

ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Санникова Евгения Геннадиевна

Фармакогностическое изучение ивы
трехтычинковой (*Salix triandra* L.),
произрастающей на Северном Кавказе

14.04.02 – ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ НАУК

Научный руководитель: О.И. Попова,
доктор фармацевтических наук,
профессор

ПЯТИГОРСК, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. БОТАНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ. ПРИМЕНЕНИЕ ИВЫ В НАРОДНОЙ И ОФИЦИАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ.....	13
1.1 Ботаническая характеристика ивы трехтычинковой.....	13
1.2 Распространение на территории России, особенности произрастания и культивирования.....	17
1.3 Химический состав ивы трехтычинковой и методы анализа биологически активных веществ.....	20
1.4 Использование видов ивы в народной и официальной медицине.....	26
1.5 Заключение по обзору литературы.....	33
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1 Объекты исследования.....	36
2.2 Приборы и оборудование.....	37
2.3 Методы исследования.....	39
2.3.1 Химические методы.....	39
2.3.2 Физико-химические методы.....	42
2.3.2.1 Метод тонкослойной хроматографии.....	42
2.3.2.2 Метод капиллярного электрофореза.....	44
2.3.2.3 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	46
2.3.2.4 Спектрофотометрический метод.....	47
2.3.3. Технологические методы исследования.....	53
2.3.4 Морфолого-анатомические исследования и определение показателей качества сырья.....	54
2.3.4.1 Микроскопическое исследование сырья.....	54
2.3.4.2 Методики испытаний растительного сырья.....	55
2.3.5 Биологические методы исследования.....	55
2.4 Статистическая обработка результатов экспериментов и валидационная оценка используемых методов.....	57

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА СЕВЕРНОМ КАВКАЗЕ.....	58
3.1 Качественный анализ биологически активных веществ ивы трехтычинковой.....	58
3.2 Определение фенологликозидов.....	59
3.3 Определение дубильных (окисляемых) веществ.....	66
3.4 Определение флавоноидов.....	75
3.4.1 Идентификация флавоноидов.....	75
3.4.2 Определение суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии.....	77
3.4.3 Определение рутина методом планарной хроматографии.....	81
3.4.4 Исследование флавоноидов методом капиллярного электрофореза.....	83
3.5 Изучение фенолкарбоновых кислот ивы трехтычинковой.....	88
3.6 Определение органических кислот.....	91
3.7 Изучение аминокислотного состава.....	95
3.8 Выделение и исследование полисахаридов.....	100
3.9 Исследование элементного состава.....	101
3.10 Определение пигментов	104
3.11 Сравнительная оценка результатов анализа биологически активных веществ побегов ивы трехтычинковой.....	113
Выводы по главе 3.....	115
ГЛАВА 4 ОБОСНОВАНИЕ НОРМ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ «ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ ПОБЕГИ».....	119
4.1 Морфолого-анатомические признаки	119
4.1.1 Морфологическое исследование.....	119
4.1.2 Микроскопическое исследование.....	120
4.2 Идентификация и определение количественного содержания основных биологически активных веществ побегов ивы трехтычинковой.....	125

4.3 Испытания.....	127
4.4 Установление срока хранения.....	129
Выводы по главе 4.....	132
ГЛАВА 5 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ	
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОРОШКА ПОБЕГОВ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ.....	133
5.1 Изучение высвобождения дубильных веществ из лекарственного растительного сырья в настое и отваре.....	133
5.2 Изучение фармакологической активности порошка побегов ивы трехтычинковой.....	134
5.3 Выбор метода деконтаминации порошка побегов ивы трехтычинковой.....	138
5.3.1 Использование СВЧ-облучения для деконтаминации порошка.....	139
5.3.2 Изучение возможности использования ионизирующего излучения для деконтаминации порошка.....	142
5.4 Технологические исследования порошка побегов ивы трехтычинковой.....	144
Выводы по главе 5.....	145
Заключение.....	147
Список сокращений.....	149
Список используемой литературы.....	151
Приложение 1 Валидационная оценка методик анализа.....	168
Приложение 2 Исходные материалы методик анализа.....	176
Приложение 3 Проект фармакопейная статьи «Ивы трехтычинковой побеги»...	186
Приложение 4 Инструкция по сбору и сушке побегов ивы трехтычинковой.....	199
Приложение 5 Нормы показателя «Микробиологическая чистота».....	210
Приложение 6 Акты внедрения и апробации.....	211

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Дикорастущие растения до настоящего времени являются важной сырьевой базой для производства многих лекарственных препаратов. Поэтому поиск новых сырьевых источников природных биологически активных веществ (БАВ) является актуальным.

Виды рода *Salix* L. (Ива) представляют значительный интерес, издавна используются в народной медицине как противовоспалительное и жаропонижающее средства.

В настоящее время кора ивы белой включена в Британскую (2009), Германскую (1991) фармакопеи, а также в Американскую травяную фармакопею (1999), а кора и однолетние побеги ивы волчниковой (*S. daphnoides* Vill.), пурпурной (*S. purpurea* L.), ломкой (*S. fragilis* L.) в Европейскую Фармакопею (ЕФ) (2005). За рубежом кора ивы входит в состав лекарственных средств (ЛС). Так, на фармацевтическом рынке Германии зарегистрировано три ЛС и более десяти гомеопатических препаратов, а во Франции – пять ЛС, содержащих кору ивы.

В последние годы в России зарегистрировано более 90 наименований биологически активных добавок к пище (БАД), в основном, зарубежного производства и только одно ЛС, содержащее кору ивы белой – «Инсти», который в настоящее время переименован в «Линкас ОРВИ» (производство Пакистан).

Анализ номенклатуры БАД и ЛС показал, что в их состав входит измельченная кора или сухой экстракт коры ивы белой. В тоже время, О.О. Хитевой (2012) и Т.М. Дементьевой (2016) на примере побегов ивы белой, ивы пурпурной, ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой установлено, что однолетние побеги имеют более обогащенный химический состав БАВ, чем кора и листья отдельно. Этими авторами показано, что противовоспалительная активность порошков побегов изучаемых видов ив оказалась сопоставимой с отваром и порошком коры ивы белой и препаратами сравнения: ацетилсалициловой кислотой (АСК) и диклофенаком натрия, что может являться

предпосылкой для более глубоких дальнейших исследований побегов других видов ив, произрастающих в России, и в частности на Северном Кавказе. Применение однолетних побегов расширит базу лекарственного растительного сырья (ЛРС) и уменьшит вред, который наносится растению при сборе коры.

В России накоплен богатейший опыт по выращиванию и переработки ив. Многочисленные исследования по выявлению площадей естественных зарослей ив, произрастающих в различных регионах нашей страны, приведены в работах известных ученых – саликологов: А.К. Скворцовым, О.И. Недосеко, И.В. Беляевой, Ю.П. Хлоновым, А.А. Афониным, Е.Т. Валягиной-Малютиной и др.

В связи с тем, что многие авторы считают, что одним из широко распространенных видов, который обеспечивает быстрый и высокий прирост фитомассы является ива трехтычинковая (*S. triandra* L.), именно данный вид ивы был выбран в качестве объекта исследования.

Степень разработанности темы исследования. Изучением химического состава, в основном, коры ивы трехтычинковой как за рубежом, так и в России занимались: Б.И. Бормотов, О.Э. Оразов, Р.Ю. Фаррахов, И.Ф. Мазан, Г.Н. Субоч, В.А. Кулак, В.Л. Шелюто, М. Vanhaelen, L. Pobłocka-Olech, P. Kenstavičienė и др., исследования которых касались определению дубильных веществ (ДВ), фенологликозидов (ФГ) и флавоноидов.

Химический состав ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, изучался В.А. Компанцевым (1970), которым в листьях обнаружены флавоноиды (рутин, кверцетин), в коре - фенольные гликозиды (салицин, триандрин). О.О. Хитевой в коре ивы трехтычинковой обнаружены фенологликозиды, флавоноиды, фенолокислоты (ФК), дубильные вещества. Нами не найдены сведения, касающиеся изучения химического состава побегов ивы трехтычинковой, растущей на Северном Кавказе.

Побеги ивы трехтычинковой представляют интерес как самостоятельное ЛС для приготовления отваров, так и для использования в виде порошка для перорального применения. Вполне вероятно, что определенное положительное фармакологическое действие могут оказывать и другие биологически активные

вещества, которые до сих пор не изучались в иве трехтычинковой, а именно пигменты, полисахариды, аминокислоты, макро- и микроэлементы. В Российской Федерации ива не является фармакопейным растением, включение ее в Государственную Фармакопею (ГФ) особенно актуально, благодаря выраженному фармакологическому действию, наличию больших сырьевых запасов и возможностью культивирования в различных эдафо-фитоценологических условиях.

Цель работы – фармакогностическое изучение ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, обоснование возможности использования однолетних побегов для получения лекарственных средств.

Поставленная цель может быть достигнута с помощью решения следующих **задач**:

- определить состав БАВ, характерных для ивы трехтычинковой, растущей на Северном Кавказе, используя современные методы анализа;
- изучить динамику накопления БАВ в сырье в зависимости от времени сбора и места произрастания (побеги без листьев, побеги, листья). Установить сроки заготовки;
- провести исследования по стандартизации и разработке проектов фармакопейной статьи (ФС) на сырье «Ивы трехтычинковой побеги» и инструкции по сбору и сушке побегов ивы трехтычинковой;
- определить фармакологическую активность порошка однолетних побегов ивы трехтычинковой;
- изучить возможность деконтаминации порошка побегов ивы трехтычинковой и его технологические характеристики.

Научная новизна. Впервые проведен комплексный химический анализ побегов ивы трехтычинковой, растущей на Северном Кавказе.

С помощью таких современных методов анализа, как тонкослойная хроматография (ТСХ), спектрофотометрия (СФМ), капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) изучены фенольные соединения ивы трехтычинковой, идентифицированы флавоноиды (рутин, причем лютеолин и нарингенин впервые), фенольные гликозиды (триандрин, салидрозид

впервые), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая, неохлорогеновая, цикориевая, коричная и феруловая кислоты), конденсированные дубильные вещества (катехин, эпикатехин, эпигаллокатехингаллат), а также танин и галловая кислота.

Определено количественное содержание суммы флавоноидов в побегах и листьях, фенологликозидов (салидрозида и триандрина), фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ в пересчете на танин, органических кислот.

Впервые в побегах ивы трехтычинковой обнаружены 16 аминокислот, из них 7 незаменимых для организма человека. Преобладающими в однолетних побегах являются моноаминомонокарбоновые кислоты: аспарагиновая, глутаминовая кислоты и лейцин. Найдено содержание свободных аминокислот в побегах.

Впервые с помощью спектрофотометрического метода определено содержание хлорофиллов в листьях ивы трехтычинковой в зависимости от места произрастания и сезонных факторов, а также с использованием различных экстрагентов изучены такие пигменты, как каротиноиды, ксантофилл и феофитин. Показано, что при сушке и хранении сырья, кроме хлорофиллов, накапливается и значительное содержание феофитина. Количественно определена сумма каротиноидов и ксантофиллов.

Атомно-эмиссионным методом в побегах ивы трехтычинковой обнаружены 8 микро- и 6 макро-эссенциальных элементов, 7 условно-эссенциальных микроэлементов.

Из побегов ивы трехтычинковой выделены полисахариды, определено количественное содержание пектинов, водорастворимых полисахаридов (ВРПС) и гемицеллюлозы.

С помощью проведенных фармакологических исследований порошка побегов ивы трехтычинковой выявлено наличие противовоспалительных свойств, сопоставимых с порошком коры ивы белой и кислотой ацетилсалициловой. Проведены морфолого-анатомические исследования цельных побегов ивы

трехтычинковой, а также их порошка, выявлены диагностические признаки, которые позволят проводить идентификацию сырья.

Показана целесообразность подтверждения подлинности побегов ивы трехтычинковой по идентификации фенологликозидов (триандрина и салидрозида), флавонолгликозида (рутина) и ДВ, а также стандартизации по количественному содержанию флавоноидов и ДВ. Определены оптимальные условия количественной экстракции из сырья фенологликозидов и ДВ, адаптированы методики их определения в сырье. Предложенные методики валидированы по показателям: линейность, правильность и прецизионность.

Изучение динамики накопления дубильных веществ и флавоноидов в сырье, собранном в 2013 - 2015 гг, позволили определить сроки его заготовки.

Новизна проведенных исследований подтверждена патентом «Способ получения противовоспалительного средства» на основе ивы белой, ивы пурпурной и ивы трехтычинковой» (Патент № 2582225).

Теоретическая и практическая значимость работы. *Теоретическая значимость.* Получены новые данные по морфолого-анатомическим признакам и по химическому составу побегов ивы трехтычинковой. Выявлены диагностические признаки исследуемого вида. Определено количественное содержание биологически активных веществ (фенологликозиды, флавоноиды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты). Экспериментально-практический материал, представленный в работе, может служить теоретической базой для исследования и создания лекарственных средств на основе сырья «Ивы трехтычинковой побеги».

Практическая значимость. Благодаря всестороннему исследованию побегов ивы трехтычинковой, может быть увеличена сырьевая база лекарственных растений для научной медицины. Сбор побегов даст возможность не только расширения сырьевой базы лекарственного растительного сырья, но и позволит снизить как ущерб, наносимый растению при заготовке коры, так и трудоемкость процесса заготовки. Разработан проект ФС «Ивы трехтычинковой побеги», апробированный на кафедре фармации ФГБОУ ВО СОГМА МЗ РФ и

«Инструкция по сбору и сушке побегов ивы трехтычинковой», апробированная ООО «Витаукт-пром», Республика Адыгея. Методики идентификации фенологликозидов и количественного определения рутина внедрены в учебный процесс аспирантов Пятигорского медико-фармацевтического института (ПМФИ) – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и фармацевтического факультета Кубанского ГМУ.

Методология и методы исследования. Методологическая основа построена на информационном поиске и анализе литературных данных по выбору перспективного объекта исследования. В качестве основных методов физического, химического и физико-химического анализа использовали тонкослойную хроматографию с видеоденситометрией, высокоэффективную жидкостную хроматографию, капиллярный зонный электрофорез, спектрофотометрию, макроскопический и микроскопический анализ, которые просты в выполнении, экспрессны и объективны. Использованы также способы деконтаминации ЛРС и методики определения противовоспалительной активности и ульцерогенного действия.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. результаты исследования химического состава побегов ивы трехтычинковой;
2. результаты морфолого-анатомического исследования побегов изученного сырья ивы, диагностические признаки сырья;
3. разработка методик идентификации и количественного определения БАВ сырья побегов ивы трехтычинковой. Результаты установления норм качества сырья;
4. обоснование возможности использования порошка побегов ивы трехтычинковой в качестве перорального противовоспалительного средства.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Полученные результаты достоверны, благодаря наличию большого объема экспериментальных исследований и использования современных методов анализа и их статистической обработки, что позволило получить воспроизводимые

результаты. Фрагменты диссертационной работы были доложены на научно-практических конференциях «От растения к препарату: традиции и современность» (23-24 апреля 2014 г, Москва), «Молодые ученые и фармация XXI века» (11-12 декабря 2014 г, Москва), «Изучение лекарственных растений» (март 2015 г, Пятигорск), «Современная фармация: проблемы и перспективы развития» (29-30 мая 2015 г, Владикавказ), «Беликовские чтения» (1-2 декабря 2015 г, Пятигорск / 6-7 декабря 2016 г), «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (24-25 мая 2016 г, Пятигорск), «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» (23-25 июня 2016 г, Москва), «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития» (20-21 октября 2016 г, Курск), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, доктора фармацевтических наук, профессора Д.А. Муравьевой (22 марта 2017 г, Пятигорск).

Связь темы с основным планом научных работ. Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры фармакогнозии и ботаники ПМФИ, номер государственной регистрации – 01201354514 «Фармакогностическое исследование дикорастущих и культивируемых растений с целью расширения сырьевой базы и внедрения в медицинскую практику».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно: пункту 5 – изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье и пункту 6 – изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и

контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 работа, из них в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК – 9. Получен один патент.

Личный вклад соискателя. Автор принимал участие в постановке цели и задач исследования, определении путей их реализации, проведении поиска отечественных и зарубежных источников литературы и их систематизации. Соискателем лично проведены все экспериментальные исследования, статистическая обработка и анализ полученных результатов, оформлены статьи и нормативная документация. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Объекты и структура диссертации. Диссертация представлена на 214 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, списка литературы, состоящего из 195 источников, в том числе 32 иностранных, содержит 52 таблиц, 42 рисунка и 6 приложений.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. БОТАНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ. ПРИМЕНЕНИЕ ИВЫ В НАРОДНОЙ И ОФИЦИАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

1.1 Ботаническая характеристика ивы трехтычинковой

Одним из перспективных растительных объектов для расширения номенклатуры лекарственных средств, обладающих вяжущим, кровоостанавливающим и противовоспалительным действием, являются различные виды ивы, которые с давних времен использовались в народной медицине, и находят широкое применение в составе различных биологически активных добавок к пище как за рубежом, так и в России [116].

В 2009 году был определен список растений, которые имеют первоочередное значение для включения в Государственную Фармакопею РФ, среди которых была отмечена ива [134].

В настоящее время в медицинской практике, в основном, используется ива белая (*Salix alba* L.) [116]. Многочисленные виды ивы, которые произрастают и широко культивируются на территории нашей страны, пока не нашли широкого применения в медицине. Всего в России произрастает около 80 видов ивы, причем они встречаются в различных климатических поясах, в частности на Северном Кавказе - около 20. Комплексным изучением ив занимается особая наука – саликология [26, 117].

В качестве объекта исследования нами взята широко распространенная и наименее изученная на Северном Кавказе ива трехтычинковая (*S. triandra* L.).

Ива трехтычинковая (*Salix triandra* L.) – многолетнее двудомное растение, относящееся к семейству *Salicaceae* (Ивовые) секции *Amygdalinae*. В литературе можно встретить следующие синонимы видового названия: ива трехтычинковая,

ива миндалелистная, белотал, белолоз. Существует 3 подвида *Salix triandra* L.: *S. triandra* ssp. *Bornmuellerii*, *S. triandra* ssp. *nipponica*, *S. triandra* ssp. *triandra* [21, 133].

Ива трехтычинковая (*Salix triandra* L.) - является высоким быстрорастущим кустарником или небольшим деревцем до 5 – 6 м высотой (рисунок 1.1). Отличается раскидистой густой кроной, длинными прутьевидными желтовато-зелеными побегами и миндалевидными листьями. Кора старых ветвей (начиная с диаметра 4-6 см) отслаивается неправильной формы пластинками («заплатками»), обнажая ржаво-коричневую пробку, не образуя грубых продольных (рисунок 1.2). Характерным признаком являются также легко отламывающиеся побеги в сочленениях. Цветоносные почки по внешнему виду одинаковые с вегетативными, сплюснутые, тупые. Черешки в верхней части с отчетливыми железками. Листья ланцетные, плоские. Сережки поздние, на длинных олиственных ножках, узкоцилиндрические, большей частью изогнутые или несколько поникающие (рисунок 1.3). Прицветные чешуи бледные, у женских цветков при созревании коробочек полностью или в значительной мере опадающие. Тычинок три, опорожнившиеся пыльники искривленные (это вызывается тем, что оба пыльцевых мешка обращены не в сторону, а вперед). Коробочки на длинных (1-2 мм) ножках, почти веретеновидные, мелкие (зрелые длиной 3-4 мм), с очень короткими столбиком и отогнутыми двуллопастными рыльцами. Мужские сережки опадают вскоре после цветения; женские – после созревания семян и вылета их из коробочек [21, 133].

В природе встречаются 2 формы растения: одноцветная (*f. concolor*) и двухцветная (*f. discolor*). В связи с этим нижняя сторона листа у *S. triandra* может быть либо зеленой без налета (*f. concolor*), либо беловатой от воскового налета (*f. discolor*). Этот признак постоянен для всех листьев на кусте и, к тому же, легко заметен. Кроме разной окраски нижней стороны пластинки листа, между двумя формами нет никаких других различий. В отличие от *S. triandra* ssp. *triandra* подвид *S. triandra* ssp. *nipponica* имеет порослевые побеги с сизым налетом, а подвид *S. triandra* ssp. *Bornmuellerii* – побеги и листья густо коротко опушенные [133].



Рисунок 1.1 – Ива трехтычинковая (фото автора)



Рисунок 1.2 – Ива трехтычинковая (характерный вид коры, фото автора)



Рисунок 1.3 – Однолетние побеги ивы трехтычинковой во время цветения
(фото автора)

А.А. Афонин отмечает, что разновидности ивы трехтычинковой отличаются по морфологии листовых пластинок. Типичная форма – *S. triandra f. vulgaris* Wimm. характеризуется ланцетовидными листьями с индексом продолговатости, равным от 3,5 до 4,5. Были описаны также и формы с широкоэллиптическими (*S. triandra f. latifolia* Schatz. (Toeppf.)) и узкими (*S. triandra f. angustifolia* Ser.)

листьями. Кроме того, в Брянской области обнаружены устойчивые формы ивы трехтычинковой, различающиеся по морфологии листовых пластинок (длиннолистная - *S. triandra f. longifolia* и коротколистная - *S. triandra f. brevifolia*) [6].

1.2 Распространение на территории России, особенности произрастания и культивирования

Ивы произрастают в самых разнообразных условиях. Благодаря способности легко возобновляться и вегетативно, и семенами, ивы часто являются пионерами зарастания нарушенных территорий. Большинство ив – влаголюбивые и светолюбивые деревья, растущие по берегам рек, по болотам и их окраинам, по сырым лесам, заболоченным лугам и т.д. Их можно встретить в составе насаждений на возвышенных участках. В лесах они встречаются только как примесь к другим породам, на более светлых местах [21]. Следует отметить важную экологическую роль ив, произрастающих на Северном Кавказе и, в частности, в Ставропольском крае. Они сохраняют берега больших и малых рек от размывания, предохраняют прибрежные пески от ветровой эрозии [17, 45].

Большое количество микропонижений в поймах рек Северной Осетии (р. Ардон, р. Дур-Дур, р. Гизельдон), Ингушетии и Чечни (Терско-Сунженский бассейн), Кабардино-Балкарии (р. Малка, р. Черек), Карачаево-Черкессии (р. Кубань), Ставропольского края (р. Кубань, р. Подкумок, р. Аликоновка, р. Кума) создает благоприятные экологические ниши для поселения ивы, выдерживающей длительный застой воды [38, 113].

В естественных условиях ивы расселяются, главным образом, при помощи семян. Семена легко переносятся ветром. Появившийся корешок в первые 3-5 дней растет довольно быстро, особенно у прибрежных видов – ивы остролистной, трехтычинковой, корзиночной, ломкой и белой [21].

В России накоплен богатейший опыт выращивания ив и переработки продукции ивоводства [5]. Е.Т. Валягина-Малюткина отмечает, что тщательные

исследования по созданию лесных культур и использованию естественных ивняков России приведены в работах многочисленных известных ученых. Выявление площадей естественных ивняков проводилось также в Белоруссии и в Украине [21]. Методологические принципы создания устойчивых высокопродуктивных насаждений ив на примере Брянского лесного массива описаны в работах А.А. Афонаина [4]. О перспективах селекции ив, изучению их устойчивости и продуктивности посвящено большое количество работ ученых-ботаников России и некоторых зарубежных стран [4, 183, 184]. В России в помощь работникам, прежде всего лесоводства, мелиорации, кожевенной, целлюлозной и др. промышленности, созданы атласы и определители, включающие в себя описание всех видов ив, произрастающих на территории России. Так, О.И. Недосеко описаны виды ив Нижегородской области [77], И.В. Беляевой с соавт. – ивы Урала [39], Ю.П. Хлоновым – ивы Сибири [158], А.А. Афониным – ивы среднего Подесенья [5], ивам Европейской части России посвящена работа Е.Т. Валягиной-Малютиной [21].

По данным А.А. Афонаина, ареал произрастания ивы трехтычинковой это: Средняя и Атлантическая Европа, Северный и Восточный Казахстан, Средиземноморье (отсутствует в Греции), Дальний Восток, Монголия, Южная Скандинавия (до 67° 30' с.ш.), Китай, Япония, Малая Азия, Кавказ, Северный Иран. Восточная Европа является географическим центром произрастания ивы трехтычинковой, где она встречается на всей территории. Растение отлично произрастает во всех странах с тёплым и жарким климатом [6].

Ареал произрастания ивы трехтычинковой (*S. triandra* ssp. *triandra*) в нашей стране достаточно широкий и занимает почти всю европейскую часть России, доходя на севере до линии Петрозаводск – Вологда – Киров, и Северный Кавказ, встречается на территории Западной и Средней Сибири (до 65° с.ш.), в том числе в бассейне реки Лены (вблизи г. Иркутска). Это говорит о том, что растительные ресурсы ивы трехтычинковой огромны. Однако, ареал распространения других подвидов: *S. triandra* ssp. *Bornmuellerii* – Малая Азия; *S. triandra* ssp. *nipponica* распространена от Прибайкалья и далее к востоку [6, 21, 133].

Характер распространения двух форм несколько различен: в Западной и Средней Европе и на Кавказе в горных районах преобладает *f. concolor*, а на низменности - *f. discolor* [133].

Ива трехтычинковая – типичный пойменно-аллювиальный вид. Заросли ивы трехтычинковой располагаются обычно в поймах рек, где идет накопление аллювия, а также вдоль русел рек, по берегам протоков и стариц, на песчаных косах и отмелях. Заросли не имеют сплошного распространения, связаны с рельефом поймы, часто разбросаны в форме куртин, полос и островов, разделенных водой или лугом [113].

По данным ученых Ставропольского ботанического сада, ива трехтычинковая является засухоустойчивым и зимостойким растением. Выносит сульфатное засоление почвы (более 0,16% сульфат – иона от массы абсолютно сухой почвы) при достаточном увлажнении [45].

Также следует отметить возможность культивирования ивы трехтычинковой в различных эдафо-фитоценотических условиях, так как она наиболее легко подвергается вегетативному размножению и прекрасно размножается черенками, кольями и хлыстами, незаменима в защитном лесоразведении, может культивироваться во всех районах, кроме Крайнего Севера [4, 67, 76, 147]. Кроме того, из исследованных видов в естественных ивняках по углерододепонирующей и кислородопродуцирующей функции можно выделить иву трехтычинковую, у которой среднегодовой показатель поглощения углекислого газа составляет 10,3 т/га, выделение кислорода 8,0 т/га и усвоение углерода соответствует 2,9 т/га в год [65].

На примере изучения продуктивности (запаса фитомассы) отмечено, что в Воронежской области продуктивность в пересчете на абсолютно сухое сырье ивы трехтычинковой больше на 2,6 т, чем ивы пурпурной. Л.А. Логиновой отмечено, что продуктивность ивы трехтычинковой составляет: сырой лозы 18,4 т/га; абсолютно сухой лозы 7,3 т/га (густота посадки 83,3 тыс. шт/га с размещением 0,8×0,15 м), в то время, как у ивы белой 7,3 т/га сырой и 2,9 т/га абсолютно сухой лозы. Таким образом, Л.А. Логинова считает, что одним из видов, который

обеспечивает быстрый и высокий прирост фитомассы является ива трехтычинковая (*S. triandra* L.) [65]. В связи с этим именно данный вид ивы был выбран в качестве объекта исследования [52].

1.3 Химический состав ивы трехтычинковой и методы анализа биологически активных веществ

В соответствии с литературными данными различные виды семейства Ивовые имеют богатый состав фенольных соединений (флавоноиды, фенологликозиды, фенолкарбоновые кислоты и дубильные вещества). При этом в различных видах ив представлен самый разнообразный состав представителей каждого класса соединений [152].

В связи с тем, что объектом нашего исследования является ива трехтычинковая, особое внимание уделено нами поиску литературных сведений по изучению химического состава именно этого вида ивы.

В соответствие с данными, представленными в академическом труде «Растительные ресурсы СССР, 1986», до 1985 года в иве трехтычинковой, произрастающей на территории республик бывшего Советского Союза, обнаружены многие классы соединений, которые содержатся в растительных объектах [112].

Среди фенологликозидов найдены: салицин (кора – менее 0,1%, в листьях и соцветиях – следы), салирепозид (кора – менее 0,1%), грандидентатин (кора – менее 0,1%), триандрин (кора – 0,1-1%, следы в листьях), салидрозид (кора – 1-2%, следы в листьях). Идентифицированы также фрагилин (кора, листья), вималин (листья), тремулоидин (листья), саликортин (листья). Сумма фенологликозидов составляет в коре – 1,6%, в листьях – 0,2% [112].

Среди дубильных веществ обнаружены: катехин в коре – 0,52% и лейкоантоцианидины в листьях. Сумма ДВ содержится в коре в пределах 2,4 – 21%, в ветвях – 0,9 – 8,7%. Класс флавоноидов представлен рутином и кверцетином (листья и соцветия) и лютеолином (листья). В коре обнаружены

салипурпозид и изосалипурпозид. Кроме того, в листьях найдены антоцианы, проантоцианидины, алкалоиды, сложные эфиры оксикоричных кислот, пипеколиновая кислота, витамины С и Р, фенолы, сахара. Древесина ивы трехтычинковой содержит большое количество целлюлозы (47,7%) и пентозанов (18-22,5%), а также лигнин и жирное масло. В коре найдены полисахариды (23,8%), лигнин, жирное масло, фенолы, витамины С и Р, антоцианы (3-глюкозид дельфинидина, 3-глюкозид цианидина, 3-глюкозид петунидина) [112].

В.А. Компанцев в 60-80-х годах прошлого столетия занимался изучением химического состава ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе. Им найдены в соцветиях флавоноиды: рутин и кверцетин (3,7%), в листьях – рутин (5%), в коре – салипурпозид и нарингенин (1,5%). Кроме того, в коре им обнаружены фенологликозиды: салицин, салидрозид и триандрин в количестве 2,1% - 3%. Найдены также в коре из фенолокислот – хлорогеновая кислота (сумма ФК – 3%), из дубильных веществ – производные пирогаллола [48].

В последние годы химический состав коры ивы трехтычинковой Северного Кавказа изучала О.О. Хитева [157]. В коре найдены флавоноиды в количестве 0,4%, фенологликозиды (салицин - 0,2%, триандрин), фенолкарбоновые кислоты – 0,29% (феруловая, п-кумаровая, коричная), конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества в сумме до 9,4% (лейкоантоцианидины, эпикатехингаллат, катехин), а также тритерпеновые сапонины – 0,14% (урсоловая кислота) [152, 157].

Флавоноиды. Количественное определение рутина в листьях ивы трехтычинковой, которое проводилось в 60-е годы XX века спектрофотометрическим методом, требовало длительной пробоподготовки (извлечение из сырья, ТСХ, извлечение из хроматографического слоя метанолом индивидуальных флавоноидов, удаление растворителя, растворение в этаноле, измерение оптической плотности). Параллельно в этих же условиях проводилось определение оптической плотности рутина [48, 151]. В настоящее время описаны доступные и простые методы определения флавоноидов в растительном сырье.

Так, в коре ивы трехтычинковой О.О. Хитевой спектрофотометрическим методом на основе реакции с алюминия хлоридом найдено 0,41% флавоноидов [157].

Р.Ю. Фарраховым установлено, что в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей в Башкортостане, преобладают флавонолы (производные агликонов кверцетина, изорамнетина и кемпферола) [147]. О.Э. Оразовым выявлено, что содержание суммы флавоноидов в листьях двух форм ивы трехтычинковой (*f. concolor* и *f. discolor*), произрастающей в районе Предуралья, незначительно отличается и составляет около 1,9% - 2,1% (время сбора - сентябрь) и 2,1 – 2,2% (время сбора - август). При этом, в листьях мужских и женских растений различия по содержанию флавоноидных соединений достоверно проявляются в период цветения – начало плодоношения, а затем в ходе вегетации они нивелируются [78, 92].

Изучению флавоноидов листьев ивы трехтычинковой и ивы остролистной, произрастающих в Белоруссии, посвящена работа В.Л. Шелюто [151].

Однако в листьях и побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, до настоящего времени определение флавоноидов современными физико-химическими методами не проводилось.

Фенологликозиды. Известно, что салицин и его производные являются хемотаксономическими маркерами видов рода Ива. Они несут ответственность за фармакологическую активность коры ивы [165].

Ранее для количественного определения ФГ описан метод ТСХ с последующей экстракцией. В.А. Компанцевым при экстракции больших количеств свежей коры ивы трехтычинковой были выделены индивидуальные ФГ в кристаллическом виде и установлена их масса, сумма ФГ в сырье составила порядка 3% [48]. Для количественного определения ФГ описан также метод ТСХ с последующей денситометрией [189].

В анализе фенольных гликозидов широко использовался также метод газовой хроматографии. Однако для анализа требовалось получение силильных производных, которые для некоторых фенольных соединений оказались даже после дериватизации не достаточно летучи [165]. Описано также использование

для определения ФГ метода квадратно-волновой вольтамперометрии. В литературе имеются данные о количественном определении ФГ в листьях ивы в пересчете на салидрозид по методике ГФ XI изд. на сырье родиолы розовой, где используется метод спектрофотометрии на основе реакции диазотирования [54, 57].

В настоящее время для определения фенологликозидов применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [165]. Согласно требованиям Европейской и Британской фармакопей определение содержания общего салицина в коре ивы проводят методом ВЭЖХ после щелочного гидролиза [192, 193]. Кроме того, по Европейской Фармакопее 5-го издания, в качестве сырья (кора или побеги) могут использоваться различные виды ивы, содержащие не менее 1,5% салицина [193].

Методом ВЭЖХ при исследовании фенологликозидов в некоторых видах ив, произрастающих на территории Польши, салицин и саликортин были найдены в четырех видах, но не в иве трехтычинковой, в коре которой был обнаружен триандрин [170].

Метод ВЭЖХ был использован также и для определения салицина в коре 12 видов ив, произрастающих на территории Латвии. Оказалось, что не все виды ивы накапливают одинаковое количество салицина. Найдено, что содержание салицина в коре различных видов ив колебалось от 0,04 до 12,6%. Обнаружено, что некоторые виды ив, в том числе ива трехтычинковая, ива корзиночная, ива шерстистопобеговая и др., обладали крайне низким содержанием салицина [165].

В соответствии с МУ 08-47/172 «Кора ивы и осины, экстракты из них и БАД на их основе. ВЭЖХ метод определения массовой концентрации салицина» определение салицина в водных извлечениях из коры ивы проводится также методом ВЭЖХ, но без щелочного гидролиза [53]. О.О. Хитевой данным методом определено количественное содержание салицина в коре ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, которое составило 0,2% [157].

В 1997 году S.E. Zaugg опубликовал данные по использованию капиллярного электрофореза (КЭ) для анализа салицина в некоторых видах ивы

[195]. С.П. Сенченко проведены исследования по изучению электрофоретического поведения ФГ методом КЭ на примере салидрозида, арбутина и триандрина, который по современной классификации проф. В.А. Куркина относится к группе фенилпропаноидов, так как не содержит в своей структуре фрагмент салигенина [58, 130].

Таким образом, представленные работы свидетельствуют о том, что не все виды ивы могут содержать большие количества салицина, среди которых находится и ива трехтычинковая. Наличие салицина, даже в незначительных количествах, очевидно, зависит от места произрастания и времени сбора сырья. В литературе нами не найдены сведения об исследовании ФГ современными методами в побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе.

Дубильные вещества. Известно, что вяжущее, кровоостанавливающее и противовоспалительное действие может быть обусловлено наличием в коре и листьях различных видов ивы значительного количества дубильных веществ [21].

Имеются сведения, что весной (в апреле) в период набухания и распускания почек и осенью (в октябре) в период массового листопада и полного опадания листьев наблюдается максимальное содержание танинов у отдельных видов ив [30]. Наибольшее содержание танинов наблюдается в коре ивы в возрасте от 3 до 6 (8) лет. Кроме того, на примере ив, произрастающих в Новосибирской области, показано, что распределение дубильных веществ у ивы трехтычинковой на разной высоте дерева неравномерно, и оно постепенно снижается от основания дерева к вершине [21, 30, 92].

И.Ф. Мазан отмечает высокое содержание танинов (до 16,1%) в коре ивы трехтычинковой, произрастающей на прирусловых отмелях и на пойменных почвах Витебской и Гомельской областях Белоруссии [66]. В.И. Бормотов и В.Н. Нилов указывают на еще большее содержание ДВ (от 12,6 до 18,73%) также в коре ивы трехтычинковой, произрастающей в Архангельской области [12]. Довольно значительное содержание ДВ в коре ивы трехтычинковой, произрастающей в Новосибирской области и Предуралье, отмечают Г.Н. Субоч, О.Э. Оразов и др. [21, 92, 143].

Показано также, что и среди исследованных видов ив Башкортостана наиболее высоким содержанием танинов в коре ветвей в начале и в конце вегетации выделялся ряд видов ив, в том числе и кора ивы трехтычинковой (до 16%) [78]. При определении содержания танинов в образцах коры как ветвей мужских и женских растений, так и в двух формах (*f. concolor* и *f. discolor*), отобранных в течение сезона вегетации, достоверных различий по накоплению ДВ не выявлено [30, 78].

Содержание ДВ в растительных объектах определяется, в основном, перманганатометрическим методом. Кроме того, ГФ РФ XIII изд. предлагает проводить определение суммы ДВ спектрофотометрическим методом по реакции полифенольных соединений с фосфорномолибденово-вольфрамовым реактивом до и после добавления кожного порошка, который осаждает только дубильные вещества [87, 88, 121].

Таким образом, кора ивы трехтычинковой содержит значительные количества ДВ и является не только источником их получения для кожевенной промышленности, но и может служить сырьем для получения лекарственных препаратов. Е.Т. Валягина-Малютина пишет, что в настоящее время совершенствуется технология заготовки и переработки танинсодержащего сырья, а также возможность получения танинов из побегов ивы в более молодом возрасте (от 1 до 7 лет). Кроме того, планируется и введение в культуру высокотанинных видов ив, например, ивы трехтычинковой, ивы корзиночной, ивы шерстистопобеговой и их гибридов [21].

Кроме проведенных исследований по изучению химического состава коры и листьев ивы трехтычинковой в отношении фенольных соединений, имеются работы по выявлению некоторых БАВ другой природы. В частности, это относится к обнаружению тритерпеновых сапонинов и ряду других соединений [157].

Так, А. Бовкиным и соавт. проведены исследования антиоксидантной активности водных вытяжек, полученных из листьев ивы трехтычинковой,

произрастающей в Белоруссии, и установлено, что она обусловлена наличием значительного количества фенольных соединений [11].

В побегах *S. viminalis*, *S. triandra*, *S. alba*, *S. fragilis*, *S. purpurea* флоры Украины обнаружено более 20 аминокислот, из которых 9 являются незаменимыми [13, 14, 152], а в побегах ивы козьей исследован элементный состав [168].

Установлено также, что в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей в Башкортостане, незаменимых аминокислот содержится не более 20 мг/100 г (лейцин, фенилаланин, лизин, аргинин, метионин), что составляет около 30% от общего содержания аминокислот [147].

Таким образом, наиболее полно изучен химический состав только **коры** ивы трехтычинковой, в том числе и произрастающей на Северном Кавказе. Имеется ряд работ по исследованию БАВ листьев и побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на других территориях России и зарубежных стран, в которых, в основном, изучалось содержание фенольных соединений (флавоноиды, фенологликозиды, дубильные вещества). Однако, практически отсутствуют сведения о содержании других БАВ (полисахариды, фенолокислоты, аминокислоты, оксикоричные кислоты, сапонины, макро- и микроэлементы, пигменты).

1.4 Использование видов ивы в народной и официальной медицине

Давно известно, что большинство древовидных и кустарниковых ив обладают такими техническими свойствами, которые очень редки у наших отечественных лесных пород. Это быстрота роста, их гибкость и вязкость, незаменимая для изготовления плетеной мебели и тары, садово-огородных изделий (кольев, тычин, стоек, мелких обручей и т.д.). Ива хороша как мелкий поделочный хозяйственный материал, а в возрасте 8-20 лет – как строительный материал. Ивовая кора – прекрасный материал для дубления кожи, а древесина – ценнейший материал для интенсивно развивающейся целлюлозно-бумажной

промышленности [17]. Причем самый высокий процент выхода целлюлозы оказался у гибридного экземпляра ивы ломкой и трехтычинковой (47,9%) [16]. Многие виды ивы используются как декоративные растения для озеленения и популярного современного направления ландшафтного дизайна. Ивы широко используются в лесомелиоративном и полезащитном лесоразведении [16, 112].

Применение в народной медицине. Использование ивы как лечебного средства известно с древнейших времен, о чем упоминается в Папирусе Эберса, в трудах Гиппократ (460-377 гг до н.э.) и Авл Корнелия Цельса (1 век н.э.) [167, 171, 179]. В настоящее время применение ивы в народной медицине описано во многих справочных изданиях [1, 94, 144]. Извлечения коры ивы оказывают противовоспалительный, мягкий анальгетический и жаропонижающий эффект. Механизм действия обычно объясняется наличием природных салицилатов, которые влияют на разные звенья регуляции гомеостаза [75, 161, 188].

Однако, почти во всех справочных изданиях описано применение коры ивы белой, и только в одной работе собраны сведения об использовании в народной медицине ивы трехтычинковой [60]. В работе указано, что наличие дубильных веществ делает возможным применение отваров коры ивы трехтычинковой (белолоза) в качестве средства для борьбы с диареей неинфекционного характера, для лечения больных с ревматическим поражением суставов, а также при подагре. Отвары могут применяться также и для лечения некоторых заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки, например, гастрите с повышенной кислотностью, а также наружно при повышенной потливости. Противомикробная и противовирусная активность отваров коры настолько высока, что многие целители раньше использовали средства из белолоза для лечения таких серьёзных заболеваний, как малярия и туберкулёз [60].

Фармакологические исследования. В последние годы учеными проведен ряд фармакологических исследований, позволяющих обосновывать эффективность экстракта коры ивы не только превращением салицина в ацетилсалициловую кислоту. Существенное влияние на фармакологический эффект оказывают и другие БАВ коры ивы – фенольные соединения, такие как

флавоноиды, дубильные вещества и др. Показано, что извлечения коры ивы имеют высокое содержание флавоноидов и других фенольных соединений и способны ингибировать ферменты воспаления (ЦОГ-1, ЦОГ-2 и липоксигеназу) [177, 178]; проявляют хондропротекторное и антиоксидантное действие [153, 164, 178, 182]. Рядом ученых доказана эффективность коры ивы при остеоартрозе [173, 174] и радикулите [178]. В работе О.Д. Барнаулова отмечено, что флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и дубильные вещества имеют сходство фармакологического действия с адреналином и норадреналином, то есть способны оказывать не прямое адреномиметическое действие [8]. Обнаруженное иммуномодулирующее действие извлечений коры ивы корзиночной обусловлено наличием фенилпропаноида - триандрина [136, 149]. Кроме того, обнаружена выраженная противоязвенная активность коры и антистрессорная активность настоя листьев ивы корзиночной [108]. В опытах на животных показана целесообразность включения экстракта ивы белой в гидрогель противоартрозного действия [49].

Проведены успешные клинические испытания экстракта коры ивы белой для лечения остеоартроза и хронических ревматических заболеваний в сравнении с современными нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС) [23, 36, 63, 181, 185]

Таким образом, одним из перспективных видов ЛРС для внедрения в клиническую практику при заболеваниях суставов является кора различных видов ивы [1, 50, 163, 186].

В последние годы изучалась фармакологическая активность водно-спиртовых извлечений из коры и побегов некоторых видов ив, произрастающих на Северном Кавказе. При изучении противовоспалительной активности отваров коры ивы белой и ее однолетних побегов, оказалось, что по угнетению экссудации и пролиферации они сопоставимы с кислотой ацетилсалициловой, а по анальгетической активности не уступает препарату сравнения метамизолу натрия [2, 41, 51]. Ульцерогенная активность изучаемых отваров была намного ниже АСК. Пролиферативная активность отваров побегов ивы пурпурной также

оказалась сопоставимой с отваром коры ивы белой [156]. Установлено, что из трех экспериментальных доз 34 мг/кг, 68 мг/кг и 125 мг/кг порошков коры ивы белой оказалось, что при приеме 68 мг/кг выявлена достоверная противовоспалительная активность, сравнимая с препаратом АСК [51]. Выявлено также, по данным Т.М. Дементьевой, что порошки побегов и коры ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой проявляют достоверную противовоспалительную активность на уровне препарата - диклофенак натрия. Ульцерогенная активность также была достоверно ниже, чем у диклофенака натрия. Таким образом, **побеги** по эффективности не уступают **коре** исследуемых видов, что дает возможность применять побеги различных видов ив в качестве лекарственного растительного сырья [145].

Особо следует отметить пролонгированность проявляемых эффектов и отсутствие ульцерогенности, что является существенным преимуществом перед широко применяемой группой нестероидных противовоспалительных препаратов [37, 178].

Заявлены патенты на ряд сборов, содержащих кору и листья различных видов ивы, которые можно использовать для лечения деформирующего полиартрита, воспалительно-деструктивных процессов [33, 99, 102], инфекционных заболеваний, тромбоокклюзирующих поражений артерий шеи и головы, рассеянного склероза, токсоплазмоза [34, 95, 96, 100].

Нами проведено исследование номенклатуры лекарственных средств и биологически активных добавок, содержащих в своем составе кору ивы или ее экстракт. Комплексный анализ информации об оптимальных лекарственных формах, входящих ингредиентах и их количестве позволил определить перспективы использования различных видов ивы для производства отечественных лекарственных препаратов [62].

В настоящее время кора ивы белой включена в Американскую травяную фармакопею, Британскую травяную фармакопею, Европейскую фармакопею, Германскую DAB [186, 191, 192, 193, 194]. К числу фармакопейных согласно Европейской Фармакопее относятся ива волчниковая (*S. daphnoides* Vill.),

пурпурная (*S. purpurea* L.), ломкая (*S. fragilis* L.) и другие, которые содержат более 1,5% суммы фенологликозидов в пересчете на салицин (после щелочного гидролиза), а также ива белая (Американская травяная фармакопея, Британская травяная фармакопея). В качестве сырья используется кора молодых ветвей или целые однолетние ветви диаметром не более 10 мм [193]. В Российской Федерации ива не является фармакопейным растением. Однако проводится химическое изучение представителей рода Ива, а также исследования по стандартизации сырья, что является предпосылкой для его дальнейшего широкого внедрения в медицинскую практику [10, 17, 157]. Включение ивы в Государственную Фармакопею особенно актуально в связи с наличием больших сырьевых запасов и возможностью культивирования в различных эдафо-фитоценоотических условиях (п. 1.2) [21].

За рубежом сырье ивы входит в состав лекарственных средств. Так, на фармацевтическом рынке Германии зарегистрировано три ЛС, содержащих сухой экстракт ивы как единственное действующее вещество: «Assalix» (Bionorica SE); «Optovitacti FLEX» (Hermes Arzneimittel GmbH) и «Proaktiv» (Steigerwald, Arzneimittelwerk GmbH). Препарат «Weidenrinde Schmerzdragees» (ABO&PAINEX Pharma GmbH&Co.KG) содержит порошок ивы. Также в Германии зарегистрированы более 10 гомеопатических препаратов на основе сырья ивы [175]. Во Франции на фармацевтическом рынке представлены пять наименований ЛС, содержащих сырье ивы: капсулы с одним действующим веществом - экстрактом коры ивы «Arkogelules Saulegél» (Arkofarma) и «Elusanes Saulegél» (Laboratoire Pierre Fabre Naturactive) и сборы лекарственных трав, включающие кору ивы - «Arthritisanе» (саше-пакетики, Fiche Abrégée), «Arthroflorine» (саше-пакетики, Fiche Abrégée), «Santane A4» (саше-пакетики или недозированный сбор, Fiche Abrégée). Кроме того, зарегистрирован гомеопатический препарат «Digestodoron», содержащий в качестве ингредиента листья ивы [190].

В России с 2014 по 2017 гг. зарегистрировано только одно ЛС, содержащее экстракт коры ивы – «Инсти» (травяные гранулы, содержащие густой водный экстракт нескольких растений, основное из которых - кора ивы белой)

производства Herbion Pakistan (Pvt) LTD (Пакистан), которое переименовано в «Линкас ОРВИ». Ранее в нашей стране было зарегистрировано еще одно ЛС, содержащее в своем составе кору ивы – Урофлукс (чай растительный быстрорастворимый) производства NattermannGmbH (Германия) и Rhone-PoulencRorer (США-Франция). Однако в Государственный Реестр ЛС ныне действующий он не входит [24].

Кора ивы выпускается самостоятельно в виде БАД в г. Москве, г. Санкт-Петербурге, в Алтайском крае и входит в состав многих комплексных БАД [7, 10, 116]. В качестве исходного сырья для производства БАД зарегистрирован также экстракт ивы [9, 162]. Опубликован ряд работ, посвященных разработке технологии БАД, содержащих кору ивы (Ассаликс, Аспиварин, Гербасприн) [22, 109, 163]. Количество БАД, прошедших государственную регистрацию на начало 2014 года, составило 10429 наименований. Анализ показал, что номенклатура БАД, содержащих в качестве ингредиента сырье ивы в том или ином виде, представлена 91 наименованием, что составляет только 0,9% от зарегистрированных БАД [116]. На начало 2017 г число зарегистрированных БАД, содержащих сырье ивы, в России заметно увеличилось [115].

По результатам анализа наиболее распространённые формы выпуска БАД с корой ивы – это капсулы (45%) и таблетки (28,6%). Далее следуют порошки и гели (8,8% и 5,5% соответственно). Незначительно используются такие формы, как фильтр-пакеты, сиропы, драже и капли. Наибольшее распространение капсул объясняется тем, что в них обеспечивается удобство перорального приема коры ивы, обладающей горьким вкусом. Кроме того, в технологии производства желатиновых капсул не предусмотрено проведение влажной грануляции ингредиентов, не оказывается дополнительное тепловое воздействие, давление, что имеет место в производстве таблеток [25, 107, 142]. Поэтому использование капсул для производства БАД и ЛС, содержащих растительное сырье, в частности сырье ивы, обосновано и предпочтительно.

Анализируя наименования ингредиентов БАД, в которые входит сырье ивы, можно сделать заключение, что, в основном, в качестве исходного сырья

применяется кора ивы белой (*S. alba* L.) как в виде порошка, так и в виде сухого экстракта (67,1%). Имеются данные об использовании сырья ивы остролистной (*S. acutifolia* Willd.) и ивы козьей (*S. carnea* L.). Следует также отметить, что, как правило, кроме сырья ивы в качестве ингредиента в том или ином виде, в состав БАД входят еще от одного до 20 наименований сопутствующих биологически активных компонентов [62].

В настоящее время наблюдается тенденция роста использования препаратов, содержащих измельченное в порошок нативное растительное сырье (ИРС) (кора, корни, корневища, трава, цветки, листья и т.п.). Прием нативного сырья внутрь практикуется в Тибетской и Китайской медицине. Преимуществом этого способа применения является отсутствие необходимости заваривания. При этом не происходит разрушение полезных веществ, вследствие нагревания и гидролиза. Также комплекс природных соединений позволяет снизить побочные эффекты по сравнению с синтетическими монопрепаратами. У производства препаратов с нативным измельченным растительным сырьем есть и технологические преимущества. Так, при экстракции часть БАВ остается в шроте, а сам шрот является опасным для экологии отходом, требующим утилизации. И, наконец, процесс экстракции требует дорогостоящего оборудования и использования не всегда безопасных растворителей [107].

В связи с этим нами была проанализирована номенклатура ЛС и БАД, содержащих ИРС, с целью выявления места капсул как лекарственной формы при их производстве. На 1 января 2014 года в государственный реестр ЛС входит 20359 наименований. Однако, ЛС в виде капсул, содержащих порошки ЛРС, зарегистрировано только четыре: «Доппельгерц-женьшень» (Queisserpharma, Германия), «Маммолептин» (Herbarexpharmaceuticalgroup, Китай), «Райлис» (Miraclepharma-group, Великобритания), «Авиоплант» (Phytopharmk-lenka, Польша) [116].

Анализ зарегистрированных БАД, содержащих ИРС различных растений и прошедших регистрацию в 2002 году, в 3,5 раза меньше, чем в 2014 году, то есть

наблюдается тенденция к значительному увеличению производства БАД, содержащих ИРС в капсулах [62].

В соответствии с Федеральным реестром БАД за 2002 г. [148] в России было зарегистрировано только 5 наименований БАД в капсулах, содержащих сырье ивы в виде ИРС: «Джой» (Sunrider Manufacturing, L.P., США); «Уро-Тоник» (Vita Pharm Canada Ltd, Канада); «Топ» (Sunrider Manufacturing L.P., США); «Метаболин для женщин» (Interactive Nutrition, Inc., Канада); «Кора белой ивы» (Sunrider Manufacturing, L.P., США). На 2014 года из указанных БАД в Регистр входят 4 наименования и все они зарубежного производства [62], однако на начало 2017 года, это число значительно увеличилось [115].

1.5 Заключение по обзору литературы

Таким образом, в ряде стран ива относится к числу фармакопейных растений. На ее основе выпускаются лекарственные и гомеопатические препараты. В России же ива пока не входит в Государственную Фармакопею. Зарегистрировано только одно ЛС с экстрактом коры ивы («Линкас ОРВИ»), которое производится в Пакистане.

Номенклатура БАД с сырьем ивы достаточно многочисленна и включает 91 наименование (2014 год). В качестве исходного сырья применяется кора ивы белой или ее сухой экстракт (67,1%). Имеются данные об использовании сырья ивы остролистной (*S. acutifolia* Willd.) и ивы козьей (*S. caprea* L.) [116].

Анализ номенклатуры БАД, в том числе и содержащих сырье ивы, показал, что лидирующей формой выпуска являются капсулы.

В 2014 году по сравнению с 2002 годом [115] наблюдается хорошо выраженная тенденция роста БАД, содержащих измельченное растительное сырье. Это может свидетельствовать о преимуществах использования растений в нативном виде, что ведет к значительному повышению лечебного действия и к снижению побочных эффектов, вследствие воздействия всего комплекса биологически активных веществ. Кроме того, при производстве таких препаратов

исключается ряд трудо- и энергоемких стадий, что позволяет считать такое производство экономически выгодным. При этом значительная доля БАД данной группы производится за рубежом, в том числе большинство БАД, содержащих сырье ивы.

В виду того, что на территории России произрастает около 80 видов ивы, становится очевидным необходимость изучения этих видов с целью расширения номенклатуры ЛРС. Особое внимание следует обратить на те виды ивы, которые широко распространены (ива трехтычинковая, ива белая, ива остролистная, ива козья и др.), а также наиболее легко подвергаются вегетативному размножению и обеспечивают быстрый и высокий прирост фитомассы (ива трехтычинковая, ива шерстистопобеговая, ива прутовидная и др.) [21, 65]. Также ива является весьма перспективным растением для производства на ее основе отечественных ЛС, гомеопатических препаратов и БАД.

Приведенные в литературном обзоре сведения относятся, в основном, к **коре** различных видов ивы. В тоже время имеется ряд работ, в которых подтверждена перспективность применения **побегов ивы**. Так, в диссертациях О.О. Хитевой (2012 г.) и Т.М. Дементьевой (2016 г.) изучен химический состав побегов ивы белой, ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой. Установлено, что побеги изученных видов ив содержат более обогащенный состав БАВ, чем кора и листья отдельно [28, 157]. Проведенными фармакологическими исследованиями установлено наличие противовоспалительной и анальгетической активности побегов ивы белой. Кроме того, изучена противовоспалительная активность и химический состав побегов ивы пурпурной [156]. То есть подтверждена перспектива исследования побегов различных видов ивы как ЛРС, проявляющего противовоспалительные свойства.

Учеными Украины также проявлен интерес к исследованию побегов различных видов ивы с целью замены растительного сырья «кора» на более доступное сырье «однолетние побеги» [15, 152].

Использование побегов ивы целесообразно с экономической стороны, так как позволит расширить сырьевые запасы. При этом, снизится при заготовке

наносимый ущерб растению по сравнению со сбором коры. Большое количество российских видов ивы растут в увлажненных местах (берега водоемов и рек), а также вводятся в культуру в промышленных масштабах. Показано, что растения рода Ива способны к быстрому росту и размножению. Все это свидетельствует о возможности заготовок сырья ивы в России для производства лекарственных препаратов (ЛП).

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования являлись высушенные однолетние длиной до 30 см, олиственные, неодревесневшие побеги ивы трехтычинковой, а также побеги без листьев и листья, полученные непосредственно с одного побега. Образец сырья «побеги без листьев» - это стебли однолетние, у которых листья были отделены вручную. Сырье, собранное в фазу цветения и плодоношения, сразу отделяли от сережек (май и июнь).

Сырье собирали в разные стадии вегетации в 2013, 2014, 2015 годах в период с 20 по 30 число каждого месяца (май, июнь, июль, август и сентябрь) с нескольких деревьев по берегам рек Подкумок (Ставропольский край, окрестности г. Пятигорска), Кубань (Кочубеевский район Ставропольского края) и Малка (Кабардино-Балкарская Республика (КБР), окрестности п. Малка). Высушенное сырье измельчали с помощью траворезки и объединяли по месту, году и месяцу сбора. Для анализа использовали порошок сырья, проходящего сквозь сито размером отверстий 1, 2 или 3 мм. Сбор побегов проводили согласно инструкции по заготовке и сушке, описанной для побегов багульника болотного и побегов эвкалипта [61, 106].

В качестве стандартных образцов (СО) использовали:

Фенологликозиды – салицин («Panreac», № 373677 1265), а также триандрин и салидрозид, любезно предоставленные коллегами из Самарского ГМУ, за что выражаем им большую благодарность.

Дубильные вещества – галловая кислота (ООО «Сигмабиосинтез»), танин, катехин, эпикатехин и эпигаллокатехингаллат («Fluka»).

Флавоноиды – рутин, кверцетина дигидрат, гесперидин, нарингин (ООО «Сигмабиосинтез»), лютеолин («Fluka»), гиперозид, дигидрокверцетин, апигенин

(«Sigma»), кемпферол («PHYTOPLAN»), лютеолин – 7 – гликозид (цинарозид), изосалипурпозид и нарингенин, любезно предоставленные коллегами из Самарского ГМУ, за что мы также выражаем им большую благодарность.

Аминокислоты – глютаминовая кислота (ФС 42-0229-07).

Фенолокислоты – феруловая кислота (ООО «НПО АЛЬФАРМ»), кислоты: коричная, цикориевая, кофейная, хлорогеновая, неохлорогеновая (ООО «Сигмабиосинтез»).

2.2 Приборы и оборудование

1. Высокоэффективный хроматограф «GILSTON – 305», Франция; инжектор ручной «RHEODYNE 7125», США (ВЭЖХ фенольные соединения, Москва); металлическая колонка «KROMASIL C18», размер 4,6×250 мм, размер частиц – 5 микрон. Обработка с помощью программы Мультихром для «Windows».

2. Система капиллярного электрофореза Капель 103Р (группа компаний «Люмэкс», Россия) с ручным управлением и оснащенной СФ-детектором, имеющим фиксированную длину волны (254 нм). Ввод пробы – гидродинамический, 150 мбар×с.

3. Система капиллярного электрофореза Капель 105 (группа компаний «Люмэкс», Россия) с жидкостной системой охлаждения капилляра, автосамплером и СФ-детектором, охватывающим рабочий диапазон длин волн в области от 190 до 400 нм. Ввод пробы – гидродинамический, 150 мбар×с.

Обработка результатов проводилась с использованием системы сбора и обработки хроматографических данных МультиХром (ЗАО «АМПЕРСЕНД», Россия), версия 1.52v – для системы капиллярного электрофореза Капель 105, версия 1.52o – для системы капиллярного электрофореза Капель 103Р [130].

4. Центрифуга лабораторная, производства «Сигма Лаборцентрифуген ГмбХ», Германия.

5. Спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия).

6. Аминокислотный анализатор – ААА 400 (фирмы – «ИНГОС», Чехия - узкоспециализированный автоматизированный жидкостный хроматограф с компьютерным управлением, оснащённый постколоночной детекторной системой).

7. Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно связанной плазмой “ICPE-9000” фирмы «Shimadzu».

8. Шкаф суховоздушный ШС-80, производства ОАО КЗМА, Россия (ТУ 64-1-909-80).

9. pH – метр иономер 410 («Аквилон», Москва).

10. Планшетный сканер «HPScanjet 3670» (разрешение 100 dpi).

11. Лабораторное перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-02.

12. СВЧ-печь «Rolsen».

13. УФ-облучатель мощностью 50 Вт («Светолит 50», Россия).
Аналитические весы марки Т-А-13.

14. Водяная баня.

15. УФ-облучатель на длины волн 254 и 365 нм (ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар).

16. Встряхиватель лабораторный АВУ-6с.

17. Перемешивающее устройство LS210 LOIP (Россия).

18. Стандартный набор сит (откалиброванных по стандарту ISO 3310-1).

19. Устройство для определения насыпного объема и насыпной плотности НО-1.

20. Мельница лабораторная электрическая ЭМ-100.

21. Гамма-облучатель «Исследователь».

22. Камеры для хроматографирования.

23. Микроскоп «Биомед-2 (С-вар 4) – Россия» с увеличением x10, объективами x8, x16, x20, x40 и «ЕС БИОМAM P13-1 («ЛОМО», Россия) при увеличении 40x10.

24. Фотоаппарат SONY DSC-W200 (Япония) снимки были обработаны с использованием программы «Microsoft Office Picture Manager».

2.3 Методы исследования

2.3.1 Химические методы

2.3.1.1 Качественные реакции

Обнаружение дубильных веществ: для проведения качественного анализа дубильных веществ использовали водное извлечение [155]:

- к 2 мл извлечения прибавляют 5 капель раствора квасцов железоаммонийных;

- к 1 мл извлечения прибавляют 2 мл 10% уксусной кислоты и 1 мл 10% раствора свинца ацетата;

- к 10 мл извлечения прибавляют 5 мл 40% формальдегида в кислоте хлористоводородной концентрированной. Полученную смесь кипятят 30 мин в колбе, снабженной обратным холодильником. Осадок отфильтровывают. К 2 мл фильтрата прибавляют 10 капель 1% раствора железоаммонийных квасцов и около 0,2 г свинца ацетата кристаллического, перемешивают (Проба Стиасни) [58].

Обнаружение катехинов:

- 2-3 мл спиртового извлечения 1:25 прибавляют несколько капель 1% раствора ванилина в хлористоводородной кислоте концентрированной [58].

Обнаружение сапонинов: готовили водные извлечения 1:10, нагревая измельченное сырье на водяной бане в течение 10 мин [155]:

- 5 мл извлечения интенсивно перемешивают до появления пены;

- в одну пробирку прибавляют 5 мл 0,5 моль/л раствора кислоты хлористоводородной, в другую – 5 мл 0,5 моль/л раствора натрия гидроксида. Прибавляют в каждую пробирку по несколько капель извлечения, встряхивают;

- к 2 мл извлечения прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, 1 мл спирта и 1 каплю 10% раствора сульфата (II) железа, нагревают (реакция Лафона).

Обнаружение флавоноидов [155]:

- к 2 мл спиртового извлечения 1:25 добавляют 7 капель хлористоводородной кислоты концентрированной и 15 мг металлического цинка (цианидиновая проба);

- при добавлении к 2-3 мл спиртового извлечения равного объема 1% раствора борной и лимонной (или щавелевой) кислот в метиловом спирте (борно-лимонная реакция);

- к 2 мл извлечения добавляют несколько капель раствора свинца ацетата основного;

- к 1 мл извлечения прибавляют несколько капель раствора аммиака, нагревают.

Обнаружение антраценпроизводных соединений [119]:

- к 2 мл водного извлечения (см. определение сапонинов) прибавляют 3 капли 10% раствора натрия гидроксида.

Обнаружение полисахаридов:

- к 5 мл водного извлечения (см. определение сапонинов) прибавляют 5 мл спирта 95% [58, 155].

Обнаружение свободных аминокислот:

- к 2 мл водного извлечения (приготовление см. ниже методику количественного определения свободных аминокислот) прибавляют 1 мл 1% раствора нингидрина, нагревают на водяной бане [155].

Обнаружение кумаринов и хромонов [58, 155]:

Методика: 2,0 г измельченного сырья заливают 20 мл спирта и кипятят в течение 15 мин с обратным холодильником. После охлаждения фильтруют:

- к 3 мл извлечения прибавляют 10 капель 10% раствора гидроксида калия в метиловом спирте; раствор нагревают на водяной бане. Должно появиться желтое окрашивание. Затем добавляют 5 мл воды и хорошо перемешивают, после чего полученный раствор нейтрализуют 10% раствором хлористоводородной кислотой до кислой реакции (лактонная проба).

Обнаружение свободных сахаров [58]:

- к 3 мл извлечения (см. методику определения сапонинов) прибавляют 1 мл 1% спиртового раствора тимола и 1 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают;

- к 5 мл извлечения (см. методику определения сапонинов) прибавляют 5 мл 1% спиртового раствора резорцина и 15 мл 30% раствора хлористоводородной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают и помещают на 20 минут в водяную баню при температуре 80 °С;

- к 5 мл водного извлечения приливают реактив Фелинга в равном объеме и доводят до кипения.

Обнаружение алкалоидов [155].

Методика: 1,0 г измельченного сырья заливают 25 мл 1% хлористоводородной кислоты и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Раствор фильтруют после охлаждения:

- к 3 мл извлечения прибавляют несколько капель реактива Драгендорфа.

Обнаружение иридоидов:

- к 1 мл спиртового извлечения прибавляют 0,5 мл реактива Трим-Хилла (смесь кислот уксусной ледяной, хлористоводородной концентрированной, 0,2% водного раствора меди (II) сульфата (20:1:2)). Смесь нагревают на водяной бане 1-2 мин [58];

- к 1 мл спиртового извлечения прибавляют 0,5 мл реактива Шталя (п-диметиламинобензальдегид – 1 г, хлористоводородная кислота концентрированная – 5 мл, спирт 95% – до 100 мл). Смесь нагревают на водяной бане 1-2 мин [58].

2.3.1.2 Методики количественного определения

Определение суммы дубильных (окисляемых) веществ проводили в соответствии со статьей ГФ XI изд., используя в качестве аликвоты 50 мл полученного исходного раствора [71, 87].

Расчет содержания дубильных веществ в настое или отваре проводили по формуле (1):

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,004157 \cdot 100}{a}, \quad (1)$$

где V , V_1 , K и $0,004157$ – см. обозначения формулы [87];

a – объем испытуемого раствора, мл.

Построение градуировочного графика: в колбу для титрования помещали 20, 30, 40, 50, 60 мл исходного раствора, далее поступали как описано [87]. Расчет содержания дубильных веществ в аликвоте проводили по формуле (2):

$$X = (V - V_1) \cdot T, \quad (2)$$

Определение суммы органических кислот проводили по методике, приведенной в ФС «Плоды шиповника» [104].

В аналогичных условиях проводили потенциметрическое определение суммы свободных органических кислот, используя для определения точки эквивалентности прибор рН – метр иономер. При титровании фиксировали значение рН после добавления каждые 0,1 мл титранта [69].

2.3.2 Физико-химические методы

2.3.2.1 Метод тонкослойной хроматографии

Определение флавоноидов. Методика: на пластинку «Сорбфил» наносят по 15 мкл спиртовых извлечений побегов, листьев и побегов без листьев и по 5 мкл 0,05% спиртовых растворов образцов СО. Пластинки помещают в камеру, насыщенную системой растворителей в течение 1 часа (н-бутанол - кислота уксусная концентрированная - вода (4:1:2)). Когда фронт растворителя достигает 12 см, хроматограммы достают из камеры, высушивают, просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете (УФ-свет) при длине волны 365 нм. Идентификацию пятен веществ проводят также с помощью обработки парами аммиака или 2% спиртовым раствором алюминия хлорида [64].

Определение пигментов. Методика: измельченное сырье побегов ивы трехтычинковой (навеска около 1 г) помещают в круглодонную колбу на 100 мл, ошпаривают кипятком для лучшего извлечения пигментов, затем воду сливают, приливают 20 мл ацетона и экстрагируют в течении 20 мин на кипящей бане с

обратным холодильником. После охлаждения полученное извлечение фильтруют. На хроматографическую пластинку размером 6×14 см Kieselguhr F254 (0,20 мм, Merck, Германия) наносят полосой 1,5 см 100 мкл полученного фильтрата. Хроматографирование проводят после насыщения камеры в системе растворителей: гексан – изопропиловый спирт – водный раствор натрия карбоната (50:5:0,25). Детектирование проводят в видимом и УФ – свете [82].

Метод планарной хроматографии.

Извлечения при определении рутина получали 2 способами [126]:

Методика №1: навеску сырья массой 3,0 г помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70%. При комнатной температуре настаивают 30 мин, затем в течение 2 часов нагревают на водяной бане, используя обратный холодильник. Извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом до метки, хорошо перемешивают.

Методика №2: навеску сырья массой 3,0 г растирают в ступке с натрия сульфатом безводным (около 15,0 г), затем обрабатывают хлороформом (3 раза по 50 мл) для удаления липофильных веществ. Оставшуюся массу подсушивают в ступке в течение 15 мин под вытяжным шкафом и количественно помещают в колбу вместимостью 250 мл с обратным холодильником. Прибавляют 50 мл спирта этилового 70% и нагревают в течение 2 часов на кипящей водяной бане. Извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом 70% до метки, хорошо перемешивают.

Раствор СО рутина готовят в соотношении 0,1:100 при нагревании на водяной бане, используя в качестве растворителя спирт 95%.

Для идентификации и количественного определения использовали метод тонкослойной хроматографии с денситометрической регистрацией аналитического сигнала. Хроматографирование проводили на пластинках размером 10x15 см марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ (г. Краснодар) в системе н-бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (4:1:1).

Методика: на линию старта в пять точек наносят раствор СО с содержанием рутина – 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг соответственно. На эту же пластинку наносят

спиртовые извлечения из побегов ивы в количестве 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкл. Пластинку переносят в камеру для хроматографирования, насыщенную парами системы растворителей. После подъема системы растворителей пластинку вынимают, высушивают при комнатной температуре. На пластинке появляются пятна жёлтого цвета. Затем пластинку дополнительно проявляют парами аммиака [126].

Сканирование пластинки проводят с помощью планшетного сканера «HPScanjet 3670» (разрешение 100 dpi) и осуществляют их цифровую обработку с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар). Расчет содержания рутина проводят по градуировочному графику зависимости – площадь пика : масса вещества [126].

2.3.2.2. Метод капиллярного электрофореза

Определение фенологликозидов. Определение триандрина и салидрозида в извлечении сырья ивы трехтычинковой проводили на системе капиллярного электрофореза Капель 105 (группа компаний Люмэкс, Россия) с кварцевым капилляром $L_{эфф}/L_{общ}=50/60$ см, ID=75 мкм. Ввод пробы осуществлялся гидродинамически 150 мбар·с, напряжение составляло +20 кВ. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 280 нм. В работе реализовывался вариант капиллярного зонного электрофореза, где в качестве ведущего электролита для анализа триандрина и салидрозида использовался 50 мМ карбонатный буферный раствор с pH 10,4 [130].

Определение салицина велось с использованием системы капиллярного электрофореза Капель 103Р (группа компаний Люмэкс, Россия) с кварцевым капилляром $L_{эфф}/L_{общ}=75/65$ см, ID=50 мкм. Ввод пробы осуществлялся гидродинамически 150 мбар·с, напряжение составляло +20 кВ. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм. Учитывая нейтральный характер салицина, в работе реализовывался вариант мицеллярной электрокинетической хроматографии, где в качестве ведущего электролита применялся 5 мМ боратный буферный раствор с pH 9,2 и содержанием натрия додецилсульфата 30 мМ [129].

Приготовление боратного буферного раствора проводилось в соответствии с ГОСТ 4919.2-77 [114; приложение 3]. Приготовление карбонатного буферного раствора проводилось в соответствии с литературными данными [31, 169]. Контроль полученных значений pH осуществляли потенциометрическим методом.

Приготовление растворов СО: по 0,0035 г салицина, 0,0082 г салидрозида и 0,0130 г триандрина переносят в мерные колбы вместимостью 10 мл и прибавляют по 5 мл спирта этилового 70% в случае триандрина и салидрозида и 5 мл воды в случае салицина, взбалтывают до растворения веществ и доводят до метки тем же растворителем. Далее растворы тщательно перемешивают (растворы А).

Для приготовления раствора смеси СО триандрина и салидрозида отбирали по 180 мкл и 30 мкл растворов А салидрозида и триандрина соответственно и доводили до 1000 мкл спиртом этиловым 50%.

Для определения триандрина и салидрозида, а также салицина использовали методики приготовления извлечений в соответствии [91].

Определение флавоноидов. Исследование проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель – 103Р» (ОАО «НПФ Люмэкс», Россия) с кварцевым капилляром $L_{эфф}/L_{общ}=50/60$ см, ID=75 мкм. Пробы вводились гидродинамически 150 мбар·с, при напряжении +20кВ. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм, где в качестве ведущего электролита для анализа рутина использовался 0,01 М боратный буферный раствор с pH 9,2. При идентификации флавоноидов использовали 0,01 М боратный буферный раствор с pH 9,8 [129].

Для обработки электрофореграмм (ЭФГ) использовалась программа «Мультихром» (версия 1.52 v). Пробоподготовку вели согласно схеме, описанной в работе Дементьевой Т.М. с соавт. [150]. Далее при помощи микропипетки отбирали 400 мкл полученного раствора, переносили в пробирку типа Эппендорф, прибавляли 600 мкл того же растворителя, перемешивали и центрифугировали

при 12000 мин⁻¹ 5 мин. Надосадочный раствор декантировали и подвергали анализу [128].

Приготовление растворов СО флавоноидов: по 0,01 г (точная навеска) кверцетина дигидрата, лютеолина, цинарозида, изосалипурпозиды, нарингенина, рутина переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, при нагревании на водяной бане растворяют в спирте этиловом 95%. После охлаждения доводят спиртом этиловым 95% до метки. Концентрация СО в растворе 0,1 мкг/мкл (исходные растворы). С помощью микропипетки в пробирку по типу Эппендорф отмеривают 500 мкл раствора СО рутина, прибавляют 300 мкл воды и 200 мкл спирта этилового 95% и перемешивают (раствор СО рутина).

Приготовление раствора смеси СО флавоноидов. С помощью микропипетки в пробирку по типу Эппендорфа отмеривают по 100 мкл исходных растворов СО: рутина, кверцетина, лютеолина, нарингенина, цинарозида, изосалипурпозиды и 200 мкл воды. Перед анализом полученные растворы центрифугируют при 8000 мин⁻¹ 5 мин.

Содержание рутина в процентах (X) рассчитывали по формуле (3):

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (3)$$

где S и S₀ – площадь пика рутина и СО рутина на ЭФГ испытуемого раствора и раствора СО соответственно;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %;

a₀ – навеска СО рутина, г;

P – содержание рутина в СО, % [129].

2.3.2.3 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Идентификацию дубильных веществ, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот проводили методом ВЭЖХ (см. п. 2.2). Условия анализа: подвижная фаза в соотношении метанол:вода:фосфорная кислота концентрированная (400:600:5). Скорость подачи элюента – 0,8 мл/мин. Время анализа – 60 мин. В работе использовали УФ-детектор “GILSTON” UV/VIS модель 151 (254 нм).

Приготовление извлечения из исследуемого сырья и растворов СО дубильных веществ и фенолкарбоновых кислот проводили по методикам, приведенных в работах [42, 80]. Кроме того, готовили серию 0,05% растворов СО в спирте этиловом 70%: апигенина, геспередина, гиперозида, дигидрокверцетина, кверцетина, кемпферола, лютеолина, рутина и цинарозида.

Определение аминокислотного состава. Анализ был проведен на аминокислотном анализаторе – ААА 400 (фирмы – «ИНГОС», Чехия), который является узкоспециализированным автоматизированным жидкостным хроматографом с компьютерным управлением, оснащённым постколоночной детекторной системой (ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», научная лаборатория кормов и обмена веществ) [123].

Методика: 0,2 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в пенициллиновую склянку на 20 мл, доводят до верха 6 моль/л хлористоводородной кислотой, плотно закрывают резиновой крышкой и оставляют в сушильном шкафу при 110°C на 23 часа. После гидролиза раствор охлаждают и выпаривают досуха в ротационном испарителе. К полученному остатку добавляют 5 мл воды и снова выпаривают для того, чтобы избавиться от остатков хлористоводородной кислоты, которая отрицательно влияет на выход и разделение пиков, промывание проводят еще 2 раза. К выпаренному досуха образцу добавляют 50 мл загрузочного буфера (рН 2,2). Перед введением в ионообменную колонку полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр [123].

Приготовление загрузочного буфера: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 14 г лимонной кислоты, 11,5 г натрия хлорида, 0,1 г натрия азида, 5 мл тиодигликоля и доводят до метки бидистиллированной водой [123].

2.3.2.4 Спектрофотометрический метод

Определение суммы дубильных веществ. **Методика:** извлечение из исследуемого сырья готовили в соответствии с методикой, приведенной в общей фармакопейной статье (ОФС) ГФ XI изд. [87]. Далее поступали, как описано в патенте И.А. Самылиной с соавт. [97]: 2 мл полученного раствора переносят в

мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят водой до метки (раствор А). Параллельно к 30 мл водного извлечения добавляют 7 мл 1% раствора коллагена в 1% растворе кислоты уксусной. Смесь взбалтывают 60 мин, фильтруют через бумажный фильтр. 2 мл полученного фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой до метки (раствор В). Измеряют оптическую плотность обоих растворов (А и А₁ соответственно) на спектрофотометре при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду [97].

Рассчитывают содержание суммы полифенольных веществ в процентах (Х) в пересчете на галловую кислоту после измерения оптических плотностей растворов А и В по формуле (4):

$$X = \frac{A \cdot 250 \cdot 50 \cdot 100}{a \cdot 2 \cdot 508 \cdot (100 - W)}, \quad (4)$$

где А и А₁ – оптическая плотность раствора А и В соответственно;

2 – объем аликвотной пробы, мл;

250 – общий объем извлечения, мл;

50 – объем колбы, мл;

508 – удельный показатель поглощения галловой кислоты;

W, a – см. обозначения формулы 3.

Содержание дубильных веществ, осаждаемых 1% раствором коллагена в 1% сырье в процентах (Х) в ЛРС, определяют как разницу между содержанием полифенольных соединений при использовании растворов А и В [97].

Определение суммы флавоноидов. Методика: пробоподготовку, приготовление СО рутина и анализ вели согласно схеме, описанной в работе Дементьевой Т.М. с соавт. [150] и по методике, приведенной в ФС «Зверобоя трава» [35].

При валидационной оценке методики для построения градуировочного графика отбирали по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 и 3,5 мл из раствора А (см. методику) и помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, далее поступали, как

описано в методике. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин определяли в конкретной аликвоте в г/мл [43].

Экстракционно-спектрофотометрическое определение суммы фенолкарбоновых кислот. Определение суммы ФК проводили согласно методике, приведенной в статье В.М. Космана с соавт. [55] и в статье М.С. Ларькиной с соавт. [59].

Содержание суммы ФК пересчитывают на доминирующий компонент - кислоту хлорогеновую [55].

Количественное содержание суммы фенолкарбоновых кислот в процентах (X) рассчитывают по формуле (5):

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{504,4 \cdot a \cdot V \cdot (100 - W)}, \quad (5)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

504,4 – удельный показатель поглощения кислоты хлорогеновой;

V – объем аликвоты раствора A , мл;

a и W – см. обозначения формулы 3.

Приготовление раствора кислот с pH 2,0 проводили в соответствии с методикой, приведенной в статье М.С. Ларькиной с соавт. [59].

Определение суммы свободных аминокислот проводили в соответствии с методикой, приведенной в статье Г.И. Олешко с соавт. [111].

Содержание суммы свободных аминокислот в процентах (X) рассчитывают по формуле (6):

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)}, \quad (6)$$

где A и A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора и раствора СО глютаминовой кислоты;

a_0 – навеска СО глютаминовой кислоты, г;

a и W – см. обозначения формулы 3.

Определение хлорофилла. Для определения хлорофилла готовили извлечения по двум методикам:

Методика №1 (при нагревании извлечения): для приготовления извлечения исследуемого сырья и расчета содержания хлорофилла (X%) проводили в соответствии с методикой, приведенной в статье С.Л. Пеливановой с соавт., с использованием значения удельного показателя поглощения хлорофилла **a** при 664 нм равным 994,5 [103].

Методика №2 (без нагревания извлечения): для приготовления извлечения исследуемого сырья проводили в соответствии с методикой, приведенной в статье О.Г. Струсовской [141]. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 при длинах волн 470 нм, 647 нм и 664 нм.

Расчет содержания хлорофилла **a** (X%) проводили, используя формулу и значение удельного показателя поглощения хлорофилла **a** при 664 нм, по приведенным в статье С.Л. Пеливановой с соавт. [103].

При производной спектрофотометрии (измерение оптической плотности растворов при длинах волн 664 нм, 649 нм и 470 нм [172], приготовленных для определения хлорофиллов), определяется содержание хлорофиллов **a** и **b**, а также сумма каротиноидов и ксантофиллов в мг/л по формулам (7) [141]:

$$\begin{aligned} Chla &= 13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649} \\ Chlb &= 27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664} \\ C_{k+kc} &= \frac{1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot Chla - 97,64 \cdot Chlb}{209} \end{aligned} \quad (7)$$

где $Chla$ – концентрация хлорофилла **a**, (мг/л);

$Chlb$ – концентрация хлорофилла **b**, (мг/л);

C_{k+kc} – концентрация суммы каротиноидов и ксантофиллов (мг/л);

A – оптическая плотность раствора при определенной длине волны.

С учетом полученных значений, рассчитывают содержание пигментов в пересчете на абсолютно сухое сырье по формуле (8) [141]:

$$X = \frac{C \cdot V_k \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}, \quad (8)$$

где C – концентрация пигмента в испытуемом растворе, %;

V_k – объем мерной колбы, мл;

a и W – см. обозначения в формуле 3.

Для определения феофитина после измерения оптической плотности в кювету с испытуемым раствором вносят 0,1 мл 1 моль/л раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и через 2 мин снова измеряют оптическую плотность при 664 нм и 750 нм [166, 180].

В случае отсутствия светопоглощения при 750 нм содержание хлорофилла и феофитина в исследуемом растворе в мг/% (C_x и C_ϕ) рассчитывают по формуле (9 и 10), затем по формуле (11 и 12) рассчитывают содержание (X_1) хлорофилла и феофитина (X_2) в процентах в сырье:

$$C_x = 29,11 \cdot [A_{664_0} - A_{664_1}], \quad (9);$$

$$C_\phi = 29,11 \cdot [1,7 \cdot A_{664_1} - A_{664_0}], \quad (10)$$

где A_{664_0} – оптическая плотность исследуемого раствора до подкисления при длине волны 664 нм;

A_{664_1} – оптическая плотность после подкисления при длине волны 664 нм.

$$X_1 = \frac{C_x \cdot 50 \cdot 100 \cdot 5}{a \cdot (100 - W) \cdot 1000}, \quad (11);$$

$$X_2 = \frac{C_\phi \cdot 50 \cdot 100 \cdot 5}{a \cdot (100 - W) \cdot 1000}, \quad (12)$$

где C_x и C_ϕ – содержание хлорофилла и феофитина в исследуемом растворе в мг/%;

a и W – см. обозначения формулы 3.

Определение каротина: приготовление извлечения исследуемого сырья и расчет содержания суммы каротиноидов (мг/%) проводили в соответствии с методикой, приведенной в статье С.Л. Пеливановой с соавт., с использованием в качестве растворителя гексан, удельный показатель поглощения β -каротина при длине волны 450 нм равным 2592 [172].

Определение элементного состава. Исследование образцов на элементный состав проводилось спектральным методом с помощью атомно-эмиссионного

спектрометра с индуктивно связанной плазмой “ICPE-9000” фирмы «Shimadzu» в лаборатории ЦКП “Физики и технологии наноструктур”, г. Владикавказ. Перед исследованием образцы подготавливали к загрузке в спектрометр.

Методика: к 0,5 г (точная навеска) образца прибавляют 10 мл концентрированной азотной кислоты. Образцы помещают в специальную микроволновую печь для пробоподготовки “MARS” фирмы SEM, разогревают в специальных кюветах под действием микроволн до 200 °С при давлении паров 50 бар и далее выдерживают в этих условиях 10 минут. После пробоподготовки образцы загружают в спектрометр и исследуют [44].

Определение полисахаридов. Фракции полисахаридов определяли гравиметрическим методом по Н.К. Кочеткову [56]. Предварительно сырье обрабатывали смесью растворителей (95% этанол – хлороформ (2:1)) для удаления пигментов, липидов и других веществ неуглеводного характера.

Водорастворимые полисахариды. **Методика:** к около 3,0 г (точная навеска) воздушно-сухого шрота прибавляют 60 мл воды и нагревают в течение 2 часов на кипящей водяной бане. Водное извлечение подвергают фильтрованию, используя бумажный фильтр «синяя лента», и упаривают до 1/10 первоначального объема. При комнатной температуре к фильтрату добавляют трехкратный объем (18 мл) спирта этилового 95%. Образовавшийся осадок фильтруют через предварительно высушенный до постоянной массы бумажный фильтр «синяя лента» и затем сушат вместе с фильтром сначала при 20 - 25 °С, а затем до постоянной массы при 40 °С [56].

Пектиновые вещества (ПВ). **Методика:** к остатку, после осаждения ВРПС, добавляют 100 мл кипящей воды, содержащей 0,5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и оставляют на водяной бане в течение 1 часа, затем смесь фильтруют и охлаждают. Фильтрат упаривают до 1/3 первоначального объема и осаждают пятикратным объемом спирта этилового 95%. Полученный осадок фильтруют через высушенный до постоянной массы бумажный фильтр «синяя лента» и высушивают осадок до постоянной массы при комнатной температуре [56].

Гемицеллюлоза А. Методика: к остатку, после выделения ПВ, прибавляют 30 мл 10% раствора натрия гидроксида и выдерживают 12 часов при комнатной температуре, затем фильтруют и к фильтрату прибавляют 15 мл кислоты уксусной. Образовавшийся осадок фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», высушенный до постоянной массы и высушивают осадок до постоянной массы при комнатной температуре [56].

Гемицеллюлоза Б. Методика: к фильтрату, после отделения гемицеллюлозы А, добавляют трехкратный объем (до 60 мл) спирта этилового 95%. Осадок отфильтровывают через высушенный до постоянной массы бумажный фильтр «синяя лента» и высушивают осадок при комнатной температуре до постоянной массы [56].

Количественное содержание фракций полисахаридов в процентах (X) рассчитывают по формуле (13):

$$X = \frac{a \cdot 100\%}{a_x}, \quad (13)$$

где a – масса полисахаридов, г;

a_x – масса сухого сырья, взятая для анализа, г.

2.3.3. Технологические методы исследования

Определение фракционного состава образца проводили согласно ОФС 42-0136-09 «Ситовой анализ» [132].

Определение степени сыпучести порошков и насыпного объема проводили в соответствии с ОФС 42-0137-09 «Степень сыпучести порошков» Государственной Фармакопеи РФ XII издания [140].

Принята условная характеристика порошков по их сыпучести: отличная (8,6-12,0 г/с), хорошая (6,6-8,5 г/с), удовлетворительная (3-6,5 г/с), допустимая (2-3 г/с), плохая (1-2 г/с), очень плохая (<1г/с) [107].

Насыпная плотность – определяется отношением массы свободно насыпанного материала к занимаемому им объему, выражается в кг/м³.

Методика: взвешивают 5 г исследуемого вещества и засыпают в мерный цилиндр, последний помещают в вибрирующее устройство с частотой 150-200

колебаний в минуту и наблюдают за изменением объема. Когда уровень вещества установится постоянным, измеряют его объем и рассчитывают по формуле 14 насыпную плотность в г/см³:

$$\rho_n = \frac{m}{V}, \quad (14)$$

где m – навеска, г;

V – объем порошка сырья, м³.

В зависимости от значения насыпной плотности порошкообразные вещества условно подразделяют на весьма тяжелые ($\rho_n > 2000$ кг/м³), тяжелые ($\rho_n > 1100$ кг/м³), средние ($\rho_n > 600$ кг/м³), легкие ($\rho_n < 600$ кг/м³) [107].

Сверхвысокочастотное облучение (СВЧ). Облучение сырья проводили в СВЧ-печи «Rolsen», которая имеет 5 мощностей: низкая 300 Вт (17%), разморозка 400 Вт (33%), средняя 500 Вт (55%), выше средней 700 Вт (77%) и высшая 900 Вт (100%).

Методика: 2,0 г сырья (точная навеска) помещают в бюкс, предварительно взвешенный без сырья и с сырьем до облучения, и ставят его в СВЧ печь с открытой крышкой. Облучение проводят на 1-5 мощности, выдерживают в течение 1, 3 и 5 минут. После облучения сырье охлаждают в эксикаторе с открытой крышкой бюкса, затем взвешивают и определяют потерю в массе сырья после облучения [124].

Ионизирующее воздействие. Методика: измельченное сырье около 5 грамм помещают в стеклянные бюксы, закрывают крышкой и переносят в камеру для облучения. Облучение проводят до достижения средней мощности дозы гамма-излучения в рабочем объеме камеры 42,5 Гр/мин [40].

2.3.4 Морфолого-анатомические исследования и определение показателей качества сырья

2.3.4.1 Микроскопическое исследование сырья

Для микроскопического исследования побегов готовили временные препараты поперечных срезов стебля, листьев, порошка. В качестве включающей жидкости использовали раствор глицерина (1:1), 10%

раствор хлоралгидрата. Для выявления лигнифицированных (одревесневших) элементов проводили реакцию с флороглюцином и кислотой хлористоводородной концентрированной [71].

Анатомическое изучение исследуемых объектов проводили с помощью микроскопа «Биомед – 2 (С-вар. 4)» («Биомед», Россия) при увеличении 16x10, 16x20 и «ЕС БИОМАН Р13-1 («ЛОМО», Россия) при увеличении 40x10.

Съемку проводили фотоаппаратом SONY DSC – W200. Полученные снимки были обработаны с использованием программы «Microsoft Office Picture Manager».

2.3.4.2 Методики испытаний растительного сырья

Определение показателей качества ЛРС проводили в соответствии с требованиями ГФ XI, XII, XIII изд. ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье» [70, 86, 132], ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов» [70], ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ лекарственного растительного сырья» [70, 90], ОФС «Определение золы» [70, 81], ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья» [70, 79].

2.3.5 Биологические методы исследования

2.3.5.1 Оценка противовоспалительной активности

Оценку противовоспалительной активности проводили на модели хронического пролиферативного воспаления [120]. Для проведения эксперимента использовали четыре группы животных по шесть особей в каждой (крысы-самцы линии *Wistar* весом 220-240 г). Животные первой группы служили контролем, второй - получали суспензию порошка побегов ивы трехтычинковой, третьей – суспензию порошка коры ивы белой; четвертой – суспензию ацетилсалициловой кислоты. Во время эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария ПМФИ на пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде, находящейся в стандартных питьевых бутылочках. При постановке эксперимента

использовали методику, приведенную в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под редакцией Р.У. Хабриева [120].

Из порошка высушенных побегов, проходящего сквозь сито с диаметром 1 мм, ивы трехтычинковой и коры ивы белой, взятой в качестве препарата сравнения [51], готовили суспензии, используя в качестве растворителя воду очищенную. Для устойчивости суспензии порошок ЛРС растирали с 1-2 каплями Твина-80, а затем порциями воды очищенной порошок из побегов и коры переносили количественно в мерную колбу на 100 мл и доводили водой до метки. Рассчитанное количество действующего вещества для крысы массой 200 г содержалось в 2 мл суспензии. Исследуемые объекты вводились в дозе 68 мг/кг (соответствует приему человеком, массой 70 кг, 800 мг порошка в сутки).

Исследуемые измельченные побеги ивы трехтычинковой и кору ивы белой, а также в эквивалентном объеме вводили препарат сравнения в течение 7 дней с помощью зонда в желудок. Контрольным животным вводили физиологический раствор таким же способом [68].

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

С целью изучения ulcerогенного действия порошка побегов ивы трехтычинковой использовали также методику, приведенную в руководстве Р.У. Хабриева [120].

2.3.5.2 Микробиологические исследования

Определение микробиологической чистоты выполняли на кафедре биологической химии и микробиологии Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ XII и XIII издания [72, 73].

2.4 Статистическая обработка результатов экспериментов и валидационная оценка используемых методов

Результаты экспериментов обрабатывали статистически по ГФ XII и ГФ XIII изд. [138, 139]. Программа Microsoft Office Excel 2007 была использована для построения графиков и таблиц, статистической обработки результатов химических и биологических исследований.

Цифровую обработку результатов, полученных с помощью планшетного сканера «HP Scanjet 3670», осуществляли с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар).

Валидационную оценку методик анализа проводили по таким характеристикам, как специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XII и XIII издания [19, 20].

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА СЕВЕРНОМ КАВКАЗЕ

3.1 Качественный анализ биологически активных веществ ивы трехтычинковой

Для проведения качественных реакций были приготовлены извлечения из побегов ивы трехтычинковой. Методики качественных реакций представлены в главе 2 (п. 2.3.1.1).

Таблица 3.1 – Качественные реакции на основные группы БАВ, содержащиеся в побегах ивы трехтычинковой

Группа БАВ	Реактив и результат
1	2
1. Антраценпроизводные	10% раствор натрия гидроксида (отсутствие красного окрашивания).
2. Сапонины	Встряхивание водного извлечения (появление обильной пены). Пенообразование в 2х пробирках с кислой и щелочной средой (тритерпеновые сапонины). Реакция Лафона (сине-фиолетовое окрашивание – тритерпеновые сапонины).
3. Полисахариды	Со спиртом этиловым 95% выпадает белый осадок.
4. Флавоноиды	Цианидиновая проба (красно – фиолетовое окрашивание). С основным ацетатом свинца (желтоватый осадок). С реактивом Вильсона (ярко-желтое окрашивание). С раствором аммиака при нагревании (темно-бурое окрашивание).
5. Свободные аминокислоты	С раствором нингидрина (фиолетовое окрашивание).
6. Дубильные вещества	С раствором свинца ацетата (желтый осадок, растворяющийся в уксусной кислоте).

1	2
	С железоммонийными квасцами (темно – зеленое окрашивание – конденсированные соединения). С раствором формальдегида в хлористоводородной кислоте (кирпично-красный осадок - конденсированные вещества), к фильтрату добавляют железоммонийные квасцы (синее окрашивание – гидролизуемые вещества). С 1% раствором ванилина (красно-малиновое окрашивание – катехины).
8. Кумарины и хромоны	Лактонная проба (красное окрашивание отсутствует).
9. Свободные сахара	С 1% спиртовым раствором тимола и концентрированной серной кислотой (синее окрашивание).
10. Алкалоиды	С реактивом Драгендорфа (отсутствие осадка оранжевого цвета).
11. Иридоиды	С реактивом Трим – Хилла (отсутствие синего окрашивания). С реактивом Шталя (отсутствие появления окрашивания).

Химический состав побегов представлен наличием флавоноидов, дубильных веществ и других фенольных соединений, а также полисахаридов, аминокислот (таблица 3.1). Из проведенных качественных реакций можно сделать вывод, что побеги ивы трехтычинковой не содержат антраценпроизводные, алкалоиды, кумарины и иридоиды. Полученные нами данные на примере побегов ивы трехтычинковой не полностью согласуются с данными монографии «Растительные ресурсы СССР» [112].

3.2 Определение фенологликозидов

Как было описано ранее (глава 1) фенологликозиды найдены в коре практически всех исследованных видов ивы, произрастающих в Германии, Польше, Литве, Финляндии и России. Салицин является наиболее распространенным и характерным ФГ для растений семейства Salicaceae, что

может являться отличительным диагностическим признаком. Кроме того, помимо салицина, в коре различных видов ивы содержатся и другие ФГ [112]. Так, в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей в Белоруссии, обнаружены салицин, салирепозид, грандидентатин, салидрозид и триандрин [57].

Для определения ФГ со свободным фенольным гидроксилом в сырье ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, был использован метод капиллярного зонного электрофореза, а для определения ФГ со связанным фенольным гидроксилом - метод мицеллярной электрокинетической хроматографии. Для выбора оптимальных условий экстракции и определения ФГ с использованием методов КЭ были приготовлены растворы СО и извлечения из сырья побегов ивы (см. п. 2.3.2.2), собранного в сентябре 2015 года по берегам реки Подкумок (г. Пятигорск). Электрофореграммы указанных растворов были измерены в условиях, приведенных в работе С.П. Сенченко [130]. На представленных электрофореграммах растворов СО салицина (рисунок 3.1), салидрозида и триандрина (рисунок 3.2) видны четкие пики исследуемых веществ. При этом пик салицина имеет фактор асимметрии на уровне 1,2 и эффективность не менее 200 000 теоретических тарелок (т.т.). Пики салидрозида и триандрина оказались хорошо разделены между собой, с разрешением 4,24. Фактор асимметрии салидрозида находился на уровне 0,3, триандрина – 0,7; эффективность составила для салидрозида не менее 100 000 т.т., для триандрина – не менее 170 000 т.т., что позволило использовать выбранные условия для поиска указанных компонентов в извлечении из сырья.

Полученные электрофореграммы извлечений из побегов ивы трехтычинковой представлены на рисунках 3.3 и 3.4.

Как следует из представленных электрофореграмм, в условиях МЭКХ в водном извлечении побегов ивы трехтычинковой пик салицина не обнаружен. В то время, как в условиях КЗЭ имелись два пика, совпадающие по временам миграции с пиками салидрозида и триандрина на электрофореграмме раствора

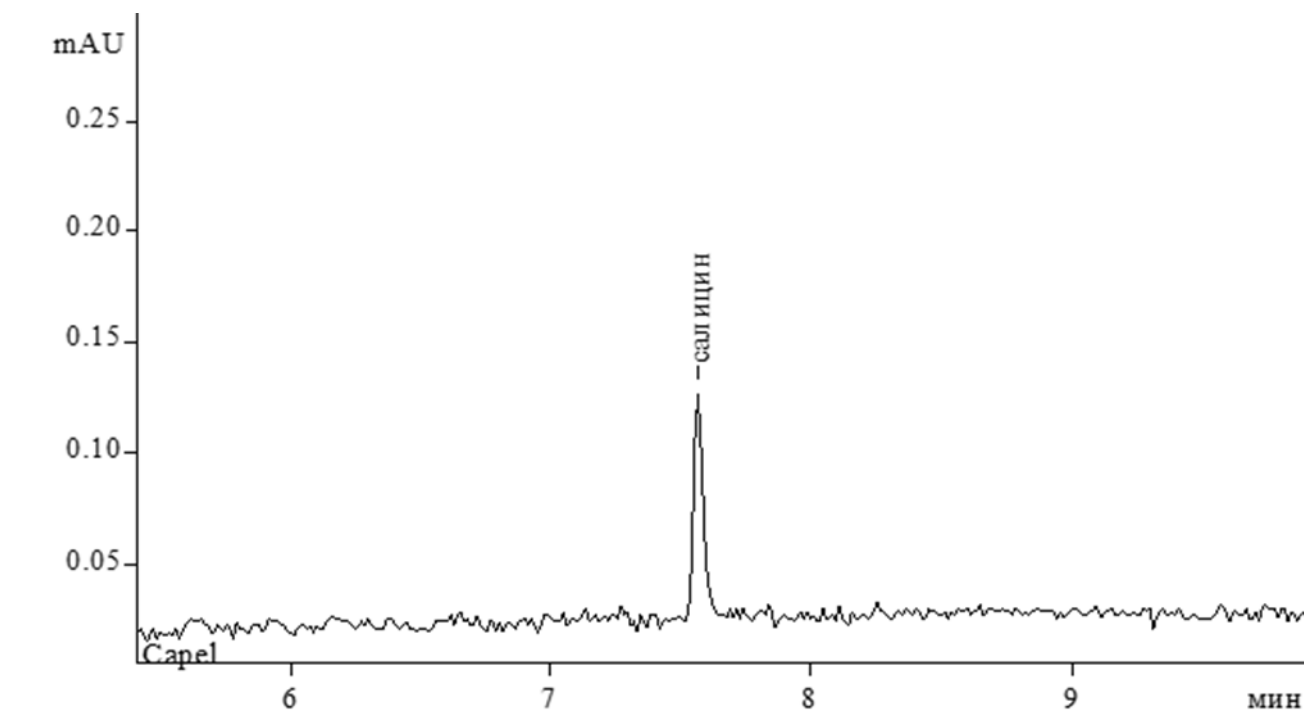


Рисунок 3.1 – Электрофореграмма раствора СО салицина в условиях МЭКХ

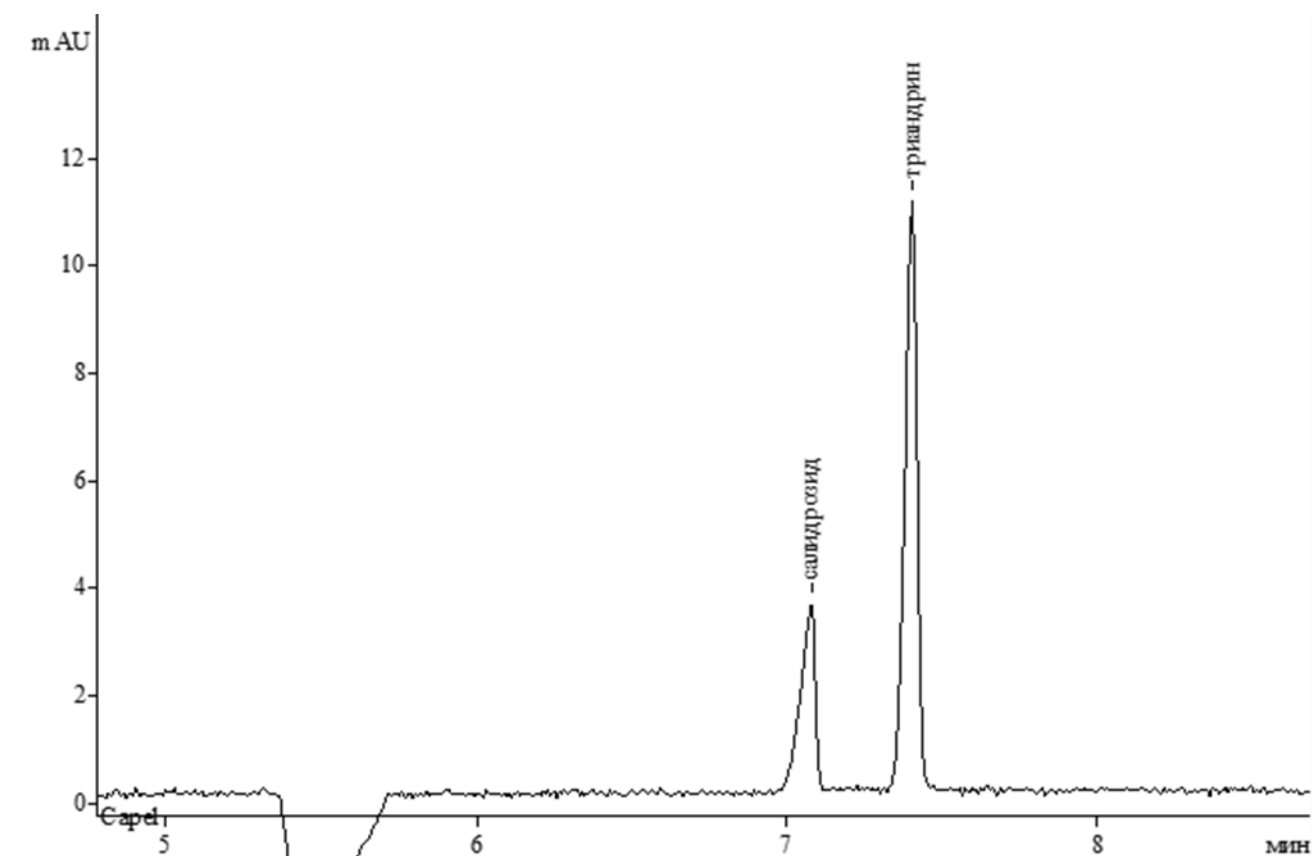


Рисунок 3.2 – Электрофореграмма раствора смеси СО триандрина и салидрозида в условиях КЗЭ

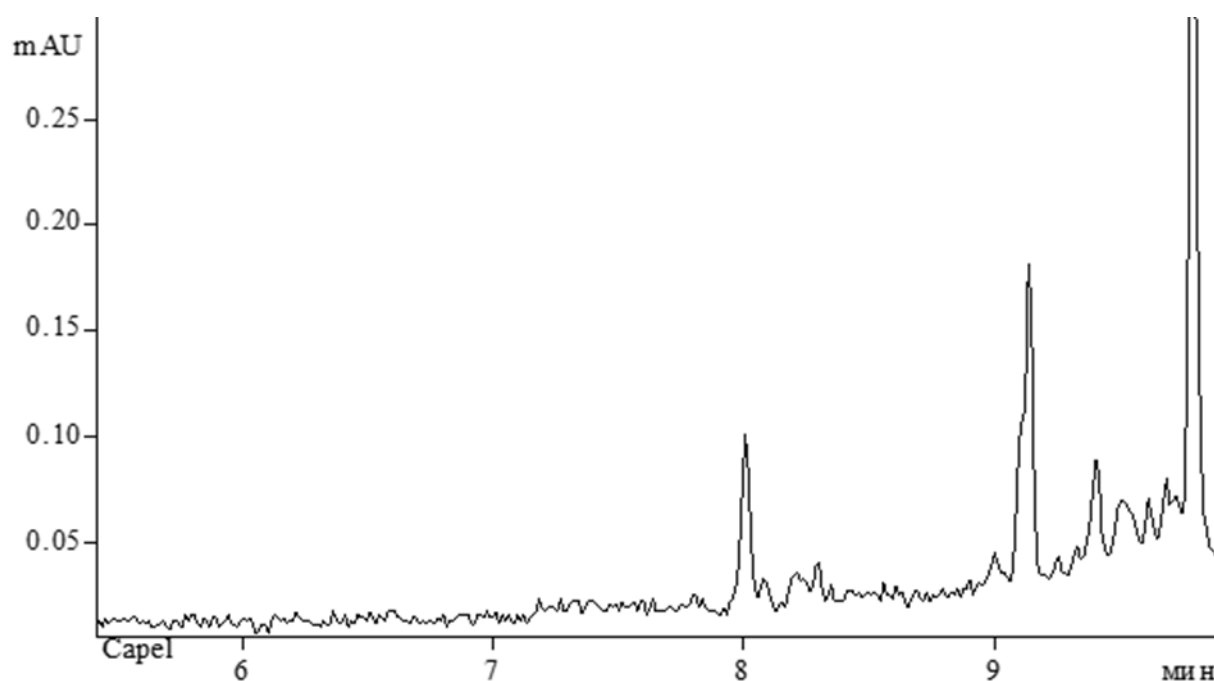


Рисунок 3.3 – Электрофореграмма водного извлечения побегов ивы
трехтычинковой в условиях МЭКХ

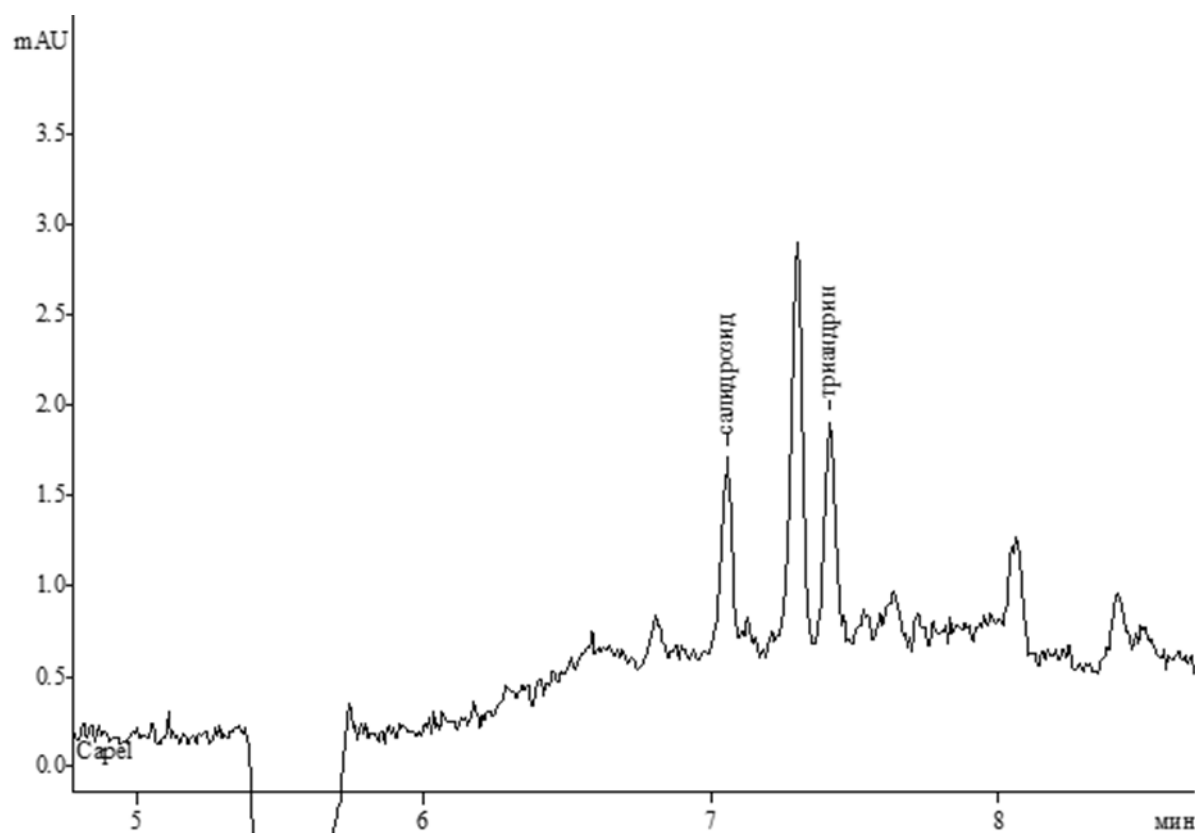


Рисунок 3.4 – Электрофореграмма спирто-водного извлечения побегов ивы
трехтычинковой в условиях КЗЭ

смеси СО. При этом разрешение с ближайшими пиками в извлечении составило 3,54 для салидрозид и 1,62 для триандрина, что обуславливает использование выбранных условий для изучения указанных соединений в растительном сырье.

Далее нами проведены исследования по определению оптимальных условий экстракции ФГ из побегов ивы трехтычинковой. Было изучено влияние времени экстракции, используемого экстрагента, соотношение сырье/экстрагент и кратность экстракции (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Изучение условий экстракции на полноту извлечения ФГ из сырья, заготовленного в сентябре 2015 года по берегу реки Подкумок

Условия экстракции	Триандрин		Салидрозид	
	Площадь пика	Найдено, %	Площадь пика	Найдено, %
Экстрагент	Однократная экстракция в течение 30 минут при соотношении сырье/экстрагент 1:100			
Спирт этиловый 20%	0,485	0,0080	2,961	0,225
Спирт этиловый 40%	0,982	0,0162	3,039	0,231
Спирт этиловый 70%	1,273	0,0210	3,145	0,239
Спирт этиловый 95%	0,636	0,0105	2,910	0,222
Время экстракции, мин	Однократная экстракция при соотношении сырье/экстрагент 1:100			
15	0,988	0,0163	2,566	0,195
30	1,249	0,0206	3,040	0,231
45	1,521	0,0251	3,382	0,257
60	1,479	0,0244	3,316	0,252
Соотношение сырье/экстрагент	Однократная экстракция в течение 45 мин спиртом этиловым 70%			
1:100	1,455	0,0240	3,289	0,250
2:100	1,479	0,0243	3,305	0,254
4:100	1,508	0,0248	3,311	0,254
Кратность экстракции	Экстракция спиртом этиловым 70% при соотношении сырье/экстрагент 1:100 в течение 45 мин			
Однократная экстракция, 100 мл	1,455	0,024	3,289	0,250
Двукратная экстракция, по 50 мл 2 раза	2,364	0,039	4,763	0,362
Трехкратная экстракция, по 30 мл 3 раза	2,727	0,045	4,868	0,370

Из таблицы 3.2 следует, что оптимальным экстрагентом ФГ из побегов ивы трехтычинковой является спирт этиловый 70%, время экстракции 45 минут. Наиболее полное извлечение ФГ наблюдается при использовании трехкратной экстракции, при соотношении сырье/экстрагент 1:100 [91].

Используя найденные оптимальные условия экстракции, был проанализирован образец сырья, собранный в сентябре 2015 года (таблица 3.3). Относительная погрешность определения оказалась равной для салидрозида - 3,3%, а для триандрина - 5,7%. Увеличение ошибки определения триандрина, очевидно, можно объяснить значительно меньшим его содержанием в сырье, по сравнению с салидрозидом.

Таблица 3.3 – Результаты определения салидрозида и триандрина в побегах ивы трехтычинковой (площадь пика СО триандрина – 23,7; СО салидрозида – 19,5; W – 6,94%)

Масса сырья, г	Салидрозид		Триандрин	
	Площадь пика	Найдено, %	Площадь пика	Найдено, %
1,1340	4,775	0,363	2,739	0,0442
1,0989	4,399	0,345	2,498	0,0416
1,0085	4,036	0,348	2,293	0,0417
1,0105	4,267	0,364	2,474	0,0448
0,9984	3,915	0,338	2,372	0,0435
0,9907	4,034	0,351	2,485	0,0459
Метрологические характеристики				
$\bar{X}$	0,352		0,0436	
$S_{\bar{x}}$	0,00414		0,00099	
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,352 $\pm$ 0,012		0,0436 $\pm$ 0,0025	
ε	3,28%		5,69%	

В описанных выше условиях было проанализировано 6 образцов побегов ивы трехтычинковой. Результаты представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Результаты количественного определения салидрозид и триандрина в побегах ивы трехтычинковой методом КЗЭ (среднее из трех параллельных определений)

площадь пика СО триандрина – 23,7; СО салидрозид – 19,5

Место и время сбора	Триандрин		Салидрозид	
	Время миграции, сек	Найдено, %	Время миграции, сек	Найдено, %
Р. Подкумок, 2013 г., сентябрь	508,0	0,0071	469,1	0,062
Р. Подкумок, 2014 г., сентябрь	506,7	0,0248	472,2	0,262
Р. Подкумок, 2015 г., сентябрь	504,9	0,0429	468,0	0,363
Р. Подкумок, 2015 г., май	504,5	0,0098	469,2	0,144
Р. Малка, 2014 г., июнь	519,6	0,0356	461,4	0,416
Р. Кубань, 2014 г., август	500,3	0,0116	470,0	0,522

Приведенные в таблице 3.4 значения времен миграции были статистически обработаны, при этом для салидрозид $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 468,3 \pm 3,9$ и $\varepsilon = 1,5\%$, а для триандрина $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 507,3 \pm 6,8$ и $\varepsilon = 1,4\%$. Полученные данные можно предложить для идентификации триандрина и салидрозид в побегах ивы трехтычинковой, считая, что время миграции их пиков на электрофореграммах извлечения и раствора смеси СО должно совпадать с отклонением, не превышающим 2%.

Анализируя полученные данные можно сделать вывод, что содержание салидрозид в побегах ивы трехтычинковой почти в 10 раз превышает содержание триандрина. Наибольшее количество салидрозид обнаружено в побегах ивы, собранных на берегу реки Кубань Кочубеевского района Ставропольского края и на берегу реки Малка КБР.

Таким образом, применение различных вариантов метода позволило определять как электронейтральный ФГ салицин (вариант МЭКХ), так и ФГ, способные к ионизации – салидрозид и триандрин (вариант КЗЭ). В результате

установлено, что в побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, салицин отсутствует, а более характерными ФГ являются салидрозид и триандрин, которые накапливаются в количестве до 0,522% и 0,043% соответственно. Данный факт свидетельствует о возможности использования салидрозида и триандрина в качестве маркерных компонентов при разработке нормативной документации на данный вид сырья. С этой целью предлагается измерять электрофореграммы извлечений и сравнивать время миграции пиков салидрозида и триандрина с временем миграции пиков растворов СО салидрозида и триандрина [91].

3.3 Определение дубильных (окисляемых) веществ

Ввиду того, что нами не обнаружено данных по изучению ДВ в побегах ивы трехтычинковой целью настоящего раздела является качественное и количественное определение дубильных веществ в этом сырье.

Идентификацию дубильных веществ проводили в водных извлечениях с помощью качественных реакций (см. таблицу 3.1) в соответствии с руководством [155], а также в спирто-водных извлечениях методом ВЭЖХ со стандартными образцами (0,05% растворы галловой кислоты, танина, эпикатехина, катехина, эпигаллокатехингаллата в спирте этиловом 70%).

Количественное определение ДВ проводили титриметрическим методом, описанном в ГФ XI издания [87], и спектрофотометрическим методом [97].

С помощью качественных реакций в водных извлечениях из побегов *S. triandra* L. были обнаружены ДВ как гидролизуемой, так и конденсированной природы (таблица 3.1).

Результаты анализа спирто-водных извлечений, полученных с помощью метода ВЭЖХ (см. п. 2.3.2.3), приведены в таблице 3.5 (в качестве объектов исследования были использованы, кроме побегов, также листья и побеги без листьев).

Таблица 3.5 – Идентификация дубильных веществ (метод ВЭЖХ) в сырье ивы трехтычинковой

СО	Побеги без листьев			Листья			Побеги		
	время, мин	площ., mV*сек	конц, %	время, мин	площ., mV*сек	конц, %	время, мин	площ., mV*сек	конц, %
Танин	3,76	1227,59	9,37	3,22	644,21	1,41	3,65	125,15	0,44
Галловая кислота	3,99	1855,10	14,17	3,56	2178,30	4,76	3,86	1572,15	5,52
Катехин	4,22	1380,27	10,54	3,79	1247,17	2,72	4,10	1407,4	4,94
Эпигалло катехин-галлат	4,55	1396,83	10,67	4,12	2890,68	6,31	4,42	957,26	6,87
Эпикатехин	5,69	587,90	4,49	5,32	1720,07	3,75	5,62	1112,8	3,91
Итого, %	49,26			18,95			21,68		
Навеска, г	1,480			1,170			1,030		

Как следует из данных таблицы 3.5, в исследуемых образцах ивы трехтычинковой содержатся, в основном, конденсированные дубильные вещества (катехин, эпикатехин, эпигаллокатехингаллат). Во всех образцах обнаружена галловая кислота и только около 20% от суммы дубильных веществ приходится на содержание танина в побегах и побегах без листьев. Наибольшее количество ДВ (49,3%) от суммы всех БАВ, извлекаемых спиртом 70% и имеющим полосу поглощения в области 254 нм, содержится в побегах без листьев. Почти сопоставимые количества ДВ при этом содержат листья и побеги – 18,95% и 21,68% соответственно [135].

Для оценки пригодности методики определения ДВ, приведенной в ГФ XI изд., в побегах ивы трехтычинковой предварительными исследованиями устанавливали ее валидность на примере сырья, заготовленного в сентябре 2014 г. в окрестностях г. Пятигорска [20].

Для определения линейности расчет содержания дубильных веществ в пробе (в граммах) проводили по формуле 2 и по полученным результатам был построен градуировочный график (рисунок 3.5).

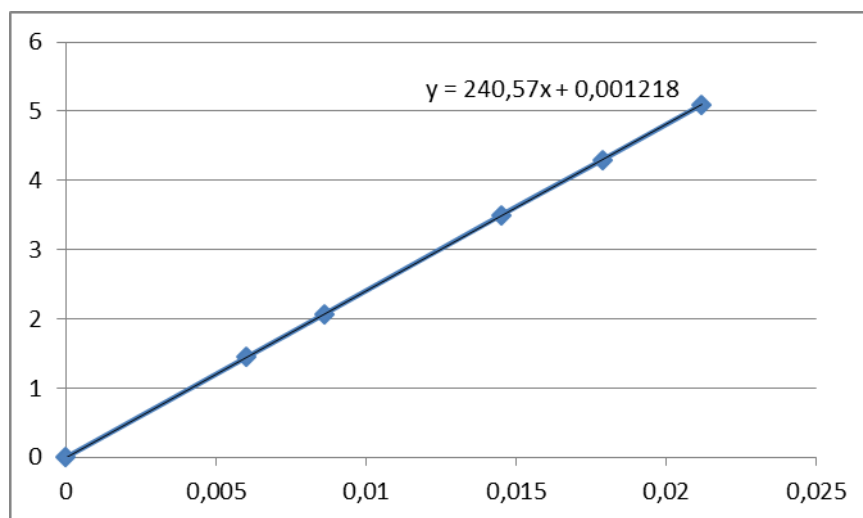


Рисунок 3.5 – Градуировочный график зависимости объема титранта (мл) от содержания дубильных веществ (г) в пробе

Как следует из графика, все экспериментальные точки находятся вблизи линии тренда, а величина коэффициента «а» незначительная. Значение коэффициента корреляции равен 1,009, что незначительно больше критического значения $|r| = 0,99$, следовательно, методика линейна.

Для определения прецизионности методики готовили 6 параллельных извлечений (п. 2.3.1.2), проводили титрование и вычисляли величины стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) [20, 139]. Представленные результаты получены при использовании титра по танину (таблица 3.6).

Чёткие нормативы по прецизионности методики определения БАВ в ЛРС отсутствуют. Это связано с тем, что её величина зависит от особенностей аналитического метода, пробоподготовки и содержания аналита в образце [3, 118].

Таблица 3.6 – Результаты определения прецизионности методики определения суммы дубильных веществ титриметрическим методом ($V_k=1,17$ мл; $W=5,06\%$)

Взято сырья, г	Объем титранта, мл	Найдено, г (X_i)	Метрологические характеристики
1,9760	4,45	3,634	$\bar{X} = 3,584$ $\sum(X_i - \bar{X})^2 = 0,03641$ $SD = 0,0853$ $RSD = 2,38\%$
2,0562	4,50	3,545	
2,0081	4,35	3,472	
2,0001	4,40	3,517	
2,0022	4,55	3,693	
2,0034	4,50	3,643	

Полученное нами значение RSD (2,38%) не превышает 3%, рекомендованных для биологических образцов, в связи с чем можно сделать заключение о том, что методика прецизионна [19, 20].

На следующем этапе устанавливали правильность методики анализа. Поскольку в данном случае не было возможности приготовить извлечение побегов ивы с заведомо известным содержанием ДВ, использовали значение свободного члена полученного уравнения регрессии, а именно если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки. Согласно статистической обработке полученного уравнения коэффициент «b» имеет доверительный интервал 4,48 ($240,57x \pm 4,48$), а свободный член «a» значимо не отличается от нуля, т.к. его доверительный интервал равен 0,0631 ($0,0012 \pm 0,0631$) и значительно превышает значение самого коэффициента. В виду того, что свободный член «a» = 0, уравнение принимает вид $y=240,87x$ и предлагаемая методика неотягощена систематической погрешностью [29]. Таким образом, методика является валидной по следующим характеристикам: линейность, правильность и прецизионность.

Результаты исследований динамики накопления БАВ в зависимости от времени и места сбора, полученные с использованием методики

перманганатометрического титрования на различных образцах сырья ивы трехтычинковой (среднее из трех параллельных определений), представлены в рисунках 3.6 – 3.9.

Образцы сырья заготавливались в 2014 году на берегах рек Подкумок, Малка и Кубань. Почвенные, климатические, фитоценоотические и другие факторы этих мест обитания оказывают влияние на содержание ДВ в образцах сырья. Наибольшие значения этого показателя наблюдали в побегах, заготовленных у рек Малка и Кубань (рисунок 3.6).



Рисунок 3.6 – Содержание дубильных (окисляемых) веществ в сырье ивы трехтычинковой, заготовленном в разных местах обитания

Наибольший суммарный вклад в сырьевую часть «побеги ивы трехтычинковой» вносят листья в образцах, заготовленных у р. Подкумок и Кубань. Побеги без листьев и листья из образца р. Малка имели близкие значения содержания суммы ДВ (рисунок 3.6).

Данные изучения динамики накопления ДВ в органах побегов ивы (рисунок 3.7) свидетельствуют о том, что побеги без листьев содержат меньшее количество ДВ по сравнению с листьями и побегами во все сроки наблюдения. Листья при

этом содержат наибольшее количество ДВ, чем полноценно дополняют побеги без листьев (рисунок 3.7).

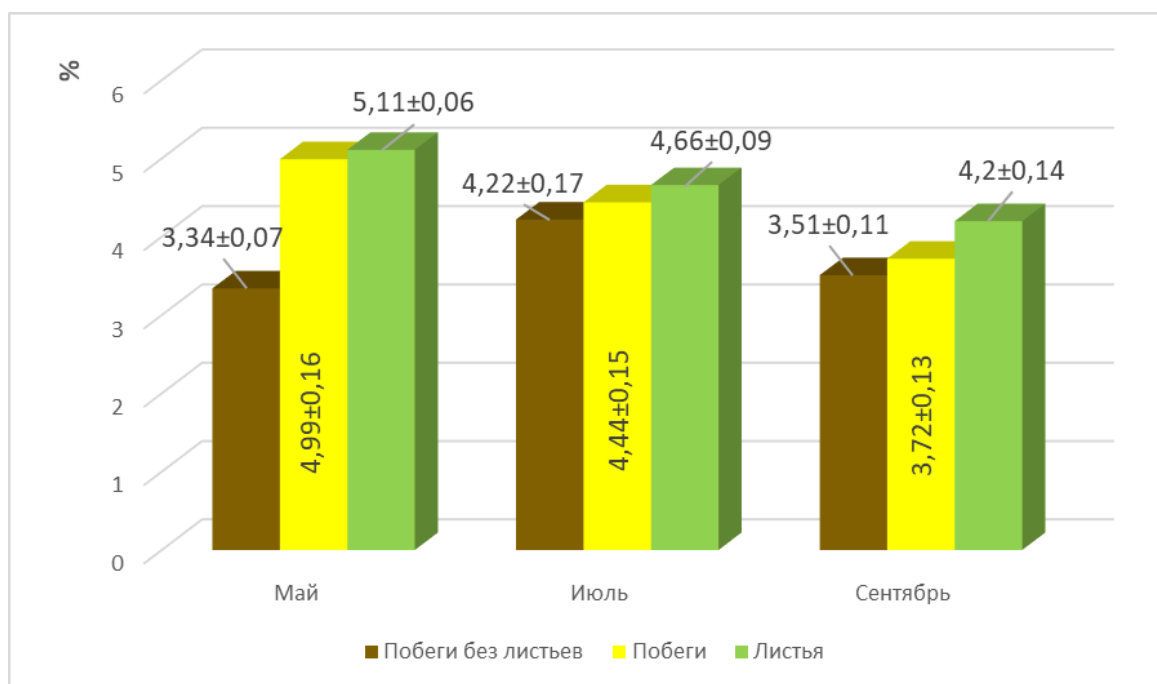


Рисунок 3.7 – Накопление дубильных веществ в органах ивы трехтычинковой в разные сроки наблюдения (р. Подкумок 2014 г.)

С целью определения сроков заготовки изучали накопление ДВ в образцах сырья, заготовленных с мая по сентябрь у р. Подкумок в 2015 г. Наибольшее накопление ДВ наблюдали в побегах ивы трехтычинковой, заготовленных в июле, августе и сентябре (рисунок 3.8).

Однако в сентябре 2014 г. количество ДВ падало (рисунок 3.7 и 3.9), исходя из этого, период с июля по август является оптимальным для заготовки сырья ивы трехтычинковой по содержанию ДВ (рисунок 3.8.).

В эксперименте выяснили, что особенности климатических условий разных лет (влажность воздуха, количество солнечных дней, количество и объем осадков и т.д.) влияют на содержание ДВ (окисляемых веществ) в побегах ивы. Образцы заготавливали в сентябре на берегу реки Подкумок (г. Пятигорск) с 2013 по 2015 год. Так, в 2013 году по сравнению с образцами 2014 г. ДВ было значительно больше, а с 2015 годом их значения были почти равными (рисунок 3.9).

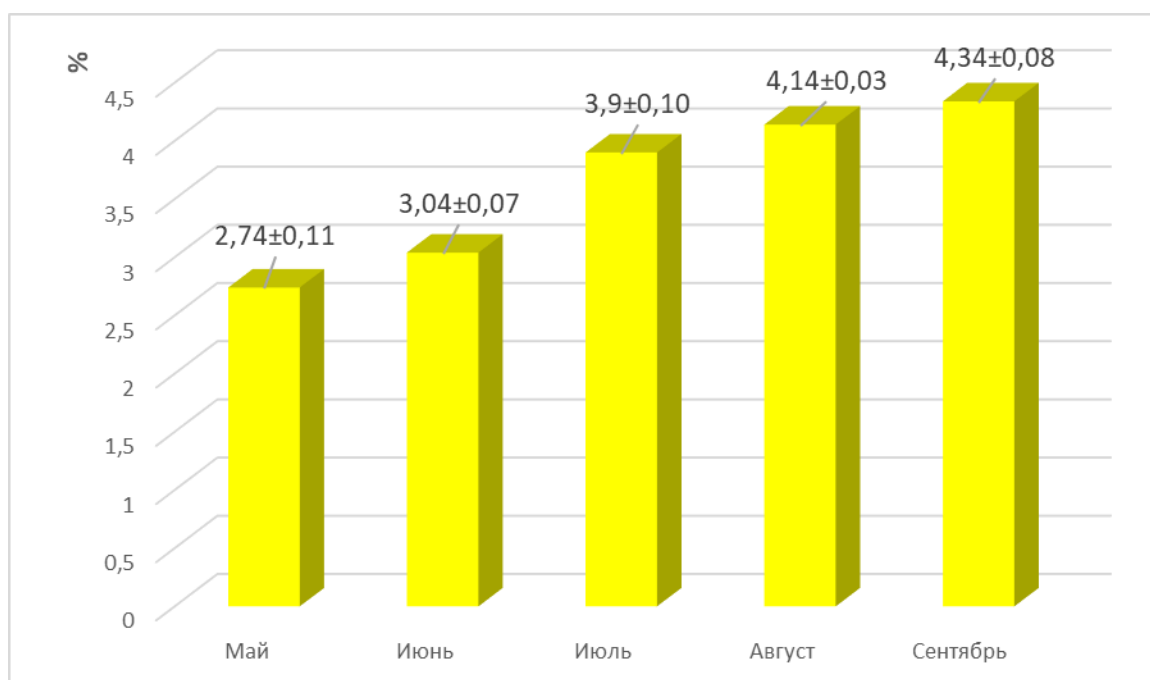


Рисунок 3.8 – Динамика накопления дубильных веществ в побегах ивы трехтычинковой (р. Подкумок 2015 г.)

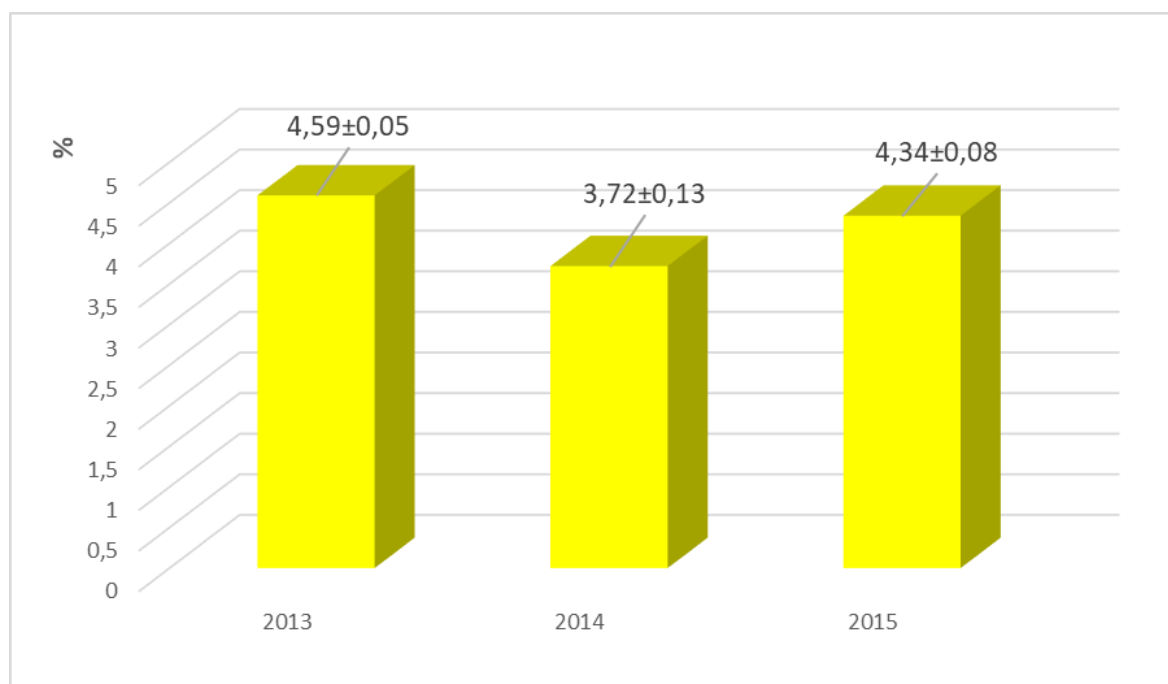


Рисунок 3.9 – Содержание дубильных веществ в побегах ивы трехтычинковой, заготовленные в сентябре месяце в разные годы

Таким образом, изучение факторов, влияющих на накопление ДВ в образцах, позволило установить оптимальные сроки заготовки сырья и определить оптимальную сырьевую часть ивы трехтычинковой.

Кроме перманганатометрического метода, нами с целью более объективной оценки содержания ДВ в исследуемом сырье был использован селективный спектрофотометрический метод. Так, Европейская фармакопея 7 изд. [31], наряду с солями железа, использует спектрофотометрический метод, при котором измеряется оптическая плотность водного извлечения до и после осаждения ДВ гольевым порошком, который осаждает только дубильные вещества. В России запатентован способ определения ДВ, основанный на реакции осаждения ДВ с помощью раствора коллагена. При сравнительном изучении использования гольевого порошка и коллагена с водными извлечениями из 13 видов ЛРС, содержащего дубильные вещества, было установлено, что 1% раствор коллагена может использоваться в качестве реактива осаждения дубильных веществ наравне с использованием гольевого порошка [97].

Используя методику, приведенную в патенте (см. п. 2.3.2.4), предварительными исследованиями нами было показано, что для осаждения дубильных веществ ивы трехтычинковой необходимо использовать 7 мл 1% раствора коллагена в 1% растворе кислоты уксусной. Результаты определения ДВ (среднее из трех параллельных определений) приведены в таблице 3.7 на примере анализа однолетних побегов ивы трехтычинковой, собранных в районе реки Подкумок (г. Пятигорск) в сентябре 2013 г. Спектры поглощения полученных извлечений были измерены до и после осаждения ДВ, на которых четко видно уменьшение оптической плотности после осаждения ДВ (рисунок 3.10).

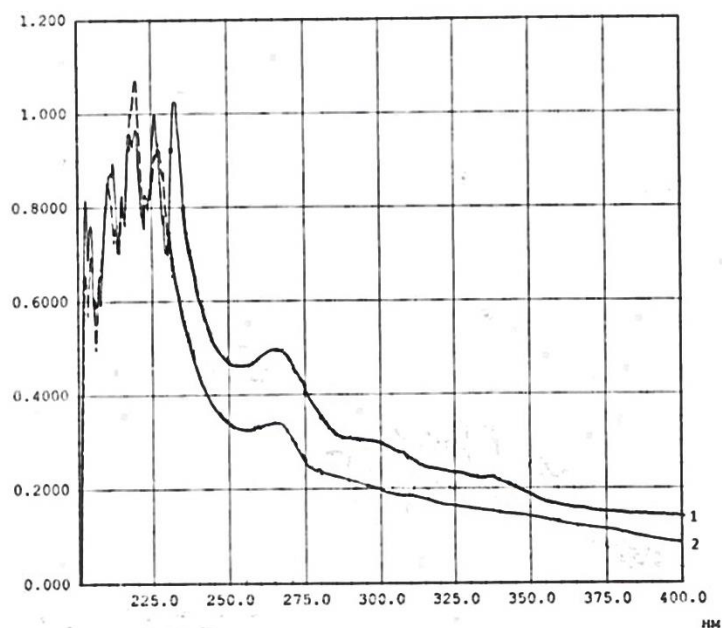


Рисунок 3.10 – Спектры поглощения извлечения листьев ивы трехтычинковой до осаждения раствором коллагена (1) и после осаждения раствором коллагена (2)

Таблица 3.7 – Результаты спектрофотометрического определения дубильных веществ (%) в сырье ивы трехтычинковой (среднее из трех параллельных определений)

Вид сырья	Побеги без листьев	Побеги	Листья
Навеска сырья, г	1,9009	1,9048	1,9006
Оптическая плотность раствора А	0,326	0,401	0,431
Оптическая плотность раствора В	0,220	0,268	0,171
Сумма полифенольных соединений, %	2,11	2,59	2,79
Сумма ДВ, осажденных коллагеном, %	1,52	1,73	1,68
Сумма не осаждаемых полифенольных соединений, %	0,59	0,86	1,11

Как следует из данных таблицы 3.7 содержание дубильных веществ,

найденных спектрофотометрическим методом, значительно отличается от результатов, полученных методом титрования, так как данный метод позволяет определить содержание непосредственно ДВ [80, 121, 135].

3.4 Определение флавоноидов

3.4.1 Идентификация флавоноидов

Известно, что ива трехтычинковая относится к секции *Amygdalinae*, которая характеризуется наличием рутина, и он является специфичным таксоном данной секции [154]. В.А. Компанцевым в 70-х годах прошлого столетия найдено, что в листьях ивы трехтычинковой содержится до 5% рутина, в коре - салипурпозид и нарингенин (около 1,5%), в соцветиях - рутин и кверцетин (около 1,5%) [46, 47, 154]. В своих работах В.А. Компанцев использовал трудоемкие и длительные по времени методы определения флавоноидов. В настоящее время описаны доступные и простые методы определения флавоноидов в растительном сырье по сравнению с методами, используемыми В.А. Компанцевым, однако в листьях и побегах ивы трехтычинковой такие определения не проводились.

Положительные результаты химических реакций (таблицы 3.1 и 3.8), методики которых описаны в п. 2.3.1.1, свидетельствуют о присутствии флавоноидов как в листьях, так и в побегах без листьев.

С помощью метода ТСХ в системах растворителей н-бутанол – кислота уксусная концентрированная – вода (8: 2: 4) нами подтверждено, что в листьях, побегах и побегах без листьев содержится рутин, так как на хроматограмме просматривалось яркое пятно на уровне пятна СО рутина (методика п. 2.3.2.1).

Используя методику, приведенную в главе 2 (п. 2.3.2.3), с помощью метода ВЭЖХ были получены хроматограммы извлечений из побегов, листьев и побегов без листьев (таблица 3.9).

На основании сравнения полученных хроматограмм спиртовых извлечений сырья с хроматограммами растворов СО (рутина, кверцетина, дигидрокверцетина,

лютеолина, лютеолин-7-гликозида, кемпферола, гиперозида, геспередина, апигенина) можно сделать заключение, что во всех исследуемых образцах в

Таблица 3.8 – Идентификация флавоноидов в иве трехтычинковой

Метод обнаружения	Побеги	Листья	Побеги без листьев
Цианидиновая проба	красное окрашивание	красное окрашивание	бледно-красное окрашивание
Борно-лимонная реакция	ярко-желтое окрашивание	ярко-желтое окрашивание	желтоватое окрашивание
Реакция с раствором ацетата свинца	желтоватый осадок	желтоватый осадок	слабо-желтоватый осадок
Реакция с раствором аммиака	темно-бурая окраска	темно-бурая окраска	бурая окраска
ТСХ	рутин $R_f = 0,64-0,66$	рутин $R_f = 0,64-0,66$	рутин $R_f = 0,64-0,66$

Таблица 3.9 – Идентификация флавоноидов в сырье ивы трехтычинковой методом ВЭЖХ

Наименование стандартного образца	Побеги без листьев			Листья			Побеги		
	время, сек	площадь, мин, mV*сек	конц., %	время, сек	площадь, мин, mV*сек	конц., %	время, сек	площадь, мин, mV*сек	конц., %
Дигидрокверцетин	10,27	183,56	1,40	-	-	-	10,24	938,15	3,29
Лютеолин – 7 – гликозид	14,32	112,22	0,86	13,94	753,62	1,65	14,76	690,05	2,42
Гиперозид	16,86	105,65	0,81		-	-	16,2	526,04	1,85
Рутин	17,91	82,68	0,63	16,66	1031,73	2,25	17,35	2141,13	7,52
Кверцетин	-	-	-	45,91	215,46	0,47	44,97	43,16	0,33
Лютеолин	-	-	-	49,61	803,92	1,75	51,7	425,05	1,49
Итого, %	4,06			6,12			16,57		
Навеска, г	1,480			1,170			1,030		

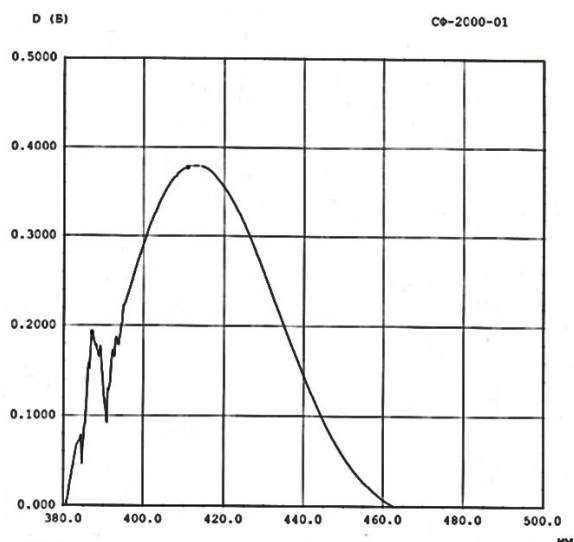
наибольших количествах содержится рутин и не обнаружены кемпферол, геспередин и апигенин. Дигидрокверцетин и гиперозид обнаружен только в

побегах и в побегах без листьев, а лютеолин и кверцетин – в листьях и побегах. Таким образом, с помощью метода ВЭЖХ подтверждено наличие в листьях рутина и лютеолина, обнаруженные ранее В.А. Компанцевым в листьях ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе [46, 47, 154]. Кроме того, дополнительно с помощью метода ВЭЖХ обнаружены в листьях лютеолин-7-гликозид (цинарозид), а в однолетних побегах без листьев - рутин и дигидрокверцетин.

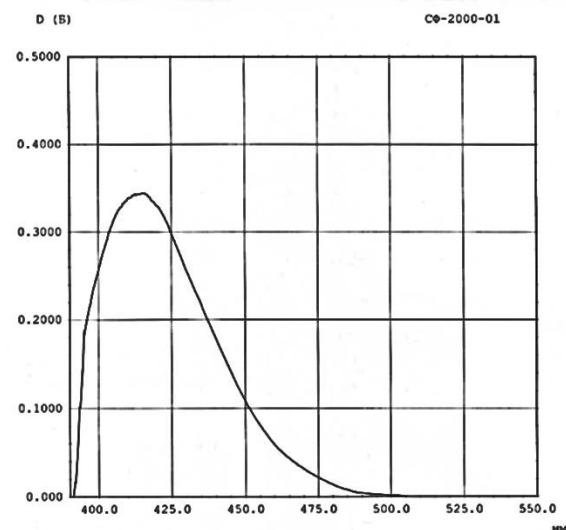
3.4.2 Определение суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии

Используя дифференциальную спектрофотометрическую методику, принятую ГФ РФ XIII издания (2015 г.) для определения суммы флавоноидов в лекарственном растительном сырье, рассчитывали сумму флавоноидов в листьях, побегах и побегах без листьев ивы трехтычинковой. Учитывая, что во всех исследуемых образцах содержался рутин, и максимум поглощения комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом в извлечениях изучаемых образцов совпадал с максимумом поглощения раствора комплекса рутина с алюминия хлоридом – 410 - 412 нм, рутин был взят нами в качестве стандартного образца (рисунок 3.11) [43]. Условия экстракции суммы флавоноидов использованы в соответствии с ФС «Трава зверобоя» и Т.М. Дементьевой с соавт. [35, 150].

Ввиду того, что методика для определения суммы флавоноидов ивы трехтычинковой используется впервые, нами предварительно была проведена валидация методики по критериям: специфичность, прецизионность, линейность и правильность (таблица 3.10) на примере анализа суммы флавоноидов в побегах ивы трехтычинковой, собранных в сентябре 2013 года (см. приложение 1) [43].



А



Б

Рисунок 3.11 - Спектр поглощения раствора комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом (А) и комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом извлечения из листьев ивы трехтычинковой (Б)

Таблица 3.10 – Валидационная оценка методики определения суммы флавоноидов в побегах ивы трехтычинковой

Показатель	Норматив	Результат
Специфичность	максимум поглощения УФ-спектра комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом извлечения из сырья должен совпадать с максимумом поглощения раствора комплекса СО рутина с алюминия хлоридом	максимум поглощения УФ-спектра комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом извлечения из сырья совпал с максимумом поглощения раствора комплекса СО рутина с алюминия хлоридом
Линейность (коэффициент корреляции $ r $)	$ r \geq 0,99$	0,994
Правильность (по градуировочному графику)	значение коэффициента «а» должно стремиться к 0	$y = (374 \pm 10)x + (0,002 \pm 0,014)$
Прецизионность $\bar{X} \pm SD$ (n=6) RSD	3%	$2,016 \pm 0,051$ 2,48%

Результаты таблицы 3.10, позволяют сделать вывод, что применяемая методика является валидной по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность [20].

Валидированная методика была использована для определения содержания суммы флавоноидов в побегах, листьях и побегах без листьев, собранных в 2013, 2014 и 2015 гг. в различное время и различных районах Северного Кавказа. Анализ проводился в год сбора сырья (таблица 3.11, приложение 2).

Таблица 3.11 – Количественное содержание суммы флавоноидов (%) в сырье ивы трехтычинковой (n=3)

Место сбора	Время сбора сырья	Побеги	Листья	Побеги без листьев
Река Подкумок (г. Пятигорск)	2014 г. май	1,73±0,09	3,07±0,23	0,11±0,02
	2014 г. июль	2,75±0,08	2,97±0,13	0,20±0,01
	2014 г. сентябрь	2,80±0,03	3,23±0,20	0,33±0,01
Река Малка (КБР)	2014 г. июнь	1,90±0,10	3,34±0,18	0,49±0,010
Река Кубань (Ставропольский край)	2014 г. август	3,24±0,06	3,68±0,21	0,25±0,02

Таким образом, результаты, представленные в таблице 3.11 и на рисунке 3.13, свидетельствуют, что наибольшее количество суммы флавоноидов накапливается в листьях (от 2,66% до 3,68%), в побегах это значение немного меньше (от 1,73% до 3,24%). В побегах без листьев содержание флавоноидов почти в 10 раз меньше (от 0,11% до 0,49%). В связи с низким содержанием флавоноидов в сырье, заготовленном в 2014 г., определение суммы флавоноидов в сырье «побеги без листьев», собранного в 2015 году не проводилось. Проведенный анализ на примере сырья, заготовленного в пойме реки Подкумок в течение трех лет (сентябрь 2013, 2014 и 2015 гг.), позволяет сделать вывод, что содержание суммы флавоноидов в сырье ивы трехтычинковой, собранного в

одном месте, но в разные годы подвергается незначительным изменениям (рисунок 3.12) [43].

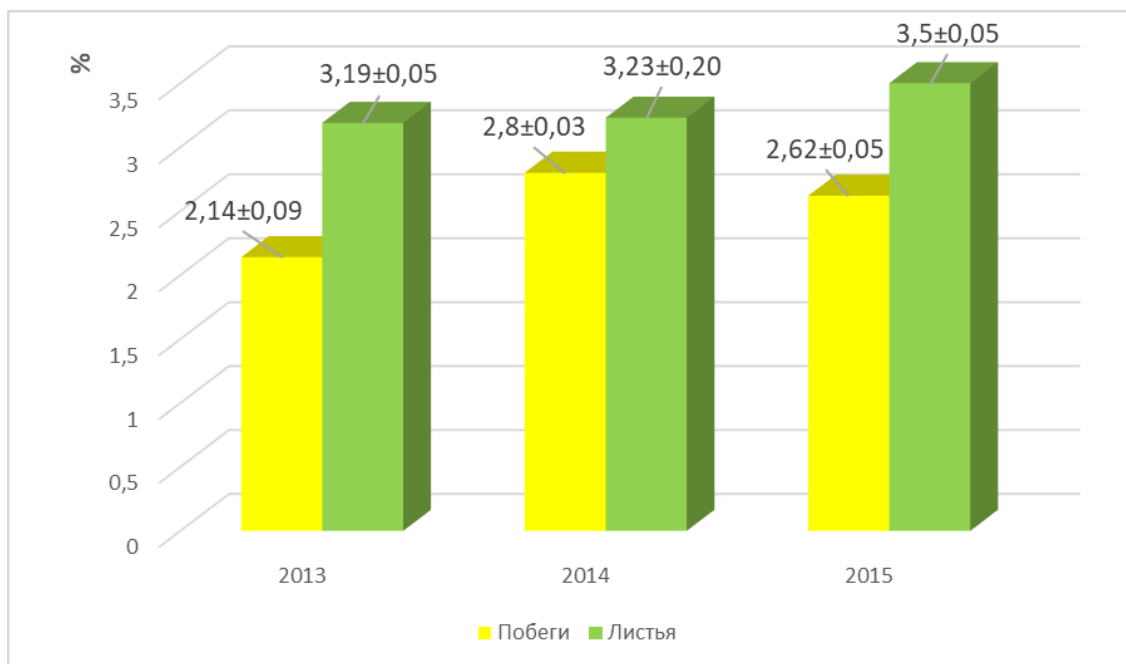


Рисунок 3.12 – Динамика накопления флавоноидов в сырье, заготовленном в разные годы (р. Подкумок, сентябрь)

Для определения сроков заготовки сырья изучали образцы, заготовленные с мая по сентябрь 2015 г. у р. Подкумок (рисунок 3.13).

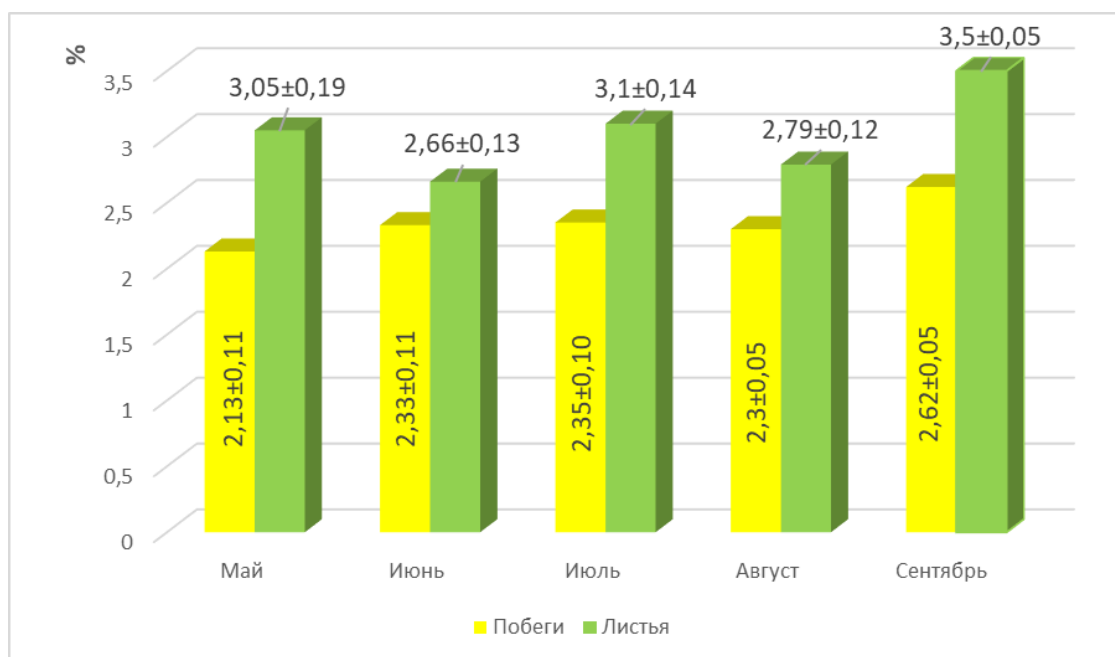


Рисунок 3.13 – Динамика накопления флавоноидов в побегах и листьях (р. Подкумок 2015 г.)

Наибольшее накопление флавоноидов в листьях и побегах наблюдали в период с июля по сентябрь месяцы. Несмотря на то, что в листьях содержание флавоноидов превышало содержание их в побегах, мы считаем целесообразным в качестве предлагаемого сырья использовать побеги.

3.4.3 Определение рутина методом планарной хроматографии

Используя данные, полученные методом ТСХ, мы посчитали возможным определить содержание рутина с помощью метода планарной хроматографии, в виду того, что по данным, полученным с помощью метода ТСХ, рутин является мажорным флавоноидом, обнаруженным как в листьях, так и в побегах.

Используя методику, приведенную в п. 2.3.2.1, на примере побегов ивы трехтычинковой, собранных в июне 2015 года на реке Подкумок (г. Пятигорск), нами получена хроматограмма, представленная на рисунке 3.14.

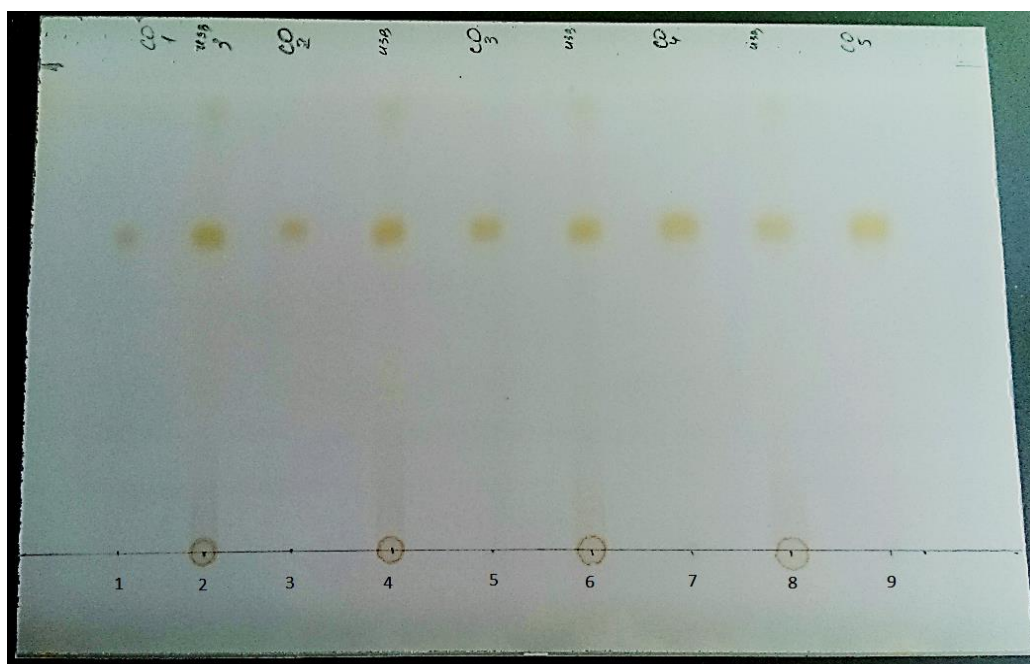


Рисунок 3.14 – Планарная хроматограмма раствора СО рутина (1-1,0 мкл, 3-2,0 мкл, 5-3,0 мкл, 7-4,0 мкл, 9-5,0 мкл) и извлечения из побегов ивы трехтычинковой (2-2,0 мкл, 4-3,0 мкл, 6-4,0 мкл, 8-5,0 мкл) (фото автора)

На треках извлечений проявлялись пятна жёлтого цвета с $R_f = (0,64 \pm 0,02)$, что совпадает по окраске и R_f с СО рутина.

При анализе извлечений, полученных разными способами (п. 2.3.2.1), было определено содержание рутина способом №1 – 1,27% и способом №2 – 1,91% (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Результаты количественного определения рутина в побегах ивы трехтычинковой

Содержание, % (способ 1)	Метрологические характеристики	Содержание, % (способ 2)	Метрологические характеристики
1,28	$\bar{X} = 1,27$ $SD = 0,01$ $RSD = 2,2\%$ $\Delta\bar{X} = 0,033$ $\varepsilon = 2,8\%$	1,95	$\bar{X} = 1,91$ $SD = 0,02$ $RSD = 2,5\%$ $\Delta\bar{X} = 0,06$ $\varepsilon = 3,12\%$
1,23		1,92	
1,26		1,95	
1,25		1,86	
1,31		1,85	

Данные свидетельствуют о наибольшей эффективности извлечения способом №2. Результаты значимо отличаются (Т-критерий – 2,57; $T_{\text{табл.}} - 2,3$).

Для подтверждения пригодности найденных условий анализа к практическому использованию и получению достоверной информации об объекте анализа проводили валидацию по следующим характеристикам: специфичность, чувствительность – предел обнаружения (ПО), предел количественного определения (ПКО), линейность, правильность, прецизионность (таблица 3.12, 3.13, приложение 1) [118].

Полученные данные (таблица 3.13) позволяют утверждать, что методика является высокочувствительной, специфичной и эффективной. Методика количественного определения отвечает необходимым требованиям по показателям: линейность, правильность и прецизионность. Данную методику можно использовать для экспресс-определения рутина в растительном сырье. Полученные данные (1,91%) отличаются от результатов, полученных методом дифференциальной спектрофотометрии (2,33%) почти на 20%.

Таблица 3.13 – Валидационная оценка методики определения рутина в побегах ивы трехтычинковой методом планарной хроматографии

Показатель	Норматив	Результат
Специфичность	R_f пятна испытуемого раствора должен соответствовать R_f СО рутина	R_f пятна испытуемого раствора соответствует R_f СО рутина ($0,63 \pm 0,02$)
Чувствительность	-	ПО – 0,22 мкг, ПКО – 0,68 мкг
Линейность (коэффициент корреляции $ r $) - по СО рутина	$ r \geq 0,99$	0,993
- по извлечению		0,997
Правильность (метод добавок): Открываемость, % RSD	97-103	99,3
	3,0	2,74
Прецизионность $\bar{X} \pm SD$ (n=6) RSD	3%	$1,91 \pm 0,02$ 2,5%

Данное отличие можно объяснить тем, что методом планарной хроматографии нами определялось содержание только рутина, тогда как методом дифференциальной спектрофотометрии определяется сумма флавоноидов, образующих окрашенный комплекс с раствором алюминия хлорида [18, 126].

3.4.4 Исследование флавоноидов методом капиллярного электрофореза

В связи с тем, что методом планарной хроматографии нами получены результаты, отличающиеся от результатов метода дифференциальной спектрофотометрии, нами изучалась возможность определения флавоноидов другими хроматографическими методами. Метод ВЭЖХ требует наличия высокочистых растворителей и дорогостоящих хроматографических колонок, а анализ, с учетом промывок, занимает, в ряде случаев, длительное время [176, 129].

В последние годы для анализа растительных объектов, в том числе и содержащих флавоноиды, все чаще стал применяться метод капиллярного электрофореза. Основными его преимуществами являются: высокая эффективность разделения, малый расход реактивов, экспрессность и экономичность [176, 129].

На первом этапе анализировали растворы СО шести основных флавоноидов, которые по литературным данным, приведенным выше, были обнаружены в листьях и коре ивы трехтычинковой (цинарозид, рутин, изосалипурпозид, нарингенин, лютеолин и кверцетин) [46, 47, 154]. На электрофореграммах обнаружены четкие пики со временем миграции 505 сек (цинарозид), 555 сек (примесь изосалипурпозид), 593 сек (рутин), 624 сек (изосалипурпозид), 641 сек (нарингенин), 735 сек (лютеолин) и 795 сек (кверцетин). Затем анализировали раствор смеси СО флавоноидов (см. п. 2.3.2.2) (рисунок 3.15) и извлечения изучаемых образцов сырья. На электрофореграмме смеси время миграции каждого флавоноида совпадает со временем их миграции на электрофореграммах индивидуальных веществ. В качестве ведущего электролита использовался раствор натрия тетрабората декагидрата (концентрация 10 мМ и рН 9,8), так как известно, что за счет образования боратных комплексов с диольными группами флавоноидов, повышается их селективность разделения [129, 176]. На электрофореграмме извлечения четко виден один пик, по времени миграции совпадающий с СО рутина, а также незначительные пики нарингенина и лютеолина (рисунки 3.15, 3.16).

Таким образом, с помощью метода КЭ нами подтверждены данные о содержании рутина в побегах ивы трехтычинковой и следовых количествах лютеолина и нарингенина. При этом, нами не найдены флавоноиды, которые были обнаружены в побегах ивы трехтычинковой с помощью метода ВЭЖХ (кверцетин и лютеолин 7-гликозид (цинарозид)).

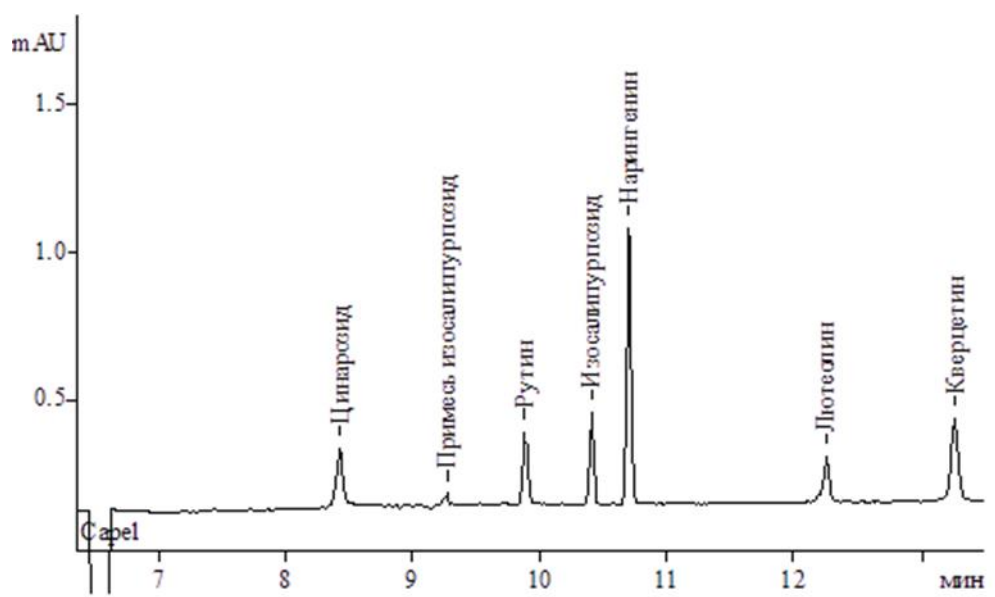


Рисунок 3.15 – Электрофореграмма раствора стандартных образцов

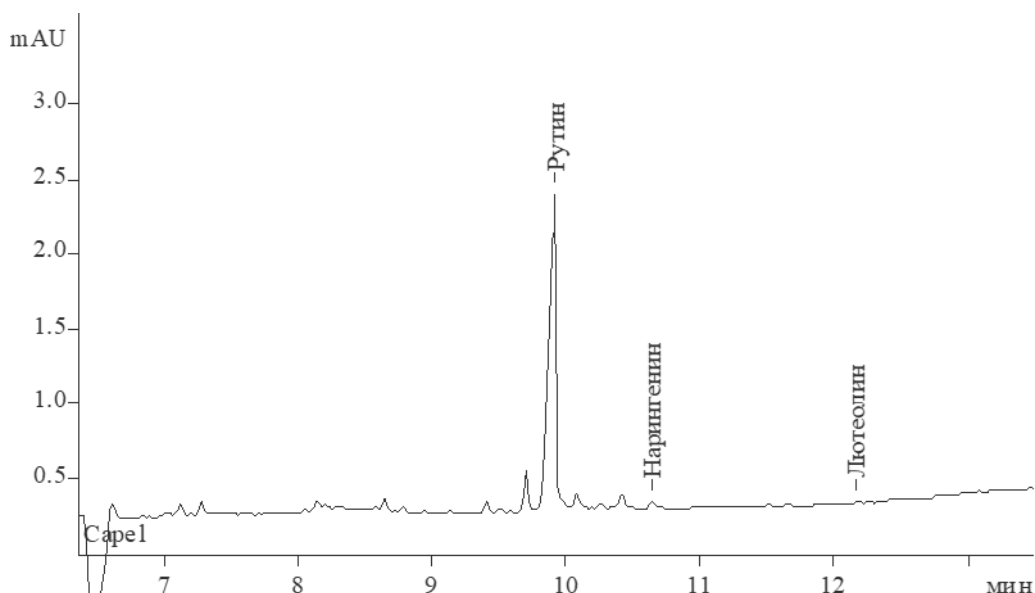


Рисунок 3.16 – Электрофореграмма спиртового извлечения побегов ивы трехтычинковой

Учитывая, что рутин является основным компонентом побегов ивы трехтычинковой, целесообразным представляется проводить оценку их качества по содержанию данного флавоноида. Площадь пика рутина в соответствии с представленной электрофореграммой (рисунок 3.16) составляет более 70% от суммы площадей всех пиков электрофореграммы.

На следующем этапе работы проводили валидационную оценку методики количественного определения рутина в побегах ивы трехтычинковой, собранных в мае 2015 года в пойме реки Подкумок, по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (таблица 3.14, приложение 1).

Таблица 3.14 – Валидационная оценка методики определения рутина в побегах ивы трехтычинковой методом КЗЭ

Показатель	Норматив	Результат
Специфичность	Время миграции испытуемого раствора должно соответствовать времени миграции СО рутина	Время миграции испытуемого раствора соответствует времени миграции СО рутина
Линейность (коэффициент корреляции $ r $)	$ r \geq 0,99$	0,9999
Правильность (по градуировочному графику)	значение коэффициента «а» должно стремиться к 0	$y = (172,75 \pm 1,39)x - (0,0017 \pm 0,0098)$
Прецизионность $\bar{X} \pm SD$ (n=6) RSD	3%	$1,84 \pm 0,04$ 2,21%

В результате полученные значения валидационных параметров (таблица 3.14) свидетельствуют о применимости разработанной методики для количественного определения рутина в исследуемых образцах сырья ивы трехтычинковой.

Количественное определение рутина в исследуемых образцах сырья ивы трехтычинковой проводили по методике, представленной в п. 2.3.2.2 (таблица 3.15).

Из таблицы 3.15 следует, что рутин накапливается непосредственно в листьях (до 3,35%), тогда как в побегах без листьев его содержание незначительно (до 0,14%). В побегах ивы трехтычинковой содержание рутина находится от

1,68% до 2,47%. Можно предложить, чтобы сбор сырья проводили после окончания цветения и плодоношения в июле и августе месяцах.

Таблица 3.15 – Содержание рутина в сырье ивы трехтычинковой, собранном в 2015 году (в %, среднее из трех параллельных определений)

Месяц сбора	Побеги	Листья	Побеги без листьев
Май	1,879	2,844	0,108
Июнь	2,232	3,054	0,123
Июль	2,110	2,891	0,115
Август	2,467	3,348	0,144
Сентябрь	1,683	2,706	0,097

Таким образом, с использованием капиллярного электрофореза разработана и валидирована методика количественного определения рутина в различных образцах сырья ивы трехтычинковой [128].

Результаты, полученные методами КЗЭ и дифференциальной спектрофотометрии на примере определения суммы флавоноидов и рутина в листьях и побегах, собранных в одно время и в одном месте заготовки, представлены в таблице 3.16.

Таблица 3.16 – Количественное определение флавоноидов в сырье ивы трехтычинковой

Место сбора	Время сбора	Побеги		Листья	
Метод анализа		СФМ	КЗЭ	СФМ	КЗЭ
Река Подкумок 2015 г.	Май	2,128	1,879	3,050	2,844
	Июнь	2,334	2,232	2,660	3,054
	Июль	2,354	2,110	3,100	2,891
	Август	2,298	2,467	2,791	3,348
	Сентябрь	2,620	1,683	3,498	2,706

Как следует из результатов, представленных в таблице 3.16, данные, полученные спектрофотометрическим методом, в основном, превышают

результаты метода КЗЭ на 10% - 35% при анализе побегов и на 5% - 25% при анализе листьев. Эти данные ожидаемы, т.к. с помощью КЗЭ определялось содержание только рутина, тогда как с помощью спектрофотометрического метода получена сумма флавоноидов, вступающих в реакцию с алюминия хлоридом. Однако, в листьях, собранных в июне и августе месяцев, методом КЗЭ получены результаты содержания рутина, превышающие результаты, полученные с помощью спектрофотометрического метода на 10%. В целом, можно считать, что метод КЗЭ может использоваться для определения содержания рутина в сырье и быть альтернативой методу дифференциальной спектрофотометрии.

3.5 Изучение фенолкарбоновых кислот ивы трехтычинковой

Известно, что фенолкарбоновые кислоты обладают выраженным фармакологическим действием и могут иметь значение как самостоятельные биологически активные вещества [152].

Различные виды растения рода Ива (*Salix* L.) отличаются высоким содержанием фенольных соединений [152], в связи с чем нами проведено исследование по определению качественного состава и количественного содержания фенолкарбоновых кислот в сырье ивы трехтычинковой.

Образцами исследования были побеги ивы трехтычинковой, которые заготовлены в Ставропольском крае в окрестностях г. Пятигорска на берегу реки Подкумок в сентябре 2013 года. В дальнейшем проводили сравнение содержания ФК в побегах, а также только в листьях и побегах без листьев [42].

Качественный состав ФК изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пробоподготовка и исследование описаны в п. 2.3.2.3. В качестве СО использовали 0,05% растворы в спирте этиловом 70% кислот: коричной, кофейной, неохлорогеновой, хлорогеновой, цикориевой и феруловой. Идентификацию веществ проводили по времени удерживания (таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Идентификация фенолкарбоновых кислот сырья ивы
трехтычинковой (метод ВЭЖХ)*

СО кислот	Анализируемые образцы								
	Побеги			Листья			Побеги без листьев		
	время, мин	площадь, мин, mV*сек	конц, %	время, мин	площадь, мин, mV*сек	конц, %	время, мин	площадь, мин, mV*сек	конц, %
Хлорогеновая	5,12	676,23	2,37	4,86	2126,4	4,64	5,28	588,10	4,49
Неохлорогеновая	8,05	1106,5	3,89	7,65	1467,1	3,20	8,28	1056,32	8,07
Цикориевая	9,24	784,06	2,75	8,92	1125,9	2,46	9,46	298,32	2,28
Феруловая	11,20	1013,6	3,56	11,30	849,21	1,85	11,49	94,56	0,72
Коричная	24,33	1896,1	6,66	23,32	1835,9	4,01	24,85	3,59	0,03
Итого, %	19,23			16,16			15,59		
*Примечание: в таблице приведены % от суммы всех БАВ, извлекаемых спиртом 70% и имеющим полосу поглощения в области 254 нм									

Во всех изученных образцах было обнаружено пять гидроксикоричных кислот (хлорогеновая (2,4-4,6%), неохлорогеновая (3,9-8,1%), цикориевая (2,3-2,8%), коричная (0,03-6,7%) и феруловая (0,72-3,6%)). Наибольшее их содержание (19,2%) от суммы всех БАВ, извлекаемых спиртом 70% и имеющих полосу поглощения в области 254 нм, находится в побегах. Почти сопоставимые количества суммы гидроксикоричных кислот оказались в образцах побегов без листьев и в листьях (15,6% и 16,2% соответственно). При этом, значительный процент от 4% до 8% приходится на долю хлорогеновой, неохлорогеновой и коричной кислот.

Для количественного определения суммы ФК использовали экстракционно-спектрофотометрический метод, в котором отмечена избирательная экстракция ФК этилацетатом в присутствии флавоноидов [55, 59].

Измеренный спектр поглощения этилацетатного извлечения, полученного по методике п. 2.3.2.4, представлен на рисунке 3.17, из которого следует, что максимум светопоглощения находится в области 325 нм и соответствует максимуму поглощения хлорогеновой кислоты, что совпадает с литературными данными [55, 59].

Результаты количественного определения суммы фенолокислот в изучаемых объектах представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Определение суммы фенолкарбоновых кислот экстракционно-спектрофотометрическим методом

Взято сырья, г	Оптическая плотность	Найдено ФК, %	Метрологические характеристики
Листья, W=5,97%, V _x =5 мл			
0,995	0,545	0,597	$\bar{X}$ =0,600% SD=0,0146 RSD=2,42%
0,957	0,513	0,584	
1,028	0,576	0,610	
1,115	0,640	0,625	
0,988	0,536	0,591	
1,013	0,560	0,602	
Побеги без листьев, W=7,99%, V _x =10 мл			
1,240	0,479	0,208	$\bar{X}$ =0,197% SD=0,008781 RSD=4,69%
0,958	0,334	0,188	
1,120	0,422	0,203	
1,021	0,377	0,199	
1,011	0,368	0,196	
0,915	0,314	0,185	
Побеги, W=8,99%, V _x =5 мл			
1,015	0,423	0,439	$\bar{X}$ =0,471% SD=0,024255 RSD=5,41%
1,112	0,506	0,480	
1,211	0,561	0,489	
1,036	0,436	0,444	
1,078	0,483	0,472	
1,248	0,591	0,499	

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот (в пересчете на кислоту

хлорогеновую) оказалось наибольшим в образцах листьев ивы трехтычинковой и составило 0,6%. Наименьшее содержание суммы ФК найдено в побегах без листьев – около 0,2%.

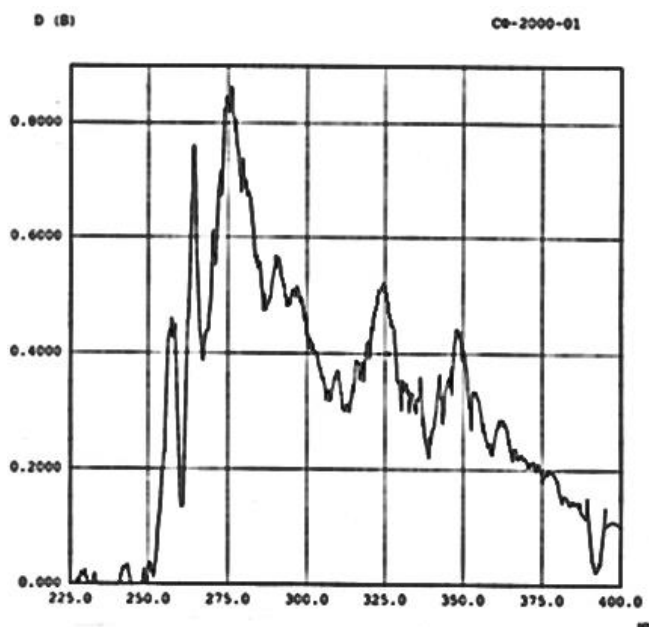


Рисунок 3.17 – Спектр поглощения этилацетатного извлечения из побегов ивы трехтычинковой

Таким образом, впервые определен качественный состав и количественное содержание фенолкарбоновых кислот в побегах, побегах без листьев и листьях ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе. Впервые в исследуемых образцах обнаружены хлорогеновая, неохлорогеновая и коричная кислоты. Полученные данные расширяют сведения о химическом составе данного растительного сырья. Обнаруженные фенолкарбоновые кислоты могут вносить существенный вклад в суммарный фармакологический эффект [42].

3.6 Определение органических кислот

Существенное влияние на фармакологический эффект растений рода Ива оказывают такие биологически активные вещества, как фенольные соединения

(флавоноиды, фенологликозиды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты) [123]. При применении такой лекарственной формы, как порошок побегов ивы, в организм человека будет поступать весь комплекс БАВ растения [152]. В связи с этим представляет интерес изучить не только фенольный комплекс, но и другие БАВ, такие как органические кислоты, аминокислоты, пигменты и макро- и микроэлементы.

Органические кислоты накапливаются во многих высших растениях. Известно, что вместе с пищевыми волокнами они могут сдерживать в кишечнике гнилостные процессы. Органические кислоты участвуют в обменных процессах организма, в цикле Кребса, способствуют повышению тонуса [62].

Известно, что количественное содержание свободных органических кислот определяют с помощью титрования алкаиметрическим методом с использованием кислотно-основных индикаторов [104, 131]. Используются также методы потенциометрического и кулонометрического титрования (плоды рябины, шиповника и др. растений) [83, 85, 110].

Для исследования использовали образцы листьев и побегов ивы трехтычинковой, заготовленные в Ставропольском крае в окрестностях г. Пятигорска на берегу реки Подкумок в сентябре 2013 года и в мае – сентябре 2014 г.

Для определения свободных органических кислот была использована методика, приведенная в ФС «Плоды шиповника» ГФ XI издания [104]. Расчет содержания суммы органических кислот проводили в пересчете на кислоту яблочную.

При титровании суммы свободных органических кислот с индикатором фенолфталеином нами не наблюдалось появления лилово-красного окрашивания в конце титрования, поэтому точку конца титрования фиксировали, исходя из наблюдения перехода окраски из светлой в зеленовато-оранжевую. Кроме того, нами велось потенциометрическое определение фиксированных точек конца титрования до значений рН 7,0 и 8,1 [83, 85, 110]. Относительная погрешность определения при потенциометрическом титровании оказалась в пределах 5,6% (на

примере титрования извлечения из сырья листьев ивы трехтычинковой, заготовленного у реки Подкумок в сентябре 2014 г), а для титрования по индикатору - 6,8% (таблица 3.19).

Таблица 3.19 – Результаты определения свободных органических кислот

Взято сырья, г	Объем, мл	Найдено, %	Взято сырья, г	Объем, мл	Найдено, %
По фенолфталеину			Потенциометрически		
4,7006	1,50	1,069	2,5661	1,35	2,07
4,7005	1,51	1,069	2,5664	1,40	2,15
5,0493	1,45	0,962	2,4591	1,40	2,24
4,7325	1,41	0,998	2,4595	1,30	2,08
5,1509	1,37	0,891	2,4589	1,65	2,37
4,7023	1,45	1,033	2,4588	1,32	2,11
Метрологические характеристики	$\bar{X}=1,004$ $SD = 0,068$ $RSD = 6,8\%$		$\bar{X}=2,17$ $SD = 0,21$ $RSD = 5,6\%$		

Результаты определения суммы органических кислот в побегах ивы трехтычинковой, в зависимости от времени сбора, как среднее из трех параллельных определений, с точкой эквивалентности по фенолфталеину представлены в таблице 3.20.

Содержание органических кислот в побегах находится в пределах 0,84-0,90%, за исключением значения 0,69% (сбор середины лета 2014 г. р. Подкумок), то есть в побегах ивы трехтычинковой содержание органических кислот незначительно зависит от времени и места сбора сырья (таблица 3.20).

В таблице 3.21 приведены данные сравнительного изучения двух способов определения точки эквивалентности при титровании суммы свободных органических кислот в сырье ивы трехтычинковой на примере сырья, собранного на реке Подкумок (окрестности г. Пятигорска).

Таблица 3.20 – Содержание органических кислот в побегах ивы трехтычинковой в зависимости от места и времени сбора

Место сбора	Время сбора	Найдено, %	Место сбора	Время сбора	Найдено, %
р. Малка,	июнь 2014 г.	0,84	р. Подкумок	июль 2014 г.	0,69
р. Подкумок	июнь 2014 г.	0,90	р. Кубань	август 2014 г.	0,84

Таблица 3.21 – Результаты определения свободных органических кислот в образцах сырья ивы трехтычинковой

Исследуемый образец сырья/ время сбора	Найдено, %		Найдено, %
	Потенциометрически		По фенолфталеину
	до pH 8,1	до pH 7,0	
Побеги / сентябрь 2013 г	1,48 ± 0,03	0,94 ± 0,03	0,75 ± 0,02
Побеги / май 2014 г	1,89 ± 0,02	1,09 ± 0,03	0,87 ± 0,05
Побеги / июнь 2014 г	1,51 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,70 ± 0,05
Побеги / сентябрь 2014 г	1,40 ± 0,03	0,76 ± 0,03	0,83 ± 0,02
Листья /сентябрь 2014 г	2,17 ± 0,01	1,44 ± 0,02	1,00 ± 0,07

Полученные результаты (таблица 3.21) свидетельствуют, что при определении конца титрования до pH 8,1 сумма свободных органических кислот в листьях ивы трехтычинковой выше, чем в побегах и составляет не более 2,2%, тогда как в побегах это значение не превышает 1,5%. Исключение составляют побеги, собранные ранней весной (1,9%).

Некоторые авторы определение суммы свободных органических кислот проводят потенциометрическим титрованием до pH 7,0, которое по точности, по данным И.О. Дейнека с соавт. [83], не могут давать объективных результатов. В связи с этим нами также рассчитано содержание суммы свободных органических кислот при фиксировании значения pH 7,0 для всех исследуемых образцов

(таблица 3.21). Полученные результаты близки по своим значениям к результатам нейтрализации кислот по фенолфталеину и это может свидетельствовать о том, что при использовании индикатора для нейтрализации органических кислот получаются заниженные результаты из-за субъективности фиксации конечной точки титрования и неточности установления изменения окраски индикатора.

Таким образом, методом потенциометрического титрования найдено, что свободных органических кислот в побегах ивы трехтычинковой содержится до 1,9%. Полученные данные расширяют сведения о химическом составе изучаемого растительного сырья [84].

3.7 Изучение аминокислотного состава

Аминокислоты, являясь составной частью белков, участвуют во всех жизненных процессах, наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами. Многие из них являются лекарственными средствами (метионин, гистидин, глицин и их различные производные). В настоящее время известно, что лекарственные растения можно рассматривать как источник легкоусвояемой формы аминокислот в комплексе с микроэлементами и другими БАВ с целью лечения различных патологий [123].

По литературным данным нами не найдено сведений об изучении аминокислотного состава в побегах ивы трехтычинковой.

Количественное определение аминокислот в однолетних побегах ивы трехтычинковой проводили методом ВЭЖХ [123].

По методике, изложенной в п. 2.3.2.3, в побегах ивы трехтычинковой обнаружены [123] 16 аминокислот, из них 7 аминокислот, которые считаются незаменимыми для организма человека, а именно валин, лейцин, лизин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин (таблица 3.22). В пересчете на сухое вещество содержание аминокислот в побегах составляет 11,73%, из них 4,64% приходится на количество незаменимых аминокислот. В сырье найдены

моноаминомонокарбоновые, моноаминодикарбоновые, диаминомонокарбоновые и гетероциклические кислоты.

Таблица 3.22 – Аминокислотный состав побегов ивы трехтычинковой
(метод ВЭЖХ)

Наименование	Время выхода, мин	Относительное содержание в сумме, %	Содержание в сухом сырье, %
1	2	3	4
Моноаминомонокарбоновые кислоты			
Аланин	45,8	7,24	0,74
Валин*	55,1	5,71	0,64
Глицин	43,6	6,85	0,70
Изолейцин*	65,3	4,71	0,51
Лейцин*	67,0	10,55	1,18
Метионин*	62,5	2,16	0,22
Серин	24,6	6,61	0,69
Тирозин	71,4	3,71	0,44
Треонин*	23,0	6,30	0,67
Фенилаланин*	73,2	5,12	0,65
Сумма		58,96	6,44
Моноаминодикарбоновые кислоты			
Аспарагиновая	18,8	10,43	1,22
Глутаминовая	31,6	13,24	1,37
Сумма		23,67	2,59
Диаминомонокарбоновые кислоты			
Аргинин	86,7	5,25	0,81
Лизин*	78,4	7,18	0,77
Сумма		12,43	1,58

Продолжение таблицы 3.22

1	2	3	4
Гетероциклические кислоты			
Гистидин	75,2	3,94	0,44
Пролин	35,6	1,00	0,68
Сумма		4,94	1,12
Сумма незаменимых аминокислот, %		41,73	4,64
Общая сумма аминокислот, %		100	11,73

**незаменимые аминокислоты*

Преобладающими компонентами в однолетних побегах являются моноаминомонокарбоновые кислоты в пересчете на сухое сырье (6,44%). Наибольшее количество из найденных аминокислот в побегах являются аспарагиновая (1,22%), глутаминовая (1,37%) кислоты и лейцин (1,18%) [123].

Кроме того, нами проведено изучение количественного содержания свободных аминокислот в однолетних побегах и листьях ивы трехтычинковой [125].

В качестве объектов исследования взяты однолетние, олиственные, неодревесневшие побеги и листья ивы трехтычинковой, заготовленные в Ставропольском крае в окрестностях г. Пятигорска на берегу реки Подкумок в сентябре 2013 года и мае – сентябре 2014 г.

Для определения суммы свободных аминокислот использовали спектрофотометрическую методику на основе реакции с нингидрином (см. п. 2.3.2.4). Содержание свободных аминокислот определяли в пересчете на кислоту глутаминовую, рекомендованную как унифицированный стандартный образец для определения суммы свободных аминокислот в растительных объектах [111].

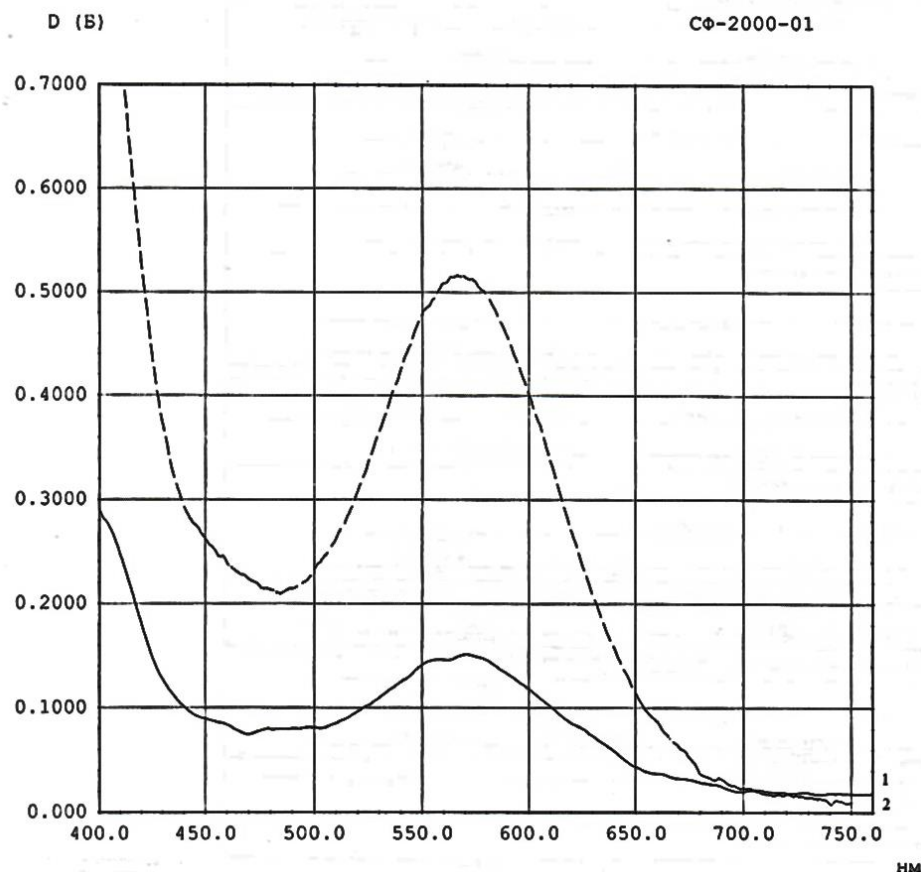


Рисунок 3.18 – Спектры поглощения продуктов реакции с нингидрином извлечения побегов ивы (2) и раствора СО кислоты глутаминовой (1)

Предварительно были измерены спектры растворов, полученных по методике, описанной в п. 2.3.2.4 (рисунок 3.18). Как следует из представленного рисунка, максимум поглощения продукта реакции извлечения из побегов ивы и СО кислоты глутаминовой совпадают и находятся в области 571 нм.

Для определения прецизионности (таблица 3.23) проводили шесть параллельных определений содержания суммы свободных аминокислот в сырье побегов ивы трехтычинковой, собранной в сентябре 2013 года на берегу реки Подкумок (окрестности г. Пятигорска).

Полученное значение RSD (1,3%) не превышает рекомендуемой погрешности анализа ($\pm 3\%$) для содержания определяемого вещества в пределах 1%, следовательно, методика прецизионна и воспроизводима.

Таблица 3.23 – Результаты определения прецизионности методики

(W=7,9%; $A_{\text{ст}}=0,645$; $a_{\text{ст}}=0,0500$ г)

Взято сырья, г	Оптическая плотность	Найдено, % (X_i)	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологические характеристики
1,0003	0,220	0,927	0,0005	0,0000002	$\bar{X} = 0,928$ $\sum(X_i - \bar{X})^2 = 0,000717$ SD = 0,012 RSD = 1,3%
1,0008	0,229	0,965	0,0375	0,00141	
0,9989	0,215	0,906	0,0215	0,00046	
1,0011	0,212	0,893	0,0345	0,00119	
0,9992	0,228	0,960	0,0325	0,00106	
0,9995	0,217	0,914	0,0135	0,000182	

Следующим этапом работы было определение свободных аминокислот в образцах однолетних побегов ивы (таблица 3.24).

Таблица 3.24 – Результаты анализа определения свободных аминокислот в образцах ивы трехтычинковой в зависимости от места и времени сбора

($A_{\text{ст}}=0,645$; $a_{\text{ст}}=0,0500$ г)

Место и время сбора	Вид сырья	W, %	Навеска, г	Оптическая плотность	Найдено, %
р. Подкумок					
Сентябрь, 2013 г.	побеги	8,99	1,010	0,219	0,93
	побеги без листьев	7,98	1,005	0,162	0,68
	листья	5,97	1,015	0,463	1,88
Май, 2014 г.	побеги	5,20	1,009	0,333	1,39
Июль, 2014 г.		5,27	1,010	0,276	1,15
Сентябрь, 2014 г.		5,07	1,012	0,374	1,56
р. Кубань					
Август, 2014 г.	побеги	5,32	1,01	0,177	0,74
р. Малка					
Июнь, 2014 г.	побеги	5,14	1,01	0,562	2,34

Как следует из данных таблицы 3.24, содержание свободных аминокислот зависит от органа растения: в побегах без листьев составляет 0,68%, в листьях - 1,88%, а в побегах находится в пределах 0,93% (р. Подкумок г. Пятигорск, сентябрь 2013 г.) и незначительно от времени сбора в 2014 году (май – 1,4%; июль – 1,1% и сентябрь – 1,6%). Значительные колебания в содержании свободных аминокислот в побегах наблюдаются в зависимости от места сбора от 0,74 до 2,34%.

3.8 Выделение и исследование полисахаридов

В связи с отсутствием литературных данных по изучению полисахаридов ивы трехтычинковой нами выделены полисахаридные комплексы.

Количественное содержание полисахаридов в соответствии с требованиями ГФ XI издания проводят гравиметрическим методом, который основан на осаждении полисахаридов спиртом 95%. В связи с присутствием в осадке большого количества примесей неуглеводной природы метод имеет низкую селективность [71].

Нами использован фракционный метод выделения полисахаридов по методике Н.К. Кочеткова [56]. Определение отдельных фракций проводили гравиметрически (см. п. 2.3.2.5).

Результаты количественного определения полисахаридов побегов ивы трехтычинковой представлены в таблице 3.25. Содержание ВРПС невысокое, не более 1,3%, а содержание ПВ еще ниже (в пределах 0,42%). Гемицеллюлозы А и Б значительно превышают содержание ВРПС и достигают значения для гемицеллюлозы А до 16%.

Т.М. Дементьевой в побегах ивы вавилонской обнаружено ВРПС 5,4% и в ее гибриде с ивой белой - 9,93%. В этих объектах содержится также значительные количества пектиновых веществ 5,4% и 4,6% соответственно [105].

Таблица 3.25 – Результаты определения полисахаридов в побегах ивы
трехтычинковой ($a_1=10,031$ г; $a_2=10,256$ г)

ВРПС		ПВ		Гемицеллюлоза А		Гемицеллюлоза Б	
Масса осадка, г	Содер- жание, %	Масса осадка, г	Содер- жание, %	Масса осадка, г	Содер- жание, %	Масса осадка, г	Содер- жание, %
0,119	1,186	0,043	0,429	1,631	16,26	0,302	2,99
0,134	1,306	0,056	0,418	1,541	15,03	0,267	2,60

Таким образом, в побегах ивы трехтычинковой в отличие от побегов ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой [28] содержится незначительные количества как ВРПС, так и ПВ, в связи с чем мы посчитали, что определение моносахаридного состава для данного сырья не представляет особого интереса для дальнейших исследований.

3.9 Исследование элементного состава

Микро- и макроэлементы необходимы для полноценной жизни человеческого организма. Все элементы условно делят на эссенциальные, условно-эссенциальные и условно-токсичные [93].

Жизнь растений также невозможна без макро- и микроэлементов. Для жизни растений необходимы металлы (калий, кальций, магний, железо) и металлоиды (сера, фосфор, азот и др.), содержащиеся в значительных количествах, а также микроэлементы, содержащиеся в малых количествах, но необходимые для нормальной жизнедеятельности растения. К абсолютно необходимым для любого растения элементам относятся железо, марганец, бор, цинк, медь, молибден, кобальт. Среднее содержание этих элементов в растении колеблется от 200 мг/кг (средняя величина для железа), до 0,1 мг/кг для молибдена. Другие металлы переменной валентности: никель, хром, кадмий - могут быть полезными, но не необходимыми. Таким образом, растения являются

хорошими источниками макро- и микроэлементов, так как они в растении накапливаются в органически связанной форме более доступной для человека [93].

Элементный состав растений рода Ива на настоящий момент изучен недостаточно. В Украине в 2015 г. опубликованы результаты элементного анализа побегов ивы козьей. Преобладающими макроэлементами оказались (мг/100 г): калий (1120), кальций (895) и кремний (450). Среди микроэлементов (мг/100 г): фосфор (195), железо (56) и алюминий (28) [152, 168].

Прием ЛРС в виде порошка позволяет считать, что в организм человека попадает весь комплекс его макро- и микроэлементов. Однако вместе с полезными веществами в организм поступают, накопленные в процессе жизнедеятельности растения, неблагоприятные для здоровья элементы. Так как растения получают вещества необходимые для питания из почвы, содержание в них токсичных для человека веществ непосредственно связано с местом произрастания. Особенному влиянию загрязняющих факторов подвержены водные и воздушные ресурсы, находящиеся в черте городов и их окрестностях. Так, А.С. Жиряковым на примере 8 видов ив, произрастающих у водоемов на территории г. Кирова и Кировской области (в том числе и ивы трехтычинковой), установлено, что в загрязнённых местообитаниях ивы достоверно накапливают больше меди, никеля, кадмия и свинца, по сравнению с растениями фоновых местообитаний и, в частности, что наибольшее количество свинца содержится в побегах ивы, меньше – в соцветиях и коре. Минимальная концентрация свинца выявлена в листьях [32].

В связи с этим нормирование содержания тяжелых металлов в сырье и фитопрепаратах – одна из важнейших задач современной отечественной науки. В настоящее время нормативы содержания тяжелых металлов в ЛРС регламентируются ГФ РФ XIII издания (2015 г.) [89].

В связи с этим представляет интерес определить наличие макро- и микроэлементов, содержащихся в побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, с целью оценки их вклада в фармакологическое и

токсическое действия. Определение элементного состава образцов проводили спектральным методом с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой “ICPE-9000” фирмы Shimadzu.

Таблица 3.26 – Элементный состав побегов ивы трехтычинковой

Элемент	Содержание в пробе, мг/л	Содержание в сырье, мг/%	Элемент	Содержание в пробе, мг/л	Содержание в сырье, мг/%
Макроэлементы					
Ca	36	72	Na	29	58
K	13	26	P	28	56
Mg	24	48	S	81	162
Микро- и ультрамикроэлементы					
Ag	0,05	0,1	Ir	2,3	4,6
Al	1,4	2,8	Mo	0,06	0,12
Au	0,37	0,74	Ni	0,23	0,46
B	0,41	0,82	Pt	0,88	1,76
Bi	<0,4	0,8	Rb	6,6	13,2
Co	0,29	0,58	Ru	0,12	0,24
Cr	0,28	0,56	Sb	0,08	0,16
Cs	<0,3	0,6	Se	0,13	0,26
Cu	0,41	0,82	Si	13	26
Er	0,07	0,14	Sr	5,5	11
Fe	29	58	Th	3,2	6,4
Ge	0,23	0,46	Ti	0,05	0,1
Hf	0,05	0,1	Tl	0,25	0,5
I	8,3	16,6	W	0,2	0,4
In	0,52	1,04	Zn	0,82	1,64

Полученные результаты исследованных образцов представлены в таблице 3.26.

Исходя из данных таблицы 3.26, следует, что в побегах ивы трехтычинковой присутствуют: эссенциальные элементы – макроэлементы: Ca, K, Mg, Na, P, S, где наибольшее количество серы (162 мг/%), а наименьшее – калия (26 мг/%) и микроэлементы: Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se, Zn, где наибольшее содержание железа (58 мг/%), а наименьшее – марганца (следы); условно-эссенциальные микроэлементы: Ag, Al, Au, B, Co, Ge, Li, Si, V, где наибольшее количество кремния (26 мг/%) и наименьшее – лития и ванадия; 39 условно-

токсичных микроэлементов и ультрамикроэлементов. В следовых количествах обнаружено 22 микроэлемента, среди которых 18 условно-токсичные микроэлементы и ультрамикроэлементы [44].

Кроме того, в таблице 3.27 нами приведены данные по наличию токсичных элементов в побегах ивы трехтычинковой, содержание которых регламентировано ОФС 1.5.3.0009.15 ГФ РФ XIII издания [89].

Таблица 3.27 – Содержание токсичных элементов в побегах ивы трехтычинковой

Элемент	Содержание в пробе, мг/л	Содержание в сырье, мг/%	Элемент	Содержание в пробе, мг/л	Содержание в сырье, мг/%
Pb	0,13	0,26	As	<0,01	0,02
Cd	0,009	0,018	Hg	0,01	0,02

**Норматив содержания токсичных элементов, мг/кг: свинец - 6,0; мышьяк – 0,5; кадмий – 1,0; ртуть – 0,1.*

Как следует из результатов таблицы 3.27, содержание токсичных элементов в побегах ивы трехтычинковой, таких как свинец, мышьяк, кадмий и ртуть не превышает допустимые нормы, предлагаемые ОФС.1.5.3.0009.15 [89].

Таким образом, в побегах ивы трехтычинковой обнаружено 68 макро- и микроэлементов.

3.10 Определение пигментов

В виду того, что при использовании измельченного растительного сырья в организм человека попадает весь комплекс БАВ, содержащийся в растении, представляет интерес изучение липофильной фракции, одним из компонентов которой являются пигменты. Известно, что хлорофилл обладает антибактериальным, противовоспалительным и ранозаживляющим эффектом [98, 172].

При сушке сырья, его хранении или удалении растворителя при экстракции комплексно связанный магний в хлорофилле полностью или частично может замещаться на водород с образованием феофитина бурого цвета [166, 180].

Нами проведена сравнительная оценка как методов определения пигментов, так и их содержания в побегах и листьях ивы трехтычинковой, учитывая время сбора, место произрастания и фазу вегетации [127].

Исследование качественного содержания пигментов в сырье проводили методом тонкослойной хроматографии [82]. Извлечения из побегов ивы трехтычинковой готовили согласно методике п. 2.3.2.1.

Визуально (рисунок 3.19) обнаружены 7 пятен, из которых одно пятно желтого цвета в видимом свете и ярко-желтого в УФ-свете со значением $R_f = 0,79$ можно отнести к β -каротину. Наиболее интенсивные пятна, имеющие сине-зеленый цвет и желто-зеленый цвет в видимом свете и малиновый и оранжевый цвет соответственно в УФ-свете с $R_f=0,10$ и $R_f=0,08$ можно отнести к хлорофиллам **a** и **b**. Пятно коричнево-серого цвета со значением $R_f = 0,27$ можно отнести к феофитину. Кроме того, на хроматограмме имеется пятно ксантофилла [82].

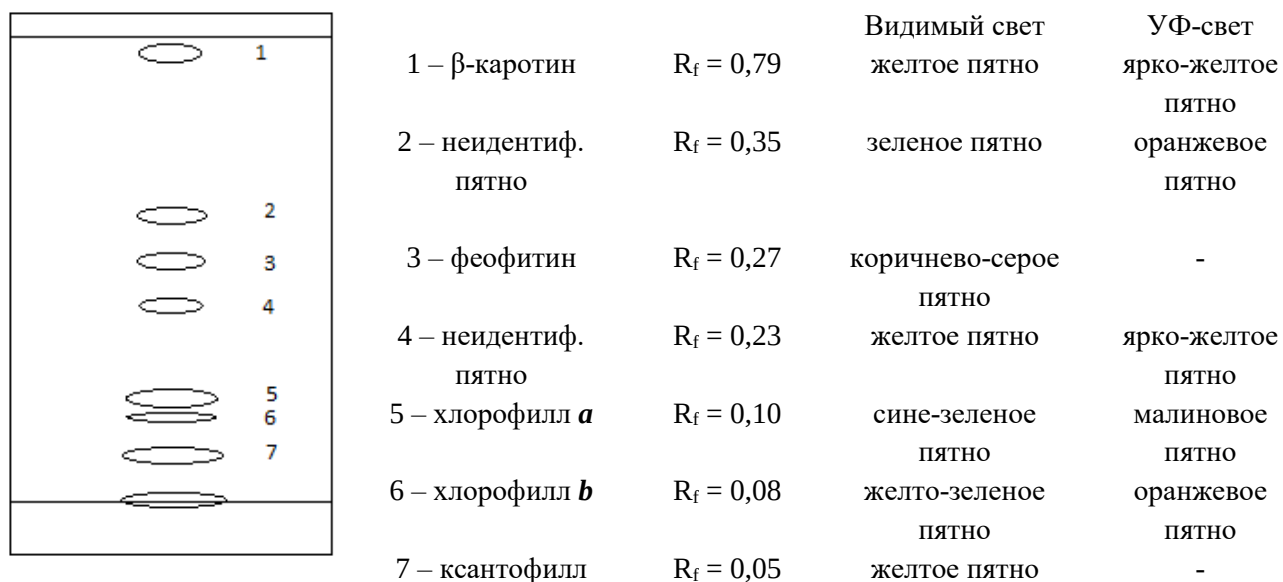


Рисунок 3.19 – Хроматограмма в тонком слое сорбента извлечения побегов ивы трехтычинковой

Количественное определение содержания хлорофилла проводили по методикам, описанным в п. 2.3.2.4 с использованием нагревания и при комнатной температуре [141, 172]. Содержание хлорофиллов рассчитывали с использованием значения удельного показателя поглощения хлорофилла [103] или с помощью производной спектрофотометрии, измеряя оптическую плотность в максимумах поглощения хлорофилла *a* (664 нм), хлорофилла *b* (649 нм) и каротина (470 нм) [141, 172]. Спектры поглощения извлечения из сырья ивы трехтычинковой представлены на рисунке 3.20.

С помощью прямой спектрофотометрии определяют содержание хлорофилла без учета возможного вклада поглощения других пигментов в данной области спектра (длина волны - 664 нм) [98]. Для определения содержания разновидностей хлорофиллов, а также суммы каротиноидов и ксантофиллов в образцах были использованы уравнения производной спектрофотометрии, позволяющей учитывать вклад в суммарное поглощение пигментов [141, 172].

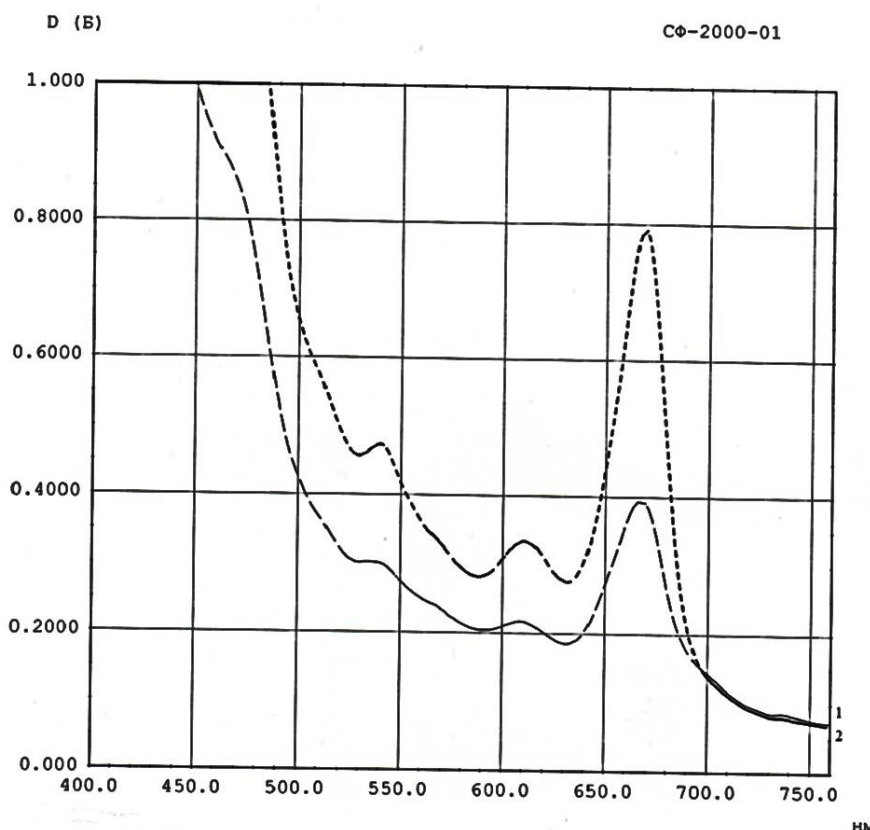


Рисунок 3.20 – Спектры поглощения спиртового извлечения из листьев (1) и побегов (2) ивы трехтычинковой

Концентрацию суммы хлорофиллов, каротиноидов и ксантофиллов рассчитывали по формулам (7-8) [141, 172]. Результаты, полученные при использовании методики с нагреванием [103] высушенных листьев и побегов ивы трехтычинковой, собранных в различное время и места произрастания, представлены в таблице 3.28.

Таблица 3.28 – Результаты количественного определения пигментов в сырье ивы трехтычинковой (мг/%)

Вид сырья	Время сбора	Содержание пигментов в сухом сырье, %			
		Производная спектрофотометрия			Прямая спектрофотометрия
		Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Сумма каротиноидов и ксантофиллов	
Река Подкумок, г. Пятигорск					
Листья	сентябрь 2013 г.	0,130	0,038	0,020	0,122
	сентябрь 2014 г.	0,111	0,091	0,014	0,115
	май 2014 г.	0,113	0,087	0,018	0,116
	июль 2014 г.	0,181	0,074	0,046	0,175
Побеги	сентябрь 2013 г.	0,082	0,046	0,015	0,081
	сентябрь 2014 г.	0,088	0,092	0,005	0,095
Река Малка, КБР					
Листья	июнь 2014 г.	0,111	0,074	0,023	0,112
Побеги	июнь 2014 г.	0,035	0,025	0,016	0,035
Река Кубань, Ставропольский край					
Листья	август 2014 г.	0,137	0,060	0,028	0,133
Побеги	август 2014 г.	0,070	0,050	0,017	0,071
Определение пигментов без термической обработки (р. Подкумок)					
Листья	сентябрь 2014 г.	0,171	0,0645	0,041	0,167

Из таблицы 3.28 следует, что содержание пигментов в листьях выше, чем в побегах, это связано с накоплением хлорофилла в хлоропластах листа растения. Очевидно, что количество пигментов напрямую зависит от места произрастания и сезонных факторов (количество солнечного света, температура и экология окружающей среды).

Для сравнения проводили альтернативную методику определения содержания пигментов без нагревания [141], с учетом возможности разрушения хлорофилла при нагревании (п. 2.3.2.4) на примере листьев ивы трехтычинковой, собранных на реке Подкумок.

Расчеты содержания хлорофиллов и каротина осуществляли по аналогичным формулам (7-8). Полученные результаты представлены в таблице 3.28.

Из таблицы 3.28 следует, что содержание хлорофилла **a**, **b** и сумма каротиноидов и ксантофиллов не отличается от данных, полученных по методике с нагреванием.

Содержание каротиноидов в пересчете на β -каротин при использовании в качестве экстрагента гексан находили по методике, представленной в п. 2.3.2.4 [103]. Спектр поглощения извлечения представлен на рисунке 3.21.

Полученные результаты (как среднее из трех параллельных определений) в сырье, собранном в 2015 году на берегу реки Кубань Кочубеевского района, представлены в таблице 3.29.

Таблица 3.29 – Результаты определения содержания суммы каротиноидов в сырье ивы трехтычинковой

Объект исследования	Навеска, г	W, %	A ₁	A ₂	X ₁	X ₂	$\bar{X}$
Листья	1,092	5,07	0,631	0,615	2,33	2,27	2,31
Побеги	1,082	6,21	0,659	0,618	2,55	2,48	2,52

Из таблицы 3.29 следует, что содержание суммы каротиноидов в листьях и побегах незначительно и не превышает 2,5 мг/%. Найденное содержание суммы

каротиноидов не согласуется с результатами, полученными по методике производной спектрофотометрии, так как почти в 10 раз меньше. Очевидно, это можно объяснить использованием различных экстрагентов (спирт и гексан), а также тем, что ксантофиллы не экстрагируются гексаном [127].

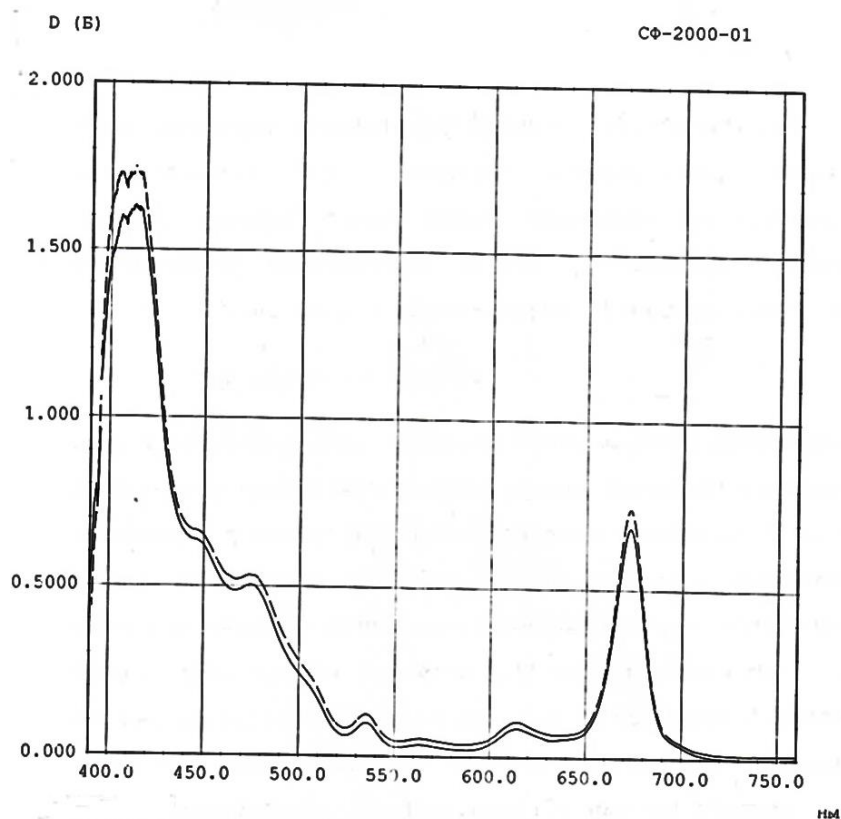


Рисунок 3.21 – Спектры поглощения гексановых извлечений побегов и листьев ивы трехтычинковой

Используя методику, описанную в п. 2.3.2.4, в которой измеряется оптическая плотность до и после подкисления раствора в кювете, было определено содержание хлорофиллов и феофитина в листьях ивы трехтычинковой, собранной в различное время года на берегу реки Подкумок (окрестности г. Пятигорска) (рисунок 3.22).

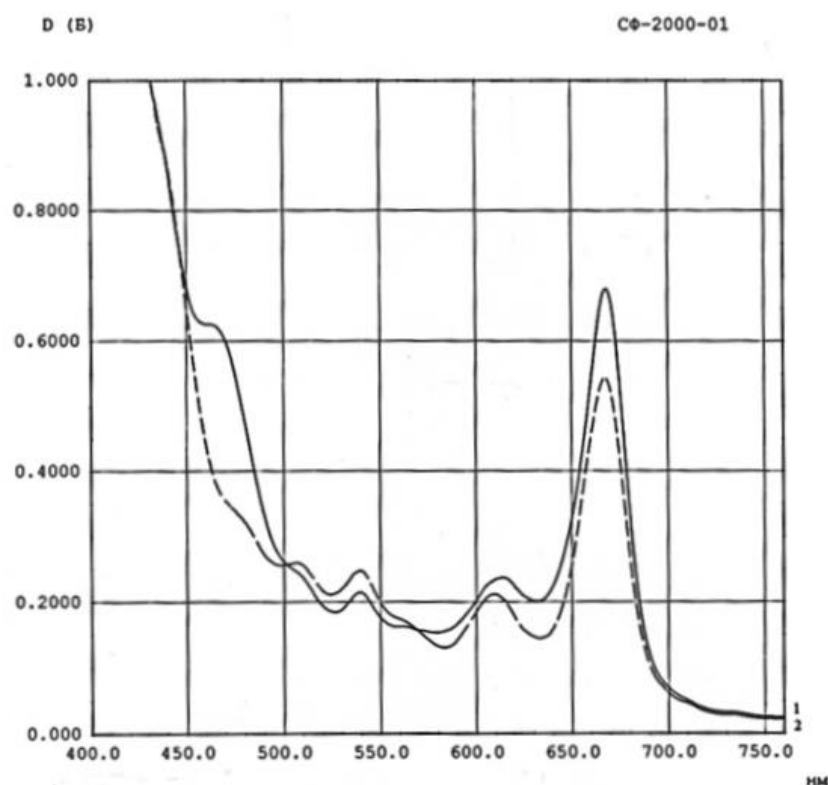


Рисунок 3.22 – Спектры поглощения извлечения ивы трехтычинковой до (1) и после (2) подкисления

Расчет содержания суммы хлорофиллов и феофитина проводили по формулам 11 и 12 (см. п. 2.3.2.4) [166, 180]. Результаты определения приведены в таблице 3.30.

Таблица 3.30 – Результаты определения хлорофилла и феофитина при совместном присутствии, длина волны - 664 нм, разведение 1:5, кроме * (без разведения)

Время сбора	Навеска, г	W, %	A_1^{**}	A_2^{***}	Найдено хлорофилла, %		Найдено феофитина, %
					по формулам 9, 11	по удельному показателю поглощения	
1	2	3	4	5	6	7	8
Июль, 2014 г.	0,2001	5,11	0,679*	0,543	0,099	0,189	0,178
Май, 2015 г.	0,2010	7,73	0,225	0,163	0,242	0,322	0,204
Июнь, 2015 г.	0,2692	6,39	0,285	0,194	0,262	0,299	0,131

Продолжение таблицы 3.30

1	2	3	4	5	6	7	8
Июль, 2015 г.	0,2069	7,94	0,243	0,171	0,254	0,287	0,174
Август, 2015 г.	0,2248	6,09	0,254	0,176	0,270	0,295	0,158
Сентябрь, 2015 г.	0,2081	9,52	0,235	0,157	0,300	0,330	0,126

*** A_1 – оптическая плотность извлечения до прибавления кислоты*

**** A_2 – оптическая плотность извлечения после прибавления кислоты*

Как следует из данных таблицы 3.30, содержание хлорофилла, рассчитанного по формулам 9 и 11, значительно отличается от значений, полученных с помощью удельного поглощения, и в зависимости от сроков сбора сырья превышает эти значения почти в два раза. Во всех образцах сырья содержание феофитина также отличалось в зависимости от сбора сырья и было почти в два раза меньше, чем содержание хлорофилла.

Таким образом, в процессе изучения химического состава сырья ивы трехтычинковой были определены основные БАВ, наибольшие значения которых представлены в таблице 3.31.

Показано, что ива трехтычинковая, произрастающая на Северном Кавказе, богата фенольными соединениями, такими как флавоноиды (рутин, лютеолин и нарингенин), фенольными гликозидами (триандрин, салидрозид), фенолкарбоновыми кислотами (хлорогеновая, неохлорогеновая, цикориевая, коричная и феруловая кислоты), конденсированными дубильными веществами (катехин, эпикатехин, эпигаллокатехингаллат), а также танином и галловой кислотой. Известно, что именно фенольные соединения обуславливают противовоспалительную активность ЛРС.

Таблица 3.31 – Результаты определения БАВ в сырье ивы трехтычинковой, %

БАВ	Метод исследования	Побеги без листьев	Листья	Побеги
Фенологликозиды: триандрин салидрозид*	КЗЭ	-**	-	0,043±0,003 0,522
Дубильные вещества*:	перманганатометрия спектрофотометрия	4,76±0,09 1,52	5,33±0,11 1,68	5,41±0,09 1,73
Флавоноиды: сумма флавоноидов рутин	спектрофотометрия КЗЭ* планарная хромат-я	0,494±0,010 0,144 -	3,676±0,211 3,348 -	3,238±0,062 2,467 1,91±0,06
Фенолкарбоновые кислоты	Спектрофотометрия	0,197±0,009	0,600±0,015	0,471±0,024
Органические кислоты	потенциометрическое титрование	-	2,17±0,01	1,89±0,02
Аминокислоты* Свободные аминокислоты*	ВЭЖХ спектрофотометрия	- 0,68	- 1,88	11,73 2,34
Полисахариды*: ВРПС ПВ ГЦ А+ГЦ Б	Гравиметрия	-	-	1,306 0,428 19,25
Пигменты*: хлорофилл <i>a</i> хлорофилл <i>b</i> каротиноиды феофитин	Спектрофотометрия	-	0,181 0,91 2,31 мг/% 0,204	0,088 0,092 2,52 мг/%

Примечание: * - среднее значение из 2-3 определений,

** - определение не проводилось

Впервые было определено количественное содержание фенологликозидов (салидрозид и триандрина), фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, органических кислот и свободных аминокислот, а также пигментов (хлорофилл, феофитин и каротиноиды). Впервые в побегах ивы трехтычинковой изучен состав аминокислот, выделены полисахариды (пектины, водорастворимые полисахариды и гемицеллюлозы).

Для более подробного определения вклада содержания БАВ в зависимости от вегетативных частей растения на первоначальном этапе количественный

анализ БАВ проводили в однолетних побегах растения, в листьях этих побегов и побегах без листьев. Как следует из таблицы 3.31, ДВ содержатся во всех изучаемых образцах почти в одинаковых количествах. Значительные количества флавоноидов и фенолкарбоновых кислот найдены только в листьях и побегах. В связи с этим мы считаем целесообразным в качестве предлагаемого сырья использовать побеги. Это обусловлено большей экономичностью сбора побегов, чем листьев.

Стадии вегетации цветения и плодоношения для ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, зависят от места произрастания и температурных условий, в связи с этим могут наблюдаться в период с апреля по июнь месяцы. Наибольшее накопление БАВ происходит после цветения и плодоношения в период с июля по сентябрь месяцы (рисунки 3.8 и 3.13). Стадия листопада также может варьировать с сентября по ноябрь месяцы, в связи с этим рекомендуемые сроки заготовки побегов: июль и август месяцы.

3.11 Сравнительная оценка результатов анализа биологически активных веществ побегов ивы трехтычинковой

Анализ исследования БАВ в побегах ивы трехтычинковой, приведенные выше, свидетельствуют о том, что они содержат богатый комплекс фенольных соединений, сравнимый с БАВ побегов ивы белой, ивы вавилонской, гибрида ивы вавилонской с ивой белой и ивы пурпурной, изученный О.О. Хитевой и Т.М. Дементьевой с соавт. [27, 28, 156, 157]. Результаты такого сравнительного анализа представлены в таблице 3.32.

Сравнительный анализ БАВ побегов ивы трехтычинковой с БАВ побегов ивы белой, ивы пурпурной, ивы вавилонской и гибрида ивы вавилонской с ивой белой показал, что качественный состав исследуемых побегов некоторых видов ив, произрастающих на Северном Кавказе, в основном сходен. Кроме того, впервые в побегах ивы трехтычинковой выявлено наличие полисахаридов (ВРПС,

ПВ, гемицеллюлозы А и Б), изучен состав аминокислот, пигментов, макро- и микроэлементов.

Сравнительный анализ количественного содержания БАВ фенольного происхождения свидетельствует, что побеги ивы трехтычинковой содержат в три раза больше флавоноидов. Содержание дубильных веществ в пересчете на конденсированные соединения также выше, чем в побегах гибрида ивы вавилонской с ивой белой и в побегах ивы вавилонской. В виду того, что содержание дубильных веществ в работах других авторов представлено в пересчете на конденсированные соединения суммы ДВ, для побегов ивы трехтычинковой содержание ДВ также пересчитали с учетом того, что 1 мл 0,02 моль/л раствора калия перманганата соответствует 0,00582 г [137].

Таблица 3.32 – Результаты количественного содержания БАВ в побегах некоторых видов ив, произрастающих на Северном Кавказе

Группа БАВ	ива трехтычин- ковая	ива* вавилонская	гибрид ивы* вавилонс- кой	ива белая*	ива* пурпурная
Флавоноиды, %	1,72 -3,27	0,83-0,90	0,80-0,95	0,31-1,52	1,15
Дубильные (окисляемые) вещества в пересчете на конденсиро- ванные соединения, %	3,84 -7,60	5,21-5,60	5,72-6,40	4,04-9,01	8,53
Фенологлико- зиды: Салицин, %	Не обнаружен	0,19 -0,20	0,24- 0,26	0,06-0,19	0,05
Триандрин, %	0,01 -0,04	-**	-	-	-
Салидрозид, %	0,14-0,52	-	-	-	-
Фенолкарбо- новые кислоты, %	0,58-0,61	0,59	0,64	0,81	1,21

*данные по указанным видам заимствованы из работ О.О. Хитовой и Т.М. Дементьевой [27, 28, 156, 157];

** «-» - нет информации в литературных источниках.

В побегах ивы трехтычинковой не обнаружен салицин, однако по содержанию салидрозида он превышает содержание салицина во всех изученных побегах ив, произрастающих на Северном Кавказе. По содержанию суммы фенолкарбоновых кислот побеги ивы трехтычинковой не уступают другим изученным видам ив Северного Кавказа.

Полученные данные сравнительного анализа позволяют предположить, что для побегов ивы можно в дальнейшем создать ФС «Побеги ивы», как это сделано в Европейской фармакопее в статье «Кора ивы», которая включает кору и побеги ивы волчниковой, ивы пурпурной и ивы ломкой и других видов ив [193].

Выводы по главе 3

1. Экспериментально установлено, что химический состав побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, представлен наличием флавоноидов, дубильных веществ, фенологликозидов и фенолкарбоновых кислот, а также свободных сахаров, полисахаридов и аминокислот.
2. Обоснованы оптимальные условия извлечения салидрозида и триандрина из растительного сырья (экстрагент, время и кратность экстракции, соотношение сырье/экстрагент). Проведенные исследования показали, что предлагаемая методика валидна по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. С помощью предлагаемой методики можно проводить идентификацию и количественный анализ триандрина и салидрозида.
3. Установлено с помощью МЭКХ, что в побегах ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, салицин отсутствует, а более характерными ФГ являются салидрозид и триандрин, определенные методом КЗЭ, которые накапливаются в количестве до 0,522% и 0,043% соответственно. Данный факт свидетельствует о возможности использования салидрозида и триандрина в качестве маркерных компонентов при разработке нормативной

документации на данный вид сырья. Найдено, что содержание салидрозида в побегах ивы трехтычинковой почти в 10 раз превышает содержание триандрина.

4. Методом ВЭЖХ показано, что в исследуемых образцах ивы трехтычинковой содержатся, в основном, конденсированные дубильные вещества, а также галловая кислота и танин. Методом перманганатометрического титрования найдено, что побеги независимо от места сбора и времени сбора содержат от 2,7% до 5,4% ДВ в пересчете на танин.

5. Используя спектрофотометрическую методику, основанную на осаждении суммы ДВ с помощью коллагена, показано, что содержание дубильных веществ значительно отличается от результатов, полученных методом титрования, и находится в пределах 1,7%.

6. С помощью метода КЗЭ показано, что в побегах содержится значительное количество рутина и следы лютеолина и нарингенина. Разработана и валидирована методика количественного определения рутина с использованием капиллярного электрофореза. В побегах ивы трехтычинковой содержание рутина колеблется от 1,68% до 2,47% в пересчете на абсолютно сухое вещество.

7. Полученные с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии результаты свидетельствуют, что наибольшее количество суммы флавоноидов накапливается в листьях (от 2,66% до 3,68%), в побегах это значение немного меньше (от 1,73% до 3,24%). В побегах без листьев содержание флавоноидов почти в 10 раз меньше. Показано, что содержание флавоноидов зависит от места и времени сбора сырья.

8. Найдены оптимальные условия и предложена и валидирована методика определения рутина с помощью метода планарной хроматографии. Содержание рутина в побегах ивы трехтычинковой составило $1,91 \pm 0,06\%$. Методика высокочувствительна и отвечает необходимым требованиям по показателям: линейность, правильность и прецизионность.

9. Определен качественный состав (хлорогеновая, неохлорогеновая, цикориевая, коричная и феруловая кислоты) и количественное содержание фенолкарбоновых кислот в побегах ивы трехтычинковой, которое достигает

0,47%. Обнаруженные фенолкарбоновые кислоты могут вносить существенный вклад в общий фармакологический эффект.

10. Методом потенциометрического титрования с фиксацией точки эквивалентности при рН 8,1 найдено, что свободных органических кислот в побегах ивы трехтычинковой содержится до 1,9%.

11. В побегах ивы трехтычинковой обнаружены 16 аминокислот (11,73%), из них 7 незаменимых для организма человека (4,64%). Наибольшее количество, из найденных аминокислот в побегах, являются аспарагиновая, глутаминовая кислоты и лейцин. Спектрофотометрическим методом на основе реакции с нингидрином найдено содержание свободных аминокислот, значительные колебания которых в побегах наблюдаются в зависимости от места сбора от 0,74% до 2,34%.

12. Гравиметрическим методом определено количественное содержание отдельных фракций полисахаридов. Показано, что побеги ивы трехтычинковой содержат незначительные количества как пектиновых веществ, так и ВРПС.

13. Атомно-эмиссионным методом в побегах ивы трехтычинковой обнаружены 8 микро- и 6 макро-эссенциальных элементов; 7 условно-эссенциальных микроэлементов; 39 условно-токсичных микроэлементов и ультрамикроэлементов. Найдено, что содержание токсичных элементов в побегах ивы трехтычинковой, таких как мышьяк, свинец, кадмий и ртуть не превышает допустимые нормы ГФ РФ XIII издания.

14. С помощью спектрофотометрического метода обнаружено, что содержание хлорофиллов в листьях ивы трехтычинковой колеблется в пределах от 0,11% до 0,33% и зависит от места произрастания и сезонных факторов (количество солнечного света, температура и экология окружающей среды). Показано, что при сушке и хранении сырья, кроме хлорофиллов, накапливается и значительное содержание феофитина, которое зависит от длительности хранения. Найдено, что при экстракции сырья гексаном содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин оказалось не более 2,5 мг% как в листьях, так и в побегах.

15. Показано, что оптимальной сырьевой частью ивы трехтычинковой являются

побеги. Заготовку сырья рекомендуется проводить в июле и августе месяцах после фазы цветения и плодоношения растения.

ГЛАВА 4 ОБОСНОВАНИЕ НОРМ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ «ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ ПОБЕГИ»

4.1 Морфолого-анатомические признаки

Важными разделами ФС на лекарственное растительное сырье, определяющими его подлинность, являются внешние признаки и микроскопия. Внешние признаки производящего растения - ивы трехтычинковой, такие как описание листьев, цветков и самого дерева достаточно полно представлены в монографиях А.К. Скворцова и Е.Т. Валягиной-Малютиной [21, 133]. Однако внешние признаки высушенного цельного и измельченного сырья побегов ивы трехтычинковой, а также его порошка не изучены, как и его характерные микроскопические признаки.

Исследование проводили на образцах побегов ивы трехтычинковой, собранных в июле и августе 2014 г., после окончания периода плодоношения и отсутствия созревших семян как с женских, так и с мужских растений, в районах Ставропольского края в поймах рек Подкумок и Кубань. Морфологическое и анатомическое изучение сырья проводили в соответствии с требованиями ГФ XI издания и рекомендациями, изложенными в атласе под редакцией И.А. Самылиной и О.Г. Аносовой [71, 122].

4.1.1 Морфологическое исследование

Цельное сырье. Смесь олиственных побегов длиной 15-30 см, листьев. Листья очередные, черешковые, ланцетовидно-вытянутые, линейные, узколанцетные, иногда узкояйцевидные, с заостренной верхушкой, края мелкопильчатые, иногда завернуты вниз, с верхней стороны листья зеленые, блестящие, слегка кожистые, с нижней – серовато-зеленые или серые от воскового налета (*f. discolor*). слабо-

опушенные, опушение наиболее выражено по главной жилке. Размеры листа – длина 5-10 см, ширина – 1-2 см.

Стебли цилиндрические. Наружная поверхность коры стеблей серая, сизо-серо-желтая, может быть желтовато-зеленых, желтовато-оливковых, золотисто-коричневых, темно-оливково-коричневых оттенков. Внутренняя поверхность коры белая, иногда имеет зеленоватый оттенок. Запах отсутствует, вкус отвара кисловато-вяжущий.

Измельченное сырье. Куски стеблей и листьев, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Цвет зеленый, светло-зеленый, серовато-зеленый. Запах отсутствует, вкус кисловато-вяжущий.

Порошок. Кусочки листовых пластинок различной формы, черешков, стеблей, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Нами также определено отношение массы листьев к массе побегов без листьев в сырье однолетних побегов ивы трехтычинковой. Масса листьев составляет в среднем не менее 51%, а масса побегов без листьев – 46%, эти данные необходимо учитывать при заготовке сырья [123].

4.1.2 Микроскопическое исследование

При рассмотрении с обеих сторон поверхности листа видны клетки эпидермиса мелкие с четковидно-утолщенными прямыми или слабо-извилистыми стенками (рисунок 4.1а), над жилками и вдоль жилок с прямыми стенками, вытянутыми вдоль жилки (рисунок 4.1б). Устьица только на нижней стороне (рисунок 4.1а), мелкие, в понижениях, с 3-6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип).

Верхняя сторона листа покрыта кутикулой; волоски встречаются очень редко. Нижняя сторона опушена волосками 2-х типов: простые 1-2 клеточные, тонкостенные с заостренной верхушкой и головчатые на одноклеточной ножке с шаровидной головкой (рисунок 4.1в). Мезофилл листа содержит большое количество мелких друз, а вдоль жилок расположены призматические кристаллы (рисунок 4.1г).

По краю листа у основания каждого зубчика располагаются

эмергенцы (желёзки округлой, иногда немного приплюснутой формы), состоящие из темно-коричневых клеток (рисунки 4.2а, 4.2б). В более старых листьях встречаются клетки-идиобласты, содержащие флобафены (рисунок 4.2в).

На поперечном срезе лист дорзовентральный. Черешок листа на поперечном срезе имеет все характерные структуры. В жилке много механической ткани – колленхимы, расположенной непосредственно под эпидермисом в несколько рядов, и волокон, окружающих проводящий пучок (рисунок 4.3а).

На поперечном срезе стебля виден слой клеток кутикулы с небольшими сосочками и 1-2-слойная хлоренхима (рисунок 4.4), наружная кора включает 2-3 слоя клеток, далее располагается 5-7 слоев клеток пластинчатой колленхимы светло-зеленого цвета. На границах первичной и внутренней коры виден слой камбия, клетки основной паренхимы овальной формы, прилегают друг к другу довольно плотно, некоторые из них заполнены зеленовато-желтым содержимым.

В более глубоких слоях поперечного среза стебля ивы трехтычинковой видны лубяные волокна с утолщенными стенками, однако их стенки не всегда окрашиваются от флороглюцина и кислоты хлористоводородной концентрированной в красный цвет (слабое одревеснение или его отсутствие). Вдоль лубяных волокон наблюдается кристаллоносная обкладка из призматических кристаллов оксалата кальция. Участки флоэмы состоят из мелких клеток, плотно прилегающих друг к другу, со спадающимися стенками.

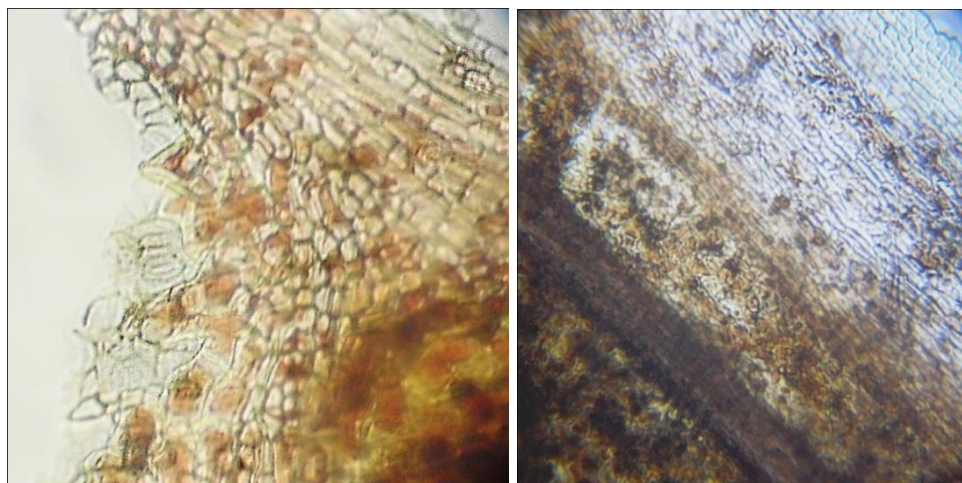
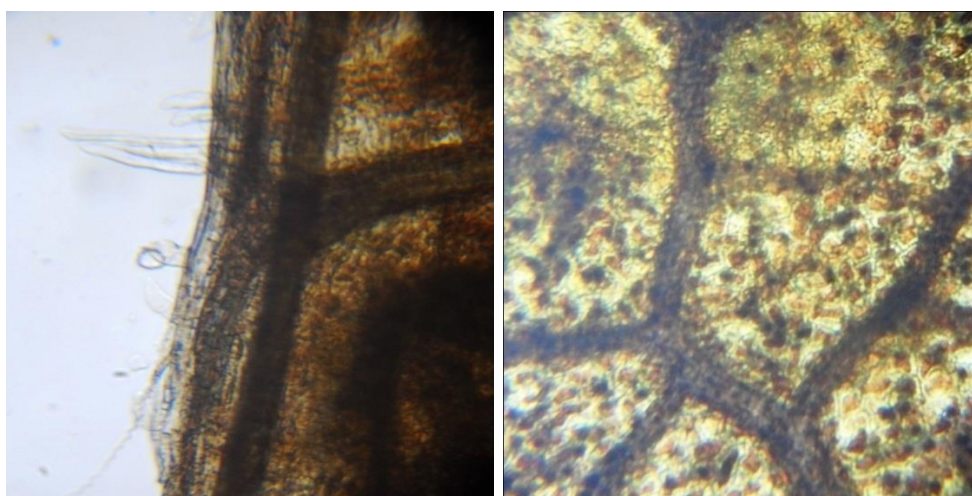
**а****б****в****г**

Рисунок 4.1 - Элементы анатомического строения листа ивы
трехтычинковой

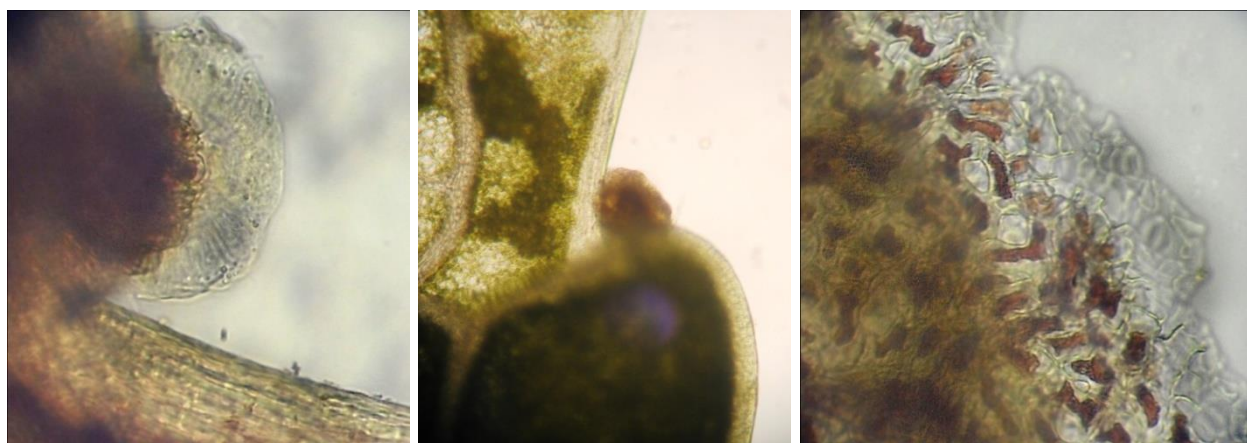
**а****б****в**

Рисунок 4.2 - Желёзки (а, б) и идиобласты (в) листьев ивы
трехтычинковой

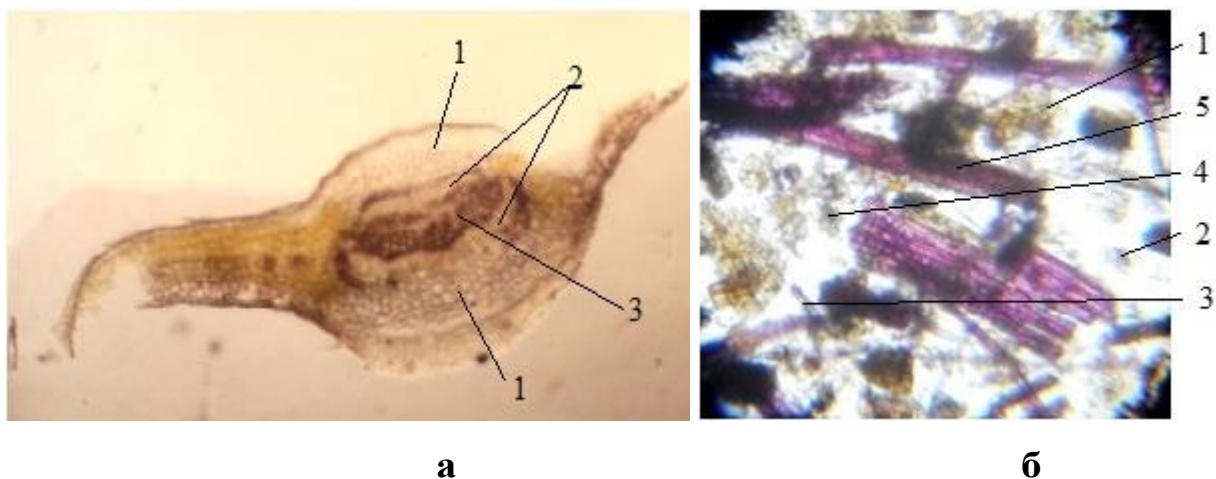


Рисунок 4.3 - Поперечный срез листа ивы трехтычинковой (а: 1-колленхима, 2-волокна, 3-проводящий пучок) и элементы порошка побегов ивы трехтычинковой (б: 1-обрывки клеток эпидермиса, 2-фрагменты волосков, 3-цельные волоски, 4-кристаллы оксалата кальция в форме друз, 5-участок проводящих элементов)

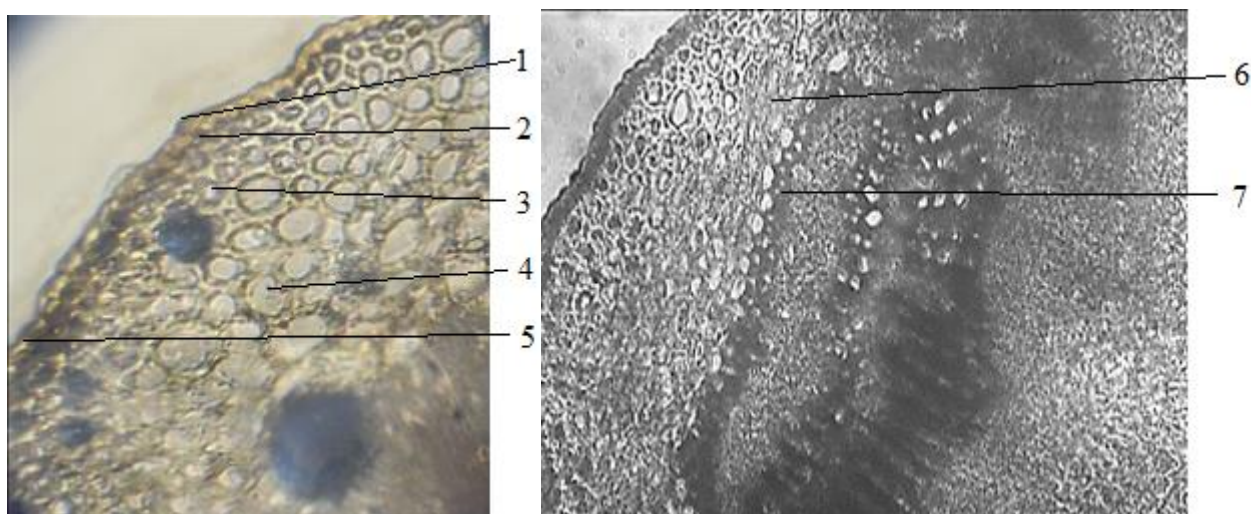


Рисунок 4.4 - Поперечный срез стебля ивы трехтычинковой (1-сосочковидные выросты, 2-хлоренхима, 3-колленхима, 4-основная паренхима, 5-кутикула, 6-лубяные волокна, 7-кристаллоносная обкладка из призматических кристаллов оксалата кальция)

На рисунке 4.3б представлены элементы порошка побегов ивы трехтычинковой (обрывки клеток эпидермиса, фрагменты волосков, и цельные волоски, включения кристаллов оксалата кальция в форме друз,

участки проводящих элементов).

Результаты позволяют по совокупности диагностических признаков подтвердить подлинность побегов ивы трехтычинковой.

Таким образом, определены основные морфологические характеристики побегов ивы трехтычинковой, необходимые для составления раздела проекта нормативного документа на сырье «Внешние признаки» (цельное сырье, измельченное сырье и порошок). При микроскопическом исследовании установлена совокупность признаков, необходимых для идентификации сырья [74]:

- клетки верхнего и нижнего эпидермиса листа мелкие с четковидно-утолщенными прямыми или слабо-извилистыми стенками, над жилками и вдоль жилок с прямыми стенками, вытянутыми вдоль жилки. Устьица только на нижней стороне, мелкие, в понижениях, с 3-6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип);
- волоски 2-х типов имеются на нижней стороне листа: простые 1-2 клеточные, тонкостенные с заостренной верхушкой и головчатые на одноклеточной ножке с шаровидной головкой;
- мезофилл листа содержит большое количество мелких друз, а вдоль жилок расположены призматические кристаллы;
- по краю листа у основания каждого зубчика располагаются эмергенцы (железки округлой, иногда немного приплюснутой формы), состоящие из темно-коричневых клеток;
- встречаются клетки-идиобласты, содержащие флобафены;
- на поперечном срезе лист дорзовентральный. Черешок листа имеет все характерные структуры. В жилке много механической ткани – колленхимы и волокон, окружающих проводящий пучок;
- на поперечном срезе стебля виден слой клеток кутикулы с небольшими сосочками, хлоренхима, наружная кора, пластинчатая колленхима. На границах первичной и внутренней коры расположен слой камбия, далее -

клетки основной паренхимы. Лубяные волокна слабо одревесневшие или не одревесневшие. Вдоль них имеется кристаллоносная обкладка из призматических кристаллов оксалата кальция. Участки флоэмы состоят из мелких клеток, плотно прилегающих друг к другу;

- элементы порошка включают обрывки клеток эпидермиса, включения кристаллов оксалата кальция в форме друз, участки проводящих элементов.

4.2 Идентификация и определение количественного содержания основных биологически активных веществ побегов ивы трехтычинковой

Результаты проведенных исследований по морфолого-анатомическому изучению ЛРС и БАВ группы фенольных соединений, позволили составить проект ФС «Ивы трехтычинковой побеги - *Salicis triandrae cormus*», определяющий подлинность и нормы качества сырья.

Для определения подлинности предложено использовать общепринятые качественные реакции: появление красного окрашивания при проведении реакции «цианидиновая проба» (флавоноиды) и образование черно-зеленого окрашивания при проведении реакции с железоаммонийными квасцами (дубильные вещества). Для подтверждения наличия в исследуемом сырье рутина в проект ФС включен метод ТСХ. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции коричневатого-желтого цвета со значением $R_f = 0,64-0,66$, соответствующие СО рутина (таблица 4.4).

Как следует из результатов исследований, приведенных в главе 3, побеги ивы трехтычинковой содержат такие фенологликозиды, как триандрин и салидрозид. Это послужило основанием для подтверждения наличия этих фенологликозидов в качестве маркерных компонентов на данный вид сырья использовать метод КЗЭ. Полученные данные по определению времени миграции пиков триандрина $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 507,3 \pm 6,8$ и $\varepsilon = 1,4\%$ и салидрозида $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} =$

468,3±3,9 и $\varepsilon=1,5\%$ (см. главу 3), подтвердили возможность использования этого метода для аналитических целей, так как относительные погрешности определения оказались равными 1,4% и 1,5% соответственно. Таким образом, время миграции пиков на электрофореграмме испытуемого раствора должно соответствовать времени миграции пиков СО триандрина и салидрозида с отклонением, не превышающим 2% (таблица 4.4).

Для нормирования содержания БАВ побегов ивы трехтычинковой нами выбраны флавоноиды и дубильные вещества, наличие которых способствует проявлению противовоспалительной активности побегов ивы трехтычинковой. Предварительный предел содержания флавоноидов был обоснован результатами анализа в зависимости от времени и места сбора сырья ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе (см. глава 3, таблица 3.11 и рисунки 3.12-3.13). В предлагаемые сроки сбора (см. приложение 4) июль и август месяцы содержание суммы флавоноидов колебалось в зависимости от места сбора сырья в пределах от 2,3% до 3,2%, а содержание рутина от 2,1% до 2,5%. В связи с этим нами предлагается норма содержания суммы флавоноидов не менее 2,0%, а рутина не менее 1,8%. Количественное содержание суммы флавоноидов предлагается проводить спектрофотометрическим методом на основе реакции с алюминия хлоридом, в пересчете на рутин. В виду того, что рутин является основным флавоноидом, содержащимся в побегах ивы трехтычинковой, мы предлагаем включить и альтернативный метод определения рутина методом КЗЭ (таблица 4.4) [70].

Для определения суммы дубильных веществ в проекте ФС был использован метод перманганатометрии. Расчет содержания суммы дубильных веществ предлагается проводить в пересчете на танин, как рекомендовано ОФС.1.5.3.0008.15 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

В соответствии с полученными результатами, приведенными на рисунках 3.6-3.9, в зависимости от факторов, влияющих на накопление ДВ, содержание суммы дубильных веществ в побегах ивы трехтычинковой находится в пределах

от 2,74% до 5,41%. Однако в предлагаемые сроки сбора (см. приложение 4) июль и август месяцы, содержание суммы дубильных веществ находится в пределах от 3,9% до 5,41%. Это послужило основанием установить предварительную норму содержания дубильных веществ не менее 3,5%.

4.3 Испытания

При составлении проекта ФС нами предварительно были также изучены такие показатели качества, как содержание экстрактивных веществ [90], влажность [79], общая зола и зола, нерастворимая в кислоте хлористоводородной [81], а также - содержание частиц, изменивших окраску и других частиц, не соответствующих описанию, органическая примесь и минеральная примесь [86] (таблицы 4.1 и 4.2).

Показатели и нормы качества ЛРС «Ивы трехтычинковой побеги – *Salicis triandrae cormus*» приведены в таблице 4.4.

Определение показателей качества ЛРС проводили в соответствии с требованиями раздела «Методы анализа растительного сырья» ГФ XI изд. [71], а именно ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в ЛРС» [86], ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья» [79], ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ лекарственного растительного сырья» [90], ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов» [71]. Определение содержания золы общей и золы, нерастворимой в растворе 10% хлористоводородной кислоты, проводили согласно методики ГФ XI издания [81].

При определении экстрактивных веществ [90] в листьях и побегах без листьев оказалось, что наиболее полное извлечение происходит при использовании спирта этилового 70% и составляет 30,34% и 11,01% соответственно. Показатели качества были определены на примере сырья побегов

ивы трехтычинковой, собранных в сентябре 2013 г., а также в июне 2015 г. на берегу реки Подкумок (таблица 4.1) [123].

Таблица 4.1 – Результаты испытаний сырья ивы трехтычинковой

Показатель	Листья	Побеги без листьев
Экстрактивные вещества, извлекаемые в %:		
Водой	28,86	6,33
Спиртом 70%	30,34	11,01
Спиртом 95%	26,83	7,97
Зола общая, %	4,82	2,64
Зола нерастворимая в кислоте хлористоводородной, %	0,32	0,41
Влажность, %	5,97	7,99
Органические примеси, %	0,27	0,12
Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее), %	3,1	2,4
Минеральная примесь, %	0,07	0,02

В виду того, что содержание влаги учитывалось при расчетах всех БАВ ивы трехтычинковой, нами была определена влажность для всех образцов сырья, используемого для аналитических целей (таблица 4.2)

Таблица 4.2 – Результаты определения влажности (%) сырья ивы трехтычинковой

Время сбора	Листья	Побеги без листьев	Побеги
Р. Подкумок, 2013 г.			
Сентябрь	5,97	7,99	8,99
Р. Подкумок, 2014 г.			
Май	5,21	-	4,97
Июль	5,02	-	5,19
Сентябрь	5,41	-	5,07
Р. Подкумок, 2015 г.			
Май	7,73	7,23	6,94
Июнь	6,39	6,71	7,44
Июль	7,35	7,87	7,81
Август	6,09	8,22	8,29
Сентябрь	9,54	8,01	10,02
Р. Малка, 2014 г., июнь	4,08	-	5,12
Р. Кубань, 2014 г., август	5,23	-	5,32

4.4 Установление срока хранения

В виду того, что для нормирования содержания БАВ побегов ивы трехтычинковой нами выбраны флавоноиды и дубильные вещества, для установления предварительного срока хранения ЛРС проведено определение содержания этих БАВ на примере сырья, собранного на берегу реки Подкумок в июле 2014 года. Высушенное и измельченное сырье было помещено в двойные полиэтиленовые мешки и оставлены на хранение в сухом прохладном месте (таблица 4.3). С периодичностью в 6 месяцев данное сырье подвергалось визуальному контролю и анализу на содержание флавоноидов, дубильных веществ и влажности. В 2017 году и на момент сбора сырья было проведено также определение наличия фенологликозидов (триандрин и салидрозид) методом КЗЭ.

Таблица 4.3 – Результаты определения некоторых показателей качества побегов ивы трехтычинковой в процессе хранения (среднее из 3 определений)

Показатели качества	Время проведения исследований					
	Июль 2014 г.	Январь 2015 г (6 мес)	Июль 2015 г (1 год)	Январь 2016 г (1,5 года)	Июль 2016 г (2 года)	Январь 2017 г (2,5 года)
Флавоноиды	2,75	2,96	2,54	2,88	2,69	2,61
Дубильные вещества	4,44	4,25	4,12	3,98	3,94	4,01
Влажность	8,99	7,54	6,40	6,09	5,54	5,01

Как следует из таблицы 4.3 содержание флавоноидов в зависимости от времени анализа колеблется от 2,96% до 2,61%. Содержание ДВ при хранении постепенно снижается от 4,44% до 4,01%. Однако и содержание суммы флавоноидов и содержание суммы дубильных веществ осталось за время хранения в пределах предлагаемой нормы не менее 2,0% (флавоноиды) и не менее 3,5% (ДВ). С помощью метода КЗЭ на момент окончания хранения подтверждено наличие в исследуемом сырье как салидрозида, так и триандрина. Значение показателя «влажность» в процессе хранения уменьшилось почти в 2 раза.

Полученные данные позволили определить показатели и предварительные нормы проекта ФС «Ивы трехтычинковой побего - *Salicis triandrae cormus*» [70]. Показатели и нормы качества ЛРС «Ивы трехтычинковой побего – *Salicis triandrae cormus*» приведены в таблице 4.4. Проект ФС представлен в приложении 3.

Таблица 4.4 – Нормы качества ивы трехтычинковой побегов

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Подлинность		
Внешние признаки	Визуальный, ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0004.15	Соответствие морфологическим признакам
Микроскопические признаки	Микроскопический ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0003.15	Соответствие анатомическим признакам
Определение основных групп БАВ		
Фенологликозиды: Триандрин Салидрозид	КЗЭ	Время миграции пиков на электрофореграмме испытуемого раствора должно соответствовать времени миграции пиков СО триандрина и салидрозида
Дубильные вещества	Реакция с железоммонийными квасцами	Черно-зеленое окрашивание
Флавоноиды	Качественная реакция: цианидиновая проба ТСХ	Красное окрашивание На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции коричневатого-желтого цвета со значением $R_f = 0,64-0,66$ соответствует СО рутина
ИСПЫТАНИЯ		
Влажность	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0007.15	Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 12%.
Зола общая	ГФ XIII, ОФС.1.2.2.2.0013.15	Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 7%.
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0005.15	Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 2%.
Измельченность сырья	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0004.15	Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм - не более 5%. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с

1	2	3
		отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5%. <i>Порошок</i> : частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5%.
Посторонние примеси		
Другие части растения (соцветия, кора)	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0004.15	<i>Цельное сырье, измельченное сырье</i> – не более 2%.
Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее)	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0004.15	<i>Цельное сырье, измельченное сырье</i> – не более 5%.
Органическая примесь	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0004.15	<i>Цельное сырье, измельченное сырье</i> – не более 1%.
Минеральная примесь	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0004.15	<i>Цельное сырье, измельченное сырье, порошок</i> – не более 1%.
Тяжелые металлы	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0009.15	В соответствии с требованиями ОФС
Радионуклиды	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0001.15	В соответствии с требованиями ОФС
Остаточные количества пестицидов	ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0011.15	В соответствии с требованиями ОФС
Микробиологическая чистота	ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0002.15	Категория 4А
Количественное определение:		
Флавоноиды <i>Альтернативная методика:</i> Рутин	Дифференциальная СФМ по реакции комплексообразования с алюминия хлоридом КЗЭ	Сумма флавоноидов - не менее 2% в пересчете на рутин Не менее 1,8%
Дубильные (окисляемые) вещества	Перманганатометрия ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0008.15	Не менее 3,5% в пересчете на танин
Упаковка, маркировка и транспортирование	ГФ XIII, ОФС.1.1.0019.15	В соответствии с требованиями ОФС
Хранение	ГФ XIII, ОФС.1.1.0011.15	В соответствии с требованиями ОФС

Выводы по главе 4

1. Проведено обоснование норм качества ЛРС и составлен проект ФС «Ивы трехтычинковой побегов».
2. Определены основные морфологические характеристики побегов ивы трехтычинковой, необходимые для составления раздела проекта нормативного документа на сырье «Внешние признаки» (цельное сырье, измельченное сырье и порошок). При микроскопическом исследовании установлена совокупность признаков, необходимых для идентификации сырья.
3. Предложено для определения подлинности сырья проводить идентификацию флавоноидов по реакции «цианидиновая проба», а дубильных веществ по реакции с железоаммонийными квасцами.
4. Для подтверждения наличия рутина в побегах ивы трехтычинковой обосновано включение в проект ФС метода хроматографии в тонком слое сорбента.
5. Для обнаружения фенологликозидов в проект ФС предложено включить метод капиллярного зонного электрофореза, при этом время миграции пиков на электрофореграмме испытуемого раствора должно соответствовать времени миграции пиков СО триандрина и салидрозида.
6. Для нормирования содержания БАВ сырья ивы трехтычинковой побегов выбраны флавоноиды и дубильные вещества.
7. Методом перманганатометрии установлена предварительная норма содержания дубильных веществ не менее 3,5%, а методом дифференциальной спектрофотометрии - норма содержания суммы флавоноидов не менее 2%.
8. Предложено включить в проект ФС альтернативный метод определения рутина методом капиллярного зонного электрофореза, так как рутин является основным флавоноидом исследуемого сырья и его предварительная норма содержания в сырье не менее 1,8%.

ГЛАВА 5 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОРОШКА ПОБЕГОВ ИВЫ ТРЕХТЫЧИНКОВОЙ

5.1 Изучение высвобождения дубильных веществ из лекарственного растительного сырья в настое и отваре

Известно, что, в основном, из лекарственного растительного сырья в домашних условиях готовят настои и отвары путем термической обработки. В связи с чем, представляет интерес изучить какой процент БАВ переходит в полученные извлечения. Настои и отвары побегов ивы трехтычинковой готовили в соотношении 1:10. С этой целью 30,0 г сырья помещали в заранее подогретый инфундирный аппарат, приливали 300 мл воды и нагревали в течение 15 минут (настой) и 30 минут (отвар) и сразу процеживали [107].

Далее проводили количественное определение высвободившихся дубильных (окисляемых) веществ по методике, представленной в п. 2.3.1.2 (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Определение количественного содержания дубильных
(окисляемых) веществ (%) в настое и отваре титриметрическим способом

Лекарственная форма	а, мл	V _{ко}	V ₁	V ₂	C ₁	C ₂	C _{ср}
Настой	5,0	1,2	2,5	2,55	0,108	0,108	0,108
Отвар	5,0	1,2	2,4	2,45	0,1	0,104	0,102

Из данных результатов можно сделать вывод, что существенного отличия в высвобождении действующих веществ из этих лекарственных форм не наблюдалось, это значит, что обе лекарственные формы будут равнозначны по терапевтическим эффектам. В виду того, что в качестве исходного сырья использовались побеги ивы, содержащие 3,72% дубильных (окисляемых)

веществ, в пересчете на танин, процент высвобождения их в отвар или настой составляет только 28,2%.

5.2 Изучение фармакологической активности порошка побегов ивы трехтычинковой

Как уже показано ранее (глава 1), заболевания опорно-двигательного аппарата (ОДА) являются одной из наиболее значимых патологий среди населения старше 60 лет. Главным патогенетическим звеном при данных заболеваниях является процесс воспаления.

Работами многих авторов показано, что перспективным видом ЛРС для внедрения в клиническую практику при заболеваниях суставов, является кора различных видов ивы [62], обладающая противовоспалительными свойствами [1, 7]. В последние годы работами О.О. Хитевой и Т.М. Дементьевой показано, что противовоспалительное действие отваров коры ивы белой и однолетних побегов ивы белой и ивы пурпурной, а также ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой, по угнетению экссудации и пролиферации, оказалось сопоставимым с кислотой ацетилсалициловой или диклофенаком натрия, а ulcerогенная активность была намного ниже [28, 156, 157]. О.О. Фроловой были проведены исследования и установлена оптимальная дозировка порошков коры ивы белой. Из трех экспериментальных доз: 1 - 34 мг/кг; 2 - 68 мг/кг и 3 - 125 мг/кг оказалось, что доза 68 мг/кг, обладает выраженной противовоспалительной активностью, сравнимой с препаратом сравнения АСК [51]. Показано также, что ulcerогенная активность изученных видов ив оказалась достоверно ниже, чем у препаратов сравнения - диклофенак натрия или АСК [28, 157]. В связи с этим представляло интерес провести исследование противовоспалительной активности и порошка побегов ивы трехтычинковой.

Исследование фармакологической активности побегов ивы трехтычинковой проводили на кафедре биологической химии и микробиологии ПМФИ совместно

с доц. кафедры, канд. фармацевт. наук Е.О. Сергеевой и ст. преп., канд. фармацевт. наук Л.А. Саджая.

В качестве исследуемого сырья использовали высушенные и измельченные до размера частиц от 1 мм до 0,25 мм побеги ивы трехтычинковой, собранные в мае, июле и сентябре 2014 г по берегу реки Подкумок.

Изучение противовоспалительной активности. Эффективность противовоспалительного действия побегов ивы трехтычинковой изучали на модели ватной гранулемы [120].

Из порошков высушенных побегов ивы трехтычинковой и коры ивы белой, взятой в качестве препарата сравнения, так как она наиболее широко используется в лекарственных препаратах и БАДах [51], готовили суспензии, используя в качестве растворителя воду очищенную. Рассчитанное количество действующего вещества для крысы массой 200 г содержалось в 2 мл суспензии. Изучаемые суспензии вводили по 68 мг/кг (доза соответствует приему человеком, массой 70 кг, 800 мг порошка коры ивы в сутки).

Кроме порошка коры ивы белой, в качестве препарата сравнения была использована и ацетилсалициловая кислота в дозе 125 мг/кг, соответствующей приему человеком, массой 70 кг (1,5 г АСК в сутки), в виде водной суспензии на Твине-80 в объеме 2 мл [41].

Изучаемые измельченные побеги ивы трехтычинковой и кора ивы белой, а также препарат сравнения АСК вводили в эквивалентном объеме в течение 7 дней с помощью зонда в желудок. Группе контрольных животных вводили физиологический раствор таким же способом [68]. Результаты оценки противовоспалительного действия изучаемых объектов исследования представлены в таблице 5.2 [146].

При сравнительной оценке противовоспалительного действия и ульцерогенной активности испытуемых объектов полученные данные сведены в таблицу 5.3 [146].

Таблица 5.2 – Результаты исследования противовоспалительной активности побегов ивы трехтычинковой

Группа животных	Масса ватного шарика сразу после извлечения из животного, г, m_1	Масса ватного шарика после высушивания, г, m_2	Экссудация, г, $m_3 = m_1 - m_2$	Пролиферация, г, $m_4 = m_2 - 0,015$	Среднее значение (M_5); Полуширина доверительного интервала (m_6) $M_5 \pm m_6$
Контроль	0,264	0,057	0,207	0,042	
	0,262	0,050	0,212	0,035	
	0,262	0,049	0,212	0,034	
	0,244	0,044	0,200	0,029	
	0,251	0,042	0,209	0,027	
	0,220	0,050	0,170	0,037	
			0,2000	0,03421	M_5
			0,0105	0,00223	m_6
АСК	0,164	0,035	0,129	0,020	
	0,165	0,040	0,125	0,025	
	0,186	0,042	0,144	0,027	
	0,117	0,031	0,082	0,016	
	0,133	0,029	0,104	0,014	
	0,154	0,032	0,122	0,017	
			0,1165	0,02471	M_5
			-0,0830	0,00211	m_6
Порошок побегов ивы трехтычинковой	0,130	0,026	0,104	0,011	
	0,244	0,054	0,190	0,039	
	0,127	0,030	0,097	0,015	
	0,191	0,037	0,154	0,022	
	0,136	0,048	0,088	0,033	
	0,171	0,057	0,114	0,042	
			0,1252	0,0272	M_5
			0,01614	0,00526	m_6
Порошок коры ивы белой	0,142	0,033	0,109	0,018	
	0,112	0,032	0,080	0,017	
	0,173	0,043	0,130	0,028	
	0,151	0,033	0,118	0,018	
	0,186	0,044	0,142	0,029	
	0,164	0,037	0,127	0,022	
			0,1186	0,02246	M_5
			0,00887	0,00218	m_6

Таблица 5.3 – Результаты определения противовоспалительной и ulcerогенной активности порошка побегов ивы трехтычинковой и коры ивы белой в сравнении с ацетилсалициловой кислотой

Объект	Противовоспалительная активность		Ульцерогенная активность (баллы)
	Экссудация, мг	Пролиферация, мг	
Контроль	200,00±10,50	34,21±2,23	0
АСК, 125 мг/кг	116,53±8,00	24,71±1,53	3,8±0,134*
Кора ивы белой, 68 мг/кг	118,60±8,87* -41%	22,41±2,18* -35%	0,6±0,023*#
Побеги ивы трехтычинковой, 68 мг/кг	125,20±16,14 * -37%	27,20±5,26	0,3±0,0047*#
Примечание: *- достоверно по отношению к контролю, $p \leq 0,05$ # - достоверно по отношению к АСК, $p \leq 0,05$			

Как следует из экспериментальных данных, порошки, полученные из коры ивы белой и побегов ивы трехтычинковой, уменьшают экссудацию на 41% и 37% соответственно по сравнению с контрольной группой. При этом не обнаружено достоверных отличий порошка коры ивы белой и побегов ивы трехтычинковой от препарата сравнения - АСК. По ограничению экссудации порошок побегов ивы трехтычинковой также достоверно не отличался от порошка коры ивы, хотя последний и проявил большую антиэкссудативную активность.

Анализ воздействия объектов изучения на пролиферативную стадию воспаления, свидетельствует, что порошок коры ивы белой на 35% по отношению к контрольной группе угнетает образование грануляционной ткани. Снижение пролиферативной активности при использовании побегов ивы трехтычинковой по отношению к контрольной группе происходило на 21%. Сравнение этого

показателя для порошка коры ивы белой не выявило достоверных отличий от АСК.

Таким образом, на модели «ватной гранулемы» (хроническое пролиферативное воспаление) в опытах на крысах, измельченный порошок побегов ивы трехтычинковой в дозе 68 мг/кг проявляет антиэкссудативную и пролиферативную активность, сопоставимую с АСК. Выявленные эффекты порошка побегов ивы трехтычинковой способствуют регенерации тканей в очаге воспаления.

Определение ульцерогенного действия. Ульцерогенное действие порошка побегов ивы трехтычинковой определяли, как наиболее характерный побочный эффект для противовоспалительных лекарственных препаратов первого поколения, так как объекты исследования вводились животным в течение 7 дней (субхроническое введение).

При оценке ульцерогенного действия (см. методику в п. 2.3.5.1), результаты которой приведены в таблице 5.3, выявлено, что в дозе 125 мг/кг АСК у 90-100% животных вызывала повреждение слизистой желудка в 3,8 балла, в том числе слущивание клеток эпителия, геморрагическое воспаление слизистой оболочки желудка. При применении суспензии, полученной из побегов ивы трехтычинковой, наблюдалась минимальная степень повреждения (0,3 балла). Под влиянием коры ивы белой проявилось слабое ульцерогенное действие (0,6 балла) (наблюдалась лёгкая гиперемия) [146]. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что порошок побегов ивы трехтычинковой может служить источником получения ЛС противовоспалительного действия [101, 146].

5.3 Выбор метода деконтаминации порошка побегов ивы трехтычинковой

В лекарственных препаратах для внутреннего и наружного применения регулируется наличие непатогенных микроорганизмов и грибов [73]. Наиболее существенным недостатком использования порошка ЛРС в капсулах является его

несоответствие требованиям по нормам показателя качества «Микробиологическая чистота», предъявляемым к ЛС для внутреннего применения (приложение 5, таблица 1). В связи с этим для использования порошка ЛРС в виде пероральной лекарственной формы необходима его деконтаминация.

К пероральным лекарственным препаратам, содержащим ЛРС, предъявляют более высокие требования по очистке от микроорганизмов. Исходя из этих требований, лекарственное растительное сырье должно быть подвергнуто деконтаминации. Термические методы деконтаминации не пригодны для лекарственного растительного сырья, так как могут инактивироваться биологически активные вещества растения. Химические методы также не могут применяться в отношении лекарственных растений. При воздействии различных химических агентов БАВ в сырье может быть инактивировано [40, 124].

Наиболее пригодными для обработки сырья являются физические методы, а именно, методы облучения сырья: ультрафиолетовое облучение, гамма облучение и СВЧ-облучение. Актуальной проблемой является выбор наиболее оптимального метода, при котором будет наблюдаться наименьшая потеря биологически активных веществ [40, 124].

В качестве объекта исследования нами выбраны однолетние побеги, собранные на реке Подкумок (окрестности г. Пятигорска) в сентябре 2014 года.

В качестве критерия оценки влияния излучения на сохранность БАВ растения нами выбран перманганатометрический метод, позволяющий определить сумму окисляемых веществ, которые, в первую очередь, будут подвергаться деструкции при их облучении.

Далее были применены два способа деконтаминации сырья.

5.3.1 Использование СВЧ-облучения для деконтаминации порошка

На первом этапе исследования была использована методика СВЧ-облучения сырья для достижения оптимальных значений микробиологической чистоты (методика изложена в п. 2.3.3).

При исследовании сырья на микробиологическую чистоту до и после облучения мы наблюдали тенденцию снижения микробной обсемененности сырья с увеличением времени и мощности. Сырье доведено до норм микробной контаминации (таблица 5.4), оптимальных для приема внутрь в соответствии с требованиями (ГФ XIII, ч.1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 3.2) (приложение 5) [72].

Таблица 5.4 – Микробная обсемененность после СВЧ-облучения сырья

Время, мин	Микробная обсемененность			
	Общее число аэробных бактерий	Общее число грибов	E. coli	Staphylococcus
мощность 300 Вт				
Без облучения	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	Не обнаружено	Не обнаружено
1	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
3	Много	$1 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
5	Не обнаруж.	$2 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
мощность 500 Вт				
1	$4 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
3	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
5	$1 \cdot 10^4$	Не обнаруж.	Не обнаружено	Не обнаружено
мощность 700 Вт				
1	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
3	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
мощность 900 Вт				
1	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено
2	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	Не обнаружено	Не обнаружено

Полученные результаты (таблица 5.4) свидетельствуют о том, что СВЧ-облучение эффективно в отношении грибов и аэробных бактерий. Кроме того, наблюдается тенденция снижения обсемененности с увеличением мощности облучения. В образцах отсутствуют E. coli и Staphylococcus, что соответствует рекомендуемым требованиям ГФ XIII издания по показателю «Микробиологическая чистота» для капсулированных лекарственных препаратов (категория 3.2). Наиболее эффективной оказалась мощность 500 Вт, которую возможно использовать для деконтаминации сырья.

Далее облученное сырье подвергали оценке сохранности легкоокисляемых веществ в побегах ивы трехтычинковой, используя перманганатометрическую методику, приведенную в п. 2.3.1.2. Параллельно рассчитывали потерю в массе при высушивании, так как сырье при воздействии облучения теряло массу (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Результаты количественного определения дубильных (окисляемых) веществ до и после СВЧ-облучения сырья
(среднее из трех параллельных определений)

Мощность, Вт	Время, мин	а, г	W, %	V _{ко} , мл	V, мл	C, %
Сырье без облучения		2,000	5,02	0,8	4,31	3,65
300	1	2,000	1,37	0,8	4,24	3,58
300	3	2,000	0,24	0,8	4,28	3,62
300	5	2,000	1,66	0,8	4,33	3,67
500	1	2,000	6,15	1,2	4,65	3,59
500	3	2,000	6,98	1,2	4,56	3,49
500	5	2,000	7,56	1,2	4,71	3,65
700	1	2,000	1,68	0,8	3,63	2,94
700	3	2,000	10,3	0,8	3,66	2,97
900	1	2,000	8,37	0,8	3,32	2,62
900	2	2,000	8,25	0,8	3,23	2,53

Из таблицы 5.5 следует, что при СВЧ-облучении ЛРС различной мощностью происходит падение содержания дубильных веществ (или сумма окисляемых БАВ). Так, уменьшение содержания БАВ наблюдается при мощности 700 Вт и времени облучения как 1, так и 3 минуты, а при мощности 900 Вт результаты значительно отличаются от необлученного сырья. При этих же мощностях наблюдается и наибольшая потеря в массе. Однако, при мощности в

300 Вт и 500 Вт результаты практически не отличаются от необработанного сырья. Следовательно, оптимальной мощностью, при которой происходит наименьшая потеря биологически активных веществ, является мощность 500 Вт, так как при мощности 300 Вт, сырье не отвечает требованиям по критерию «Микробиологическая чистота» (приложение 5).

Таким образом показано, что оптимальной мощностью является 500 Вт, при облучении в течение 5 минут, при которых сырье сохраняло свои свойства и товарный вид, а также происходила наименьшая потеря окисляемых веществ [124].

5.3.2 Изучение возможности использования ионизирующего излучения для деконтаминации порошка

Работами О.Б. Чакчир показано положительное влияние ионизирующего излучения для деконтаминации ЛРС [159].

Обработку измельченных побегов ивы трехтычинковой ионизирующим излучением проводили на базе ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» МЗ РФ по методике пункта 2.3.3. В работе использовался гамма-облучатель «Исследователь». Суммарная активность источников гамма-излучения радиоактивного кобальта ^{60}Co составила 19460 Кюри; высота рабочей камеры – 240 мм, диаметр – 150 мм, рабочий объем – 4,4 л. Средняя мощность дозы гамма-излучения в рабочем объеме камеры составила 42,5 Гр/мин.

Дозу гамма-излучения контролировали химическим методом с помощью ферросульфатного дозиметра с погрешностью $\pm 2\%$. Величину поглощенных доз варьировали в интервале от 0,5 до 5 кГр [159, 160].

Установлено, что содержание суммы дубильных (окисляемых) веществ в исследуемом образце до облучения составило $4,61 \pm 0,03\%$, а после облучения – $4,52 \pm 0,03\%$. Таким образом, воздействие ионизирующего излучения не влияет на количественное содержание суммы дубильных веществ.

Кроме того, наиболее информативным для выявления возможных продуктов деструкции является метод ТСХ. Было показано, что на хроматограмме

извлечений (п. 2.3.2.1) из порошка побегов ивы трехтычинковой, приготовленных до и после воздействия ионизирующего излучения, не было выявлено дополнительных пятен продуктов деструкции БАВ побегов ивы трехтычинковой.

Результаты определения микробиологической чистоты (см. п. 2.3.5.2), приведенных в таблице 5.6, свидетельствуют, что исследуемое сырье без использования облучения не соответствует требованиям ГФ РФ XIII изд. по содержанию грибов по категории 4Б (ЛРС без использования кипящей воды) [72]. Образцы, подвергавшиеся различным дозам (0,25-2,5 кГр) облучения, соответствуют рекомендуемым требованиям ГФ к ЛРС без использования кипящей воды, а при использовании дозы в 5 кГр соответствует нормам, предъявляемым к ЛРС для перорального приема (категория 3.2).

Таблица 5.6 – Результаты определения микробиологической чистоты побегов ивы трехтычинковой

Доза облучения, кГр	Результат				
	Общее число аэробных бактерий	Общее число грибов	Escherichia coli	Salmonella	Энтеробактерии
Без облучения	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
0,25	10^2	$3 \cdot 10^2$	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
0,5	$3 \cdot 10^2$	10^2	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
1,0	$2 \cdot 10^2$	10^2	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
2,5	10^2	10^2	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
5,0	10^2	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

Таким образом, наши исследования на примере изучения побегов ивы трехтычинковой показали, что при использовании метода СВЧ-облучения и ионизирующего излучения возможно добиться деконтаминации ЛРС до нормы микробиологической чистоты для пероральных лекарственных средств (капсулы).

При этом до и после облучения в выбранных условиях сырье не теряло по содержанию количество дубильных (окисляемых) веществ [40]. Это позволяет рекомендовать измельченное в порошок ЛРС (побеги ивы трехтычинковой) после обработки СВЧ- или ионизирующим излучением заключать его в капсулы.

5.4 Технологические исследования порошка побегов ивы трехтычинковой

При производстве ЛП и БАДов на основе измельченного нативного лекарственного сырья необходимо определение технологических свойств порошка используемого сырья, влияющих на процесс объемного дозирования полученного готового продукта. Исследование по определению технологических свойств порошка побегов ивы трехтычинковой касались изучения некоторых факторов, влияющих на процесс объемного дозирования: фракционного состава, насыпной плотности и сыпучести [25, 107].

Исследование проводили на образцах побегов ивы трехтычинковой, собранных в г. Пятигорске Ставропольского края в пойме реки Подкумок в июле 2014 года. Для измельчения побегов ивы, имеющих волокнистую структуру, была применена траворезка, с помощью которой достигали размера частиц 3 мм. Дальнейшее измельчение сырья до размера частиц менее 1 мм (оптимального для приема внутрь) стандартного состояния измельченного сырья достигали просеиванием через сито соответствующего диаметра. Очистку от пыли осуществляли просеиванием через сито с размером отверстий 0,2 мм.

Фракционный состав или распределение частиц порошкообразного вещества по размерам оказывает значительное влияние на стабильность порошкованной массы и ритмичную работу дозирующей машины. Фракционный состав порошка ивы трехтычинковой побегов был определен с помощью ситового анализа и показано, что (таблица 5.7) он неоднороден, так как преобладают фракции с размером частиц более 1 мм (35,5%), с размером частиц 0,5-1 мм (31,1%) и 0,5-0,25 мм (29,9%).

Обеспечение выполнения одного из основных требований к качеству

порошка – *однородности дозирования* – зависит от сыпучести материала.

Каждая полученная фракция была проверена на сыпучесть, и найдено, что фракции порошка с размером частиц 1,0-0,5 мм и 0,5-0,25 мм обладают хорошей сыпучестью (таблица 5.7) [107].

Кроме того, у каждой фракции была определена насыпная плотность. Насыпная плотность зависит от формы, размера частиц и влажности порошкообразных веществ. Результаты исследования показали (таблица 5.7), что фракции порошка с размером частиц 1,0-0,5 мм и 0,5-0,25 мм обладают насыпной плотностью 0,530 г/см³ и 0,328 г/см³ соответственно, т.е. эти фракции порошка ивы трехтычинковой побегов можно условно отнести к легким порошкам.

Таблица 5.7 – Результаты определения фракционного состава, сыпучести и насыпной плотности порошка побегов ивы трехтычинковой

Наименование показателя	Размер фракции порошка, мм			
	более 1,0	от 0,5 до 1,0	от 0,25 до 0,5	менее 0,25
Масса фракции порошка, г	53,25	46,65	44,85	5,25
Состав фракции порошка, %	35,5	31,1	29,9	3,5
Сыпучесть, г/с	5,9	6,6	8,5	8,9
Насыпная плотность, г/см ³	0,399	0,530	0,328	0,322

Результаты технологических исследований свидетельствуют о возможности непосредственного объемного дозирования порошка побегов ивы трехтычинковой при производстве потенциального лекарственного препарата [146].

Выводы по главе 5

1. В опытах на крысах на модели хронического пролиферативного воспаления (ватной гранулемы) порошок побегов ивы трехтычинковой в эффективной дозе 68

мг/кг обладает достоверной антиэкссудативной активностью, сопоставимой с лекарственным средством - кислота ацетилсалициловая. По ограничению пролиферации исследуемый объект угнетает образование грануляционной ткани по отношению к контрольной группе на 21%.

2. Ульцерогенная активность изучаемого порошка была достоверно ниже, чем у животных, получавших кислоту ацетилсалициловую. Следовательно, длительное применение порошка ивы трехтычинковой при воспалительных заболеваниях суставов более безопасно.

3. Найдено, что для деконтаминации побегов ивы трехтычинковой можно использовать СВЧ-облучение при мощности 500 Вт и времени экспозиции 5 минут, а также обработку ЛРС с помощью ионизирующего излучения в дозе 5 кГр в течении 5 минут. Методом перманганатометрического титрования показано, что сумма дубильных (окисляемых) веществ не изменяется при выбранных условиях облучения, а ЛРС отвечает показателю «Микробиологическая чистота» в соответствии с требованиями, предъявляемыми к лекарственным средствам для перорального применения (категория 3.2).

4. Проведенные технологические исследования показали, что фракция измельченного и высушенного порошка побегов ивы трехтычинковой с размером частиц от 0,25 до 1,0 мм, обладают приемлемой насыпной плотностью и сыпучестью, что свидетельствуют о возможности непосредственного объемного дозирования порошка побегов ивы трехтычинковой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из анализа литературных данных, результаты исследований побегов некоторых видов ив, произрастающих на Северном Кавказе, показали перспективность побегов ивы, как потенциального ЛРС, проявляющего противовоспалительное действие.

Проведенные исследования по изучению возможности использования в качестве ЛРС побегов ивы трехтычинковой позволили сформулировать следующие выводы:

1. Химический состав побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе, изученный современными физико-химическими методами представлен наличием фенольных соединений (фенологликозидов, флавоноидов, дубильных веществ и фенолкарбоновых кислот), а также полисахаридов, пигментов, органических и аминокислот, макро- и микроэлементов.

2. С использованием метода КЗЭ обоснованы оптимальные условия извлечения фенологликозидов (салидрозида и триандрина) из растительного сырья и разработаны методики качественного и количественного определения ФГ в побегах ивы трехтычинковой.

3. Методом ВЭЖХ показано, что в исследуемых образцах ивы трехтычинковой содержатся в основном конденсированные дубильные вещества. Методом перманганатометрического титрования найдено, что побеги ивы трехтычинковой содержат до 5,4% ДВ в пересчете на танин. При использовании метода, основанного на осаждении суммы ДВ с помощью коллагена, показано, что их содержание значительно отличается от результатов, полученных методом титрования, и находится в пределах 1,7%.

4. С помощью методов ТСХ, ВЭЖХ и КЗЭ показано, что в побегах ивы трехтычинковой содержится значительное количество рутина и следы лютеолина и нарингенина. Наибольшее количество суммы флавоноидов накапливается в листьях (от 2,66% до 3,68%), в побегах это значение немного меньше (от 1,73% до 3,24%). Впервые разработаны и валидированы методики количественного

определения рутина с использованием методов капиллярного электрофореза и планарной хроматографии.

5. Найдено впервые, что количественное содержание фенолкарбоновых кислот в побегах ивы трехтычинковой достигает 0,47%, свободных органических кислот содержится до 1,9%, свободных аминокислот до 0,91%, хлорофиллов в листьях ивы трехтычинковой колеблется в пределах от 0,11% до 0,33%, а содержания суммы каротиноидов и ксантофиллов - до 0,05%.

6. Впервые в побегах ивы трехтычинковой найдено 16 аминокислот (11,73%), из них 7 незаменимых для организма человека (4,64%). Атомно-эмиссионным методом в побегах ивы трехтычинковой обнаружены 8 микро- и 6 макро-эссенциальных элементов; 7 условно-эссенциальных микроэлементов.

7. Установлена оптимальная сырьевая часть ивы трехтычинковой – побеги, рекомендуемые сроки заготовки сырья с июля по август месяцы с учетом динамики накопления ДВ и флавоноидов.

8. Разработан проект ФС «Ивы трехтычинковой побеги» и инструкция по сбору и сушке побегов ивы трехтычинковой.

9. В опытах на крысах показано, что измельченный порошок ивы трехтычинковой обладает достоверной антиэкссудативной активностью, а по ограничению пролиферации угнетает образование грануляционной ткани по отношению к контрольной группе на 21%. Найдено, что для деконтаминации побегов ивы трехтычинковой можно использовать СВЧ-облучение и ионизирующее излучение. Проведенные технологические исследования показали возможность непосредственного объемного дозирования порошка побегов ивы трехтычинковой при создании оптимального лекарственного препарата.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы данной диссертации могут заключаться в обосновании дальнейшего проведения морфолого – анатомических, химических и фармакологических исследований сырья ивы трехтычинковой других районов России с целью создания нового лекарственного средства на его основе.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСК – ацетилсалициловая кислота;

БАВ – биологически активные вещества;

БАД – биологически активная добавка к пище;

Вода – вода очищенная;

ВРПС – водорастворимые полисахариды;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГФ – Государственная Фармакопея;

ДВ – дубильные вещества;

ЕФ – Европейская Фармакопея;

ИРС – измельченное растительное сырье;

КБР – Кабардино-Балкарская Республика;

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез;

КЭ – капиллярный электрофорез;

ЛП – лекарственный препарат (лекарственные препараты);

ЛРС – лекарственное растительное сырье;

ЛС – лекарственное средство (лекарственные средства);

МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография;

НПВС- нестероидное противовоспалительное средство;

ОДА – опорно-двигательный аппарат;

ОФС – общая фармакопейная статья;

ПВ – пектиновые вещества;

ПКО – предел количественного определения;

ПМФИ – Пятигорский медико-фармацевтический институт;

ПО – предел обнаружения;

СВЧ-облучение – сверхвысокочастотное облучение;

СО – стандартный образец (стандартные образцы);

СФМ – спектрофотометрия (спектрофотометрически);

т.т. – теоретические тарелки;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

УФ – ультрафиолетовый;

ФГ – фенологликозиды;

ФК – фенолкарбоновые кислоты;

ФС – фармакопейная статья;

ЭФГ – электрофореграмма.

Список используемой литературы

1. Алефиров, А.Н Фитотерапия заболеваний суставов [Электронный ресурс] / А.Н. Алефиров. - СПб., 2011. - Режим доступа: <http://www.travolekar.ru/articles/pract/art.htm>.
2. Анальгетическая активность отваров коры и однолетних побегов ивы белой [Электронный ресурс] / О.О. Хитева и [др.] // Успехи современного естествознания. - 2012. - №2. - С. 51-52. - Режим доступа: <http://www.natural-sciences.ru/ru/article/view?id=29647>.
3. Арзамасцев, А.П. Валидация фармакопейных методов (проект ОФС) / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Ведомости Науч. центра экспертизы и гос. контроля лек. средств МЗ РФ.- 2001.- №1.-С.28-29.
4. Афонин, А.А. Изменчивость ив Брянского лесного массива и перспективы их селекции на устойчивость и продуктивность: автореф. дис. ... д-ра сельскохоз. наук: 06.03.01 / Афонин Алексей Алексеевич. - Брянск, 2006.- 48 с.
5. Афонин, А.А. Ивы среднего Подесенья [Электронный ресурс] / А. А. Афонин // Брянский гос. ун-т, (Willows, Weiden). - Режим доступа: <http://afonin-59-salix.narod.ru>salix06040201.htm>.
6. Афонин, А.А. Формовое разнообразие ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) на территории Восточной Европы / А.А. Афонин, Я.Д. Фучило // Вестн. Брянского гос. ун-та. - 2012. - №4 (1). - С.32-36.
7. БАД, поддерживающие функции опорно-двигательного аппарата [Электронный ресурс]: мед. информ.-справоч. сеть.- М., 2011. - Режим доступа: <http://www.ros-med.info/bad/full.php?code=11&action=bad1>.
8. Барнаулов, О.Д. Введение в фитотерапию /О.Д. Барнаулов. – СПб: Лань, 1999.- 160 с.
9. Биологически активная добавка "Коры ивы сухой экстракт" ("White Willow Bark Р.Е.") (порошок от 5 кг до 25 кг). Свидетельство о государственной регистрации 77.99.23.3.У.13451.12.06.- Федеральная службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека. -М., 2006. - 1 с.
10. Биологически Активные Добавки при заболеваниях суставов: обзор БАД, обладающих хондропротективной активностью [Электронный ресурс] - М., 2011.- Режим доступа: <http://spinet.ru/public/bad.php>.
11. Бовкин, А. Антиоксидантная активность отваров листьев трехразновидностей ивы из Беларуси / А. Бовкин, Е.Игнатович, Н. Гурина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы 6 междунар. съезда «Фитофарм», 4-6 июля 2002 г., - СПб, 2002. – С.139-142.

12. Бормотов, В.И. Таннидность видов ив *Salix L.* в Архангельской области / В.И. Бормотов, В.Н. Нилов // Раст. ресурсы. -1987. - Т.23, вып.2. – С. 234-238.
13. Бородина, Н.В. Анализ аминокислотного состава побегов *Salix alba L* / Н.В. Бородина, В.Н. Ковалев, А.А. Стремоухов // Inter-Medical. - 2014. - №4. - С.68-71.
14. Бородина, Н.В. Сравнительный анализ аминокислотного состава побегов *Salix purpurea L.*, *Salix viminalis L.*, *Salix fragilis L.* / Н.В. Бородина, В.Н. Ковалев, О.Н. Кошевой // Вестн. Южно-Казахст. гос. фармацев. акад. - 2014. -Т.4, №3(68). - С.53-55.
15. Бородина, Н.В. Сравнительный анализ фенольных соединений побегов *Salix caprea L.*, *Salix purpurea L.*, *Salix viminalis L.* флоры Украины / Н.В. Бородина, В.Н. Ковалев // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. материалов IX Междунар. симпоз. 20-25 апр. 2015 г. - М.,2015. - С.27-33.
16. Браславский, В.Б. Ива, тополь и прополис в медицине и фармации: монография / В.Б. Браславский – Самара: «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012.- 116 с.
17. Браславский, В.Б. Комплексное фармакогностическое и физико-химическое исследование флавоноидов и фенилпропаноидов представителей семейства ивовых (*Salicaceae*): автореф. дис... д-ра фармац. наук: 14.04.02 / Браславский Валерий Борисович.- Самара, 2012. - 48 с.
18. Валидационная оценка методики определения рутина в листьях ивы трехтычинковой методом планарной хроматографии / Т.Д. Мезенова [и др.] // Химия раст. сырья.-2016.-№4. –С.175-178.
19. Валидация аналитических методик (ОФС.1.1.0012.15) // Государственная фармакопея Российской Федерации в 3-х т.: т. 1.- М., 2015. -13-е изд - [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#222
20. Валидация аналитических методик (ОФС 42-0113-09). Государственная Фармакопея Российской Федерации 12 изд. (1 ч.).-М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008.- 696с.
21. Валягина-Малютина, Е.Т. Ивы европейской части России: иллюстр.пособие для работников лесного хозяйства / Е.Т. Валягина-Малютина. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2004.- 217с.
22. Везиришвили, М.О. Разработка и клинические испытания новой биологически активной добавки к пище гербасприн / М.О. Везиришвили // Человек и лекарство: тез. докл. 10 Рос. нац. конгр. 7-11 апр. 2003 г.- М, 2003.- С.701.
23. Вернер, Г. Экстракт коры ивы (Ассаликс) в лечении пациентов с хронической болью в спине и суставах. Результаты крупномасштабного

- постмаркетингового исследования / Г.Вернер, К.Щульц // Укр. ревматол. журн.- 2006. -№ 1. -С. 62-64.
24. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. - М., 2014. - Режим доступа: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View.aspx?idReg=12344&isOld=1&t=http://fp.crc.ru/gosregfr/.
 25. Гранулы и капсулы. Микрокапсулирование [Электронный ресурс]. -Режим доступа: <http://farmf.ru/lekcii/granuly-i-kapsuly-mikrokapsulirovanie/> Загл. с экрана.
 26. Гроссгейм, А.А. Определитель растений Кавказа / А.А. Гроссгейм.- М.: Сов. наука, 1949. – С.725.
 27. Дементьева, Т.М. Изучение дубильных веществ в некоторых видах ивы / Т.М. Дементьева, В.А. Климовская // Актуальные вопросы современной медицины: сб. тезисов. – Хабаровск, 2015. – С. 233-234.
 28. Дементьева, Т. М. Изучение коры и побегов ивы вавилонской (*Salix babylonica* L.) и гибрида ивы вавилонской и ивы белой (*Salix babylonica* L. × *Salix alba* L.), произрастающих на Северном Кавказе: автореф. дис. канд. фармацевт. наук 14.04.02. / Дементьева Татьяна Михайловна.–Пятигорск, 2016. - 24с.
 29. Дерффель К. Статистика в аналитической химии / К. Дерффель - М.: Мир, 1994. –268с.
 30. Динамика содержания танидов в коре некоторых видов р. *Salix* L. / О.Э. Оразов, В.С. Никитина, А.Ю. Кулагина, А.А. Баталов // Раст. ресурсы. - 1993. - №1. - С.69-71.
 31. Европейская Фармакопея. Т. 1. – М.: Ремедиум, 2011. – 1812 с.
 32. Жиряков, А.С. Особенности аккумуляции тяжелых металлов представителями рода ива /А.С. Жиряков // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства. – 2007. - №1. - С.156.
 33. Заявка 94033174 Рос. Федерация МПК А61К35/78 Способ лечения местнотекающих воспалительно-деструктивных процессов / К.А. Лукманова [и др.] (РФ).-№ 94033174/14; заявл. 12.09.1994; опубл. 10.09.1996. - [Электронный ресурс]: официальный сайт Федеральной службы по интеллектуальной собственности.- М., 2012. - Режим доступа:<http://www.fips.ru/cdfi/Fips2009.dll/CurrDoc?SessionKey=12M2F9OATGQ735TNTG9Q&GotoDoc=1&Query=2>.
 34. Заявка 102005033645 Германия Фармацевтическая комбинация активных веществ для лечения рассеянного склероза. Pharmazeutischer Wirkstoff-Kombination zur Behandlung von Multipler Sklerose МПК 8 А 61 К 35/56 (2006.01), А 61 К 36/76 (2006.01)., /D.Weickmann TOXIMED GmbH. N 102005033645.0; заявл. 19.07.2005; опубл. 01.02.2007.

35. Зверобоя трава: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып. - Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. - 11-е изд. - М., 1990. - С.323.
36. Зеннер-Вебер, М.А. Успешное лечение пациентов с хроническими ревматическими заболеваниями с помощью экстракта коры ивы (препарат Ассаликс)/ М.А.Зеннер-Вебер // Укр. ревматол. журн.- 2006. -N 4.-С. 65-67.
37. Ива белая – биологически активные вещества, свойства и применение / А.Н. Шиков [и др.]. // Актуальные проблемы создания новых ЛС природного происхождения: материалы 8 междунар. съезда «Фитофарм-2004» 21-23 июня 2004 г. Миккели, Финляндия.- СПб., 2004.- С.507-512.
38. Иванов, А.Л. Флора Предкавказья и ее генезис/ А.Л. Иванов// Ставрополь. 1998.- 204с.
39. Ивы Урала = Willows of Ural: атлас-определитель / И. В. Беляева, О. В. Епанчинцева, А. А. Шаталина, Л. А. Семкина; - Екатеринбург: УрО РАН, 2006. -172с.
40. Изучение возможности использования побегов ивы трехтычинковой (*Salix triandra*) после воздействия ионизирующего излучения / А.С. Саушкина [и др.] // Многопрофильная клиника XXI века: Экстремальная медицина: материалы международного научного форума. СПб., 2015. -С.262-263.
41. Изучение противовоспалительной активности водных извлечений из коры и однолетних побегов ивы белой / Т.А. Лысенко, О.О. Хитева, И.А. Савенко, Е.В. Компанцева // Вестн. новых мед. технологий. - 2011. - Т.18, №3. - С. 288-290.
42. Изучение фенолкарбоновых кислот побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе / Е.Г. Санникова, О.И.Попова, Е.В.Компанцева, О.О.Фролова //Фармация и фармакология. – 2015. – № 2(9). – С. 13-17.фа
43. Изучение флавоноидов ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе / Е.Г.Санникова, О.И.Попова, О.О.Фролова, А.Ю.Айрапетова // Фармация и фармакология. – 2016. – №3(16). – С. 56-67.
44. Исследование элементного состава побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе / Р.Д. Кусова [и др.] // Известия Горск. гос. аграрного ун-та. – 2016. – №53(3). – С. 150 – 153.
45. Кольцова, М.А. Методические рекомендации по ассортименту, технологии возделывания и воспроизводству видов и культиваторов рода ива / М.А. Кольцова, В.И.Кожевников, А.Ф. Кольцов - Ставрополь: ГНУ Ставроп. бот. сад, 2009. – 84 с.

46. Компанцев, В.А. Получение фармпрепарата рутина из листьев ивы трехтычинковой / В.А. Компанцев, А.Л. Шинкаренко // Исследования по изысканию лекарственных средств природного происхождения: тез. докл. Всесоюз. науч. конф. – Л., 1981. – С.48.
47. Компанцев, В.А. Фенольные соединения ивы трехтычинковой / В.А. Компанцев // Науч. конф. молодых ученых Пятигорского фармац. ин-та: тез докл. – Пятигорск, 1973. – С.28-29.
48. Компанцев, В.А. Химическое изучение фенольных гликозидов некоторых видов ив Северного Кавказа: автореф. дис. ...канд. фармацевт. наук: Компанцев Владислав Алексеевич.- Пятигорск, 1970. - 23 с.
49. Компанцев, Д.В. Экспериментальное изучение целесообразности включения экстракта ивы белой в гидрогель противоартрозного действия. /В.А. Компанцев //Бюл. Сиб. мед. - 2007. -Т.6, №2, -С. 26-30.
50. Компанцева, Е.В. Возможность использования ивы вавилонской в фармации/ Е.В. Компанцева, О.О. Фролова, Т.М. Дементьева // Фармация и фармакология. -2013. - №1.- С.4-8.
51. Компанцева, Е.В. Изучение противовоспалительной активности побегов ивы белой/ Е.В. Компанцева, О.О. Фролова, И.А. Савенко // Проблемы фармацевтической науки и практики: материалы IV Межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Владикавказ, 30–31 мая 2014 г.). - Владикавказ, 2014. - С.206-209.
52. Компанцева, Е.Г. Геоботанические аспекты изучения некоторых видов растений *Salix L.* с целью обоснования их медицинского использования / О.И. Попова, Е.Г. Компанцева // Вопросы биологич., мед. и фармац. химии. – 2014. – № 4. – С. 50-51.
53. Кора ивы и осины, экстракты из них и БАД на их основе. ВЭЖХ метод определения массовой концентрации салицина / МУ 08-47/172. - Введ.2005. - Томск: Томск. политех. ун-т,2005. - 17с.
54. Корневища и корни родиолы розовой: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып. - Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье.- 11-е изд.- М., 1990.- С.364-366.
55. Косман, В.М. Количественное экстракционно-спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. - 2001.- Вып.4. - С.123-129.
56. Кочетков, Н.К. Химия биологически активных природных соединений / Н.К. Кочетков. - М.: Химия, 1970. – 486 с.

57. Кулак, В.А. Содержание флавоноидов и фенологликозидов в листьях белорусских видов ив [Электронный ресурс] / В.А.Кулак, Н.А. Кузьмичева. - Минск, 2010. -Режим доступа: <http://www.metolit.by/imcysb/txt320.php#txt3246.html>.
58. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фарм. вузов (факультетов) / В.А. Куркин.- 2-е изд., перераб. и доп.- Самара: Офорт; ГОУ СамГМУ, 2007.- 1239с.
59. Ларькина, М.С. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого / М.С. Ларькина, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова // Химия раст. сырья.- 2008.- №3.- С.71-74.
60. Лекарственные растения в народной медицине – лекарственные травы, народные рецепты, сборы трав -2017 [Электронный ресурс]. -Режим доступа: <http://varakol.ru/>
61. Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Фармакогнозия / под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева.- М., 2003.-534 с.
62. Лекарственные средства и БАД, содержащие иву: тенденции и перспективы / Е.Г. Санникова [и др.] // Фармация.- 2015.- №5.- С. 51-53.
63. Лечение боли в нижней части спины растительными или синтетическими противоревматическими препаратами: рандомизированное контролируемое исследование. Экстракт коры ивы при боли в нижней части спины / С.Крубасик и [и др.] // Укр. ревматол. журн. - 2008. -№2. -С. 41-47.
64. Лобанова, И.Ю. Выделение и изучение состава флавоноидов листьев осины обыкновенной / И.Ю. Лобанова, В.Ф. Турецкова // Химия раст. сырья. -2011. - №2. - С. 117–122.
65. Логинова, Л.А. Продуктивность и энергетический потенциал ивовых ценозов на примере Воронежской области: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Логинова Людмила Александровна. - Воронеж, 2010.- 24с.
66. Мазан, И.Ф. Содержание танинов в коре видов *Salix L.* в зависимости от условий произрастания / И.Ф. Мазан // Раст. ресурсы. -1986. - Т.22, вып.1. - С. 72-75.
67. Максименко, А.П. Лесоразведение в Восточном Приазовье: автореф. дис.д-ра сельскохозяйств. наук: 06.03.04; 06.03.01 / Максименко Анатолий Петрович. – Воронеж, 2003. – 48 с.
68. Меньшиков, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков - М.: Медицина, 1987. – 365 с.
69. Методика количественного определения суммарного содержания органических кислот в растительном сырье/ Д.Н.Олейников [и др.] // Раст. ресурсы. -2004. -№3. –С.112-116.

70. Методы анализа лекарственного растительного сырья, фармацевтических субстанций растительного происхождения и лекарственных растительных препаратов Государственная фармакопея Российской Федерации; в 3-х т.: т. 2. – 13-е изд.- М., 2015. - [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#222
71. Методы анализа растительного сырья. [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып.: вып.1 Общие методы анализа. – 11-е изд. – М., 1987. – вып.1-С. 276, 277, 296; Вып. 2-С. 377.
72. Микробиологическая чистота (ОФС.1.2.4.0002.15). //Государственная фармакопея Российской Федерации в 3-х т.: т. 1.– 13-е изд.- М., 2015. - [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#222
73. Микробиологическая чистота (ОФС 42-0067-07). //Государственная Фармакопея Российской Федерации 12 изд. (1 часть). - М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008.- 696с.
74. Морфолого-анатомическое изучение побегов ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе //Е.Г.Санникова, О.О. Фролова, О.И. Попова, Е.В. Компанцева [Электронный ресурс]. //Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №6. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16174>
75. Насонов, Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов и ингибиторов циклооксигеназы-2 в начале XXI века / Е.Л. Насонов // Рос.мед.журн. – 2003. – Т. 11, №7. – С. 375 -379.
76. Недосеко, О.И. Ивы Нижегородской области / О. И. Недосеко; - Арзамас: АГПИ, 2010. - 171 с.
77. Недосеко, О.И. Бореальные виды ив подродов *Salix* и *Vetrix*: онтоморфогенез и жизненные формы / О. И. Недосеко ; - Н. Новгород: Из-во Нижегород. гос. ун-та, 2014. - 426 с.
78. Никитина, В.С. Динамика содержания суммы флавоноидов в листьях и танидов в коре ветвей разнополых особей *Salix triandra* L. и *S.acutifolia* Willd. / В.С. Никитина, О.Э. Оразов // Раст. ресурсы. – 2001. – вып.3. – С.65-72.
79. Определение влажности лекарственного растительного сырья [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып.: вып. 1. Общие методы анализа.- 11-е изд.- М., 1987.- С. 285.
80. Определение дубильных веществ в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе /Е.Г.Санникова [и др.]// Молодые ученые и фармация XXI века: материалы второй науч.-практич. конф. аспирантов и молодых ученых 11-12 дек. 2014 г. –М.: 2014. -С.181-185.

81. Определение золы: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып.: вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье.- 11-е изд.- М., 1990.- С.25.
82. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) методом ТСХ / Т.В. Великая, К.К. Кожанова, С.К. Жетерова, О.Дрегерт // Междунар. науч.-исслед. журн..- 2016- №1 (43), ч. 3. - С. 78-80.
83. Определение кислотности соков плодов растений с использованием двух электрохимических датчиков / Л.А., Дейнека, И.П. Анисмович, Т.Г. Новоженова, В.И. Дейнека // Науч. ведомости. - 2009, - № 11(66). - С. 111- 116.
84. Определение органических кислот в листьях и побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) /Е.Г.Санникова, О.И. Попова, Л.С. Ушакова, Е.В. Компанцева // Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития: материалы Всерос. Науч.-практич. конф. с междунар. участием, посвященной 50-летию фармац. факультета КГМУ. - Курск, 2016. - С.515 – 518.
85. Определение органических кислот в плодах рябины обыкновенной. / С.Г. Абдуллина, Н.М. Агапова, Р.Ш. Хазиев, С.А. Сидуллина // Фармация. - 2011. - №2. - С.17- 19.
86. Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып.: вып. 1. Общие методы анализа.- 11-е изд.- М., 1987.- С. 275.
87. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: в 2 вып.: вып. 1. Общие методы анализа.- 11-е изд.- М., 1987.- С. 286.
88. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах: (ОФС.1.5.3.0008.15) [Электронный ресурс]. //Государственная фармакопея Российской Федерации. - 13 изд.: в 3 т. - М.: МЗ РФ, 2015. - Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.
89. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (ОФС.1.5.3.0009.15) [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации в 3-х т.: т. 1.— 13-е изд.- М., 2015.— Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#234
90. Определение содержания экстрактивных веществ лекарственного растительного сырья» ОФС //Государственная Фармакопея Российской Федерации 12 изд. (1 ч.).-М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008.- 696с.

91. Определение фенологликозидов в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе / С.П. Сенченко, О.И. Попова, Е.Г. Санникова, Н.Н. Крылов // Научные ведомости БелГУ. Серия медицина. Фармация. -2017. –Вып.37, №5 (254), - С.176-182.
92. Оразов, О.Э. Состав и накопление флавоноидов и танидов у женских и мужских клонов видов рода *Salix* L.: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.12. / Оразов Олег Энверович. - Уфа, 1998. - 21 с.
93. Орлов, Д.С. Микроэлементы в почвах и живых организмах / Д.С. Орлов // Соросов. образоват. журн. - 1998. - № 1. - С.61-68.
94. Палов, М. Энциклопедия лекарственных растений: пер. с нем. / М. Палов – М.: Мир, 1998.- С. 142-143.
95. Пат. 2273484 Рос. Федерация, МПК А 61 К 31/722. Средство для лечения инфекционных заболеваний / Л.В. Погорельская [и др.] (РФ).- № 2004108177/15; заявл. 22.03.2004; опубл. 10.04.2006.- Бюл. №10.- 12с.
96. Пат. 2313359 Рос. Федерация, МПК А61К36/76. Сбор для лечения больных с тромбоокклюзирующими поражениями артерий шеи и головы / М.Л. Поспелова [и др.] (РФ).- № 2006137496/15, заявл. 23.10.2006; опубл. 27.12.2007.- Бюл. №36.- 10 с.
97. Пат. 2439568, Рос. Федерация Способ определения дубильных веществ в растительном сырье / И.А. Самылина, Р.К. Абоянц, Е.Н. Гринько; заявл.12.10.2010, опубл. 10.01.2012. Режим доступа <https://yandex.ru/search/?lr=11067&clid=2242347&msid=1505804671.91326.22907.9988&text=97.%09%D0%9F%D0%B0%D1%82.%202439568>
98. Пат. 2531940 Рос. Федерация, Способ спектрофотометрического количественного определения в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии хлорофилла, каротиноидов и гидроксикоричных кислот / О. В. Тринеева, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин, С. В. Воропаева: заяв. №2013117181/15, 15.04.2013-опубл.27.10.2014, Бюл. № 30 - С.15
99. Пат. 3013417 Рос. Федерация, МПК А61К35/78 Препарат "Эфказим" для лечения посттравматических остеопатий и деформирующего полиартрита .- [Электронный ресурс]:/ В.И. Ткаченко, Р.П. Свистунова, О.Н. Нарбеков (РФ) // № 93013417/14; заявл. 16.03.1993; опубл. 10.09.1995.- -М., 2012. - Режим доступа:
<http://www.fips.ru/cdfi/Fips2009.dll/CurrDoc?SessionKey=12M2F9OATGQ735TN TG9Q&GotoDoc=1&Query=1>.
100. Пат. 2246965 Рос. Федерация МПК 7 А61К 35/78, А61Р 33/02.Средство для лечения токсоплазмоза / В.Ф. Ральченко, О.В.Боярова N 2003132079/15; заявл. 31.10.03; опубл. 27.02.05. Режим доступа <http://www.findpatent.ru/patent/228/2281113.html>.

101. Пат. 2582225 Рос. Федерация. А61Р29/00, А61К36/76 Способ получения противовоспалительного средства / Е.Г. Санникова [и др.] заявл. 22.12.2014, опубл. 20.04.2016. - Бюл.№11 -32 с.
102. Пат. 7282224 США Композиция для облегчения боли. Pain relief composition, МПК А 01 N 65/00 (2006.01)./ Guthy-Renker Corp., Roederer Joy E. N 11/450648; заявл. 09.06.2006; опубл. 16.10.2007; НПК 424/725.
103. Пеливанова, С.Л. Изучение состава пигментов в крыжовнике отклоненном (*Grossularia reclinata* (L) Mill.) семейства Grossulariacee DC листьях и ветвях / С.Л. Пеливанова, О.А.Андреева, Э.Т.Оганесян // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр.– Пятигорск, 2012. –вып. 67. - С.106-107.
104. Плоды шиповника: [фармакоп. ст.] // Государственная фармакопея СССР: Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье.- 11-е изд.- М., 1990.- С.296-297.
105. Полисахариды ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой/ Т.М. Дементьева, Е.В. Компанцева, И.Н. Харченко, О.О. Фролова// Беликовские чтения: сб. материалов IV Всерос. Науч.-практич. конф. (1-2 дек. 2015). – Пятигорск, 2015. – С. 91-92.
106. Правила сбора и сушки лекарственных растений: сборник инструкций.- М.: Медицина, 1985.-328с.
107. Промышленная технология лекарств: в 2-х т. / под ред. В.И. Чуешова. Харьков: МТК-Книга; Изд-во НФАУ, 2002. Т. 1,2.
108. Противоязвенные свойства вытяжек ивы корзиночной / С.Г. Аксиненко [и др.] // Сиб. журн. гастроэнтерол. и гепатол.. -2001. -№12. -С. 65.
109. Разработка биологически активной добавки к пище "Аспиварин" на основе сухого экстракта коры ивы белой. / Л.А. Прокопьева [и др.] // Новые технологии и комплексное использование природных ресурсов Алтайского края для производства биологически активных добавок: материалы науч.-практ. конф. 17-20 июня 2003г.; Бийск; Барнаул, 2003. - С. 99-103.
110. Разработка методики потенциометрического определения суммы органических кислот в плодах шиповника / А.И. Марахова [и др.] // Фармация. - 2013. - №1. - С.24 - 27.
111. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г.И Олешко., Т.И. Ярыгина , Е.В. Зорина , М.Д Решетникова.// Фармация. – 2011. - №3. - С.14-17.
112. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейства *Reoniaceae* – *Thymelaeaceae*. / отв. ред. П.Д. Соколов – Л.: Наука. 1986. — 336с.

113. Растительный мир Северной Осетии / науч.ред. А.Л. Комжа, К.П. Попов.- Владикавказ, 2000.- 544 с.
114. Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов и буферных растворов ГОСТ 4919.2-77. – М.: Стандартинформ, 2010. – 34 с.
115. Регистр БАД – Единый Электронный Справочник Биологически Активных Добавок [Электронный ресурс]. 2017. – Режим доступа: <http://www.registrbad.ru/bad/bad.php>.
116. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию [Электронный ресурс]. - М., 2014. - Режим доступа: <http://fp.crc.ru/gosregfr/>. - Загл. с экрана.
117. Род 356. Ива — *Salix L.* // Флора СССР. В 30 т. / гл. ред. и ред. тома В. Л. Комаров. — М; Л.: Изд-во АН СССР, 1936. — Т. 5. — С. 184—186.
118. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» // Фармация.- 2008.- №4.- С.3-10.
119. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии: учебн. пособие / под ред. И.А. Самылиной, А.А. Сорокиной-М.: МИА, 2007. -672 с.
120. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С.695-709.
121. Самылина, И.А. Исследования по разработке фармакопейного метода определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / И.А. Самылина, Н.П. Антонова, И.П. Рудакова // Фармация.- 2009. - №6.- С.3-6.
122. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас : учеб. пособие: в 3т. / И.А. Самылина, О.Г. Аносова.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.1,2,3.
123. Санникова, Е.Г. Изучение аминокислотного состава и некоторых числовых показателей побегов ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*) / Е.Г.Санникова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевт. продукции», - Пятигорск,– 2015. – Вып. 70. – С.186-189.
124. Санникова, Е.Г. Изучение влияния СВЧ-излучения на стабильность легкоокисляемых БАВ побегов ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*) / Е.Г.Санникова, Д.Д. Шабардина // Беликовские чтения: материалы 4 Всерос. науч.-практич. конф.- Пятигорск, 2015. – С.137-138.
125. Санникова, Е.Г. Количественное определения суммы свободных аминокислот в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*) / Е.Г. Санникова, З.З. Агузарова // Беликовские чтения: материалы 5 Всерос. науч.-практич. конф.- Пятигорск, 2017. – С.230-232.
126. Санникова, Е.Г. Определение рутина в листьях ивы трехтычинковой методом планарной хроматографии / Е.Г. Санникова, Т.Д. Мезенова // Фармация и фармакология. – 2016. – №1(14). – С. 85-90.
127. Санникова, Е.Г. Определение хлорофилла в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra L.*) флоры Северного Кавказа / Е.Г.Санникова // Современная

- фармация: проблемы и перспективы развития: материалы 5 Межрегион. науч.-практич. конф.- Владикавказ, 2015. – С.127-130.
128. Санникова, Е.Г. Разработка и валидация методики количественного определения рутина в побегах и листьях ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) с использованием капиллярного электрофореза / Е.Г.Санникова, С.П. Сенченко, О.О. Фролова // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине. Сб. науч. трудов междунар. конф. 23-25 июня 2016 г. –М.; 2016. -С.416 – 419.
 129. Сенченко, С.П. Изучение электрофоретического поведения флавоноидов с целью разработки методологических подходов к их анализу в условиях капиллярного зонного электрофореза [Электронный ресурс] / С.П. Сенченко, Е.В Компанцева // Современные проблемы науки и образования. 2015. - №4. - Режим доступа: www.science-education.ru/127-20806.
 130. Сенченко, С.П. Прогноз электрофоретического поведения фенольных соединений в условиях капиллярного зонного электрофореза / С.П. Сенченко // Вопросы биологич., мед. и фармац. химии. -2015. -№ 7 – С. 3-9.
 131. Сергунова, Е.В. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях / Е.В.Сергунова, А.И.Марахова, А.С.Аврач // Фармация. – 2013. - №4. - С.11.
 132. Ситовой анализ. ОФС 42-0136-09 //Государственная Фармакопея Российской Федерации 12 изд. (1 ч.).-М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008.- 696с.
 133. Скворцов, А К. Ивы СССР. Систематический и географический обзор / А К. Скворцов – М: Наука, 1968.-259 с.
 134. Смирнова, Ю.А. Новые виды лекарственных растений для отечественной фармакопеи / Ю.А. Смирнова, Т. Л. Киселева // Фармация. - 2009. - №7.-С.6-7.
 135. Содержание дубильных веществ в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе / Е.Г. Санникова [и др.]// Вопросы биологич., мед. и фармац. химии. – 2014. – № 12. – С. 65-66.
 136. Сравнительная актопротекторная активность фенилпропаноидов и растительных препаратов / В.А.Куркин [и др.] // Фармация. – 2005.- № 5- С.32-34.
 137. Сравнительное исследование Melissa лекарственной и шалфея лекарственного на содержание полифенолов / Е. И. Рябина [и др.] // Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.- 2009.- № 2.- С.49-53.
 138. Статистическая обработка результатов химического эксперимента (ОФС.1.1.0013.15) // Государственная фармакопея Российской Федерации в 3-х т.: т. 1.– 13-е изд.- М., 2015.- [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#234.
 139. Статистическая обработка результатов химического эксперимента [фармакоп. ст.] //Государственная Фармакопея Российской Федерации 12 изд. (1 ч.).-М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008.- 696с.

140. Степень сыпучести порошков (ОФС 42-0137-09).// Государственная Фармакопея Российской Федерации 12 изд. (1 ч.).-М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008.- 696с.
141. Струсовская, О. Г. Определение пигментного состава *Cochlearia officinalis*, произрастающей на островах Соловецкого архипелага / О. Г. Струсовская // Фармация и общественное здоровье: материалы V Междунар. науч.-практич. конф. – Екатеринбург, 2012. – С. 184–187.
142. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. ОСТ 91500.05.001-00. –М.,2000. -80с.
143. Субоч, Г.Н. Содержание дубильных веществ у видов *Salix L.* (Новосибирская область) / Г.Н. Субоч // Раст.. ресурсы. -1988. - Т.24.- вып.4. - С.610-614.
144. Травник: золотые рецепты народной медицины / сост. А. Маркова. - М.:Эксмо, 2007.- С.671-673.
145. Фармакологическое действие коры и побегов ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой [Электронный ресурс] / Т.М. Дементьева, Е.О. Сергеева, Л.А. Саджая, О.О. Фролова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №5. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/128-21893>.
146. Фармакотехнологические исследования порошка ивы трехтычинковой побегов / Е.Г. Санникова [и др.] //Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5;-Режим доступа: <http://www.science-education.ru/128-22354>
147. Фаррахов, Р.Ю. Комплексное использование водоохранно-защитных лесных насаждений (на примере видов рода *Salix L.*): автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.16. / Фаррахов Рафаил Юсупович.- Тольятти, 2004. - 19 с.
148. Федеральный реестр БАД 2002 г.[Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://www.ros-med.info/bad/> - Загл. с экрана.
149. Фенилпропаноиды как потенциальные иммуномодуляторы / В.А. Куркин [и др.] // Человек и лекарство: тез. докл. 9 Рос. нац. конгр. 8-12 апр. 2002 г.- М, 2002.- С.646.
150. Флавоноиды коры и побегов ивы вавилонской и ее гибрида с ивой белой [Электронный ресурс] / Т.М. Дементьева [и др.] / Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2.;-Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22217>.
151. Флавоноиды эфирных фракций листьев видов *Salix L.* / В.Л. Шелюто [и др.] // Раст.ресурсы.-1987.- Вып.4.- С.590-597.
152. Фролова, О.О. Биологически активные вещества растений рода ива (*Salix L.*) / О.О. Фролова, Е.В.Компанцева, Т.М. Дементьева // Фармация и фармакология. – 2016. - №2. – С. 41-49.
153. Характеристика антирадикальной активности и состава экстрактов из растительного сырья / М.Н. Макарова [и др.]. // Актуальные проблемы создания новых ЛС природного происхождения: материалы 8 междунар. съезда «Фитофарм-2004» 21-23 июня 2004 г., Миккели, Финляндия.- СПб., 2004.- С.464-471.

154. Хемотоксономическое изучение рода Ивы / В.А. Компанцев, С.Ф. Джумырко, А.Л. Белоусова, Т.П. Блинова // Материалы регион. конф. по фармации и фармакологии. – Пятигорск, 1994. – С.27-28.
155. Химический анализ лекарственных растений / под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Софронич. - М.: Высш. шк., 1983.-С.47,88,102,118,136.
156. Химическое изучение побегов ивы пурпурной (*Salix purpurea* L.) и определение противовоспалительной активности их водного извлечения [Электронный ресурс] / О.О. Фролова, О.А. Шевченко, Е.В. Компанцева, Т.А. Лысенко // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - №6. - Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8066>.
157. Хитева, О.О. Изучение некоторых видов ивы, произрастающих на Северном Кавказе: автореф. дис.... канд. фармацевт. наук: 14.00.02 / Хитева Ольга Олеговна. - Пятигорск, 2012.- 24 с.
158. Хлонов, Ю.П. Атлас деревьев и кустарников Сибири (ивы, тополя, чозения) = Atlas of trees and shrubs of Siberia (*salix*, *populus*, *chosenia*) / Ю.П. Хлонов ; отв. ред. Коропачинский И.Ю. - Новосибирск : [б. и.], 2000. - 92 с.
159. Чакчир, О.Б. Исследование влияния ионизирующего излучения на БАВ лекарственного сырья: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 14.04.02. / Чакчир Олег Борисович - М., 2013. – 24с.
160. Чакчир, О.Б. Исследование влияния фотонного излучения на антиаритмическую активность плодов боярышника и настоя из них/ О.Б. Чакчир, Е.И. Саканян, Б.А. Чакчир // Фармация из века в век. Ч. 3. Анализ и стандартизация лекарственных средств. -СПб., 2008. -С. 179 – 182.
161. Швец, П. Кислота ацетилсалициловая — лекарство, проверенное поколениями (к столетию ацетилсалициловой кислоты) / П. Швец, М. Халабала // Словакофарма ревю.- Киев, 2002.— С.66–68.
162. Экстракт ивы сухой ТУ 9199-006-33150849-2004. - Введ. 2004.- СПб: ОКК ХАРМС, 2004.- 7 с.
163. Юрьев, К.Л. Новый противовоспалительный фитопрепарат Ассаликс: «назад в будущее» / К.Л. Юрьев // Украин. медич. часопис. - 2005.- №4(48). – С.113-131.
164. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds / M. Kahkonen [et al.] // J. Agr. and Food Chem.- 1999.- Vol. 10. - P. 3954-3962.
165. Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of *Salix* / P.Kenstavičienė [et al.]. // Medicina (Kaunas). - 2009. – Vol.45 (8). – P.644-651.
166. Arvola, L. Spectrophotometric determination of chlorophyll-a and phaeopigments in ethanol extractions / L. Arvola // Ann Bot Fennici. - 1981. –N18. -P.221-227.
167. Aspirin from Willow Bark //Forest. Chron.. 2000. -Vol.76, -N 4. -P. 553
168. Borova, E.B. Elemental composition of *Salix caprea* L. / E.B. Borova, N.V. Borodina // Topical issues of new drugs development: abst. of Intern. Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 23, 2015). - Kharkov, 2015. - P.62.

169. Buffer solutions [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://ochemonline.com/Buffer_solutions.
170. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix* / L.Pobłocka-Olech [et al.] // *J. Sep. Sci.*- 2007. –N 30. –P.2958 – 2966.
171. Complementary and alternative therapies resource [Электронный ресурс]. - Somerville (USA), 2011. – Режим доступа: www.naturalstandard.com.
172. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species/ R. Minocha [et al.] // *Can. J. For. Res.* -2009. –N 39. -P. 849–861.
173. Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials / C. Biegert [et al.] // *J.Rheumatol.*- 2004.- Vol.11.- P.2121-2130.
174. Evidence of effectiveness of herbal anti-inflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain / S.Chrubasik [et al.] // *Phytother. Res.*- 2007.- Vol. 21.- P 675-683.
175. Gelbe Liste Pharmindex [Электронный ресурс]. - Электрон. дан. –Munchen, 2014. - Режим доступа: <http://www.gelbe-liste.de/medikamente> 175.
176. Gotti, R. Capillari electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants / R.Gotti // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2011. – N 55. – P. 775- 801.
177. Inhibitorische Effekte von Weidenrinden extrakten auf proinflammatorische Prozesse in LP Saktivierten Humanmonozyten / O. Kelber [et al.] // *Z. Rheumatol.*- 2006. - Vol.1 - P.31.
178. Keusgen, M. Weidenrindenextrakt. Vielstoffgemisch gegen Entzündungen und Schmerzen [Электронный ресурс]: Pharmazeutischezeitung / M. Keusgen, C. Allgäuer-Lechner. – Eschborn, 2012. – Режим доступа: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2666&type=4>.
179. Levesque, H. Aspirin throughout the ages: a historical review / H.Levesque, O. Lafont // *Rev Med Interne.*- 2000.-Vol.21, N 1.-P.8-17.
180. Lorenzen, C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations / C. J. Lorenzen// *Limnology and Oceanography.*- 1967. - N 12(2), - P.343-346.
181. Marz, R.W. Weidenrindenextrakt- Wirkungen und Wirksamkeit. Erkenntnisstand zu Pharmakologie, Toxikologie und Klinik/ R.W. Marz, F. Kemper // *Wien. med. Wochenschr.*.-2002. –Vol.152, N 15-16. - P. 354-359.
182. Milde, J. Kooperative Wirkung pflanzlicher Antioxidantien in pathologisch-relevanten Arteriosklerose- und Arthritismodellen / J. Milde // *Dipl.-Ing. agr. (Univ.)* - München, 2004.- 115 p.
183. Newsholme, C. Willows the genus *Salix* / C. Newsholme. - Portland : Timber, 1992. - 224 p.
184. Pohjonen, V. Selection of species and clones for biomass willow forestry in Finland = Biomassan viljelyyn sopovien pajulajien ja-kloonien valinta Suomessa / V. Pohjonen. - Helsinki : [s. n.], 1991. - 58 p.

185. Potential economic impact using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study/ S. Chrubasik [et al.] // *Phytomedicine*.-2001.- Vol.4.- P.241-251.
186. *Salicis cortex* (Willow bark): ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytomedicine). Monographs on the medicinal use of plant drugs.- 2. ed. .- Stuttgart, 2003.- P. 445-451.
187. Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain / S. Chrubasik [et al.] // *Rheumatology*.-2001. – Vol.40.- P.1388-1393.
188. Vane, J. R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs / J.R. Vane // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2000.-Vol. 4, Pt. 1.- P.573-586.
189. Vanhaelen, M. Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography-densitometry / M.Vanhaelen, F.Vanhaelen // *J. Chromatogr.* - 1983. – N 281. – P.263-271.
190. VIDAL [Электронный ресурс].- France, 2014. - Режим доступа: <http://www.vidal.fr/Medicament/>.
191. *Weidenrinde* [monograph]: *Deutsches Arzneibuch*.- 10 ed.- Stuttgart, 1991.- 1650 p.
192. *Willow bark* [monograph]: *British Pharmacopoeia*.- London, 2009.- Vol. III. *Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations* - 3p.
193. *Willow bark* [monograph]: *European Pharmacopoeia*.- 5 ed.- Strasbourg, 2005. - P.2702.
194. *Willow bark Salix spp.* Analytical, quality control and therapeutic monograph // *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium*. - Santa Cruz, 1999.- 16 p.
195. Zaugg, S.E. Capillary electrophoretic lysis of salicin in *Salix* spp. / S.E. Zaugg, D.Cefalo, E.B. Walke // *J. of Chromatogr. A* . -1997.- N 1-2. –P.487-490.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Валидационная оценка методик анализа

1.1 Материалы проведения валидационной оценки методики определения флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии

Специфичность методики подтверждалась ее способностью четко определять максимум поглощения извлечения из сырья в присутствии сопутствующих компонентов, и его совпадением с максимумом поглощения раствора СО рутина (412 ± 2 нм).

Линейная зависимость. В соответствии с методикой, приведенной в п. 2.3.2.4, был построен градуировочный график зависимости оптической плотности извлечений из сырья от концентрации суммы флавоноидов в данном извлечении. Для данной выборки значение коэффициента корреляции составило 0,994, уравнение имеет вид: $y = 374x + 0,0019$. Полученное уравнение позволяет сделать вывод о наличии линейной зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов в области концентраций от 0,0005 г/мл до 0,0026 г/мл.

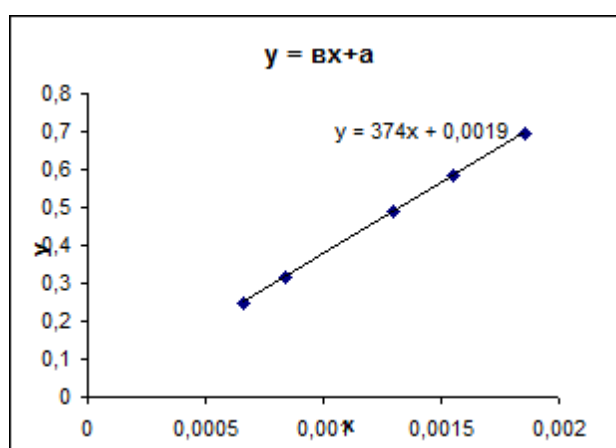


Рисунок 1.1 - Градуировочный график зависимости оптической плотности извлечения от концентрации флавоноидов

Результаты определения **прецизионности** методики приведены в таблице 1.1

Таблица 1.1 – Результаты определения прецизионности методики определения суммы флавоноидов в побегах ивы трехтычинковой

Навеска для анализа, г	Оптическая плотность	Найдено, %	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$
1,001	0,3022	2,007	-0,009	0,00008
1,001	0,2849	1,892	-0,024	0,00056
1,001	0,3176	2,109	0,093	0,00865
1,002	0,3078	2,042	0,026	0,00068
1,002	0,2973	1,972	0,044	0,00194
1,002	0,3130	2,076	0,060	0,00360
Сумма		$\bar{X} = 2,016$		0,015510

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} = 0,05102,$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100\% = 2,48\%.$$

Правильность методики рассматривали как результат изучения линейности валидируемой методики: если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки.

Согласно статистической обработке полученного уравнения коэффициент «b» имеет доверительный интервал 374 ± 10 , а свободный член «a» значимо не отличается от нуля, т.к. его доверительный интервал намного больше этого значения и равен $0,014 (0,002 \pm 0,014)$. В виду того, что свободный член «a» = 0, уравнение принимает вид $y = (375 \pm 3)x$ и данная методика является правильной.

1.2 Материалы проведения валидационной оценки методики определения рутина методом планарной хроматографии

Специфичность методики определяли по величине R_f пятна контрольного трека, которое должно соответствовать R_f пятна стандартного образца ($0,63 \pm 0,02$). На треках контрольного образца визуально обнаруживалось пятно жёлтого цвета с $R_f = 0,63$, что соответствует окраске и R_f стандартных образцов (рисунок 1.2). Это может свидетельствовать о специфичности методики. Эффективность пластинки около 2000 теоретических тарелок (N).

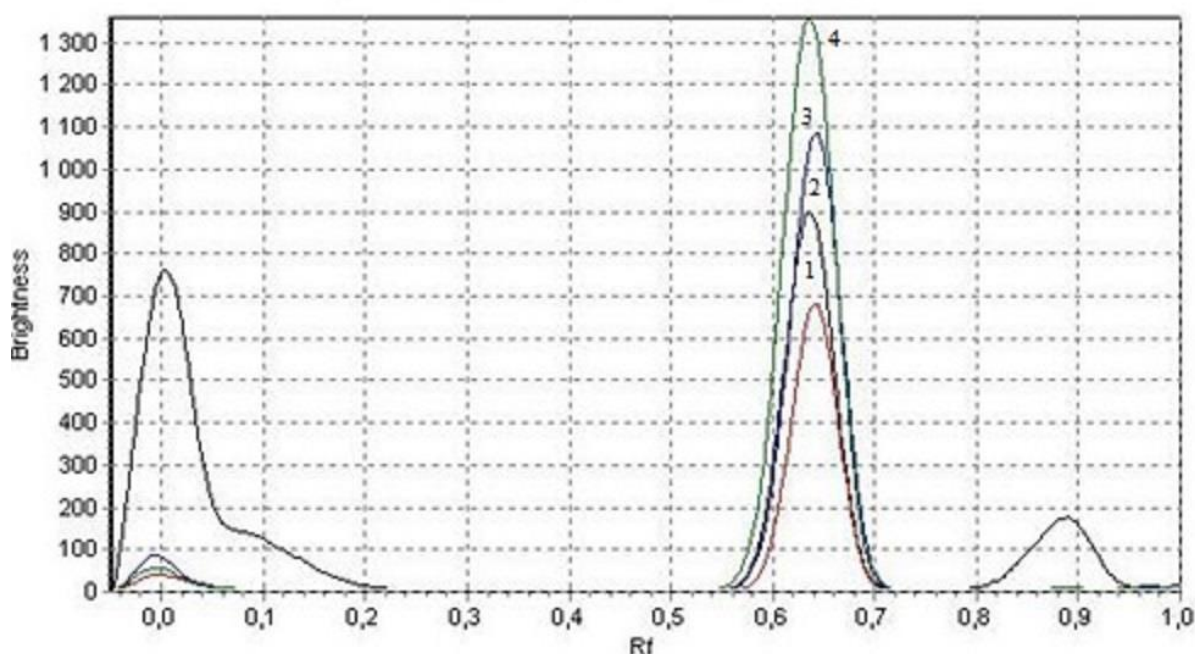


Рисунок 1.2 – Оцифрованная хроматограмма спиртового извлечения (2) и СО рутина (1-3 мкг/мкл; 3-4 мкг/мкл; 4-5 мкг/мкл)

Чувствительность. Предел обнаружения рассчитывали по формуле:

$$ПО = 3,3 \cdot S/b,$$

где: S – стандартное отклонение сигнала;

b – угловой коэффициент градуировочного графика.

Значение ПО оказалось равным 0,22 мкг.

Предел количественного определения рассчитывали по формуле:

$$ПКО = 10 \cdot S/b$$

Значение ПКО оказалось равным 0,68 мкг.

Линейность методики определяли экспериментально измерением аналитических сигналов для 5-ти проб с разными концентрациями СО рутина.

Уравнение регрессии и коэффициент корреляции были рассчитаны в электронных таблицах Microsoft Excel. Методом наименьших квадратов определяли значимость свободного члена линейной зависимости (а) и углового коэффициента (b). Уравнение регрессии имеет вид: $y = 4,75 \cdot 10^3 x$ (рисунок 1.3).

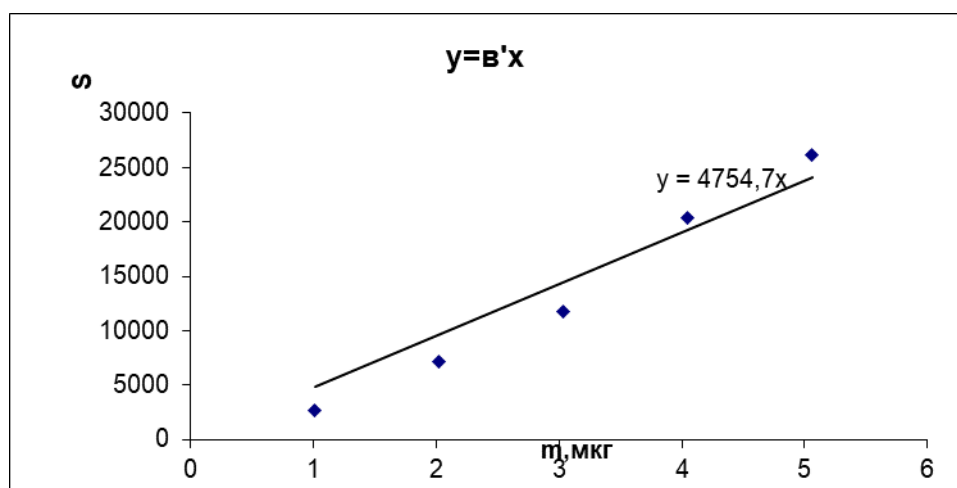


Рисунок 1.3 – Градуировочный график СО рутина

Установлено, что зависимость площадей пиков от содержания рутина в аналитической области методики (от 1 до 5 мкг в вводимой пробе) является линейной (свободный член «а» значимо не отличается от нуля), коэффициент корреляции составил 0,993.

Также установлена линейная зависимость между различными объемами спиртового извлечения из листьев ивы и аналитическим сигналом (рисунок 1.4). Коэффициент корреляции составил 0,997.

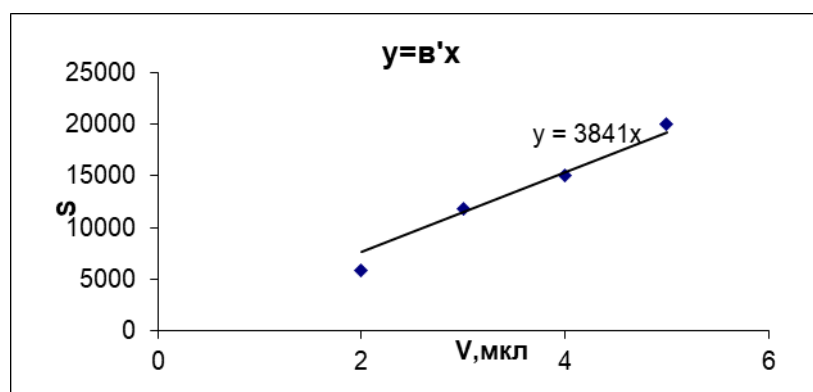


Рисунок 1.4 – График зависимости количества аналита и аналитического сигнала

Правильность методики определяли методом «введено-найдено». По уравнению градуировочного графика рассчитывали содержание рутина на 5-ти уровнях концентраций СО и определяли метрологические характеристики (таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Оценка правильности методики определения рутина

Уровень	Взято, мкг	Найдено, мкг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	1,0	0,980	98,0	$\bar{X} = 99,31\%$ $SD = 2,74$ $RSD = 2,76$ $t_{\text{табл}} = 2,26$ $t_{\text{выч}} = 0,81$
1	1,0	0,952	96,2	
2	2,0	1,948	97,4	
2	2,0	2,058	102,9	
3	3,0	2,895	96,5	
3	3,0	3,033	101,1	
4	4,0	4,104	102,6	
4	4,0	4,072	101,8	
5	5,0	5,010	100,2	
5	5,0	4,770	96,4	

Используя данные таблицы 1.2, можно сделать заключение, что определение рутина на модели «введено-найдено» в побегах ивы трехтычинковой методом планарной хроматографии не отягощено систематической ошибкой, так как вычисленное значение критерия Стьюдента не превышает табличного значения.

1.3 Материалы проведения валидационной оценки методики определения рутина методом капиллярного зонного электрофореза

Специфичность методики подтверждалась ее способностью четко определять рутин в присутствии сопутствующих компонентов сырья, а также соответствием времен его миграции на электрофореграмме извлечения и раствора СО (рисунки 3.15 и 3.16 см. диссертацию). Для дополнительного подтверждения специфичности методики использовали добавку раствора СО к извлечению из сырья. При этом наблюдалось увеличение площади пика рутина при сохранении его однородности, что свидетельствует о специфичности методики.

Линейность методики оценивали путем измерения аналитического сигнала для пяти проб извлечения с различным содержанием рутина. Подготовку анализируемых растворов готовили путем различных разведений раствора А, полученного согласно п. 2.3.2.2. Для этого 100, 200, 400, 600 и 800 мкл раствора А доводили до точного объема 1000 мкл (рисунок 1.5). Содержание рутина определяли в конкретной аликвоте в %.

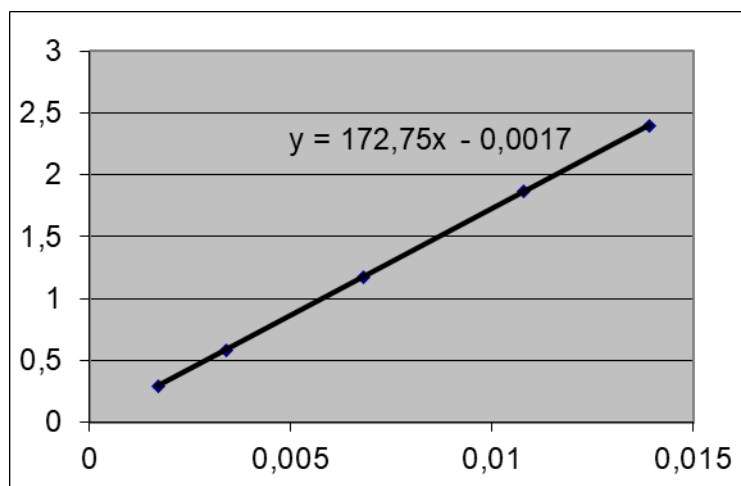


Рисунок 1.5 – График линейной зависимости площади пика рутина от его концентрации (% в пробе)

Наличие линейной зависимости площади пика рутина от его концентрации в извлечении оценивали путем обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов с применением линейной модели, а также расчетом

коэффициента корреляции и свободного члена уравнения регрессии в соответствии с требованиями ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [138].

В результате представленная зависимость описывалась уравнением $y=172,75x-0,0017$, с коэффициентом корреляции равным 0,9999, что согласно ОФС «Валидация аналитических методик» [19] свидетельствует о линейности методики.

Установление **прецизионности** проводили на уровне сходимости (таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Результаты определения прецизионности методики количественного определения рутина в побегах ивы трехтычинковой

Навеска, г	Площадь пика	Найдено, %	SD	RSD
0,9862	1,173	1,7800	0,0406	2,21
0,9820	1,184	1,8043		
0,9883	1,196	1,8110		
0,9882	1,230	1,8627		
0,9975	1,263	1,8948		
0,9982	1,246	1,8680		
		$\bar{X}=1,8368$		

Величину RSD на уровне 2,21% можно считать вполне приемлемой при анализе извлечений растительного сырья.

Оценку **правильности методики** проводили в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» [19] путем рассмотрения результата изучения линейности валидируемой методики: если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки. Согласно статистической обработке полученного уравнения коэффициент «b» имеет доверительный интервал $172,75 \pm 1,39$, а свободный член «a» значимо не отличается от нуля, т.к. его доверительный интервал намного больше этого значения и равен $0,0098 (0,0017 \pm 0,0098)$. Ввиду того, что свободный член «a»=0,

уравнение принимает вид $y=172,58x$ и предлагаемая методика неотягощена систематической погрешностью [19, 29].

Исходные материалы методик анализа

Таблица 2.1 – Определение суммы флавоноидов в побегах ивы трехтычинковой методом дифференциальной спектрофотометрии ($A_0=0,379$; $a_0= 0,0500$ г)

Место сбора	Навеска, г	W, %	Объем аликвоты, мл	A_i	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	2	3	4	5	6	7
Подкумок (побеги) сентябрь 2013	1,0050	5,16	5	0,788	2,181	$\bar{X} = 2,143\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0344$ $\Delta\bar{X} = 0,0854$ $\varepsilon = \pm 3,98\%$
	1,0052			0,764	2,114	
	1,0044			0,771	2,134	
Подкумок (побеги) май 2014	1,0002	4,97	5	0,622	1,727	$\bar{X} = 1,725\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0208$ $\Delta\bar{X} = 0,0895$ $\varepsilon = \pm 5,19\%$
	0,9999			0,634	1,760	
	0,9999			0,608	1,688	
Подкумок (побеги) июль 2014	0,9951	5,19	5	0,970	2,713	$\bar{X} = 2,750\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0304$ $\Delta\bar{X} = 0,0754$ $\varepsilon = \pm 2,75\%$
	1,0012			0,991	2,772	
	0,9960			0,980	2,755	
Подкумок (побеги) сентябрь 2014	0,9897	5,52	5	0,986	2,784	$\bar{X} = 2,801\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0077$ $\Delta\bar{X} = 0,033$ $\varepsilon = \pm 1,18\%$
	0,9992			1,005	2,810	
	1,0044			1,007	2,801	
Малка (побеги) июнь 2014	1,0008	4,89	5	0,691	1,915	$\bar{X} = 1,902\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0234$ $\Delta\bar{X} = 0,1006$ $\varepsilon = \pm 5,29\%$
	1,0009			0,670	1,857	
	1,0006			0,698	1,935	
Кубань (побеги) август 2014	1,0026	5,32	5	1,175	3,266	$\bar{X} = 3,238\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0144$ $\Delta\bar{X} = 0,062$ $\varepsilon = \pm 1,95\%$
	0,9979			1,162	3,230	
	0,9982			1,158	3,218	

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6	7
Подкумок (побеги) май 2015	1,0050	6,94	2	0,301	2,121	$\bar{X} = 2,128\%$ $S_{\bar{x}} = 0,023$ $\Delta\bar{X} = 0,109$ $\varepsilon = \pm 5,14\%$
	1,0177			0,310	2,163	
	0,9941			0,292	2,080	
Подкумок (побеги) июнь 2015	0,987	7,44	2	0,324	2,330	$\bar{X} = 2,334\%$ $S_{\bar{x}} = 0,026$ $\Delta\bar{X} = 0,112$ $\varepsilon = \pm 4,79\%$
	0,9981			0,384	2,384	
	1,0017			0,321	2,291	
Подкумок (побеги) июль 2015	0,9820	7,54	2	0,320	2,321	$\bar{X} = 2,354\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0242$ $\Delta\bar{X} = 0,104$ $\varepsilon = \pm 4,43\%$
	0,9943			0,326	2,339	
	1,0202			0,343	2,401	
Подкумок (побеги) август 2015	1,0100	8,29	2	0,325	2,311	$\bar{X} = 2,298\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0097$ $\Delta\bar{X} = 0,0462$ $\varepsilon = \pm 2,01\%$
	1,0287			0,308	2,279	
	0,9725			0,312	2,305	
Подкумок (побеги) сентябрь 2015	1,0010	11,02	2	0,177	2,623	$\bar{X} = 2,620\%$ $S_{\bar{x}} = 0,011$ $\Delta\bar{X} = 0,046$ $\varepsilon = \pm 1,81\%$
	0,9921			0,176	2,630	
	0,9803			0,177	2,621	
Подкумок (побеги без листьев) май 2014	0,9852	4,79	5	0,036	0,101	$\bar{X} = 0,106\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0032$ $\Delta\bar{X} = 0,0152$ $\varepsilon = \pm 14,35\%$
	1,2667			0,048	0,105	
	0,9900			0,040	0,112	
Подкумок (побеги без листьев) июль 2014	0,9984	4,97	5	0,063	0,175	$\bar{X} = 0,200\%$ $S_{\bar{x}} = 0,00393$ $\Delta\bar{X} = 0,0078$ $\varepsilon = \pm 3,85\%$
	0,9997			0,081	0,225	
	0,9997			0,072	0,200	
Подкумок (побеги без листьев) сентябрь 2014	1,0000	5,01	5	0,124	0,344	$\bar{X} = 0,332\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0065$ $\Delta\bar{X} = 0,008$ $\varepsilon = \pm 9,28\%$
	1,0867			0,109	0,329	
	1,0004			0,116	0,322	

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6	7
Малка (побеги без листьев) июнь 2014	0,9923	4,80	5	0,174	0,486	$\bar{X} = 0,494\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0045$ $\Delta\bar{X} = 0,0102$ $\varepsilon = \pm 2,07\%$
	0,9915			0,189	0,528	
	1,2749			0,218	0,469	
Кубань (побеги без листьев) август 2014	0,9917	4,65	5	0,087	0,243	$\bar{X} = 0,250\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0064$ $\Delta\bar{X} = 0,0275$ $\varepsilon = \pm 7,65\%$
	0,9916			0,092	0,257	
	0,9861			0,089	0,250	
Подкумок (листья) сентябрь 2013	1,0341	5,01	2	0,465	3,169	$\bar{X} = 3,188\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0099$ $\Delta\bar{X} = 0,0469$ $\varepsilon = \pm 1,47\%$
	1,0322			0,476	3,201	
	0,9941			0,457	3,195	
Подкумок (листья) май 2014	1,018	4,98	2	0,441	3,041	$\bar{X} = 3,071\%$ $S_{\bar{x}} = 0,048$ $\Delta\bar{X} = 0,227$ $\varepsilon = \pm 6,74\%$
	1,0020			0,433	3,002	
	1,0421			0,474	3,159	
Подкумок (листья) июль 2014	0,961	5,017	2	0,411	2,970	$\bar{X} = 2,967\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0264$ $\Delta\bar{X} = 0,125$ $\varepsilon = \pm 4,21\%$
	1,0082			0,437	3,011	
	1,0143			0,426	2,920	
Подкумок (листья) сентябрь 2014	1,0100	5,41	2	0,458	3,17	$\bar{X} = 3,231\%$ $S_{\bar{x}} = 0,046$ $\Delta\bar{X} = 0,200$ $\varepsilon = \pm 6,10\%$
	1,0074			0,480	3,22	
	1,0252			0,470	3,20	
Кубань (листья) август 2014	1,0050	5,23	2	0,504	3,762	$\bar{X} = 3,676\%$ $S_{\bar{x}} = 0,049$ $\Delta\bar{X} = 0,21$ $\varepsilon = \pm 5,7\%$
	1,0123			0,522	3,590	
	0,9841			0,518	3,671	
Малка (листья) июнь 2014	0,9980	4,804	2	0,479	3,350	$\bar{X} = 3,341\%$ $S_{\bar{x}} = 0,04$ $\Delta\bar{X} = 0,176$ $\varepsilon = \pm 5,28\%$
	0,9815			0,451	3,182	
	1,0043			0,496	3,420	

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6	7
Подкумок (листья) май 2015	0,9940	7,73	2	0,416	2,980	$\bar{X} = 3,050\%$ $S_{\bar{x}} = 0,04$ $\Delta\bar{X} = 0,190$ $\varepsilon = \pm 6,23\%$
	0,9872			0,422	3,050	
	1,0031			0,438	3,123	
Подкумок (листья) июнь 2015	0,9970	6,39	2	0,370	2,611	$\bar{X} = 2,660\%$ $S_{\bar{x}} = 0,0242$ $\Delta\bar{X} = 0,125$ $\varepsilon = \pm 4,71\%$
	1,0145			0,382	2,650	
	1,0032			0,386	2,711	
Подкумок (листья) июль 2015	0,9950	7,35	2	0,435	3,093	$\bar{X} = 3,100\%$ $S_{\bar{x}} = 0,032$ $\Delta\bar{X} = 0,138$ $\varepsilon = \pm 4,46\%$
	0,9892			0,439	3,160	
	1,0027			0,428	3,051	
Подкумок (листья) август 2015	1,0030	6,09	2	0,387	2,751	$\bar{X} = 2,791\%$ $S_{\bar{x}} = 0,029$ $\Delta\bar{X} = 0,124$ $\varepsilon = \pm 4,43\%$
	1,0165			0,411	2,850	
	1,0081			0,401	2,800	
Подкумок (листья) сентябрь 2015	1,1317	9,54	1	0,273	3,518	$\bar{X} = 3,498\%$ $S_{\bar{x}} = 0,011$ $\Delta\bar{X} = 0,052$ $\varepsilon = \pm 1,49\%$
	1,0022			0,239	3,481	
	1,0151			0,243	3,495	

Таблица 2.2 – Результаты определения рутина методом капиллярного зонного электрофореза ($a_0 = 0,0108$ г, $S_0 = 0,930$)

Месяц сбора	W, %	Навеска, г	Площадь пика		Найдено, %		Найдено, % ($\bar{X}$)
			S_1	S_2	X_1	X_2	
1	2	3	4	5	6	7	8
Листья							
Май	7,73	0,9940	1,745	1,848	2,762	2,925	2,844
Июнь	6,39	0,9971	1,884	2,044	2,930	3,179	3,054
Июль	7,35	0,9952	1,882	1,791	2,963	2,819	2,891
Август	6,09	1,0031	2,127	2,219	3,278	3,419	3,348
Сентябрь	11,02	1,1320	1,802	1,953	2,597	2,815	2,706

1	2	3	4	5	6	7	8
Побеги без листьев							
Май	7,23	0,9910	0,065	0,072	0,102	0,114	0,108
Июнь	6,71	0,9542	0,069	0,082	0,113	0,133	0,123
Июль	7,87	1,0071	0,060	0,087	0,094	0,136	0,115
Август	8,22	1,0312	0,084	0,104	0,129	0,159	0,144
Сентябрь	8,01	0,9950	0,048	0,074	0,076	0,118	0,097
Побеги							
Май	6,94	1,0052	1,136	1,286	1,763	1,995	1,879
Июнь	7,44	0,9870	1,457	1,352	2,315	2,148	2,232
Июль	7,54	0,9820	1,293	1,346	2,067	2,152	2,110
Август	8,29	1,0113	1,431	1,722	2,239	2,695	2,467
Сентябрь	9,54	1,0011	1,141	0,959	1,829	1,537	1,683

Таблица 2.3 – Накопление дубильных (окисляемых) веществ в % в сырье ивы трехтычинковой *S. triandra* L. (перманганатометрия) в пересчете на танин

Место сбора	Навеска, г	W, %	V, мл	V _к , мл (среднее содержание)	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	2	3	4	5	6	7
Подкумок (побеги) сентябрь 2013 г	2,0010	5,16	5,35	1,17	4,58	$\bar{X} = 4,59\%$ $S_{\bar{x}} = 0,019$ $\Delta\bar{X} = 0,050$ $\varepsilon = \pm 1,09\%$
			5,30		4,52	
			5,45		4,67	
Подкумок (побеги) май 2014 г	2,0021	4,97	6,10	1,48	5,00	$\bar{X} = 4,99\%$ $S_{\bar{x}} = 0,149$ $\Delta\bar{X} = 0,156$ $\varepsilon = \pm 3,13\%$
			6,30		5,22	
			6,05		4,75	
Подкумок (побеги) июль 2014 г	2,0023	5,19	5,55	1,48	4,40	$\bar{X} = 4,44\%$ $S_{\bar{x}} = 0,141$ $\Delta\bar{X} = 0,148$ $\varepsilon = \pm 3,33\%$
			5,80		4,68	
			5,35		4,24	
Подкумок (побеги) сентябрь 2014 г	2,0080	5,52	5,20	1,6	3,94	$\bar{X} = 3,72\%$ $S_{\bar{x}} = 0,051$ $\Delta\bar{X} = 0,131$ $\varepsilon = \pm 3,51\%$
			4,85		3,56	
			4,95		3,66	

Продолжение таблицы 2.3

1	2	3	4	5	6	7
Подкумок (побеги) май 2015 г	2,0351	6,94	3,67	1,25	2,57	$\bar{X} = 2,74\%$ $S_{\bar{x}} = 0,044$ $\Delta\bar{X} = 0,113$ $\varepsilon = \pm 4,12\%$
			3,75		2,74	
			3,90		2,91	
Подкумок (побеги) июнь 2015 г	2,0660	7,44	4,05	1,25	3,04	$\bar{X} = 3,04\%$ $S_{\bar{x}} = 0,028$ $\Delta\bar{X} = 0,073$ $\varepsilon = \pm 2,4\%$
			4,15		3,15	
			3,95		2,93	
Подкумок (побеги) июль 2015 г	1,9901	7,31	4,70	1,25	3,89	$\bar{X} = 3,90\%$ $S_{\bar{x}} = 0,039$ $\Delta\bar{X} = 0,010$ $\varepsilon = \pm 2,56\%$
			4,85		4,06	
			4,6		3,76	
Подкумок (побеги) август 2015 г	2,0810	8,29	5,05	1,25	4,13	$\bar{X} = 4,14\%$ $S_{\bar{x}} = 0,012$ $\Delta\bar{X} = 0,030$ $\varepsilon = \pm 0,73\%$
			5,10		4,19	
			5,00		4,10	
Подкумок (побеги) сентябрь 2015 г	2,0560	11,02	5,05	1,25	4,32	$\bar{X} = 4,34\%$ $S_{\bar{x}} = 0,031$ $\Delta\bar{X} = 0,080$ $\varepsilon = \pm 1,85\%$
			5,20		4,47	
			4,95		4,23	
Малка (побеги) июнь 2014 г	2,0020	4,89	6,20	1,48	5,15	$\bar{X} = 5,21\%$ $S_{\bar{x}} = 0,036$ $\Delta\bar{X} = 0,093$ $\varepsilon = \pm 1,78\%$
			6,40		5,37	
			6,15		5,11	
Кубань (побеги) август 2014 г	2,0024	5,32	6,40	1,48	5,39	$\bar{X} = 5,41\%$ $S_{\bar{x}} = 0,036$ $\Delta\bar{X} = 0,094$ $\varepsilon = \pm 1,73\%$
			6,30		5,28	
			6,55		5,56	
Подкумок (побеги без листьев) сентябрь 2013 г	2,0001	7,73	6,25	1,48	5,40	$\bar{X} = 5,54\%$ $S_{\bar{x}} = 0,032$ $\Delta\bar{X} = 0,082$ $\varepsilon = \pm 1,47\%$
			6,45		5,59	
			6,50		5,63	
Подкумок (побеги без листьев) май 2014 г	2,0032	4,79	4,50	1,48	3,29	$\bar{X} = 3,34\%$ $S_{\bar{x}} = 0,027$ $\Delta\bar{X} = 0,069$ $\varepsilon = \pm 2,07\%$
			4,65		3,46	
			4,48		3,27	

Продолжение таблицы 2.3

1	2	3	4	5	6	7
Подкумок (побеги без листьев) июль 2014 г	2,0030	4,97	5,30	1,48	4,17	$\bar{X} = 4,22\%$
			5,15		4,00	$S_{\bar{x}} = 0,064$
			5,60		4,49	$\Delta\bar{X} = 0,165$ $\varepsilon = \pm 3,91\%$
Подкумок (побеги без листьев) сентябрь 2014 г	2,0065	5,01	5,00	1,6	3,70	$\bar{X} = 3,51\%$
			4,75		3,43	$S_{\bar{x}} = 0,043$
			4,72		3,40	$\Delta\bar{X} = 0,110$ $\varepsilon = \pm 3,12\%$
Малка (побеги без листьев) июнь 2014 г	2,0031	5,13	5,40	1,17	4,62	$\bar{X} = 4,76\%$
			5,55		4,78	$S_{\bar{x}} = 0,034$
			5,65		4,88	$\Delta\bar{X} = 0,087$ $\varepsilon = \pm 1,83\%$
Кубань (побеги без листьев) август 2014 г	2,0041	4,65	5,00	1,48	3,76	$\bar{X} = 3,89\%$
			5,25		4,09	$S_{\bar{x}} = 0,045$
			5,00		3,82	$\Delta\bar{X} = 0,117$ $\varepsilon = \pm 3,00\%$
Подкумок (листья) сентябрь 2013 г	2,0102	5,01	4,90	1,17	4,06	$\bar{X} = 4,18\%$
			5,10		4,28	$S_{\bar{x}} = 0,029$
			5,05		4,20	$\Delta\bar{X} = 0,074$ $\varepsilon = \pm 1,77\%$
Подкумок (листья) май 2014 г	2,0010	4,97	6,10	1,48	5,05	$\bar{X} = 5,11\%$
			6,15		5,06	$S_{\bar{x}} = 0,025$
			6,25		5,22	$\Delta\bar{X} = 0,063$ $\varepsilon = \pm 1,24\%$
Подкумок (листья) июль 2014 г	2,0082	5,02	5,70	1,48	4,56	$\bar{X} = 4,66\%$
			5,90		4,81	$S_{\bar{x}} = 0,034$
			5,75		4,61	$\Delta\bar{X} = 0,088$ $\varepsilon = \pm 1,88\%$
Подкумок (листья) сентябрь 2014 г	2,0037	5,41	5,40	1,60	4,16	$\bar{X} = 4,20\%$
			5,65		4,43	$S_{\bar{x}} = 0,055$
			5,25		4,01	$\Delta\bar{X} = 0,141$ $\varepsilon = \pm 3,36\%$

Продолжение таблицы 2.3

1	2	3	4	5	6	7
Малка (листья) июнь 2014 г	2,0015	4,80	5,60	1,48	4,49	$\bar{X} = 4,55\%$
			5,55		4,44	$S_{\bar{x}} = 0,039$
			5,80		4,72	$\Delta\bar{X} = 0,099$
Кубань (листья) август 2014 г	2,0121	5,23	6,30	1,48	5,25	$\bar{X} = 5,33\%$
			6,55		5,52	$S_{\bar{x}} = 0,043$
			6,25		5,22	$\Delta\bar{X} = 0,110$
						$\varepsilon = \pm 2,18\%$
						$\varepsilon = \pm 2,06\%$

Таблица 2.4 – Результаты количественного определения пигментов в сырье ивы трехтычинковой

Объект исследования	ах, г	Объем, мл	A ₆₆₄	A ₆₄₉	A ₄₇₀	Хлф <i>a</i> , мг/л	Хлф <i>b</i> , мг/л	Каротин и ксантофилл, мг/л	Хлф <i>a</i> , %	Хлф <i>b</i> , %	Каротин и ксантофилл, %	Найдено по A _{уд} , %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Листья, сентябрь 2013, р. Подкумок	0,578	50	1,274	0,530	0,889	14,27	4,19	2,15	0,130	0,038	0,020	0,122
Листья, май 2014, р. Подкумок	1,035	100	1,073	0,628	1,224	11,08	8,52	1,76	0,113	0,087	0,018	0,116
Листья, июль 2014, р. Подкумок	0,986	100	1,546	0,710	1,610	16,97	6,93	4,29	0,181	0,074	0,046	0,175
Листья, сентябрь 2014, р. Подкумок	1,009	100	1,042	0,626	1,156	10,67	8,71	1,35	0,111	0,091	0,014	0,115
Листья, июнь 2014, р. Малка	1,092	100	1,096	0,606	1,274	11,49	7,72	2,37	0,111	0,074	0,023	0,112
Листья, август 2014, р. Кубань	0,525	50	1,255	0,590	1,189	13,71	5,99	2,75	0,137	0,06	0,028	0,133

Продолжение таблицы 2.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Побеги, сентябрь 2013, р. Подкумок	1,310	100	0,956	0,490	1,007	10,23	5,68	1,82	0,082	0,046	0,015	0,081
Побеги, сентябрь 2014, р. Подкумок	1,323	100	1,124	0,754	1,271	11,11	11,55	0,57	0,088	0,092	0,005	0,095
Побеги, август 2014, р. Кубань	1,167	100	0,742	0,422	0,944	7,72	5,55	1,84	0,067	0,050	0,017	0,071
Побеги, июнь 2014, р. Малка	1,249	100	0,396	0,224	0,684	4,13	2,93	1,86	0,035	0,025	0,016	0,035

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ (ПРОЕКТ)

Ивы трехтычинковой побеги
Salicis triandrae cormus

ФС
Вводится впервые

Собранные в июле-августе высушенные побеги текущего года дикорастущих и культивируемых древесных растений ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) сем. Ивовые (*Salicaceae*).

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь побегов длиной 15-30 см, листьев. Листья очередные, черешковые, ланцетовидно-вытянутые, линейные, узколанцетные, иногда узкояйцевидные, с заостренной верхушкой, края мелкопильчатые, иногда завернуты вниз. С верхней стороны листья зеленые, блестящие, слегка кожистые, с нижней – серовато-зеленые или серые от воскового налета, слабо-опушенные, опушение наиболее выражено по главной жилке, длиной 5-10 см, шириной – 1-2 см. Стебли цилиндрические. Наружная поверхность побегов серая, сизая или желтая, шероховатая, на ней обнаруживаются коричневые пигментные пятна. Излом в центре зернисто-шероховатый, снаружи иногда волокнистый. Запах отсутствует. Водное извлечение имеет горьковатый, вяжущий вкус.

Измельченное сырье. Куски стеблей, листьев, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Цвет зеленый, светло-зеленый, иногда серый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Порошок. Кусочки листовых пластинок различной формы, черешков, стеблей от зеленого до светло-зеленого и серого цвета, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок.* При рассмотрении листа с поверхности должны быть видны клетки эпидермиса с обеих сторон листа – мелкие с четковидно-утолщенными прямыми или слабо-извилистыми стенками, над жилками и вдоль жилок с прямыми стенками, вытянутыми вдоль жилки. Устьица только на нижней стороне, мелкие, в понижениях, с 3-6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип).

Верхняя сторона листа покрыта кутикулой; волоски встречаются очень редко. Нижняя сторона опушена волосками 2-х типов: простые 1-2 клеточные, тонкостенные с заостренной верхушкой и головчатые на одноклеточной ножке с шаровидной головкой. Мезофилл листа содержит большое количество мелких друз, а вдоль жилок расположены призматические кристаллы.

По краю листа у основания каждого зубчика располагаются эмергенцы (желёзки округлой, иногда немного приплюснутой формы), состоящие из темно-коричневых клеток. В более старых листьях встречаются клетки-идиобласты, содержащие флобафены.

На поперечном срезе лист дорзовентральный. Черешок листа на поперечном срезе имеет все характерные структуры. В жилке много механической ткани – колленхимы, расположенной непосредственно под эпидермисом в несколько рядов, и волокон, окружающих проводящий пучок.

При рассмотрении поперечного среза стебля должен быть виден слой клеток кутикулы с небольшими сосочками и 1-2-слойная хлоренхима, наружная кора включает 2-3 слоя клеток, далее располагается 5-7 слоев клеток пластинчатой колленхимы светло-зеленого цвета. На границах первичной и внутренней коры должен быть виден слой камбия, клетки

основной паренхимы овальной формы, прилегающие друг к другу довольно плотно, некоторые из них должны быть заполнены зеленовато-желтым содержимым.

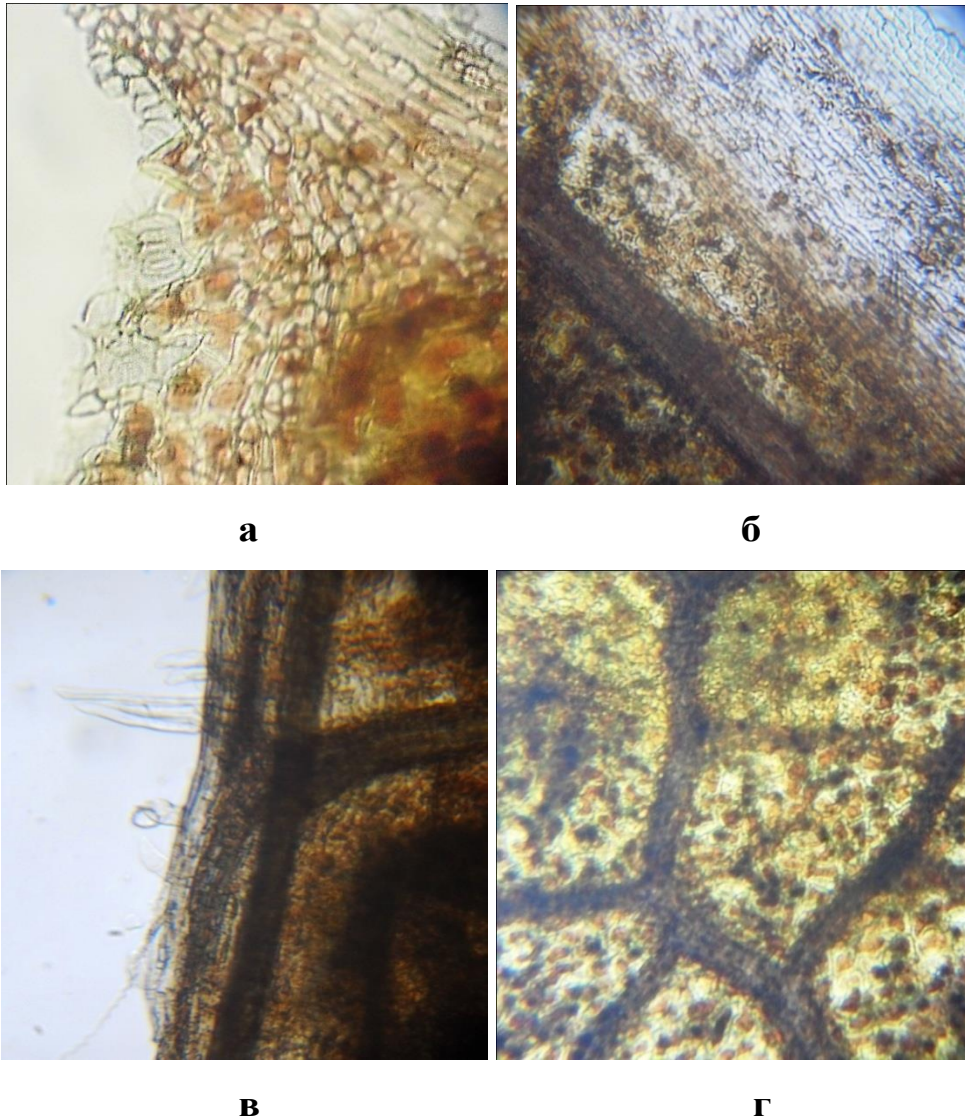


Рисунок 1 - Элементы анатомического строения листа ивы трехтычинковой: а, б – фрагмент эпидермиса, устьица аномоцитного типа; в – волоски 2х типов; г – друзы и призматические кристаллы

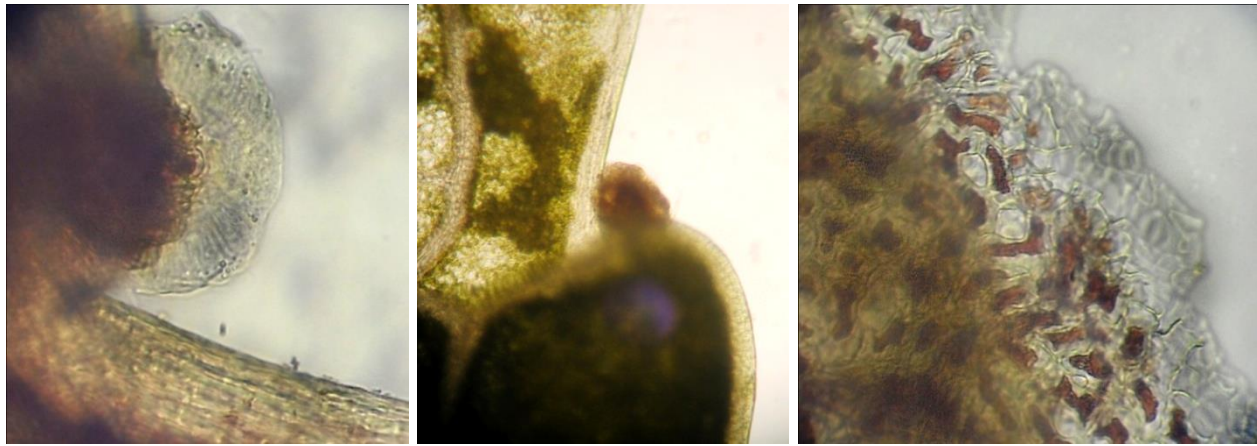
**а****б****в**

Рисунок 2 - Желёзки (а, б) и идиобласты (в) листьев ивы трехтычинковой

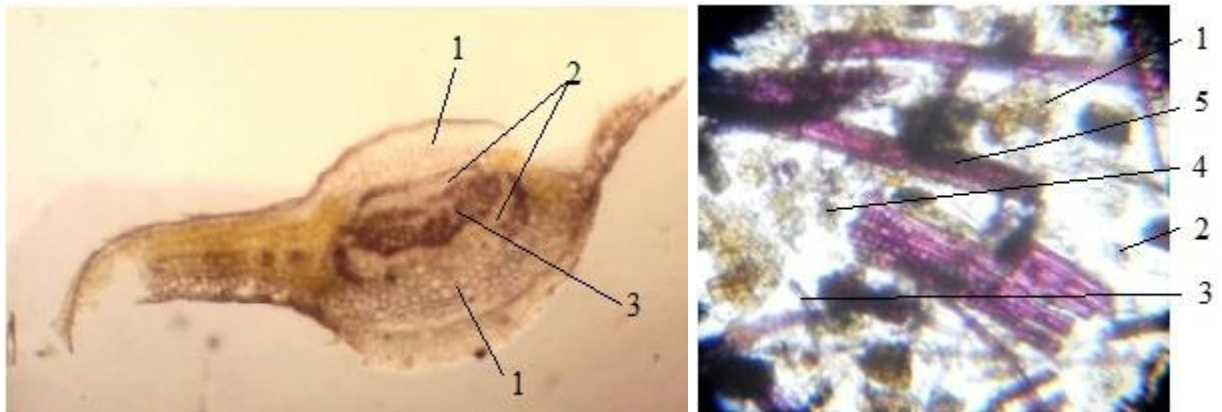
**а****б**

Рисунок 3 – Поперечный срез листа ивы трехтычинковой (а: 1-колленхима, 2-волокна, 3-проводящий пучок) и элементы порошка побегов ивы трехтычинковой (б: 1-обрывки клеток эпидермиса, 2-фрагменты волосков, 3-цельные волоски, 4-кристаллы оксалата кальция в форме друз, 5-участок проводящих элементов)

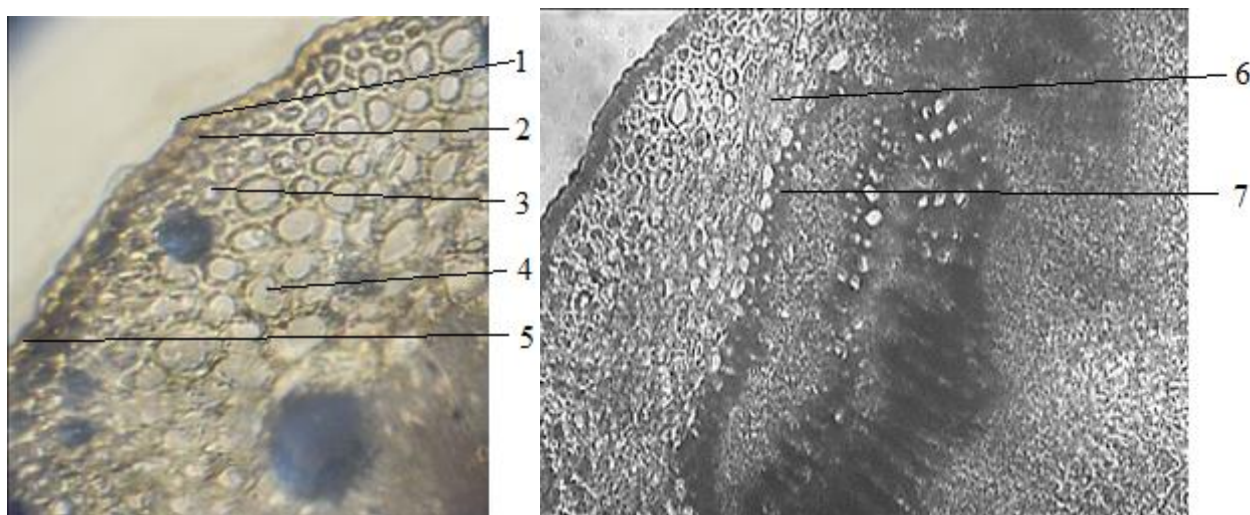


Рисунок 4 - Поперечный срез стебля ивы трехтычинковой (1-сосочковидные выросты, 2-хлоренхима, 3-колленхима, 4-основная паренхима, 5-кутикула, 6-лубяные волокна, 7-кристаллоносная обкладка из призматических кристаллов оксалата кальция)

При рассмотрении более глубоких слоев поперечного среза стебля ивы трехтычинковой должны быть видны лубяные волокна с утолщенными стенками, их стенки не всегда окрашиваются от флороглюцина и кислоты хлористоводородной концентрированной в красный цвет (слабое одревеснение или его отсутствие). Вдоль лубяных волокон должна наблюдаться кристаллоносная обкладка из призматических кристаллов оксалата кальция. Участки флоэмы состоят из мелких клеток, плотно прилегающих друг к другу, со спадающимися стенками.

При рассмотрении микропрепаратов порошка должны быть видны фрагменты: обрывки клеток эпидермиса, фрагменты волосков, и цельные волоски, включения кристаллов оксалата кальция в форме друз, участки проводящих элементов.

Определение основных групп биологически активных веществ

Определение фенологликозидов. Время миграции пиков на электрофореграмме испытуемого раствора должно соответствовать времени миграции пиков СО триандрина и салидрозида.

Определение проводят методом КЗЭ.

Приготовление растворов.

Буферный раствор pH 10,4 (карбонатный): 38,5 мл 0,2 М натрия карбоната и 11,5 мл 0,2 М натрия гидрокарбоната. Перед проведением анализа буферный раствор фильтруется и центрифугируется.

Испытуемый раствор: около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в коническую колбу 250 мл со шлифом, прибавляют 100 мл спирта 70%, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут. После охлаждения раствор фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, сырье отжимают и доводят до метки спиртом 70%, тщательно перемешивают. Далее извлечение центрифугируют 5 мин при 8000 мин⁻¹ и подвергают анализу.

Приготовление растворов СО: по 0,01 г салидрозида и 0,015 г триандрина помещают в мерные колбы вместимостью 10 мл, добавляют по 5 мл спирта этилового 70%, взбалтывают до растворения порошков веществ и доводят до метки тем же растворителем. Далее растворы тщательно перемешивают (раствор А и Б). Для приготовления раствора смеси СО салидрозида и триандрина отбирали по 180 мкл и 30 мкл раствора А и Б салидрозида и триандрина соответственно и доводили до 1000 мкл спиртом 70%.

Предварительная подготовка капилляра: Для подготовки капилляров и восстановления их поверхности проводят последовательную промывку водой, 0,5 М раствором натрия гидроксида, водой, 0,5 М раствором кислоты хлористоводородной, водой и затем ведущим электролитом. Время промывки для всех растворов должно быть не менее 10 мин, для ведущего электролита – 30 мин. Перед проведением анализа промывочные растворы фильтруются и центрифугируются.

Условия анализа:

Капилляр	кварцевый, $L_{эфф}/L_{общ}=50/60$ см, ID=75 мкм
Ввод пробы	гидродинамический, 150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектор	спектрофотометрический, 280 нм
Ведущий электролит	50 мМ карбонатный буферный раствор с pH 10,4

Проверка пригодности электрофоретической системы.

Электрофоретическая система считается пригодной, если:

- относительное стандартное отклонение времени миграции пиков триандрина и салидрозида, рассчитанное по шести последовательным электрофореграммам раствора стандартного образца или испытуемого раствора, составляет не более 2%;
- эффективность электрофоретической системы, рассчитанная по пику триандрина стандартного или испытуемого раствора, – не менее 170 000 теоретических тарелок, по пику салидрозида стандартного или испытуемого раствора – не менее 100 000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии салидрозида должен быть на уровне 0,3, триандрина – 0,7;
- разрешение должно составлять 3,5 для салидрозида и 1,5 для триандрина.

Определение дубильных веществ.

1,0 г измельченного до 3 мм растительного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл и прибавляют 20 мл воды. Нагревают на кипящей водяной бане в течении 30 минут. Охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр.

Качественная реакция. К 2 мл полученного извлечения прибавляют 5 капель 1% раствора железоммонийных квасцов. Наблюдают появление черно-зеленого окрашивания раствора.

Определение флавоноидов.

Около 1,0 г сырья помещают в колбу вместимостью 25 мл и заливают 10 мл спирта 70% и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 10 минут с момента закипания спирта в колбе. Извлечение охлаждают до комнатной температуры, фильтруют (испытуемый раствор).

Качественная реакция. Цианидиновая проба. К 2 мл извлечения добавляют 7 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 15 мг металлического цинка. Наблюдают появление красного окрашивания раствора.

Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10×15 см наносят по 15 мкл испытуемого раствора и 5 мкл 0,05% спиртового раствора СО рутина (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора СО рутина). Пластинки помещают в камеру, насыщенную системой растворителей: н-бутанол – кислота уксусная концентрированная – вода (8: 2: 4) в течение 1 часа. Когда фронт растворителя достигает 12 см, хроматограммы достают из камеры, высушивают, просматривают в видимом и УФ-свете при длине волны 365 нм. Идентификацию пятен веществ проводят с помощью обработки парами аммиака или 2% спиртовым раствором алюминия хлорида. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции коричневатого-желтого цвета со значением $R_f=0,64-0,66$ соответствующее СО рутина. Допускается наличие других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 12%.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 7%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 2%.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм - не более 5%. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5%; 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

Другие части растения (кора, части соцветий). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 2%.

Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 5%.

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

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – 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. Категория 4А.

В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок*: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2% (*альтернативная методика*: рутин – не менее 1,8%), дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 3,5%.

Определение флавоноидов.

Приготовление растворов.

Приготовление стандартного образца рутина: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135 °С в течении 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Хранят в защищенном от света месте в плотно укупоренном флаконе темного стекла.

Срок хранения - 30 суток.

Приготовление 2% спиртового раствора алюминия хлорида. 2,0 г (точная навеска) алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 95% и нагревают на водяной бане до полного растворения. Раствор охлаждают и доводят растворителем до метки, перемешивают и фильтруют. Хранят в защищенном от света месте в плотно укупоренном флаконе темного стекла.

Срок хранения – 30 суток.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) высушенных побегов ивы трехтычинковой, помещают в коническую колбу с притертой пробкой, вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70% спирта и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин с момента закипания воды. Полученное извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию проводят трижды. Извлечения фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят 70% спиртом до метки (раствор А испытуемого раствора).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 95% и 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2%. Через 10 минут прибавляют 0,1 мл уксусной кислоты разведенной и доводят до метки спиртом 95%. По истечении 40 минут измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл соответствующего извлечения, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной и доведенный спиртом 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца

рутина, для чего в две мерные колбы вместимостью 25 мл вносят по 1 мл 0,05% спиртового раствора рутина и далее поступают, как описано выше.

Сумму флавоноидов в процентах (X) в пересчете на рутин определяют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot 100},$$

где A и A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора и раствора СО рутина при длине волны 410 нм;

a – навеска сырья, г;

a_0 – навеска СО рутина, г;

P – содержание основного вещества в СО рутина, %;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Альтернативная методика: *Определение рутина.*

Определение проводят методом КЗЭ.

Буферный раствор pH 9,2 (боратный): 0,01 М раствор натрия тетрабората декагидрата. Перед проведением анализа буферный раствор фильтруется и центрифугируется.

Испытуемый раствор: при помощи микропипетки отбирают 400 мкл раствора А (см. «Количественное определение флавоноидов»), переносят в пробирку типа Эппендорф, прибавляют 600 мкл спирта 70%, перемешивают и центрифугируют при 12000 мин⁻¹ 5 мин. Надосадочный раствор декантируют и подвергают анализу.

Приготовление раствора СО рутина: 6 мл раствора СО рутина (см. приготовление выше) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом этиловым 95% и перемешивают. С помощью микропипетки в пробирку по типу Эппендорфа отмеривают 500 мкл полученного раствора, прибавляют 300 мкл воды и 200 мкл спирта этилового 95% и перемешивают. Перед анализом полученный раствор центрифугируют при 8000 мин⁻¹ 5 мин.

Предварительная подготовка капилляра: см. определение фенологликозидов.

Условия анализа:

Капилляр	кварцевый, $L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}}=50/60$ см, ID=75 мкм
Ввод пробы	гидродинамический, 150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектор	спектрофотометрический, 254 нм
Ведущий электролит	боратный буфер с pH 9,2

Проверка пригодности электрофоретической системы.

Электрофоретическая система считается пригодной, если:

- относительное стандартное отклонение времени миграции пика рутина, рассчитанное по шести последовательным электрофореграммам раствора стандартного образца или испытуемого раствора составляет не более 3%;

- эффективность электрофоретической системы, рассчитанная по пику рутина стандартного или испытуемого раствора – не менее 300 000 теоретических тарелок.

- фактор асимметрии рутина должен быть на уровне 0,7.

Содержание рутина в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S и S_0 – площадь пика рутина и СО рутина на ЭФГ испытуемого раствора и раствора СО соответственно;

a – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

a_0 – навеска СО рутина, г;

P – содержание рутина в СО, %

Определение дубильных веществ.

Приготовление растворов.

Приготовление раствора индигосульфокислоты. 1,0 г индигокармина растворяют в 25 мл серной кислоты концентрированной, затем прибавляют дополнительно 25 мл серной кислоты концентрированной и разбавляют водой до

1000 мл, осторожно вливая полученный раствор в воду, в мерной колбе вместимостью 1000 мл, перемешивают.

Определение дубильных веществ проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1).

Аликвоту раствора А необходимо брать 50 мл.

Содержание дубильных веществ в процентах (X) в пересчете на танин рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,004157 \cdot 100}{a},$$

где V – объем калия перманганата раствора 0,02 моль/л, израсходованного на титрование водного извлечения, мл;

V_1 – объем калия перманганата раствора 0,02 моль/л, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл;

K – поправочный коэффициент калия перманганата раствора 0,02 моль/л;

0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл калия перманганата раствора 0,02 моль/л (в пересчете на танин), г;

a – навеска сырья, г;

W – влажность лекарственного растительного сырья, %;

250 – общий объем водного извлечения, мл;

50 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Упаковка, маркировка, транспортировка. 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».

«УТВЕРЖДАЮ»
директор по производству
ООО «Витаукт-пром»
Корочинский А.В.
«14» сентября 2017 г.



Инструкция по сбору и сушке побегов ивы трехтычинковой

Пятигорск, 2017

Ива трехтычинковая (*Salix triandra* L.) является высоким быстрорастущим кустарником или небольшим деревцем до 5 – 6 м высотой (рисунок 1). Отличается раскидистой густой кроной, длинными прутьевидными желтовато-зелеными побегами и миндалевидными листьями. Кора старых ветвей (начиная с диаметра 4-6 см) отслаивается неправильной формы пластинками («заплатами»), обнажая ржаво-коричневую пробку, не образуя грубых продольных участков (рисунок 2). Характерным признаком являются также легко отламывающиеся побеги в сочленениях. Цветоносные почки по внешнему виду одинаковые с вегетативными, сплюснутые, тупые. Черешки в верхней части с отчетливыми железками. Листья ланцетные, плоские. Сережки поздние, на длинных облиственных ножках, узкоцилиндрические, большей частью изогнутые или несколько поникающие (рисунок 3). Прицветные чешуи бледные, у женских цветков при созревании коробочек полностью или в значительной мере опадающие. Тычинок три, опорожнившиеся пыльники искривленные (это вызывается тем, что оба пыльцевых мешка обращены не в сторону, а вперед). Коробочки на длинных (1-2 мм) ножках, почти веретеновидные, мелкие (зрелые дл. 3-4 мм), с очень коротким столбиком и отогнутыми очень короткими двулопастными рыльцами. Запах отсутствует, вкус отвара побегов горьковатый, вяжущий. Цветет в мае – июне.



Рисунок 1 – Ива трехтычинковая



Рисунок 2 – Ива трехтычинковая (характерный вид коры)



Рисунок 3 – Однолетние побеги ивы трехтычинковой во время цветения

При сборе побегов ивы трехтычинковой на Северном Кавказе можно встретить другие виды ивы, такие как *S. pentandra* (ива пятитычинковая), *S. fragilis* (ива ломкая), *S. purpurea* (ива пурпурная), *S. viminalis* (ива корзиночная), *S. alba* (ива белая), *S. cinerea* (ива пепельная), *S. caprea* (ива козья).

Отличительные признаки некоторых видов рода Ива, произрастающих в Северо-Кавказском Федеральном округе, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Морфологические признаки некоторых видов рода Ивы (*Salix* L.), произрастающих в Северо-Кавказском Федеральном округе

Видовое название растения								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Органы растения	<i>S. triandra</i> (ива трехтычинковая)	<i>S. pentandra</i> (ива пяти тычинковая)	<i>S. fragilis</i> (ива ломкая)	<i>S. purpurea</i> (ива пурпурная)	<i>S. viminalis</i> (ива корзиночная)	<i>S. alba</i> (ива белая)	<i>S. cinerea</i> (ива пепельная)	<i>S. caerea</i> (ива козья)
Кора ветвей	Серая, сизо-серо-желтая, шероховатая растрескивающаяся или лущащаяся, отслаивается тонкими пластинками	Серовато-зеленовато-желтая или оливково-зеленая, блестящая	Гибрид с вавилонской, светло-серая, гладкая	Ярко кораллово-красная, темно-красная, коричнево-красная или фиолетовая, блестящая, иногда с сизым налетом	Желтая, оливково-кирпичная, опушенная	Гибкая, голая, зеленовато-желтая, светло-коричневая	Темно-серая (почти черная), красновато-серая, гладкая, иногда блестящая	Светло-серая, иногда коричневатосерая, гладкая
Молодые побеги	Не клейкие, зеленые, желтовато-зеленые, желтые с пурпурным оттенком, желто-коричневые, голые, слабоопушенные с чечевичками или с сизым налетом	Клейкие, ароматические, блестящие (лакированные)	Клейкие, голые, светло-серые, оливково-зеленые, блестящие	Красно-коричневые, оливково-зеленые, редко с сизым налетом	Светло-зеленые	Раскидистая крона. Серебристоокрашенные, зеленовато-желтые или бурые	Зеленые, сизо-зеленые, бархатистые или прижатоволосистые, редко бороздчатые	Голые или почти голые
Листья	Простые, линейные, узколанцетные, узкояйцевидные или чешуйчатые; листорасположение очередное	Простые, продолговато-линейные, редко овальные; на границе пластинки и черешка 2-3 пары железистых выростов; очередные или супротивные	Продолговато-линейные, 7-10 см длиной. Одна пара железок или гроздевидных выростов на границе черешков и пластинки	Простые, линейные, узколанцетные, узкояйцевидные или чешуйчатые Расположение очередное или супротивное	Ланцетные, линейно-ланцетные, 5-8 см длиной (до 10 см), 0,7-0,5 см шириной, край волнистымчатый	Продолговато-линейные, 7-12 см длиной, 1-1,5 см шириной. На границе черешка и пластинки листа одна пара железок или гроздевидных выростов	Простые, 4-6 см длиной, 1,5-2 см шириной, округлые, яйцевидные, эллиптические, с обеих сторон опушенные (снизу более густо); Листорасположение очередное	Округлоэллиптические, овальные 5-9 см длиной, 2,5-5 см шириной, черешки до 2 см длиной, опушенные; листорасположение очередное

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Опушение взрослых листьев	Сверху темно-зеленые, лоснящиеся, снизу светло-серые, опущенные	Голые, опушение отсутствует	Опушение отсутствует как сверху, так и снизу	Сверху слабое опушение по главной жилке (лупа 10х), снизу по жилкам 2-го порядка	Сверху зеленые голые или серовато-зеленые, слабоопушенные, снизу – снежно-белые или атласно-блестящие	Снизу, а иногда и сверху сплошь белые от прижатого опушения	Сверху и снизу слабое опушение	Сверху зеленые, снизу – очень опушены, серовато-войлочные
Окраска цветков, плоды и семена	Цветки без околоцветника, прицветные чешуи однотонные; коробочка одногнездная, семена с пучками белых волосков	Очень мелкие, однополые, околоцветника нет, соцветия сережчатые; коробочки мелкие, желтоватые	Тычиночные и пестичные цветки в сережках, лишены околоцветника, завязь одногнездная, плод коробочка, вскрывающаяся по 2 швам	Цветки без околоцветника или околоцветник малозаметны, прицветные чешуи двухцветные	Прицветные чешуи однотонные, семена без опушения. Цветки зеленоватые, околоцветник малозаметен	Цветки зеленоватые, в раздельнополых сережках, распускаются одновременно с листьями, многосемянная коробочка, семена с пучком шелковистых волосков	Цветки без околоцветника или околоцветник малозаметны, прицветные чешуи двухцветные, коробочка одногнездная	Зеленовато-бурые, коричнево-бурые, коробочки собраны в сережки, семена с пушком

За рубежом ареал произрастания ивы трехтычинковой: Средняя и Атлантическая Европа, Средиземноморье (отсутствует в Греции), Южная Скандинавия (до 67° 30' с.ш.), Северный и Восточный Казахстан, Дальний Восток, Монголия, Япония, Китай, Кавказ, Малая Азия, Северный Иран. Изолированные популяции встречаются в Южном Иране, восточном Афганистане, в предгорьях Копетдага. Однако географический центр ареала ивы трехтычинковой находится в Восточной Европе, где этот вид встречается практически на всей территории. Растение отлично произрастает во всех странах с тёплым и жарким климатом [Афонин А.А., Фучило Я.Д., 2012].

Ареал произрастания ивы трехтычинковой в России достаточно широкий и занимает почти всю европейскую часть, доходя на севере до линии Петрозаводск – Вологда – Киров, и Северный Кавказ, встречается на территории Западной и Средней Сибири (до 65° с.ш.), в том числе в бассейне реки Лены (вблизи г. Иркутска).

Ива трехтычинковая – типичный пойменно-аллювиальный вид. Заросли ивы трехтычинковой располагаются обычно в поймах рек, где идет накопление аллювия, а также вдоль русел рек, по берегам протоков и стариц, на песчаных косах и отмелях. Заросли не имеют сплошного распространения, связаны с рельефом поймы, часто разбросаны в форме куртин, полос и островов, разделенных водой или лугом.

Заготовку побегов ивы трехтычинковой рекомендуем проводить после цветения в июле – августе месяцах, срезая однолетние побеги длиной около 30 см. Собранный сырьё укладывают рыхлым слоем в открытую тару (ящики, плетенные корзины) или тканевые мешки. При сборе бригадным методом и при перевозке на дальние расстояния кузов машины должен быть оборудован стеллажами или решетками, на которые раскладывают побеги ивы трехтычинковой.

Побеги ивы трехтычинковой рекомендуется сушить следующим образом: сырьё раскладывают тонким слоем на ткани (брезенте) или бумаге на чердаках с хорошей вентиляцией или под навесами, периодически перемешивают. В первые дни сырьё ежедневно переворачивают для обеспечения его равномерной сушки.

Сушат в течение 6-7 дней в защищенном от солнечного света, хорошо продуваемом ветром, месте. После сушки сырье проверяют на излом: если побег не гнется, а ломается, сушку следует прекратить.

Согласно требованиям фармакопейной статьи внешние признаки сырья следующие:

Цельное сырье. Смесь побегов длиной 15-30 см, листьев (рисунок 4). Листья очередные, черешковые, ланцетовидно-вытянутые, линейные, узколанцетные, иногда узкояйцевидные, с заостренной верхушкой, края мелкопильчатые, иногда завернуты вниз. С верхней стороны листья зеленые, блестящие, слегка кожистые, с нижней – серовато-зеленые, серые или светло-зеленые от воскового налета, слабо-опушенные, опушение наиболее выражено по главной жилке, длиной 5-10 см, шириной – 1-2 см. Стебли цилиндрические. Наружная поверхность побегов серая, сизая или желтая, шероховатая, на ней обнаруживаются коричневые пигментные пятна. Излом в центре зернисто-шероховатый, снаружи иногда волокнистый. Запах отсутствует. Водное извлечение имеет горьковатый, вяжущий вкус.



Рисунок 4 – Ива трехтычинковая однолетние побеги
(цельное сырье)

Измельченное сырье. Куски стеблей, листьев, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Цвет зеленый, светло-зеленый, иногда

серый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения горьковатый, вяжущий.

Порошок. Кусочки листовых пластинок различной формы, черешков, стеблей от зеленого до светло-зеленого и серого цвета, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Согласно требованиям фармакопейной статьи показатели качества следующие:

Цельное сырье. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2% (*альтернативная методика:* рутин – не менее 1,8%); дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 3,5%; влажность – не более 12%; зола общая – не более 7%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 2%; измельченность сырья – частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм – не более 5%; другие части растения – не более 2%; сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее) – не более 5%; органическая примесь – не более 1%; минеральная примесь – не более 1%, микробиологическая чистота – категория 4А.

Измельченное сырье. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2% (*альтернативная методика:* рутин – не менее 1,8%); дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 3,5%; влажность – не более 12%; зола общая – не более 7%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 2%; измельченность сырья – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5%; другие части растения – не более 2%; сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее) – не более 5%; органическая примесь – не более 1%; минеральная примесь – не более 1%, микробиологическая чистота – категория 4А.

Порошок. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2% (*альтернативная методика:* рутин – не менее 1,8%); дубильных веществ в пересчете на танин – не менее 3,5%; влажность – не более 12%; зола общая – не более 7%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 2%; измельченность сырья – частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями

размером 1 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5%; минеральная примесь – не более 1%, микробиологическая чистота – категория 4А.

Побеги ивы трехтычинковой упаковывают в мешки тканевые продуктовые по ГОСТ 30090-93 не более 15 кг. Тара должна быть чистой, сухой и однородной для всей партии сырья.

В каждую транспортную упаковку должен быть вложен упаковочный лист с указанием места, времени сбора и наименования сырья. Маркировка транспортной упаковки должна соответствовать ГОСТ 14192-96.

Транспортируют побеги ивы трехтычинковой в соответствии с ГОСТ 6077-80 в сухих, чистых, не имеющих постороннего запаха, крытых транспортных средствах.

Хранить сырье необходимо на стеллажах в защищенных от прямых солнечных лучей, сухих, чистых, хорошо вентилируемых складских помещениях, не зараженных амбарными вредителями по ГОСТ 6077-80.

Срок годности – 2 года.

Разработчики:

Заведующий кафедрой фармакогнозии и ботаники Пятигорского медико-фармацевтического института – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
д. фарм. н., профессор



Д.А. Коновалов

Профессор кафедры фармакогнозии и ботаники Пятигорского медико-фармацевтического института – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
д. фарм. н., профессор



О.И. Попова

Аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники Пятигорского медико-фармацевтического института – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России



Е.Г. Санникова

Нормы показателя «Микробиологическая чистота»

Таблица 5.1 – Требования по показателю качества ГФ XIII, ч.1,
ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», раздел «Лекарственные
растительные средства, состоящие из одного вида сырья (фасованная продукция)
или нескольких (сборы), а также растительное сырье «ангро»»

Категория 4	
А. Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые в виде настоев и отваров, приготовленных с использованием кипящей воды	- Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^7 КОЕ в 1 г - Общее число грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г <i>Escherichia coli</i> – не более 10^2 КОЕ в 1 г
Б. Лекарственные растительные средства или растительное сырье «ангро», приготовленные без использования кипящей воды	- Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^5 КОЕ в 1 г - Общее число грибов – не более 10^4 КОЕ в 1 г - Энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10^3 КОЕ в 1 г - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> – в 1 г - Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г
Категория 3.2	
для приема внутрь	- Общее число аэробных бактерий - не более 10^4 КОЕ в единице препарата/г - Общее число грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г - Энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10^2 КОЕ в 1 г - Отсутствие энтеробактерий, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> - Отсутствие бактерий рода <i>Proteus</i>



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научно-исследовательской работе
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

А.Н. Редько

«04» сентября 2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Методики анализа рутина, триандрина и салидрозида в растительном сырье «Ивы трехтычинковой побеги» методом капиллярного зонного электрофореза.

Кем предложен: профессором кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ О.И. Поповой и аспирантом кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ Е.Г. Санниковой.

Источник информации: проект фармакопейной статьи на сырье «Ивы трехтычинковой побеги». Печатные статьи: 1. Санникова, Е.Г. Разработка и валидация методики количественного определения рутина в побегах и листьях ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.) с использованием капиллярного электрофореза / Е.Г.Санникова, С.П. Сенченко, О.О. Фролова // Сборник научных трудов международной конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» Москва, 23-25 июня 2016 г. – М.: 2016, -С.416 – 419.

2. Определение фенологликозидов в побегах ивы трехтычинковой (*Salix triandra* L.), произрастающей на Северном Кавказе / С.П. Сенченко, О.И. Попова, Е.Г. Санникова, Н.Н. Крылов // Научные ведомости БелГУ. Серия медицина. Фармация. 2017. –Вып.37, - №5 (254), - С.176-182.

Место внедрения: кафедра фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (Краснодарский край, г. Краснодар, ул. Седина, 4).

Цель внедрения: использование предлагаемых методик в учебном процессе аспирантов кафедры фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ответственный за внедрение: заведующий кафедрой фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации А.М. Сампиев.

Результаты внедрения: предложенные в проекте фармакопейной статьи методики идентификации триандрина и салидрозида и количественного определения рутина методом капиллярного зонного электрофореза включены в практические занятия учебного плана аспирантов кафедры фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ответственный за внедрение:
заведующий кафедрой фармации
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
д. фарм. н., профессор

А.М. Сампиев

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора Пятигорского
медико-фармацевтического института -
филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава
России по научной работе, доктор
фармацевтических наук, профессор



Д.А. Коновалов

«11» августа 2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Методики анализа рутина, триандрина и салидрозида в растительном сырье «Ивы трехтычинковой побег» методом капиллярного зонного электрофореза.

Кем предложен: профессором кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ О.И. Поповой и аспирантом кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ Е.Г. Санниковой.

Источник информации: проект фармакопейной статьи на сырье «Ивы трехтычинковой побег».

Место внедрения: Кафедра фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (Ставропольский край, г. Пятигорск, проспект Калинина, 11).

Цель внедрения: использование предлагаемых методик в учебном процессе аспирантов кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Ответственный за внедрение: Доцент кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, кандидат фармацевтических наук Вдовенко-Мартынова Н.Н.

Результаты внедрения: предложенные в проекте фармакопейной статьи методики идентификации триандрина и салидрозида и количественного определения рутина методом капиллярного зонного электрофореза включены в практическое занятие учебного плана аспирантов второго года обучения кафедры фармакогнозии.

Ответственный за внедрение:

Доцент кафедры фармакогнозии

Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО

ВолгГМУ МЗ РФ, кандидат фармацевтических наук

Вдовенко-Мартынова Н.Н.

«УТВЕРЖДАЮ»

ДЕКАН ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО
ФАКУЛЬТЕТА ФГБОУ ВО СОГМА

МИНЗДРВА РОССИИ

Ф.Н. БИДАРОВА

«04» сентября 2017 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Предмет апробации: Методики анализа проекта ФС на растительное сырье «Ивы трехтычинковой побег».

Кем предложен: профессором кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ О.И. Поповой и аспирантом кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ Е.Г.Санниковой.

Источник информации: проект фармакопейной статьи на растительное сырье «Ивы трехтычинковой побег».

Где и кем апробировано: ФГБОУ ВО СОГМА Минздрав России (362019, РСО –Алания г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40), кафедрой фармации.

Цель апробации: подтверждение пригодности методик идентификации сырья и определения его показателей качества, включенных в проект фармакопейной статьи.

Ответственный за апробацию: заведующая кафедрой фармации, к.фарм.н. Бидарова Фатима Николаевна.

Результаты апробации: предложенные в проекте ФС методики идентификации сырья и определения его числовых показателей успешно апробированы в мае 2017 г. на практических занятиях кафедры фармации. Подтверждена специфичность методик идентификации триандрина, салидрозида, дубильных веществ и флавоноидов, а также правильность и воспроизводимость методик количественного определения дубильных веществ и флавоноидов.

Предложения: Разработанный проект фармакопейной статьи на растительное сырье «Ивы трехтычинковой побег» могут быть направлены в ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» (ФГУ НЦ ЭМП) для начала процедуры регистрации.

Ответственный за апробацию:

Декан фармацевтического
факультета



Ф.Н. Бидарова

«УТВЕРЖДАЮ»

директор по производству

ООО «Витаукт-пром»

Корочинский А.В.

20 11 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Предмет апробации: инструкция по сбору и сушке «Ивы трехтычинковой побеги».

Кем предложен: профессором кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ О.И. Поповой и аспирантом кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ Е.Г. Санниковой.

Источник информации: материалы диссертации заочного аспиранта кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ Е.Г. Санниковой.

Место апробации: Кафедра фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения 680006 (Ставропольский край, г. Пятигорск, проспект Калинина 11).

Цель апробации: воспроизведение предлагаемых условий сбора и сушки побегов ивы трехтычинковой и оценка качества сырья по морфолого-анатомическим признакам и показателям качества в условиях ООО «Витаукт-пром», республика Адыгея, майкопский район, ст. Абадзехская, ул. Клубная, 59-а.

Ответственный за апробацию: аналитик-контролер Щербакова Л.Н.

Результаты апробации: инструкция по сбору и сушке однолетних побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на территории республики Адыгея по берегам реки Белая апробирована и одобрена ООО «Витаукт-пром».

Ответственный за апробацию

аналитик-контролер
Щербакова Л.Н.