

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

РЯЗАНОВА ТАТЬЯНА КОНСТАНТИНОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ПЛОДОВ И ПОБЕГОВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ  
(*VACCINIUM MYRTILLUS L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических наук, профессор  
В.А. КУРКИН

Самара – 2014

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

- БАС – биологически активные соединения
- ВФС – временная фармакопейная статья
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВР – вспомогательные работы
- ГСО – государственный стандартный образец
- ГФ – Государственная фармакопея
- ДСК – диазобензолсульфокислота
- ЛРС – лекарственное растительное сырье
- НД – нормативная документация
- РСО – рабочий стандартный образец
- ТП – технологический процесс
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УМО – упаковка, маркировка, отправка
- УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр
- УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия
- ФС – фармакопейная статья
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс

# Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЛОДОВ И ПОБЕГОВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ И РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 14	
1.1. Черника обыкновенная – перспективный источник биологически активных соединений с разнообразной фармакологической активностью .....	14
1.1.1. Этимология названия растения и историческая справка .....	14
1.1.2. Ботаническое описание растения .....	14
1.1.3. Ареал, культивирование черники обыкновенной.....	15
1.1.4. Заготовка и сушка сырья .....	16
1.1.5. Внешние признаки сырья .....	16
1.1.6. Химический состав и фармакологические свойства плодов и побегов черники обыкновенной и препаратов на их основе .....	17
1.1.7. Современное состояние морфолого-анатомических исследования лекарственного растительного сырья черники обыкновенной .....	20
1.1.8. Проблемы стандартизации сырья и лекарственных препаратов черники обыкновенной.....	21
1.1.9. Народно-хозяйственное значение черники обыкновенной.....	23
1.1.10.Перспективы создания отечественных лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантным действием при различных офтальмологических заболеваниях.....	25
Выводы к главе 1 .....	31
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Объекты исследования.....	33
2.2. Методы исследования .....	35
2.2.1. Методики анатомо-гистологического анализа .....	35
2.2.2. Физические методы анализа .....	36
2.2.3. Химические методы .....	37

2.2.4. Хроматографические методы .....	38
2.2.5. Спектральные методы (УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) ..	41
2.2.6. Технологические методы .....	42
2.2.7. Титриметрические методы.....	46
2.2.8. Фармакологические методы.....	46
<b>ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ К НЕЙ ВИДОВ .....</b>	<b>48</b>
3.1. Сравнительное морфологическое исследование побегов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной .....	49
3.2. Сравнительное анатомо-гистологическое исследование побегов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной .....	52
3.3. Сравнительное исследование петиолярных признаков черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной .....	64
Выводы к главе 3 .....	73
<b>ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ .....</b>	<b>75</b>
4.1. Сравнительное исследование химического состава плодов и побегов черники обыкновенной.....	75
4.2. Фитохимическое исследование плодов черники обыкновенной.....	87
4.3. Фитохимическое исследование побегов черники обыкновенной .....	90
Выводы к главе 4 .....	93
<b>ГЛАВА 5. СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ .....</b>	<b>95</b>
5.1. Разработка методик качественного анализа плодов и побегов черники обыкновенной .....	95
5.1.1. Тонкослойная хроматография .....	95
5.1.2. Электронная спектроскопия .....	98
5.2. Разработка методик количественного определения суммы флавоноидов в плодах и побегах черники обыкновенной .....	100

5.2.1. Разработка методики количественного определения суммы антоцианов в плодах черники обыкновенной.....	100
5.2.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной .....	109
5.2.3. Стабильность антоцианов при высушивании .....	113
Выводы к главе 5.....	114
<b>ГЛАВА 6. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ РАЗРАБОТКИ ИМПОРТЗАМЕЩАЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ.....</b>	<b>116</b>
6.1. Разработка и стандартизация лекарственных препаратов на основе плодов черники обыкновенной.....	116
6.1.1. Обоснование состава и способа получения лекарственного препарата «Черники обыкновенной сироп».....	117
6.1.2. Обоснование состава и способа получения лекарственного препарата «Черники обыкновенной таблетки».....	120
6.1.3. Обоснование состава и способа получения лекарственного препарата «Черники обыкновенной пастилки» .....	126
6.1.4. Стандартизация лекарственных препаратов из плодов черники обыкновенной.....	130
6.2. Разработка и стандартизация лекарственного препарата «Черники обыкновенной побегов настойка» .....	131
6.3. Влияния препаратов из плодов и побегов черники обыкновенной на экскреторную функцию почек.....	133
Выводы к главе 6.....	141
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	159

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Растения являются одним из важнейших источников биологически активных соединений (БАС), находящихся широкое применение в различных областях промышленности, однако особое значение имеет опыт их применения в медицине (Киселева Т.Л., 2009; Куркин В.А., 2009; Самылина И.А. и др., 2007; 2010). Отличительной особенностью многих препаратов растительного происхождения имеет комплексный и взаимодополняющий характер действия совокупности содержащихся в них БАС (Киселева Т.Л., 2009; Куркин В.А., 2009; Самылина И.А. и др., 2004; 2007).

Одним из ценным источников лекарственных препаратов является черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) – растение, широко используемое в народной и официальной медицине. Фармакопейным сырьем являются плоды и побеги (Государственный реестр лекарственных средств, 2014). Однако более широкое применение в составе препаратов на фармацевтическом рынке получили именно плоды черники благодаря разнообразию своего химического состава. Плоды черники обыкновенной – растительное сырье, накапливающее значительное количество антоцианов, соединений, обладающих антиоксидантной, антиагрегантной, ангиопротекторной, противовоспалительной активностью). Подобная активность антоцианов обуславливает их применение при комплексной терапии офтальмологических заболеваний (миопия, возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия) (Киселева Т.Н., 2007; Егоров Е.А., 2004). Побеги черники обыкновенной используются в составе противодиабетических сборов («Арфазетин-Э», «Арфазетин-ЭК») (Государственный реестр лекарственных средств, 2014).

И для плодов, и для побегов черники обыкновенной недостаточно проработана стандартизация по группам действующих соединений. На данный момент в России существует фармакопейная статья (Государственная Фармакопея СССР XI издания, вып. 2) только на плоды черники воздушно-сухие, в то время как в европейских странах регламентируется качество как воздушно-сухих, так и свежих плодов, при этом в качестве источника антоцианов применяются только

свежие плоды. Следует отметить, что и используемая в Российской Федерации фармакопейная статья (ФС) на плоды черники не соответствует современным требованиям к стандартам качества на ЛРС; в частности, не регламентируется количественное содержание действующих веществ, отсутствует ряд других показателей (Отраслевой стандарт 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения»). Возможно, с отсутствием содержащих современные требования стандартов качества на плоды черники обыкновенной связаны немногочисленность отечественных лекарственных препаратов на их основе и преобладание дорогостоящих импортных лекарственных средств («Стрикс», «Витрум Вижн форте»).

Качество побегов оценивают по содержанию дубильных веществ, хотя по литературным данным известно, что в побегах также содержатся флавоноиды, которые являются более лабильной группой БАС, и соответственно их содержание является более достоверным показателем качества обработки сырья.

В связи с этим актуальным является более углубленное фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной для обоснования подходов к стандартизации сырья, а также проведение химико-фармацевтических исследований по обоснованию состава лекарственных препаратов из плодов черники. Решение поставленных задач будет способствовать реализации Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года», утвержденной приказом Минпромторга России № 965 от 23.10.2009 г.

**Цель работы и основные задачи исследования.** Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной, направленное на разработку и усовершенствование методов стандартизации сырья и препаратов на их основе.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анатомо-гистологическое исследование различных органов черники обыкновенной и других морфологически сходных видов лекарственного растительного сырья.
2. Провести сравнительное фитохимическое исследование различных органов черники обыкновенной, а также сравнение с другими морфологически сходными видами ЛРС.
3. Изучить химический состав плодов и побегов черники обыкновенной.
4. Разработать методики качественного и количественного анализа БАС в сырье черники обыкновенной.
5. Разработать проекты фармакопейных статей на черники обыкновенной плоды воздушно-сухие, черники обыкновенной плоды свежие и черники обыкновенной побеги.
6. Провести химико-фармацевтическое исследование по обоснованию состава препаратов из плодов и побегов черники обыкновенной («Черники обыкновенной сироп», «Черники обыкновенной пастилки», «Черники обыкновенной таблетки», «Черники побегов настойка»).
7. Разработать методики качественного и количественного анализа экспериментальных препаратов на основе ЛРС черники.
8. Провести фармакологические исследования по изучению влияния экспериментальных лекарственных препаратов из плодов и побегов черники обыкновенной на выделительную функцию почек крыс.

**Научная новизна.** С использованием оптической микроскопии получены микрофотографии, отражающие диагностические признаки побегов черники обыкновенной. Впервые проведено сравнительное анатомо-гистологическое и фитохимическое исследование побегов черники с морфологически сходными видами (толокнянка обыкновенная, брусника обыкновенная).

Из плодов черники обыкновенной выделены и идентифицированы три соединения антоциановой природы: 3-О-глюкозиды цианидина, мальвидина и дельфинидина. Впервые определен удельный показатель поглощения цианидина-3-О-глюкозида в 0,5% растворе аммиака в 95% спирте этиловом. Из побегов

черники обыкновенной выделены и идентифицированы кверцетин-3-О-ксилопиранозид, кофейная кислота и даукостерин,  $\beta$ -ситостерин, из которых даукостерин впервые обнаружен в чернике, а кверцетин-3-О-ксилопиранозид выделен впервые из черники, произрастающей на территории Российской Федерации.

Разработаны методические и методологические подходы к стандартизации плодов свежих и воздушно-сухих, а также препаратов черники обыкновенной, заключающиеся в оценке суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид методом прямой спектрофотометрии в 95% этиловом спирте, содержащем 1% хлороводородной кислоты. Впервые разработана методика количественного определения антоцианов в ЛРС методом дифференциальной спектрофотометрии в 0,5% растворе аммиака в 95% спирте этиловом при аналитической длине волны 623 нм на фоне исходного раствора без добавления аммиака, разведенного аналогичным образом.

Обоснованы подходы к стандартизации побегов черники обыкновенной по сумме флавоноидов в пересчете на рутин методом дифференциальной спектрометрии с алюминия хлоридом при аналитической длине волны 420 нм.

Предложен состав и способ получения лекарственных препаратов «Черники обыкновенной таблетки», «Черники обыкновенной пастилки», «Черники побегов настойка», «Черники обыкновенной сироп».

Разработаны методики анализа экспериментальных лекарственных препаратов по содержанию флавоноидов, в том числе антоцианов, с использованием методов ТСХ и спектроскопии в соответствии с принципами унификации, предъявляемыми к современному фармацевтическому анализу (Самылина И.А. и др., 1994; 2007).

Проведено изучение влияния водных и водно-спиртовых извлечений из плодов и побегов черники на экскреторную функцию почек на белых беспородных крысах. Результаты исследования показывают, что умеренным диуретическим действием обладают водные извлечения из побегов и препараты на основе свежих плодов черники. По показателям диуретической активности,

натрийуреза, калийуреза и креатининуреза через 24 ч действие экстракта из свежих плодов черники обыкновенной было сравнимо с действием гипотиазида. Под влиянием водно-спиртовых извлечений из воздушно-сухих плодов и побегов черники происходит уменьшение диуреза по сравнению с контрольной группой.

**Практическая значимость.** Разработаны разделы «Микроскопия», «Количественное определение», усовершенствован раздел «Качественные реакции» (ТСХ-метод и метод спектроскопии), включенные в проект фармакопейной статьи на «Черники плоды».

Предложены методики качественного и количественного анализа, определены показатели качества, которые нашли отражение в разработанных и принятых на рассмотрение ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» ФС «Черники плоды» и «Черники обыкновенной плоды свежие» и «Черники обыкновенной побеги» (вх. № 1016 от 22.01.13 г.; вх. № 1020 от 28.01.13 г.) с целью включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания..

Разработаны составы и способы получения, методы стандартизации препаратов из плодов и побегов черники (таблетки, пастилки, сироп). Получен патент «Черники обыкновенной сироп (Патент РФ на изобретение № 2484671 от 20 июня 2013 г. «Сироп черники обыкновенной»); удостоверение на рационализаторское предложение № 219 от 21.09.2012 г. «Способ получения сиропа черники обыкновенной»).

Результаты диссертационных исследований используются в учебных процессах на кафедрах фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, фармацевтической технологии, управления и экономики фармации, химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, ГБУ здравоохранения «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

**Связь задач исследования с планами научных работ.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-

исследовательских работ ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России (№ гос. регистрации 01200900568).

**Положения, выдвигаемые на защиту.**

1. Результаты сравнительных анатомо-гистологических исследований побегов черники обыкновенной и морфологически сходных видов.
2. Результаты сравнительного фитохимического исследования плодов и побегов черники обыкновенной и морфологически сходных видов.
3. Результаты исследований по разработке методик качественного анализа плодов и побегов черники обыкновенной.
4. Результаты исследований по разработке методик количественного определения суммы флавоноидов в плодах и побегах черники обыкновенной.
5. Данные по изучению стабильности антоцианов в зависимости от условий сушки сырья.
6. Результаты исследований по разработке способов получения лекарственных препаратов на основе плодов и побегов черники обыкновенной.
7. Данные по изучению показателей качества разработанных лекарственных препаратов («Черники обыкновенной сироп», «Черники обыкновенной пастилки», «Черники обыкновенной таблетки», «Черники побегов настойка»).
8. Результаты исследований диуретической активности экспериментальных препаратов на основе плодов и побегов черники обыкновенной

**Апробация работы.** Материалы работы доложены и обсуждены на IV Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. направленный поиск новых лекарственных средств» (г. Волгоград, 2012), II Международном Конгрессе «Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации» (г. Москва, 2012); XV, XVI, XVII Всероссийских конгрессах "Экология и здоровье человека" (г. Самара, 2010; 2011; 2012); Первой Всероссийской научно-практической конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (г. Москва, 2013); в финале II Всероссийского конкурса УМНИК на СТАРТ 2011 (Самарская область, сентябрь

2011); конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2011; 2012; 2013).

**Публикации.** Основное содержание диссертации опубликовано в 24 научных работах, из них 9 статей в журналах, рекомендуемых ВАК РФ.

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению морфологических и анатомо-гистологических особенностей строения различных органов черники обыкновенной, в том числе в сравнительном аспекте, выявлены диагностические признаки. Из плодов черники обыкновенной выделены и идентифицированы 3 основных антоциана, из побегов черники - кверцетин-3-О-ксилопиранозид, кофейная кислота и даукостерин.,  $\beta$ -ситостерин, из которых даукостерин выделен впервые, а кверцетин-3-О-ксилопиранозид выделен впервые из черники, произрастающей на территории Российской Федерации. Разработаны методики стандартизации плодов и побегов черники по содержанию флавоноидов. Изучена стабильность антоцианов при сушке плодов черники. Разработаны составы и способы получения экспериментальных лекарственных препаратов: «Черники обыкновенной сироп», «Черники обыкновенной пастилки», «Черники обыкновенной таблетки», «Черники побегов настойка». Разработаны методики их анализа, определены основные показатели качества. Изучена диуретическая активность полученных препаратов. Автором разработаны проекты ФС «Черники плоды» и «Черники обыкновенной плоды свежие», «Черники побеги».

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 159 страницах машинописного текста, содержит 30 таблиц, 59 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), обсуждения результатов собственных экспериментальных исследований (главы 3-6), общих выводов, приложения и списка литературы, включающего 135 источников, из которых 47 – на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов, изложены положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору современного состояния исследований черники обыкновенной, в котором систематизированы сведения по изучению химического состава, фармакологических свойств, применению в медицине, стандартизации сырья и препаратов на основе данного растения.

В главе 2 приведена характеристика объектов и методов исследования.

Глава 3 отражает результаты анатомо-гистологического исследования различных органов черники обыкновенной, в том числе в сравнении.

В 4 главе приведены результаты сравнительного изучения химического состава плодов и побегов черники обыкновенной, а также морфологически схожих видов.

В 5 главе обсуждаются результаты по разработке подходов к стандартизации сырья черники обыкновенной.

В главе 6 приведены результаты исследования по стандартизации и созданию лекарственных препаратов на основе сырья черники обыкновенной, изучению их диуретической активности.

В Приложение вынесены акты внедрения, проекты ФС на черники плоды воздушно-сухие и свежие, черники побеги, патент РФ на изобретение, рационализаторское предложение.

# ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЛОДОВ И ПОБЕГОВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ И РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Черника обыкновенная – перспективный источник биологически активных соединений с разнообразной фармакологической активностью

### 1.1.1. Этимология названия растения и историческая справка

Черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L., семейство Брусничные – *Vacciniaceae*, английские названия bilberry (чаще употребляемое), blueberry, huckleberry, whortleberry). Фармакопейными видами сырья являются плоды и побеги [8, 36].

Черника пользуется популярностью у многих народов [97, 99, 102, 103, 107]. В народе существует много названий для этого растения, в основном связанные с окраской плодов, ее красящими свойствами (ворон-ягода, чернец, чернега, горница, черняга, чернишник, черничник и др.). Растение впервые упоминается в «Буколиках» («Пастушеских песнях») древнеримского писателя Вергилия под названием *Vaccinium*. По мнению ученых, возможно это название – латинизированное греческое *Hyacinthus* («гиацинт») [47]. В России род получил свое название от латинского *bassa* (*bassinium*) – «ягода» («ягодник»), впоследствии трансформировавшегося в *Vaccinium*. Другое объяснение этимологии этого слова связано с латинским *vassa* – «корова», так как некоторые виды кустарничков этого рода пригодны на корм скоту [36]. Видовое название обусловлено внешним сходством этого растения с кустарничком мирта (*myrtillus* – уменьшительное от *myrtus* – «мирт»). Таким образом, дословно латинское название в переводе на русский язык звучит, как «ягодник миртоподобный» [47].

### 1.1.2. Ботаническое описание растения

Черника обыкновенная – это невысокий ветвистый листопадный кустарничек 15-50 см [36, 48]. Стебли прямостоячие или приподнимающиеся,

ветви остро-угловатые, молодые – зеленые взрослые – серые или коричнево-серые. Листья очередные короткочерешковые, яйцевидные, эллиптические или почти округлые, длиной 10-25 мм шириной 8-20 мм по краю мелкопильчатые. Корневище длинное, ползучее. Цветки мелкие, поникающие, зеленовато-белые с розоватым оттенком, расположенные по одному в пазухах листьев. Венчик кувшинчато-шаровидный, 4-5-зубчатый, андроцей представлен 8-10 тычинками, завязь 5-гнездная. Плод черники – шаровидная черно-синяя ягода с голубоватым восковым налетом и множеством продолговато-коричневых семян. Растение цветет в мае - июне, плодоносит в июле – августе (рис. 1, 2) [36, 48].



Рисунок 1 – Черника обыкновенная: фаза цветения

Рисунок 2 – Черника обыкновенная: фаза плодоношения

### **1.1.3. Ареал, культивирование черники обыкновенной**

В естественных условиях черника произрастает к северу от умеренных широт в хвойных и смешанных лесах, в лесной зоне с умеренным увлажнением и по склонам гор, образуя заросли [2, 36]. Наиболее распространенными типами леса являются ельники-черничники и сосняки-черничники. Основные заготовки ведутся в северных и Центральных районах европейской части России, Западной и Восточной Сибири. За пределами России черника обыкновенная произрастает в Белоруссии, на Украине, в странах Прибалтики, в горах и лесах европейских стран, на севере Соединенных Штатов [2, 22, 36, 134].

Кроме черники обыкновенной, существуют и другие виды черники, а также выведены разнообразные сорта. На островах Мадейра обитает черника

черемухолистная, а на Кавказе, Дальнем Востоке и на севере Малой Азии произрастает третичный реликт - черника кавказская (*Vaccinum arctostaphylos* L.) – кустарник или небольшое до 3 м высотой, листопадное деревце. В теплых климатических условиях плодоносить кавказская черника может несколько раз в год, плоды ее съедобны и в последнее время рассматриваются как возможные заменители официального сырья – плодов черники обыкновенной [36, 47, 79].

Культурное разведение черники было впервые начато в США и сейчас постепенно налаживается и в России. Выведены такие культурные сорта, как черника садовая Bluecrop, черника садовая Herbert, черника садовая Spartan, черника садовая Nelson и др. [47].

#### **1.1.4. Заготовка и сушка сырья**

Для лекарственных целей собирают ягоды вручную в период полной зрелости в сухую погоду утром ближе к полудню или в конце дня. Перезревшие ягоды собирать не следует, так как они легко мнутся при сушке и слипаются. Применение ягодо-сборочных механизмов нежелательно. Собранные ягоды очищают от мха, веточек хвои и других примесей. Мыть ягоды черники нельзя [36, 55]. Сушат в конвейерных и других сушилках, вначале провяливая в течение 2-3 ч при температуре 35-40 °С, а затем досушивая при температуре 55-60 °С. Высушенные ягоды не должны слипаться в комок и окрашивать ладонь.

Листья черники собирают вручную во время цветения (май – июнь), обрывая средние листья или срезая ножницами побеги с листьями. Сушка проводится тонким слоем в тени или на чердаках при хорошей вентиляции [36].

#### **1.1.5. Внешние признаки сырья**

Фармакопейным сырьем у черники являются плоды и побеги [8, 9].

Плоды черники обыкновенной представляют собой шарообразные черные ягоды с сизым налетом, реже приплюснутые или несколько удлиненные, 6-8 мм в диаметре, с блюдцевидным широким вдавлением на верхушке – диском, окаймленным остатком чашечки; мякоть темно-пурпуровая с красным соком [8,

36, 55]. В мякоти плода имеются многочисленные (до 30 штук) семена яйцевидной формы. У основания иногда имеется короткая плодоножка.

Цвет плодов с поверхности черный с красноватым оттенком; матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-бурый. Запах слабый. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий [48].

В высушенном состоянии это ягоды диаметром 3-6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. На верхушке плодов виден остаток чашечки в виде небольшой кольцевой оторочки, окружающей вздутый диск с остатком столбика в центре или с небольшим углублением после его отпада [8, 36]. Цвет плодов с поверхности черный с красноватым оттенком; матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-бурый. Запах слабый. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий [8].

Побеги черники представляют собой смесь цельных или изломанных верхушек побегов, отдельных стеблей, листьев, реже бутонов, цветков и плодов. Стебли длиной до 150 мм. Вкус сырье горьковато-вяжущий [82].

Измельченное сырье - кусочки листьев, стеблей, изредка бутонов, цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет светло-зеленый, зеленый или коричневатозеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий. При рассмотрении под лупой видны голые, слегка блестящие, светло-зеленые, зеленые или коричневатозеленые кусочки листьев и остро-ребристые, зеленые или коричневатозеленые кусочки стеблей [9, 82].

#### **1.1.6. Химический состав и фармакологические свойства плодов и побегов черники обыкновенной и препаратов на их основе**

Многообразие фармакологических свойств черники обыкновенной обусловлено целым комплексом биологически активных веществ [36, 134]. В настоящее время ведущей группой биологически активных соединений рассматриваются конденсированные дубильные вещества (до 12%) на основе

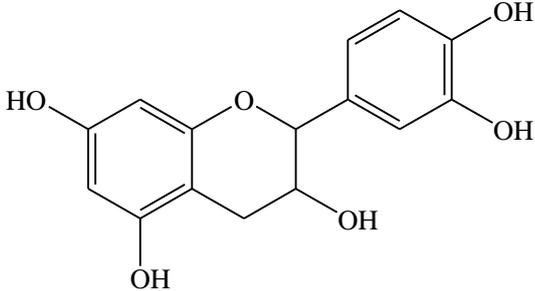
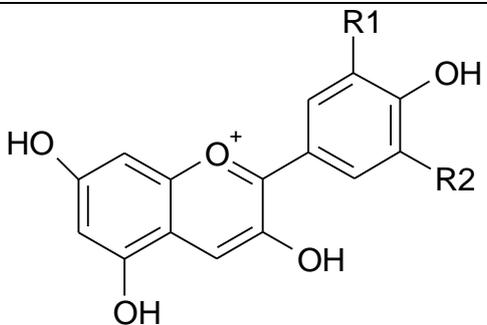
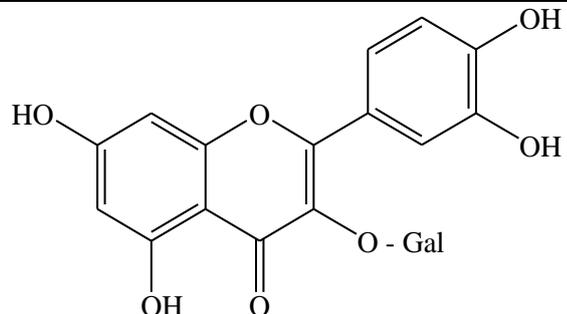
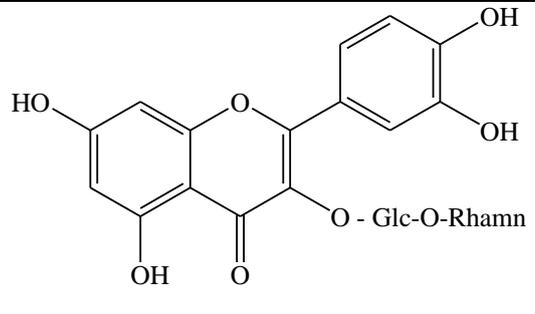
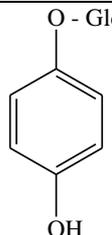
галлокатехина, эпикатехина, эпигаллокатехина, обеспечивающих вяжущее, антисептическое, противовоспалительное действие плодов [8, 36].

Но возросший в последнее время интерес к плодам черники связан с их способностью улучшать зрение. Это их действие ассоциируют с наличием в ней антиоксидантов из группы биофлавоноидов и в первую очередь антоцианов. По литературным данным содержание антоцианов колеблется от 300 до 700 мг% [105]. В плодах было идентифицировано 14 антоцианов, представленных 3-О-арабинозидами, 3-О-глюкозидами и 3-О-галактозидами пяти антоцианидинов: цианидина, дельфинидина, петунидина, пеонидина и мальвидина [36, 95, 108].

Антоцианы являются более лабильной группой, легко разрушающейся под действием света, высокой температуры, высоких значениях pH [89, 108]. Поэтому, в соответствии с современной концепцией о ведущей группе БАС, предложенной В.А. Куркиным, под которой следует понимать «наиболее уязвимую, с точки зрения фармакогнозии, на всех стадиях технологического процесса – от «грядки» до лекарственной формы» [36, 62], возможен пересмотр отнесения черники к классу дубильных веществ.

Кроме антоцианов, в плодах черники обнаружены такие флавоноиды, как рутин, гиперозид, изокверцитрин и др. (табл. 1). В качестве сопутствующих веществ содержатся сахара (глюкоза, фруктоза, сахароза) (5-20%); органические кислоты (лимонная, щавелевая, яблочная, янтарная, хинная, молочная (5 – 7%); до 6 мг% витамина С, витамины группы В, каротин, простые фенолы (арбутин, метиларбутин), пектиновые вещества [36].

Таблица 1 – Важнейшие группы БАС в ЛРС черники обыкновенной

<b>I. Дубильные вещества конденсированной группы</b>			
			
<i>катехин</i>			
<b>II. Флавоноиды</b>			
<b>Антоцианы</b>			
		<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
	пеларгонидин	H	H
	цианидин	OH	H
	пеонидин	OCH <sub>3</sub>	H
	дельфинидин	OH	OH
	петунидин	OCH <sub>3</sub>	OH
мальвидин	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
<b>Флавононолы</b>			
			
<i>гиперозид</i>		<i>рутин</i>	
<b>III. Простые фенолы</b>			
			
<i>арбутин</i>		<i>метиларбутин</i>	

В химический состав плодов черники входят ценные микроэлементы. Особенно велико содержание марганца и железа. Соотношение этих компонентов

приемлемо для применения плодов в патогенетической терапии железодефицитной анемии [25].

Листья содержат практически те же вещества, что и плоды, но значительных количеств достигает содержание витамина С (до 250 мг%), также много конденсированных дубильных веществ (7-20%), имеются и другие фенольные соединения - гидрохинон (1%), арбутин (1-2%), флавоноиды. Гипогликемическое действие побегов черники объясняется присутствием неомиртиллина, о химической структуре которого не существует однозначного мнения. Первоначально под «неомиртиллином» понимали комплекс фенольных соединений (в том числе антоцианов), имеющих также и в плодах, но применение благодаря своему инсулиноподобному действию нашли только побеги черники. Существует версия, что сахаропонижающее действие связано с шестиатомным циклическим спиртом [36, 47].

### **1.1.7. Современное состояние морфолого-анатомических исследования лекарственного растительного сырья черники обыкновенной**

В Российской Федерации в существующей фармакопейной статье на плоды черники обыкновенной [8] отсутствует раздел «Микроскопия». Проблема подтверждения подлинности плодов черники обыкновенной в зарубежных фармакопеях проработана достаточно глубоко. Описание анатомо-гистологических признаков приводится в Европейской Фармакопее и Американской растительной фармакопее.

Следует отметить, что ранее на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии была проведена работа по сравнительному морфолого-анатомическому исследованию плодов, содержащих антоцианы [17, 18, 19, 31]. Результаты данных исследований были использованы при составлении проектов фармакопейных статей.

При описании отмечаются такие признаки, как полигональные клетки эпидермиса, покрытые толстым слоем кутикулы. Клетки эпидермиса сгруппированы в комплексы, отграниченные друг от друга более толстыми

клеточными стенками, чем в границах комплекса. Экзокарп состоит из клеток с тонкими стенками, встречаются склереиды и сосудистые пучки со спиральными сосудами. В эндокарпе встречаются удлиненные склереиды с толстыми пористыми стенками, как правило, расположенные группами. Встречаются кристаллы оксалата кальция. Эпидермис семени состоит из характерных U-образных клеток.

В научной литературе и нормативной документации имеются данные и по анатомо-гистологическим признакам побегов черники обыкновенной [48, 65, 82]. Отмечаются такие признаки, как наличие толстостенных прямых волосков с грубой бородавчатой поверхностью, булавовидных железок на обеих сторонах листовой пластинки, кристаллоносная обкладка вдоль жилок.

Однако по-прежнему остается актуальным проведение сравнительного анатомо-гистологического исследования побегов черники обыкновенной с близкородственными видами, получение цифровых микрофотографий диагностических признаков в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 "Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения" к фармакопейным статьям на лекарственное растительное сырье и включение полученных данных в стандарт качества на исследуемое лекарственное растительное сырье.

Кроме этого, в последнее время получила распространение петиолярная анатомия [32, 33, 34, 35, 41, 54, 69], которая позволяет проводить диагностику близкородственных видов. Однако информации по строению черешков черники обыкновенной, особенно в сравнительном плане с другими видами, в литературных данных не обнаружено.

### **1.1.8. Проблемы стандартизации сырья и лекарственных препаратов черники обыкновенной**

В настоящее время качество лекарственного растительного сырья «Плоды черники обыкновенной» в Российской Федерации регламентируется

Государственной Фармакопеей XI издания (ФС 35) [8]. На побеги черники существуют фармакопейные статьи предприятий [82].

Однако фармакопейная статья на плоды черники обыкновенной не соответствует современным требованиям к стандартам качества лекарственных средств. В ней отсутствует раздел «Микроскопия». Не оценивается содержание действующих веществ. Раздел «Числовые показатели» предусматривает только определение влажности, золы общей и нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты и другие показатели, которые не отображают качество ЛРС. Подлинность сырья оценивается с помощью пробирочных реакций, в то время как в настоящее время существуют другие, более специфичные методы анализа [8].

Требования Американской растительной фармакопеи 2001 г. включают в себя те же числовые показатели, а также содержание экстрактивных веществ, которых должно быть не менее 50% [79].

В Европейской фармакопее предусматривается оценка качества сырья с использованием метода тонкослойной хроматографии, указаны диагностические микроскопические признаки плодов. Регламентируется содержание общей суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид (хризантемин) (не менее 0,3%), которое определяется спектрофотометрически [101].

Лекарственными средствами из черники обыкновенной, применяемыми на территории Российской Федерации, являются «Черники обыкновенной плоды», «Черники обыкновенной побеги», побеги черники входят в состав сборов «Арфазетин-Э» (Красногорсклексредства), «Арф-Э» (Фитофарм). Также зарегистрирован гомеопатический препарат «Миртикам» [9]. В основном распространены биологически активные добавки («Черника-форте», «Окувайт» и др.), требования к которым значительно ниже, чем к лекарственным препаратам, и поэтому велика вероятность фальсификации.

### **1.1.9. Народно-хозяйственное значение черники обыкновенной**

Значимость в сознании людей этого растения отражает красивая легенда, повествующая о том, что волшебными и уникальными свойствами наделили чернику гномы в благодарность за убежище от различных опасностей, предоставленное им черничным лесочком [47].

Столь большая популярность ягод черники в народе связана не только с ее вкусом и красящими свойствами, но и значимостью ее как лечебного средства. На Руси издавна существовало поверье, что в доме, где едят чернику, врачу делать нечего [47].

Впервые лечебные свойства черники описали Плиний и Диоскорид (I в. н. э.), указавшие на ее ценные лечебные свойства при терапии желудочных заболеваний. В XVI знахарь Калпеппер отметил положительное влияние плодов черники на печень и желудок, при хроническом кашле, заболевании легких. Чернику стали активно применять при острых и хронических расстройствах желудочно-кишечного тракта, колитах, энтероколитах, дизентерии, а также местно – при стоматитах и гингивитах (вяжущее и антисептическое действие). Отвар из плодов – нежное вяжущее лекарственное средство, применяемое при расстройствах функции желудочно-кишечного тракта, особенно ценное в детской практике. Ягоды применяются также при циститах [47].

В годы Второй Мировой войны английские летчики употребляли черничный джем с целью улучшения зрения в сумерках. Черника давно входит в обязательное меню космонавтов [47, 115]. Такое действие плодов черники в большей степени обусловлено содержащимся в них комплексом антоцианов, многообразные фармакологические эффекты которых перечислены выше. Из-за своего положительного воздействия на зрение плоды черники входят в состав биологически активных добавок (Черника-форте, Окувайт, Черника с селеном и др.).

Входящие в состав черники антоцианы применяются в пищевой промышленности в качестве красителей (E163) [42, 75, 83]. Объединенный экспертный комитет по пищевым добавкам Всемирного общества

здравоохранения (ВОЗ) оценивает антоцианы как нетоксичные для организма человека и не ограничивает их потребление [115, 120, 127]. Кроме того, безопасность антоцианов подтверждают исследования их токсичности, а также клинические испытания [115]. Доказано, что антиоксидантная активность антоцианов более выражена, чем у альфа-токоферолов, аскорбиновой кислоты,  $\beta$ -каротина, и сравнима с синтетическими антиоксидантами - бутилгидроксианизолом и бутилгидрокситолуолом [98, 112].

Антоцианы обладают и антимикробными свойствами. Например, они препятствуют адгезии микроорганизмов к слизистой мочевого тракта. Для них обнаружена и гепатопротекторная, противовоспалительная активность. Упоминаются и эстрогеноподобные свойства антоцианов [98, 112].

Имеются сведения о проявлении антоцианами противоопухолевой активности [119]. Для цианидина-3-глюкозида и пеонидина-3-глюкозида было выявлено потенцирование действия доксорубина и снижения его токсической дозы на модели клеток линий рака легких. Антоцианы с *o*-дигидроксильной группировкой в кольце В (цианидин, пеларгонидин, дельфинидин) обладают большей противоопухолевой активностью по сравнению с другими (мальвидин, пеонидин, петунидин), что коррелирует с их антиоксидантной активностью [100, 119].

Клинические исследования показали положительный эффект применения антоцианов при терапии ломкости капилляров, тромбоцитарной пурпуре, нарушении кровообращения головного мозга, венозной недостаточности, варикозной болезни вен. Эти эффекты связаны со стабилизацией мембранных фосфолипидов и увеличением восстановления соединительной ткани, окружающей сосуда. При употреблении черничного экстракта в количестве 480 мг/день 47 пациентов были вылечены от варикоза вен [98].

Благодаря разнообразным фармакологическим эффектам антоцианы нашли клиническое применение. В настоящее время в европейских странах применяется стандартизованный 25% экстракт из плодов черники, применяемый в офтальмологии (для улучшения ночного зрения, лечения катаракты, макулярной

дегенерации, диабетической ретинопатии), для лечения сосудистых расстройств, а также пептических язв, дисменореи. В нашей стране на основе лекарственного растительного сырья, содержащего антоцианы, пока производятся только биологически активные добавки [97, 98].

Действующие вещества побегов черники обладают инсулиноподобным действием, вследствие чего входят в состав сборов, применяемых при сахарном диабете (Арфазетин) [9, 36].

Черника находит широкое применение и в других отраслях. Она широко используется в пищевой промышленности, из ягод готовят вино, кисель, соки, экстракты; сок черники – пищевой краситель при производстве плодовых вин, безалкогольных напитков [80].

Наземную часть используют для дубления и окрашивания кожи в коричневый и желтый цвета, из жмыха получают краситель, окрашивающий ткани, шерсть, шелк в красный и фиолетовый цвета. Раньше из черничного сока изготавливали пурпурные и фиолетовые краски для художников. Само растение – прекрасный медонос [47].

#### **1.1.10. Перспективы создания отечественных лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантным действием при различных офтальмологических заболеваниях**

Офтальмологические заболевания являются достаточно распространенными и по числу случаев заболеваний, выявленных (или взятых под диспансерное наблюдение) в течение года при обращении в лечебно-профилактические учреждения или при профилактическом осмотре болезни глаза и его придаточного аппарата занимают 5 место и составляют 7,0% от общего числа случаев заболеваний [50].

За последние годы наблюдается увеличение количества пациентов с офтальмологическими заболеваниями. В Приволжском федеральном округе заболеваемость населения офтальмологическими нарушениями, в том числе миопией, одна из самых высоких в Российской Федерации [50].

Для лечения офтальмологических заболеваний используют консервативную, лазерную хирургию, медикаментозное лечение, физиотерапевтические методы (электрофорез, электростимуляцию, магнитотерапию, УВЧ-терапию, магнитофорез, лазерную терапию и др.) и очковую коррекцию [50].

Анализ рынка лекарственных препаратов, применяемых при болезнях глаз и его придаточного аппарата (коды Н00-Н59 по международной классификации болезней 10 пересмотра) показывает, что он представлен препаратами различных групп по АТХ-классификации (средства для лечения заболеваний глаз, средства, влияющие на сердечно-сосудистую систему, средства, действующие на дыхательную систему и т.п.) и по разным данным представлен 170 - 250 международными непатентованными наименованиями (МНН), что соответствует 460 и 762 торговым наименованиям. Из общего количества ЛС, имеющих показания к применению при различных офтальмологических заболеваниях, упоминаемых в Регистре лекарственных средств, на рынке Самарской области присутствует 328 торговых наименования (72,2%); 143 МНН (86,7%) [52, 76].

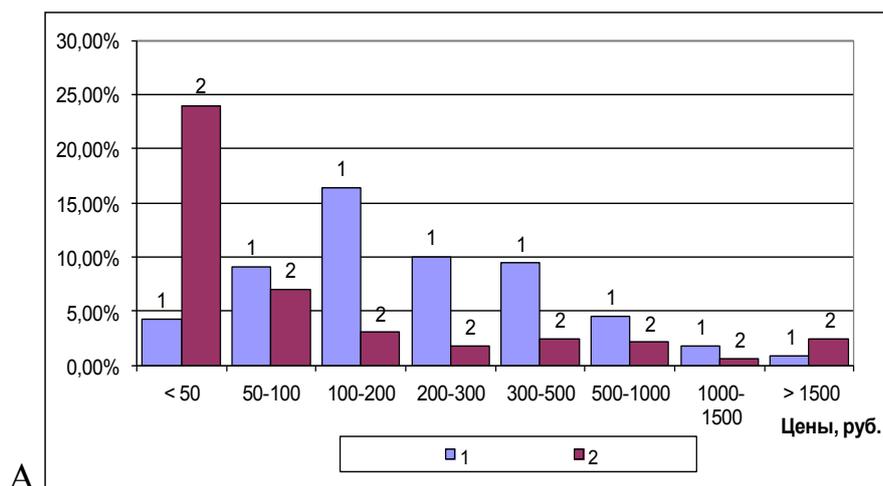
Доля зарегистрированных торговых наименований отечественных производителей от общего количества лекарственных препаратов, применяемых для лечения заболеваний глаз, составляет 51,1%, из них на рынке Самарской области присутствует 67,2% (48,5% от общего количества присутствующих ЛП на рынке региона). 38% от этого количества наименований представлено менее чем в 20 аптечных организаций. На долю отечественных лекарственных препаратов, которые имеются более чем в 200 аптечных организациях Самарской области, приходится 23% [52].

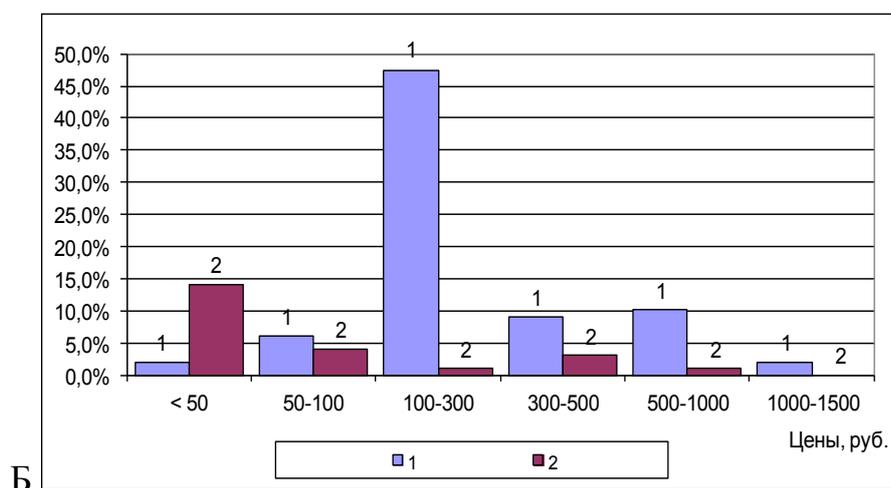
Лекарственные препараты, используемые при заболеваниях глаз, представлены преимущественно жидкими (61,6%) и твердыми лекарственными формами (32,0%). Среди жидких препаратов преобладают глазные капли (69,5% от всех лекарственных форм данной группы, 42,1% от общего количества наименований); среди твердых доминируют таблетки, в том числе для приготовления глазных капель (65,3% и 20,9% соответственно) [52, 53] (рис. 3).



Рисунок 3 – Лекарственные формы офтальмологических лекарственных средств.

Отечественные лекарственные препараты имеют более низкие ценовые характеристики по сравнению с зарубежными. Наибольшее количество зарегистрированных торговых наименований российских производителей (24% от общего количества присутствующих на рынке средств, назначаемых при болезнях глаз и его придаточного аппарата) имеют средние цены по Самарской области до 50 руб. Импортные препараты в основном имеют цену в диапазоне от 100 до 300 руб. [52] (рис. 4).





Б

Рисунок 4 – Ценовые характеристики лекарственных препаратов, применяемых при заболеваниях глаз: А – на фармацевтическом рынке Самарской области; Б – препаратов, представленных более чем в 200 аптечных организациях г. Самары. Обозначения: 1 – импортные препараты; 2 – отечественные препараты.

По происхождению преобладают препараты синтетического происхождения (примерно 80%); по количеству компонентов – монопрепараты (85,0%). Доля средств растительного происхождения составляет 5,4% [52].

По объему продаж в денежном выражении из импортных препаратов лидируют ЛС бельгийского, канадского и индийского производства (рис. 5).



А

Б

Рисунок 5 – Распределение объемов продаж офтальмологических лекарственных средств по странам: А – по количеству упаковок; Б – в денежном выражении.

Лидерами по объему продаж в денежном выражении являются Квинакс, Визин, Офтальмоферон; по количеству упаковок – Сульфацил-натрия, Тауфон, Визин (табл. 1).

Был проведен ABC-анализ ассортимента изучаемых лекарственных препаратов (рис. 6).

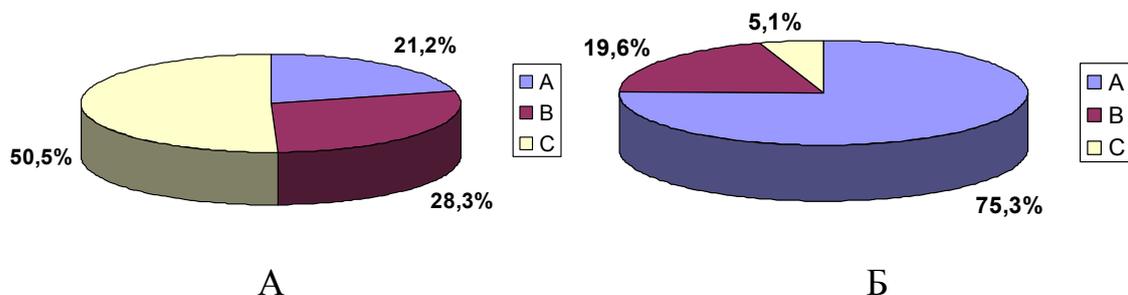


Рисунок 6 – Распределение торговых наименований по группам в соответствии с ABC-анализом: А – доли групп по количеству наименований; Б – доли групп в объеме продаж.

Следует отметить, что в группе А 5% от выручки приходится на препараты («Стрикс», «Витрум вижн форте»), содержащие антоцианы – природные антиоксиданты [52].

Следует отметить, что практически при всех офтальмологических заболеваниях, особенно ассоциированных с сердечно-сосудистой патологией, требуется дополнительное применение лекарственных препаратов с антиоксидантной, нейропротективной, антиагрегантной активностью, способностью ускорять регенеративные процессы [16, 17, 21, 26, 29, 44, 50, 56, 59].

Обзор литературы показывает, что выраженными антиоксидантными свойствами обладают лекарственные препараты, получаемые из растительного сырья, содержащие различные биофлавоноиды, в том числе антоцианоиды [16, 21, 26, 56, 133]. Хорошо себя зарекомендовали лекарственные средства, содержащие антоцианоиды плодов черники [16, 79, 98, 134]. Данные вещества обладают противовоспалительным и антиоксидантным действием [133]. Они способствуют улучшению реологических свойств крови (снижая тонус

сосудистой стенки и уменьшая тромбообразование), способствуют укреплению стенки кровеносных сосудов (эффект обусловлен способностью данных веществ влиять на регуляцию биосинтеза коллагена), а также ускоряют восстановление обесцвеченного родопсина [97, 98, 112]. Препараты на основе плодов черники могут использоваться при возрастной макулярной дегенерации, миопии, при «компьютерном зрительном синдроме, положительный эффект наблюдался в комплексном лечении диабетической ретинопатии, нейропротективной терапии первичной открытоугольной глаукомы [16, 17, 21, 26, 44]. Из препаратов, содержащих антоцианоиды плодов черники, Межрегиональной ассоциацией врачей-офтальмологов рекомендован Миртиллене форте (производитель S.I.F.I., Италия) [16].

В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует значительное количество биологически активных добавок на основе плодов черники, которые пользуются большой популярностью (более 50 наименований, лидеры продаж «Черника форте с витаминами и цинком», «Черника форте с лютеином» (ЗАО «Эвалар»)) [3, 52, 86]. Однако ассортимент лекарственных средств, содержащих антоцианы плодов черники, представлен в основном импортными препаратами («Стрикс» (Дания, Ферросан, стоимость 350-450 руб.), «Витрум вижн форте» (США, Unipharm Inc., стоимость №30 - 350-500 руб., №60 – 550-700 руб.), «Миртиллене форте» (Италия, S.I.F.I., стоимость 1100-1200 руб.)), хотя ареал черники в РФ достаточно обширен; из отечественных представлен только гомеопатический сироп «Миртикам» (ООО "Камелия НПП", стоимость 200-250 руб.) [9, 52, 53].

Следует отметить, что в настоящее время фармакопейным сырьем являются воздушно-сухие плоды черники обыкновенной [8], в то время как антоцианы являются очень лабильными соединениями и легко разрушаются под воздействием высоких температур, воздействия света и т.п. [90, 91, 122]. В Европейской Фармакопее имеются отдельные монографии на свежие плоды черники (источник антоцианов) и воздушно-сухие (источник дубильных веществ) [101].

Все это обуславливает необходимость регистрации в качестве фармакопейного лекарственного растительного сырья свежие плоды черники и разработки отечественного импортозамещающего лекарственного препарата на основе свежих плодов.

## **Выводы к главе 1**

1. Анализ данных литературы показал, что в настоящее время применение плодов черники обыкновенной в основном обусловлено содержащимися в них антоцианами – природными антиоксидантами с широким спектром фармакологической активности. Воздушно-сухие плоды черники являются источником дубильных веществ конденсированной группы и используются как мягкое вяжущее в педиатрии. Биологически активными соединениями побегов черники являются флавоноиды, дубильные вещества, фенилпропаноиды.
2. Фармакопейным сырьем в Российской Федерации являются побеги и воздушно-сухие плоды черники обыкновенной, в то время как в европейских странах в качестве ЛРС используют также свежие плоды для получения 25% экстракта. Применение свежих плодов обусловлено тем, что антоцианы являются лабильными соединениями и их потери при сушке могут достигать 60%. В связи с этим актуальным представляется разработка показателей качества и фармакопейной статьи для свежих плодов, а также в отличие от европейских стандартов стандартизация как свежего, так и воздушно-сухого сырья по содержанию антоцианов как наиболее лабильной группы биологически активных соединений.
4. Заболеваемость болезнями глаз и его придаточного аппарата в Российской Федерации достаточно высока; имеется потребность в эффективных и безопасных средствах с антиоксидантной, нейропротективной, капилляроукрепляющей активностью при различных офтальмологических расстройствах (миопия, возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия, др.) с целью их профилактики и предотвращения осложнений.

.5. В настоящее время рыночный ассортимент лекарственных средств на основе плодов черники представлен в основном препаратами зарубежного производства («Стрикс», «Миртиллене форте»), несмотря на то, что в Российской Федерации достаточно ресурсов для производства отечественных препаратов. Целесообразным представляется разработка отечественных импортозамещающих препаратов на основе черники обыкновенной с антиоксидантной активностью.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили образцы сырья – плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L., сем. Брусничные – *Vacciniaceae*), побегов брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L., сем. Брусничные – *Vacciniaceae*) и побегов толокнянки [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., сем. Вересковые – *Ericaceae*], заготовленные в период с 2012 по 2013 гг. Растения заготавливались на территории Пензенской области, Республики Марий Эл и др. Образцы сырья были собраны в различной фазе вегетации.

Образцы лекарственного растительного сырья:

- побеги черники обыкновенной, заготовленные в Пензенской области, Сосновоборский район, пос. Сосновоборск, 2012 г.;
- побеги черники обыкновенной, заготовленные в Республике Марий Эл, Волжский район, г. Волжск, 2013 г.;
- побеги брусники обыкновенной, заготовленные в Республике Марий Эл, Волжский район, г. Волжск, 2013 г.;
- побеги толокнянки обыкновенной, заготовленные в Республике Марий Эл, Волжский район, г. Волжск, 2012 г.;
- заводские образцы побегов черники обыкновенной (ООО «Алтай-фарм», г. Барнаул);
- свежемороженые плоды черники (ЗАО «Хладокомбинат западный», Московская область, г. Одинцово, ТУ 9165-002-47569210-00);
- образцы плодов из разных регионов РФ (Алтайский край, республика Татарстан);
- плоды черники воздушно-сухие (ООО ПКФ «Фитофарм» (г. Анапа, Краснодарский край), ЗАО «Иван-Чай» (г. Москва)).

Изучены лекарственные средства, субстанции, а именно:

1. Сок черники обыкновенной.
2. Сахар высшей очистки – рафинад, содержащий не менее 99,9% сахарозы в пересчете на сухое вещество, и воды не более 0,4% [29, 87, 101, 102].
3. Сорбит пищевой (ТУ 9325-001-51760333-2002)
4. Сироп на основе сорбита и сока черники

Состав: Упаренного сока черники	10,0%
сорбита	57,3%
воды очищенной	32,2%
кислоты лимонной	0,5%

5. Сироп сахарный с соком черники обыкновенной

Состав: Упаренного сока черники	10,0%
сахара-рафинада	57,3%
воды очищенной	32,2%
кислоты лимонной	0,5%

6. Индивидуальные соединения: рутин, арбутин, цианидин-3-О-глюкозид, кверцетин, даукостерин,  $\beta$ -ситостерин, кофейная кислота, кверцетин-3-О-ксилопиранозид.

Экспериментальные данные были получены с использованием следующих приборов и оборудования.

1. Аналитические весы «Mettler Toledo XS 204», весы Мора ВА-4М, весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20. Весы электронные САРТО ГОСМ ЛВ 210-А.
2. Спектрофотометры «Specord 40» (Analytik Jena).
3. рН-метр «MP-225».
4. Хроматографические пластинки «Силуфол УФ-254», «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» и гликозидные системы (хлороформ-этанол-вода и хлороформ-метанол-вода в различных соотношениях; *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода 4:1:2).
5. Цифровые микроскопы марки «Motic»: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.

6. Кривошипный таблеточный пресс.
7. Устройство для определения прочности твердых лекарственных средств при истирании.
8. Идентификатор распадаемости таблеток «ERWEKA».
9. Лабораторное устройство контроля качества ЛС на растворение «ЛОПТС».
10. Прибор для оценки прочности таблеток на сжатие «VARIAN VK 200».
11. Набор сит с размером отверстий 0,2; 0,5; 1; 2; 3 мм.
12. ЯМР-спектрофотометры «Varian-Gemini-200» и «Bruker AM 300».
13. Масс-спектрофотометр «Kratos MS-30».

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Методики анатомо-гистологического анализа**

Образцы исследуемого лекарственного растительного сырья выдерживали в горячей воде на кипящей водяной бане, фиксировали в смеси спирта этилового 96%, глицерина ректифицированного и воды очищенной в соотношении 1:1:1. Экспозицию объекта проводили в течение суток, после чего подвергали анатомо-гистологическому анализу.

Приготовление микропрепаратов осуществляли в соответствии с фармакопейной методикой микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья [7, с. 279; 14]. Препараты кожуры и околоплодника с поверхности, поперечные срезы плодов и семян в ряде случаев готовились также с нативного сырья.

Окраску микропрепаратов осуществляли следующими способами:

1. Окрашивание одревесневших (лигнифицированных) оболочек клеток. Срезы на предметном стекле помещали в каплю раствора сернокислого анилина, накрывали покровным стеклом. Наблюдали окрашивание одревесневших оболочек клеток в желтый цвет.

2. Окраска жирного масла. Срезы на часовом стекле помещали в каплю раствора Судана III на 10-20 мин, затем промывали водой и переносили на предметное стекло в каплю глицерина. Наблюдали окрашивание капель жирного масла в желто-оранжевый цвет.

Реактивы готовились в соответствии с методиками, изложенными в [7, 13, 51].

Так как объектами исследования являлись плоды, содержащие антоцианы, то на препаратах, приготовленных с нативного сырья, была проведена качественная реакция на эти соединения – с разбавленным раствором натрия гидроксида.

### 2.2.2. Физические методы анализа

Плотность образцов сиропа определяли с использованием набора ареометров общего назначения ИСП.АI (ГФ XII, ч.1, с. 40, метод 3).

Величину рН измеряли при помощи электронного рН-метра «MP-225» (ГФ XII, ч.1, с. 89-90).

Оценка внешнего вида таблеток проводилась визуально на наличие дефектов размера, цвета, поверхности (наличие выступов, сколов, крошений, царапин, слипаний и др.).

Механическую прочность таблеток определяли с помощью устройства для истирания таблеток барабанного типа – фриабилляторе при скорости вращения 20 об/мин. 10 таблеток, предварительно обеспыленных и взвешенных с точностью до 0,001 г, помещали в барабан, привинчивали крышку и включали прибор на 5 мин (100 оборотов барабана). По истечении установленного времени таблетки обеспыливали и определяли массу с точностью до 0,001 г.

Прочность таблеток на истирание определяли по формуле:

$$П = 100 - \frac{P_{нач} - P_{кон}}{P_{нач}} \cdot 100;$$

где  $P_{нач}$ ;  $P_{кон}$  – масса таблеток до и после испытания соответственно, г.

Для определения распадаемости таблеток использовался идентификатор распадаемости таблеток (Erweka) (рис. 8). Прибор состоит из сборной корзинки,

сосуда для жидкости вместимостью 1 л, термостатического устройства, поддерживающего температуру  $37\pm 2^\circ\text{C}$  и электромеханического устройства, сообщающего корзинке возвратно-поступательное движение в вертикальной плоскости при частоте 28-32 цикла в 1 мин. Корзинка снабжена 6 направляющими дисками, вставленными в стеклянные трубки. Испытание проводили на 6 образцах. Если 1 или 2 таблетки не распались, испытание проводили на 12 образцах. Норма распадаемости для обычных таблеток – 15 мин. Этот метод позволяет косвенно судить о времени распадаемости таблеток в желудочно-кишечном тракте.

Среднюю массу таблеток определяли путем взвешивания 20 таблеток с точностью до  $\pm 0,0001$  г. Массу отдельных таблеток определяли взвешиванием порознь 20 таблеток с точностью до  $\pm 0,0001$  г. Допустимые отклонения для таблеток массой 0,3 г и более  $\pm 5\%$  от средней массы таблеток.

### **2.2.3. Химические методы**

При проведении фитохимического исследования нами использовались следующие пробирочные реакции:

1. Цианидиновая реакция (проба Shinoda). К 1-2 мл исследуемого образца прибавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 5-10 мг магния. Образуется красно-малиновое окрашивание (флавоноиды) [36, 84].
2. Цианидиновая реакция по Брианту (продолжение первой реакции). Раствор, полученный в реакции 1, разбавляют водой и обрабатывают изоамиловым спиртом. При наличии агликона окраска переходит в органическую фазу, а при наличии гликозида – остается в водном растворе [36, 84].
3. В пробирку помещают 2 мл исследуемого препарата, прибавляют 2 мл 1-2% раствора алюминия хлорида (III), образуются окрашенные соединения (желтого цвета), имеющие желто-зеленую флуоресценцию при длине волны 366 нм (батохромный сдвиг) (флавоноиды, фенольные соединения) [36, 84].

4. Борно-лимонная реакция (реакция Вильсона). К 1-2 мл исследуемого образца прибавляют 1-2 капли раствора борной кислоты в присутствии лимонной (или щавелевой) кислоты. Образуется ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией (образование батохромного комплекса). В случае участия в реакции 3-ОН-группы образуется устойчивый (пятичленный) комплекс, который не разрушается при добавлении лимонной или щавелевой кислоты [36, 84].

5. Реакция с diazo-реактивом (диазобензолсульфокислота – ДСК в щелочной среде). К 1-2 мл исследуемого образца прибавляют 1-2 капли раствора ДСК. Раствор окрашивается в желтый цвет [36, 84].

6. Кислотный гидролиз. 10 мг гликозида нагревают с 3 мл 2% раствора HCl на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Полноту гидролиза проверяют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Из охлажденной смеси отфильтровывают кристаллы агликона через взвешенный стеклянный фильтр. Водный раствор упаривают в вакууме и используют для идентификации углеводов [36, 84].

#### **2.2.4. Хроматографические методы**

##### **2.2.4.1. Тонкослойная хроматография**

В процессе разделения хроматографическим методом в тонком слое сорбента анализируемая смесь перемещается с подвижной фазой по тонкому слою порошкообразного сорбента, закрепленным на стеклянной, алюминиевой или полимерной подложке. Хроматографическое разделение основано на различиях в их скоростях миграции. В основе механизма разделения лежит характер взаимодействия между растворенными веществами и твердой или жидкой фазами, с которыми они соприкасаются (адсорбция, ионный обмен, распределение между жидкостями подвижной и неподвижной фаз). Для обнаружения соединений на пластинках используются физические (флуоресценция при облучении с длиной волны 254 и 366 нм), химические, биологические и комбинированные методы [27].

В исследовании ТСХ-разделение проводили на хроматографических пластинках “Силуфол УФ-254”, “Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ” или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Пластинки предварительно выдерживали для активации в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 1 часа. Пробы наносили микропипеткой на линию старта, проведенную на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки вдоль линии накатки, так чтобы пятна отстояли друг от друга на расстоянии около 1 см. После нанесения проб пластинку высушивали на воздухе в течение 5 мин, затем помещали в предварительно насыщенную парами растворителей камеру и хроматографировали восходящим способом в различных системах (хлороформ-метанол-вода 26:14:3; хлороформ-этанол-вода 26:16:3; хлороформ-0,1% спиртовой раствор HCl - вода 26:16:3, 1% спиртовой раствор HCl; н-бутанол - ледяная уксусная кислота-вода 4:1:2; 4:1:5 (верхняя фаза) и др.). Когда фронт растворителей проходил около 8-9 см, пластинку вынимали и сушили на воздухе в течение 5-10 минут до удаления запаха растворителей. Детекцию проводили в видимой области спектра и в УФ-свете (254 и 366 нм), а также после обработки раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе натрия карбоната.

#### 2.2.4.2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография

В основе разделения методами адсорбционной жидкостной хроматографии лежит адсорбция - физическое взаимодействие между молекулами пробы (сорбата) и неподвижной фазы (сорбента), а также между молекулами подвижной фазы (элюента) и сорбента [21, 40].

При исследовании химического состава плодов черники в качестве исходного материала для нанесения на сорбент использовали сок плодов, нестабилизированный. После отжима свежих плодов (50,0 г) их промывали небольшим объемом 95% спирта. Полученный сок упаривали в роторно-вакуумном испарителе при температуре 60±2 °С. Сгущенный сок высушивали при комнатной температуре на сорбенте Silica gel для хроматографии L 40/100 (20,0 г).

Для заполнения колонок использовали суспензионный метод. В хроматографическую колонку на предварительно сформированный в хлороформе слой сорбента (толщина слоя сорбента 7 см, диаметр 4,5 см) переносили порошок (сок + сорбент). Элюирование проводили в градиентном режиме смесями хлороформа и этилового спирта, содержащего 0,1% хлористоводородной кислоты (хлороформ, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%-ное содержание подкисленного этилового спирта в хлороформе, подкисленный этиловый спирт). Фракции собирали объемам по 100 мл; упаривали в ротаторно-вакуумном испарителе при температуре  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  до остаточного объема 5-6 мл.

Целевые фракции, содержащие антоцианы, рехроматографировали на полиамиде (полиамид «Woelm») в градиентном режиме от хлороформа к метанолу и ступенчатом увеличении значения рН. Для этого объединенные упаренные фракции наносили на слой полиамида (толщина слоя 3 см; диаметр – 2 см. В качестве элюентов использовались хлороформ, смеси хлороформа и метанола, содержащего 0,1% хлористоводородной кислоты, в различных соотношениях (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 4:6); подкисленный метанол.

Ход хроматографического разделения контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в нескольких системах с использованием различных способов детекции (визуально в видимой области; в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм).

Фракции, содержащие преимущественно индивидуальные антоцианы, объединяли и упаривали при комнатной температуре до сухого остатка. Структуру веществ определяли с использованием методов спектроскопии ядерно-магнитного резонанса и масс-спектрометрии.

С целью изучения химического состава побегов получали настойку из побегов черники в соотношении «сырье – экстрагент» 1:5 с использованием в качестве экстрагента 70% этилового спирта. Полученную настойку упаривали и смешивали с силикагелем L40/100 (Чехия), высушивали до получения сыпучего порошка. Хроматографическое разделение проводили на сорбенте силикагеле L40/100 с использованием в качестве элюентов хлороформа, спирто-

хлороформных смесей в различных соотношениях, 95% спирта этилового. Очистку веществ проводили хроматографией на полиамиде (Woelm) и силикагеле L40/100 и перекристаллизацией. Выделенные в результате хроматографического разделения вещества были изучены с помощью УФ-,  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений.

#### 2.2.4.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе Biotronic; хроматографическая колонка Phenomenex Luna C18(2) (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм), элюент А – ацетонитрил; элюент В - 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , подкисленный  $\text{H}_3\text{PO}_4$  до pH  $3,00 \pm 0,01$ , расход подвижной фазы - 0,6 мл/мин, объем инжестируемой пробы 20 мкл. Режим элюирования – градиентный, двухступенчатый: элюент А 20% 9 мин; подъем до 40% за 1 мин, 20 мин - 40% А. После фильтрования через слой алюминия оксида (х.ч., нейтральный II по Брокману) анализ проб проводили в изократическом режиме элюирования при 10% элюента А. Рабочая длина волны 280 нм была выбрана на основании спектра поглощения стандартного образца арбутина.

#### 2.2.5. Спектральные методы (УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия)

При изучении химического состава использовались УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, а также сочетание экстракционных методов и перекристаллизации.

Спектральные свойства выделенных веществ изучали с использованием следующих методов: ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Varian-Gemini-200» (200 МГц) и «Bruker AM 300» (300 МГц). Масс-спектры электронного удара регистрировали на масс-спектрометре «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и варьировании температуры ионного источника от 100 до 250 °С. Определение температуры плавления выделенных веществ осуществляли на блоке Кофлера.

#### 2.2.5.1. Электронная спектроскопия (ультрафиолетовая и видимая область спектра (180-700 нм))

Этот метод основан на регистрации электронных спектров поглощения, связанных с переходом валентных электронов с занятых орбиталей основного электронного состояния на вакантные орбитали возбужденного состояния. Данный метод может быть использован для качественного и количественного анализа.

В исследовании регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190-700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. С помощью данного метода были сняты кривые поглощения выделенных антоцианов.

С использованием данного метода разрабатывалась методика количественного определения антоцианов в свежих и воздушно-сухих плодах черники обыкновенной с использованием значения удельного показателя поглощения стандартного образца цианидина-3-О-глюкозида, а также методика определения суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной.

Результаты измерений обрабатывались с помощью программ WinASPECT и Microsoft Excel.

### **2.2.6. Технологические методы**

В исследовании использованы механические (отжим плодов, измельчение и смешение твердых материалов, просеивание, обработка материалов прессованием), гидромеханические (фильтрование, перемешивание в жидких средах), тепловые (нагрев, выпаривание) и массообменные (сушка, экстракция, растворение) процессы.

#### 2.2.6.1. Получение сока из плодов черники обыкновенной

Сок получали отжимом быстрозамороженных плодов черники обыкновенной после предварительной разморозки при комнатной температуре. Полученный сок фильтровали через два слоя марли, оставляли в холодильнике при температуре  $7 \pm 2$  °C на 7 дней для отстаивания. Осадок отфильтровывали под

вакуумом в колбу Бюнзена через воронку Бюхнера. В качестве фильтровального материала использовали фильтровальную бумагу («красная лента»). Для стабилизации использовали спирт этиловый и кислоту сорбиновую.

В связи с термолабильностью действующих веществ в плодах черники для сгущения исходного и стабилизированного сока рассматривались следующие варианты концентрирования под вакуумом:

- в роторно-вакуумном испарителе при  $60 \pm 2$  °С до 1/5-1/6 от первоначального объема; досушивание на водяной бане до остаточной влажности 18-22%;

- в вакуум-сушильном шкафу при  $40 \pm 2$  °С при остаточном давлении не более 4,9 кПа до остаточной влажности 15-20%.

#### 2.2.6.2. Таблетирование

Таблетирование осуществляли на кривошипной таблеточной машине (рис. 7).



Рисунок 7 – Напольная кривошипная таблеточная машина салазочного типа.

В основном прессование осуществляли, минуя стадию гранулирования (прямое прессование). Прямое прессование позволяет исключить 3–4 технологические операции и, таким образом имеет преимущество перед таблетированием с предварительным гранулированием порошков [9].

### 2.2.6.3. Оценка показателей качества таблеток

Контроль качества готовых таблеток проводился в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Таблетки» (ГФ СССР XI изд., вып. 2, с. 155-159) и ОФС 42-0003-04 «Растворение» по показателям:

- органолептические свойства;
- механическая прочность;
- распадаемость;
- растворение;
- средняя масса таблеток и отклонение в массе отдельных таблеток;
- содержание лекарственных веществ в таблетках.

Определение органолептических свойств, механической прочности, распадаемости и средней массы описаны в разделе, посвященной физическим методам.

Для определения количественного содержания антоцианов в таблетках 0,1 г (точная навеска) растертых таблеток (не менее 20 штук) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 20 мл 95% спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты, перемешивали при комнатной температуре 20-25 мин, фильтровали через бумажный фильтр марки «красная лента» в мерную колбу емкостью 100 мл. Операцию повторяли трижды, последний раз нагревали на водяной бане 15 мин. Объем раствора доводили до метки 95% спиртом, содержащим 1% HCl. Полученный раствор спектрофотометрировали при длине волны 546 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Тест «Растворение» проводили на аппарате «Вращающаяся корзинка» (рис. 9). Количество вещества, перешедшего в раствор определяли как среднее для 6 таблеток. Испытуемый образец помещали в сухую сетчатую корзинку цилиндрической формы с диаметром отверстий 0,25 мм. В качестве среды растворения использовали воду (500 мл). При испытании корзинка вращалась в среде для растворения со скоростью 100 об/мин. В процессе определения температура поддерживалась с помощью термостата на уровне  $37 \pm 1$  °C.



Рисунок 8 – Идентификатор  
распадаемости таблеток (Erweka).



Рисунок 9 – Лабораторное  
устройство для контроля качества  
ЛС на растворение (ЛОПС).

Через 45 мин раствор фильтровали через фильтровальную бумагу марки «Синяя лента». К 5 мл полученного фильтрата добавляли 2 мл 95% этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты, и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 527 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения готовили путем добавления к 5 мл воды 2 мл этилового спирта, содержащего 1% HCl.

Расчет количества вещества, перешедшего за это время в раствор, проводился по формуле:

$$X = \frac{A * 7 * 500 * 100}{5 * 250 * 100 * a};$$

где  $A$  – оптическая плотность анализируемого раствора;

$a$  – среднее содержание антоцианов в одной таблетке, г.

Таблетки считались качественными, если за 45 минут в раствор переходило не менее 75% содержащихся действующих веществ в лекарственной форме.

#### 2.2.6.4. Определение стабильности сиропа черники в процессе хранения

Проводили долгосрочное испытание сиропа на стабильность (хранение в естественных условиях) на трех образцах сиропов [90]. Датой отсчета испытаний приняли дату завершения аналитического исследования сиропа по описанным

выше методикам. Сироп хранили в прохладном, защищенном от света месте в наполненных доверху плотно закупоренных флаконах из темного стекла. Образцы хранили в закрывающемся шкафу, исключающем попадание прямых солнечных лучей, при относительной влажности воздуха не выше 70%. Влажность контролировали гигрометром психрометрическим типа ВИТ-1. Стабильность сиропа устанавливали через год по показателям: внешний вид, запах, вкус, плотность, показатель преломления, значение рН, количественное содержание суммы антоцианов.

### **2.2.7. Титриметрические методы**

В исследовании использовали фармакопейный метод определения дубильных веществ (метод Левенталя в модификации А.Л. Курсанова, перманганатометрический метод) в побегах и плодах черники обыкновенной [7].

### **2.2.8. Фармакологические методы**

Изучение диуретической активности проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180-220 г. Животные содержались в виварии на обычном рационе при свободном доступе к воде. За день до опыта крысы получали внутривентрикулярно водную нагрузку в объеме 3% от массы тела [24]. В день эксперимента животным контрольной группы при анализе водных извлечений вводилась водная нагрузка, при анализе водно-спиртовых извлечений - спирт этиловый в концентрации, соответствующей анализируемым образцам и разведенный аналогичным образом; опытным группам при помощи внутривентрикулярного зонда вводился лекарственный препарат в эквивалентном объеме [23]. Водные извлечения вводили в двух дозах (50 и 100 мг/кг), водно-спиртовые в дозе 50 мг/кг. Всего было поставлено 20 серий экспериментов 10 опытных и 10 контрольных (по 10 животных в каждой серии).

Животные помещались в обменные клетки на 24 часа. По истечении 4 и 24 ч собранная моча анализировалась и подвергалась исследованию [24]. Определялась экскреция воды, регистрировалась концентрация натрия и калия методом пламенной фотометрии на ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим

методом на КФК-3. Статистическая обработка полученных результатов экспериментов проводилась с использованием стандартных методов вариационной статистики при помощи программ Microsoft Excel 2010 «Пакет анализа», Statistica 8.0 по критерию Манна-Уитни.

### ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ К НЕЙ ВИДОВ

В настоящее время в традиционной медицине используются значительное количество лекарственных растений [28, 36, 46]. При этом возникает проблема корректной диагностики лекарственного растительного сырья (ЛРС) морфологически сходных видов на этапе заготовительных мероприятий, при приемочном контроле сырья в цельном и особенно измельченном состоянии [62, 63]. В связи с широким внедрением в практику различных современных методов качественного и количественного анализа, а также усовершенствованием инструментального оснащения, возрастают возможности для идентификации ЛРС [62, 63]. Одним из путей решения данной проблемы является включение в нормативную документацию (фармакопейные статьи, фармакопейные статьи предприятий) морфолого-анатомического описания диагностических признаков сырья с применением цифровых микрофотографий [64].

Для черники обыкновенной фармакопейным сырьем являются плоды и побеги. Как уже отмечалось, исследование по морфолого-анатомическому исследованию плодов ранее на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии [17, 18, 19, 31]. Для побегов черники обыкновенной к морфологически сходным видам ЛРС, при идентификации которых могут возникнуть сложности, можно отнести листья брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* (L.) сем. *Vacciniaceae*), листья толокнянки (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., сем. *Ericaceae*). Морфологическое сходство объясняется близким родством указанных видов, входящих в порядок *Ericales* Lindl. Подкласса *Dilleniidae* [81]. При заготовке данные виды растений могут выступать примесными по отношению друг к другу, поскольку они имеют общий ареал и местообитание [2, 11, 36].

### **3.1. Сравнительное морфологическое исследование побегов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной**

По своим морфологическим свойствам черника обыкновенная представляет собой многолетний полукустарник высотой 15-40 см с многочисленными зелеными острорезбристыми веточками. Цветки одиночные, расположены при основании молодых веточек, поникающие, с кувшинчато-шаровидным зеленовато-розовым венчиком. Плод – черная ягода с сизым налетом, шарообразная, приплюснутая или несколько удлинённая, диаметром 6-8 мм, блюдцевидным широким вдавлением на верхушке – диском. Семена многочисленные (рис. 10А) [48, 55, 66].

Брусника обыкновенная – вечнозеленый прямостоячий полукустарничек 5-25 см высотой, с ползучим длинным корневищем и ветвистым стеблем. Молодые ветви зеленые, слабо короткоопушенные. Цветки собраны на концах прошлогодних ветвей в плотные поникшие кисти по 3-8, венчик колокольчатый, бледно-розовый или почти белый. Плод – шаровидная или слегка приплюснутая 4-гнездная ягода. Семена многочисленные (рис. 10Б) [48, 55].

Толокнянка обыкновенная – вечнозеленый, стелющийся, длиной 30-130 см, сильноветвящийся кустарничек с красно-бурой корой. Молодые ветви зеленые, мелко опушенные. Цветки расположены на концах ветвей в коротких поникающих кистях. Венчик розовый, кувшинчатый, с 5-зубчатым отгибом. Плод – слегка приплюснутая костянка, красная с легкой желтизной, ягодообразная, 6-8 мм диаметром. Полноценных семян в плоде 1-2 (рис. 10В) [48, 55].



Рисунок 10 – Гербарные образцы исследуемых растений (*гербарный фонд кафедры фармакогнозии СамГМУ, образцы 2012 года, собранные в Республике Марий Эл*): А – черники обыкновенная; Б – брусника обыкновенная; В – толокнянка обыкновенная.

Анализ внешних признаков лекарственного растительного сырья исследуемых видов показал, что все образцы соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи СССР XI издания и частных фармакопейных статей [8, 82]. Результат сравнения основных диагностических признаков листьев (рис. 11), изучаемых объектов приведен в таблице 2.



Рисунок 11 – Морфологические признаки листьев исследуемых видов: А – верхний эпидермис; Б – нижний эпидермис. *Обозначения: 1 - черники обыкновенная; 2 – брусника обыкновенная; 3 – толокнянка обыкновенная.*

Таблица 2 – Сравнительная характеристика морфологических признаков листьев черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной.

<b>№</b>	<b>Признак</b>	<b>Черника обыкновенная</b>	<b>Толокнянка обыкновенная</b>	<b>Брусника обыкновенная</b>
1.	Размеры листовой пластинки:			
	Длина, см	0,5-2,8	1,0-2,1	1,0-2,9
	Ширина, см	0,6-1,6	0,6-1,1	0,4-1,4
2.	Форма листовой пластинки	Яйцевидная или эллиптическая	Обратнойцевидная или удлиненно- овальная, к основанию клиновидно- суженная	Обратнойцевидная или эллиптическая
3.	Край листовой пластинки	Мелкопильчатый	Цельный	Цельный или слегка зазубренный, завернутый вниз
4.	Верхушка листовой пластинки	С мягким шипиком	Цельнокрайная	Притупленная с чуть заметной выемкой
5.	Цвет листовой пластинки	Снизу и сверху – светло-зеленые	С верхней стороны блестящие, темно- зеленые с заметными вдавленными жилками; с нижней стороны – светло- зеленые, матовые	Сверху темно- зеленые, снизу светло-зеленые, с заметными темно- коричневыми точками
6.	Длина черешка, мм	0,5-2	1,0-5,0	0,5-1,5
7.	Структура	Хрупкие, тонкие	Кожистые, плотные	Кожистые, плотные

По результатам сравнительного морфологического анализа исследуемых видов можно сказать, что есть небольшие различия в форме края листовой пластинки, цвете верхнего и нижнего эпидермиса, длине черешка и структуре.

Однако эти различия незначительны и не могут быть использованы для однозначной диагностики ЛРС, особенно если оно в измельченном состоянии. В связи с этим необходимы дополнительные анатомо-гистологические исследования сырья черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной.

### **3.2. Сравнительное анатомо-гистологическое исследование побегов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной**

Анатомо-гистологическое исследование изучаемых видов лекарственного растительного сырья проводили в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» и требованиями частных фармакопейных статей [7].

При рассмотрении, сравниваемых листьев с поверхности, видны клетки эпидермиса. У толокнянки клетки верхнего и нижнего эпидермиса преимущественно изодиаметрической формы с прямыми утолщенными стенками, полигональные, мелкие (длиной 29-46 мкм, шириной 22-36 мкм); у брусники клетки верхнего эпидермиса слабоизогнутые длиной 21-50 мкм, шириной 21-35 мкм, клетки нижнего эпидермиса слабоизвилистые длиной 10-50 мкм, шириной 8-38 мкм; у черники клетки эпидермиса с верхней и нижней стороны с извилистыми тонкими стенками длиной 31-80 мкм, шириной 20-65 мкм (рис. 12-13).

Устьица у всех изучаемых видов расположены на нижнем эпидермисе (гипостоматический тип). У черники устьица вытянутой **колпачковидной** [64] формы, длиной 21-30 мкм, шириной 15-20 мкм, окружены 4-6 околоустьичными клетками (анамоцитного типа). У толокнянки устьица присутствуют только на нижнем эпидермисе, они **чечевицевидные** [64], длиной 35-45 мкм, шириной 41-50 мкм, с узкой устьичной щелью, широким передним двориком (преддверьем, криптой), отграниченным от внешней среды кутикулярным сводом, имеющим в центре отверстие; околоустьичных клеток 6-9 (анамоцитного типа). У брусники

устыица многочисленные, мелкие, сферовидной [64] формы, длиной 18-30 мкм, шириной 10-15 мкм, окружены 4 околоустьичными клетками. Встречаются клетки с бурым содержимым (рис. 13).

Необходимо отметить, что форма устьичных клеток весьма характерна для сравниваемых видов и является весомым признаком в их диагностики.

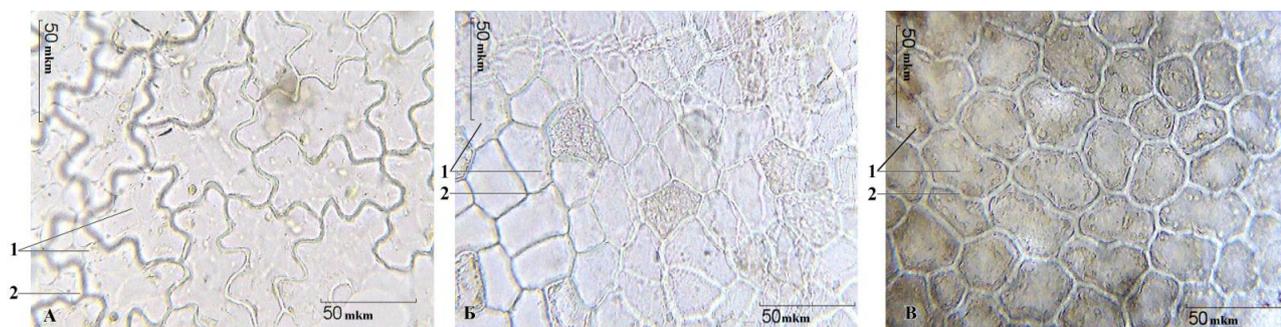


Рисунок 12 – Сравнение верхнего эпидермиса листовой пластинки исследуемых видов: А – черника обыкновенная; Б – брусника обыкновенная; В – толокнянка обыкновенная. Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – клеточная стенка.

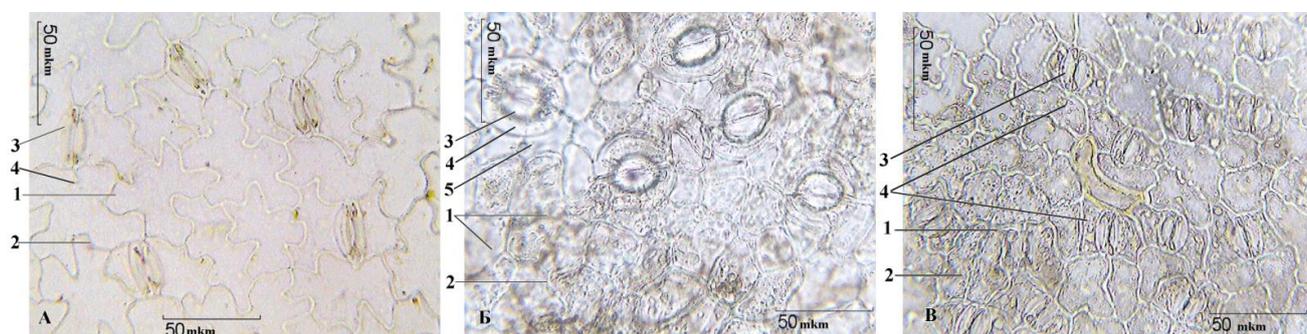


Рисунок 13 – Сравнение нижнего эпидермиса листовой пластинки исследуемых видов: А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная. Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – клеточная стенка; 3 – устьица; 4 – околоустьичные клетки.

У черники обыкновенной по жилкам с верхней стороны расположены одноклеточные, толстостенные прямые волоски с грубой бородавчатой поверхностью длиной 23-52 мкм. На обеих сторонах листа (по жилкам и на краевых зубцах) встречаются булавовидные железки длиной 150-200 мкм с

многоклеточной двурядной ножкой и многоклеточной головкой с бурым содержимым (длина головки 60-80 мкм, ширина 50-65 мкм).

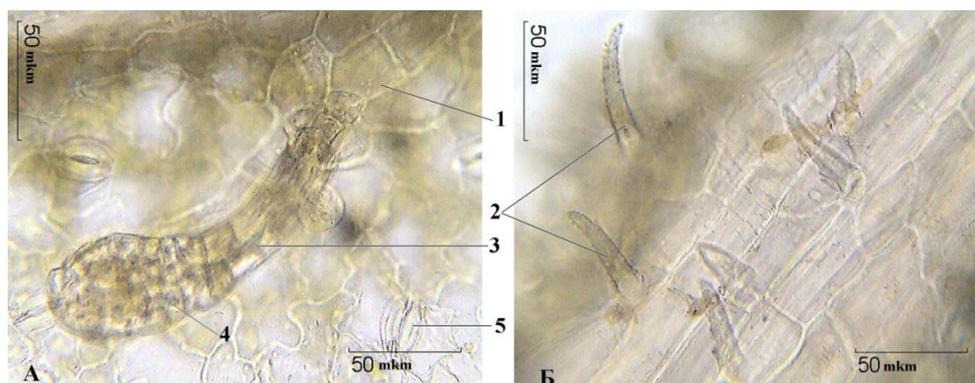


Рисунок 14 – Трихомы черники обыкновенной: А – булавовидная железка; Б – прямые волоски. Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – волоски; 3 – ножка железки; 4 – головка железки; 5 – устьице.

Лист брусники обыкновенной аналогично чернике на нижней стороне имеет булавовидные железки с бурым содержимым, длиной 160-240 мкм, высота головки 105-130 мкм, ширина 65-100 мкм (рис. 15А, Б). По жилкам и на черешке листа брусники встречаются одноклеточные волоски с толстыми стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью длиной 100-140 мкм (рис. 15В).



А Б В  
Рисунок 15 – Трихомы брусники обыкновенной: А – Эпидермис. Железки (x40); Б – Эпидермис. Железки (x100); В – Поперечный срез черешка. Волоски. Окраска суберином (x40). Обозначения: 1 – булавовидная железка; 2 – жилка; 3 – клетки эпидермиса.

Листовая пластинка толокнянки не опушена. Однако на эпидермисе черешка листа толокнянки, особенно с верхней стороны, расположены простые и

головчатые волоски. Простые волоски длинные 1-2-клеточные, длинные, изогнутые. Головчатые волоски (длиной 25-40 мкм) на 1-2 клеточной ножке с многоклеточной головкой с содержимым коричневого цвета.

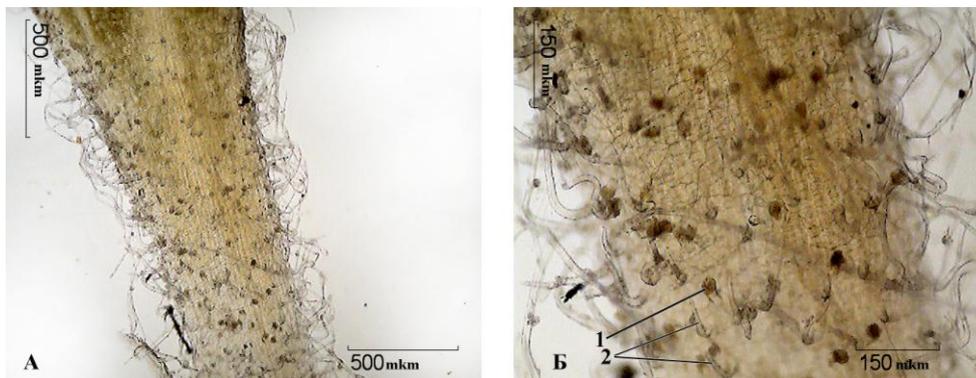


Рисунок 16 – Трихомы толокнянки обыкновенной: А – увеличение x 40; Б – увеличение x 100. Обозначения: 1 – головчатые волоски; 2 – простые волоски.

Особенность опушения сравниваемых листьев является скорее общим признаком для представителей семейства *Vacciniaceae* и *Ericaceae* и не достаточным для диагностики подлинности.

При рассмотрении с поверхности у черники обыкновенной вдоль жилок с нижней стороны листа выражена кристаллоносная обкладка (рис. 17). У толокнянки крупные жилки сопровождаются кристаллами оксалата кальция в виде призм, кристаллов и друз. У брусники в мезофилле встречаются редкие одиночные призматические кристаллы оксалата кальция и друзы, более часто ближе к жилкам и в черешках.



Рисунок 17 – Кристаллы исследуемых видов: А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная. Обозначения: 1 – жилка, 2 – кристаллы оксалата кальция, 3 – клетки эпидермиса; 4 – устьице; 5 – клетки мезофилла, 6 – межклетники.

При анализе поперечных срезов листовых пластинок выявлено, что у всех сравниваемых видов они имеют дорсовентральное строение. Толщина листовой пластинки у черники обыкновенной в области главной жилки достигает 230-290 мкм, по бокам от главной жилки 110-140 мкм; у толокнянки обыкновенной – 200-300 мкм и 210-250 мкм соответственно и у брусники – 300-360 мкм и в области главной жилки и по бокам от нее.

У черники обыкновенной адаксиальная сторона главной жилки уплощена или вдавлена, абаксиальная – сильно выпуклая, округлой формы (рис. 18А). Кристаллы содержатся в клетках с тонкими оболочками (рис. 17А). Край листа не имеет механических элементов. На крупных жилках кутикула с обеих сторон листа имеет хорошо различимые складки; местами складчатость кутикулы встречается и между жилками.

Верхний эпидермис листа черники подстилается одним рядом довольно рыхлых палисадных клеток (рис. 18А), высота которых сильно варьирует (20-48 мкм). Губчатая паренхима очень рыхлая, с лопастными клетками. Жилки имеют тяжи волокон, сопровождающие проводящие пучки. В главной жилке кроме волокон, может быть развита с обеих сторон колленхима (рис. 18А, 19А).

При анатомическом исследовании поперечного среза листа толокнянки обыкновенной видно, что палисадная паренхима образует несколько неправильных рядов. Она представлена клетками неправильной формы и занимает до половины толщины листа. Губчатая паренхима очень рыхлая с крупными воздухоносными полостями, клетки нелопастные, но чаще неправильной формы (рис. 18Б). Наружная стенка эпидермальных клеток сильно утолщена и кутинизирована (рис. 18Б). Сверху и снизу крупных жилок непосредственно под эпидермисом располагается уголковая колленхима. По краю листа также тянется колленхима, занимающая субэпидермальное положение (рис. 18Б, 19Б). Вдоль жилок встречаются кристаллы оксалата кальция (рис. 18Б, 19Б).

У брусники под верхним эпидермисом располагается несколько неправильных рядов палисадной паренхимы (толщина 75-120 мкм), занимающей менее половины толщи пластинки (рис. 18В). Губчатая паренхима очень рыхлая с

крупными воздухоносными полостями (рис. 18В). Наружная стенка клеток сильно кутинизирована. Сверху и снизу от проводящего пучка хорошо развиты тяжи волокон. По краю листа также наблюдается уголковая колленхима. В мезофилле встречаются редкие одиночные кристаллы и друзы оксалата кальция (рис. 18В).

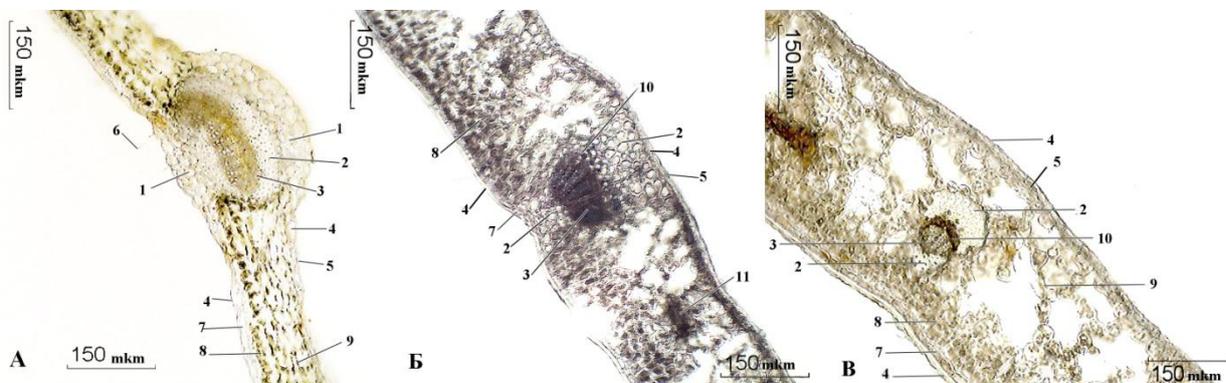


Рисунок 18 - Поперечные срезы листа исследуемых видов растений (x100): А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная. *Обозначения: 1 – колленхима; 2 – механическая ткань; 3 – проводящий пучок; 4 – кутикула; 5 – нижний эпидермис; 6 – толстостенный волосок; 7 – верхний эпидермис; 8 – столбчатая паренхима; 9 – губчатая паренхима; 10 - флоэма; 11 – проводящий пучок не главной жилки.*

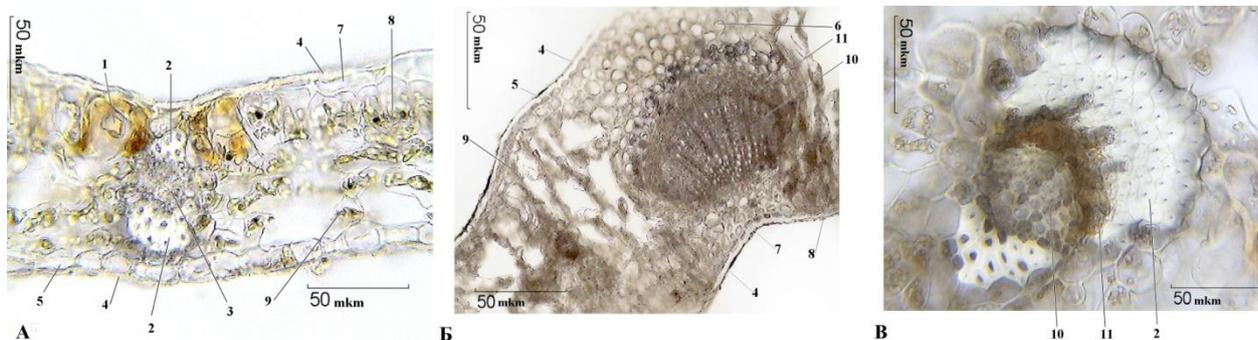


Рисунок 19 - Поперечные срезы листа исследуемых видов растений (x400): А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная. *Обозначения: 1 – кристаллы оксалата кальция; 2 – тяжи волокон; 3 – проводящий пучок; 4 – кутикула; 5 – нижний эпидермис; 6 – колленхима; 7 – верхний эпидермис; 8 – столбчатая паренхима; 9 – губчатая паренхима; 10 - древесина; 11 – флоэма.*

Так как лекарственным растительным сырьем черники обыкновенной являются побеги [9], нами было проведено сравнительное анатомо-гистологическое исследование стеблей исследуемых видов с целью подтверждения диагностики и предупреждения возможной фальсификации.

Стебли черники обыкновенной на поперечном срезе имеет характерную неправильно угловатую форму с четырьмя сильно зауженными рёбрами часто расположенными под острым углом к основной поверхности стебля (рис.20А). Описанное очертание стебля в значительной степени отличает чернику от сравниваемых видов толокнянки и брусники у которых очертание поперечных срезов стеблей округлое (рис. 20). Стебли всех сравниваемых видов непучкового строения.

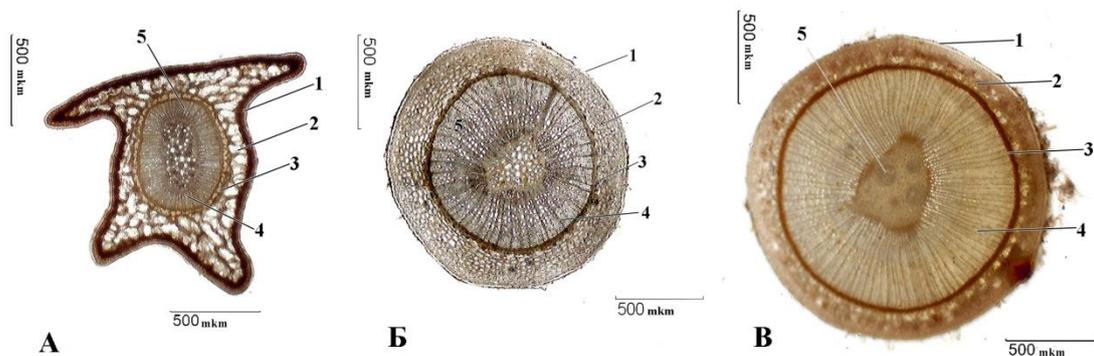


Рисунок 20 – Поперечные срезы стеблей: А – черники обыкновенной; Б – толокнянки обыкновенной; В – брусники обыкновенной. *Обозначения: 1 – эпидермис, 2 – первичная кора, 3 - флоэма; 4 – древесина; 5 – сердцевина.*

Эпидермис стебля черники обыкновенной с поверхности представлен клетками различной формы с прямыми боковыми стенками, густо пронизанными порами. Устьица многочисленные, окружены четырьмя околоустьичными клетками. Причем 2 клетки расположены параллельно устьичной щели, а две другие перпендикулярно ей (рис. 21).



Рисунок 21 – Эпидермис стебля черники (x400). *Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – околоустьичные клетки; 3 – замыкающие клетки устьиц.*

Под эпидермисом расположена основная хлорофиллоносная паренхима первичной коры, представленная несколькими рядами клеток овальной формы с относительно утолщенными целлюлозными оболочками (рис. 22А). Ниже расположена рыхлая паренхима с крупными межклетниками, значительно превышающими размеры клеток. В клетках паренхимы встречаются включения в виде кристаллов различной формы и размера, а также друз (рис. 22).

Центральный цилиндр занимает основную часть стебля. Флоэма выражена слабо. С периферии она армирована склеренхимными волокнами, расположенными небольшими группами, перемежающимися с клетками основной паренхимы (рис. 22Б). Волокна склеренхимы на поперечном сечении мелкие, округлой формы с лигнифицированными стенками. Полости волокон щелевидные. Проводящие элементы флоэмы расположены непрерывным кольцом и представлены мелкими тонкостенными клетками с темно-бурым содержимым, выделяющим флоэмную область. Клетки флоэмы неправильной угловатой формы (рис. 22Б).

Древесина стебля черники представлена мелкими сосудами четкими однорядными сердцевинными лучами; некрупными рассеянными сосудами и толстостенными клетками основной ткани в радиальных рядах. Сердцевина слагается из толстостенных пористых клеток (рис. 23).

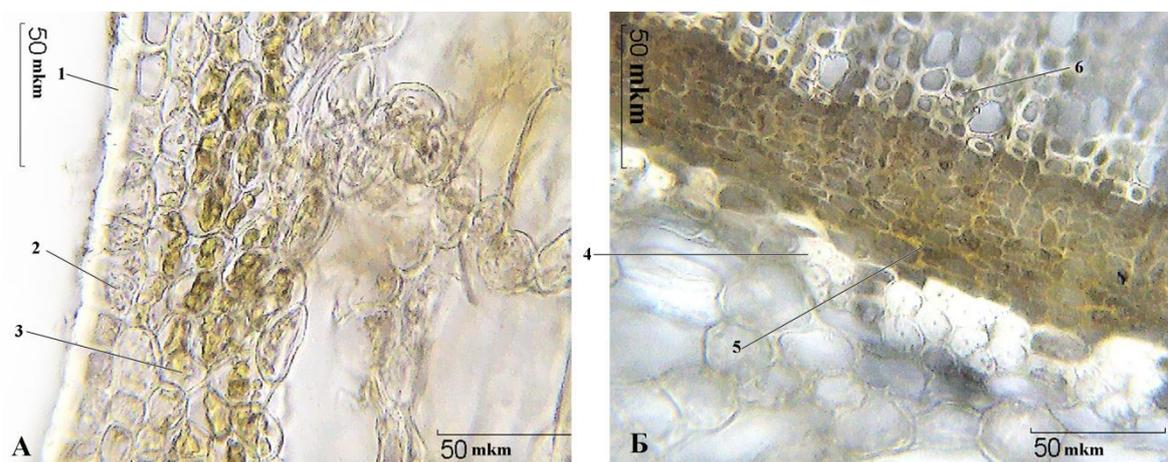


Рисунок 22 – Первичная кора стебля черники обыкновенной (x400): А – Эпидермис и субэпидермальные слои; Б – Флоэма, камбий и древесина. *Обозначения: 1 – кутикула; 2 – эпидермис; 3 – основная хлорофиллоносная паренхима; 4 – флоэма; 5 – кольцо механической ткани; 6 – древесина.*

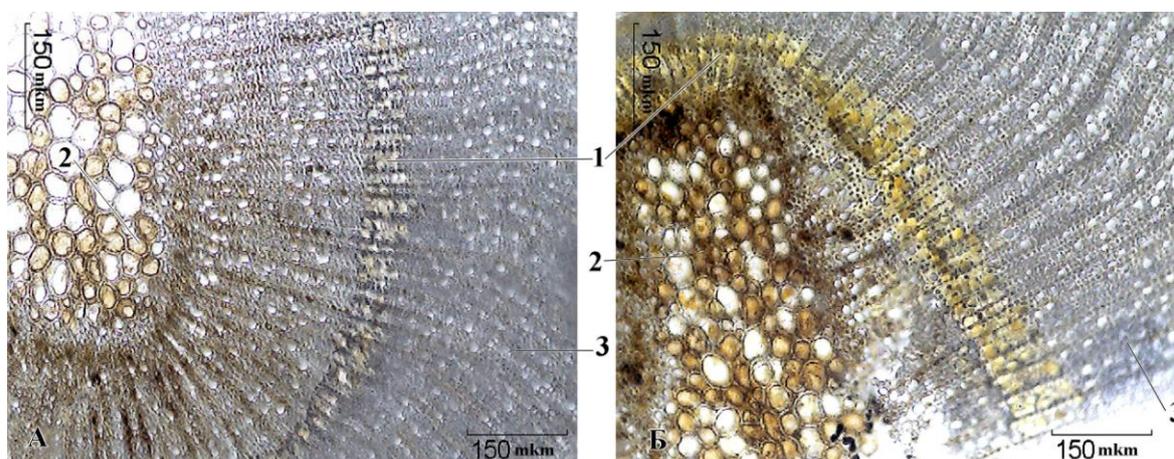


Рисунок 23 – Древесина и сердцевина стебля черники обыкновенной (x400): А – до обработки раствором щелочи; Б – после обработки. *Обозначения: 1 – ; 2 – клетки сердцевины; 3 – древесина.*

Побег толокнянки на поперечном сечении имеет почти правильную, округлую форму (рис. 20Б). Эпидермис на поперечном сечении представлен клетками овальной или прямоугольной формы с утолщенной наружной стенкой, покрытой значительным слоем кутикулы (рис. 24). Эпидермис, при рассмотрении с поверхности представлен почти правильными рядами клеток прямоугольной формы с утолщенными оболочками. Особенно утолщены оболочки, параллельные оси побега. На эпидерме имеются простые одноклеточные волоски длиной 120-160 мкм (рис. 25). Устьица анамоцитного типа встречаются редко.

Под эпидермой расположена слабо выраженная колленхима в один слой клеток (рис. 24). Первичная кора представлена клетками овальной формы с заметно утолщенными целлюлозными стенками, насчитывающими до 10-ти рядов. Размеры клеток составляют от 18 до 46 мкм в длину и от 15 до 40 мкм шириной. Встречаются клетки, содержащие призматические кристаллы оксалата кальция (рис. 24).

Флоэмная часть центрального цилиндра, аналогично побегам черники, выражена слабо. Склеренхимные волокна разрозненные, собранные в небольшие группы с периферии флоэмы (рис. 24). На поперечном сечении склеренхимные волокна имеют 4-х 5-ти угольную форму с заметными полостями (рис. 24Б). Проводящие элементы флоэмы цитологически схожи с таковыми у побегов черники (рис. 24Б). Флоэмная область также исходно окрашена в темно-бурый цвет (рис. 24Б).

Древесина побегов толокнянки кольцесосудистого типа. Сердцевидные лучи ксилемы обычно однорядные; сосуды мелкие (рис. 24). Сердцевина складывается из толстостенных пористых клеток овальной или округлой формы диаметром от 10 до 50 мкм (рис. 24А).

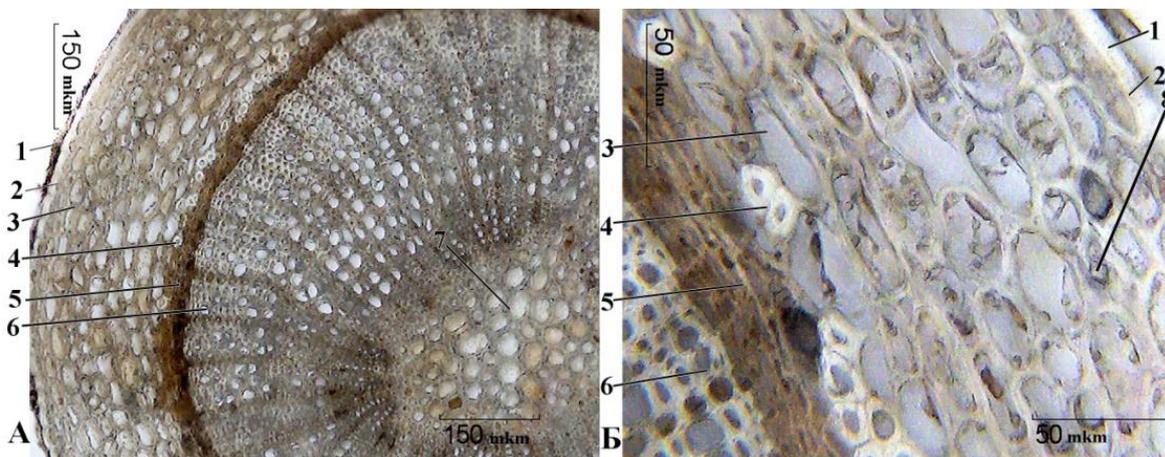


Рисунок 24 – Поперечный срез стебля толокнянки обыкновенной: А – увеличение  $\times 100$ ; Б – увеличение  $\times 400$ . Обозначения: 1 – кутикула; 2 – эпидермис; 3 – коровая часть; 4 – лубяные волокна; 5 – элементы флоэмы; 6 – древесина.

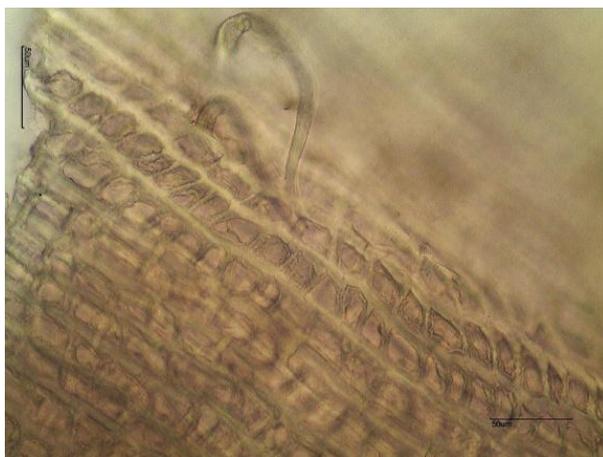


Рисунок 25 – Эпидермис стебля толокнянки обыкновенной. Волоски.

Побег брусники анатомически сходен с побегом толокнянки (рис. 20). Однако у брусники менее выражена первичная кора относительно центрального цилиндра.

Эпидермис на поперечном сечении также имеет прямоугольную форму сильно сдавленную с поверхности. Наружная оболочка значительно утолщена и покрыта толстым слоем кутикулы (рис. 26Б). С поверхности клетки эпидермиса угловатые почти прямоугольной формы. Эпидермис густо опушен. Трихомы представлены простыми одноклеточными волосками длиной до 150-200 мкм (рис. 28). Под эпидермисом расположена уголково-пластинчатая колленхима, достигающая 2-3 слоев клеток. За колленхимой следует основная паренхима первичной коры (5-7 слоев клеток). Паренхима первичной коры составлена из крупных клеток (длиной 50-72 мкм, шириной 10-21 мкм), овальной иногда сильно вытянутой в тангентальном направлении формы (рис.26). Протопласт в клетках аморфный, окрашенный в бурый цвет. В клетках паренхимы встречаются призматические кристаллы оксалата кальция (рис. 26Б).

Флоэмная часть по цитологической характеристике сходна со сравнимаемыми видами. Однако лубяные волокна имеют более узкий просвет по сравнению с побегами толокнянки обыкновенной и сгруппированы в более крупные группы, расположенные равномерно перемежаясь с клетками основной паренхимы (рис. 26, 27). Флоэма аналогично сравнимаемым видам, пигментирована в бурый цвет (рис. 26Б, 27А).

Древесина побегов брусники рассеянососудистого типа. Сердцевинные лучи обычно однорядные, сосуды некрупные. Сердцевина представлена округлыми или овальными клетками с толстыми пористыми стенками диаметром от 10 до 40 мкм (рис. 27Б). Клеточные стенки лигнифицированы. Полости клеток заполнены аморфным протопластом серого цвета. В паренхиме сердцевины отчетливо видны мелкие межклетники округлой формы (рис. 27Б).

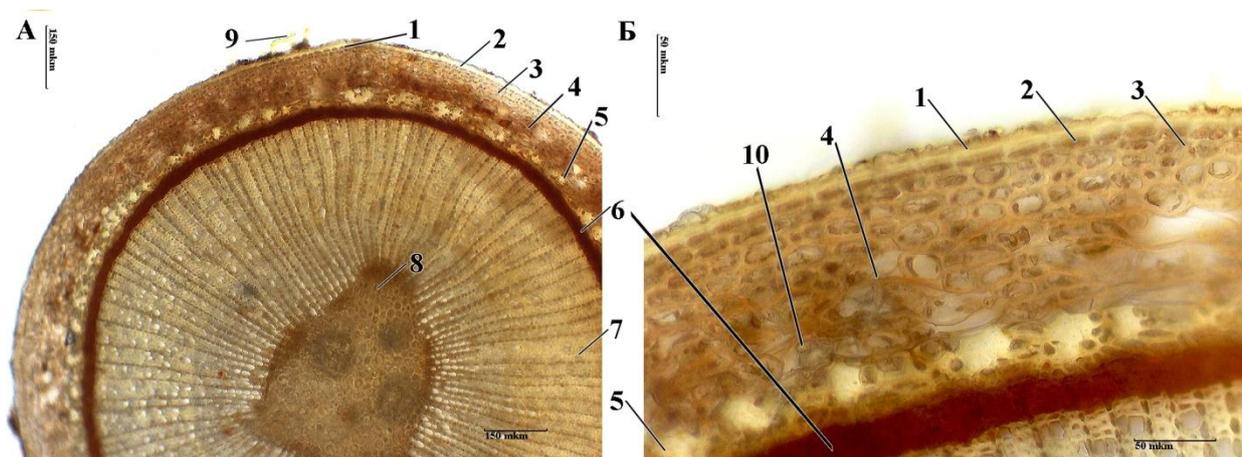


Рисунок 26 – Поперечный срез стебля брусники обыкновенной: А – увеличение  $\times 100$ ; Б – увеличение  $\times 400$ , первичная кора. Обозначения: 1 – кутикула; 2 – эпидермис; 3 – колленхима; 4 – основная паренхима; 5 – лубяные волокна; 6 – пигментированные клетки флоэмы; 7 – древесина; 8 – сердцевина; 9 – простые волоски; 10 – кристаллы оксалата кальция.

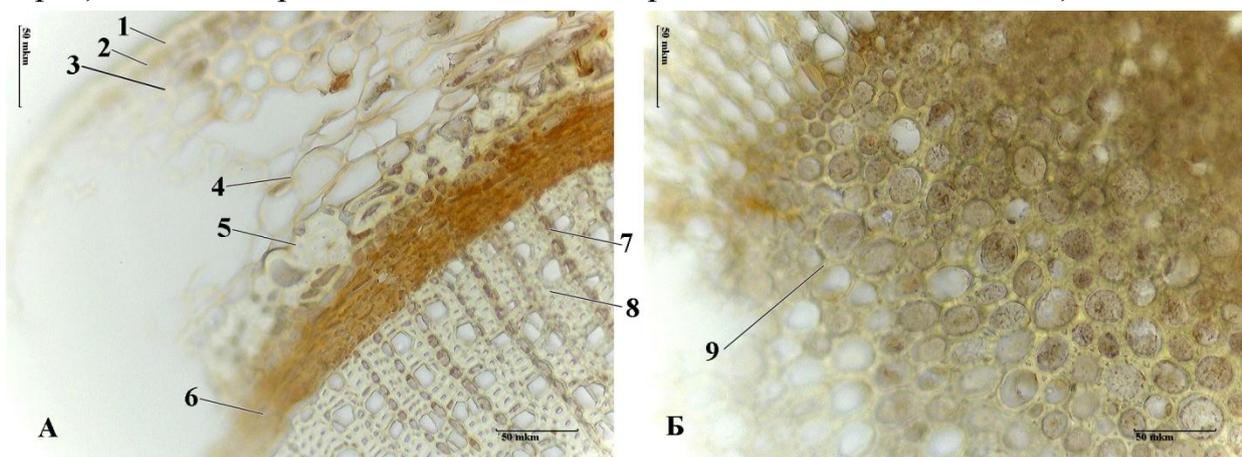


Рисунок 27 – Поперечный срез стебля брусники обыкновенной: А – камбиальная зона; Б – сердцевина. Обозначения: 1 – кутикула; 2 – эпидермис; 3 – колленхима; 4 – основная паренхима; 5 – лубяные волокна; 6 – кольцо механической ткани; 7 – сердцевинные лучи; 8 – волокна; 9 – клетки сердцевины.



Рисунок 28 – Эпидермис стебля толокнянки обыкновенной. Волоски.

Таким образом, проведено сравнительное исследование листьев и стеблей черники обыкновенной, брусники обыкновенной, толокнянки обыкновенной, позволяющие проводить диагностику данных растений. Однако для более детального исследования, особенно в связи с тем, что диагностические признаки листовых пластинок двудольных растений особенно близкородственных часто схожи, возникает необходимость дополнительных селективных данных анатомо-гистологии для более точной диагностики сырья [69]. К таким признакам можно отнести строение черешков листьев исследуемых растений.

### **3.3. Сравнительное исследование петиолярных признаков черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной**

В последнее время получает распространение петиолярная анатомия как метод более селективной диагностики лекарственного растительного сырья [32, 33, 34, 35, 41, 54, 69], нами было изучены морфолого-анатомические особенности строения черешков исследуемых видов растений.

Известно, что особенности строения черешка на его протяжении могут меняться [69], однако в связи с небольшими размерами черешков исследуемых видов, особенно для черники и брусники, нами были изучены медиальные части черешков, наиболее характеризующие их анатомические особенности.

Проведенный анализ показал, что черешки толокнянки, брусники и черники имеют на поперечном сечении полулунное очертание (рис. 29), что, очевидно является общим признаком для представителей, изучаемых семейств.

Отличительной чертой черники обыкновенной является наличие в очертании поперечного сечения острых выдающихся бортов черешка. У сравниваемых видов борта черешков тупые, округлой формы (рис. 29).

В центре сравниваемых черешков у всех, анализируемых объектов расположен всего один закрытый коллатеральный проводящий пучок (рис. 29).

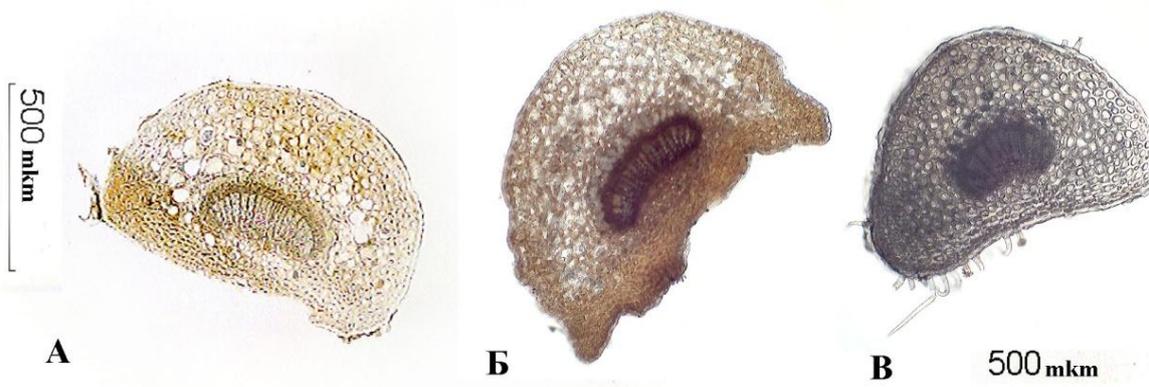


Рисунок 29 – Сравнение поперечных сечений черешков листьев: А - брусника обыкновенная, Б - черника обыкновенная; В - толокнянка обыкновенная.

Эпидермис черешков листьев исследуемых видов, при рассмотрении на поперечном сечении, представлен мелкими, кутинизированными клетками чаще прямоугольной, реже округлой формы (рис. 30).

Топография колленхимы примерно одинакова. Тип колленхимы – уголкового у всех сравниваемых видов. Колленхима располагается непосредственно под эпидермисом в несколько слоев по всему периметру среза. Однако имеются отличительные особенности по выраженности колленхимного слоя и характеру клеток. У черешков толокнянки колленхимные клетки крупнее, чем у сравниваемых видов и слой колленхимы в отдельных случаях может достигать до 5-ти рядов клеток. Колленхимные клетки округлой или овальной формы, их размер увеличивается в глубину черешка (рис. 30Б). Колленхима черешков черники и брусники выражена слабо и представлена мелкими клетками с пигментированными целлюлозными стенками (рис. 30А, В). У черники и брусники колленхима неоднородна. У обоих видов колленхима также представлена по всему периметру, однако образует более крупные участки в ребрах, которые у черники имеют более угловатую форму (рис. 29А,Б, 30 А,В).

Колленхима в абаксиальной и адаксиальной части черешков исследуемых видов отличается по степени утолщенности и выраженности (рис. 30 А,В, 31А,В). У черешков листьев черники и брусники утолщенность клеток и количество слоев составляющих ее клеток больше в адаксиальной части по сравнению с абаксиальной (рис. 29А,Б). В адаксиальной части она более уплотнена, клетки имеют прямоугольную форму, в абаксиальной части они относительно округлые (уголковый тип). Количество слоев колленхимы в абаксиальной части у брусники достигает 4-5, у черники колленхима представлена 1-3 слоем.

Основная паренхима черешков также отличается. У черешков толокнянки она представлена овальными клетками с утолщенными оболочками и рыхлым протопластом серого цвета. В паренхиме имеются межклетники. Размеры клеток при приближении к пучку увеличиваются, достигая до 40 мкм в длину (рис. 29В, 30Б).

Основная паренхима у черешков черники и брусники выражена, представлена тонкостенными клетками от 10 до 80 мкм в диаметре. Имеются крупные клетки (идиобласты), содержащие призматические кристаллы и друзы оксалата кальция. Крупные идиобласты особенно характерны для основной паренхимы черешков брусники. Межклетники отсутствуют (рис. 30А,В, 31 А,В, 32А,В).

Склеренхима у всех исследуемых видов расположена во флоэмной части коллатеральных пучков. Пучки всех трех видов имеют в очертании полулунную форму и расположены в центральной части черешка или несколько ближе к брюшной (абаксиальной) части (рис. 33). У черники и брусники пучки армируются первичной склеренхимой со стороны флоэмы (рис. 33А,В). Также, в отличие от черешка листа толокнянки, флоэмная часть пучков пигментирована (рис. 33А, В).

Отличительной особенностью черешков также является особенность их опушение. У толокнянки обыкновенной с верхней стороны черешка и у основания листа встречаются простые и головчатые волоски (рис. 16). У черники трихомы (одноклеточные, кутинизированные толстостенные прямые волоски с грубой

бородавчатой поверхностью длиной 23-52 мкм) представлены на бортах черешка и с адаксиальной стороны. У брусники трихомы (одноклеточные волоски с толстыми кутинизированными стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью длиной 100-140 мкм) представлены по всей поверхности, однако максимальная опушенность с адаксиальной стороны (рис. 15В, 34).

У толокнянки также максимальная опушенность с адаксиальной стороны и представлена головчатыми волосками (длиной 25-40 мкм) с многоклеточной головкой с содержимым коричневого цвета и простыми волосками (рис. 16).

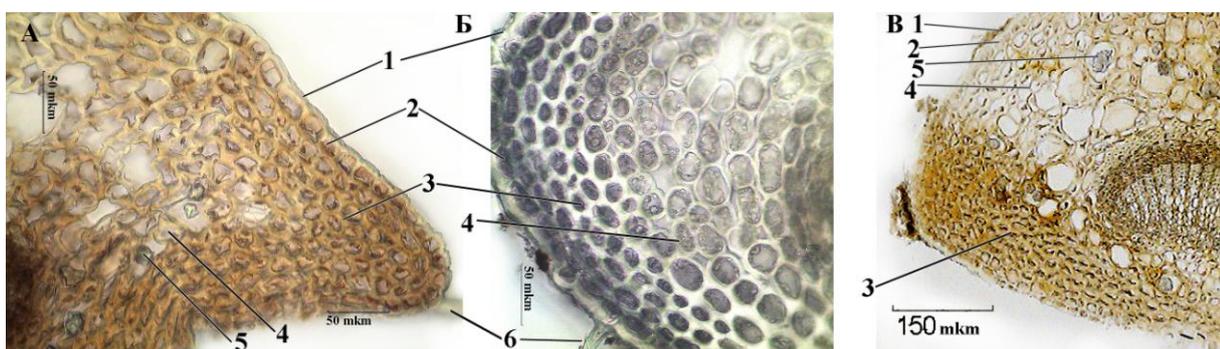


Рисунок 30 – Борты черешков (поперечный срез): А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная. *Обозначения: 1 – кутикула; 2 – эпидермис; 3 – колленхима; 4 – паренхима; 5 – друзы оксалата кальция; 6 – волоски.*



Рисунок 31 – Абаксиальная сторона черешков: А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная.

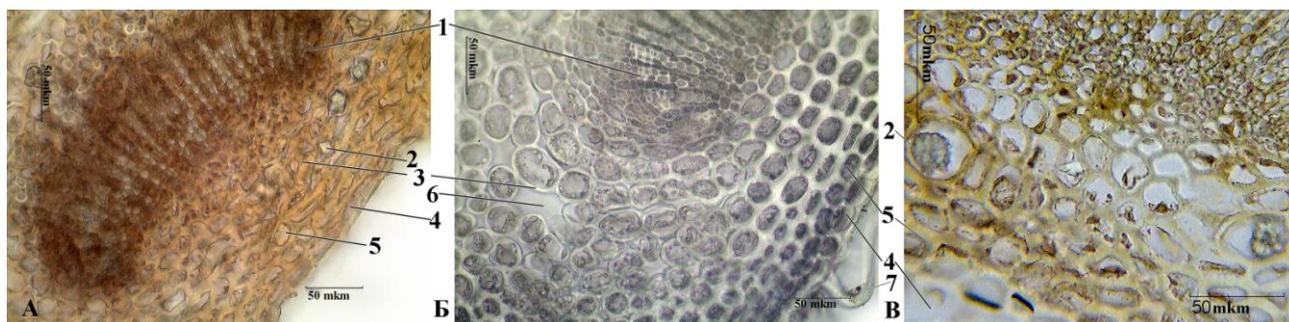


Рисунок 32 – Адаксиальная сторона черешков: А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная. *Обозначения: 1 – ксилема; 2 – друзы оксалата кальция; 3 – паренхима; 4 – эпидермис; 5 – колленхима; 6 – межклетники, 7 - волоски.*



Рисунок 33 – Черешки. Окраска серноокислым анилином: А – черника обыкновенная; Б – толокнянка обыкновенная; В – брусника обыкновенная.

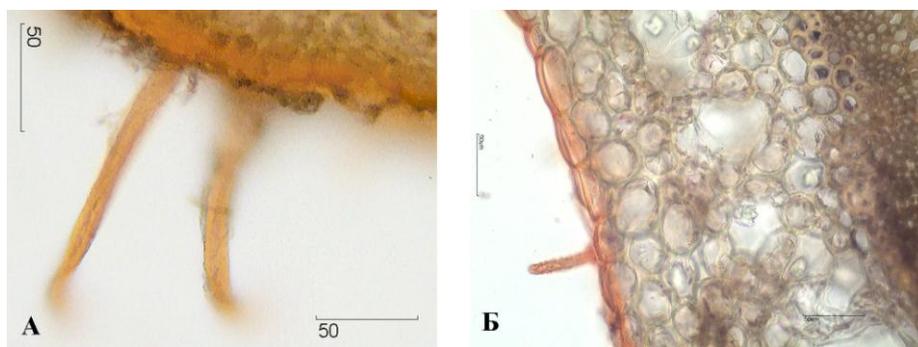


Рисунок 34 – Поперечные срезы черешков. Окраска суданом III: А – черника обыкновенная; Б - брусника обыкновенная.

По результатам проведенных сравнительных морфолого-анатомических исследований была составлена таблица, обобщающая полученные данные по анатомо-гистологическому исследованию побегов (листьев, стеблей и черешков листьев) черники обыкновенной, толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной (табл. 3).

Таблица 3 - Отличительные признаки анатомо-гистологического строения побегов черники обыкновенной, толокнянки обыкновенной, брусники обыкновенной.

Признак сравнения	Черника обыкновенная	Толокнянка обыкновенная	Брусника обыкновенная
<b>1. Листовая пластинка</b>			
<b>Эпидермис</b>	Клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми тонкими стенками	Клетки верхнего и нижнего эпидермиса изодиаметричной формы	Клетки верхнего эпидермиса слабоизогнутые, клетки нижнего эпидермиса слабоизвилистые
<b>Устьица</b>	Вытянутой колпачковидной формы, длиной 21-30 мкм, шириной 15-20 мкм, окружены 4-6 околоустьичными клетками (анамоцитного типа), преимущественно на нижнем эпидермисе.	Чечевицевидные длиной 35-45 мкм, шириной 41-50 мкм, с узкой устьичной щелью, широким передним двориком (преддверьем, криптой), отграниченным от внешней среды кутикулярным сводом, имеющим в центре отверстие; околоустьичных клеток 6-9 (анамоцитного типа); на нижнем эпидермисе	Сферовидные, длиной 18-30 мкм, шириной 10-15 мкм, окружены 4 околоустьичными клетками.
<b>Трихомы</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Прямые волоски с грубой бородавчатой поверхностью длиной 23-52 мкм по жилкам с верхней стороны;</li> <li>• Булавовидные железки длиной 150-200 мкм с многоклеточной двурядной ножкой и многоклеточной головкой с бурым содержимым по жилкам с обеих сторон и на краевых зубцах.</li> </ul>	Листовая пластинка не опушена. Простые и головчатые волоски на эпидермисе черешка, особенно с верхней стороны.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Одноклеточные волоски с толстыми стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью длиной 100-140 мкм по жилкам и на черешке;</li> <li>• Булавовидные железки с бурым содержимым</li> </ul>
<b>Главная жилка и мезофилл</b>	Адаксиальная сторона главной жилки уплощена или вдавлена, абаксиальная – значительно выпуклая, округлой формы. Палисадная паренхима	Палисадная паренхима образует несколько рядов и занимает до половины толщины листа.	Палисадная паренхима представлена несколькими неправильными рядами, занимает менее половины толщи пластинки.

<b>Признак сравнения</b>	<b>Черника обыкновенная</b>	<b>Толокнянка обыкновенная</b>	<b>Брусника обыкновенная</b>
	образована одним рядом клеток.		
<b>2. Черешок</b>			
<b>Форма поперечного сечения черешка листа</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• контур среза в медиальной части слегка сплюснут с адаксиальной стороны</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• контур среза в медиальной части слегка сплюснут с адаксиальной стороны</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• контур среза в медиальной части слегка сплюснут с адаксиальной стороны</li> </ul>
<b>Проводящие пучки</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Единственный пучок центральной жилки расположен в центре ближе к адаксиальной части</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Единственный пучок центральной жилки расположен в центре ближе к адаксиальной части</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Единственный пучок центральной жилки расположен в центре ближе к адаксиальной части</li> </ul>
<b>Особенности строения механических тканей</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Колленхима представлена по всему периметру, однако неоднородна; образует более крупные участки в ребрах, более угловатых, чем у брусники, более выражена в адаксиальной части по сравнению с абаксиальной. Количество слоев в абаксиальной части – 1-3.</li> <li>• Пучки армируются первичной склеренхимой со стороны флоэмы, флоэмная часть пигментирована</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Колленхимные клетки крупнее по сравнению с другими видами, слой колленхимы может достигать до 5 рядов;</li> <li>• Форма колленхимных клеток округлая или овальная, размер увеличивается в глубину черешка;</li> <li>• Пучки не армированы склеренхимой со стороны флоэмы, флоэмная часть не пигментирована.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Колленхима представлена по всему периметру, однако неоднородна; образует более крупные участки в ребрах, более выражена в адаксиальной части по сравнению с абаксиальной. Количество слоев в абаксиальной части – 4-5.</li> <li>• Пучки армируются первичной склеренхимой со стороны флоэмы, флоэмная часть пигментирована</li> </ul>
<b>Паренхима черешка</b>	Основная паренхима у черешков выражена, представлена тонкостенными клетками от 10 до 80 мкм в диаметре. Имеются крупные клетки (идиобласты), содержащие	Основная паренхима черешков также отличается. У черешков толокнянки она представлена овальными клетками с утолщенными оболочками и рыхлым протопластом серого	Основная паренхима у черешков выражена, представлена тонкостенными клетками от 10 до 80 мкм в диаметре. Имеются крупные клетки (идиобласты), содержащие

<b>Признак сравнения</b>	<b>Черника обыкновенная</b>	<b>Толокнянка обыкновенная</b>	<b>Брусника обыкновенная</b>
	призматические кристаллы и друзы оксалата кальция	цвета. Имеются межклетники.	призматические кристаллы и друзы оксалата кальция
<b>Опушение</b>	Одноклеточные, кутинизированные толстостенные прямые волоски с грубой бородавчатой поверхностью длиной 23-52 мкм) представлены на бортах черешка и с адаксиальной стороны	Простые и головчатые волоски с верхней стороны черешка и у основания	Одноклеточные волоски с толстыми кутинизированными стенками и гладкой или слабобородавчатой поверхностью длиной 100-140 мкм представлены по всей поверхности, однако максимальная опушенность с адаксиальной стороны
<b>3. Стебель</b>			
<b>Форма поперечного сечения</b>	Характерная неправильно угловатая форма с четырьмя сильно зауженными рёбрами	Округлая	Округлая
<b>Эпидермис</b>	Представлен клетками различной формы с прямыми боковыми стенками, густо пронизанными порами. Устьица многочисленные, окружены 4-мя клетками.	С поверхности представлен правильными рядами клеток прямоугольной формы с утолщенной стенкой, покрытой значительным слоем кутикулы.	С поверхности клетки угловатые, почти прямоугольной формы. Наружная оболочка сильно утолщена и покрыта слоем кутикулы.
<b>Первичная кора</b>	Под эпидермисом расположена основная хлорофиллоносная паренхима; ниже расположена рыхлая паренхима с межклетниками, превышающими размеры клеток. Встречаются включения в виде кристаллов и друз	Под эпидермой расположена слабо выраженная колленхима в один слой клеток. Первичная кора представлена клетками овальной формы с заметно утолщенными целлюлозными стенками насчитывающими до 10-ти рядов. Встречаются включения в виде кристаллов оксалата кальция.	Под эпидермисом расположена уголково-пластинчатая колленхима, достигающая 2-3 слоя клеток. За колленхимой следует основная паренхима первичной коры (5-7 слоев клеток). Паренхима первичной коры составлена из крупных клеток овальной, иногда сильно вытянутой в тангентальном направлении формы. В клетках паренхимы встречаются призматические

<b>Признак сравнения</b>	<b>Черника обыкновенная</b>	<b>Толокнянка обыкновенная</b>	<b>Брусника обыкновенная</b>
			кристаллы оксалата кальция
<b>Флоэма</b>	Выражена слабо. С периферии армирована склеренхимными волокнами. Волокна в поперечном сечении мелкие, округлой формы. Полости волокон щелевидные. Проводящие элементы расположены непрерывным кольцом, представлены мелкими тонкостенными клетками с темно-бурым содержимым; неправильной угловатой формы.	Также выражена слабо. Склеренхимные волокна разрозненные. На поперечном сечении склеренхимные волокна имеют 4-х или 5-ти угольную форму с заметными полостями	Лубяные волокна имеют более узкий и сгруппированы в более крупные группы, расположенные равномерно перемежаясь с клетками основной паренхимы. Флоэма аналогично сравниваемым видам, пигментирована в бурый цвет
<b>Древесина</b>	Сосуды не крупные рассеянные с толстостенными клетками основной ткани в радиальных рядах.	Кольцесосудистая. Сосуды мелкие, сердцевинные лучи однорядные.	Рассеяннососудистого типа. Сердцевинные лучи однорядные. Сосуды не крупные.
<b>Сердцевина</b>	Клетки толстостенные, пористые.	Клетки толстостенные, пористые овальной или округлой формы от 10 до 50 мкм.	Сердцевина представлена округлыми или овальными клетками с толстыми пористыми стенками диаметром от 10 до 40 мкм Полости клеток заполнены аморфным протопластом серого цвета. В паренхиме сердцевинны отчетливо видны мелкие межклетники округлой формы

Таким образом, можно сказать, что диагностическое значение при морфолого-анатомическом исследовании лекарственного растительного сырья побегов черники обыкновенной, листьев толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной имеют:

1. Морфологические особенности (форма, жесткость листовой пластинки). Однако этих признаков не всегда бывают достаточны, особенно при анализе измельченного сырья.
2. Строение эпидермиса (извилистость стенок, устьичный аппарат, характер опушенности, типы трихом).
3. Особенности петиолярной анатомии.
4. Строение первичной коры стебля исследуемых видов.

### **Выводы к главе 3**

В результате проведенного сравнительных морфолого-анатомических исследований плодов и побегов черники обыкновенной, в том числе в сравнении с побегами брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной, нами были сделаны следующие выводы:

1. Впервые проведено сравнительное морфолого-анатомическое исследование побегов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной; подтверждены имеющиеся литературные данные об особенностях строения исследуемых видов ЛРС.
2. Впервые изучены петиолярные признаки листьев черники обыкновенной и двух потенциально примесных видов - брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной.
3. Определены основные анатомо-гистологические особенности листьев черники обыкновенной в сравнении с другими видами:
  - трихомы (форма, размеры, локализация),
  - форма клеток эпидермиса листовой пластинки,
  - наличие выраженной кристаллоносной обкладки;
  - соотношение размеров главной жилки по отношению к толщине остальной листовой пластинки,;
  - соотношение губчатой и столбчатой паренхимы;
  - особенности строения черешка:

- Форма поперечного сечения: полулунная форма, слегка сплюснутая с адаксиальной стороны;
- В паренхиме черешка локализован один закрытый коллатеральный пучок (центральная жилка), расположенный по центру, ближе к адаксиальной стороне. Пучок армирован с обеих сторон, склеренхима мощная.
- Колленхима представлена по всему периметру, неоднородна; образует более крупные участки в ребрах, более угловатых, чем у других видов, более выражена в адаксиальной части по сравнению с абаксиальной. Количество слоев в абаксиальной части – 1-3.
- Основная паренхима представлена тонкостенными клетками от 10 до 80 мкм в диаметре. Имеются крупные клетки (идиобласты), содержащие призматические кристаллы и друзы оксалата кальция
- Эпидермис опушен с адаксиальной стороны простыми одноклеточными волосками с грубой бородчатой поверхностью длиной 23-52 мкм.

4. Определены основные анатомо-гистологические особенности стеблей черники обыкновенной в сравнительном плане с другими близкородственными видами (толокнянкой и брусникой):
  - форма поперечного сечения стебля,
  - строение первичной коры;
  - особенности строения древесины и клеток сердцевины.
5. Полученные сравнительные данные могут быть использованы при доработке раздела «Микроскопия» имеющихся ФС на ЛРС «Черники обыкновенной побегов», «Брусники листья», «Толокнянки листья» с целью усовершенствования существующих методик стандартизации.

## ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

### 4.1. Сравнительное исследование химического состава плодов и побегов черники обыкновенной

На предварительном этапе нами было проведено сравнительное исследование химического состава свежих и воздушно-сухих плодов и побегов черники обыкновенной методом ТСХ и спектрофотометрии. Также были разработаны методики качественного анализа схожих видов лекарственного растительного сырья, имеющих аналогичный ареал: побегов черники обыкновенной, листьев толокнянки обыкновенной [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.] и брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.). Проведено сравнительное изучение антоцианового состава плодов черники обыкновенной, плодов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) и плодов аронии черноплодной [*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott].

Хроматографическое исследование полученных извлечений показало, что лучшее разделение комплекса соединений на используемых хроматографических пластинках обеспечивают системы н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2) и хлороформ – метанол - вода (26:14:3). Для анализа антоцианов более приемлемой является система с уксусной кислотой, в которой происходит видимое разделение окрашенных в характерные для антоцианов цвета пятен. Антоцианы в УФ-свете флуоресцируют слабо.

При сравнительном исследовании химического состава свежих и воздушно-сухих плодов черники пробоподготовку осуществляли следующим образом: 2,0 г плодов помещали в коническую колбу со шлифом, добавляли 10 мл 95% спирта этилового, содержащего 1% хлороводородной кислоты, закрывали пробкой и перемешивали в течение 30 мин. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр «красная полоса» и 0,02 мл полученного извлечения наносили на линию старта пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ», проведенную на расстоянии 1,5 см от нижнего края. Пластинку высушивали на воздухе и хроматографировали

восходящим способом в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2). На хроматограмме свежих плодов обнаруживаются 3 доминирующих антоциана, в то время как воздушно-сухие плоды имеют некоторые различия в профиле антоцианов, что подтверждает литературные данные о лабильности антоцианов и их значительной потере при сушке. Общим для извлечений из свежих и воздушно-сухих плодов можно считать наличие цианидин-3-О-глюкозида ( $R_f \sim 0,36$ ) и мальвидин-3-О-глюкозида ( $R_f \sim 0,51$ ) (рис. 35).

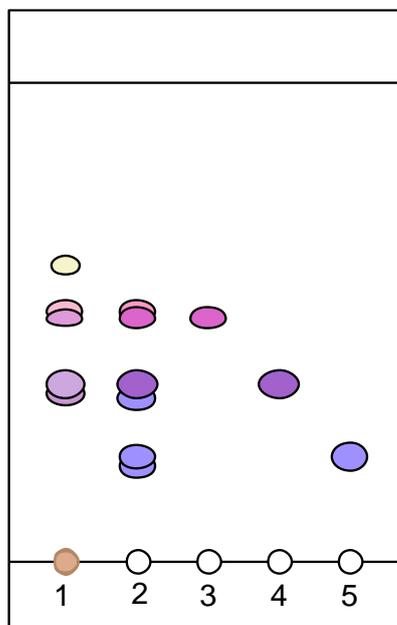


Рисунок 35 – ТСХ–анализ: система *n*-бутанол - ледяная уксусная кислота - вода (4:1:2). Обозначения: 1 – спиртовое извлечение из воздушно-сухих плодов черники; 2 – спиртовое извлечение из плодов черники свежих; 3 - мальвидин-3-О-глюкозид; 4 - цианидин-3-О-глюкозид; 5 - дельфинидин-3-О-глюкозид

По результатам хроматографического исследования в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) также видно, что антоциановый состав плодов черники обыкновенной по сравнению с другими также широко употребляемыми темноокрашенными плодами отличается, вследствие чего данный метод может быть использован для оценки подлинности данных видов ЛРС. Во всех плодах имеется цианидин-3-О-глюкозид (наиболее распространенный антоциан в растительном мире). Диагностическим признаком плодов черники обыкновенной является наличие пятна, соответствующего мальвидин-3-О-глюкозиду ( $R_f \sim 0,51$ ) (рис. 36).

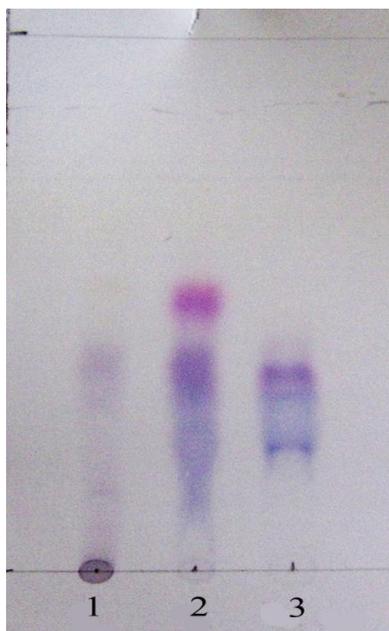


Рисунок 36 - Сравнительный ТСХ - анализ антоцианов плодов изучаемых растений. Обозначения: 1 – плоды аронии черноплодной; 2 – плоды черники обыкновенной; 3 – плоды черной смородины.

Также различия наблюдаются в электронных спектрах поглощения извлечений из плодов. Извлечение из свежих плодов черники имеет максимумы поглощения при  $282 \pm 2$  нм и  $545 \pm 2$  нм, соотношение ( $A_{282}/A_{546}$ ) примерно составляет 1,0:1,5, что близко к спектральным характеристикам цианидин-3-О-глюкозида. Для воздушно-сухих плодов это соотношение изменяется в пользу коротковолнового максимума и составляет  $1,0:0,10 \div 0,15$  (рис. 37).

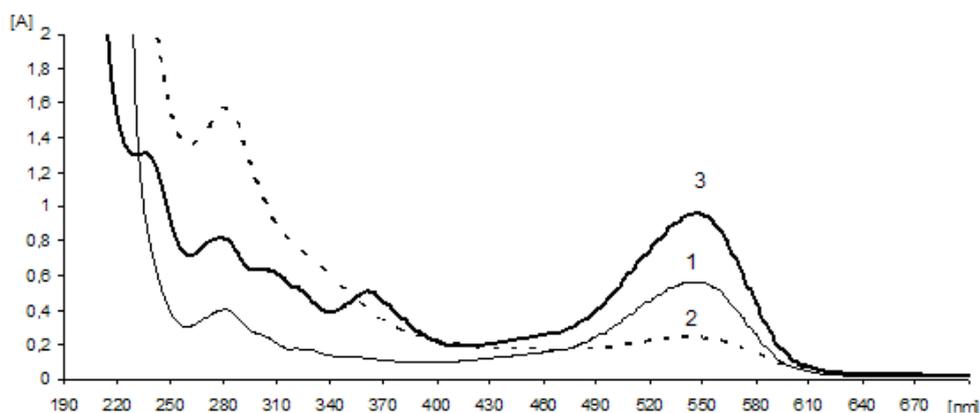
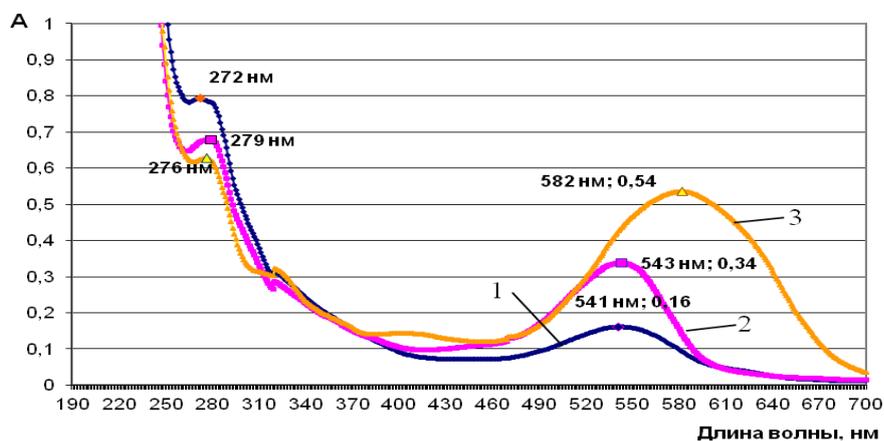


Рисунок 37 – Спектры поглощения водно-спиртового извлечения: 1 - из свежих плодов черники обыкновенной, 2 - воздушно-сухих плодов черники обыкновенной; 3 - цианидин-3-О-глюкозида в 95% этиловом спирте, содержащем 1% HCl.

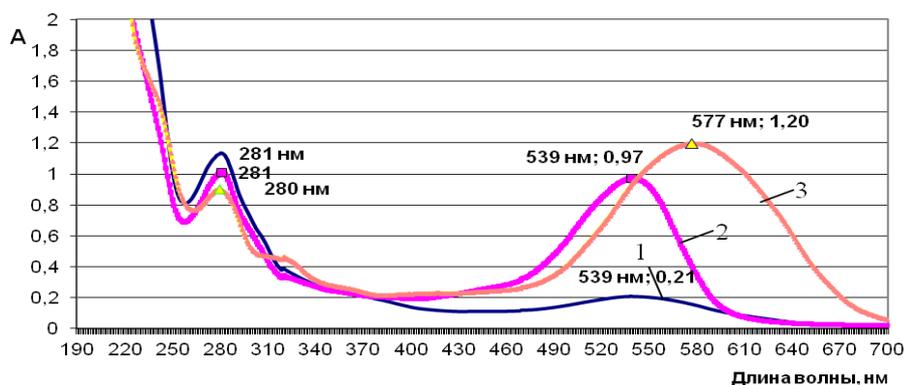
В спектре поглощения из плодов аронии черноплодной имеются максимумы поглощения при  $282 \pm 2$  нм и  $537 \pm 2$  нм, имеется плечо при  $324 \pm 2$  нм. В спектре плодов черной смородины максимумы поглощения при  $272 \pm 2$  нм и при  $541 \pm 2$  нм (рис. 38).

Интенсивность поглощения извлечений из плодов увеличивается в кислой среде, практически достигая значений оптической плотности при 280-290 нм, но длина волны максимума практически не смещается. Этот факт связан с известным переходом антоцианов в кислой среде в форму флавилиевого катиона с максимумом поглощения в видимой области.

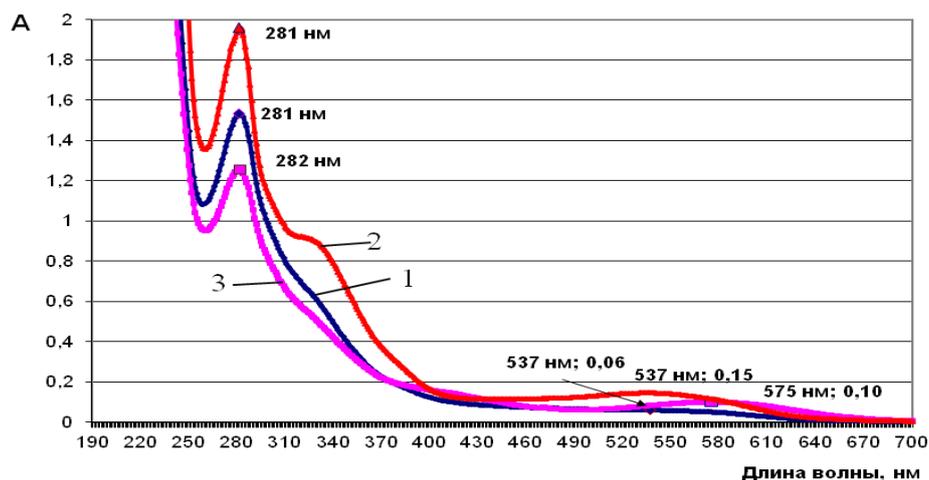
При добавлении раствора алюминия хлорида наблюдается батохромный сдвиг.



А



Б



В

Рисунок 38 – Спектры поглощения антоцианов плодов: А – плодов черники обыкновенной; Б – плодов черной смородины; В – плодов аронии черноплодной. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – в кислой среде; 3 – после добавления алюминия оксида.

С целью проведения сравнительного исследования побегов черники, листьев брусники и листьев толокнянки получали извлечение из них с использованием водно-спиртовых смесей с различной концентрацией спирта этилового. Анализируемые образцы представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика исследуемого растительного материала

№ п/п	Растительный материал	Район заготовки	Год заготовки	Экстрагент
1.	Арбутин			
2.	Побеги черники обыкновенной	Пензенская область, Сосновоборский р-н, пос. Сосновоборск	2012 г.	40% спирт
3.	Побеги черники обыкновенной	Пензенская область, Сосновоборский р-н, пос. Сосновоборск	2012 г.	70% спирт
4.	Побеги черники обыкновенной	Пензенская область, Сосновоборский р-н, пос. Сосновоборск	2012 г.	96% спирт
5.	Побеги черники обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2013 г.	40% спирт
6.	Побеги черники	Республика Марий Эл,	2013 г.	70% спирт

	обыкновенной	Волжский р-н, г. Волжск		
7.	Побеги черники обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2013 г.	96% спирт
8.	Листья брусники обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2013 г.	40% спирт
9.	Листья брусники обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2013 г.	70% спирт
10.	Листья брусники обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2013 г.	96% спирт
11.	Листья толокнянки обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2012 г.	40% спирт
12.	Листья толокнянки обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2012 г.	70% спирт
13.	Листья толокнянки обыкновенной	Республика Марий Эл, Волжский р-н, г. Волжск	2012 г.	96% спирт

В процессе пробоподготовки 0,50 г измельченного лекарственного растительного сырья помещали в колбу, добавляли 10 мл соответствующего экстрагента и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Полученное извлечение охлаждали и фильтровали через бумажный фильтр (марки «красная полоса»).

Разделение проводили в подвижных системах: хлороформ – спирт этиловый 96%– вода (26:16:3) и *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2). Хроматографические пластины после элюирования просматривали в видимом свете, при воздействии УФ-света с длинами волн 254 и 366 нм и обрабатывали раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе натрия карбоната. Оптимальное разделение наблюдалось в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2).

При просмотре при дневном свете для хроматограммы извлечения из листьев толокнянки была характерна интенсивная темноокрашенная полоса до значения  $R_f \approx 0,55$  (рис. 39).

При просмотре под лампой с УФ-излучением 254 нм (рис. 40) для водно-спиртовых извлечений из исследуемых образцов побегов черники обыкновенной были характерны пятна со значениями  $R_f \approx 0,41$ – $0,42$  и  $R_f \approx 0,15$ – $0,16$ ; для извлечений из листьев брусники обыкновенной – пятна со значениями  $R_f \approx 0,65$ –

0,66,  $R_f \approx 0,58-0,59$  и  $R_f \approx 0,15-0,16$ ; для извлечений из листьев толокнянки обыкновенной – пятно со значением  $R_f \approx 0,57-0,58$ .

После обработки раствором диазобензолсульфокислоты эти же пятна окрашивались в различные цвета от желтого до темно-коричневого. В побегах черники дополнительно проявлялось пятно со значением  $R_f \approx 0,19-0,20$ , а в толокнянке – пятно со значением  $R_f \approx 0,63-0,64$  (рис 41).

По предварительным оценкам, наибольшей экстракционной способностью обладают водно-спиртовые смеси с концентрацией спирта этилового 70% и 40%.

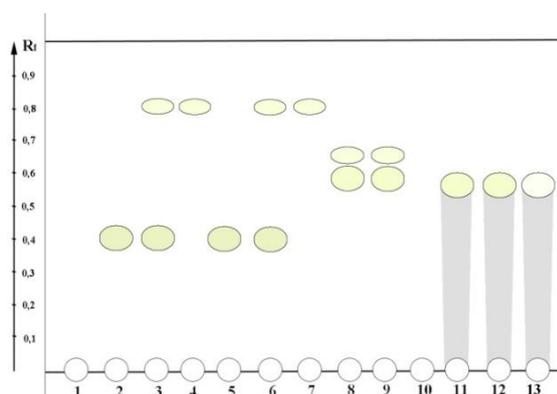


Рисунок 39 – Схема хроматографического разделения веществ побегов черники обыкновенной, листьев толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2 об/об/об) в присутствии РСО арбутина при просмотре в дневном свете. *Обозначения:* в соответствии с таблицей 4.

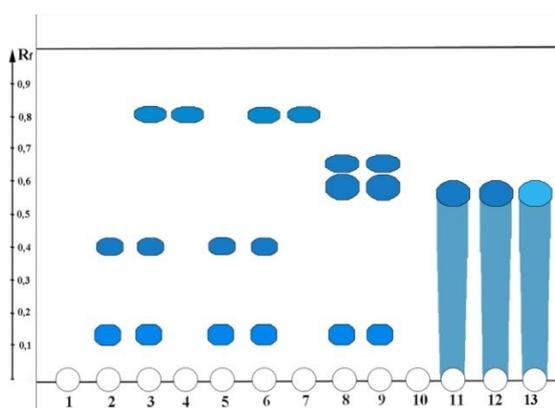


Рисунок 40 – Схема хроматографического разделения веществ побегов черники обыкновенной, листьев толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2 об/об/об) в присутствии РСО арбутина (УФ-254 нм). *Обозначения:* в соответствии с таблицей 4.

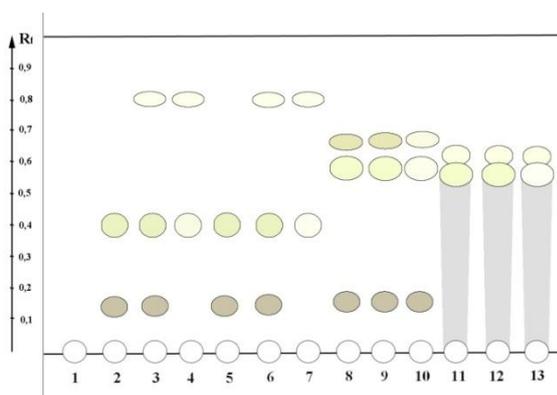


Рисунок 41 – Схема хроматографического разделения веществ побегов черники обыкновенной, листьев толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной в системе *n*- бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2 об/об/об) в присутствии РСО арбутина после обработки раствором диазобензолсульфокислоты. *Обозначения:* в соответствии с таблицей 4.

Также нами был проведен сравнительный ВЭЖХ-анализ извлечений из побегов черники, листьев толокнянки и брусники. Анализ проводили в градиентном режиме, условия описаны в разделе «Материалы и методы исследования» (рис. 42-44).

Данный метод также может быть использован для оценки подлинности растительного сырья.

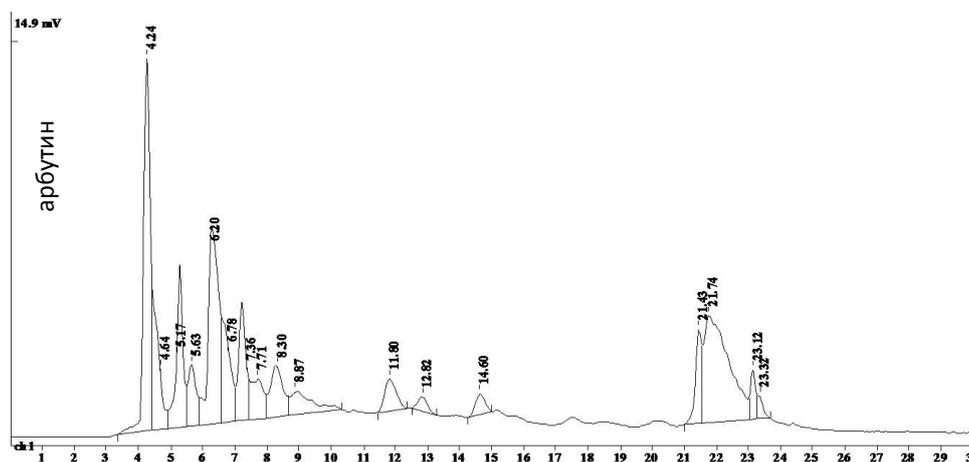


Рисунок 42 – ВЭЖХ-хроматограмма водного извлечения из листьев брусники обыкновенной.

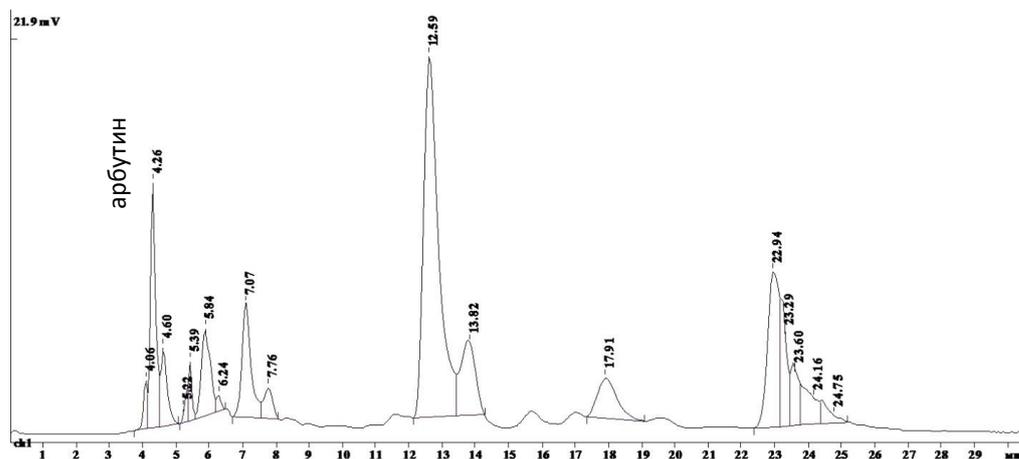


Рисунок 43 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения на 40% этиловом спирте из листьев толокнянки обыкновенной.

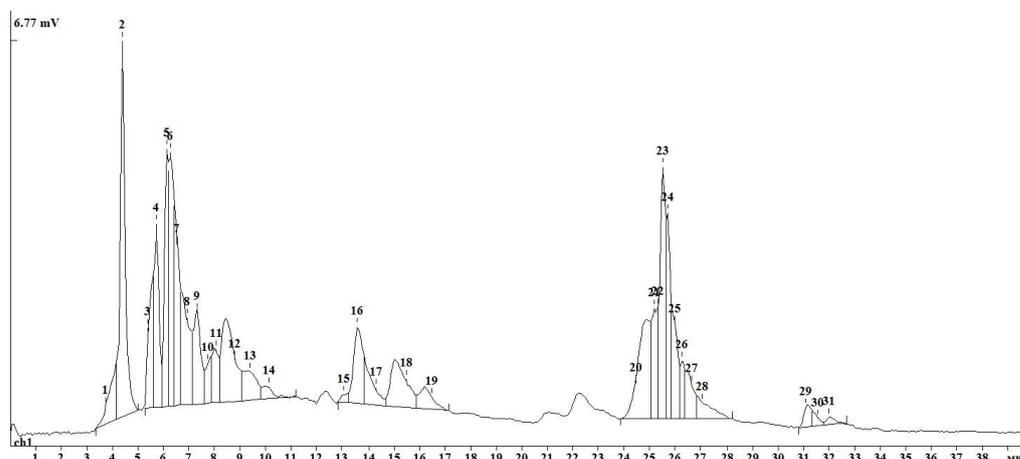


Рисунок 44 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения на 40% этиловом спирте из листьев черники обыкновенной.

Известно, что основным действующим компонентом листьев толокнянки и брусники является арбутин ( $\beta$ -D-глюкопиранозидом гидрохинона), однако его присутствие маскируется присутствием других соединений, также реагирующих с диазосоединениями. В указанных выше условиях хроматографического разделения (пробоподготовка, объем пробы и т.п.) арбутин в побегах черники обыкновенной не обнаруживается. Так как другие фенольные соединения, представленные в исследуемых видах ЛРС, в основном являются полифенолами (флавоноиды, дубильные вещества и др.), связывающиеся с алюминия оксидом, полученные извлечения нами были профильтрованы через слой алюминия оксида (х.ч., нейтральный II по Брокману, «Реахим») [36].

Извлечения до и после фильтрования через слой алюминия оксида были проанализированы в различных системах растворителей, известных для ТСХ-анализа арбутина (рис. 45), а также с помощью метода ВЭЖХ в системе 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , подкисленная  $\text{H}_3\text{PO}_4$  до pH  $3,00 \pm 0,01$ , и ацетонитрил (9:1); расход подвижной фазы: 0,6 мл/мин; детекция при 280 нм (рис. 46-48).

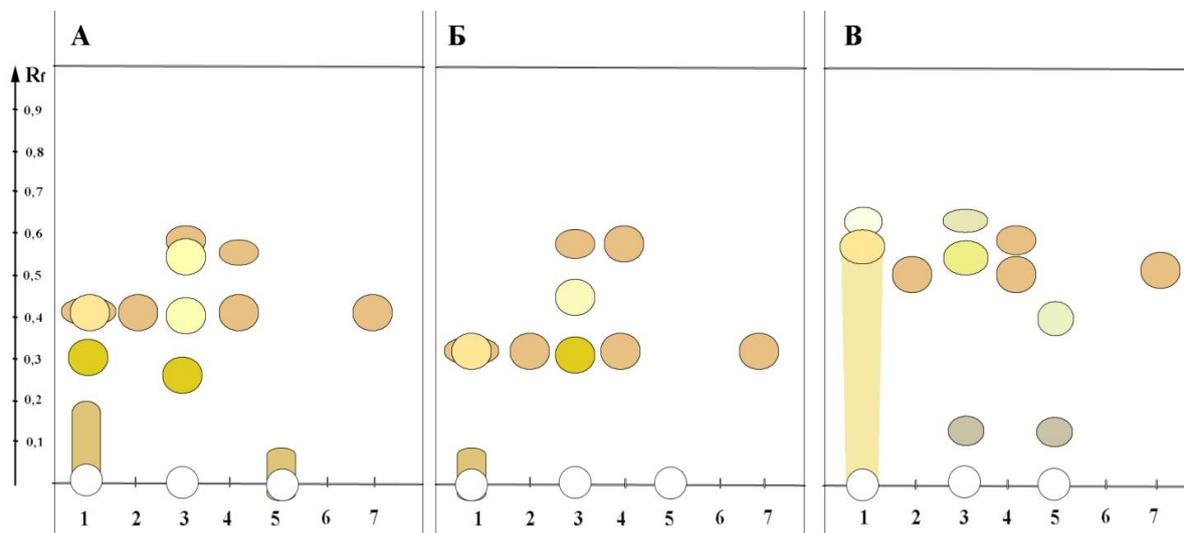


Рисунок 45 – Хроматограммы и схемы разделения извлечений из листьев толокнянки, брусники и побегов черники на этиловом спирте 70%до и после твердофазной экстракции в разных системах растворителей: А – подвижная фаза: хлороформ –спирт этиловый 96% (6:4 об/об); Б – подвижная фаза: хлороформ –спирт этиловый 96% – вода (26:16:3 об/об/об); В – подвижная фаза: *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2 об/об/об).

Обозначения: 1 – извлечение из листьев толокнянки до фильтрования через слой алюминия оксида; 2 – извлечение из листьев толокнянки после фильтрования через слой алюминия оксида; 3 – извлечение из листьев брусники до фильтрования через слой алюминия оксида; 4 – извлечение из листьев брусники после фильтрования через слой алюминия оксида; 5 – извлечение из побегов черники до фильтрования через слой алюминия оксида; 6 – извлечение из побегов черники после фильтрования через слой алюминия оксида; 7 – государственный стандартный образец арбутина.

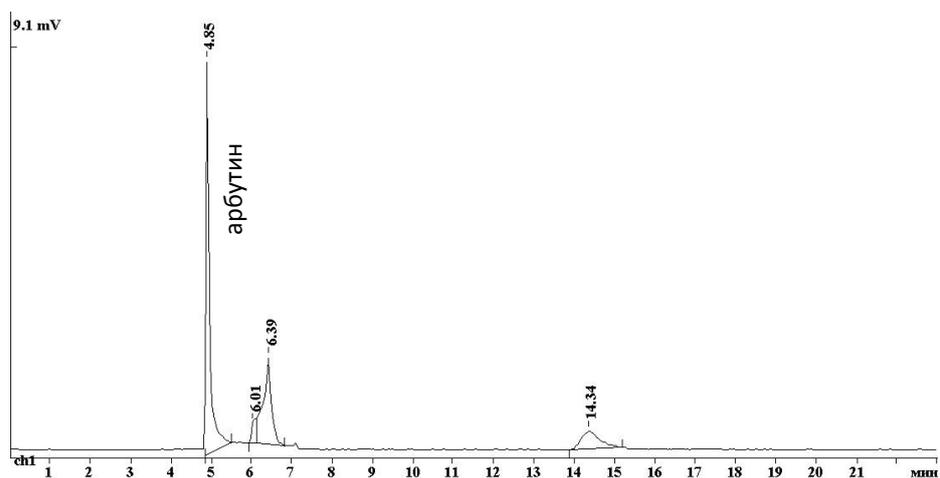


Рисунок 46 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения на 40% этиловом спирте из листьев толокнянки обыкновенной после фильтрования через слой алюминия оксида.

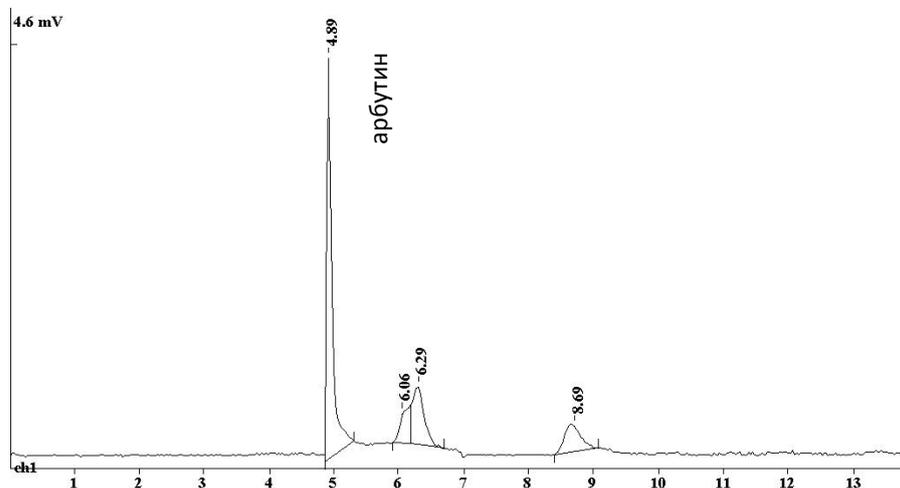


Рисунок 47 - ВЭЖХ-хроматограмма водного извлечения из листьев брусники обыкновенной после фильтрования через слой алюминия оксида.

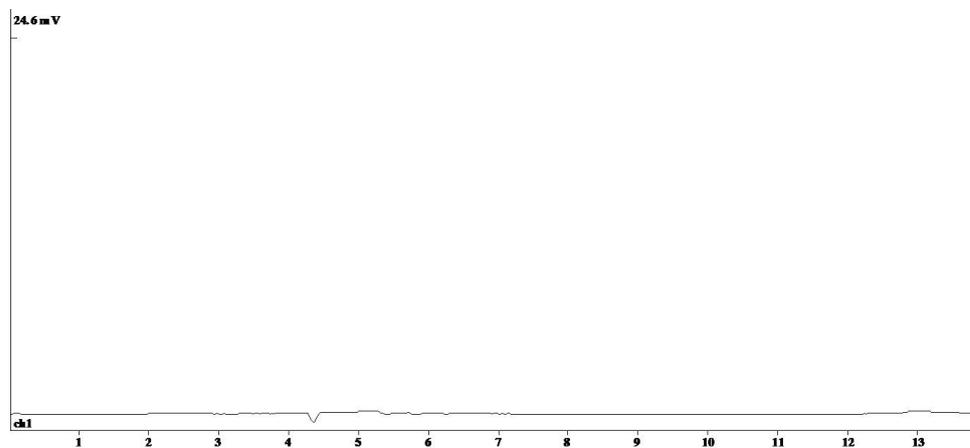


Рисунок 48 - ВЭЖХ-хроматограмма водного извлечения из побегов

черники обыкновенной после фильтрования через слой алюминия оксида.

Из исследуемых хроматографических систем для ТСХ-анализа наибольшей разрешающей способностью по отношению к арбутину и химически родственному соединению обладала подвижная фаза хлороформ – спирт этиловый 96% – вода (26:16:3) (больше 1,0). Оптимальной для разделения этих веществ также являлась система хлороформ – спирт этиловый 96% (6:4) (разрешающая способность примерно равна 0,6).

В извлечении из брусники после фильтрования помимо пятна, соответствующего арбутину, обнаруживается другое пятно с более высоким значением  $R_f$ , которое также окрашивается в красный цвет после обработки раствором диазобензолсульфокислоты в красный цвет и предположительно является метиларбутином. Значения  $R_f$  анализируемых соединений в различных системах растворителей приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Значения  $R_f$  арбутина и метиларбутина в разных системах растворителей

<b>Подвижная фаза</b>	<b><math>R_f</math> арбутина</b>	<b><math>R_f</math> метиларбутина (предположительно)</b>
хлороформ – спирт этиловый 96% – вода (26:16:3)	0,31-0,33	0,55-0,57
<i>n</i> -бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2)	0,51-0,53	0,59-0,62
хлороформ – спирт этиловый 96% (6:4)	0,39-0,41	0,52-0,54

В описанных выше условиях для ВЭЖХ- и ТСХ-анализа арбутина в побегах черники обыкновенной не обнаруживается. Следует отметить, что результаты йодометрического анализа, описанного для количественного определения арбутина в листьях толокнянки и брусники, показывают присутствие этого соединения в побегах черники обыкновенной 2,41%. Однако это может быть объяснено вкладом других сопутствующих соединений.

#### 4.2. Фитохимическое исследование плодов черники обыкновенной

При хроматографическом разделении на силикагеле (колонка № 1) окрашенные в характерные для антоцианов цвета фракции начинали выходить при содержании в хлороформе 20% этилового спирта, содержащего 0,1% хлористоводородной кислоты. Основная масса антоцианов десорбировалась при элюировании 40% подкисленным этиловым спиртом в хлороформе.

Целевые фракции объединяли и наносили на силикагель, элюировали смесями хлороформ – этиловый спирт, содержащий 0,1% HCl в различных соотношениях при увеличивающейся концентрации спирта. В результате были получены фракции, содержащие преимущественно гликозиды мальвидина и цианидина; фракции, содержащие в основном гликозиды цианидина и дельфинидина и фракции, содержащие преимущественно гликозиды дельфинидина.

Для разделения смеси этих соединений использовали рехроматографию на слое полиамида. Упаренные фракции, содержащие гликозиды мальвидина и цианидина, наносили на полиамид; после того как раствор впитывался в адсорбент, полиамид промывали хлороформом, 20%, 40%, 60% раствором подкисленного метанола в хлороформе и чистым метанолом (содержащим 0,1% HCl). Фракции собирали объемом по 5 мл. При содержании в хлороформе 20% подкисленного метилового спирта выходил в основном мальвидин-3-глюкозид. Во фракциях, полученных при элюировании 60% раствором метанола в хлороформе и кислым метанолом, находился преимущественно цианидин-3-глюкозид.

Очистку фракций, содержащих гликозиды цианидина и дельфинидина, также проводили методом жидкостной колоночной хроматографии на полиамиде аналогично предыдущему. Относительно чистый дельфинидин-3-глюкозид был во фракциях, выходящих при элюировании кислым метанолом (рис. 49).

Чистоту веществ подтверждали методом ТСХ в различных системах растворителей. Полученные фракции, содержащие относительно чистые

вещества, оставляли при комнатной температуре открытыми для испарения растворителя.

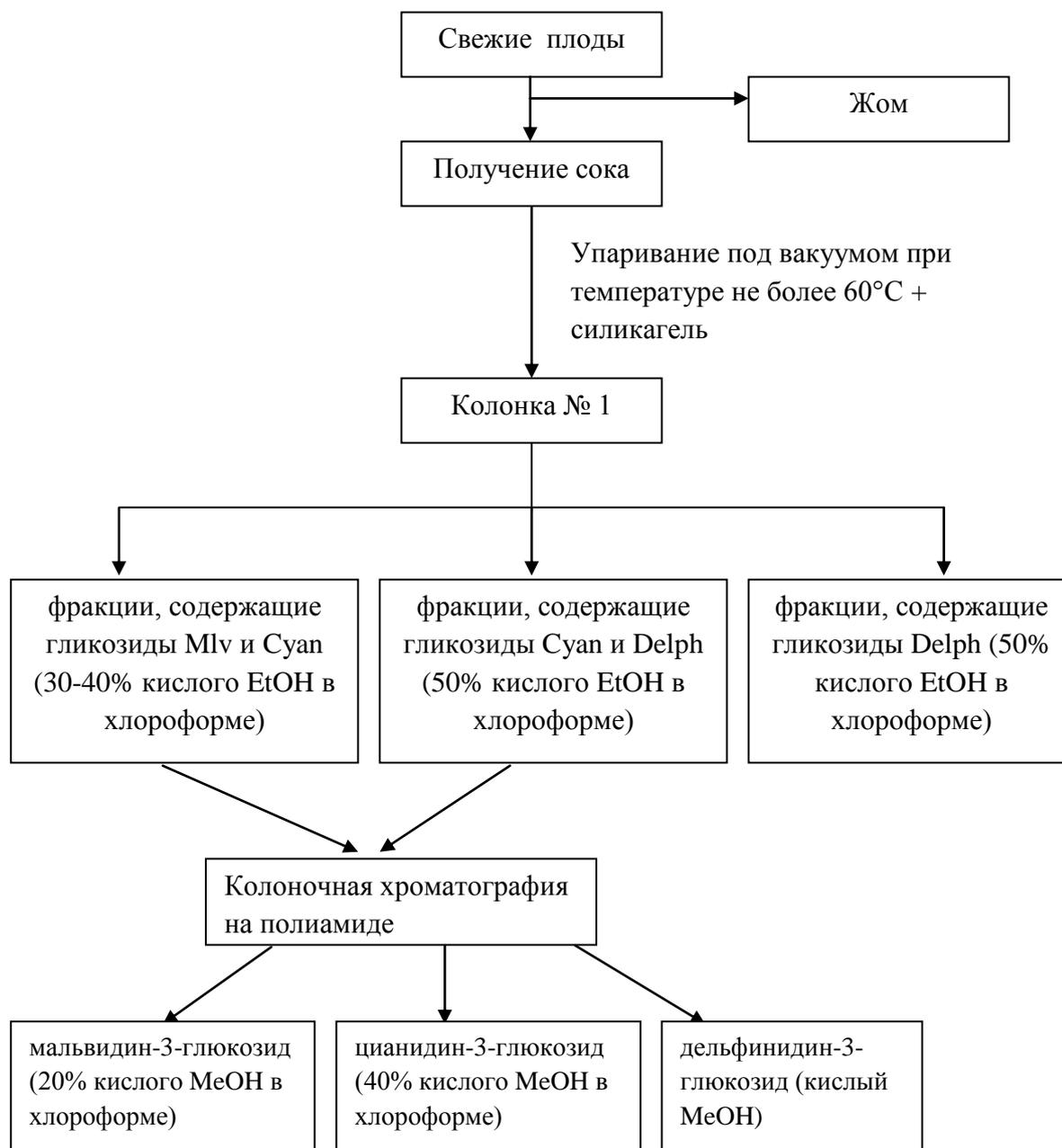


Рисунок 49 - Схема выделения антоцианов из плодов черники

Таким образом, выделены 3 доминирующих антоциана (с  $R_f$  – 0,51; 0,36 и 0,20 в системе н-бутанол - ледяная уксусная кислота-вода 4:1:2). Сравнение их химических свойств показало, что первое вещество не изменяло свою окраску при добавлении раствора алюминия хлорида, что было объяснено как отсутствие расположенных в орто-положении друг к другу фенольных гидроксильных групп, которые обусловили бы комплексообразование (характерно для производных мальвидина).

Второе и третье вещества при добавлении раствора алюминия хлорида приобретали синий цвет.

На основании данных ЯМР- и масс-спектра доминирующего соединения ( $R_f$  - 0,36 в системе н-бутанол - ледяная уксусная кислота-вода 4:1:2), УФ-спектра раствора этого веществ в 1% этанольном растворе хлористоводородной кислоты, выделенное вещество было идентифицировано как цианидин-3-О-глюкозид.

Кривые поглощения выделенных антоцианов имеют характерные максимумы при  $281 \pm 2$  нм и в видимой области. Максимумы поглощения в видимой области несколько отличались. Для вещества с  $R_f$  в системе н-бутанол - ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) – 0,51-0,52 (мальвидин-3-глюкозиду) максимум поглощения соответствовал  $537 \pm 2$  нм; для вещества с  $R_f$  – 0,36 (цианидин-3-глюкозиду) -  $544 \pm 2$  нм; веществу  $R_f$  – 0,20 (дельфинидин-3-глюкозиду) соответствовала длина волны при максимуме поглощения  $551 \pm 2$  нм. Соотношение удельных показателей поглощения в видимой и УФ-области для антоцианов и извлечения из плодов составляет 1,5-1,8 (рис. 50).. Максимум поглощения извлечения из плодов черники, полученного настаиванием при температуре  $8 \pm 2$  °С (экстрагент – 95% спирт, содержащий 1% HCl), соответствовал веществу с  $R_f$  – 0,36 ( $546 \pm 2$  нм), т.е. цианидин-3-О-глюкозиду. Характерная кривая поглощения может быть использована для качественного анализа изучаемого растительного сырья (табл. 6).

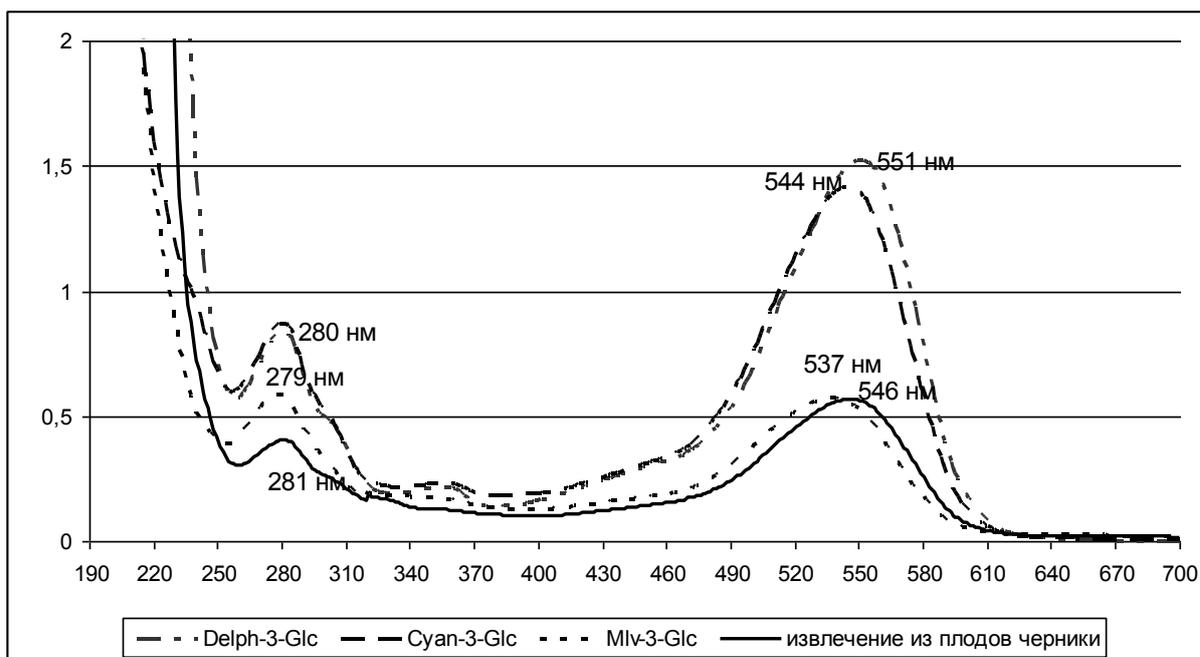


Рисунок 50 – Кривые поглощения выделенных антоцианов. Delph-3-Glc – дельфинидин-3-глюкозид; Cyan-3-Glc – цианидин-3-глюкозид; Malv-3-Glc – мальвидин-3-глюкозид

По данным спектров в УФ- и видимой области был определен удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида в глюкозида в 1% растворе хлористоводородной кислоты в 95% этиловом спирте при аналитической длине волны 546 нм ( $100 \pm 4,3$ ) и в 0,5% спиртовом растворе аммиака при аналитической длине волны 623 нм ( $250 \pm 3,6$ ).

Полученные значения удельного показателя поглощения были использованы при разработке методики количественного определения антоцианов в плодах черники.

#### 4.3. Фитохимическое исследование побегов черники обыкновенной

С целью изучения химического состава побегов черники обыкновенной было получено извлечение на 70% этиловом спирте.

Из побегов черники обыкновенной, измельченных до размера, проходящего через сито с диаметром отверстий 5 мм, было получено извлечение методом дробной мацерации с последующим термическим нагреванием. Полученное извлечение упаривали под вакуумом до густого остатка. Упаренное извлечение

высушивали на силикагеле L 40/100 (Чехия). Полученный сухой порошок наносили на слой силикагеля, сформированный в хлороформе (высота колонки 30 см, диаметр – 7,5 см). Колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях (99:1; 97:3; 95:5; 93:7; 90:10; 88:12; 85:15; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:60) и 96% спиртом этиловым.

Это привело к получению блока фракций (29-67), содержащих целевые вещества. Данные фракции объединяли по три и наносили на полиамид с целью дальнейшей очистки. Сухой порошок (экстракт+полиамид) переносили в хроматографическую колонку на слой чистого полиамида (высота сорбента – 4,0 см, диаметр – 5,0 см), элюировали хлороформом, содержащим этиловый спирт в различных концентрациях (5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%). Контроль за разделением осуществлялся с помощью ТСХ-анализа.

В результате были получены три блока фракций, из которых методом перекристаллизации были выделены три соединения.

Для изучения выделенных веществ были использованы метод тонкослойной хроматографии, спектральные методы, кислотный и ферментативных гидролиз с последующей идентификацией углеводных остатков с помощью бумажной хроматографии в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) в присутствии стандартных образцов моно- и дисахаридов.

Для установления структуры выделенных веществ использовали данные УФ-, <sup>1</sup>H-ЯМР- и масс-спектров. Совокупность проведенных методов анализа и полученные результаты позволили идентифицировать выделенные соединения как кверцетин-3-О-ксилопиранозид, даукостерин и кофейная кислота (табл. 6).

Таблица 6 – Физико-химические и спектральные характеристики соединений, выделенных из плодов и побегов черники обыкновенной

№ п/п	Название	Химическая формула	Физико-химические характеристики
1.	Цианидин-3-О-глюкозид $C_{21}H_{21}O_{11}^+$ 3-О-β-D-глюкопиранозил 3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил) хроменилия		<b>масс-спектр (m/z):</b> 287 ( $M^+$ агликона); <b>т.пл.</b> 244-246°C; <b>УФ-спектр:</b> $\lambda_{max}$ 281 нм; 537 нм (1% HCl в 95% EtOH)
2.	Мальвидин-3-О-глюкозид $C_{23}H_{25}O_{12}^+$ 3-О-β-D-глюкопиранозил 3,5,7-тригидрокси-2-(4- гидрокси-3,5- диметоксифенил)хроменилия		<b>масс-спектр (m/z):</b> 331 ( $M^+$ агликона); <b>т.пл.</b> 240-245°C; <b>УФ-спектр:</b> $\lambda_{max}$ 281 нм; 544 нм (1% HCl в 95% EtOH)
3.	Дельфинидин-3-О-глюкозид $C_{21}H_{21}O_{12}^+$ 3-О-β-D-глюкопиранозил 3,5,7-тригидрокси-2-(3,4,5- тригидроксифенил) хроменилия		<b>масс-спектр (m/z):</b> 331 ( $M^+$ агликона); <b>т.пл.</b> 255-260°C; <b>УФ-спектр:</b> $\lambda_{max}$ 281 нм; 551 нм (1% HCl в 95% EtOH)
4.	Кверцетин-3-О- ксилопиранозид $C_{20}H_{18}O_{10}$ 3-О-β-D-ксилопиранозид 2- (3,4-дигидроксифенил)-3,5,7- тригидрокси-4Н-хромен-4-она		<b>масс-спектр (m/z):</b> 302 ( $M^+$ агликона); <b>т.пл.</b> 182-185°C (водный спирт); <b>УФ-спектр:</b> $\lambda_{max}$ 264 нм (плечо), 370 нм.
5.	Кофейная кислота $C_9H_8O_4$ (3-(3,4-дигидроксифенил)-2- пропенонвая кислота		<b>масс-спектр (m/z):</b> 180; <b>т.пл.</b> 223-225°C (водный спирт); <b>УФ-спектр:</b> $\lambda_{max}$ 327 нм (плечо)
6.	Даукостерин $C_{35}H_{60}O_6$ (3-О-глюкозид 17-(5-этил-6- метилгептан-2-ил)-10,13- диметил- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н- циклопента[а]фенантрен-3- ола)		<b>масс-спектр (m/z):</b> 414 ( $M^+$ агликона); <b>т.пл.</b> 315-318°C
7.	β-ситостерин $C_{29}H_{50}O$ (17-(5-этил-6-метилгептан-2- ил)-10,13-диметил- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17- додекагидро-1Н- циклопента[а]фенантрен-3-ол)		<b>масс-спектр (m/z):</b> $M^+$ 414; <b>т.пл.</b> 136-140°C

#### **Выводы к главе 4.**

1. Проведено сравнительное фитохимическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ и электронной спектроскопии.
2. Результаты качественного хроматографического (ТСХ и ВЭЖХ) анализа в основном соответствуют литературным данным, могут быть использованы для идентификации исследуемые видов ЛРС и включены в проекты фармакопейных статей на них. Следует отметить, что в условиях эксперимента арбутин в побегах черники не обнаруживается.
3. Электронные спектры изучаемых антоциансодержащих растительных объектов (плоды черники обыкновенной, аронии черноплодной и черной смородины) отличаются по длинам волн максимума поглощения, соотношению оптических плотностей при этих длинах, а также по наличию плеча.
4. Из плодов черники обыкновенной выделены и идентифицированы три соединения антоциановой природы: 3-О-глюкозиды цианидина, мальвидина и дельфинидина. Изучены их спектральные характеристики и определен удельный показатель поглощения цианидина-3-О-глюкозида в 1% растворе хлороводородной кислоты в 95% спирте этиловом и в 0,5% растворе аммиака в 95% спирте этиловом.
5. Из побегов черники обыкновенной выделены и идентифицированы кверцетин-3-О-ксилопиранозид, кофейная кислота и даукостерин.,  $\beta$ -ситостерин, из которых даукостерин выделен впервые, а кверцетин-3-О-ксилопиранозид выделен впервые из черники, произрастающей на территории Российской Федерации.
6. Результаты фитохимического исследования были использованы при разработке разделов «Качественные реакции» проектов фармакопейных статей «Черники обыкновенной побегов», «Черники

плоды», «Черники обыкновенной плоды свежие», рекомендованные для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания.

## **ГЛАВА 5. СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ**

### **5.1. Разработка методик качественного анализа плодов и побегов черники обыкновенной**

С развитием инструментальных методов значительно расширился возможный диапазон методов, используемых для идентификации фармацевтических субстанций и в том числе ЛРС. К таким методам можно отнести тонкослойную хроматографию, электронную спектроскопию, высокоэффективную жидкостную хроматографию. Эти методы отличает высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость [31].

Нами была рассмотрена возможность применения хроматографических и спектральных методов для качественного анализа изучаемых видов ЛРС.

#### **5.1.1. Тонкослойная хроматография**

Тонкослойная хроматография при подборе соответствующих условия (система растворителей, хроматографическая пластинка, способ детекции) является практически универсальным методом для анализа многих групп БАС.

В связи с тем, что антоцианы вызывают наибольший интерес по своим фармакологическим свойствам из других групп действующих соединений в плодах, а также из-за своей высокой неустойчивости к различным факторам окружающей среды, нами предлагается проводить стандартизацию и свежих, и воздушно-сухих плодов по содержанию именно этой группы БАС.

Нами было проведено исследование по определению оптимальной хроматографической системы для разделения антоцианов черники методом тонкослойной хроматографии.

Извлечение из плодов получали при комнатной температуре для избежания изменения профиля антоцианов при температурном воздействии.

Были апробированы несколько систем растворителей: хлороформ-метанол-вода (26:14:3); хлороформ-этанол-вода (26:16:3); хлороформ-0,1% спиртовой раствор HCl - вода (26:16:3), 1% спиртовой раствор HCl; *n*-бутанол - ледяная

уксусная кислота-вода 4:1:2 или 4:1:5 (верхняя фаза). В качестве оптимальной системы растворителей для хроматографического разделения антоцианов нами рекомендована смесь *n*-бутанол - ледяная уксусная кислота-вода 4:1:2; 4:1:5 (верхняя фаза). Детекцию веществ осуществляли в видимой области спектра и в УФ-свете (254 и 366 нм).

На хроматограмме извлечения из плодов черники обыкновенной обнаруживаются пятна розового цвета с величиной  $R_f$  около 0,51 и 0,47 (гликозиды мальвидина), фиолетового цвета с  $R_f$  0,36 (цианидин-3-глюкозид) и пятна синего цвета с  $R_f$  0,20 и 0,33 (гликозиды дельфинидина) (рис. 1). Результаты данных исследований свидетельствуют о целесообразности использования ТСХ в системе *n*-бутанол - ледяная уксусная кислота - вода (4:1:2).

Состав воздушно-сухого сырья отличается по профилю антоцианов от свежего. Общим является наличие цианидин-3-О-глюкозида ( $R_f$  0,36) и мальвидин-3-О-глюкозида ( $R_f$  0,51).

Методика качественного анализа антоцианов свежих плодов черники  
обыкновенной

2,0 г плодов черники помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 10 мл 95 % этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты, закрывают пробкой и перемешивают 20 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса». На линию старта пластинки «Сорбфил–ПТСХ-АФ-А-УФ», проведенную на расстоянии 1,5-2 см от нижнего края хроматографической пластинки, микропипеткой наносят 0,02 мл извлечения в виде пятна диаметром около 5 мм. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру, которую предварительно насыщают смесью растворителей *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) в течение суток, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 8 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут и просматривают в видимом свете. На хроматограмме обнаруживаются розовые пятна с величиной  $R_f$  0,47 и

0,51 (гликозиды мальвидина), фиолетового цвета с  $R_f$  0,36 (цианидин-3-гликозид) и пятна синего цвета с  $R_f$  0,20 и 0,33 (гликозиды дельфинидина).

Методики качественного анализа антоцианов воздушно-сухих плодов черники обыкновенной.

2,0 г плодов черники обыкновенной помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 10 мл 95 % этилового спирта, содержащего 1 % хлористоводородной кислоты, закрывают пробкой и перемешивают в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса». На линию старта пластинки «Сорбфил–ПТСХ-АФ-А-УФ», проведенную на расстоянии 1,5-2 см от нижнего края хроматографической пластинки, микропипеткой наносят 0,02 мл извлечения в виде пятна диаметром около 5 мм. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру, которую предварительно насыщают смесью растворителей н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) в течение суток, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 8 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут и просматривают в видимом свете. На хроматограмме обнаруживаются розовое пятно с величиной  $R_f$  около 0,5 (гликозид мальвидина) и пятно фиолетового цвета с величиной  $R_f$  около 0,35 (цианидин-3-гликозид); допускается наличие других пятен.

Для качественного анализа побегов черники методом ТСХ также были рассмотрены различные системы растворителей, в том числе известное по литературным данным [фсп]. Выбрана система этилацетат - безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12).

Методики качественного анализа побегов черники обыкновенной

На линию старта пластинки “Силуфол УФ-254”, “Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ” или “Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ” микропипеткой наносят 0,01 мл испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение») и параллельно 0,002 мл раствора раствора А рутина (см. раздел «Количественное определение»). Затем

хроматографическую пластинку помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч, со смесью растворителей: этилацетат - безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 13 см (силуфол) или 8 см (сорбфил), пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и 366 нм. Затем хроматограмму обрабатывают раствором диазобензолсульфокислоты, высушивают при 100-105 °С в течение 5 мин. Подлинность побегов черники подтверждается наличием на пластинке пятен с  $R_s$  относительно пятна ГСО рутин 2,2-2,4 (доминирующий флавоноид - кверцетин-3-О- $\beta$ -D-ксилопиранозид), допускается наличие других пятен.

### **5.1.2. Электронная спектроскопия**

Спектроскопический анализ – один из современных методов анализа, позволяющий по характеру кривой поглощения сделать предварительные выводы о наличии в анализируемом объекте определенных групп БАС. Для каждого растения набор групп БАС специфичен, вследствие чего электронная спектроскопия может быть применена для идентификации ЛРС.

Например, известно, что для антоцианов характерны два максимума поглощения: в УФ-области (260-280 нм) и в видимой области спектра (500-550 нм), из которых последний является характерным для этих растительных пигментов. Спектры поглощения для разных антоцианов могут незначительно отличаться в зависимости от типа агликона, типа гликозилирования и условий измерения спектральных данных. С увеличением содержания фенольных гидроксиллов наблюдается смещение  $\lambda_{\text{max}}$ , видимая область в сторону более длинных волн. Поэтому по характеру поглощения антоцианосодержащих растительных объектов можно приблизительно сказать о наличии тех или иных компонентов.

Данные о влиянии природы антоцианидина на длину волны максимума поглощения в видимой области спектра в 0,01% метанольном растворе HCl представлены в табл. 7.

Таблица 7 – Значения  $\lambda_{\max}$  в видимой области спектра агликонов

<b>Антоцианидин</b>	$\lambda_{\max}$ , видимая область
пеларгонидин	505 нм
цианидин и пеонидин	520-526 нм
производные дельфинидина	532-537 нм

В ходе исследования нами были изучены и включены в раздел «Подлинность» проектов фармакопейных статей.

Извлечение из плодов черники в 1% спиртовом растворе хлороводородной кислоты имеет максимумы поглощения при  $282 \pm 2$  нм и  $545 \pm 2$  нм. У свежих и воздушно-сухих отличается соотношением ( $A_{546}/A_{282}$ ). Для воздушно-сухих плодов это соотношение изменяется в пользу коротковолнового максимума и составляет  $1,0:0,10 \div 0,15$  (рис. 37). Такое различие по всей видимости обусловлено изменением химического состава плодов черники после высушивания по принятой схеме. Следовательно, соотношение  $A_{546}/A_{282}$  является важным показателем доброкачественности сырья и косвенно отображает химические процессы, происходящие в сырье при хранении и в процессе переработки.

Извлечение из побегов черники имеет максимумы поглощения при длинах волн  $292 \pm 2$  нм и  $331 \pm 2$  нм. Извлечение из листьев черники на 70% спирте этиловом имеет соответствующие максимумы  $287 \pm 2$  нм и  $324 \pm 2$  нм; для стеблей характерный максимум поглощения при  $281 \pm 2$  нм и «плечо» в области  $315 \pm 2$  нм. Характер кривой поглощения может использоваться для подтверждения доброкачественности сырья и преобладания в сырье тех или иных органов растений (рис. 51).

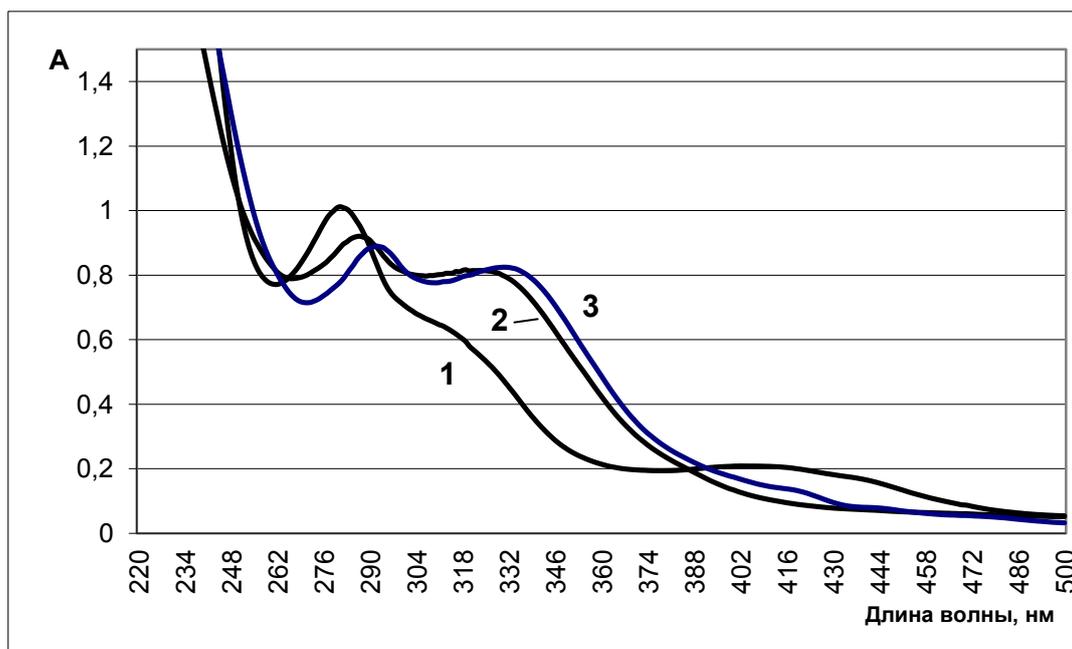


Рисунок 51 – Электронные спектры поглощения извлечений на 70% спирте из стеблей черники обыкновенной (1), листьев (3) и побегов (2).

## 5.2. Разработка методик количественного определения суммы флавоноидов в плодах и побегах черники обыкновенной

### 5.2.1. Разработка методики количественного определения суммы антоцианов в плодах черники обыкновенной

В ходе исследования нами разрабатывалась методика количественного определения суммы антоцианов в плодах черники обыкновенной методом прямой спектрофотометрии в соответствии с монографией Европейской Фармакопеи на плоды черники и фармакопейной статьей на цветки василька синего Государственной Фармакопеи СССР XI издания [8, 101]. Содержание рассчитывали с использованием удельного показателя поглощения выделенного из плодов цианидина-3-О-глюкозида.

Для этого из плодов получали извлечение с использованием водно-спиртовых смесей, содержащих 1% хлороводородной кислоты при нагревании в течение 30 мин на водяной бане. Извлечение после охлаждения доводили 1% спиртовым раствором хлороводородной кислоты до первоначальной массы и фильтровали через бумажный фильтр «красная полоса». Аликвоту полученного

извлечения и помещали в мерную колбу, доводили объем до метки 95% спиртом этиловым, содержащем 1% хлороводородной кислоты. Растворы перемешивали и измеряли оптическую плотность при аналитической длине волны 546 нм.

С использованием данного метода нами разработана методика количественного определения суммы антоцианов в свежих и воздушно-сухих плодах. Для этого сравнилась экстракционная способность спиртов различных концентраций, влияние рН, температуры, соотношения сырье : экстрагент и времени экстрагирования. Были определены оптимальные условия для извлечения антоцианов из воздушно-сухих плодов черники обыкновенной: экстрагент – 60%-ный этиловый спирт, содержащий 1% хлористоводородной кислоты; соотношение «сырье–экстрагент» – 1 : 50; время экстракции на водяной бане при температуре 85–90 °С в течение 90 мин (табл. 8). Для свежих плодов оптимальные условия: 95% этиловый спирта, содержащий 1% раствора хлороводородной кислоты, соотношение «сырье : экстрагент» - 1:50; время экстракции 30 мин на кипящей водяной бане (табл. 10).

Таблица 8 - Влияние различных факторов на полноту извлечения антоцианов из плодов черники обыкновенной

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение сырье: экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид и абсолютно сухое сырье	Примечание
<b>Экстрагент</b>				
95% (1% HCl)	1:50	90	2,37±0,13	нагрев на кипящей водяной бане
80% (1% HCl)	1:50	90	2,88±0,18	нагрев на кипящей водяной бане
70% (1% HCl)	1:50	90	2,83±0,18	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	90	3,35±0,17	нагрев на

				кипящей водяной бане
50% (1% HCl)	1:50	90	2,92±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
40% (1% HCl)	1:50	90	2,96±0,10	нагрев на кипящей водяной бане
30% (1% HCl)	1:50	90	2,80±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	120	2,20 ±0,18	настаивание при комнатной температуре
<b>Время экстрагирования</b>				
60% (1% HCl)	1:50	30	2,77±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	45	3,11±0,18	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	60	3,35±0,13	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	90	4,04±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	120	3,91±0,14	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	150	4,00±0,14	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	180	4,07±0,14	нагрев на кипящей водяной бане
<b>Соотношение «сырье : экстрагент»</b>				
60% (1% HCl)	1:30	90	3,86±0,10	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1% HCl)	1:50	90	4,04±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
60% (1%	1:100	90	3,76 ±0,06	нагрев на

HCl)				кипящей водяной бане
------	--	--	--	-------------------------

**Методика количественного определения суммы антоцианов в плодах черники.** Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, но не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл 60 % этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 90 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент 60 % этиловым спиртом, содержащим 1 % хлористоводородной кислоты. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (марки «Красная лента»). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 1% раствором хлористоводородной кислоты в 95% этиловом спирте. Оптическую плотность измеряют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 546 нм. В качестве раствора сравнения используют 95 % этиловый спирт.

*Примечание: Приготовление 60 % этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты.* К 126 мл 95 % этилового спирта добавляют 5,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной (Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издания), доводят водой до объема 200,0 мл.

Содержание суммы антоцианов в плодах черники обыкновенной в процентах (X) в пересчете на абсолютно-сухое сырье и цианидин-3-О-глюкозид вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 25 \times 50 \times 100}{m \times 1 \times 100 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора,

$m$  – масса сырья, г;

100 – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида;

$W$  – потеря в массе при высушивании в процентах.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывает, что ошибка единичного определения суммы антоцианов в плодах черники с доверительной вероятностью 95 % составляет 3,52 % (табл. 9).

С использованием разработанной методики был проанализирован ряд промышленных образцов сырья, представленных на фармацевтическом рынке Самарской области (производства ООО ПКФ «Фитофарм» и ЗАО «Иван-Чай»). Содержание суммы антоцианов в исследуемых образцах варьирует от  $4,04 \pm 0,08\%$  до  $4,79 \pm 0,05\%$ .

Таблица 9 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антоцианов в свежих плодах черники обыкновенной

$n$	$f$	$\bar{X}$	$S$	$S^2$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
7	6	4,15	0,0580	0,00336	95	2,45	0,14	$\pm 3,52$

Таблица 10 - Влияние различных факторов на полноту извлечения антоцианов из свежих плодов черники обыкновенной

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение сырье: экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в свежем сырье	Примечание
<b>Экстрагент</b>				
95% (1% HCl)	1:50	120	$2,32 \pm 0,26$	настаивание при комнатной температуре
95% (0,1% HCl)	1:50	30	$2,39 \pm 0,18$	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:50	30	$4,05 \pm 0,18$	нагрев на кипящей водяной бане

70% (1% HCl)	1:50	30	3,43±0,17	нагрев на кипящей водяной бане
40% (1% HCl)	1:50	30	3,48±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
вода (1% HCl)	1:50	30	2,85±0,18	нагрев на кипящей водяной бане
<b>Время экстрагирования</b>				
95% (1% HCl)	1:50	15	3,25±0,15	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:50	30	4,05±0,18	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:50	45	3,22±0,20	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:50	60	2,64±0,17	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:50	90	2,75±0,14	нагрев на кипящей водяной бане
<b>Соотношение «сырье : экстрагент»</b>				
95% (1% HCl)	1:30	30	3,76±0,17	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:50	30	4,05±0,18	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:100	30	4,15 ±0,20	нагрев на кипящей водяной бане
95% (1% HCl)	1:150	30	4,05±0,10	нагрев на кипящей водяной бане

**Методика количественного определения суммы антоцианов в плодах черники.** Около 1 г (точная навеска) размороженных плодов черники помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл 95 % этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты. Колбу

закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент 95 % этиловым спиртом, содержащим 1% хлористоводородной кислоты. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (марки «Красная лента»). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 1 % раствором хлористоводородной кислоты в 95 % этиловом спирте. Оптическую плотность измеряют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 546 нм. В качестве раствора сравнения используют 95 % этиловый спирт.

*Примечание: Приготовление 1% раствора хлористоводородной кислоты в 95 % спирте.* 5,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной (Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издания) доводят 95 % этиловым спиртом до объема 200,0 мл.

Содержание суммы антоцианов в плодах черники свежих в процентах (X) в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A * 25 * 50}{m * 1 * 100}, \text{ где}$$

*A* – оптическая плотность испытуемого раствора,

*m* – масса сырья, г.

100 – удельный показатель поглощения цианидина-3-О-глюкозида.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывает, что ошибка единичного определения суммы антоцианов в плодах черники с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 4,54\%$  (табл. 11).

Таблица 11 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антоцианов в свежих плодах черники обыкновенной

<i>n</i>	<i>f</i>	$\bar{X}$	<i>S</i>	$S^2$	<i>P</i> , %	<i>t</i> ( <i>P</i> , <i>f</i> )	$\Delta X$	<i>E</i> , %
7	6	4,15	0,0767	0,00588	95	2,45	0,18	$\pm 4,54$

Содержание антоцианов в исследуемых образцах плодов черники обыкновенной с использованием данной методики составило 3,80-4,10 %.

Данные методики были отражены в разделах «Количественное определение» и «Числовые показатели» проектов фармакопейных статей на свежие и воздушно-сухие плоды черники обыкновенной, принятых на рассмотрение ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» ФС «Черники плоды» и «Черники обыкновенной плоды свежие» (вх. № 1016 от 22.01.13 г., вх. № 1020 от 28.01.13 г.).

Однако известно, что антоцианы могут существовать в 4-х таутомерных формах в зависимости от кислотности среды. В кислой среде (pH<3) они присутствуют в растворе в виде бензопирилиевых солей красного цвета. При повышении pH (4-5) происходит присоединение гидроксильной группы во втором положении с образованием бесцветного псевдосонования. При pH 6-7 образуются феноляты синего цвета. При pH более 8,0 происходит размыкание хроменого цикла и образуется соответствующий халкон (рис. 52) [104]. На этой способности антоцианов известен pH-дифференциальный метод количественного определения [104].

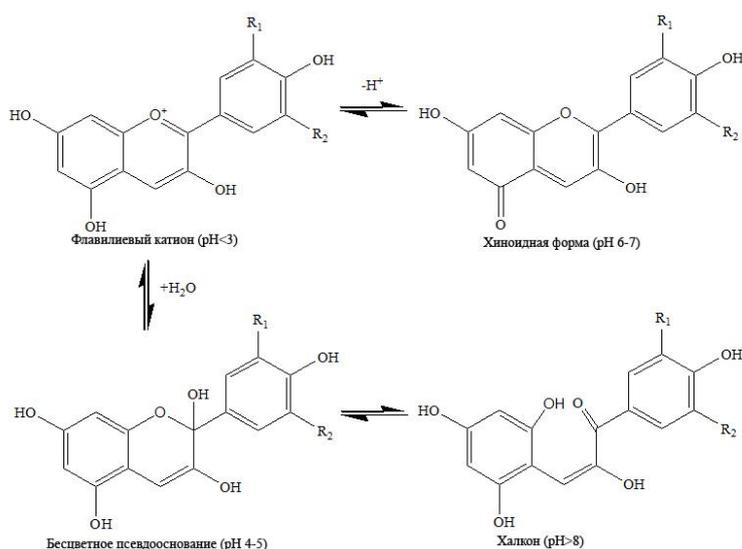


Рисунок 52 – Таутомерные превращения антоцианов в зависимости от значения pH.

Однако эта методика имеют ряд ограничений, в связи с высокой и не всегда обоснованной трудоемкостью процедуры.

Нами была рассмотрена возможность определения антоцианов дифференциальным методом при смещении рН в сторону щелочной реакции среды. Щелочную реакцию создавали использованием 0,5% раствора аммиака в 95% спирте этиловом. Для этого получали извлечение из плодов на 95% спирте этиловом, содержащем 1% хлороводородной кислоты при нагревании в течение 60 мин на водяной бане. Извлечение после охлаждения доводили 1% спиртовым раствором хлороводородной кислоты до первоначальной объема и фильтровали через бумажный фильтр «красная полоса». Отбирали две одинаковые аликвоты полученного извлечения и помещали в две мерные колбы, в одной из которых объем до метки доводили 95% спиртом этиловым, в другой – 0,5% спиртовым раствором аммиака. Растворы перемешивали и сразу измеряли оптическую плотность при аналитической длине волны 623 нм.

Содержание антоцианов в свежих плодах черники составило  $0,60 \pm 0,02\%$ . При количественном определении антоцианов с использованием рН-дифференциальной спектрофотометрии содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид составило  $0,61 \pm 0,03\%$  (табл. 12, 13).

Таблица 12 - Метрологические характеристики методики количественного определения антоцианов в свежих плодах черники обыкновенной с использованием раствора аммиака

$n$	$f$	$\bar{X}$	$S$	$S^2$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
7	6	0,60	0,02160	0,00047	95	2,45	0,02	$\pm 3,33$

Таблица 13 - Метрологические характеристики рН-дифференциальной методики количественного определения антоцианов в свежих плодах черники обыкновенной (прототип)

$n$	$f$	$\bar{X}$	$S$	$S^2$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
7	6	0,61	0,03240	0,00105	95	2,45	0,03	$\pm 4,92$

Содержание антоцианов в воздушно-сухих плодах составило  $0,325 \pm 0,009\%$ . При количественном определении антоцианов с использованием рН-дифференциальной спектрофотометрии содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид составило  $0,312 \pm 0,012\%$  (табл. 14, 15).

Таблица 14 - Метрологические характеристики методики количественного определения антоцианов в воздушно-сухих плодах черники обыкновенной с использованием раствора аммиака

$n$	$f$	$\bar{X}$	$S$	$S^2$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
7	6	0,325	0,00972	0,00009	95	2,45	0,009	$\pm 2,77$

Таблица 15 - Метрологические характеристики рН-дифференциальной методики количественного определения антоцианов в воздушно-сухих плодах черники обыкновенной (прототип)

$n$	$f$	$\bar{X}$	$S$	$S^2$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
8	7	0,312	0,01438	0,00021	95	2,36	0,012	$\pm 3,85$

Таким образом, предлагаемый способ отличается меньшей ошибкой единичного определения, меньшей трудоемкостью за счет сокращения времени на приготовление буферных растворов.

Однако разработка методики анализа антоцианов с использованием данного метода требует проведения дополнительных испытаний с целью определения стабильности анализируемых растворов, возможности применения метода для других антоцианосодержащих объектов, взаимодействиях аммиака с другими соединениями в ЛРС и влиянии этих взаимодействий на результаты.

### **5.2.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной**

В связи с тем, что известная фармакологическая активность побегов черники, на наш взгляд, в большей степени обусловлена флавоноидами, чем другими группами биологически активных соединений, содержащихся в сырье,

нами дополнительно к уже существующим требованиям к содержанию дубильных веществ была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом в пересчете на рутин.

В ходе исследования было установлено, что оптимальным экстрагентом является 70% этиловый спирт; спирт данной концентрации позволяет наиболее полно извлечь флавоноиды из сырья по сравнению с другими концентрациями; оптимальным является соотношение «сырье – экстрагент» 1:50; время экстракции 30 мин после закипания экстрагента на кипящей водяной бане (табл. 16).

Таблица 16 - Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из побегов черники обыкновенной

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение «сырье: экстрагент»	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье
Экстрагент			
95%	1:50	60	0,56±0,02
80%	1:50	60	0,66±0,03
70%	1:50	60	0,73±0,02
60%	1:50	60	0,72±0,03
50%	1:50	60	0,63±0,02
40%	1:50	60	0,63±0,02
Время экстрагирования			
70%	1:50	30	0,72±0,02
70%	1:50	60	0,72±0,02
70%	1:50	90	0,72±0,02

70%	1:50	120	0,73±0,02
70%	1:50	150	0,73±0,02
Соотношение «сырье : экстрагент»			
70%	1:30	60	0,63±0,02
70%	1:50	60	0,72±0,02
70%	1:100	60	0,72±0,02

***Методика количественного определения суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной.***

**Определение содержания суммы флавоноидов.** Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до ±0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр и охлаждают до комнатной температуры. Содержимое колбы перемешивают.

2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный при тех же условиях, но без добавления алюминия хлорида (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при аналитической длине волны 420 нм через 30 мин после приготовления всех растворов.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б рутина. Раствором сравнения служит раствор Б рутина, приготовленный аналогично испытуемому, но без добавления алюминия хлорида (См. «Примечание»).

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

$$X = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times 50 \times 25 \times (100 - W)} ;$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m<sub>0</sub> – масса ГСО рутина, в граммах; m – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

**Примечание:** *Приготовление раствора ГСО рутина:* Около 0,025 г (точная навеска) рутина (ФС 42-2508-87) помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят 70% этиловым спиртом до метки (**раствор А рутина**). 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят 95% спиртом до метки (**испытуемый раствор Б рутина**). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А рутина, помещенного в мерную колбу на 25 мл и доведенный 95 % спиртом до метки (**раствор Б рутина**). Срок хранения раствора А рутина – 1 месяц.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывает, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в побегах черники с доверительной вероятностью 95% составляет ±3,56%. Содержание флавоноидов и исследуемых образцах варьировало от 0,62% до 1,02%. Метрологические характеристики метода количественного определения флавоноидов в побегах черники представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной

n	f	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
7	6	0,73	0,027645	0,000764	95	2,45	0,026	±3,56

### 5.2.3. Стабильность антоцианов при высушивании

В связи с тем что антоцианы являются лабильными соединениями, нами было проведено исследование по изучению влияния условия сушки на потери антоцианов.

Для этого плоды предварительно провяливали на воздухе и высушивали при температурах:  $+40\pm 2$  °С;  $+50\pm 2$  °С;  $+60\pm 2$  °С;  $+70\pm 2$  °С;  $+80\pm 2$  °С в термостатируемом сушильном шкафу при толщине слоя не более 2 см. Высушивали до остаточной влажности не более 17%.

Качественный состав антоцианов определяли методом ТСХ. Содержание антоцианов определяли в исходных образцах и после высушивания в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид и абсолютно сухое сырье. Содержание антоцианов в исходном образце составило  $4,60\pm 0,12\%$ .

По данным ТСХ-анализа, за исключением плодов, высушенных при  $+70$  и при  $+80$  °С, антоциановый состав плодов мало отличался от профиля антоцианов свежих плодов. С увеличением температуры уменьшается содержание гликозидов дельфинидина.

Потери антоцианов в зависимости от условий высушивания приведены в таблице 18.

Таблица 18 - Потери антоцианов в зависимости о условий высушивания плодов черники обыкновенной

Параметры сушки, °С	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид и абсолютно сухое сырье, %	Потери антоцианов, %
$+40\pm 2$	$2,28\pm 0,07$	$50\pm 2$
$+50\pm 2$	$2,29\pm 0,07$	$50\pm 2$
$+60\pm 2$	$1,96\pm 0,06$	$58\pm 2$
$+70\pm 2$	$1,66\pm 0,05$	$64\pm 2$
$+80\pm 2$	$1,30\pm 0,04$	$72\pm 2$

Таким образом, диапазон температур +40-50 °С обеспечивает лучшую сохранность антоцианов.

### **Выводы к главе 5.**

1. Разработаны и включены в проекты фармакопейных статей методики качественного анализа побегов и плодов воздушно-сухих и свежих.
2. Подлинность плодов предложено определять методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) и методом электронной спектроскопии по наличию максимумов поглощения при 281 и 546 нм.
3. Подлинность побегов также предложено определять с использованием ТСХ-анализа в системе этилацетат - безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12) и наличию максимумов поглощения при 291 и 331 нм.
4. Разработана методика количественного определения суммы антоцианов в свежих плодах черники обыкновенной методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 546 нм, которая включена в проект фармакопейной статьи. Пробоподготовка предусматривает использование в качестве экстрагента 95% этилового спирта, содержащего 1% хлороводородной кислоты, нагревание на кипящей водяной бане в течение 30 мин, соотношение «сырье-экстрагент» - 1:50. Содержание суммы антоцианов должно быть не менее 3,5%.
5. Разработана методика количественного определения суммы антоцианов в воздушно-сухих плодах черники обыкновенной методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 546 нм, также включенная в проект фармакопейной статьи. Оптимальные условия экстракции: 60% этиловый спирт, содержащий 1% хлороводородной кислоты, нагревание на кипящей водяной бане в течение 60 мин, соотношение «сырье-экстрагент» - 1:50. Содержание

суммы антоцианов должной быть не менее 3,0% в пересчете на абсолютно сухое сырье.

6. Проведены исследования возможности количественного определения антоцианов дифференциальной спектрофотометрией в щелочной среде на основании их способности к таутомерным превращениям. Измерение оптической плотности проводили в 0,5% растворе аммиака в 95% спирте этиловом при аналитической длине волны 623 нм, расчеты проводили с использованием удельного показателя поглощения цианидина-3-О-глюкозида в аналогичных условиях.
7. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной методом дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом при аналитической длине волны 420 нм. Оптимальные условия экстракции: 70% этиловый спирт, время экстракции 60 мин на кипящей водяной бане, соотношение «сырье – экстрагент» - 1:50. В качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов рекомендовано значение «не менее 0,6%».
8. Исследована стабильность антоцианов в плодах в зависимости от условий высушивания. Оптимальным диапазоном, обеспечивающим более высокую стабильность антоцианов, является +40-50 °С.
9. На основании полученных результатов разработаны разделы «Качественные реакции» (ТСХ и спектроскопия в УФ- и видимой области) и «Количественное определение» в проекты фармакопейных статей «Черники обыкновенной побеги», «Черники плоды», «Черники обыкновенной плоды свежие», рекомендованные для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания.

## ГЛАВА 6. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ РАЗРАБОТКИ ИМПОРТЗАМЕЩАЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

### 6.1. Разработка и стандартизация лекарственных препаратов на основе плодов черники обыкновенной

При разработке лекарственных препаратов в качестве субстанции использовали сок, получаемый отжимом быстрозамороженных плодов черники обыкновенной после предварительной разморозки при комнатной температуре.

Выход сока составляет 80-85% от исходной массы плодов; жом, полученный после отжима плодов досушивали при  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  в вакуум-сушильном шкафу. Масса жома составляла 4-6% от исходной массы плодов.

Стабилизацию сока проводили путем добавления к 85 частям сока по массе 15 частей 95% спирта, в котором предварительно растворяли сорбиновую кислоту в количестве 0,1% от общей массы жидкости. Для быстрого нагревания смесь ставили в воду, предварительно нагретую до  $85-88^\circ\text{C}$ , и после нагревания сока до  $77-78^\circ\text{C}$ , нагревание продолжалось 30 минут; затем нагретую жидкость ставили в проточную воду. Потери антоцианов после стабилизации достигали 10% от их первоначального содержания в плодах (табл. 19).

Таблица 19 - Показатели качества сока плодов черники

Показатели	Плотность, г/см <sup>3</sup>	pH	Содержание антоцианов, %
До стабилизации	1,030-1,040	3,20-3,25	0,27-0,57
После стабилизации	1,010-1,020	3,25-3,27	0,30-0,37
После сгущения	остаточная влажность $20 \pm 3\%$		1,93-2,43

В связи с термолабильностью действующих веществ в плодах черники для сгущения исходного и стабилизированного сока рассматривались следующие варианты концентрирования под вакуумом:

- в роторно-вакуумном испарителе при  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  на водяной бане до 1/5-1/6 от первоначального объема; досушивание на водяной бане до остаточной влажности 18-22%;

- в вакуум-сушильном шкафу при  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  при глубине вакуума не более 4,9 кПа до остаточной влажности 15-20%.

В связи с тем, что разница в потерях была статистически незначима, в дальнейшем концентрирование сока проводилось упариванием в роторно-вакуумном испарителе (табл. 20).

Таблица 20 - Сравнительная характеристика двух способов упаривания сока плодов черники

Метод упаривания	В роторно-вакуумном испарителе	В вакуум-сушильном шкафу
Потери	$8,83\pm 0,27\%$	$7,10\pm 0,21\%$

Преимущества данного метода по сравнению со сгущением в вакуум-сушильном шкафу: быстрота; равномерность нагрева. Существенным недостатком является более интенсивное термическое воздействие, что может быть уменьшено в промышленных условиях созданием более глубокого вакуума.

Полученный сгущенный сок включали в состав следующих лекарственных форм: таблетки; сироп; пастилки.

#### **6.1.1. Обоснование состава и способа получения лекарственного препарата «Черники обыкновенной сироп»**

При изготовлении сиропов в качестве корригентов использовались сахароза, сорбит и фруктоза. Первоначально получали по стандартной технологии вкусовой сироп (64% по массе корригента и 36% воды очищенной)

Корригент (сахар, фруктозу или сорбит) смачивали небольшим количеством воды для разбухания, добавляли оставшуюся воду и растворяли при нагреве до  $60-70^{\circ}\text{C}$ . Смесь дважды доводили до кипения, удаляя образующуюся при этом пену. Приготовление сиропа не должно превышать часа для предотвращения карамелизации сахара. Полученный сахарный сироп стандартизовали по показателю преломления и плотности.

После приготовления вкусового сиропа, его охлаждения и доведения до первоначальной массы, к нему добавляли 5 или 10% от общей массы сока плодов черники, предварительно упаренного на роторно-вакуумном испарителе при

температуре  $60 \pm 1$  °С до остаточной влажности  $20 \pm 3\%$ . Сгущенный сок растворяли во вкусовых сиропах и фильтровали во флаконы темного стекла. При содержании сока 10% добавляли лимонную кислоту (0,5%). Часть сиропа с 10% содержанием сока оставляли без изменений. Сиропы представляют густые вязкие жидкости темно-красного цвета (табл. 21).

Таблица 21 - Показатели качества сиропов с использованием различных основ

Наименование показателя					Норма качества
	Сахароза		Сорбит	Фруктоза	
Содержание сока	5%	10%	10%	10%	
Внешний вид	прозрачная жидкость вишнево-красного цвета				Тоже
Запах	фруктовый				Тоже
Вкус	кисло-сладкий, слегка вязущий				Тоже
Плотность	1,310	1,315	1,210	1,330	От 1,30 до 1,33
Показатель преломления	1,420	1,435	1,418	1,433	От 1,42 до 1,44
Количественное определение антоцианов, %	0,12 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,37 ± 0,03	

Готовые сиропы хранили в холодильнике при температуре  $+ 7 \pm 2$ °С. На протяжении 3-х месяцев контролировали стабильность антоцианов в процессе хранения (табл. 22).

Таблица 22 - Изменение содержания антоцианов в процессе хранения

Основа (10% сока)	Исходное значение	1 месяц	3 месяца	Изменение за месяц	Изменение за 3 месяца
Фруктоза (0,5% лимонной кислоты)	0,35%	0,35%	0,32%	-	7,9%
Сахароза (1% лимонной кислоты)	0,32%	0,32	0,31	-	1,5%
Сорбит (0,5% лимонной кислоты)	0,44%	0,44%	0,41%	-	6,8%
Сахароза	0,30%	0,30	0,26	-	13,3%
Фруктоза	0,35%	0,33%	0,31%	6,5%	12,5%
Сорбит	0,43	0,43	0,42	-	11,2%

Таким образом, можно сделать предположение, что природа сахара незначительно влияет на стабильность антоцианов. Добавление лимонной кислоты (создание кислой среды) способствует сохранению антоцианов и

уменьшает скорость процесса их деструкции. Кроме того, отсутствие стабилизатора влияло также на органолептические свойства и микробиологическую чистоту сиропов при хранении. Схема получения сиропа на основе сгущенного сока из плодов черники представлена на рис. 53.

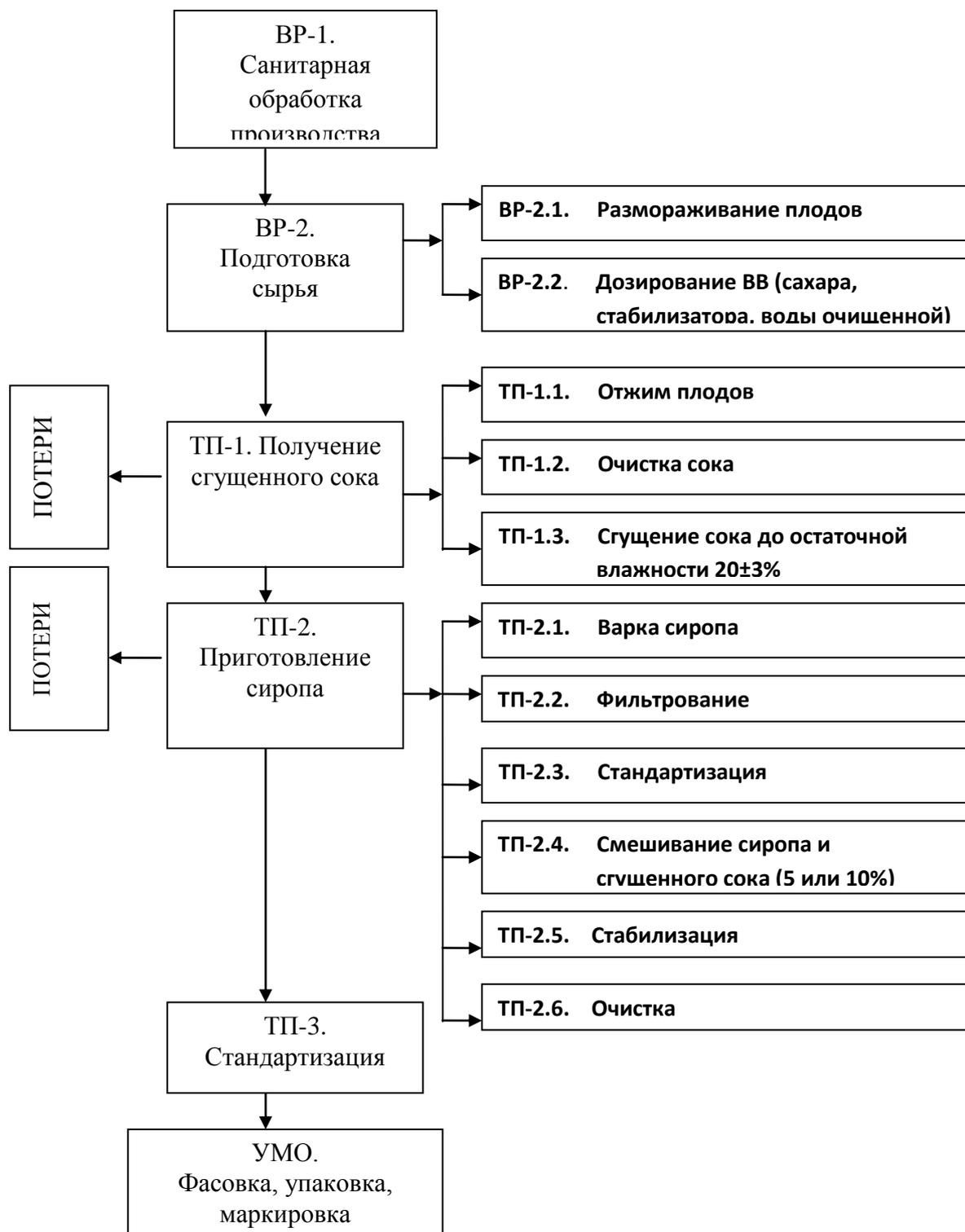


Рисунок 53 – Технологическая схема получения сиропов.

Помещения, в которых осуществляется процесс производства сиропов, должны соответствовать 3-му и 4-му классам чистоты (С и D).

### **6.1.2. Обоснование состава и способа получения лекарственного препарата «Черники обыкновенной таблетки»**

В исследовании были рассмотрены следующие варианты технологии таблеток:

- через стадию влажного гранулирования продавливанием;
- через стадию гранулирования размолотом увлажненной и высушенной массы.

Прессование проводили на кривошипной таблеточной машине (КТМ) салазочного типа.

**Технология получения таблеток из упаренного сока черники** (прессованием через стадию гранулирования продавливанием).

1.1. Смешивание упаренного сока с лактозой в соотношении 1:5.

1.2. Первичное гранулирование через перфорированную поверхность с диаметром отверстий 3 мм.

1.3. Сушка гранул в сушильном шкафу при  $40 \pm 2$  °С в течение 24 ч до остаточной влажности 4-5%.

1.4. Вторичное гранулирование через перфорированную поверхность с диаметром отверстий 1 мм.

1.5. Прессование на КТМ по 0,5 г.

При смешении и высушивании упаренного сока и МКЦ в том же соотношении смесь получается неоднородной, несыпучей.

**Технология получения таблеток из неупаренного сока черники** (прессованием через стадию гранулирования продавливанием)

2.1. Смешивание сока с лактозой в соотношении 1:4.

2.2. Добавление аэросила в количестве 1% от общей массы таблеточной смеси.

2.3. Первичное гранулирование через перфорированную поверхность с диаметром отверстий 3 мм.

2.4. Сушка гранул в сушильном шкафу при  $40 \pm 2$  °С в течение 1,5 ч до остаточной влажности 4-5%.

2.5. Вторичное гранулирование через перфорированную поверхность с диаметром отверстий 1 мм.

2.6. Прессование на КТМ по 0,5 г.

Содержание антоцианов в таблетках из исходного сока – 0,32 мг в 1,0г таблеточной массы (0,16 мг в одной таблетке). В таблетках из упаренного сока – 2,6 мг в 1,0 г таблеточной массы (1,3 мг в одной таблетке) (рис. 54).

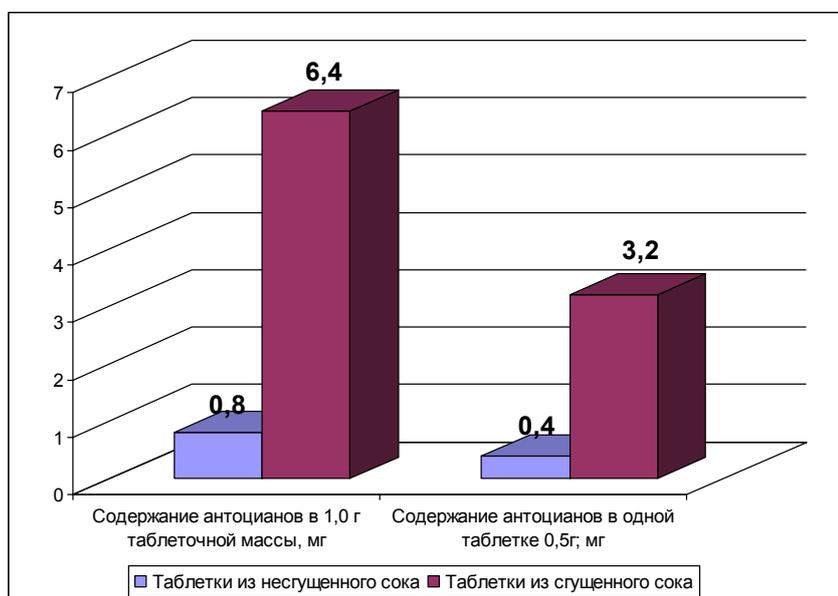


Рисунок 54 – Содержание антоцианов в таблетках.

**Технология таблеток из неупаренного сока черники** (прессование через стадию гранулирования размолотом увлажненной и высушенной массы).

3.1. Смешивание сока с МКЦ в соотношении 4:1.

3.2. Сушка в вакуум-сушильном шкафу при  $40 \pm 1$ °С до остаточной влажности 4-5%.

3.3. Добавление к полученной смеси 2% (от массы смеси) аэросила, измельчение и смешивание.

3.4. Прессование на КТМ по 0,5 г.

Содержание антоцианов составляет 4,1 мг в одной таблетке.

При использовании вместо МКЦ лактозы и последующем высушивании полученная смесь приобретает стекловидную форму (рис. 55).



А.

Б.

Рисунок 55 – Фотографии смеси исходного сока и наполнителя после упаривания под вакуумом: А - смесь сока с МКЦ; Б - смесь сока с лактозой.

В отличие от первой схемы, где электрическая энергия, преобразованная в тепловую, расходуется и на сгущение сока, и на сушку гранул, в третьей технологической схеме производства тепловое воздействие осуществляется только на стадии сгущения сока с наполнителем.

В связи с меньшими временными затратами, более экономным расходом электроэнергии по сравнению с первой схемой и достаточно высоким содержанием антоцианов нами была выбрана третья технологическая схема производства таблеток из сока плодов черники.

На следующем этапе с целью увеличения содержания антоцианов в таблетках изучалось влияние степени предварительного сгущения сока на показатели качества таблеток. Для этого сок из плодов черники упаривали в роторно-вакуумном испарителе до  $\frac{1}{2}$  и  $\frac{1}{3}$  от первоначального объема и смешивали с микрокристаллической целлюлозой в соотношении 4:1. Полученные суспензии упаривали в вакуум-сушильном шкафу при остаточном давлении не более 4,9 кПа и температуре  $40 \pm 2$  °С в течение 24 ч.

Полученную массу измельчали, добавляли 4% аэросила, перемешивали и подвергали прессованию на КТМ. У полученных таблеток определяли

количественное содержание антоцианов, распадаемость, прочность на истирание (табл. 23).

Таблица 23 - Сравнительная характеристика свойств таблеток в зависимости от состава

Состав	Состав, г			Количественное содержание, мг в одной таб. 0,3	Распадаемость, мин	Прочность на истирание, %
	Сок	МКЦ	аэросил			
№ 1	20,0	5,0	0,05 (2%)	4,1±0,2	2,0	98,0
№ 2	20,0 (до 1/2 V)	5,0	0,34 (4%)	18,0±0,2	1,5	99,5
№ 3	20,0 (до 1/3 V)	5,0	0,60 (4%)	22,0±0,3	41,0	99,9

Таким образом, наиболее оптимальным вариантом оказалось предварительное упаривание сока под вакуумом до 1/2 от первоначального объема. Таблетки, полученные из предварительно упаренного до 1/3 от первоначального объема сока, из-за повышения концентрации связующих веществ, не распадаются с течение установленного времени для таблеток, не покрытых оболочкой (15 мин).

Средняя масса таблеток, полученных по наиболее оптимальной схеме составила 0,32 г ± 4,0%, что находится в пределах установленных значений (±5% для таблеток массой 0,3 и более). Только две таблетки имели отклонение свыше 5%, но не более 10%, что также допускается установленными требованиями (табл. 24).

Тест «Растворение» проводился на 6 таблетках оказавшегося наиболее оптимальным состава. Все таблетки соответствовали требованиям: за 45 минут в раствор переходило более 75% содержащихся в них действующих веществ (табл. 25).

Таблица 24 - Результаты анализа таблеток по показателю «Средняя масса и отклонение от средней массы»

№ п/п	масса таблетки, г	отклонение, %
1	0,3357	+2,3%
2	0,3146	-4,1%
3	0,3379	+3,0%
4	0,3340	+1,8%
5	0,3402	+3,7%
6	0,3194	-2,6%
7	0,3372	+2,8%
8	0,3376	+2,9%
9	0,3203	-2,4%
10	0,3301	+0,6%
11	0,3040	-7,3%
12	0,3150	-4,0%
13	0,3399	+3,6%
14	0,3503	+6,8%
15	0,3185	-2,9%
16	0,3353	+2,2%
17	0,3147	-4,1%
18	0,3146	-4,1%
19	0,3434	+4,7%
20	0,3191	-2,7%
Масса средняя	0,3281	
Максимальная масса, г	0,3503	+6,8%
Минимальная масса, г	0,3040	-7,3%

Таблица 25 - Результаты анализа таблеток по показателю «Растворение»

№ п/п	1	2	3	4	5	6	Среднее значение, %
Выход антоцианов за 45 минут, %	97,6	99,6	102,9	95,5	99,2	99,0	99,0

Таким образом, предложенная схема технологического процесса производства таблеток на основе сока из плодов черники предусматривает использование в качестве наполнителя МКЦ и включает в себя предварительное сгущение полученного сока до  $\frac{1}{2}$  от первоначального объема (рис. 56).

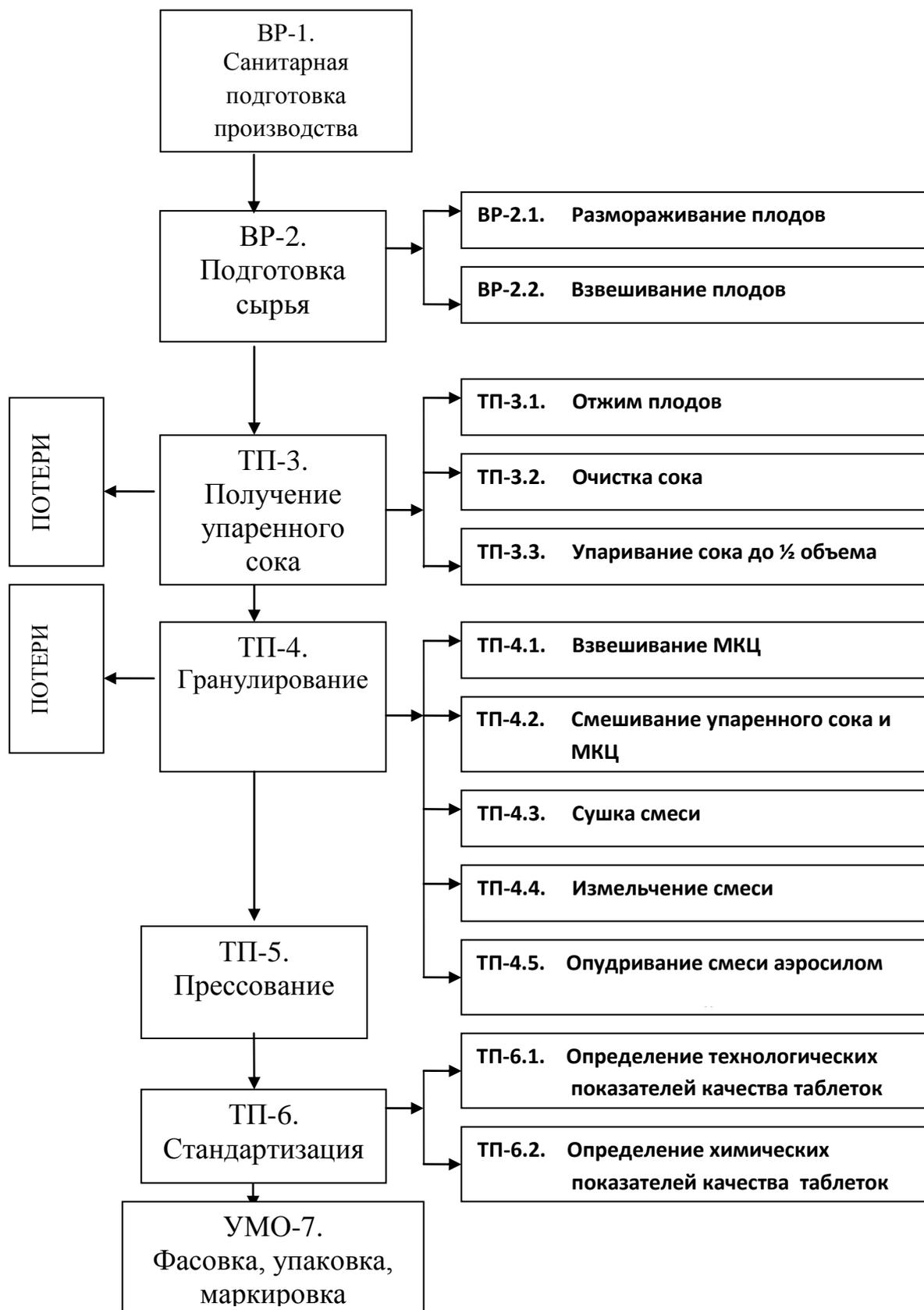


Рисунок 56. Технологическая схема таблеток.

Согласно данной схеме предварительно готовят помещения и персонал. Помещение должно соответствовать классу чистоты С или D (подготовка

первичной упаковки, проведение операций смешивания, участок таблетирования и др.). Для создания условий необходима предварительная очистка воздуха, помещений, технологического оборудования, одежды и т.д.

Для получения 30 таблеток осуществляли следующие операции.

Стадия ТП-1 включает в себя получение сгущенного сока в качестве промежуточного продукта. Сгущение производили в роторно-вакуумном испарителе при температуре  $60 \pm 1$  °С до половины от исходного объема.

50,0 сока упаривали таким образом до 25,0 г, затем полученный упаренный сок на стадии ТП-4 смешивали с 6,25 г микрокристаллической целлюлозы; высушивали суспензию в вакуум-сушильном шкафу при температуре  $40 \pm 1$ °С и остаточном давлении не более 4,9 кПа до остаточной влажности не более 5%. К полученному порошку добавляли 4% аэросила от общей массы таблеточной смеси (0,44 г), перемешивали до однородной массы .

Полученную смесь подвергали прямому прессованию на кривошипной таблеточной машине.

Полученные таблетки проверяли по физическим показателям и качественному и количественному химическому составу.

### **6.1.3. Обоснование состава и способа получения лекарственного препарата «Черники обыкновенной пастилки»**

В качестве гелеобразователей использовались агар-агар и желатин. Формы предварительно смазывались вазелиновым маслом и охлаждались в морозильной камере. Сок предварительно сгущали до остаточной влажности  $20 \pm 3\%$  в роторно-вакуумном испарителе.

#### С желатином:

Приготовление раствора желатина 5, 10 или 20%. Разжижение сока – происходит при добавлении на 1,0 г сгущенного сока 0,6-0,7 г воды очищенной.

Рассчитанное количество желатина смешивают с водой в старированной фарфоровой чашке, взвешивают, оставляют для набухания на 30-40 минут, растворение на водяной бане при 60-70 °С, доведение до первоначальной массы. К растворившемуся желатину доведения до первоначальной массы добавляют

сок, разливают в предварительно охлажденные формы и помещают в холодильник на 15-20 минут.

Пастилки получаются мягкие и трудно отделяются от стенок форм, большое содержание желатина соответствовало большей прочности пастилок.

Соотношение компонентов в пастилках на основе 20% раствора желатина:

желатина 1,0

воды очищенной до 5,0

Получают раствор желатина (набухание, растворение при нагреве)

сока сгущенного 2,0

воды очищенной для разжижения сока 1,2 г

Раствор и сок смешивают, разливают в формы. Масса одной пастилки составляла 2,0 г.

С агаром:

Приготовление раствора агара 2 и 3%: рассчитанное количество агара смешивали с водой, оставляли на 20-30 мин при комнатной температуре для набухания, растворяли при нагреве на электрической плитке. Одновременно сгущенный сок смешивали с примерно равным количеством воды очищенной для перевода в менее вязкое состояние, нагревали на водяной бане до 50-55°C и добавляли к раствору агара той же температуры. Нагрев осуществляли для предотвращения преждевременного застудневания агара при смешении растворов.

Состав:

агара 0,1 (0,15)

воды очищенной до 5,0

сока черники сгущенного 2,0

воды очищенной для разжижения сока 1,2

После смешения разлив в предварительно охлажденные формы и помещение в холодильник на 15-20 мин. Пастилки были достаточно твердые, легко отсоединялись от стенок.

Однако в процессе хранения полученные пастилки теряли влагу и утрачивали свою форму. В связи с этим в качестве влагоудерживающего вещества вводили сорбитол (в равном количестве с водой).

Состав на 5 пастилок:

агара 0,08

сорбита 2,5

воды очищенной 2,5

сока черники сгущенного 2,0

воды очищенной для разжижения сока 1,5.

Технологическая схема получения пастилок представлена на рис. 57.

Помещения, в которых осуществляется процесс производства, должны соответствовать 3-му и 4-му классам чистоты (С и D).

В ходе предварительных операций формы смазывали вазелиновым маслом и оставляли в морозильной камере при температуре  $+2\pm 1^\circ\text{C}$ . Плоды размораживали, отжимали, полученный сок фильтровали. Сок сгущали так же, как и в предыдущих схемах.

На стадии ТП-2 агар оставляли для набухания в воде при комнатной температуре, затем растворяли при нагревании до  $90-100^\circ\text{C}$ , после растворения агара вводили сорбит. Полученный раствор охлаждали до температуры  $50-60^\circ\text{C}$ . Параллельно разжижали сгущенный сок черники и смешивали с раствором агара при температуре  $50-55^\circ\text{C}$  (ТП-3). Раствор разливали в формы и выдерживали при температуре  $+7\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 15-20 мин (ТП-4).

Средняя масса пастилок составила  $2,0 \text{ г} \pm 2\%$ . Оценку качества полученных пастилок проводили по внешним признакам и содержанию антоцианов.

Пастилки практически полностью сохраняли свою форму на протяжении всего наблюдаемого срока хранения (2 месяца).

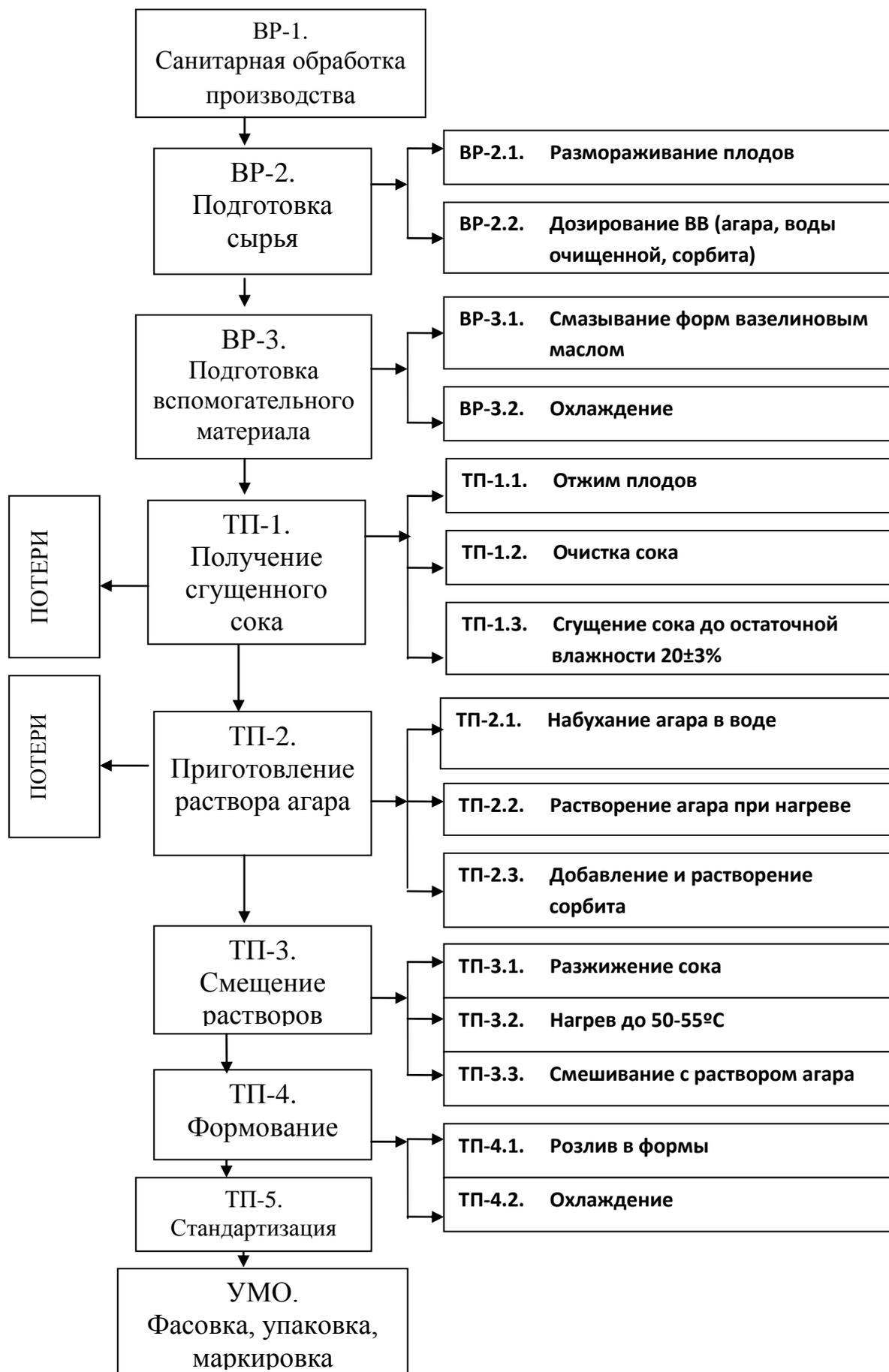


Рисунок 57 – Технологическая схема получения пастилок.



Рисунок 58 – Пастилки на основе сока плодов черники обыкновенной.



Рисунок 59 – Таблетки на основе сока плодов черники обыкновенной

#### 6.1.4. Стандартизация лекарственных препаратов из плодов черники обыкновенной

**Методика определения содержания суммы антоцианов в сиропе.** Около 1,0 г препарата (точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 50 мл, доводят до метки 70% этиловым спиртом, содержащим 1% хлористоводородной кислоты, до метки. В качестве раствора сравнения 70% этиловый спирт, содержащий 1% HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 538 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы антоцианов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50}{a \cdot l \cdot 100} = \frac{0,5 \cdot A}{a \cdot l};$$

где А – оптическая плотность полученного раствора;

а – масса пробы, взятой на анализ;

l – длина кюветы, см.

**Методика определения содержания суммы антоцианов в пастилках.** 10 пастилок измельчали в ступке до однородной массы. Около 1,0 г полученной массы (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл, добавляли 20 мл 95% этилового спирта, содержащего 1% HCl, и перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, фильтровали через бумажный фильтр марки

«красная лента» в мерную колбу емкостью 100 мл. Операцию повторяли трижды, последний раз нагревали на водяной бане 20 мин. Объем раствора доводили до метки 95% спиртом, содержащим 1% HCl. Полученный раствор спектрофотометрировали при длине волны 546 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Содержание антоцианов в одной форме составляло  $40,0 \pm 2,0$  мг.

## **6.2. Разработка и стандартизация лекарственного препарата «Черники обыкновенной побегов настойка»**

Для получения настойки из побегов черники обыкновенной нами использовался 70% спирт этиловый в связи с тем, что он является по результатам ранее проведенных исследований при разработке методики количественного определения он является оптимальным экстрагентом для флавоноидов.

Настойку получали в массо-объемном соотношении 1:5 методом дробной мацерации по методике, разработанной профессором В.А. Куркиным и сотрудниками кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ (Пат.РФ № 2134584) [84].

В первый день получения настойки в 3 термостойкие широкогорлые колбы помещали по 1 части сырья (побегов черники обыкновенной). В первую колбу наливали 7 объемов спирта этилового 70%, во вторую – 2 объема того же экстрагента.

На второй день в третью колбу заливали 2 объема 70% спирта. Из первой колбы извлечение переливали во вторую, в первую заливали 5 объемов экстрагента.

На третий день извлечение из второй колбы переливали в третью, из первой – во вторую. В первую колбу вновь заливали 5 объемов 70% спирта этилового.

На четвертый день из третьей колбы сливали извлечение в приемник, извлечение из второй колбы переливали в третью. Первую колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, остужали, извлечение переливали во вторую колбу. Первую колбу разгружали.

На пятый день из третьей колбы сливали извлечение в приемник. Вторую колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, остужали, извлечение переливали в третью. Вторую колбу разгружали.

На шестой день третью колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, остужали, сливали извлечение в приемник.

Объединенное извлечение (готовый продукт) перемешивали. Отстаивали при температуре не выше 10 °С в течение 2 суток, фильтровали.

Полученная настойка представляет собой прозрачную или опалесцирующую жидкость темно-коричневого цвета, специфического запаха.

**Методика количественного определения суммы флавоноидов в настойке побегов черники обыкновенной.**

1,0 мл настойки помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл (раствор А). 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный при тех же условиях, но без добавления алюминия хлорида (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при аналитической длине волны 420 нм через 30 мин после приготовления всех растворов.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б рутина. Раствором сравнения служит раствор Б рутина, приготовленный аналогично испытуемому, но без добавления алюминия хлорида (см. главу 4).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 25 \times 25 \times 1 \times 100}{D \times m \times 5 \times 1} = \frac{D \times m_0 \times 12500}{D \times m},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m<sub>0</sub> – масса ГСО рутин, в граммах.

### 6.3. Влияния препаратов из плодов и побегов черники обыкновенной на экскреторную функцию почек

Были проведены фармакологические исследования по изучению влияния препаратов плодов и побегов черники обыкновенной на выделительную функцию почек.

Анализ полученных результатов показал, что по сравнению с контрольной группой диурез достоверно стимулируют следующие препараты: сок из свежих плодов в дозах 50 и 100 мг/кг (на 49 и 85% соответственно за 4 ч), экстракт из свежих плодов черники в дозе 50 мг/кг (на 25% за 4 ч и на 41% за сутки) и настой побегов черники в дозе 50 мг/кг (на 22% за 4 ч) (табл. 1). Показатели диуреза при введении настоя черники возрастали спустя 4 часа после их введения и достоверно не отличались от контрольной группы через 24 ч с момента их введения, в то время как диуретический эффект экстракта из свежих плодов черники на 70% этаноле был повышенным через 4 ч и 24 ч. Увеличение дозы сока плодов с 50 до 100 мг/кг приводило к увеличению диуретического эффекта, для настоя из побегов наблюдалась обратная тенденция. Экстракты из воздушно-сухих плодов и из побегов черники обыкновенной в исследовании показали антидиуретическую активность (табл. 26).

По показателям диуреза и натрийуреза через 24 ч действие экстракта из свежих плодов черники обыкновенной в дозе 50 мг/кг было сравнимо с действием гипотиазида в дозе 20 мг/кг (табл. 26-29). Данные по гипотиазиду через 4 часа не приводятся, так как эти показатели статистически не отличались от водного контроля.

Таблица 26 - Изменение показателей диуреза у крыс под влиянием водных и водно-спиртовых извлечений из плодов и побегов черники обыкновенной

Образец	Доза, мг/кг	Контроль, через 4 ч	Диурез, через 4 часа		Контроль, через 24 ч	Диурез, через 24 часа	
		(M±m), мл	(M±m), мл	в % к контролю	(M±m), мл	(M±m), мл	в % к контролю
Сок плодов	50	0,72±0,05	1,06±	149**	1,34±0,11	1,47±0,10	110

			0,09**				
Сок плодов	100	0,80±0,06	1,48± 0,15**	185**	1,25±0,10	1,41±0,11	113
Экстракт из свежих плодов	50	1,50±0,10	1,88± 0,13*	125*	2,37±0,10	3,33±0,22* *	141**
Отвар воздушно-сухих плодов	50	1,01±0,04	1,06±0,05	105	1,81±0,10	1,85±0,13	102
Отвар воздушно-сухих плодов	100	1,06±0,05	0,99±0,04	83	1,93±0,09	1,52±0,15*	79*
Экстракт из воздушно-сухих плодов	50	1,39±0,12	0,71± 0,11**	51**	2,15±0,20	1,29±0,20* *	60**
Настой побегов	50	0,74±0,05	0,90± 0,04*	122*	1,20±0,09	1,31±0,11	109
Настой побегов	100	0,74±0,05	0,59± 0,08	80	1,20±0,09	1,12±0,08	93
Экстракт из побегов (70% спирт этиловый)	50	1,41±0,21	0,72± 0,06**	62**	2,40±0,27	1,44±0,14* *	59**
Экстракт из побегов (40% спирт этиловый)	50	0,99±0,07	0,66± 0,08*	67*	1,83±0,12	1,35±0,20	74
Гипотиазид	20				2,73±0,17	3,83 ±0,22**	140**

Примечание: \* p < 0,05

\*\* p < 0,01

Аналогично изменялся салурез и креатининурез при введении вышеуказанных препаратов (табл. 27-29). Препараты из свежих плодов (сок, экстракт) повышали почечную экскрецию натрия, калия и креатинина. Для сока плодов в дозе 50 мг/кг и экстракта из свежих плодов отмечалось изолированное натрийуретическое действие, в то время как возрастание калийуреза было пропорционально диуретическому эффекту.

Настой из побегов черники в дозе 50 мг/кг также достоверно увеличивал показатели натрийуреза, калийуреза и креатининуреза за 4 часа. Настой из побегов в дозе 100 мг/кг и экстракты из побегов на 40% и 70% этиловом спирте

достоверно приводят к снижению количества в выделяемой моче натрия. Показатели калийуреза и креатининуреза для этих препаратов изменялись недостоверно.

Таблица 27 - Изменение показателей натрийуреза у крыс под влиянием водных и водно-спиртовых извлечений из плодов и побегов черники обыкновенной

Образец	Доза, мг/кг	Контроль, через 4 ч	Натрийурез, через 4 часа		Контроль, через 24 ч	Натрийурез, через 24 часа	
		(M±m), мкМ	(M±m), мкМ	в % к контролю	(M±m), мкМ	(M±m), мкМ	в % к контролю
Сок плодов	50	89,24 ±10,74	156,97±21,47*	176*	306,81±31,86	267,31±41,08	87
Сок плодов	100	101,48 ±19,96	173,36±25,05*	171*	277,80±29,88	296,35±46,03	107
Экстракт из свежих плодов	50	125,73 ±20,70	196,05±18,89*	156*	367,67±38,51	634,14±48,82**	175**
Отвар воздушно-сухих плодов	50	102,26±7,01	115,53±14,18	113	304,12±21,46	367,90±28,19	121
Отвар воздушно-сухих плодов	100	111,94±11,25	87,38±9,12	78	352,36±36,70	320,68±26,77	91
Экстракт из воздушно-сухих плодов	50	116,22 ±17,70	82,34±7,71	71	376,54±52,23	197,80±39,09*	53*
Настой из побегов	50	102,36±11,06	144,87±14,80*	142*	327,80±25,78	364,86±38,44	111
Настой из побегов	100	102,36±11,06	67,12±9,49*	76*	327,80±25,78	232,91±25,78*	71*
Экстракт из побегов (70% спирт этиловый)	50	111,98 ±8,76	77,11±7,08**	79**	401,52±45,90	256,27±27,77*	64*
Экстракт из побегов (40% спирт этиловый)	50	96,77±9,47	45,06±6,53**	47**	320,47±43,70	209,62±32,78	65
Гипотиазид	20				462,88±52,16	711,31±19,26**	154**

Примечание: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

Таблица 28 - Изменение показателей калийуреза у крыс под влиянием водных и водно-спиртовых извлечений из плодов и побегов черники обыкновенной

Образец	Доза, мг/кг	Контроль, через 4 ч	Калийурез, через 4 часа		Контроль, через 24 ч	Калийурез, через 24 часа	
		(M±m), мкМ	(M±m), мкМ	в % к контролю	(M±m), мкМ	(M±m), мкМ	в % к контролю
Сок плодов	50	38,69±6,11	55,63±4,99*	144*	143,74±16,68	147,33±16,34	102
Сок плодов	100	54,67±6,64	82,20±7,49*	150*	95,04±18,79	127,65±16,70	134
Экстракт из свежих плодов	50	60,74±11,85	87,29±11,41	144	166,98±19,83	264,38±31,67*	158*
Отвар	50	50,74±4,53	54,76±4,61	108	145,60±8,41	155,84±12,66	107
Отвар	100	53,14±3,73	53,68±3,70	101	144,11±16,10	136,93±17,48	95
Экстракт из воздушно-сухих плодов	50	123,17±16,39	87,50±17,83	71	155,76±10,85	107,05±12,04**	69**
Настой побегов	50	39,72±4,40	52,93±5,73	130	121,15±15,14	122,26±13,54	101
Настой побегов	100	39,72±4,40	35,46±6,51	76	121,15±15,14	108,70±9,94	89
Экстракт из побегов (70% спирт этиловый)	50	54,79±10,57	64,79±7,06	118	176,28±15,02	124,00±10,11**	70**
Экстракт из побегов (40% спирт этиловый)	50	45,87±7,41	36,67±4,85	80	138,20±19,65	137,73±34,51	100
Гипотиазид	20				155,86±20,70	241,60±19,26**	155**

Примечание: \* p < 0,05

\*\* p < 0,01

Таблица 29 - Изменение показателей креатининурина у крыс под влиянием водных и водно-спиртовых извлечений из плодов и побегов черники обыкновенной

Образец	Доза, мг/кг	Контроль, через 4 ч	Креатининурина, через 4 часа		Контроль, через 24 ч	Креатининурина, через 24 часа	
		(M±m), мг	(M±m), мг	в % к контролю	(M±m), мг	(M±m), мг	в % к контролю
Сок плодов	50	0,90 ±0,13	1,23 ±0,09*	137*	2,40 ±0,39	2,93 ±0,31	122
Сок плодов	100	0,94 ±0,07	1,40 ±0,12	149	2,71 ±0,30	2,41 ±0,30	89
Экстракт из свежих плодов	50	1,11 ±0,11	1,84 ±0,08**	166**	3,38 ±0,27	5,89 ±0,48**	174**
Отвар	50	1,22 ±0,09	1,16 ±0,04	95	2,92 ±0,23	3,21 ±0,35	110
Отвар	100	1,37 ±0,11	1,22 ±0,12	89	3,04 ±0,27	2,52 ±0,28	83
Экстракт из воздушно-сухих плодов	50	1,00 ±0,13	0,91 ±0,13	91	2,87 ±0,38	2,49 ±0,38	85
Настой побегов	50	1,27 ±0,12	1,69 ±0,15*	133*	3,00 ±0,28	3,72 ±0,41	124
Настой побегов	100	1,27 ±0,12	1,09 ±0,21	86	3,00 ±0,28	2,66 ±0,34	89
Экстракт из побегов (70% спирт этиловый)	50	1,16 ±0,16	0,70 ±0,13*	60*	3,09 ±0,41	2,49 ±0,32	81
Экстракт из побегов (40% спирт этиловый)	50	1,21 ±0,13	1,02 ±0,18	84	2,80 ±0,28	2,70 ±0,56	96
Гипотиазид	20				5,27± 0,55	6,85± 0,59	130

Примечание: \* p < 0,05

\*\* p < 0,01

В связи с тем, что растительное сырье содержит значительное разнообразие биологически активных соединений, интерес представляет выявление групп действующих веществ, ответственных за тот или иной фармакологический эффект.

Известно, что основными группами действующих соединений плодов черники обыкновенной являются антоцианы (подгруппа флавоноидов) и дубильные вещества конденсированной группы, в побегах – флавоноиды, а также дубильные вещества конденсированной группы [36, 85]. Каждая из этих групп может вносить свой вклад в диуретический или антидиуретический эффект исследуемых препаратов. В научной литературе преобладают данные о наличии диуретической активности у большинства из наиболее распространенных флавоноидов, в то время как по дубильным веществам доминируют данные, свидетельствующие о негативном их влиянии в больших концентрациях на переваривание и всасывание питательных веществ, на функции почек и печени [102].

В ходе настоящего исследования нами была отмечена обратная зависимость между диуретической активностью экспериментальных препаратов и содержанием в них дубильных веществ, определяемых по фармакопейной методике (метод Левенталя в модификации А.Л. Курсанова, перманганатометрический метод) [7] (табл. 30). За исключением сока, содержание дубильных веществ и флавоноидов приводится как количество, извлекаемое соответствующим препаратом экстрагентом (вода, 40% этиловый спирт, 70% этиловый спирт) из исходного сырья в пересчете на абсолютно сухое.

Таблица 30 - Зависимость диуретического эффекта препаратов от содержания дубильных веществ в сырье

Образец	Доза, мг/кг	Диурез, через 4 часа	Диурез, через 24 часа	Содержание дубильных веществ в сырье	Содержание флавоноидов в сырье
		в % к контролю	в % к контролю		
Сок плодов	50	149**	110	0,12±0,01% (в исходном соке)	1,5±0,1% (в исходном соке, в пересчете на цианидин-3-глюкозид)
Сок плодов	100	185**	113	0,12±0,01% (в исходном соке)	1,5±0,1% (в исходном соке, в пересчете на цианидин-3-глюкозид)
Экстракт из свежих плодов 1:1	50	125*	141**	4,61±0,20% (70% спирт)	27,41±0,5% (70% спирт, в пересчете на цианидин-3-глюкозид)
Отвар (1:10)	50	105	102	2,81±0,15% (вода)	2,83±0,18 (вода, в пересчете на цианидин-3-глюкозид)
Отвар (1:10)	100	83*	79*	2,81±0,15% (вода)	2,83±0,18 (вода, в пересчете на цианидин-3-глюкозид)
Экстракт из воздушно-сухих плодов 1:1	50	51**	60**	6,76±0,20% (70% спирт)	1,66±0,15 (70% спирт, в пересчете на цианидин-3-глюкозид)
Настой побегов (1:10)	50	122*	109	6,65±0,18% (вода)	0,56±0,02% (вода, в пересчете на рутин)
Настой побегов (1:10)	100	80	93	6,65±0,18% (вода)	0,56±0,02% (вода, в пересчете на рутин)
Экстракт из побегов (70% спирт)	50	62**	59**	9,00±0,19% (70% спирт)	0,73±0,03% (70% спирт, в пересчете на рутин)

этиловый, 1:1)					
Экстракт из побегов (40% спирт этиловый, 1:1)	50	67*	74	8,97±0,15% (40% спирт)	0,63±0,02% (40% спирт, в пересчете на рутин)

*Примечание:* \*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

Как видно из таблицы 30, антидиуретический эффект проявляли препараты с высоким содержанием дубильных веществ. Несмотря на значительное количество дубильных веществ, извлекаемое из побегов водой ( $6,65 \pm 0,18\%$ ), диуретическую активность настоя из побегов в дозе 50 мг/кг можно объяснить их низким содержанием в готовом извлечении (в 10 или более раз меньше, чем указано в таблице), в связи с чем возможно проявление диуретического эффекта других групп действующих веществ. Увеличение дозы настоя до 100 мг/кг приводит к увеличению вводимого количества дубильных веществ, чем может быть обусловлено снижение диуретической активности. Аналогичным образом можно объяснить действие отвара воздушно-сухих плодов черники (отсутствие значимого действия по сравнению с контрольной группой влияния на диуретическую активность почек и антидиуретический эффект при увеличении дозы).

Подобное действие дубильных веществ может быть обусловлено их взаимодействием со слизистой оболочкой пищеварительного тракта и с пищеварительными ферментами, уменьшающим всасывание различных биологически активных соединений (флавоноидов, антоцианов) [94].

С замедлением всасывания действующих веществ под влиянием дубильных веществ может быть связан постепенно нарастающий эффект экстракта из свежих плодов черники.

Следует отметить, что используемая нами методика для количественного определения дубильных веществ является неспецифичной и результаты могут искажаться влиянием других соединений, окисляемых перманганатом калия. Однако сделанные нами предположения не противоречат известным данным о

свойствах природных соединений и создают основу для дальнейшего более детального исследования влияния содержания сопутствующих дубильных веществ на биологическую активность растительных препаратов.

Таким образом, в ходе исследования было изучено влияние препаратов из плодов и побегов черники на выделительную функцию почек крыс. Водные извлечения из плодов в дозе 50 и 100 мг/кг и побегов в дозе 50 мг/кг, а также экстракт из свежих плодов черники в дозе 50 мг/кг за 24 ч эксперимента оказывают умеренное диуретическое действие. В то время как водно-спиртовые извлечения из воздушно-сухих плодов и побегов черники проявляют антидиуретическую активность. Предположительно, такое различие фармакологической активности препаратов из плодов и побегов обусловлено различным содержанием в них дубильных веществ. Большое содержание дубильных веществ замедляет процесс всасывания соединений, обладающих диуретической активностью, и, возможно, оказывает самостоятельное антидиуретическое действие. Полученные результаты позволяют обосновать рациональные подходы к выбору состава природной фармацевтической субстанции и дозы при разработке лекарственных препаратов черники.

### **Выводы к главе 6.**

1. В результате химико-технологических исследований были подобраны оптимальные условия упаривания сока плодов черники с целью максимального сохранения антоцианов (под вакуумом при температуре  $+60\pm 2$  °C).
2. Разработана технологическая схема производства таблеток из сгущенного сока плодов черники прямым прессованием с использованием в качестве наполнителя микрокристаллической целлюлозы.
3. Разработаны технологические схемы производства сиропов на основе сгущенного сока плодов черники с использованием в качестве корригентов сахарозы, фруктозы или сорбита в зависимости от сопутствующих заболеваний.

4. Предложена технология получения пастилок из сгущенного сока черники с применением агара в качестве гелеобразователя.
5. Предложена технологическая схема получения настойки из побегов черники обыкновенной с использованием в качестве экстрагента 70% этилового спирта по методике, разработанной профессором В.А. Куркиным и сотрудниками кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ (Пат.РФ № 2134584).
6. Для стандартизации разработанных препаратов из плодов черники использован метод прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 546 нм в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид.
7. Для стандартизации препаратов из побегов черники разработан методика с использованием дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом при длине волны 420 нм в пересчете на рутин.
8. Изучено влияние экспериментальных препаратов из плодов и побегов черники на экскреторную функцию почек. Результаты исследования показывают, что умеренным диуретическим действием обладают водные извлечения из побегов и препараты на основе свежих плодов черники. Под влиянием водно-спиртовых извлечений из воздушно-сухих плодов и побегов черники происходит снижение диуреза в опытной группе по сравнению с контрольной группой. Предположительно, такое различие обусловлено высоким абсолютным и относительным содержанием в данных перпаратах дубильных веществ по отношению к флавоноидам.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате анатомо-морфологических исследований изучены листья, стебли, плоды черники обыкновенной. Получены микрофотографии диагностических признаков, которые включены в проекты фармакопейных статей «Черники плоды», «Черники плоды свежие» и «Черники побеги».
2. Впервые изучено анатомическое строение черешка листа черники обыкновенной, которое может иметь важное значение при морфолого-анатомической диагностике сырья.
3. В результате фитохимического исследования из побегов черники выделены и идентифицированы кверцетин-3-О-ксилопиранозид (3-О-ксилопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), кофейная кислота и даукостерин (глюкозид  $\beta$ -ситостерина),  $\beta$ -ситостерин, из которых даукостерин впервые обнаружен в чернике, а кверцетин-3-О-ксилопиранозид впервые выделен из черники обыкновенной, произрастающей на территории Российской Федерации.
4. Из плодов черники обыкновенной выделены и идентифицированы три соединения антоциановой природы: 3-О-глюкозиды цианидина, мальвидина и дельфинидина. Изучены их спектральные характеристики и определен удельный показатель поглощения цианидина-3-О-глюкозида в 1% растворе хлороводородной кислоты в 95% спирте этиловом и в 0,5% растворе аммиака в 95% спирте этиловом.
5. Разработаны методики качественного анализа плодов черники обыкновенной методом тонкослойной хроматографии в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) и методом электронной спектроскопии по наличию максимумов поглощения при  $281 \pm 2$  и  $546 \pm 2$  нм.
6. Разработаны методики качественного анализа побегов черники обыкновенной методом тонкослойной хроматографии в системе этилацетат - безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12) и методом электронной спектроскопии по наличию максимумов поглощения при  $291 \pm 2$  и  $331 \pm 2$  нм.

7. Разработана методика количественного определения суммы антоцианов в свежих плодах черники обыкновенной методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 546 нм в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид; а также методика количественного определения флавоноидов в побегах черники методом дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом в пересчете на рутин при аналитической длине волны 420 нм.
8. Проведены исследования по возможности количественного определения антоцианов дифференциальной спектрофотометрией в щелочной среде (0,5% раствор аммиака в 95% спирте этиловом) на основании их способности к таутомерным превращениям.
9. В качестве нижнего предела содержания суммы антоцианов в сырье «Черники плоды» предложено значение «не менее 3,0%», в сырье «Черники плоды свежие» - «не менее 3,5%»; для сырья «Черники побеги» нижний предел содержания суммы флавоноидов предложен «не менее 0,6%».
10. На основании химико-технологических исследования разработаны состав и технология получения «Черники сиропа», «Черники таблеток» и «Черники пастилок», а также изучены показатели их качества.
11. В ходе фармакологических исследований было установлено, что настой и сок черники в дозе 50 мг/кг стимулируют диурез, натрийурез и креатининурез за 4 часа эксперимента, а настойка черники на 70% этаноле в дозе 50 мг/кг увеличивает почечную экскрецию воды, натрия и креатинина за 4 и 24 часа эксперимента.
12. Разработаны проекты ФС «Черники плоды», «Черники плоды свежие» и «Черники побеги», которые направлены в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» с целью включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, И.И. Ботаника. / И.И. Андреева, Л.С. Родман. – 2-ое изд. перераб. и доп. – М.: КолосС, 2002. – 488 с.
2. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / ВНИИ лекарств. растений и др. - М., 1983. - 340 с.
3. Бреднева, Н. Маркетинговые исследования потребителей биологически активных добавок / Н. Бреднева, В. Тихонова // Ремедиум. - 2005. - N 3 . - С. 54-56.
4. Ватулина, Г.Г. Выделение антоциана из кожицы плодов рябины обыкновенной / Г.Г.Ватулина // Труды III Всесоюзного семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод: тез. докл. Свердловск, 1968.- С. 466-468.
5. Воскобойникова, И.В. Современные вспомогательные вещества в производстве таблеток. Использование высокомолекулярных соединений для совершенствования лекарственных форм и оптимизации технологического процесса / И.В. Воскобойникова, С.Б. Авакян, Т.А. Сокольская и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 22-27.
6. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения (Растения – целители): Справ. пособие / А.Ф. Гаммерман, Г.Н. Кадаев, А.А. Яценко-Хмелевский. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. – Высш. шк., 1983, - 400 с. ил.
7. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа. / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 336 с., ил.
8. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1991. – 400 с., ил.
9. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание по состоянию на 1 апреля 2009 года : в 2-х т. — М.: Издательство "Медицинский совет", 2009. – 1359 с.
10. Глазные болезни: Учебник / Под ред. В.Г. Копаевой. – М.: Медицина, 2002. – 560 с.: ил.

11. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. – 520 с.

12. Губен, И. Методы органической химии. Т. 3, вып. третий. Перев. с нем. / И. Губен. – М.: Главная редакция химической литературы, 1935. – с. 240 -296.

13. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. - М.: «Медицина», 1977. - С. 33

14. Егоров, Е. А. Офтальмофармакология / Е.А. Егоров, Ю.С. Астахов, Т.В. Ставицкая. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 464 с.

15. Егоров, Е.А. Изучение эффективности применения препарата «Миртиллене форте» у больных с возрастной макулярной дегенерацией / Е.А. Егоров, Т.В., Ставицкая, Стрижкова А.В. // Клиническая офтальмология. Библиотека РМЖ. – 2005. – Т. 6, №4.– С. 163–165.

16. Егоров, Е.А. Общие принципы медикаментозного лечения заболеваний глаз / Е.А. Егоров, Ю.С. Астахов, Т.В. Ставицкая // Клиническая офтальмология. Библиотека РМЖ. – 2004. – Т. 5, № 1. – С.2-5.

17. Егорова, А.В. Анатомо-морфологическое исследование плодов черники обыкновенной / А.В. Егорова // Аспирантский вестник Поволжья. – 2011. - № 5-6. – С. 244-247.

18. Егорова, А.В. Анатомо-морфологическое исследование плодов черники обыкновенной / А.В. Егорова // «Молодые ученые – медицине»: сборник материалов Всероссийской конференции. – 2010. – С. 127.

19. Егорова, А.В. Исследование по стандартизации плодов растений, содержащих вещества антоциановой природы: автореферат дис. ... кандидата фармацевтических наук: 14.04.02 / Егорова Анна Владимировна. - Самара, 2013. – 26 с.

20. Егорова, Т.Е. Антиоксиданты в лечении и профилактике сухой формы возрастной макулярной дегенерации. Обзор литературы / Т.Е. Егорова // Клиническая офтальмология. Библиотека РМЖ. – 2010. – Т. 11, № 2. – С. 69-72.

21. Жидкостная колоночная хроматография / Пер. с англ. под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. – М.: Мир, 1978. – Т. 3.– С. 130-131.
22. Жизнь растений. В 6 т., т. 5 ч. 2 / Под ред. А. Л. Тахтаджяна. — М.: Просвещение, 1981. — с. 44.
23. Зайцева, Е.Н. Способ получения диуреза у лабораторных животных /Е.Н. Зайцева // Патент России на изобретение №2494703. 2013. Бюл. №28. - 11 с.
24. Зайцева, Е.Н. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным /Е.Н. Зайцева, А.Р. Зайцев, А.В. Дубищев// Патент России на полезную модель №115651. Бюл. № 13. - 2 с.
25. Ильиных, А.В. Микроэлементы и флавоноиды черники обыкновенной/ А.В. Ильиных, Д.С. Круглов // Труды 3-го Международного форума (8-й Международной конференции). – Самара. - 20-23 ноября 2007 г.
26. Ищенко, И.А. Эффективность применения антиоксидантов в лечении диабетической ретинопатии / И.А. Ищенко, Т.М. Миленская // Клиническая офтальмология. Библиотека РМЖ. – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 97-101.
27. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. В двух томах. Т. 2 / Ю. Кирхнер. Перевод с англ. К.Ю. Кошевника. Под ред. д. хим. наук, проф. В.Г. Березкина. – М.: «Мир», 1981. – 523 с.
28. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с., ил.
29. Киселева, Т.Н. Современные аспекты медикаментозной коррекции нарушения кровообращения в сосудах глаза / Т.Н. Киселева, Г.С. Полунин, Ю.М. Лагутина // Вестник офтальмологии. – 2007. - № 2. – С. 37-39.
30. Колесник, А.А. Изменение антоцианов в плодах рябины мичуринских сортов при хранении / А.А. Колесник, Л. Г. Елизарова// Труды III Всесоюзного семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод. - Свердловск, 1968. -С. 389-395.

31. Куркин, В.А. Анатомо-морфологическое исследование плодов рябины черноплодной / В.А. Куркин, А.В. Егорова, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, Т.К. Рязанова, Е.В. Каллина // Медицинский альманах. – 2011. - № 2. – С. 326 – 328.

32. Куркин, В.А. Морфолого-анатомическое исследование рахисов и черешка листа ореха грецкого (*Juglans regia* L.) / В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, А.С. Железникова, А.В. Помогайбин // Фундаментальные исследования. – 2014. - № 5 (часть 1). – С. 102-108.

33. Куркин, В.А. Новые подходы к диагностике лекарственного растительного сырья эхинацеи пурпурной // В.А. Куркин, Е.И. Вельмьяйкина, Л.В. Тарасенко, В.М. Рыжов // Традиционная медицина. – 2012. – № 1. – С. 42–46.

34. Куркин, В.А. Петиолярная анатомия в рамках морфолого-анатомического исследования перспективного лекарственного растительного сырья – травы женьшеня / В.А. Куркин, А.С. Акушская, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, П.Д. Топоркова // Фундаментальные исследования. – 2014. - № 5 (часть 6). – С. 1274-1278.

35. Куркин, В.А. Сравнительное анатомо-морфологическое исследование некоторых вегетативных органов эвкалипта прутовидного и эвкалипта серого / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Л.В. Тарасенко, В.М. Рыжов, Н.Р. Шагалиева, А.В. Азнагулова, Л. В. Марлынова // Медицинский альманах. – 2013. – № 5 (28). – С. 191–196.

36. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учеб. для студентов фармац. вузов / В.А. Куркин. - Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.

37. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды как самостоятельный класс биологически активных соединений: Учебное пособие / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, Е.В. Авдеева, В.Н. Ежков – Самара: ООО «Офорт»; Гоувпо «СамГМУ», 2005. – 128 с., ил.

38. Левданский, В.А. Выделение и изучение состава антоцианидинов коры лиственницы/ В.А. Левданский, А.И. Бутылкина, Б.Н. Кузнецов // Хим. раст. сырья. – 2006. - №4. – С. 17-20.

39.Левданский, В.А. Получение антоцианидиновых красителей из луба коры березы *Betula pendula* Roth./ Хим. раст. сырья. – 2004. - №3. – С. 25-28.

40.Ломова, Т. С. Новые решения в хроматографическом и фотометрическом анализе антоциановых пигментов из растительного сырья: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00. 02/ Ломова Татьяна Сергеевна. – Воронеж, 2007. – 23 с.

41. Лотова, Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений: учебник./ Л.И. Лотова. – 4-е, изд. доп. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. – 512 с.

42.Лурье, И.С. Технология кондитерского производства / И.С. Лурье. – М.: Агропромиздат, 1992. – 399 с.: ил.

43. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 15-е изд., перераб. и доп. – М. : РИА «Новая волна» : Издатель Умеренков, 2008. – 1206 с. : ил.

44.Миленькая, Т.М. Эффективность применения антоцианозидов в лечении больных с непролиферативной диабетической ретинопатией / Т.М. Миленькая // Клиническая офтальмология. Библиотека РМЖ. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 159-161.

45.Молчанов, М.В. Изучение возможности производства сиропов на основе водных извлечений из плодов черники / М.В. Молчанов, В.И. Погорелов // Технология лекарственных препаратов и БАД: поиски и решения. – Вып. 59. – Пятигорск, 2004. – С. 128-130.

46. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А.Муравьева, И.А.Самылина, Г.П.Яковлев.- М.: Медицина, 2007. - 656 с.

47. Неумывакин, И.П. Черника. На страже здоровья / И.П. Неумывакин – СПб.: «Издательство «ДИЛЯ», 2008. – 128 с

48.Никитин, А. А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений / А. А. Никитин, И. А. Панкова. - Л. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1982. - 767 с. : ил. - С. 717-720

49.Орешникова, В.С. Об эффективности лечения больных гипертонией соком черноплодной рябины (аронии) // Труды III Всесоюзного семинара по

биологически активным (лечебным) веществам пло-дов и ягод. - Свердловск, 1968. - С. 339-342.

50. Офтальмология : национальное руководство / под ред. С.Э. Аветисова, Е.А. Егорова, Л.К.Мошетовой и др. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 944 с.

51. Паламарчук, И.А. Изучение растительной клетки. Пособие для учителей / И.А., Паламарчук, Т.Д. Веселова - М.: Просвещение, 1969. – 143 с.

52. Петрухина, И.К. Результаты маркетинговых исследований номенклатуры лекарственных средств, применяемых при заболеваниях глаз / И.К. Петрухина, Л.В. Логинова, Т.К. Рязанова // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы X Международной конференции, 6-7 апреля 2012 г., Минск. Минск, 2012. - с. 435-437.

53. Петрухина, И.К. Изучение факторов, влияющих на выбор препаратов, используемых для улучшения функционального состояния сетчатки глаза / И.К. Петрухина, Л.В. Логинова, Т.К. Рязанова // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы XI Международной конференции, 17-18 мая 2013 г., Минск. - Минск, 2013. - С. 89-91.

54. Попова, И.А. Новое в диагностике краснокнижных видов растений рода *Nedysarum* / И.А. Попова, Т.И. Плаксина, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // *Modern Phytomorphology*. – 2013. - № 3. – С. 207–211.

55. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций)/под ред. А.И. Шретер. - М.: Медицина, 1985. - 328 с.

56. Применение антиоксидантов в комплексной терапии компьютерного зрительного синдрома / Полунин Г.С., Полунина Е.Г., Каспарова Е.А., Забегайло А.О. // Клиническая офтальмология. Библиотека РМЖ. – 2006. – Т. 7, № 1. – С.38-41.

57.Птицын, А. В. Технология выделения флавоноидов винограда *Vitis vinifera* сорта “Изабелла” для косметики и изучение их свойств.: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 03.00. 23 / Птицын Андрей Владимирович. - Москва, 2007. – 26 с.

58.Пятигорская, Н.В. Особенности выбора лекарственной формы для детей / Н.В. Пятигорская, Н.И. Ханова // Фармация. – 2009. - № 2. – С. 24-27.

59. Рациональная фармакотерапия в офтальмологии : Рук. для практикующих врачей / Е.А. Егоров, В.Н.Алексеев, Ю.С.Астахов,В.В. Бржевский, А.Ф. Бровкина и др.; под общ. ред. Е.А. Егорова. – М.: Литерра, 2004. – 954 с. (Рациональная фармакотерапия: сер. рук. для практикующих врачей; т. 7).

60. Регуляторный статус и проблема безопасности средств растительного происхождения / О.В. Решетько [и др.] // Ремедиум. – 2010. - № 5. – С. 15-18.

61.Рудаков, О. Б. Фракционный состав антоциановых красителей из растительных экстрактов и контроль над ним методом ВЭЖХ / О.Б. Рудаков [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. - №1. – С. 85-93.

62. Самылина, И.А. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств // Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты: материалы 1-го Международного научного конгресса. – М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ и др., 1994. – С. 203.

63. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация, 2004. - № 2. - С.39-41

64. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 060108 (040500) – Фармация: в 3-х томах / И.А.Самылина, О.Г.Аносова.-М.: ГЭОТАР-МЕдиа.- (Учебное пособие). Том 1: Общая часть. Термины и техника микроскопического анализа в фармакогнозии. - 2007. – 192 с.

65. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 060108 (040500) – Фармация: в 3-х томах / И.А.Самылина, О.Г.Аносова.-М.: ГЭОТАР-МЕдиа. - Том 2. - 2010. - 384с.

66. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 060108 (040500) – Фармация: в 3-х томах / И.А.Самылина, О.Г.Аносова.-М.: ГЭОТАР-МЕдиа. - Том 3. – 2009. - 488с.

67. Сафонов, Н. Н. Полный атлас лекарственных растений : полезные растения, их свойства и применение / Н. Н. Сафонов - М. : ЭКСМО, 2005. – 310 с.

68. Сергеева, С.В. Извлечение и концентрирование антоцианового красителя с применением двухфазных водных систем на основе водорастворимых полимеров/ Сергеева, С.В. [и др.] // Проблемы теоретической и экспериментальной химии: тезисы докладов XVII Российской молодежной научной конференции. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. – 2007. – С. 71.

69. Сдобина, А.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии / А.И. Сдобина // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: материалы Международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина. – Пенза: Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 2008. – 420 с.

70. Сизяков, С.А. Современные вспомогательные вещества в технологии прямого прессования / С.А. Сизяков, К.В. Алексеев, А.С. Сульдин, С.К. Алексеева // Фармация. – 2008. - №4. – С. 52-57.

71. Синева, Т.Д. Разработка технологии и стандартизация качества сиропа сорбита как дисперсионной среды лекарственных препаратов для детей / Т.Д. Синева, Т.С. Потехина, И.Г. Витенберг // Химико-фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41, № 12. – С. 26-29.

72. Синева, Т.Д. Фармакологические особенности применения сорбита в качестве вспомогательного вещества в лекарственных препаратах для детей / Т.Д. Синева, Н.Ю. Фролова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2008. - № 2. – С. 41-45.

73. Скорикова, Ю. Г. О флавоноидах северо-кавказских вишен и черешен / Ю. Г. Скорикова, Э.А. Шафтан // Труды III Всесоюзного семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод. - Свердловск, 1968. – С. 113-118.

74. Скорикова, Ю.Г. Методика определения антоцианов в плодах и ягодах/ Ю.Г. Скорикова, Э, А. Шафтан // Труды III Всесоюзного семинара по

биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод. - Свердловск, 1968. - С. 451-460.

75. Смирнов, Е. В. Пищевые красители. Справочник / Е.В. Смирнов. — СПб.: Издательство «Профессия», 2009. — 352 с.

76. Соколова, В. Российский рынок офтальмологических препаратов / В. Соколова // Ремедиум .- 2008 .- N 7 .- С. 16-19.

77. Соколова Е.А. Значение признаков анатомического строения черешка для систематики родов *Cerasus* Mill. и *Radus* Mill. (Rosaceae) // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – 1989. – Т. 124. – С. 109–112.

78. Сорокопудов, В.Н. Антоцианы плодов некоторых видов рода *Rubus* L. из коллекции ботанического сада БелГУ/ В.Н. Сорокопудов, В.И. Дейнека, И.П. Лукина, Л.А. Дейнека// Хим. раст. сырья. – 2005. - №4. – С. 61-65.

79. Степанян, Р.В. Получение лекарственных форм из плодов черники кавказской и изучение их влияния на сетчатку глаза. / Р.В. Степанян, А.В. Топчян // Новый армянский медицинский журнал. – 2007. – Т. 1, №1. – С. 35-39.

80. Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. – М., 1974.

81. Флора СССР: в 30 т./ Под ред. В.Л. Комарова. - М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1937-1960. - Т. 18. – 853 с.

82. ФСП 42-8635-07 «Черники обыкновенной побegi» (ОАО «Красногорсклексредства»).

83. Харламова, О.А. Натуральные пищевые красители / О.А. Харламова, Б.В. Кафка. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 191 с.

84. Химический анализ лекарственных растений: Учебное пособие для фармацевтических вузов / Ладыгина Е.Я., Сафронович Л.Н., Отряшенкова В.Э. и др. Под ред. Гринкевич Н.И., Сафронович Л.Н. – М.: Высш. школа, 1983. - С. 85-86.

85. Шилова, И.В. Химический состав и ноотропная активность растений Сибири / И.В. Шилова, Н.И. Суслов, И.А. Самылина. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2010. – 236 с.

86.Энциклопедия лекарств. Регистр лекарственных средств России / гл. ред. Г.Л. Вышковский. - М.: Изд-во РЛС-Медиа, 2010. - Вып. 18. - 1296 с.

87.Яковлев, Г. П. Ботаника: Учебник для вузов / Г.П. Яковлев, В. А. Челомбитько // Под ред. чл. – корр. РАН, проф. Р.В. Камелина. – СПб.: Спецлит, Издательство СПХФА, 2001. – 680 с.

88.Adje, F. Anthocyanin Characterization of Pilot Plant Water Extracts of *Delonix regia* Flowers/ F. Adje et al.// *Molecules*. – 2008. - № 13. – P. 1238-1245.

89.Andersen, Ø. M. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin/ Ø. M. Andersen *et al.* // *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65. – P. 405-410.

90.Baerle, A. Studiu privind separarea și stabilizarea coloranților antocianici din aronia melanocarpa: Teza de doctor în Chimie/ Alexei Baerle. - Chișinău, moldova, 2006. – 118 p.

91.Bakhshayeshi, M.A. The effects of light, storage temperature, pH and variety on stability of anthocyanin pigments in four *Malus* varieties/ M.A.Bakhshayeshi *et al.* // *Pakistan Journal of biological sciences*. - 2006.– Vol. 9 (3).– P. 428 – 433.

92.Bednar, Petr. Utilization of capillary electrophoresis /mass spectrometry (CE/MS<sup>n</sup>) for the study of anthocyanin dyes/ Petr Bednar et al.// *Journal of Separation Science*. – 2005. 17-March. – P. 1-28.

93.Bednar, Petr. Separation of Structurally Related Anthocyanins by MEKC/ Petr Bednar et al.// *Chromatographia*. – 2003. - № 5/6). – P. 283 – 287.

94. Boulton, R. B. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review / R. B. Boulton // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2001. – Vol. 52 – P. 67-87.

95.Burdulis, D. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits/ Deividas Burdulis *et al.*// *Medicina (Kaunas)* – 2007. - Vol. 43, № 12. – P. 971 – 977.

96.Byamukama, R. Anthocyanins from flowers of *Hippeastrum* cultivars/ R. Byamukama *et al.* // *Scientia Horticulturae*. – 2006. - Vol. 109. - P. 262–266.

97. Clifford, M.N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden / M.N. Clifford // *J. Sci. Food Agric.* - Vol. 80. – P. 1063-1072.

98. Antal, Diana-Simona. The anthocyanins: biologically active substances of food and pharmaceutical interest / Diana-Simona Antal, Gabriela Gârban. Zeno Gârban Wang et al. // *The annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – Food Technology.* – 2003. – P. 106-115.

99. Durst, Robert W. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC / Robert W. Durst, and Ronald E. Wrolstad // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* – 2001. - F1.2.1-F1.2.13.

100. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer / Emma M. Coates et al. // *Journal of Carcinogenesis.* – 2007. - Vol. 6, № 4. – P. 25-30.

101. European Pharmacopoeia. – 6-th Ed. – Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008. - P. 738-739.

102. Frutos, P. Tannins and ruminant nutrition. Review / P. Frutos, G. Hervás, F. J. Giráldez and A. R. Mantecón. // *Spanish Journal of Agricultural Research.* - 2004. - Vol. 2 (2). - P. 191-202.

103. German Homeopathic Pharmacopoeia 5<sup>th</sup> supplement 1991

104. Giusti, M. Mónica. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy/ M. Mónica Giusti and Ronald E. Wrolstad // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* – 2001. - F1.2.1-F1.2.13.

105. Hayashi, K. Blue Anthocyanin from the Flowers of Commelina, the Crystallisation and Some Properties Thereof Studies on Anthocyanins. XXX/ Kozo Hayashi, Yukihide Abe and Seiji mitsui// *Bot . Mag. (Tokyo).* – 1958. - Vol. 34. – P. 373-378.

106. Hiraoca, A. Isotachopheresis of anthocyanins / Atsushi Hiraoca, Kunijiro Yoshitama // *Chem. Pharm. Bull.* 34 (5) 2257-2260 (1986).

107. Horbowicz, M. Anthocyanins of fruits and vegetables – their occurrence, analysis and role in human nutrition/ Marcin Horbowicz *et al.* // *Vegetable crops research bulletin.* - 2008.– Vol. 68. – P. 5-22.

108. Ichiyanagi, Takashi. Complete Assignment of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Anthocyanins Separated by Capillary Zone Electrophoresis/ Takashi Ichiyanagi *et al.*// Chem. Pharm. Bull. – 2004. - Vol. 52, № 2. – P. 226—229.
109. Ishikura, N. Chromatographic Separation and Characterization of the Component Anthocyanins in Radish Root. Studies on Anthocyanins, XXXVIII/ Nariyuki Ishikura and Kozo Hayashi// Bot. Mag. Tokyo – 1963. - Vol. 76. – P. 6-13.
110. Jordheim, M. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms: diss. ... Philosophiae Doctor/ Monica Jordheim. – Bergen, Norway, 2007. – 98 c.
111. Jordheim, M. Anthocyanins in Caprifoliaceae/ M. Jordheim *et al.*// Biochemical Systematics and Ecology. - 2007. - Vol. 35. - P. 153-159.
112. Kowalczyk, E. Anthocyanins in medicine/ Edward Kowalczyk, Paweł Krzesiński, Marcin Kura, Bartosz Szmigiel, Jan Blaszczyk// Pol. J. Pharmacol. – 2003. - Vol. 55. – P. 699–702.
113. Kraus, M. Synthese von <sup>14</sup>C-markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.): Diss. des naturwissenschaftlichen Doktorgrades/ Michael Kraus. – Würzburg, 2006. – 187 p.
114. Lee, J. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods/ Jungmin Lee, Christopher Rennaker a, Ronald E. Wrolstad// Food Chemistry. – 2008. - Vol. 110. – P. 782–786.
115. Lila Mary Ann. Anthocyanins and Health: An In Vitro Approach/ Mary Ann Lila// Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2004. - Vol. 5. - P. 306–313.
116. Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceutical /Second Edition. Edited by W. Jeffrey Hurst/ Functional Foods and Nutraceutical Series – CRC Press, 2008. - p. 247-277.
117. Mozetič, B. Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia)/ B. Mozetič, P. Trebše, J. Hribar// Food Technol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 40, № 3. – P. 207–212.

118. Nakamura, Y. Major Anthocyanin of the Flowers of Hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis L.*) / Yasuyuki Nakamura [et al.] // Agric. Biol. Chem. – 1990. - Vol. 54, № 12. – P. 3345-3346

119. Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo / Pei-Ni Chen et al. // Nutrition And Cancer. – 2005. - Vol. 53, № 2. – P. 232–243.

120. Plant Guide. Contributed by: USDA NRCS Bismarck Plant Materials Center. Michael Knudson //USDA NRCS Plant Materials Center, Bismarck, ND – 128 с., ил.

121. Rechner, A.R. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function / A.R. Rechner, C. Kroner // Thromb. Res. – 2005. - Vol. 116. – P. 327-334.

122. Rein, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins: Academic dissertation/ Maarit Rein. – Helsinki. – 2005. - 88 + 34 pp.

123. Rodriguez-Saona, Luis E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins / Luis E. Rodriguez-Saona, Ronald E. Wrolstad// Current Protocols in Food Analytical Chemistry. - 2001. - F1.1.1-F1.1.11.

124. Saito, N. On Petanin Isolated from the Berries of *Solanum nigrum*, var. *guineense*/ N. Saito, K. Hirata,( Miss) R. Hotta, and K. Hayashi// Part XLVIII: Proc. Japan Acad. – 1965. - Vol. 41, № 7. – P. 593 - 598.

125. Saito, N. Isolation and Crystallization of Genuine Red Anthocyanins / N. Saito, K. Hirata,( Miss) R. Hotta, and K. Hayashi// Part XLIII: Proc . Japan Acad. – 1964. - Vol. 40, No 7. - P. 516-521.

126. Saito, Norio. Delphin, the Anthocyanin of Medicinal Saffron and its Identity with Hyacin as Shown by Paper Chromatography of Partial Hydrolysates/ Norio Saito, Seiji Mitsui, Kozo Hayashi// Part XXXII: Bot . Mag. Tokyo, 73, 231. - 1960. – Vol. 36, № 6. – P. 340 -345

127. Sampson, L. Flavonol and flavone intakes in US health professionals / Sampson, L., Rimm E., Hollman P.C., de Vries J.H., Katan M.B. // J. Am. Diet. Assoc. – 2002. - Vol. 102. – P. 1414-1420.

128. Skalska-Kamińska A. Application of high performance thin layer chromatography method for ophthalmological preparations containing anthocyanins fractions/ A. Skalska-Kamińska *et al.*// Journal of Pre-Clinical and Clinical Research. – 2008. - Vol. 1, № 1. – P. 35-38.
129. Stoj, A. Use of anthocyanin analysis for detection of berry juice adulterations / A. Stoj, Z. Targonski, A. Malik // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. – 2006. – № 5(1). – P. 73-85.
130. Takeda, K. Crystallization and Some Properties of the Genuine Anthocyanin inherent to the Deep Violet Color of Pansy/ K. Takeda, K. Hayashi// Part XLVII: Sci. Report of Tokyo Kyoiku Univ., Sect. B. - 1965. - Vol. 41, No 6. - P. 449-454.
131. Tatsuzawa, F. Determination of minor floral anthocyanins in a red-flowered Petunia/ F. Tatsuzawa, T. Ando// J. Japan Soc. Hort. Sci. – 2005. – No. 74(6) . – P. 482-484
132. Wheldale, M. The anthocyanin pigments of plants / Muriel Wheldale - Cambridge University Press, 1916. – 320 p.
133. Wang, H. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries/ Wang H. et al // J. Nat. Prod. – 1999. - Vol. 62. – P. 294-296.
134. Vaccinium myrtillus (Bilberry). - Alternative Medicine Review. – Vol. 6, N. 5. – 2001. – P. 500 – 504.
135. Zushang, Su. Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L. / Su Zushang // Pharmaceutical Crops. – 2012. – Vol. 3. – P. 7-37.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

- 1 – 6. Акты о внедрении;
7. Направительное письмо в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» от 22.01.2013 г. № 1230/01-37-181. Вх. № 1016 от 20.01.2013 г.;
8. Направительное письмо в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» от 22.01.2013 г. № 1230/01-37-182. Вх. № 1020 от 28.01.2013 г.;
9. Проект ФС «Черники плоды»;
10. Проект ФСП «Черники обыкновенной плоды свежие»;
11. Проект ФСП «Черники обыкновенной побегов»;
12. Патент на изобретение «Сироп черники обыкновенной» №2484671 от 20.06.2013 г.;
13. Удостоверение на рационализаторское предложение «Способ получения сиропа черники обыкновенной» № 219 от 21.09.2012 г.

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава  
России, академик РАН,  
лауреат Государственной премии РФ,  
дважды лауреат премии Правительства РФ,  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор  Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ  
«16»  2014 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Рязановой Татьяна Константиновны «Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии: зав. кафедрой фармацевтической технологии, д. фарм. н., профессора С.В. Первушкина, доцента, к. фарм. н. Л.Д. Климовой, старшего преподавателя, к. фарм. н. О.В. Бер подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рязановой Т.К., посвященного изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья черники обыкновенной и препаратов на его основе в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по созданию лекарственных препаратов на основе флавоноидов. Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья и лекарственных препаратов являются методической и методологической основой.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии,  
д. фарм. н., профессор

С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,  
к. фарм. н.

Л.Д. КЛИМОВА

Старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии,  
к. фарм. н.

О.В. БЕР

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава  
России, академик РАН,  
лауреат Государственной премии РФ,  
дважды лауреат премии Правительства РФ,  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор  Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ  
«16»  2014 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Рязановой Татьяна Константиновны «Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, доцента, к. фарм. н. И.К. Петрухиной, доцента, к. фарм.н. Е.П. Гладуновой, доцента, к. фарм. н. Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рязановой Т.К., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе черники обыкновенной, содержащего флавоноиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований офтальмологических лекарственных препаратов. Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе черники обыкновенной и создания конкурентоспособных отечественных лекарственных средств, в том числе импортозамещающих препаратов.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации,  
к. фарм. н., доцент

И.К. ПЕТРУХИНА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,  
к. фарм. н.

Е.П. ГЛАДУНОВА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,  
к. фарм. н.

Е.Л. АБДУЛМАНОВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава  
России, академик РАН,  
лауреат Государственной премии РФ,  
дважды лауреат премии Правительства РФ,  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор  Г.И. КОТЕЛЬНИКОВ  
«11»  2014 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Рязановой Татьяна Константиновны «Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д. фарм. н., профессора В.А. Куркина, профессора, д. фарм. н. Е.В. Авдеевой, доцента, д. фарм. н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рязановой Т.К., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных препаратов на основе черники обыкновенной, содержащего флавоноиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют разработке методик диагностики и определению качества сырья черники обыкновенной и препаратов на его основе.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,  
д. фарм. н., профессор  В.А. КУРКИН

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,  
д. фарм. н.  Е.В. АВДЕЕВА

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,  
к. фарм. н.  О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава  
России, академик РАН,  
лауреат Государственной премии РФ,  
дважды лауреат премии Правительства РФ,  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор  Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ  
«1»  2014 г.



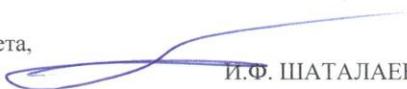
АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Рязановой Татьяна Константиновны «Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета: зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, д.б.н., профессора И.Ф. Шаталаева, доцента, к.фарм.н. А.В. Воронина, доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рязановой Т.К., посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов черники обыкновенной, содержащего флавоноиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе черники обыкновенной.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,  
д. б. н., профессор

 И.Ф. ШАТАЛАЕВ

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,  
к. фарм. н.

 А.В. ВОРОНИН

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,  
к. х. н.

 С.Х. ШАРИПОВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ  
«Центр контроля качества  
лекарственных средств  
Самарской области»



Е.А. КАЛАБУХОВА

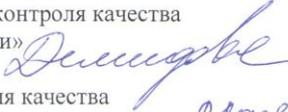
2014 г.

**АКТ**

о внедрении результатов диссертационной работы Рязановой Татьяна Константиновны «Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Демидовой Г.А., провизора-аналитика Власовой Г.Н., провизора-аналитика Козловой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рязановой Т.К., посвященного фармакогностическому изучению черники обыкновенной при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и спектроскопии в УФ- и видимой области. Методики определения подлинности сырья и препаратов черники обыкновенной, а также методики определения суммы флавоноидов воспроизводимы и удобны в работе. Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Т.К. Рязановой будут способствовать повышению объективности стандартизации черники, а также лекарственных препаратов на основе данного сырья.

**Члены комиссии:**

Заместитель руководителя ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»  Г.А. ДЕМИДОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»  Г.Н. ВЛАСОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»  Е.Е. КОЗЛОВА

443070, г. Самара, ул. Партизанская, д. 33

«Утверждаю»

Генеральный директор  
ЗАО «Самаралектравы»  
И.Д. ЛУЖНОВ

\_\_\_\_\_ 2014 г.

**АКТ**

о внедрении результатов диссертационной работы Рязановой Татьяна Константиновны «Фармакогностическое исследование плодов и побегов черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загрянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рязановой Т.К., посвященного разработке методик получения и анализа сиропа черники, а также изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья черники обыкновенной.

Разработанные методики качественного и количественного анализа сырья черники обыкновенной, а также сиропа из данного растения апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе черники обыкновенной.

**Члены комиссии:**

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»

А.Н. ЗАГРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»

А.В. НИКИТЕНКОВ

446554, Самарская обл., Сергиевский район, с. Антоновка, ул. Полевая, д. 19А



государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего  
профессионального образования

**«Самарский государственный  
медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
(ГБОУ ВПО СамГМУ  
Минздрава России)**

ул. Чапаевская, 89, г. Самара, 443099  
тел.: (846) 332-16-34, факс: (846) 333-29-76  
E-mail: info@samsmu.ru  
ОГРН 1026301426348  
ИНН 6317002858

22.01.2013 № 1230/01-37-181  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Генеральному директору ФГБУ  
«Научный центр экспертизы  
средств медицинского применения»,  
доктору медицинских наук,  
профессору **А.Н. МИРОНОВУ**

127051, г. Москва,  
Петровский бульвар, 8, строение 2

Глубокоуважаемый Александр Николаевич!

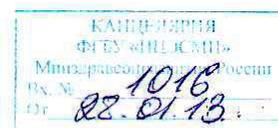
Ректорат государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации направляет Вам на рассмотрение с целью утверждения проекта фармакопейной статьи (ФС) на лекарственное растительное сырье «Черники плоды» и пояснительную записку к ФС для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XII издания.

При этом ректорат Самарского государственного медицинского университета выражает Вам глубокую благодарность за плодотворное сотрудничество.

Приложение: 1. Проект ФС «Черники плоды» - 2 экз.  
2. Пояснительная записка к ФС - 2 экз.

Ректор,  
академик РАМН,  
профессор

**Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ**





государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего  
профессионального образования

**«Самарский государственный  
медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
(ГБОУ ВПО СамГМУ  
Минздрава России)**

ул. Чапаевская, 89, г. Самара, 443099  
тел.: (846) 332-16-34, факс: (846) 333-29-76  
E-mail: info@samsmu.ru  
ОГРН 1026301426348  
ИНН 6317002858

Генеральному директору ФГБУ  
«Научный центр экспертизы  
средств медицинского применения»,  
доктору медицинских наук,  
профессору **А.Н. МИРОНОВУ**

127051, г. Москва,  
Петровский бульвар, 8, строение 2

22.01.2013 № 1230/01-37-182  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Глубокоуважаемый Александр Николаевич!

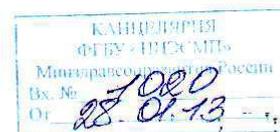
Ректорат государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации направляет Вам на рассмотрение с целью утверждения проекта фармакопейной статьи (ФС) на лекарственное растительное сырье «Черники плоды свежие» и пояснительную записку к ФС для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XII издания.

При этом ректорат Самарского государственного медицинского университета выражает Вам глубокую благодарность за плодотворное сотрудничество.

Приложение: 1. Проект ФС «Черники плоды свежие» - 2 экз.  
2. Пояснительная записка к ФС - 2 экз.

Ректор,  
академик РАМН,  
профессор

**Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ**



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**  
**РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФГБУ «Научный центр экспертизы  
средств медицинского назначения»  
Руководитель Центра стандартизации  
лекарственных средств

Е.Л. КОВАЛЕВА

от “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**  
**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

**Производитель:**

**Заявители:**

**Разработчик:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

---

Черники плоды  
Vaccinii myrtilli fructus

ФС 42-.....  
взамен ГФ СССР XI, ч. 2, ст. 35

---

Срок введения установлен

с “\_\_\_” \_\_\_\_\_ г.

до “\_\_\_” \_\_\_\_\_ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на зрелые и высушенные плоды многолетнего кустарника черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus* L., семейство вересковые – *Ericaceae*.

## Спецификация лекарственного растительного сырья

### «Черники плоды»

Производитель:

Показатель качества	Методы	Нормы
2	3	4
Внешние признаки	<p>Ц е л ь н о е с ы р ь е. Ягоды диаметром 3-6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. На верхушке плодов виден остаток чашечки в виде небольшой кольцевой оторочки, окружающей вздутый диск с остатком столбика в центре или с небольшим углублением после его отпада. В мякоти плода – многочисленные (до 30 штук) семена яйцевидной формы. У основания иногда имеется короткая плодоножка.</p> <p>Цвет плодов с поверхности черный с красноватым оттенком; матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-бурый. Запах слабый. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий.</p>	<p>Просмотр невооружённым глазом и под лупой с увеличением (×10)</p>
Микроскопия	ГФ XI, вып. 1, с. 277	<p>Просмотр под микроскопом с увеличением (не менее ×40)</p>
Качественные реакции	<p>1. ТСХ-анализ;</p> <p>2. Качественные реакции;</p> <p>3. Спектроскопия в УФ и видимой области спектра.  <math>\lambda_{\max} = 281 \pm 2 \text{ нм}, 546 \pm 2 \text{ нм}</math> (антоцианы);</p>	<p>1. ТСХ: наличие пятен с величинами <math>R_f</math> около 0,5 розового цвета (гликозиды мальвидина) и 0,35 фиолетового цвета (гликозиды цианидина)</p> <p>2. Качественные реакции:                      Отвар плодов(1:10) имеет темно-фиолетовый цвет.                      При прибавлении к отвару нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется оливково-зеленое окрашивание (антоцианы).                      При прибавлении к отвару нескольких капель раствора свинца ацетата основного образуется аморфный осадок, частично растворимый в</p>

		кислотах; при этом раствор приобретает розовую или красную окраску (антоцианы). При прибавлении к отвару нескольких капель железоаммониевых квасцов образуется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).  3. УФ-спектр раствора Б (см. раздел "Количественное определение") имеет максимумы поглощения $281 \pm 2$ нм, $546 \pm 2$ нм (антоцианы).
Количественное определение: Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид	УФ-спектроскопия	Не менее 3,0%
Влажность	ГФ XI, вып. 1, стр. 285	Не более 17 %
Золы общей	ГФ XI, вып. 2, стр. 24	Не более 3,0 %
Золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты	ГФ XI, вып. 2, стр. 25	Не более 0,8%
Других частей растений (листьев, кусочков стеблей)	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 0,25%
Плодов незрелых, твердых и пригоревших	ГФ XI, вып. 1, стр. 276	Не более 1%
Органической примеси	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 2%
Минеральной примеси	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 0,3%
Микробиологическая чистота	В соответствии с ОФС 42-0016-04	Категория 4А
Срок годности		2 года

**Внешние признаки.** Цельное сырье. Ягоды диаметром 3-6 мм, бесформенные, сильно сморщенные, в размоченном виде шаровидные. На верхушке плодов виден остаток чашечки в виде небольшой кольцевой оторочки, окружающей вздутый диск с остатком столбика в центре или с небольшим углублением после его отпада. В мякоти плода – многочисленные (до 30 штук) семена яйцевидной формы. У основания иногда имеется короткая плодоножка.

Цвет плодов с поверхности черный с красноватым оттенком; матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-бурый. Запах слабый. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий.

## Микроскопия.

Клетки эпидермиса плодов сгруппированы в комплексы, разграниченные между собой более толстыми клеточными стенками, чем в границах комплекса (так называемого окончатого типа), что является результатом деления уже развившихся клеток (рис. 1, 2).



Рисунок 1 – Эпидермис плодов черники  
( $\times 100$ )

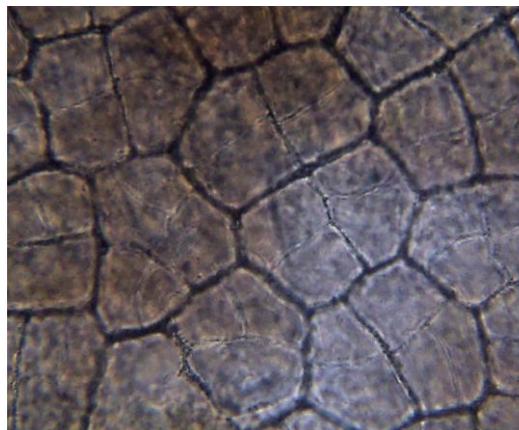
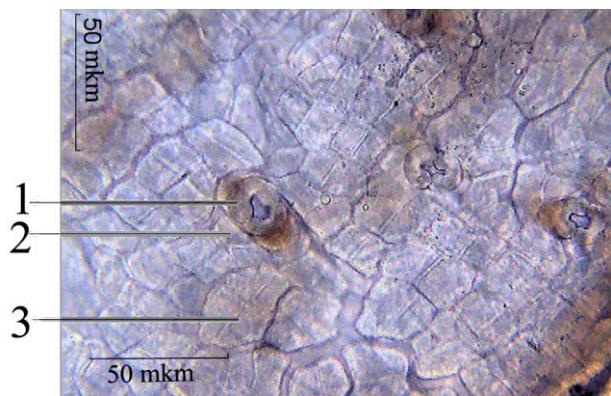
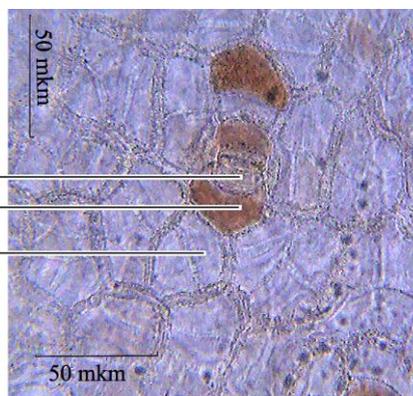


Рисунок 2 – Эпидермис плодов черники  
( $\times 400$ )

Устьица на зрелом плоде встречаются редко, обычно они деформированы (рис. 3Б). Эпидермис диска отличается от остальной поверхности плода более мелкими клетками и наличием хорошо сохранившихся устьиц (рис. 3А). Устьица, как правило, окружены 4-5 околоустьичными клетками (аномоцитного типа).



А



Б

Рисунок 3 – Эпидермис плода черники. Устьица ( $\times 400$ ) А – эпидермис диска Б – эпидермис основной части плода. 1 – устьица, 2 – околоустьичные клетки, 3 – клетки эпидермиса

Эпидермальные клетки и подстилающие их 2-3 ряда клеток вытянуты в тангентальном направлении. Наружная стенка эпидермальных клеток утолщена сильнее остальных. Кутикула тонкая, покрыта восковым слоем. Субэпидермальные 2-3 ряда клеток имеют слабоколленхиматозный характер. Вместе с эпидермисом они образуют экзокарп. Вглубь плода оболочки клеток становятся более тонкими (рис. 4).

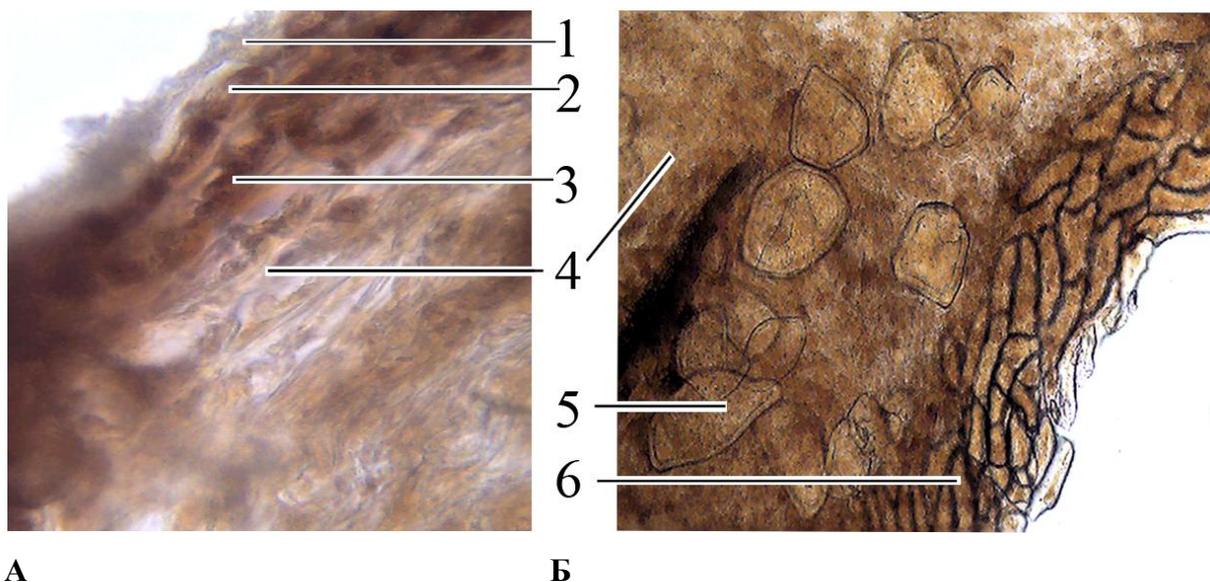


Рисунок 4 – Эпидермальные клетки, мезокарп и эндокарп плода ( $\times 400$ ) после осветления. А – эпидермис и мезокарп; Б – эндокарп.  
 1 – кутикула, 2 – эпидермальные клетки; 3 - тангентально вытянутые клетки, 4 – клетки мезокарпа, 5 – тонкостенные каменные клетки, 6 – клетки эндокарпа

Мезокарпий представлен рыхлой паренхимой, клетки которой окрашены антоцианами. Проводящие пучки очень тонкие, в основном представлены спиральными сосудами (рис. 6). Местами встречаются друзы, которые преимущественно локализуются в эндокарпе (рис. 5).

Эндокарп (внутренний эпидермис) состоит из большого числа толстостенных, полигональных, пористых клеток (рис. 5). В процессе увеличения размеров плода он разрывается, поэтому у зрелых плодов представлен отдельными участками, состоящими из 2-3 и большего количества клеток.

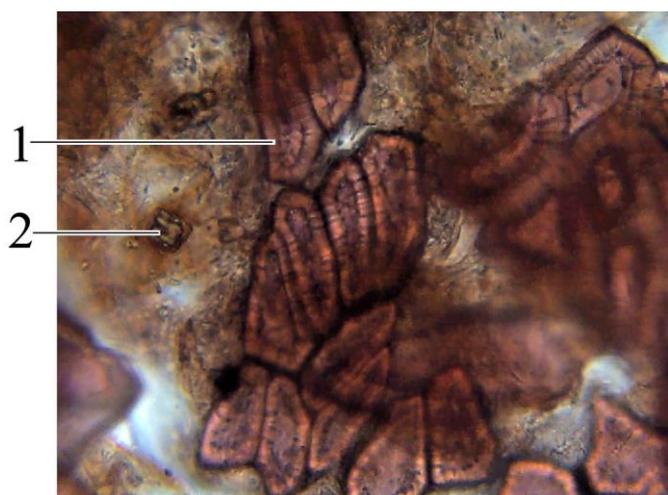


Рисунок 5 – Участок эндокарпа ( $\times 400$ ).  
 1 – толстостенные клетки; 2 - друзы

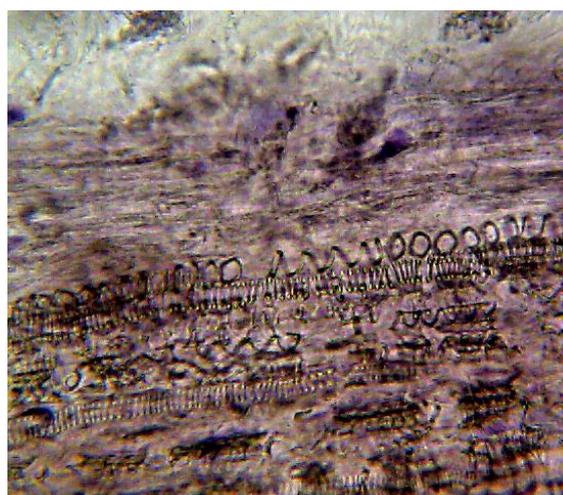


Рисунок 6 – Мезокарпий плода черники.  
 Сосудистые пучки ( $\times 400$ )

При добавлении разбавленного раствора щелочи (0,5-1%) к микропрепаратам эпидермиса, мякоти плодов, не подвергавшихся обработке (кипячение в растворе щелочи по фармакопейной методике), происходит изменение окраски в синий цвет, что характерно для антоцианов.

Семена многочисленные (до 30 штук), до 1,5 длиной, 0,5-0,8 мм шириной, 0,4-0,6 мм толщиной, бурые неясно-крупносетчатые, сжатые с боков и выпуклые по спинке (рис. 7А, Б).



А

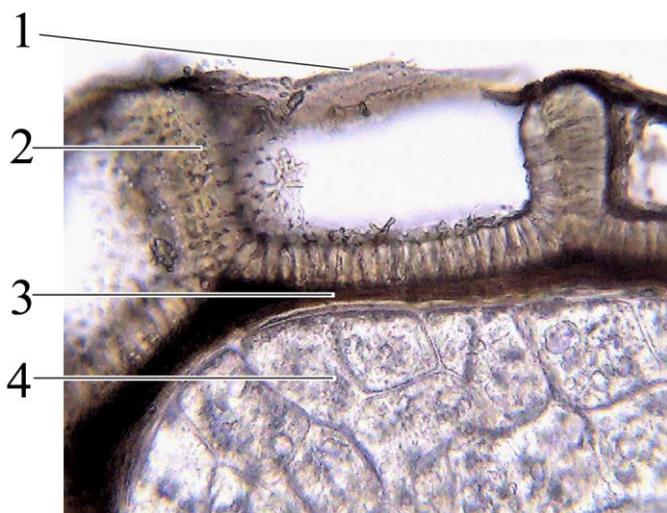


Б

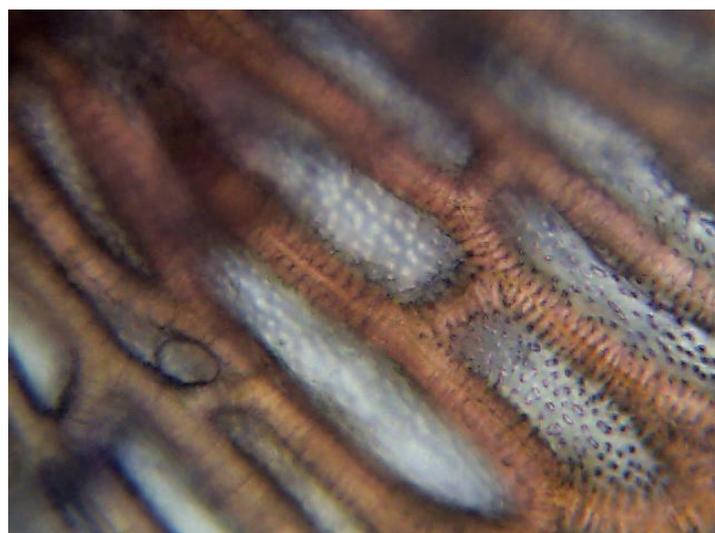
Рисунок 7 – Семена черники обыкновенной.

А – увеличение  $\times 40$ ; Б – продольный разрез ( $\times 40$ )

Структурными компонентами семян являются семенная кожура, эндосперм, зародыш. Строение семенной кожуры имеет характерные особенности. Из тканей семенной кожуры хорошо выражен только эпидермис, а остальные клетки совершенно спадаются. Эпидермальные клетки вытянуты вдоль семени, внутренняя и боковая стенки склерифицированы, пронизаны порами. Ослизняется только наружная стенка эпидермальных клеток (рис. 8). Эндосперм мощный, зародыш небольшой (рис. 9). Клетки зародыша и эндосперма содержат алейроновые зерна и жирное масло.



А



Б

Рисунок 8 – Семя черники.

А - продольный срез. Б – эпидермис с поверхности. ( $\times 400$ ).

1 – ослизняющиеся стенки эпидермальных клеток семени; 2 – эпидермис семени; 3 – спавшаяся паренхима семенной кожуры; 4 – эндосперм с маслом и алейроновыми зернами

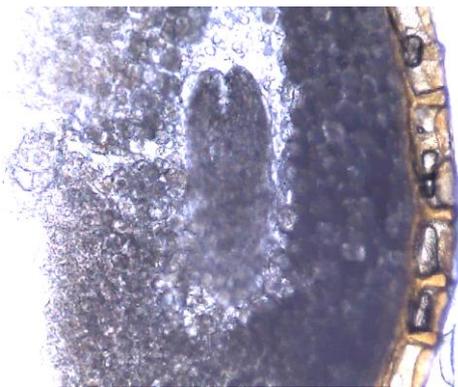


Рисунок 9 – Семя черники.  
Зародыш. Продольный разрез ( $\times 100$ )

### Качественные реакции.

1. ТСХ-анализ. 2,0 г плодов черники обыкновенной помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 10 мл 95 % этилового спирта, содержащего 1 % хлористоводородной кислоты, закрывают пробкой и перемешивают в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса». На линию старта пластинки «Сорбфил–ПТСХ-АФ-А-УФ», проведенную на расстоянии 1,5-2 см от нижнего края хроматографической пластинки, микропипеткой наносят 0,02 мл извлечения в виде пятна диаметром около 5 мм. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру, которую предварительно насыщают смесью растворителей н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) в течение суток, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 9 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10-15 минут и просматривают в видимом свете. На хроматограмме обнаруживаются розовое пятно с величиной  $R_f$  около 0,5 (гликозид мальвидина) и пятно фиолетового цвета с величиной  $R_f$  около 0,35 (цианидин-3-глюкозид); допускается наличие других пятен.

**Примечания:** 1. Подготовка пластинок. Пластины «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89) разрезают поперек линий накатки соответственно на 2 части 10 × 5 см и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 110 °С в течение 1 ч.

2. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: на хроматограмме извлечения из плодов черники  $R_f$  основных пятен (антоцианы) раствора должно быть от 0,20 до 0,50.

### 2. Качественные реакции.

Отвар плодов(1:10) имеет темно-фиолетовый цвет.

При прибавлении к отвару нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется оливково-зеленое окрашивание (антоцианы).

При прибавлении к отвару нескольких капель раствора свинца ацетата основного образуется аморфный осадок, частично растворимый в кислотах; при этом раствор приобретает розовую или красную окраску (антоцианы).

При прибавлении к отвару нескольких капель железоммониевых квасцов образуется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

### 3. Спектроскопия в УФ и видимой области спектра.

Электронный спектр раствора Б (см. методику количественного определения) в области от 190 до 700 нм имеет характерные максимумы поглощения при  $281 \pm 2$  нм и  $546 \pm 2$  нм.

**Числовые показатели.** Сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид и абсолютно сухое сырье не менее 3,0%, влажность не более 17%; золы общей не более 3,0%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты корней, не более 0,8%; других частей растений (листьев, кусочков стеблей) не более 0,25%; плодов незрелых, твердых и пригоревших не более 1%; органических примесей не более 2%; минеральной примеси не более 0,3%.

### **Количественное определение.**

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, но не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл 60 % этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент 60 % этиловым спиртом, содержащим 1 % хлористоводородной кислоты. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (марки «Красная лента») (раствор А). Содержимое колбы тщательно перемешивают.

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 1% раствором хлористоводородной кислоты в 95% этиловом спирте (раствор Б). Оптическую плотность измеряют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 546 нм. В качестве раствора сравнения используют 95 % этиловый спирт.

Содержание суммы антоцианов в плодах черники обыкновенной в процентах (X) в пересчете на абсолютно-сухое сырье и цианидин-3-О-глюкозид вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 25 \times 50 \times 100}{m \times 1 \times 100 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

*A* – оптическая плотность испытуемого раствора,

*m* – масса сырья, г;

100 – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

**Примечание:** Приготовление 60 % этилового спирта, содержащего 1% хлористоводородной кислоты. К 126 мл 95 % этилового спирта добавляют 5,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной (Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издания), доводят водой до объема 200,0 мл.

**Микробиологическая чистота.** Категория 4А. Должно быть не более  $10^5$  аэробных бактерий, не более  $10^4$  дрожжевых и плесневых грибов (ГФ РФ XII, ОФС 42-0016-04).

**Упаковка.** В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 17768-90 в тканевые мешки по ГОСТ 30090-93 не более 40 кг нетто.

Транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

**Маркировка.** В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80 со следующим дополнением: указывают массу при влажности 17 %, номер серии, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, соответствие продукции требованиям ОФС 42-0011-03 по содержанию радионуклидов («Продукция прошла радиационный контроль»), «Годен до». Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-77.

**Транспортирование.** В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80 и ГФ СССР XI, вып. 1, с. 385.

**Хранение.** В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296.

**Срок годности.** 2 года.

**Фармакологическая группа.** Вяжущее средство.

Примечание. Реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих

разделах Государственной фармакопеи СССР XI издания, вып. 1, 2; XII Государственной фармакопеи РФ, часть 1.

Ректор ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет» Минздрава России,  
Академик РАМН, Лауреат  
Государственной премии РФ и  
дважды лауреат премии  
Правительства РФ  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор

Г.П. Котельников

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

Зав. кафедрой фармакогнозии  
с ботаникой и основами фитотерапии  
ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет» Минздрава России,  
профессор

В.А. Куркин

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

Аспирант кафедры  
фармакогнозии с ботаникой  
и основами фитотерапии  
ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет»  
Минздрава России

Т.К. Рязанова

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

## **СОГЛАСОВАНО**

Руководитель центра  
стандартизации лекарственных средств  
ФГУ «Научный центр экспертизы  
средств медицинского применения»

Е.Л. Ковалева

«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**  
**РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФГБУ «Научный центр экспертизы  
средств медицинского назначения»  
Руководитель Центра стандартизации  
лекарственных средств  
\_\_\_\_\_ Е.Л. КОВАЛЕВА  
от “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**  
**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

**Производитель:**

**Заявители:**

**Разработчик:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

---

Черники обыкновенной плоды свежие  
*Vaccinii myrtilli fructus recens*

ФС 42-.....

Срок введения установлен  
с “\_\_\_” \_\_\_\_\_ г.

до “\_\_\_” \_\_\_\_\_ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на зрелые свежие или свежемороженые плоды многолетнего кустарника черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus* L., семейство вересковые – *Ericaceae*.

## Спецификация лекарственного растительного сырья

### «Черники обыкновенной плоды свежие»

Производитель:

Показатель качества	Методы	Нормы
2	3	4
Внешние признаки	<p>Ц е л ь н о е с ы р ь е. Шарообразные черные ягоды с сизым налетом, реже приплюснутые или несколько удлинённые, 6-8 мм в диаметре, с блюдцевидным широким вдавлением на верхушке – диском, окаймленным остатком чашечки; мякоть темно-пурпуровая с красным соком. В мякоти плода – многочисленные (до 30 штук) семена яйцевидной формы. У основания иногда имеется короткая плодоножка. Цвет плодов с поверхности черный с красноватым оттенком; матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-бурый. Запах слабый. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий.</p>	<p>Просмотр невооружённым глазом и под лупой с увеличением (<math>\times 10</math>)</p>
Микроскопия	ГФ XI, вып. 1, с. 277	<p>Просмотр под микроскопом с увеличением (не менее <math>\times 40</math>)</p>
Качественные реакции	<p>4. ТСХ-анализ; 5. Качественные реакции; 6. Спектроскопия в УФ и видимой области спектра. <math>\lambda_{\max} = 281 \pm 2</math> нм, <math>546 \pm 2</math> нм (антоцианы);</p>	<p>1. ТСХ: наличие пятен розового цвета с величиной <math>R_f</math> 0,47 и 0,51 (гликозиды мальвидина), фиолетового цвета с <math>R_f</math> 0,36 (цианидин-3-глюкозид) и пятна синего цвета с <math>R_f</math> 0,20 и 0,33 (гликозиды дельфинидина). 2. Качественные реакции: Получают водное извлечение из сырья (1:10) настаиванием при 40-45°C в течение 30 мин. При прибавлении к водному извлечению нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется оливково-зеленое окрашивание (антоцианы). При прибавлении к извлечению нескольких капель раствора свинца</p>

		ацетата основного образуется аморфный осадок, частично растворимый в кислотах; при этом раствор приобретает розовую или красную окраску (антоцианы).  3. УФ-спектр раствора Б (см. раздел "Количественное определение") имеет максимумы поглощения $281 \pm 2$ нм, $546 \pm 2$ нм (антоцианы).
Количественное определение: Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид	УФ-спектроскопия	Не менее 3,5%
Влажность	ГФ XI, вып. 1, стр. 285	Не более 87%
Золы общей	ГФ XI, вып. 2, стр. 24	Не более 2,0 %
Золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты	ГФ XI, вып. 2, стр. 25	Не более 0,5%
Других частей растений (листьев, кусочков стеблей)	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 0,25%
Плодов незрелых, твердых и пригоревших	ГФ XI, вып. 1, стр. 276	Не более 1%
Органической примеси	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 2%
Минеральной примеси	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 0,3%
Микробиологическая чистота	В соответствии с ОФС 42-0016-04	Категория 4А
Срок годности		1 год

**Внешние признаки.** Цельное сырье. Шарообразные черные ягоды с сизым налетом, реже приплюснутые или несколько удлиненные, 6-8 мм в диаметре, с блюдцевидным широким вдавлением на верхушке – диском, окаймленным остатком чашечки; мякоть темно-пурпуровая с красным соком. В мякоти плода – многочисленные (до 30 штук) семена яйцевидной формы. У основания иногда имеется короткая плодоножка.

Цвет плодов с поверхности черный с красноватым оттенком; матовый или слегка блестящий; мякоти – красно-фиолетовый; семян – красно-бурый. Запах слабый. Вкус кисло-сладкий, слегка вяжущий.

**Микроскопия.**

Клетки эпидермиса плодов сгруппированы в комплексы, разграниченные между собой более толстыми клеточными стенками, чем в границах комплекса (так называемого окончатого типа), что является результатом деления уже развившихся клеток (рис. 1, 2). К моменту полной зрелости у крупных ягод различие между толщинами стенок у крупных и мелких плодов утрачивается.



Рисунок 1 – Эпидермис плодов черники  
(× 100)

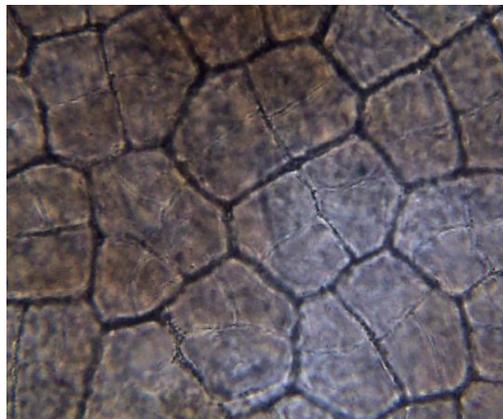
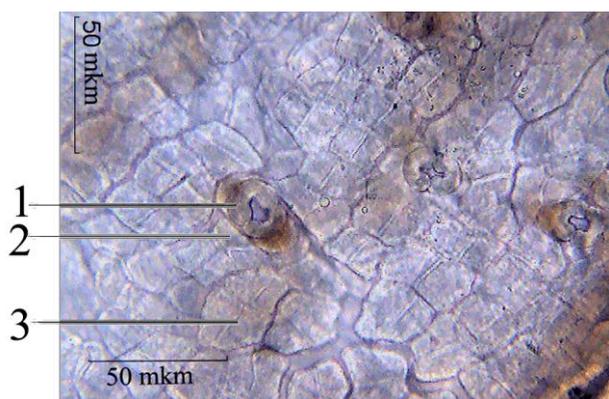
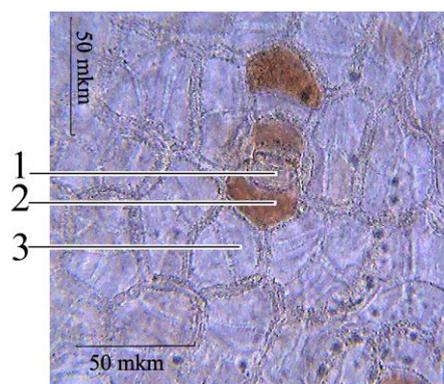


Рисунок 2 – Эпидермис плодов черники  
(× 400)

Устьица на зрелом плоде встречаются редко, обычно они деформированы (рис. 3Б). Эпидермис диска отличается от остальной поверхности плода более мелкими клетками и наличием хорошо сохранившихся устьиц (рис. 3А). Устьица, как правило, окружены 4-5 околоустьичными клетками (анамоцитного типа).



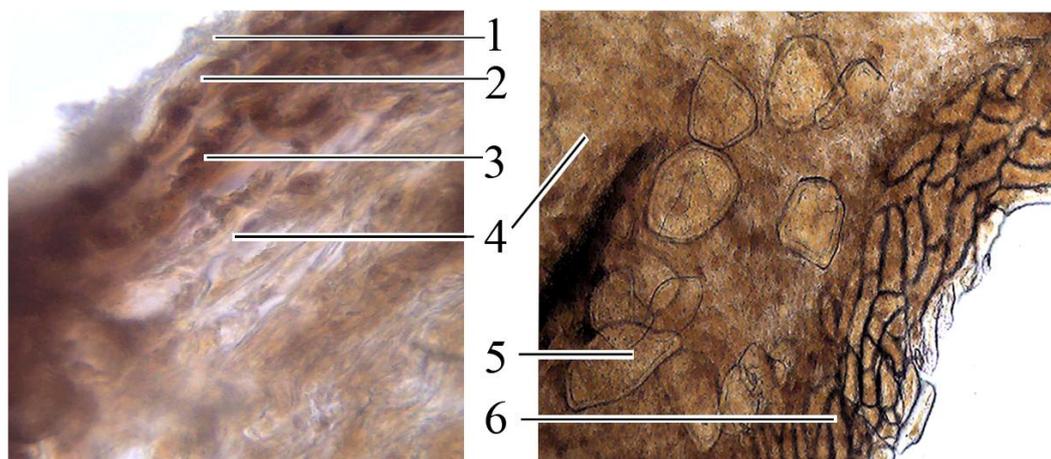
**А**



**Б**

Рисунок 3 – Эпидермис плода черники. Устьица (× 400) А – эпидермис диска Б – эпидермис основной части плода. 1 – устьица, 2 – околоустьичные клетки, 3 - клетки эпидермиса

Эпидермальные клетки и подстилающие их 2-3 ряда клеток вытянуты в тангентальном направлении. Наружная стенка эпидермальных клеток утолщена сильнее остальных. Кутикула тонкая, покрыта восковым слоем. Субэпидермальные 2-3 ряда клеток имеют слабоколленхиматозный характер. Вместе с эпидермисом они образуют экзокарп. Вглубь плода оболочки клеток становятся более тонкими (рис. 4).



А

Б

Рисунок 4 – Эпидермальные клетки, мезокарп и эндокарп плода ( $\times 400$ ) после осветления. А – эпидермис и мезокарп; Б – эндокарп.

1 – кутикула, 2 – эпидермальные клетки; 3 – тангентально вытянутые клетки, 4 – клетки мезокарпа, 5 – тонкостенные каменистые клетки, 6 – клетки эндокарпа

Мезокарпий представлен рыхлой паренхимой, клетки которой окрашены антоцианами. Среди паренхимных клеток мезокарпа попадаются одиночные тонкостенные, округлые каменистые клетки. Иногда встречаются склереиды с живым содержимым (рис. 5, 6). Проводящие пучки очень тонкие, в основном представлены спиральными сосудами (рис. 8). Местами встречаются друзы, которые преимущественно локализируются в эндокарпе (рис. 6).

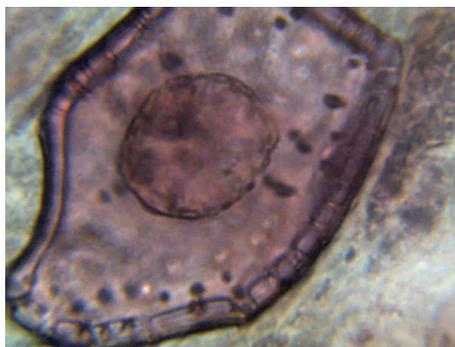


Рисунок 5 – Склереида, сохранившая протопласт ( $\times 1000$ )



Рисунок 6 – Склереиды мякоти плодов ( $\times 400$ )

Эндокарп (внутренний эпидермис) состоит из большого числа толстостенных, полигональных, пористых клеток (рис. 7). В процессе увеличения размеров плода он разрывается, поэтому у зрелых плодов представлен отдельными участками, состоящими из 2-3 и большего количества клеток.

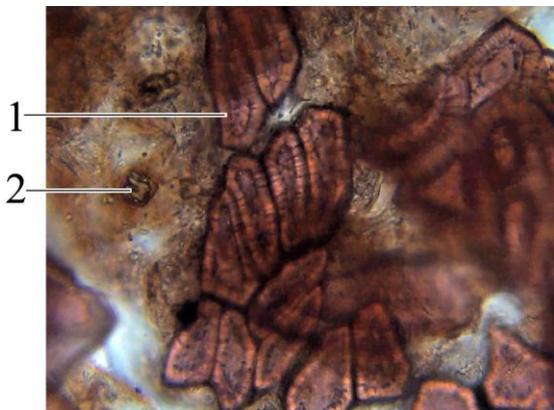


Рисунок 7 – Участок эндокарпа (× 400). 1 – толстостенные клетки; 2 - дразы



Рисунок 8 – Мезокарпий плода черники. Сосудистые пучки (× 400)

При добавлении разбавленного раствора щелочи (0,5-1%) к микропрепаратам эпидермиса, мякоти плодов, не подвергавшихся обработке (кипячение в растворе щелочи по фармакопейной методике), происходит изменение окраски в синий цвет, что характерно для антоцианов.

Семена многочисленные (до 30 штук), до 1,5 длиной, 0,5-0,8 мм шириной, 0,4-0,6 мм толщиной, бурые неясно-крупносетчатые, сжатые с боков и выпуклые по спинке (рис. 9А, Б).



**А**



**Б**

Рисунок 9 – Семена черники обыкновенной.

А – увеличение × 40; Б – продольный разрез (× 40)

Структурными компонентами семян являются семенная кожура, эндосперм, зародыш. Строение семенной кожуры имеет характерные особенности. Из тканей семенной кожуры хорошо выражен только эпидермис, а остальные клетки совершенно спадаются. Эпидермальные клетки вытянуты вдоль семени, внутренняя и боковая стенки склерифицированы, пронизаны порами. Ослизняется только наружная стенка эпидермальных

клеток (рис. 10). Эндосперм мощный, зародыш небольшой (рис. 11). Клетки зародыша и эндосперма содержат алейроновые зерна и жирное масло.

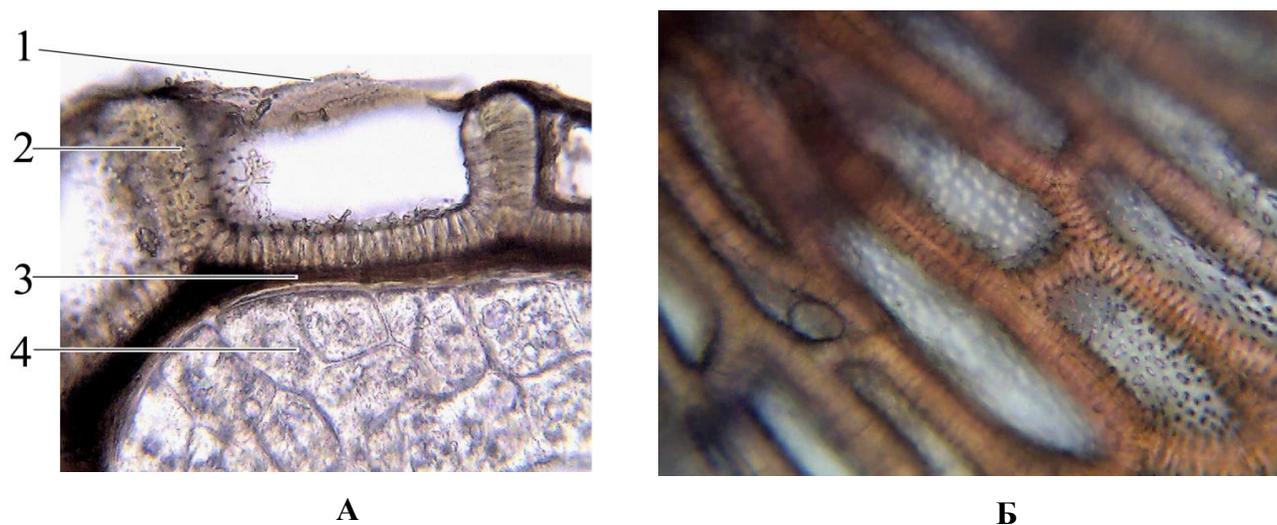


Рисунок 10 – Семя черники.

А - продольный срез. Б – эпидермис с поверхности. (× 400).

1 – ослизняющиеся стенки эпидермальных клеток семени; 2 – эпидермис семени;  
3 – спавшаяся паренхимы семенной кожуры; 4 – эндосперм с маслом и алейроновыми  
зернами

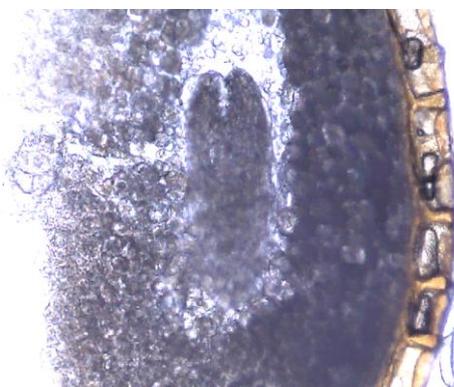


Рисунок 11 – Семя черники.

Зародыш. Продольный разрез (× 100)

### Качественные реакции.

1. ТСХ-анализ. 2,0 г свежих или свежемороженых (после предварительной разморозки) плодов черники помещают в коническую колбу со шлифом, добавляют 10 мл 95 % этилового спирта, содержащего 1% хлороводородной кислоты, закрывают пробкой и перемешивают 20 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса». На линию старта пластинки «Сорбфил–ПТСХ-АФ-А-УФ», проведенную на расстоянии 1,5-2 см от нижнего края хроматографической пластинки, микропипеткой наносят 0,02 мл извлечения в виде пятна диаметром около 5 мм. Пластинку с нанесенными пробами

высушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру, которую предварительно насыщают смесью растворителей н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) в течение суток, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 9 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10-15 минут и просматривают в видимом свете. На хроматограмме обнаруживаются розовые пятна с величиной  $R_f$  0,47 и 0,51 (гликозиды мальвидина), фиолетового цвета с  $R_f$  0,36 (цианидин-3-глюкозид) и пятна синего цвета с  $R_f$  0,20 и 0,33 (гликозиды дельфинидина).

**Примечания:** 1. Подготовка пластинок. Пластины “Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ” (ТУ 26-11-17-89) разрезают поперек линий накатки соответственно на 2 части 10 × 5 см и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 110 °С в течение 1 ч.

2. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: на хроматограмме извлечения из плодов черники  $R_f$  основных пятен (антоцианы) раствора должно быть от 0,20 до 0,60.

#### 2. Качественные реакции.

Получают водное извлечение из сырья (1:10) настаиванием при 40-45°С в течение 30 мин. При прибавлении к водному извлечению нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется оливково-зеленое окрашивание (антоцианы).

При прибавлении к водному извлечению нескольких капель раствора свинца ацетата основного образуется аморфный осадок, частично растворимый в кислотах; при этом раствор приобретает розовую или красную окраску (антоцианы).

#### 3. Спектроскопия в УФ и видимой области спектра.

Электронный спектр раствора Б (см. методику количественного определения) в области от 190 до 700 нм имеет характерные максимумы поглощения при  $281 \pm 2$  нм и  $546 \pm 2$  нм.

**Числовые показатели.** Сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид не менее 3,5%, влажность не более 87%; золы общей не более 2,0%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты корней, не более 0,5%; других частей растений (листьев, кусочков стеблей) не более 0,25%; плодов незрелых не более 1%; органических примесей не более 2%; минеральной примеси не более 0,3%.

#### **Количественное определение.**

Около 1 г (точная навеска) свежих или свежемороженых (после предварительной разморозки) плодов черники помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл 95 % этилового спирта, содержащего 1% хлороводородной кислоты. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут, закрывают той

же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент 95 % этиловым спиртом, содержащим 1% хлороводородной кислоты. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (марки «Красная лента») (раствор А). Содержимое колбы тщательно перемешивают.

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 1 % раствором хлороводородной кислоты в 95 % этиловом спирте (раствор Б). Оптическую плотность измеряют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 546 нм. В качестве раствора сравнения используют 95 % этиловый спирт.

Содержание суммы антоцианов в плодах черники свежих в процентах (X) в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A * 25 * 50}{m * 1 * 100}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора,

m – масса сырья, г.

100 – удельный показатель поглощения цианидин-3-глюкозида.

**Примечание:** Приготовление 95 % этилового спирта, содержащего 1% хлороводородной кислоты. 5,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной (Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издания) доводят 95 % этиловым спиртом до объема 200,0 мл.

**Микробиологическая чистота.** Категория 4А. Должно быть не более  $10^5$  аэробных бактерий, не более  $10^4$  дрожжевых и плесневых грибов (ГФ РФ XII, ОФС 42-0016-04).

**Упаковка.** В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 17768-90 в тканевые мешки по ГОСТ 30090-93 не более 20 кг нетто.

Транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

**Маркировка.** В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80 со следующим дополнением: указывают массу при влажности 17 %, номер серии, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, соответствие продукции требованиям ОФС 42-0011-03 по содержанию радионуклидов («Продукция прошла радиационный контроль»), «Годеи до». Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-77.

**Транспортирование.** В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80 и ГФ СССР XI, вып. 1, с. 385.

**Хранение.** В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296.

**Срок годности.** 1 год.

**Фармакологическая группа.** Средство, улучшающее функциональное состояние сетчатки, для системного применения в офтальмологии. Сырье для получения моно- и комплексных препаратов черники.

Примечание. Реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи СССР XI издания, вып. 1, 2; XII Государственной фармакопеи РФ, часть 1.

Ректор ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет» Минздрава России,  
Академик РАМН, Лауреат  
Государственной премии РФ и  
дважды лауреат премии  
Правительства РФ  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор

Г.П. Котельников

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.

Зав. кафедрой фармакогнозии  
с ботаникой и основами фитотерапии  
ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет» Минздрава России,  
профессор

В.А. Куркин

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.

Аспирант кафедры  
фармакогнозии с ботаникой  
и основами фитотерапии ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет»  
Минздрава России

Т.К. Рязанова

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.

## **СОГЛАСОВАНО**

Руководитель центра  
стандартизации лекарственных средств  
ФГУ «Научный центр экспертизы  
средств медицинского применения»

Е.Л. Ковалева

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**  
**РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФГБУ «Научный центр экспертизы  
средств медицинского назначения»  
Руководитель Центра стандартизации  
лекарственных средств  
Е.Л. КОВАЛЕВА  
от “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**  
**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

**Производитель:**

**Заявители:**

**Разработчик:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

---

Черники обыкновенной побegi  
*Vaccinii myrtilli fructus recens*

ФС 42-.....  
Взамен ВФС 42-1609-86

---

Срок введения установлен  
с “\_\_\_” \_\_\_\_\_ г.

до “\_\_\_” \_\_\_\_\_ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на высушенные верхушки побегов дикорастущего многолетнего кустарника черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus* L., семейство вересковые – *Ericaceae*.

---

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

**Спецификация лекарственного растительного сырья  
«Черники обыкновенной побegi»**

Производитель:

Показатель качества	Методы	Нормы
2	3	4
Внешние признаки	<p>Ц е л ь н о е с ы р ь е. Смесь цельных или изломанных верхушек побегов, отдельных стеблей, листьев, реже бутонов, цветков и плодов. Стебли длиной до 150 мм. Вкус сырья горьковато-вяжущий.</p> <p>И з м е л ь ч е н н о е с ы р ь е. Кусочки листьев, стеблей, изредка бутонов, цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет светло-зеленый, зеленый или коричневатозеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий. При рассмотрении под лупой видны голые, слегка блестящие, светло-зеленые, зеленые или коричневатозеленые кусочки листьев и остро-ребристые, зеленые или коричневатозеленые кусочки стеблей.</p>	<p>Просмотр невооружённым глазом и под лупой с увеличением (×10) или с помощью стереомикроскопа (×15) (ГФ СССР XI, вып. 1, с.252).</p>
Микроскопия	ГФ XI, вып. 1, с. 277	Просмотр под микроскопом с увеличением (не менее ×40)
Качественные реакции	<p>7. ТСХ-анализ; 8. УФ-спектроскопия <math>\lambda_{\max} = 292 \pm 2</math> нм и <math>331 \pm 2</math> нм</p>	<p>1. ТСХ: наличие пятна с <math>R_f</math> относительно пятна ГСО рутина 2,2-2,4 (доминирующий флавоноид - кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид); допускается наличие других пятен.</p> <p>2. УФ-спектр раствора Б (см. раздел "Количественное определение") имеет максимумы поглощения <math>292 \pm 2</math> нм и <math>331 \pm 2</math> нм.</p>

Количественное определение: 1. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин 2. Содержание дубильных веществ	УФ-спектроскопия	Не менее 0,6%
	Перманганометрия	Не менее 3,5%
Влажность	ГФ XI, вып. 1, стр. 285	Не более 13%
Золы общей	ГФ XI, вып. 2, стр. 24	Не более 4,0 %
Золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты	ГФ XI, вып. 2, стр. 25	Не более 0,6%
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 10%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 10%
Минеральной примеси	ГФ XI, вып. 1, стр. 275	Не более 0,5%
Микробиологическая чистота	В соответствии с ОФС 42-0016-04	Категория 4А
Срок годности		3 года

**Внешние признаки.** Цельное сырье. Смесь цельных или изломанных верхушек побегов, отдельных стеблей, листьев, реже бутонов, цветков и плодов. Стебли длиной до 150 мм. Вкус сырье горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье. Кусочки листьев, стеблей, изредка бутонов, цветков и плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет светло-зеленый, зеленый или коричневатозеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий. При рассмотрении под лупой видны голые, слегка блестящие, светло-зеленые, зеленые или коричневатозеленые кусочки листьев и остро-ребристые, зеленые или коричневатозеленые кусочки стеблей.

#### **Микроскопия.**

#### **Качественные реакции.**

1. ТСХ-анализ. На линию старта пластинки “Силуфол УФ-254”, “Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ” или “Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ” микропипеткой наносят 0,01 мл испытуемого раствора А (см. раздел «Количественное определение») и параллельно 0,002 мл раствора раствора А рутин (см. раздел «Количественное определение»).

Затем хроматографическую пластинку помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 1 ч, со смесью растворителей: этилацетат - безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 13 см (силуфол) или 8 см (сорбфил), пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе при комнатной температуре до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и 366 нм. Затем хроматограмму обрабатывают раствором диазобензолсульфокислоты, высушивают при 100-105°C в течение 5 мин. Подлинность побегов черники подтверждается наличием на пластинке пятен с  $R_s$  относительно пятна ГСО рутин 2,2-2,4 (доминирующий флавоноид - кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид), допускается наличие других пятен.

**Примечания:** 1. Подготовка пластинок. Пластины “Силуфол УФ 254” 15 x 15 см, Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ” или “Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ” (ТУ 26-11-17-89) перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 ч. Пятна исследуемых растворов наносят на линию старта, проведенную вдоль линий накатки.

2. Приготовление раствора ГСО рутин. См. раздел «Количественное определение».

3. Приготовление раствора диазобензолсульфокислоты. 0,01 г диазобензолсульфокислоты (ГФ Х, стр. 876) растворяют в 10 мл 10 % раствора натрия карбоната. Раствор используют свежеприготовленным.

## 2. Спектроскопия в УФ и видимой области спектра.

УФ-спектр раствора Б (см. методику количественного определения) в области от 190 до 500 нм имеет характерные максимумы поглощения при 292±2 нм и 331±2 нм. Раствором сравнения является спирт этиловый 96 %.

**Числовые показатели.** Ц е л ь н о е с ы р ь е. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье не менее 0,6 %; дубильных веществ не менее 3,5%; влажность не более 13 %, золы общей не более 4%; золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 0,6 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

И з м е л ь ч е н н о е с ы р ь е. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье не менее 0,6 %; дубильных веществ не менее 3,5%; влажность не более 13 %, золы общей не более 4 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 0,6%; стеблей (в том числе отделенных при анализе) не более 50 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2

мм, не более 10 % ; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 10 %; минеральной примеси не более 0,5%.

**Количественное определение.**

**Определение содержания флавоноидов.** Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$  г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр и охлаждают до комнатной температуры. Содержимое колбы перемешивают.

2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный при тех же условиях, но без добавления алюминия хлорида (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при аналитической длине волны 420 нм через 30 мин после приготовления всех растворов.

Параллельно измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б рутина. Раствором сравнения служит раствор Б рутина, приготовленный аналогично испытуемому, но без добавления алюминия хлорида (См. «Примечание»).

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

$$X = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times 50 \times 25 \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m<sub>0</sub> – масса ГСО рутин, в граммах; m – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

**Примечание:** Приготовление раствора ГСО рутин: Около 0,025 г (точная навеска) рутин (ФС 42-2508-87) помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят 70% этиловым

спиртом до метки (**раствор А рутина**). 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят 95% спиртом до метки (**испытуемый раствор Б рутина**). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А рутина, помещенного в мерную колбу на 25 мл и доведенный 95 % спиртом до метки (**раствор Б рутина**). Срок хранения раствора А рутина – 1 месяц.

**Определение содержания дубильных веществ.** Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и процеживают около 100 мл в коническую колбу вместимостью 200-250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Затем отбирают пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую коническую колбу вместимостью 750 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0,02 моль/л) до золотисто – желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание дубильных веществ (X) в процентах в пересчете на абсолютное сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \times 0,004157 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

V - объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, в миллилитрах;

V<sub>1</sub> - объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;

0,004157 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) (в пересчете на танин), в граммах;

m - масса сырья в граммах;

W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах; 250 - общий объем извлечения в миллилитрах;

25 - объем извлечения, взятого для титрования, в миллилитрах.

**Микробиологическая чистота.** Категория 4А. Должно быть не более  $10^5$  аэробных бактерий, не более  $10^4$  дрожжевых и плесневых грибов (ГФ РФ XII, ОФС 42-0016-04).

**Упаковка.** В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 17768-90 в тканевые мешки по ГОСТ 30090-93 не более 40 кг нетто.

Транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

**Маркировка.** В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80 со следующим дополнением: указывают массу при влажности 17 %, номер серии, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, соответствие продукции требованиям ОФС 42-0011-03 по содержанию радионуклидов («Продукция прошла радиационный контроль»), «Годен до». Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-77.

**Транспортирование.** В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80 и ГФ СССР XI, вып. 1, с. 385.

**Хранение.** В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296.

**Срок годности.** 1 год.

**Фармакологическая группа.** Гипогликемическое средство. Компонент для получения противодиабетического сбора «Арфазетин».

Примечание. Реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи СССР XI издания, вып. 1, 2; XII Государственной фармакопеи РФ, часть 1.

Ректор ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет» Минздрава России,  
Академик РАМН, Лауреат  
Государственной премии РФ и  
дважды лауреат премии  
Правительства РФ  
заслуженный деятель науки РФ,  
профессор

Г.П. Котельников  
« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.

Зав. кафедрой фармакогнозии  
с ботаникой и основами фитотерапии  
ГБОУ ВПО «Самарский государственный

медицинский университет» Минздрава России,  
профессор

В.А. Куркин  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

Аспирант кафедры  
фармакогнозии с ботаникой  
и основами фитотерапии  
ГБОУ ВПО «Самарский государственный  
медицинский университет»  
Минздрава России

Т.К. Рязанова  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

### **СОГЛАСОВАНО**

Руководитель центра  
стандартизации лекарственных средств  
ФГУ «Научный центр экспертизы  
средств медицинского применения»

Е.Л. Ковалева  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

**РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ**



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2484671**

**СИРОП ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

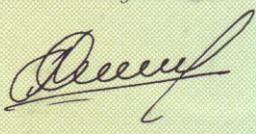
Заявка № **2011146295**

Приоритет изобретения **15 ноября 2011 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **20 июня 2013 г.**

Срок действия патента истекает **15 ноября 2031 г.**

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

  
Б.П. Симонов



