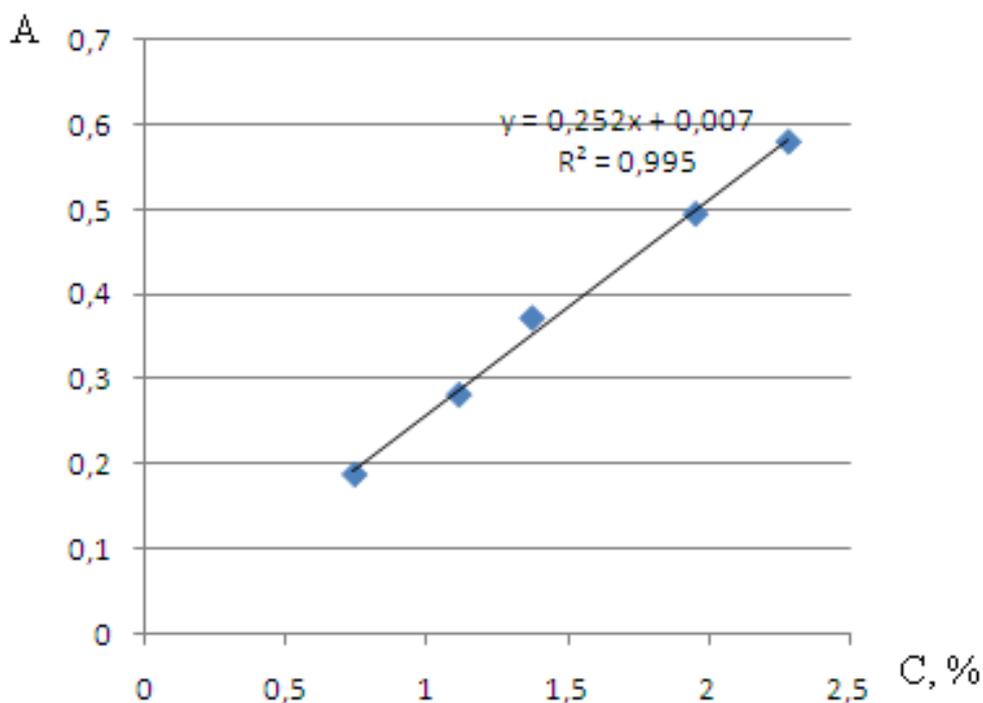


Рисунок 9. Зависимость оптической плотности раствора от объема исследуемого извлечения

Критерий приемлемости – коэффициент корреляции составил 0,995. На основании полученных данных можно утверждать, что соблюдается линейная зависимость между величинами оптической плотности и содержанием суммы флавоноидов в извлечениях из якорцев стелющихся травы в интервале концентраций 50 – 150% от номинального значения определяемой величины.

Повторяемость методики определяли в десятикратной повторности, в одной лаборатории в идентичных условиях, с использованием одного и того же оборудования, одним и тем же исследователем, в пределах короткого промежутка времени. Критерий приемлемости выражался величиной

относительного стандартного отклонения RSD, которое не должно превышать 10% (табл. 11).

Таблица 11

Определение повторяемости разработанной методики

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в якорцах стелющихся траве, %
1	1,54 ± 0,08
2	1,56 ± 0,06
3	1,52 ± 0,10
4	1,47 ± 0,08
5	1,59 ± 0,04
6	1,72 ± 0,04
7	1,58 ± 0,06
8	1,58 ± 0,12
9	1,65 ± 0,10
10	1,58 ± 0,02
Среднее значение	1,58 ± 0,04
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,069 %

Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли два провизора – аналитика кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА. Исследования проводили на трех образцах в трехкратной повторности на спектрофотометре СФ – 2000 (табл.12).

Таблица 12

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики

Повторность	Аналитик	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в образцах травы якорцев стелющихся, %		
		1. Молдова, окрестности г. Кишинев	2. Сирия, окрестности г. Дамаск	3. Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва
1	1	1,18	1,12	1,90
2	1	1,10	1,15	1,52
3	1	0,95	1,19	1,75
4	2	1,17	1,23	1,62
5	2	0,94	1,19	1,32
6	2	1,18	1,12	1,69
Среднее значение		1,09	1,17	1,64
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		0,113 %	0,044 %	0,194 %

Межлабораторную воспроизводимость методики проводили на трех образцах в трехкратной повторности в двух лабораториях (на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ПГФА на спектрофотометре СФ – 2000 и в лаборатории РИЦ «Фарматест» на спектрофотометре SHIMADZU UV – 1800). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 15% (табл. 13).

Таблица 13

Результаты определения межлабораторной воспроизводимости

№ п/п	Место сбора	Повторность	Содержание суммы флавоноидов, %	
			СФ-2000 кафедра фармакогнозии с курсом ботаники	UV-1800 SHIMADZU РИЦ «Фарматест»
1.	Молдова, окрестности г. Кишинев	1	1,36	1,41
		2	1,36	1,37
		3	1,35	1,40
		Среднее значение	1,36	1,39
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,006	0,021
2.	Сирия, окрестности г. Дамаск	1	1,18	1,29
		2	1,29	1,25
		3	1,23	1,23
		Среднее значение	1,23	1,26
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,055	0,031
3.	Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва	1	1,65	1,72
		2	1,67	1,75
		3	1,68	1,82
		Среднее значение	1,67	1,76
		Относительное стандартное отклонение (RSD), % при $f = 2$	0,015 %	0,051 %

Результаты определения подтверждают прецизионность методики в условиях внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости, так как относительное стандартное отклонение не превысило 15%.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления необходимого количества стандарта к исследуемому раствору непосредственно в извлечение из якорцев стелющихся травы (табл. 14).

Таблица 14

Определение правильности методики

№ п/п	Место сбора	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, мг	Добавлено СО рутин, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %
1.	Молдова, окрестности г. Кишинев	10,8	0,05	10,85	10,90	0,46
		10,8	0,1	10,90	11,10	1,83
		10,8	0,15	10,95	11,13	1,64
2.	Сирия, окрестности г. Дамаск	11,5	0,05	11,55	11,70	1,30
		11,5	0,1	11,60	11,78	1,55
		11,5	0,15	11,65	11,95	2,57
3.	Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва	17,6	0,05	17,65	17,67	0,11
		17,6	0,1	17,70	18,03	1,86
		17,6	0,15	17,75	17,95	1,13

Результаты показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения и не превышает 2,89% (табл. 15).

Таблица 15

Метрологическая характеристика метода

n	f	\bar{x}	S²	S	P,%	t(p,f)	$\Delta\bar{x}$	ε	δ,%
5	4	2,086	0,0596	0,2441	95	2,78	0,03	0,77	2,89

Экстрактивные вещества

Определение экстрактивных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья 1 г, экстрагент – спирт 50%) [18].

Выбор экстрагента устанавливали на объединенном образце, полученном путем смешивания в равных количествах указанных образцов. Для подбора экстрагента использовали: воду очищенную, спирт 50, 70, 80, 90-процентной концентрации.

Исследования по выбору экстрагента показали, что максимальное количество экстрактивных веществ, извлекается 50% спиртом (табл.16), поэтому данный экстрагент использовали в последующем при количественном определении экстрактивных веществ в исследуемых образцах (табл.17).

Таблица 16

Выбор экстрагента для определения содержания экстрактивных веществ в
якорцах стелющихся траве

Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %
Вода очищенная	25,28 ± 0,05%
спирт 50%	26,79 ± 0,03%
спирт 70%	24,12 ± 0,09%
спирт 80%	22,36 ± 0,04%
спирт 90%	16,81 ± 0,09%

Таблица 17

Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50% в образцах

Образец	Содержание экстрактивных веществ, %
Крым, 2017	22,58 ± 0,04
Молдова, 2017	22,06 ± 0,03
ВИЛАР, 2016	16,62 ± 0,07
Сирия, 2018	16,13 ± 0,04
Сирия, 2019	25,75 ± 0,05
Крым, 2019	30,12 ± 0,03

Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 50% в
исследованных образцах якорцев стелющихся составило от 16,13 до 30,12% [3].

Исходя из этого, предлагаем нормировать показатель:

Цельное сырьё, измельченное сырьё: Экстрактивных веществ,
извлекаемых спиртом 50% не менее 16%.

Упаковка, маркировка и транспортирование.

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [26].

Литература

1. Анисимова А.Г., Блинова О.Л., Белоногова В.Д., Аффуж Абдулкарим. Морфолого-анатомическое исследование якорцев стелющихся травы//Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. - №3 (25) 2019. – С. 26-35.
2. Артеменков А.А. Использование адаптогенов в реабилитационной практике для коррекции дезадаптивных расстройств /А.А. Артеменков // Актуальные проблемы экологии и здоровья человека : сб. науч. тр. / Череповецкий гос. ун-т. – Череповец, 2016. - с. 81-87.
3. *Affouf Abdulkarim, Blinova Olga Leonidovna, Belonogova Valentina Dmitrievna. Research on comprehensive quality assessment of tribulus terrestris grass*//International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”. - September 14, 2019. Beijing, PRC. – P. 136-139.
4. Бобров Е. Г. Семейство Zygophyllaceae, род Tribulus / Флора СССР. Под ред. Б. К. Шишкина. - Москва: АН СССР, 1949. Т. 14. – с. 194-196.
5. Гладчук Е.А., Грачёв Р.А., Степанов П.И. Роль препарата Трибестан в комплексном лечении эректильной дисфункции у пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы и хроническими обструктивными заболеваниями легких / Е.А. Гладчук, Р.А. Грачёв, П.И. Степанов // *Здоровье мужчины. – 2012. - №2. – с. 109 -113.*
6. Горпинченко И.И., Гурженко Ю.Н. Исследование эффективности препарата Трибестан в лечении больных эректильной дисфункцией / И.И. Горпинченко, Ю.Н. Гурженко // *Здоровье мужчины. – 2008. – № 3. –с. 1–6.*
7. Горпинченко И.И., Гурженко Ю.Н. Применение препарата Трибестан в андрологической практике / И.И. Горпинченко, Ю.Н. Гурженко // *Здоровье мужчины. – 2010. – № 1. – с. 28-32.*

8. Лекарственные растения Государственной фармакопеи / под ред. И.Л. Самылиной, В.А. Северцева. - М.: АНСИ, 2001. - С. 364 – 367.
9. МР 64-03-004-2004 «Графическое оформление лекарственных средств. Общие требования».
10. Молохова Е.И., Карпенко Ю.Н., Аффиф А. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования диосцина в экстракционных препаратах из *Tribulus terrestris* L. // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Создание конкурентоспособных лекарственных средств - приоритетное направление развития фармацевтической науки. Материалы научно-практической конференции с международным участием. -2018г.- №22. – с. 158 – 161.
11. ОСТ 91.500.05.001-00 Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. – М., 2001.
12. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. [Электронное издание] Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=zz
13. ОФС.1.2.2.2.0013.15 Зола общая [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/984/index.html#zoom=z
14. ОФС.1.5.3.0005.15 Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/541/index.html
15. ОФС.1.5.1.0003.15 Листья [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-1-0003-15-listya/>.
16. ОФС.1.5.3.0007.15 Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/547/index.html#zoom=z.
17. ОФС.1.5.3.0004.15 Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/535/index.html#zoom=z

- 18.ОФС.1.5.3.0006.15 Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0006-15-Opredelenie-soderzhaniya-ekstraktivnyh-veshhestv-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatah/>
- 19.ОФС.1.1.0005.15 Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0005-15-otbor-prob-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatov/>
- 20.ОФС.1.5.1.0007.15 Плоды [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-1-0007-15-plody/>.
- 21.ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. – Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/289/index.html#zoom=z.
- 22.ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/752/index.html#zoom=z.
- 23.ОФС.1.5.3.0003.15 Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0003-15-tehnika-mikroskopicheskogo-i-mikrohimicheskogo-issledovaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatov/>.
- 24.ОФС.1.5.1.0002.15 Травы [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2.html/HTML/#2/z
- 25.ОФС.1.5.1.0004.15 Цветки [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-1-0004-15-tsvetki/>.
- 26.ОФС.1.1.0011.15 Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации. – 14 издание. -

http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/271/index.html

27. Проект ФС «Якорцев стелющихся трава – *Tribuli terrestris herba*», ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.
28. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae – Ariaceae / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – с. 102 – 105.
29. Хорлякова О.В., Дремова Н.Б. Современные фитопрепараты для нормализации / регулирования нарушения липидного обмена на фармацевтическом рынке России / В.А. Лазаренко, И.Л. Дроздовой, И.В.

Зубковой, О.О. Куриловой // Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития : сб. науч. тр. – Казань, 2016. - С. 295-299.

Разработчики:

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
канд. фарм. наук, доцент



А.Ю. Турышев

«5» ноября 2019 г

Зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
доктор фарм. наук, профессор

В.Д.Белоногова

«05» ноября 2019 г

Доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
кандидат фармацевтических наук

О.Л. Блинова

«5» ноября 2019 г

Доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
кандидат фармацевтических наук

А.А. Гилева

«5» ноября 2019 г

Старший преподаватель кафедры фармакогнозии с
курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава
России

А.Г. Анисимова

«5» ноября 2019 г

Аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

Абдулкарим Аффуф

«5» ноября 2019 г

PhD student Abdulkarim Affouf

**METHODS FOR IDENTIFICATION OF TRIBULUS
TERRESTRIS HERBA**

The methods were developed in the process of working on a Ph.D. thesis on the topic “Pharmacognostic study of *Tribulus terrestris* herba growing in Russia, neighboring countries and the Syrian Arab Republic”.

Specialty 04.14.02 – Pharmaceutical chemistry, pharmacognosy

The candidate dissertation was performed in the Russian Federation, in the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Perm State Pharmaceutical Academy

Perm city, 2020

Studies were conducted on individual specimens of *Tribulus terrestris* herba, family – Zygophyllaceae collected in the Russian Federation: in the Republic of Crimea and the VILAR Botanical Garden; in Moldova, the Syrian Arab Republic, procured during 2016 – 2019. Objects of research are presented in table 1.

Table 1

Samples of *Tribulus Terrestris*

№	Collecting place	Sample type	Collection date
1	Russian Federation, VILAR Botanical Garden, Moscow city	individual collection	2016 year
2	Russian Federation, Crimea, Laspi Bay, top of Mount Kushkaya	individual collection	2017 year
3	Republic of Moldova, surroundings Kishinev city	individual collection	2017 year
4	Syrian Arab Republic, surroundings Damascus city	individual collection	2018 year
5	Syrian Arab Republic, surroundings Damascus city	individual collection	2019 year
6	Russian Federation, Crimea, Nikita village	individual collection	2019 year

1. Macroscopic analysis

Tribulus terrestris L., the family of Zygophyllaceae is an annual herb. The plant has a short pubescent. It has a core root system up to 2.6 m with a network of fibrous lateral roots. With short internodes are spread on the ground, branched from the base, 10 – 120 (300) cm long (Fig. 1). The leaves are opposite, paired – pinnate, 3 – 8 cm long, with 6 – 8 pairs of small oblong (lanceolate) leaves, have a whole edge. Flowers, few, small, single, regular, yellow, on short, upright pedicels, with a diameter of 1 – 1.2 cm, located in the axils of the leaves. Perianth, easily falling five – membered, the calyx consists of 5 ovate – lanceolate, long – pointed, externally pressed hairy sepals 4 – 5 mm long, 1–1.3 mm wide. Petals of the corolla 5, they are obovate in shape, 5 – 7 mm long, about 3 mm wide, 10 stamens (Fig. 2).

The fruit is disc – shaped, coenocarpous, dry, fractional, decaying when ripe into 5 star – shaped angular mericarpias (fruitlets).

Fruits trihedral wedge shaped, firm, tubercular on the outside, covered with small and large bristly hairs and with two pairs of long, sharp, horizontally diverging spines; 2 upper spines are longer, 2 lower ones are shorter (Fig. 3).



Fig.4. *Tribulus terrestris* L., general view of the plant.



Fig.5. Leaves, flower *Tribulus terrestris* L.

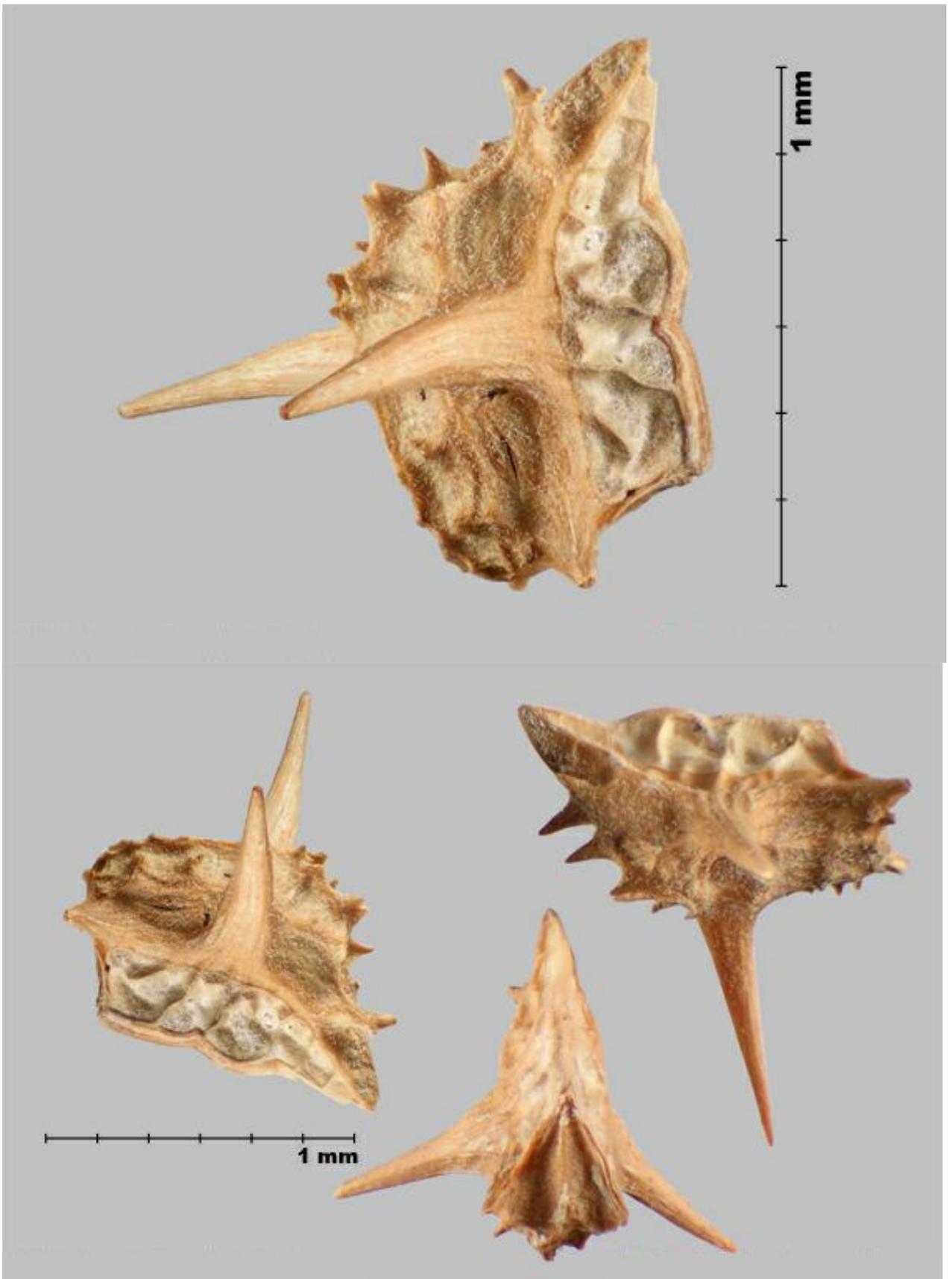


Fig.6. Fruit *Tribulus terrestris* L.

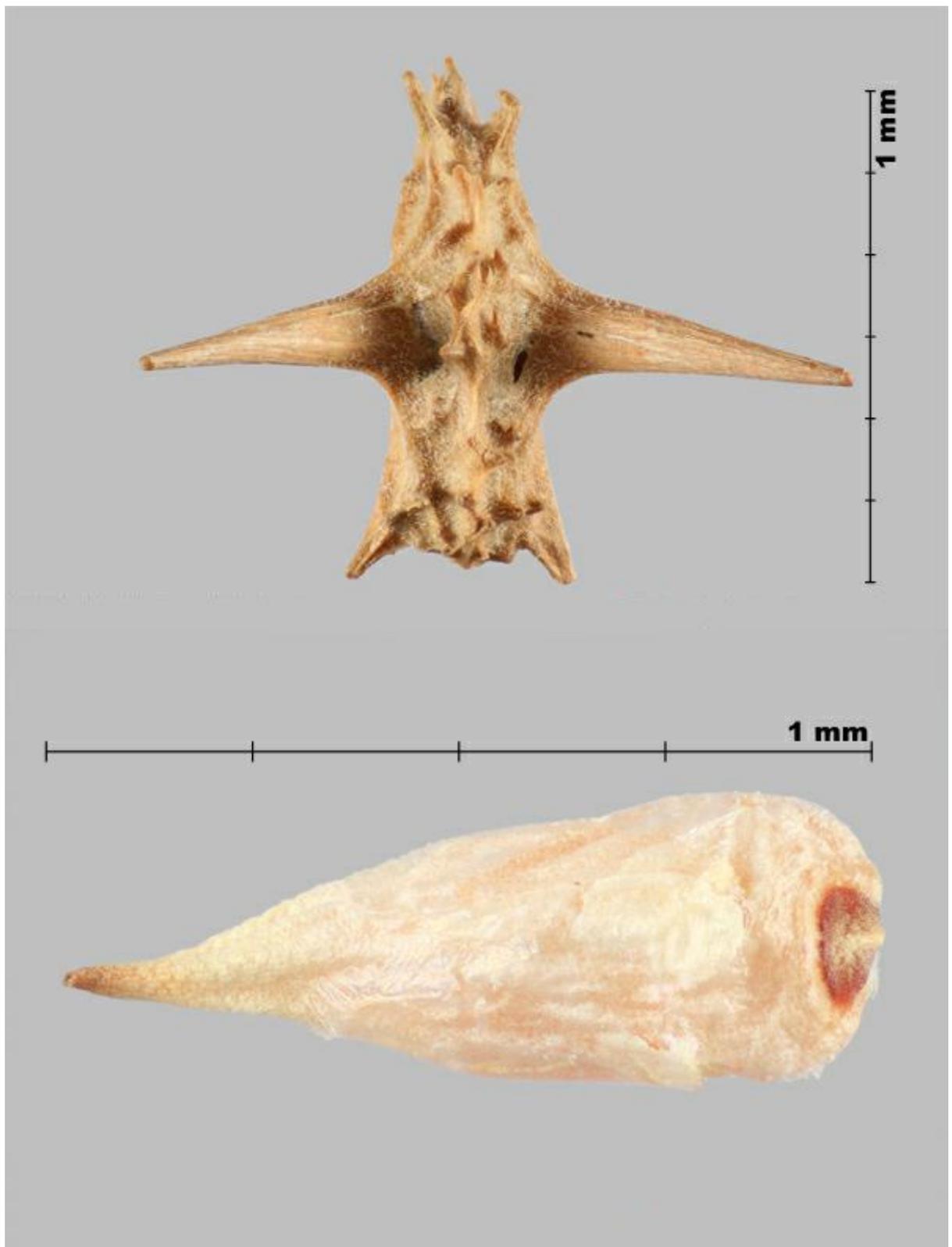


Fig.3. Fruit *Tribulus terrestris* L.

External signs of raw materials. Whole raw materials (Fig. 4). A mixture of whole or partially chopped stems, leaves, flowers, fruit and roots. Stems 10 – 120 cm long. Leaves are paired – pinnate, 3 – 8 cm long with 6 – 8 pairs of small oblong (lanceolate) leaves. Small leaves are oblong, with a solid edge, from 5.60 to 9.60 mm long, from 2.00 to 4.90 mm wide in green on the upper side, whitish – green on the lower side, mostly pubescent on the lower side. The flowers are few, small, solitary, regular, yellow, on short pedicels, with a diameter of 1 – 1.2 cm, located in the axils of the leaves. Perianth, easily falling five – membered, calyx consists of 5 ovate-lanceolate, long pointed, externally covered with sepal hairs 4– 5 mm long, 1 – 1.3 mm wide. Petals of the corolla 5, they are obovate in shape, 5-7 mm long, about 3 mm wide, 10 stamens. Fruits – cenocarpous, dry, fractional, decay upon ripening into 5 star – shaped angular fruitlets (merikarpiev). Fruits are trihedral wedge – shaped, solid, tubercular on the outside, covered with small and large bristly hairs, with two pairs of long, sharp, horizontally diverging, straw – green spikes with a diameter of 9.0 to 16 mm. The root system is pivotal with a network of fibrous roots. The smell is mild. The taste of water extract is bitter.



Fig. 4. Appearance of raw *Tribulus terrestris* L.

Ground raw materials.

A mixture of pieces of stems, leaves, flowers, fruit and roots passing through a sieve with openings of 7 mm in size.

When viewed under a magnifying glass (10x) or a stereo microscope (16x), pieces of stems and roots of greenish – yellow color are visible. Leaflets of a complex leaf of green color on the upper side, whitish – green on the lower side, pubescent mostly on the lower side, whole and in the form of pieces of various shapes; Flowers, few in number, small, often chopped. The flowers are single, regular, yellow, petals of the corolla 5, they are obovate in shape, the calyx consists of 5 ovate – lanceolate, long – pointed, externally pressed sepals. Pieces of fractional, dried fruit. Fruits trihedral wedge – shaped, firm, tubercular on the outside, covered with small and large bristly hairs, with two pairs of long, sharp, horizontally diverging spines; 2 upper spikes longer, 2 lower spikes short, light green. The color of the crushed raw material is yellowish green. The smell is mild. The taste of water extract is bitter.

Powder.

A mixture of pieces of stems, leaves, flowers, fruits, and greenish – yellow roots passing through a 2 mm sieve. When viewed under a magnifying glass (10x) or a stereo microscope (16x), pieces of greenish – yellow leaves are visible, pieces of dried fruits with spikes. The smell is mild. The taste of water extract is bitter.

2. Microscopic analysis

For microscopic analysis, samples of raw materials were divided into organs (leaves, stems, flowers, roots).

When analyzing the leaves, their whole parts or pieces of the leaf plate with the edge and vein were taken.

A few pieces of the raw material were placed in a flask or test tube, a 5% sodium hydroxide solution diluted with water (1: 1) was added, and boiled for 5 – 7 minutes, avoiding strong softening. Then the contents were poured into a glass beaker, the liquid was poured through 2 – 4 layers of gauze, which covered the beaker, and the raw materials were thoroughly washed with water, each time draining water through the same gauze. The contents of the glass were transferred in a small amount of water to a Petri cup. The particles of raw material left on the cheesecloth were washed in the same Petri cup. Pieces were taken out of the water with a scalpel or spatula and placed on a glass slide in a drop of chloral hydrate solution.

Pieces of raw material, enlightened and placed on a glass slide, were divided into two parts with a scalpel or dissecting needles, one of them was carefully inverted.

At different magnifications, using the macroscrew and microscrew, we examined the upper and lower epidermis, as well as the deep structures of the leaf located under the epidermis (parenchyma, inclusions, vessels, etc.) [7].

For the analysis of flowers, its components were taken: a calyx, a corolla. The enlightenment method used was the same as for the leaves. Thin petals were boiled in sodium hydroxide solution of 5% for no more than 1 min. And they prepared micropreparations [7].

For the analysis of stems and roots, cross sections were prepared. Small pieces of organs were placed in cold water and kept about 1 day, then placed in a mixture of 95% alcohol and glycerol (1: 1) for 3 days. Cross sections were made, which were stained with safranin, and micropreparations were prepared in a chloral

hydrate solution [7]. Anatomical and diagnostic signs were examined first at low, then at high magnification.

The study of anatomical signs was carried out using a Biomed 6 microscope, magnification 640x, 400x, 160x.

For microphotography, a DCM 510 digital camera, Scope Photo, was used.

Cell sizes were measured using an eyepiece micrometer. The results were processed in Microsoft Excel.

Microscopic signs [1].

Whole, crushed raw materials. When examining a leaf from the surface, it should be seen that the epidermal cells are oblong, less often round in shape, 20.90 – 25.29 μm long, 13.97 – 16.06 μm wide, the cell contour is slightly sinuous, there are thickenings in the corners of the cells. The stomata are 16.30 – 18.06 μm long, 13.37 – 15.94 μm wide, located on both sides of the leaf, more of them are found on the underside of the leaf. The stomata are surrounded by 3 – 5 parotid cells (anomocytic type). On the entire surface of the leaf, from the lower and upper sides, simple unicellular hairs of different lengths (long, medium, short) and widths are located. Long hairs 790.80 – 890.53 μm long, 18.27 – 19.87 μm wide, medium 443.07 – 493.33 μm long, 14.80 – 17.87 μm wide, short hairs long 117.33 – 172.53 μm , a width of 16.30 – 18.06 μm . Short hairs are predominantly found at the top of the leaf.

At the attachment point of the hair, epidermal cells are located radially, forming a rosette. In the leaf mesophyll, crystals of calcium oxalate – drusen, with a diameter of 21.31 – 23.68 μm are found (Fig. 5).

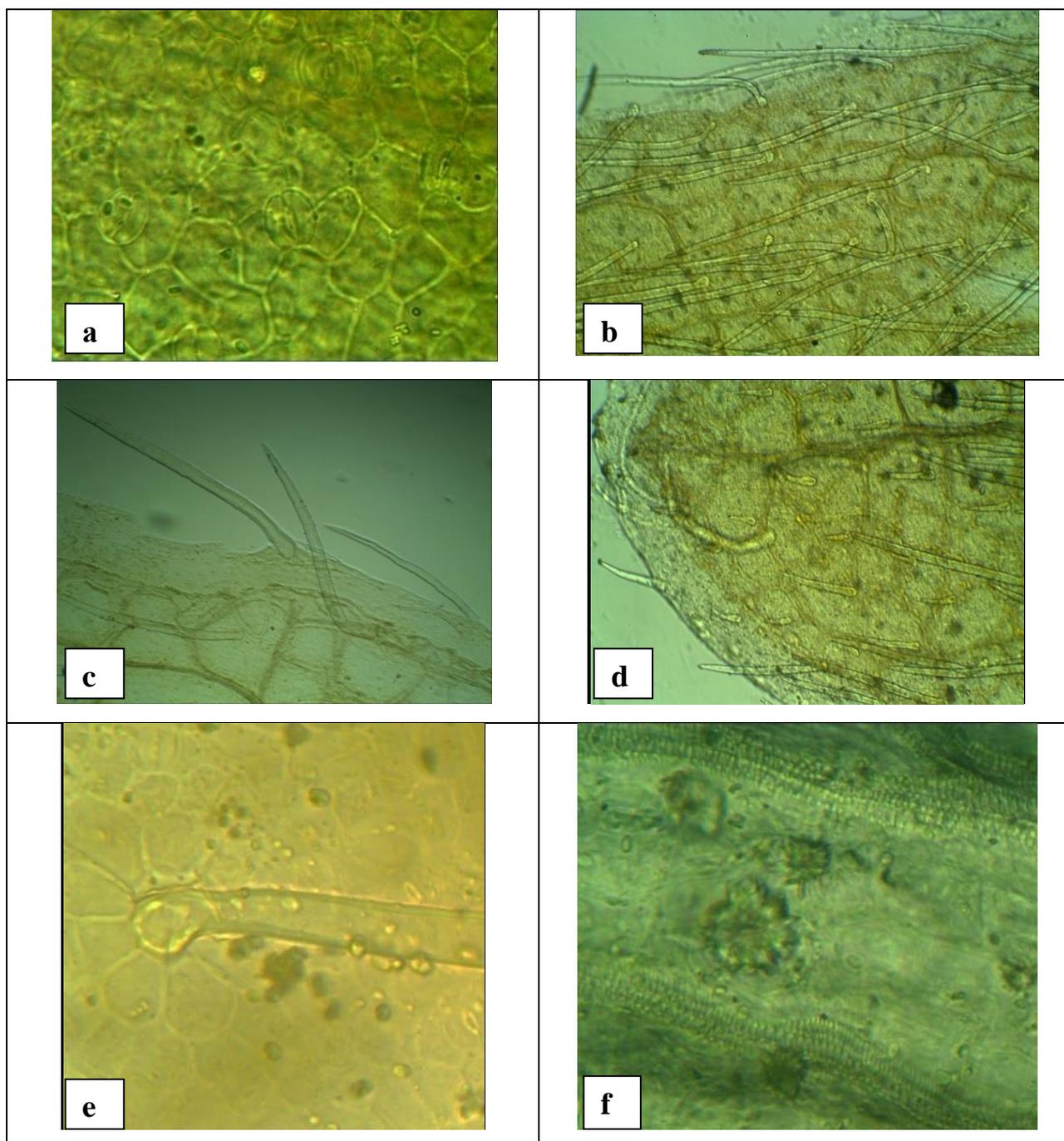


Fig. 5. *Tribulus terrestris* herba (fragments of a leaf preparation, 640x).

a – epidermal cells, stomata of the anomocytic type, b – simple hairs along the surface of the leaf and along the edge, c – simple hairs along the edge of the leaf,

d – simple hairs at the top of the leaf, e – place of hair attachment, f – drusen of calcium oxalate.

On the transverse section of the stem (Fig. 6), (stem radius 958.00 – 1430.00 μm), the integumentary tissue is visible – the epidermis, covered with a cuticle layer.

Primary cortex consists of 5 – 8 layers of parenchyma, 137.87 – 200.00 μm thick. The pericycle consists of 4 to 7 layers of sclerenchyma cells with small intercellular spaces, 90.93 – 122.40 μm thick. The conductive system is of non – beam structure, the xylem is clearly visible, with a thickness of 225.20 – 419.23 μm . The large core consists of parenchymal cells. Calcium oxalate drusen may be present in the primary cortex and core.

Corollary epidermal cells are polygonal, isodiametric, 30.27 – 34.75 μm long, 15.40 – 19.00 μm wide. The sepal epidermis consists of cells with slightly wavy walls, covered with a smooth cuticle. Stomatal device of anomocytic type. The stomata are 18.83 – 23.67 μm long and 13.97 – 17.00 μm wide. Unicellular hairs of different lengths (length 202.53 – 481.04, width 9.47 – 17.33 μm) are located on the surface of the sepals and along its edge. Druses with a diameter of 14.00 – 19.25 μm are found in both the petals and sepals. Spherical pollen with a diameter of 38.50 – 47.30 μm is present in flower preparations (Fig. 7).

On the transverse section of the root (root radius 995.33 - 1802.00 μm), a periderm is visible with a thickness of 44.13 – 50.00 μm . In the secondary cortex (thickness 319.47 – 517.33 μm), the cells of the parenchyma are rectangular in shape with a tortuous contour. The non – bunch structure conducting system consists of a secondary phloem, cambium, and a wider zone of secondary xylem (xylem thickness 520.53 – 1469 μm). Calcium oxalate crystals – druses with a diameter of 22.67 – 24.20 μm are located in the cortical zone of the root (Fig. 8).

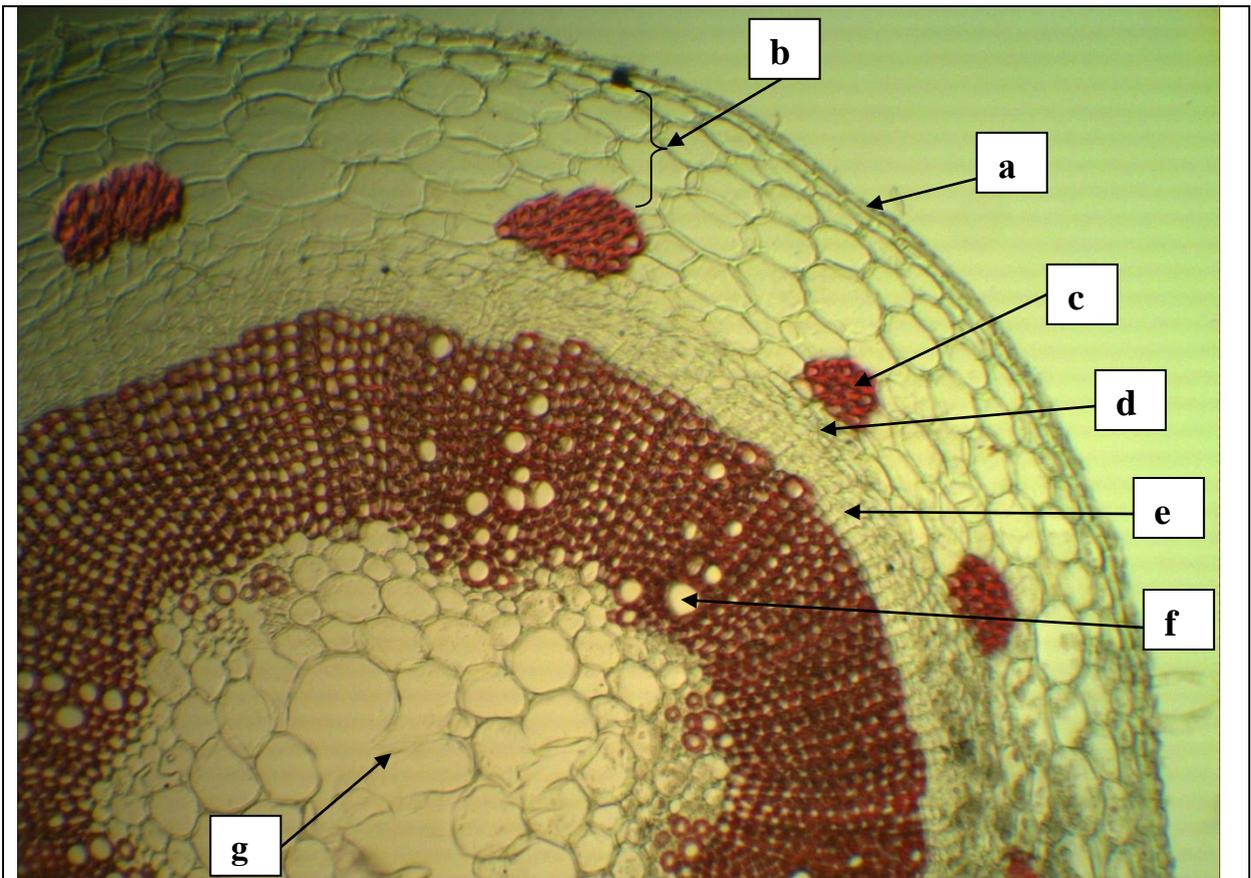


Fig. 6. *Tribulus terrestris* herba (transverse section of the stem, 640x).

a – epidermis, b – primary cortex, c – pericycle, d – phloem, e – cambium, f – xylem, g – core.

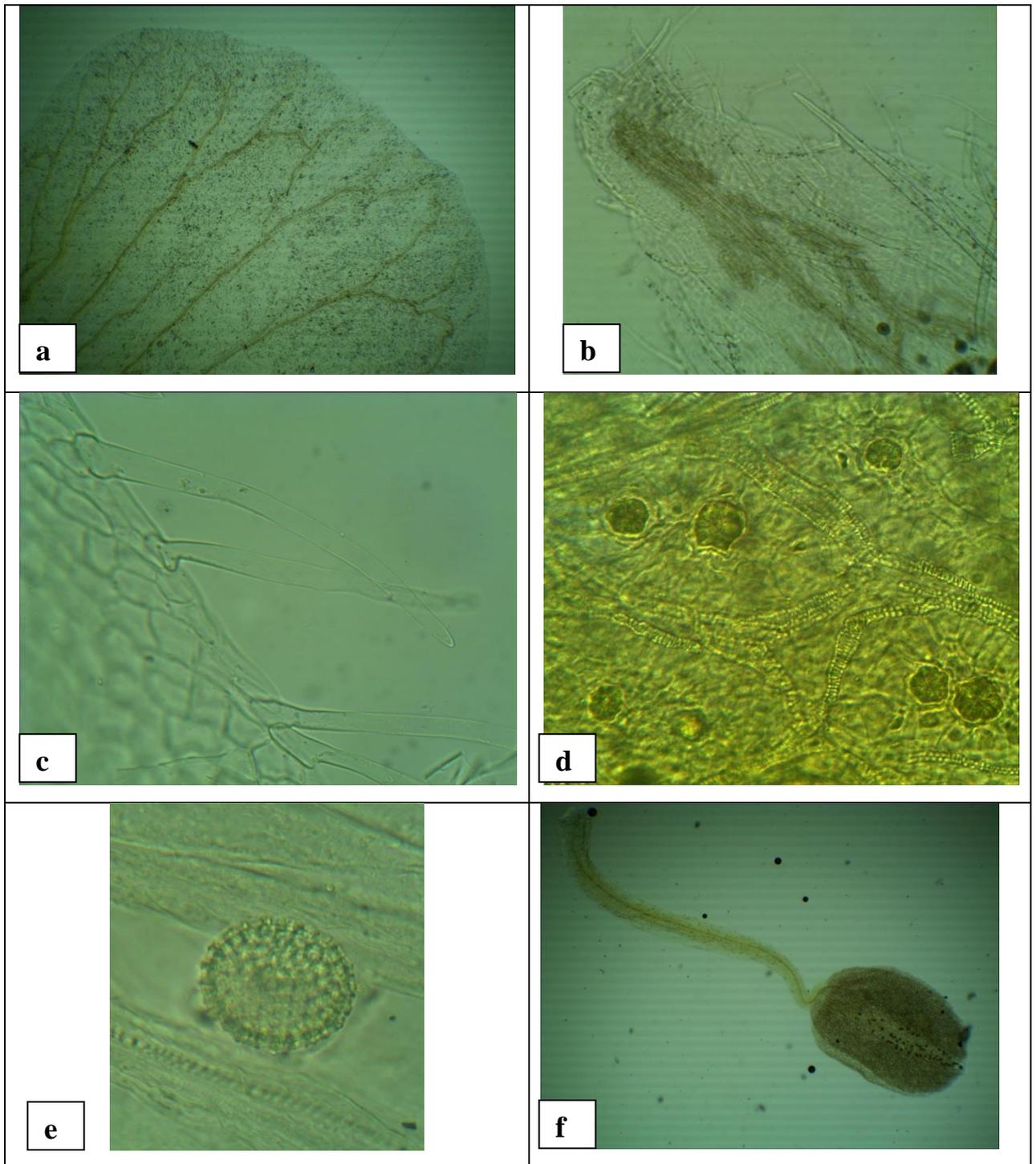


Fig. 7. *Tribulus terrestris* herba (fragments of a flower preparation, 640x).

a – petal of the corolla, b – sepals with hairs on the surface,
 c – sepals with hairs along the edge, d – sepals with drusen,
 e – pollen; f – stamen with pollen.

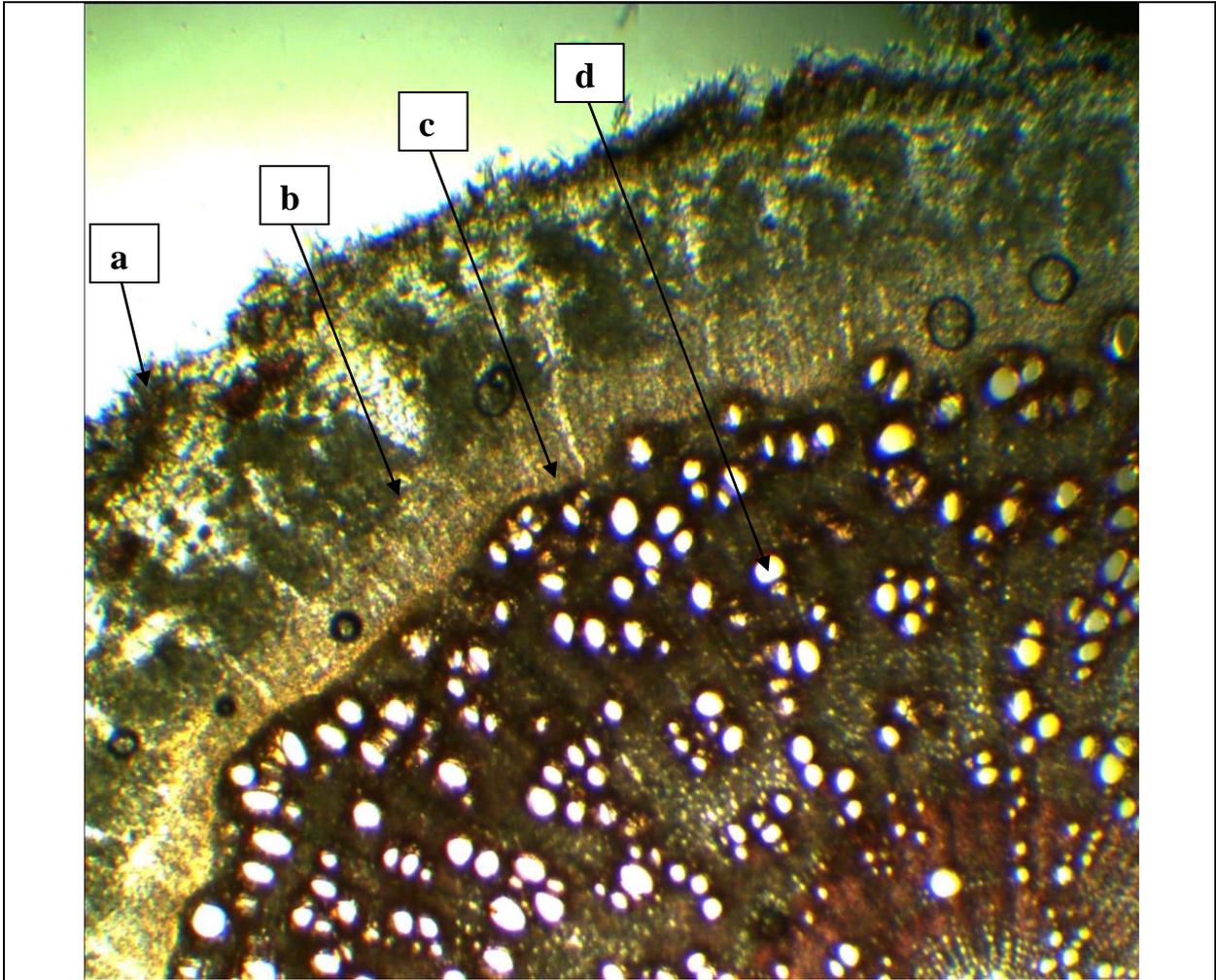


Fig. 8. *Tribulus terrestris* herba (cross section of the root, 640x).

a – periderm, b – secondary phloem, c – cambium, d – secondary xylem.

Powder. When considering a micropreparation of the powder, fragments of the epidermis of the leaf blade, calyx and corolla should be visible. The epidermal cells are elongated, less often round in shape, the contour of the cells is slightly sinuous, there are thickenings in the corners of the cells. The stomata are surrounded by 3 – 5 parotid cells (anomocytic type). There are simple unicellular hairs of different lengths. Spherical pollen is present in flower preparations. In the sheet mesophyll, crystals of calcium oxalate are drusen. Fragments of the epidermis of the stem with straight walls with trichomes of different lengths. Fragments of the brown root cork, scraps of fibers, mesh vessels (Fig. 9).



Fig. 9. *Tribulus terrestris* herba (powder) a fragment of the mesh vessels, 640x.

3. The definition of the main groups of biologically active substances

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [4,9].

Using the method of high performance liquid chromatography in the studied samples, the presence of dioscin and protodioscin was confirmed (table 2, Fig. 10-15). The identification of dioscin and protodioscin in the chromatograms was carried out by retention times in comparison with standard samples. The retention times of protodioscin and dioscin were 4.93 ± 0.03 and 8.86 ± 0.03 min, respectively.

Additional peaks observed in the chromatograms of the extracts corresponded to coextractive compounds, were well separated and did not interfere with the determination of target analytes.

In addition to the qualitative determination of saponins by HPLC, saponins in plant materials were quantified. For this, the external standard method was used.

The maximum dioscin content is observed in the sample of raw materials harvested in the Crimea - 1.90 ± 0.02 ($p < 0.05$), and the minimum - in the sample from the VILAR. No statistically significant differences were found between the dioscin content in the samples prepared in Crimea and Syria. The largest amount of protodioscin was also found in the sample from the Crimea - 15.59 ± 0.28 ($p < 0.05$), and the minimum - In the sample from Moldova (Table 2).

Table 2

Quantitative results of dioscin and protodioscin in samples

Sample	Dioscin content, mg (in 1 g of raw material) X cp. \pm SD	Protodioscin content, mg (in 1 g of raw material) X cp. \pm SD
Republic of Moldova, surroundings Kishinev city, 2017	$0,27 \pm 0,011^*$	$3,17 \pm 0,13^*$
Russian Federation, Crimea, Laspi Bay, top of Mount Kushkaya, 2017	$1,90 \pm 0,02$	$15,59 \pm 0,28^*$
Syrian Arab Republic, surroundings Damascus city, 2018	$1,67 \pm 0,04^*$	$3,80 \pm 0,11^*$
Russian Federation, VILAR Botanical Garden, Moscow city, 2016	$0,09 \pm 0,02^*$	$1,44 \pm 0,38^*$

* significance of differences $p < 0.05$

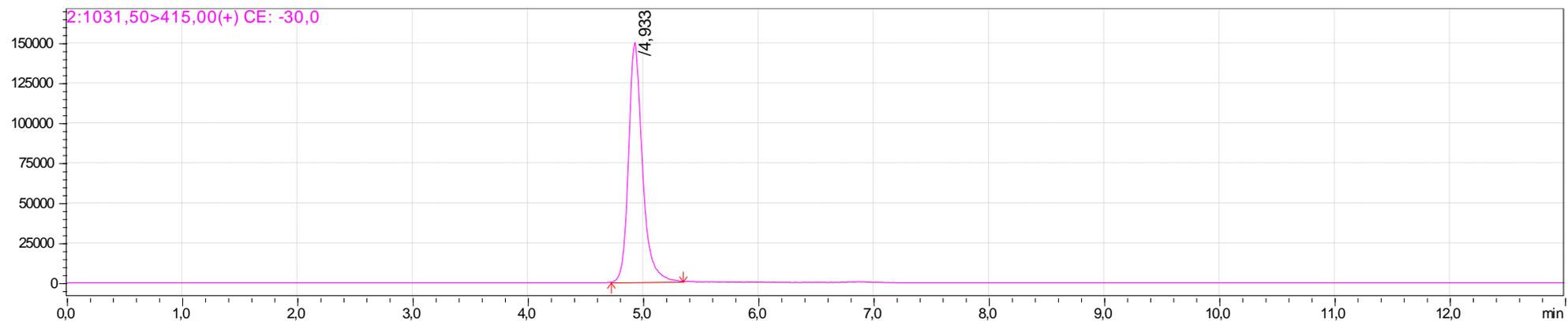


Fig. 10. Chromatogram of a solution of a standard sample of protodioscin (1333 ng / ml).

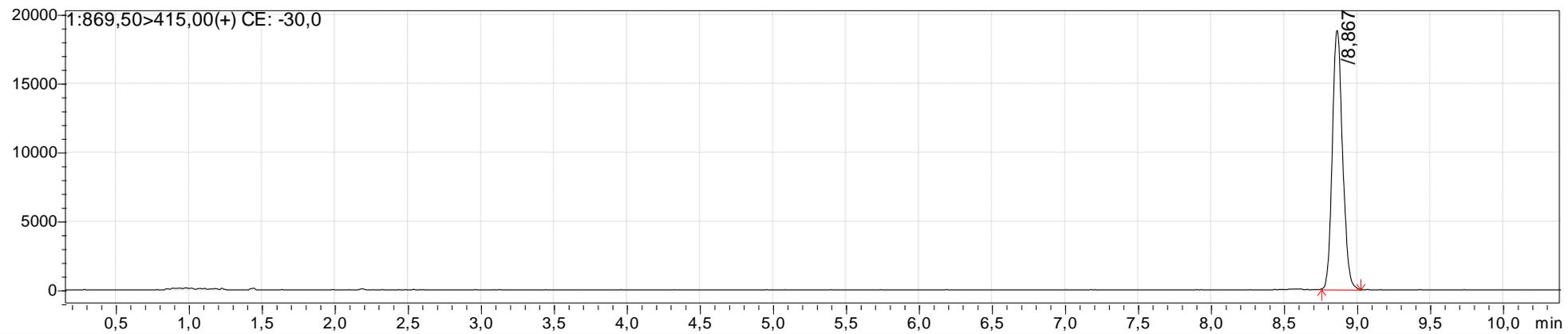


Fig. 11. Chromatogram of a solution of a standard sample of dioscin (1333 ng / ml).

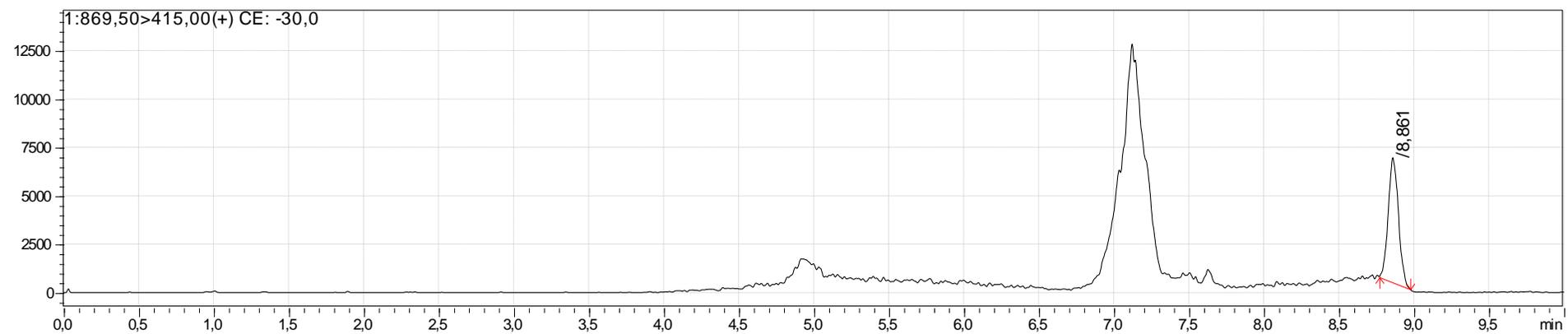
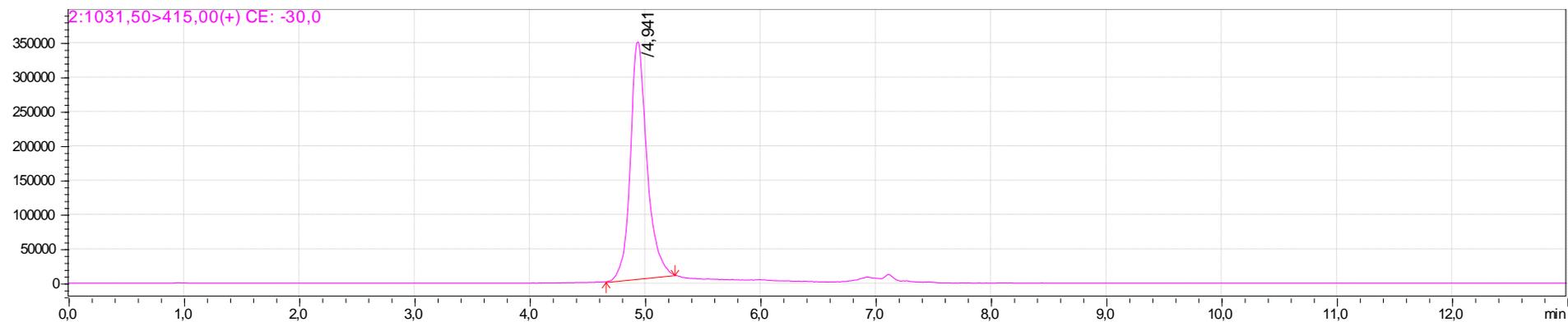


Fig. 12. Chromatograms of the sample solution from Moldova protodioscin (upper), dioscin (lower).

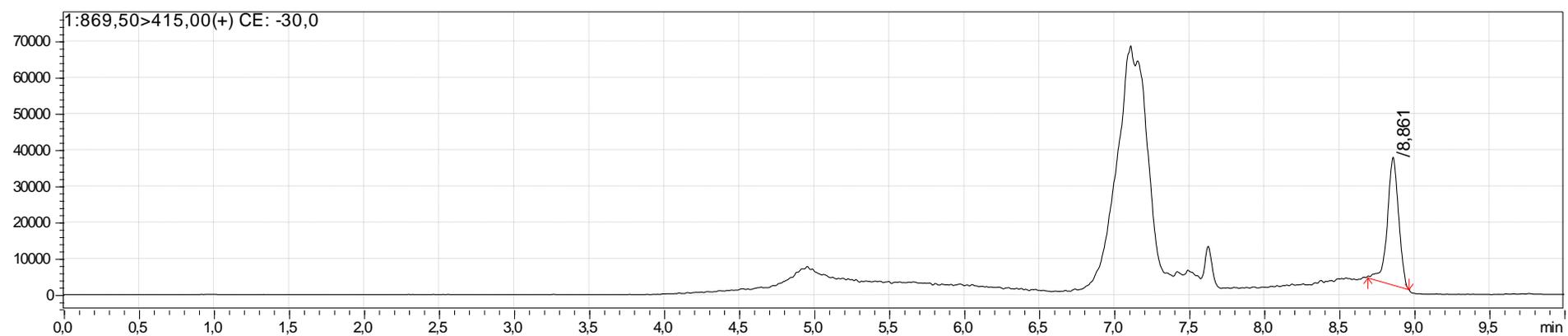
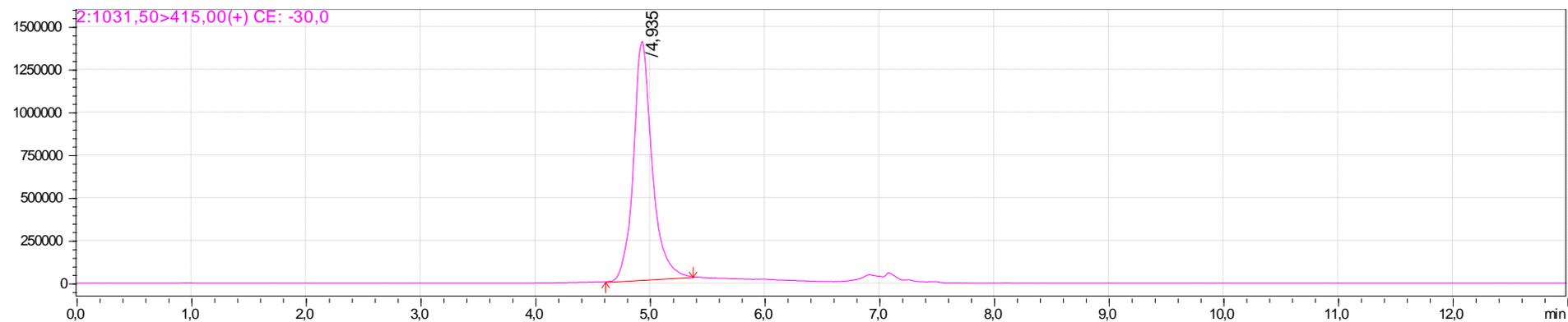


Fig. 13. Chromatograms of a solution of a sample from the Crimea (2017) protodioscin (upper), dioscin (lower)

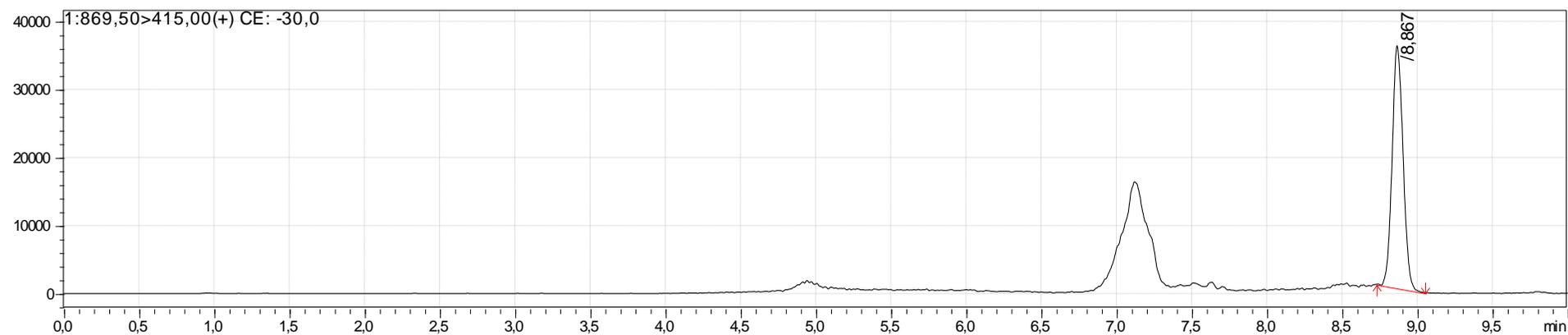
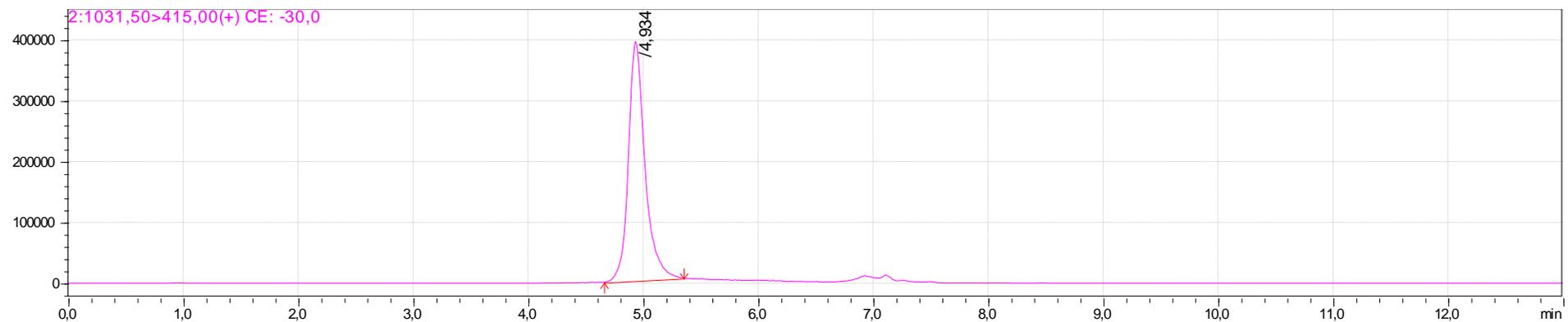


Fig. 14. Chromatograms of a solution of a sample from Syria (2018) protodioscin (upper), dioscin (lower).

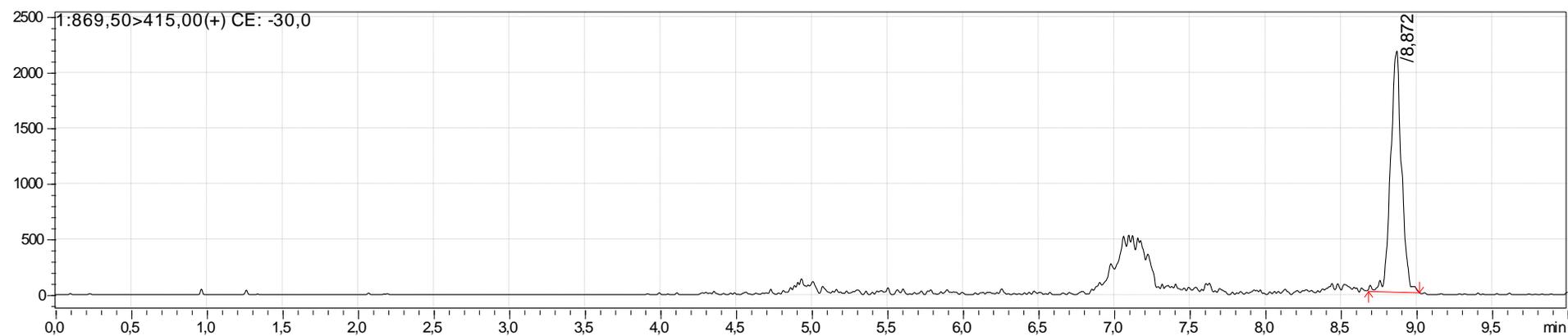
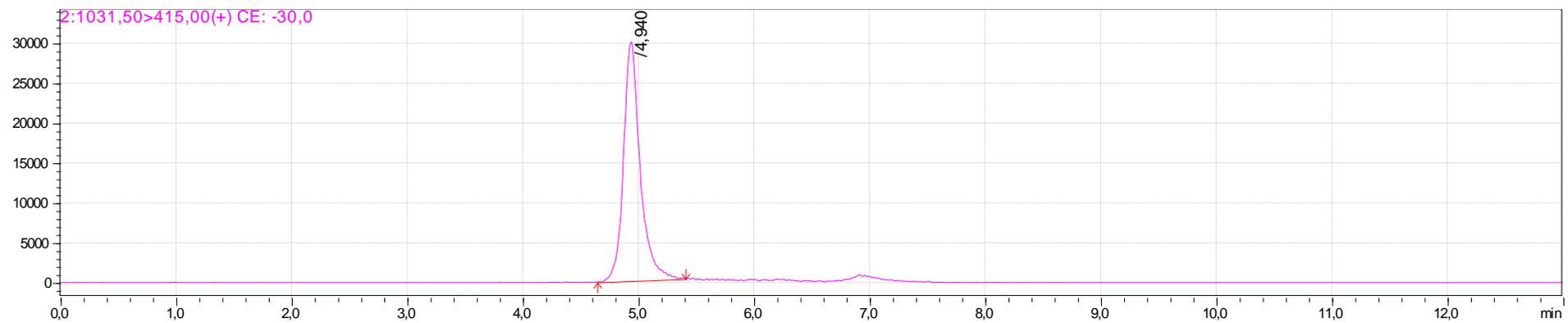


Fig. 15. Chromatograms of the sample solution from VILAR protodioscin (upper), dioscin (lower).

Thin layer chromatography (TLC)

1. Determination of the authenticity of saponins (furostanol glycosides)

About 1.0 g of raw material, crushed to a particle size passing through a 2 mm sieve, is heated under reflux in a boiling water bath for 15 minutes with 10 ml of alcohol 80%, filtered through a paper filter (test solution).

Chromatograph in a thin layer of sorbent in the system of chloroform – methanol – water (61: 32: 7). After drying, the chromatogram is sprayed with a 1% solution of para-dimethylaminobenzaldehyde in 4 mol / L methanol solution of hydrochloric acid and heated in an oven at a temperature of 60 °C for 2 – 3 minutes. Four pink spots appear (furostanol glycosides) (Fig. 16).

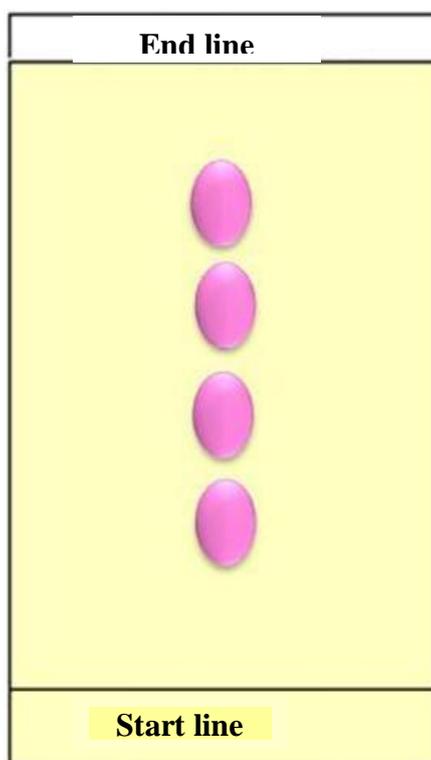


Fig. 16. Scheme of the chromatogram for extracting from *Tribulus terrestris* herba.

2. Determination of the authenticity of flavonoids [2]

Solution preparation

The solution of the standard sample routine. About 0.005 g of rutin (rutin trihydrate) is dissolved in 10 ml of alcohol 96%. The shelf life of the solution is not more than 3 months, when stored in a cool, dark place.

About 1.0 g of raw material, crushed to a particle size passing through a 2 mm sieve, is placed in a 100 ml flask, 15 ml of alcohol 80% are added, heated under reflux in a boiling water bath for 5 min, then extraction filtered through a paper filter (test solution).

On the start line of the Silufol analytical chromatographic plate, Silpearl sorbent is a broad-porous silica gel with a luminescent indicator, a substrate of aluminum foil measuring 15x5 cm is applied with 0.02 ml of the test solution and in parallel with 0.1 ml of standard sample rutin solution. The sample plate is dried at room temperature for 5 minutes, placed in a chamber, anhydrous formic acid — water — ethyl acetate (10:10:80) pre – saturated for 40 minutes with a mixture of solvents, and chromatographed in an ascending manner. When the solvent front passes 80-90% of the length of the plate from the start line, it is taken out of the chamber and dried until traces of solvents are removed (under draft at room temperature). Then the chromatogram is treated with aluminum chloride with a solution of 2% in 96% alcohol, kept in an oven at a temperature of 100 – 105 °C for 2 – 3 minutes and viewed in UV light at a wavelength of 365 nm. The chromatogram of the test solution should show 1 adsorption zone with yellow-green fluorescence at the level of a standard rutin sample ($R_f = 5.83$); detection of other adsorption zones is allowed (Fig. 17).

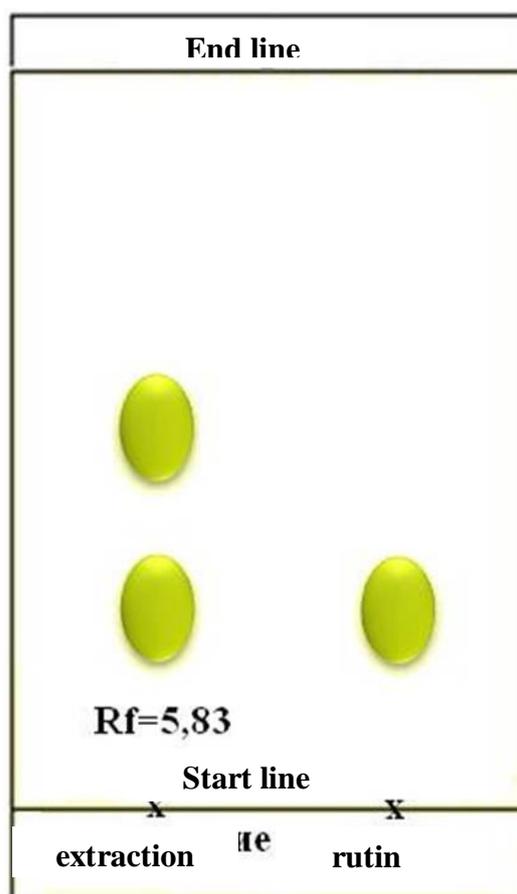


Fig. 17. Scheme of the chromatogram for extracting from *Tribulus terrestris* herba.

Quantitation. The literature [8] describes a method for the quantitative determination of saponins, however, we believe that this technique is difficult. The *Tribulus terrestris* herba besides saponins contains flavonoids, phenolcarboxylic acids, alkaloids, carotenoids, organic acids and other substances [10], therefore we propose to evaluate the quality of the *Tribulus terrestris* herba by the content of the sum of flavonoids and extractive substances. The method of spectrophotometric determination of the amount of flavonoids is express and easily feasible and allows you to objectively assess the quality of raw materials.

Whole *raw materials*, *ground raw materials*, *powder*: furostanol glycosides – not less than 0.7%; the amount of flavonoids, in terms of routine – at least 1%; extractive substances extracted with alcohol 50% – not less than 16%.

Furostanol Glycosides

An analytical sample of the raw material is crushed to the size of the particles passing through a sieve with holes with a diameter of 2 mm. About 5 g (accurately weighed) of the crushed raw material is placed in a 100 ml flask, 50 ml of methyl alcohol are added and a vitrified stirring bar is introduced.

The flask with the contents is weighed to the nearest 0.01 g, heated to a boil in a water bath with a magnetic stirrer and boiled for 1 hour. Then cooled to room temperature and weighed. Losses in the mass are replenished with methyl alcohol, mixed and filtered through a paper filter. 10 ml of the filtrate was transferred to a 50 ml volumetric flask. The volume of the solution was adjusted to the mark with methyl alcohol and mixed thoroughly (solution A). 5 ml of solution A is transferred to a glass tube, 5 ml of a 1% solution of para-dimethylaminobenzaldehyde in a 4 normal solution of hydrochloric acid in methyl alcohol is added (solution B). The tube is closed with a glass stopper, shaken and heated for 2 hours in an ultra – thermostat at a temperature of 58 ± 0.5 °C. The solution is cooled with water to room temperature and its optical density is determined at a wavelength of 516 nm in a cuvette with a layer thickness of 10 mm. As a comparison solution, use a mixture of 5 ml of solution A and 5 ml of a 4 normal solution of hydrochloric acid in methyl alcohol, which is also kept in an ultra – thermostat at 58 ± 0.5 °C. The content of furostanol glycosides in percent (X) in terms of absolutely dry raw materials is calculated by the formula:

$$X = \frac{C \times 0,009401 \times 50 \times 10 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W) \times k}, \text{ where}$$

C – Is the amount of cobalt chloride found by the calibration graph in grams; 0,009401 – conversion factor of the concentration of cobalt chloride to the concentration of furostanol glycosides; m – Is the mass of raw materials in grams; W – Is the loss in mass when drying the raw material in percent; k – Is the correction factor for the titer of hydrochloric acid.

Construction of a calibration graph. An exact sample of 5.0000 g of cobalt chloride is placed in a 100 ml volumetric flask, dissolved in water, 1 drop of concentrated hydrochloric acid is added and the volume is made up to the mark with water. In volumetric flasks with a capacity of 25 ml are selected with a burette of 2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 12.5 and 15 ml of the original solution and adjust the volume of the solution to the mark with water. The resulting solutions contain, respectively, 5,10,15,20,25,30 mg of cobalt chloride in 1 ml. The optical density of the solutions was measured on a spectrophotometer at a wavelength of 518 nm in a cuvette with a layer thickness of 10 mm, using water as a comparison solution. According to the results of measuring the optical density of the solutions, a calibration graph is constructed, plotting the cobalt chloride content in grams in 1 ml on the abscissa axis, and the optical density of the solution on the ordinate axis.

Note.

1. Preparation of a 4 normal solution hydrochloric acid solution. 340 ml of concentrated hydrochloric acid (density 1.19) is diluted with methyl alcohol to 1 liter. Setting the caption. 12 ml of the prepared solution is introduced into a volumetric flask with a capacity of 200 ml, the solution volume is adjusted to the mark with methyl alcohol and mixed thoroughly (0.5 normal solution of hydrochloric acid in methyl alcohol is obtained). Then proceed as indicated when setting the titer of a 0.5 normal solution hydrochloric acid.

2. Preparation of a 1% solution of para-dimethylaminobenzaldehyde. 5 g of para-dimethylaminobenzaldehyde are placed in a 500 ml volumetric flask, about 200 ml of a 4 normal solution of hydrochloric acid in methyl alcohol are added, and after the precipitate is dissolved, the volume is adjusted to the mark with a 4 normal solution of hydrochloric acid in methyl alcohol.

The amount of flavonoids in terms of rutin [3]

An analytical sample of the raw material is crushed to the size of the particles passing through a sieve with holes with a diameter of 2 mm About 3.0 g (accurately weighed) of the crushed raw material is placed in a flask with a thin section with a

capacity of 250 ml and 100 ml of 80% alcohol are added. The flask is attached to a reflux condenser and heated in a boiling water bath for 60 minutes, periodically shaking to flush the particles of the raw material from the walls. The hot extract is cooled and filtered through a Filtrak paper filter into a 100 ml volumetric flask so that particles of raw materials do not get on the filter. After cooling, the filter is washed with 80% alcohol, the extraction volume is adjusted to the mark and stirred (solution A).

In a 25 ml volumetric flask, place 2 ml of solution A, add 5 ml of a 2% solution of aluminum chloride in 96% alcohol, 1 drop of a solution of acetic acid 5% and adjust the volume of the solution to the mark with 96% alcohol (solution B). After 15 minutes, the optical density of the solution was measured on an SF-2000 spectrophotometer at a wavelength of 410 nm in a cell with a layer thickness of 10 mm.

The following solution is used as a comparison solution: 2 ml of solution A is placed in a 25 ml volumetric flask, 1 drop of 5% acetic acid solution is added and the volume of the solution is adjusted with 96% alcohol to the mark.

The content of the amount of flavonoids in terms of rutin – the standard for absolutely dry raw materials in percent (X) is calculated by the formula:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

where,

A – is the optical density (solution B) of the test solution;

A₀ – is the optical density (solution B) of standard sample of rutin;

a – a sample of raw materials in grams;

a₀ – is the portion of standard sample rutin in grams;

P – is the content of the basic substance in standard sample rutin in %;

W – is the loss in mass upon drying in %.

Preparation of standard sample rutin: about 0.05 g (accurately weighed) of standard sample rutin, previously dried at a temperature of 130 – 135 ° C for 3 hours,

placed in a 100 ml volumetric flask and dissolved in 85 ml of 96% alcohol when heated in a water bath, cooled, adjusted the volume of the solution with the same alcohol to the mark and stirred (solution A) with rutin.

2 ml (solution A) of standard sample rutin, 1 drop of a solution of acetic acid 5%, 5 ml of aluminum chloride solution of 2% in 96% alcohol, placed in a volumetric flask with a capacity of 25 ml and adjusted with 96% alcohol to the mark (solution B) of standard sample rutin.

Extractive substances

The determination of extractive substances is carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation [5,6], General Pharmacopoeia Monograph “Determination of the content of extractive substances in medicinal plant raw materials and medicinal herbal preparations.

About 1 g (accurately weighed) of the chopped medicinal plant material / preparation sifted through a sieve with holes of 1 mm in size is placed in a conical flask with a capacity of 200 – 250 ml, 50 ml of solvent are added *, the flask is closed with a stopper, weighed (with an accuracy of $\pm 0,01$ g) and left for 1 h. Then the flask is connected to a reflux condenser and heated to maintain a weak boil for 2 hours. After cooling, the flask with the contents again close with the same cork and weigh. The loss in mass of the contents of the flask is made up for with the same solvent. The contents of the flask are thoroughly shaken and filtered through a dry paper filter into a dry flask with a capacity of 150-200 ml. 25.0 ml of the obtained filtrate is pipetted into a previously dried porcelain cup with a diameter of 7 - 9 cm, dried at a temperature of 100 to 105 ° C, and the contents are evaporated to dryness in a water bath. A cup with a dry residue is dried at a temperature of from 100 to 105 ° C to constant weight, cooled for 30 minutes in a desiccator, at the bottom of which there is anhydrous calcium chloride, and immediately weighed.

The content of extractive substances in absolutely dry medicinal plant material / preparation in percent (X) is calculated by the formula:

$$X = \frac{m \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}{a \cdot (100 - W) \cdot 25}$$

Where

m – is the mass of dry residue, g;

a – is a hinge of medicinal plant material / preparation, g;

V – is the volume of extractant used in a single treatment of a medicinal plant material / preparation, ml,

W – is the moisture content of the medicinal plant material / preparation, %.

* For the *Tribulus terrestris* herba, we experimentally selected a solvent – ethyl alcohol 50%.

The results of our research

The results of our research are presented in table 3.

Table 3

The results of our research

Sample	Furostanol glycosides, %	The amount of flavonoids, %	Extractive substances, %
Russian Federation, VILAR Botanical Garden, Moscow city, 2016	0,85 ± 0,04	1,67 ± 0,06	22,58 ± 0,04
Russian Federation, Crimea, Laspi Bay, top of Mount Kushkaya, 2017	0,95 ± 0,08	1,36 ± 0,02	22,06 ± 0,03
Republic of Moldova, surroundings Kishinev city, 2017	0,88 ± 0,10	1,25 ± 0,02	16,62 ± 0,07
Syrian Arab Republic, surroundings Damascus city, 2018	1,01 ± 0,06	1,23 ± 0,08	16,13 ± 0,04
Syrian Arab Republic, surroundings Damascus city, 2019	1,02 ± 0,02	1,18 ± 0,04	25,75 ± 0,05
Russian Federation, Crimea, Nikita village, 2019	0,84 ± 0,04	1,22 ± 0,04	30,12 ± 0,03

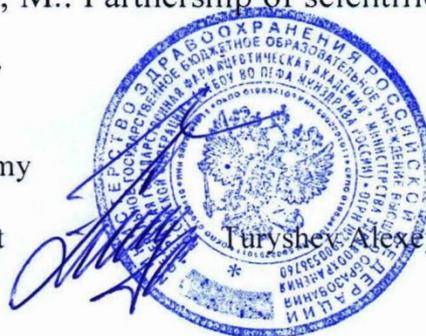
List of references

1. Anisimova A.G. Morphological and anatomical study of *Tribulus terrestris* herba / A.G. Anisimova, O.L. Blinova, V.D. Belonogova, Abdulkarim Affouf // Issues of ensuring the quality of medicines. - No. 3 (25) 2019. Pages 26-35.
2. Affouf, A. Determination of the main groups of biologically active substances of *Tribulus* grass A. Affouf, OL Blinova, A.A. Gileva, V.D. Belonogova // Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy: scientific and practical journal. - Perm: PGFA, 2019 .-- No. 24. - Pages. 115 - 118.
3. Affouf, Abdulkarim Development of a method for the quantitative determination of the sum of flavonoids in *Tribulus terrestris* herba / Affouf Abdulkarim, Gileva A.A., Blinova OL, Belonogova VD, Turyshev A.Yu. // Pharmacy, Volume 69, № 1. – Pages 17 – 22.
4. Affouf, Abdulkarim Phytochemical study of the *Tribulus terrestris* herba / Abdulkarim Affouf, Yu.N. Karpenko, D.K. Gulyaev, V.D. Belonogova, E.I. Molokhova, O.L. Blinova, A.A. Gileva // Pharmacy and Pharmacology. - 2019;7(6): pages 346-355.
5. *Affouf Abdulkarim Research on comprehensive quality assessment of tribulus terrestris grass/ Abdulkarim Affouf, Olga Leonidovna Blinova, Valentina Dmitrievna Belonogova //International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”. - September 14, 2019. Beijing, PRC. – P. 136-139.*
6. General pharmacopoeial article .1.5.3.0006.15 Determination of the content of extractive substances in medicinal plant materials and herbal medicines [Electronic resource] // State Pharmacopoeia of the Russian Federation. - 14th edition. - Access mode: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0006-15-Opredelenie-soderzhaniya-ekstraktivnyh-veshhestv-v-lekarstvennom-rastitelnom-syre-i-lekarstvennyh-rastitelnyh-preparatah/>

7. General pharmacopoeial article .1.5.3.0003.15 Technique of microscopic and microchemical studies of medicinal plant materials and herbal medicines [Electronic resource] // State Pharmacopoeia of the Russian Federation. - 14th edition. - Access mode: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-5-3-0003-15-tehnika-mikroskopicheskogo-i-mikrohimicheskogo-issledovaniya-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya-i-lekarstvennyh-rastitelnyh/preparatovov>.
8. Medicinal plants of the State Pharmacopoeia / ed. I.L. Samylina, V.A. Severtseva. - M.: ANSI, 2001. Pages 364 - 367.
9. Molokhova, E.I. The choice of conditions for mass spectrometric detection of dioscin in extraction preparations and Tribulus terrestris L. / E.I. Molokhova, Yu.N. Karpenko, A. Affouf // Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy. Materials scientific and practical. conf. from the international participation (December 13, 2018): Creation of competitive medicines is a priority in the development of pharmaceutical science, dedicated to the 100th anniversary of the departments: pharmacognosy, pharmaceutical technology, pharmaceutical chemistry. - Perm: PGFA, 2018. - No. 22. - Pages. 158 - 161.
10. Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. T. 3. Families Fabaceae - Apiaceae / Ed. ed. A.L. Budantsev. - SPb.; M.: Partnership of scientific publications of KMK, 2010. - Pages. 102 - 105.

Rector of Perm State Pharmaceutical Academy
Ministry of Health of Russia,
candidate of pharmaceutical sciences, docent

Head of the Department of Pharmacognosy
with a course of Botany of Perm State
Pharmaceutical Academy
Ministry of Health of Russia, Professor



Turyshchey Alexey Yuryevich

Belonogova Valentina Dmitrievna

Приложение Б.

Акты внедрения. Отчет по валидации методики
количественного определения суммы флавоноидов

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России)
Юридический адрес: ул. Екатерининская, д.101, г. Пермь, 614990
Почтовый адрес: ул. Полевая, д.2, г. Пермь, 614990
Тел/факс (342) 233-55-01; 236-90-50; E-mail: perm@pfa.ru; <http://www.pfa.ru>
ИНН 5902291011; КПП 590201001; ОГРН 1025900536760

ОТЧЕТ

О результатах количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве согласно методики, предоставленной аспирантом кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Аффуф Абдулкаримом.

Образец	Повтор	Влажность, %	Навеска, г	Найдено	
				Оптическая плотность, *	Содержание суммы флавоноидов, %
№1 Молдова, окрестности г. Кишинев, 2017 г.	1	7,60	3,0070	0,354	1,41
	2	7,60	3,0010	0,344	1,37
	3	7,60	3,0190	0,352	1,40
№2 Сирия, окрестности г. Дамаск, 2018 г.	1	6,20	3,0020	0,329	1,29
	2	6,20	2,9980	0,317	1,25
	3	6,20	3,0030	0,312	1,23
№3 Ботанический сад ВИЛАР, г. Москва, 2016 г.	1	5,90	3,0000	0,440	1,72
	2	5,90	3,0000	0,446	1,75
	3	5,90	2,9980	0,450	1,82

*Значение является средним из трех параллельных измерений.

SHIMADZU UV 1800 SPECTROPHOTOMETER

Дата проведения испытания 14.06.2019 г.

Руководитель РИЦ «Фарматест»

Исполнитель:

Заведующий лабораторией физико-химических методов РИЦ «Фарматест»



Т.Л. Малкова

Люст Е.Н.



Российский университет
дружбы народов (РУДН)



ИНСТИТУТ
БИОХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
И НАНОТЕХНОЛОГИИ (ИБХТН)

ул. Минлукхо-Маклая, д. 10к2, Москва, Россия, 117198
ОГРН 1027739189323; ОКПО 02066463; ИНН 7728073720

Телефон: +7495 936-86-25
nano.rudn.ru; bionano@rudn.ru

06 октября 20 20
№ 2020/484

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБХТН
доктор химических наук,
профессор


Я.М. Станишевский

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Аффуф Абдулкарима на тему «Фармакогностическое исследование якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L., произрастающих в России, сопредельных государствах и Сирийской Арабской Республике» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в практику ИБХТН РУДН, г.Москва

Комиссия в составе сотрудников ИБХТН РУДН, г.Москва: д. химических наук., профессора Станишевского Я.М, д. фарм.наук, профессора А.И Мараховой, к.фарм.н., доцента В.Ю Жилкиной, подтверждает использование материалов диссертационного исследования Аффуф Абдулкарима, посвященного фармакогностическому исследованию якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L., произрастающих в России, сопредельных государствах и Сирийской Арабской Республике в учебном процессе, при проведении практических занятий магистрантов, а также в научно – исследовательской работе кафедры.

Внедренные результаты способствуют разработке методик диагностики и определения качества якорцев стелющихся травы *Tribulus terrestris* herba.

Председатель комиссии:
Директор ИБХТН
доктор химических наук,
профессор

Члены комиссии:
доктор фармацевтических наук,
профессор

кандидат фармацевтических наук,
доцент

06 октября 2020 г.



Станишевский Я.М.

Марахова А.И.


Жилкина В.Ю.