

На правах рукописи

ГУЛЯЕВ ДМИТРИЙ КОНСТАНТИНОВИЧ

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЛИ
ОБЫКНОВЕННОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В ПЕРМСКОМ КРАЕ**

14.04.02. – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата фармацевтических наук

Самара – 2016

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор - **Белоногова Валентина Дмитриевна**

Официальные оппоненты:

Пупыкина Кира Александровна – доктор фармацевтических наук, профессор; государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, профессор кафедры;

Ханина Миниса Абдуллаевна - доктор фармацевтических наук, профессор; государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Министерства образования Московской области, кафедра химии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Рязань

Защита состоится «__» октября 2016 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ель обыкновенная – *Picea abies* (L. Karst.) является широко-распространённым древесным растением на территории Пермского края и других регионов Российской Федерации. Древесная зелень и шишки ели обыкновенной являются отходами лесозаготовок. С одного кубометра древесины получается около 250 килограмм отходов древесной зелени. Отходы древесной зелени на сегодняшний день используются ограничено и далеко не во всех местах лесозаготовок. Богатый химический состав данного сырья является основой для поиска перспективных фармакологически активных веществ и расширения ассортимента препаратов на основе биологически активных веществ (БАВ) сырья ели обыкновенной.

Фармакопейным сырьём ели обыкновенной являются шишки – *Piceae abietis strobili* (Государственный реестр лекарственных средств, ФС № 81 ГФ XI). Существующий нормативный документ на сырьё не соответствует современным требованиям, регламентирующим качество сырья. В действующей фармакопейной статье отсутствует ряд показателей, регламентирующих подлинность сырья: УФ-спектральная характеристика, качественные реакции, хроматография. Оценка качества сырья дана лишь по содержанию эфирного масла, без учёта путей использования сырья. Целесообразно дополнить оценку качества сырья ели обыкновенной шишек не только по содержанию эфирного масла, но и по содержанию экстрактивных и дубильных веществ, так как данное сырьё перспективно для создания новых современных препаратов, а также для использования в экстемпоральной рецептуре. В связи с этим действующая статья № 81 Государственной Фармакопеи XI издания, выпуск 2 «Шишки ели обыкновенной» нуждается в существенной доработке.

Отходы лесозаготовок (древесная зелень, шишки), оставленные на вырубках, приводят к снижению эффективности использования лесных ресурсов, загрязнению окружающей среды, что вызывает необходимость проведения исследований по экологической безопасности данного сырья.

Научно обоснованное использование древесных отходов может приносить прибыль для предпринимателей и пользу отечественной фармацевтической промышленности.

Учитывая всё вышеперечисленное, актуальным является фармакогностическое исследование шишек и древесной зелени ели обыкновенной.

Степень разработанности темы. В настоящее время представители семейства сосновых привлекают всё больший интерес исследователей. При этом фитохимическому исследованию ели обыкновенной посвящено меньшее количество работ, по сравнению с исследованиями пихты сибирской, сосны лесной и лиственницы сибирской. Исследования отечественных и зарубежных авторов в основном направлены на изучение фенольных соединений хвои ели обыкновенной. В литературе имеются разноречивые данные о компонентном составе эфирного масла, элементов, пигментов хвои ели. При этом состав БАВ ели обыкновенной шишек остаётся малоизученным. Также в литературе недостаточно данных о биологической активности разных групп БАВ ели обыкновенной.

Существующие нормативные документы на ели обыкновенной шишки предполагают проводить оценку качества сырья только по содержанию эфирного масла, без учёта путей использования сырья. Кроме того, анатомические диагностические признаки данного вида сырья рассмотрены не в полной мере.

В связи с этим представляется актуальным фармакогностическое исследование и стандартизация сырья ели обыкновенной.

Цель работы. Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование древесной зелени, ели обыкновенной шишек и стандартизация ели обыкновенной шишек.

Задачи

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести фитохимическое исследование древесной зелени и ели обыкновенной шишек.
2. Изучить сезонную динамику содержания эфирного масла, полисахаридов, элементов, пигментов, аскорбиновой кислоты в древесной зелени ели обыкновенной.
3. Провести анатомическое исследование ели обыкновенной шишек и древесной зелени и установить диагностические признаки.
4. Провести сравнительное микроскопическое исследование ели обыкновенной с близкими видами рода *Picea*.
5. Определить показатели качества ели обыкновенной шишек.
6. Провести стандартизацию и разработать нормативную документацию на ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*, для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIII издания.
7. Провести исследование по установлению биологической активности полисахаридных фракций и эфирного масла древесной зелени и ели обыкновенной шишек.

Научная новизна.

С помощью газожидкостной хроматографии с масс-селективной детекцией исследован состав эфирного масла древесной зелени и ели обыкновенной шишек. Исследована сезонная динамика компонентного состава эфирного масла древесной зелени, которая показала, что компонентный состав эфирного масла остаётся постоянным на протяжении всего вегетационного периода, меняется лишь количественное соотношение компонентов.

Кроме того, впервые в Российской Федерации в эфирном масле древесной зелени ели обыкновенной установлены такие компоненты, как неролидол, туйопсен, сейхеллен, тунбергол.

Установлены диагностические анатомические признаки хвои и ели обыкновенной шишек. Для идентификации хвои и ели обыкновенной шишек и

отличия от близких видов рода *Picea*, произрастающих на территории Пермского края (ель сибирская, пихта сибирская), проведено их сравнительное анатомическое исследование, которое позволило выявить отличительные особенности, позволяющие отделять целевое сырье от примесных растений.

Проведено исследование острой токсичности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек, по результатам которого данные вещества были отнесены к классу 4 малотоксичных, классу 3 умеренно токсичных веществ согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Изучена антибактериальная активность эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной и его отдельных фракций по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Установлено, что фракция № 1 эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной, представленная преимущественно монотерпенами, превосходит по силе антибактериальной и противогрибковой активности цельное эфирное масло.

Определена противовоспалительная активность полисахаридных фракций древесной зелени и ели обыкновенной шишек, в результате выявлена противовоспалительная активность, сопоставимая по силе с препаратом сравнения – нимесулидом.

Результаты морфолого-анатомических и фитохимических исследований использованы для разработки методик диагностики и определения качества сырья ели обыкновенной шишек. На основе результатов исследования разработан проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*», который принят к рассмотрению в федеральное государственное бюджетное учреждение (ФГБУ) «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», после рецензирования, для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания.

Теоретическая и практическая значимость работы. С учётом современных требований, предъявляемых к подлинности и качеству лекарственного растительного сырья, проведена стандартизация сырья и разработан проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae*

abietis strobili», для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания.

Материалы диссертации апробированы при производстве эфирного масла на предприятии ООО НПК «Апифитогруп». Используются в учебном процессе на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Результаты, полученные в ходе диссертационной работы, использованы при чтении лекций для студентов по теме «Фитотерапия при заболеваниях верхних дыхательных путей».

Практическая значимость диссертационных исследований подтверждается также заявкой на патент Российской Федерации «Средство на основе полисахаридов ели обыкновенной шишек, обладающее противовоспалительной активностью».

Углублённое фармакогностическое исследование химического состава, анатомического строения, фармакологической активности позволило расширить информационную базу о ели обыкновенной шишках и древесной зелени.

Методология и методы диссертационного исследования. Методология диссертационного исследования основана на изучении отечественных и зарубежных источников литературы по фармакогностическому исследованию ели обыкновенной, на оценке степени изученности и актуальности темы. Согласно поставленной цели и задачам, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами исследования служили образцы ели обыкновенной шишек и древесной зелени, собранные на территории Пермского края в разных условиях произрастания и разные сезоны года. Фармакогностические исследования включали целый комплекс мероприятий: физико-химические методы (газожидкостная хроматография с масс селективным детектором, спектрофотометрия, рентгенофлуоресцентный анализ, тонкослойная и

бумажная хроматография), макро- и микроскопические методы, а так же фармакологические методы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты морфолого-анатомического исследования ели обыкновенной древесной зелени и шишек.
2. Результаты фитохимического исследования ели обыкновенной древесной зелени и шишек.
3. Исследования сезонной динамики содержания эфирного масла, полисахаридов, микроэлементов, пигментов, аскорбиновой кислоты в древесной зелени и ели обыкновенной шишках.
4. Результаты исследований по стандартизации ели обыкновенной шишек.
5. Исследования фармакологической активности полисахаридных фракций и эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной.

Степень достоверности. Достоверность диссертационных исследований подтверждена большим объёмом экспериментальных исследований, проведённых с помощью современных физико-химических и химических методов: хроматомасс спектрометрии, спектрофотометрии, рентгенофлуоресцентного метода, ТСХ и БХ хроматографии; а также морфолого-анатомических и фармакологических методов исследования. Проведена статистическая обработка результатов исследования по требованиям ГФ XII и с использованием программы «Microsoft Excel 2013».

Апробация результатов. Материалы работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции с международным участием «Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом» (г. Пермь, 2013); научно-практической конференции с международным участием, посвященный тридцатилетию ЯГМА, «Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике» (г. Ярославль, 2014); на XIV Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (г. Москва, 2015); научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука и практика: достижения, инновации, перспективы» (г.

Пермь, 2015); финальном туре XII Студенческого регионального конкурса научных проектов по программе «У.М.Н.И.К» (г. Пермь, 2015).

Диссертационная работа поддержана грантом Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «У.М.Н.И.К» - 2015 г.

Внедрение результатов исследования. Данные диссертационных исследований используются в учебном процессе на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Кроме того, материалы диссертации апробированы при производстве эфирного масла на предприятии ООО НПК «Апифитогруп».

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты, приведённые в диссертационной работе, получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению морфолого-анатомических признаков древесной зелени и шишек ели обыкновенной и близких видов рода *Picea*, выявлены диагностические отличительные признаки. Изучен компонентный состав и сезонная динамика накопления эфирного масла, полисахаридов, пигментов, микроэлементов древесной зелени и ели обыкновенной шишек. Проведена стандартизация, разработаны показатели качества, составлен проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*»; проведено исследование антибактериальной, противовоспалительной и сорбционной активности полисахаридных фракций и эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной, оформлены статьи по материалам исследований, автореферат и диссертация.

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ государственной регистрации 01.9.100.18875).

Соответствие паспорту специальности. Основные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных статей, из них 7 статей в изданиях из перечня, рекомендованного ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 195 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 42 рисунками. Список литературы включает 144 источника, из них 43 на иностранных языках.

Во введении сформулированы актуальность исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость работы, положения, выдвигаемые на защиту.

Глава 1 посвящена обзору отечественной и зарубежной литературы по исследованию сырья ели обыкновенной. Изложены данные по ботанической характеристике, ареалу обитания, химическому составу, применению ели обыкновенной в научной и народной медицине.

В главе 2 описаны материалы и методы исследования БАВ *Picea abies*.

В главе 3 приводятся результаты исследования химического состава древесной зелени и ели обыкновенной шишек.

В главе 4 представлены результаты анатомического исследования ели обыкновенной шишек и хвои, а так же сравнение с близкими видами, встречающимися на территории Пермского края *Picea obovata* и *Abies sibirica*.

Глава 5 посвящена исследованию биологической активности эфирного масла и полисахаридных фракций древесной зелени и ели обыкновенной шишек.

В главе 6 представлены результаты исследований по стандартизации ели обыкновенной шишек.

В приложении представлены УФ-спектры пигментов, хроматограммы компонентного состава эфирного масла, проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки, заявка на патент.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись древесная зелень и ели обыкновенной шишки. Образцы сырья были собраны на территории Пермского края в период с 2011 по 2015 гг.

Эфирное масло получали по методу 1 ГФ XI издания. Полученное эфирное масло из приёмника собирали одноразовым шприцем и запаивали в ампулы.

Для получения отдельных фракций эфирное масло собирали из приёмника через 30, 60 и 120 минут (фракции 1,2,3 соответственно), с помощью одноразового шприца и запаивали в ампулы.

Хромато-масс-спектрометрический анализ эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C.

Полисахаридные фракции из древесной зелени и шишек ели обыкновенной выделяли по методу Н.К. Кочеткова, адаптированного нами для объекта исследования. В результате получали две последовательно выделяемые

фракции: водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПК) и пектиновые вещества (ПВ).

Моносахаридный состав гидролизатов полученных фракций, определяли с помощью восходящей хроматографии на бумаге.

Содержание элементов в образцах сырья ели обыкновенной определяли в зольном остатке на энергодисперсионном спектрометре Quantix.

Определение количественного содержания пигментов хвои ели обыкновенной проводили спектрофотометрически, содержание аскорбиновой кислоты определяли титриметрически по методике ГФ XI издания.

Анатомические признаки хвои и ели обыкновенной шишек (не было пробела между словами) исследовали на микроскопе марки Биомед 6 (Россия) при увеличении 10x4, 10x10, 10x40, измерения проводились с помощью окуляр-микрометра. Микрофотографии сделаны с помощью фото насадки DCN 510.

Исследование острой токсичности полисахаридных фракций (ВРПК и ПВ) древесной зелени и шишек ели обыкновенной проводили с помощью экспресс метода определения средней летальной дозы Прозоровского.

Определение противовоспалительной активности проводили на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1% водного раствора каррагинена. Контролем служили животные, не получавшие препарата. В качестве препарата сравнения использовали нимесулид.

Антибактериальную и противогрибковую активность эфирного масла определяли диско-диффузионным методом в агаре на твердых питательных средах. В качестве тест-культур использовали суточные бульонные культуры микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, и 48-часовую бульонную культуру *Candida albicans*.

Сорбционную активность оценивали по способности полисахаридов поглощать метиленовый синий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование эфирного масла

Исследования показали химическую неоднородность компонентного состава образцов эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной. Компоненты (α -пинен, борнилацетат, борнеол и др.) являются основными и присутствуют в каждом образце.

Компонентный состав эфирного масла древесной зелени меняется по мере увеличения времени перегонки. Первые фракции эфирного масла насыщаются легколетучими компонентами, в последующих фракциях увеличивается доля тяжелолетучих компонентов.

В результате исследования влияния сезонов года и условий произрастания на состав эфирного масла установлено, что в составе эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной доминируют монотерпены. Их процентное соотношение составляет более 70% от общей массы веществ. Наблюдается высокое содержание борнилацетата, лимонена, α -пинена, борнеола, камфоры, Δ^3 -карена.

Во всех образцах вне зависимости от условий произрастания и сезона года, присутствуют все основные компоненты. Основу эфирного масла составляют 8-10 компонентов с содержанием каждого более 2% от цельного масла. Остальные компоненты содержатся в гораздо меньшем количестве, или могут отсутствовать.

Основные сезонные изменения в компонентном составе эфирного масла происходят в основном в монотерпеновой фракции. Монотерпены содержатся в гораздо большем количестве, и на протяжении всего года компонентный состав их варьирует.

Неролидол, тунбергол, сейхеллен и туйопсен впервые обнаружены нами в эфирном масле древесной зелени ели обыкновенной.

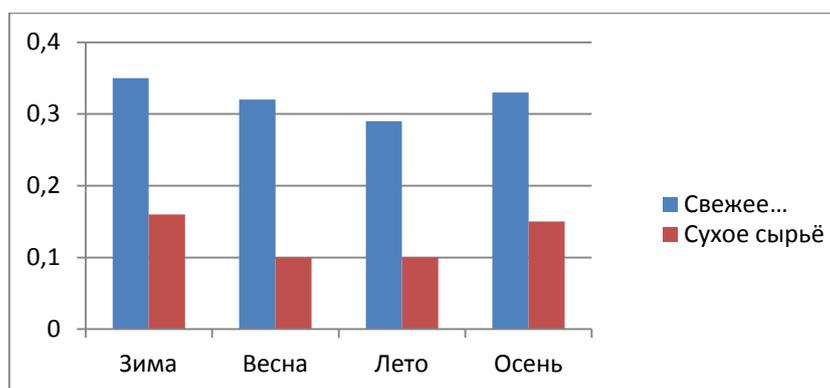


Рисунок 1. Сезонная изменчивость содержания эфирного масла ели обыкновенной

Содержание эфирного масла подвержено сезонным изменениям (Рисунок 1). Самое высокое содержание эфирного масла отмечается в осенние и зимние месяцы. Летом наблюдается резкий спад содержания эфирного масла, что возможно связано с усилением испарения под воздействием высоких температур.

Исследование полисахаридов

Наличие полисахаридов в образцах древесной зелени и шишек ели обыкновенной доказали с помощью качественных реакций (осаждение спиртом 96%, с 0,2% раствором антраона в серной кислоте концентрированной, с 5% раствором тимола и концентрированной серной кислотой).

Таблица 1 - Выход полисахаридных фракций из сырья ели обыкновенной

Сырьё	Выход фракции, % к сырью	
	ВРПК	ПВ
Древесная зелень	1,66±0,67	0,92±0,29
Хвоя	1,49±0,24	0,76±0,05
Ветви	0,97±0,12	1,2±0,2
Шишки	2,5±0,54	0,63±0,22

Наибольший выход водорастворимого полисахаридного комплекса характерен для ели обыкновенной шишек (Таблица 1). Петиновых веществ извлекается больше из ветвей.

Согласно данным хроматографического анализа в каждой полученной фракции присутствует арабиноза и галактоза. Глюкозы и рамнозы в исследуемых образцах найдено не было.

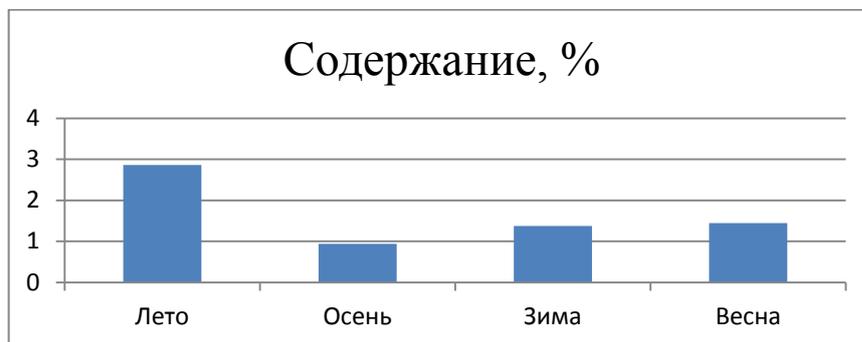


Рисунок 3. Динамика накопления полисахаридов в древесной зелени ели обыкновенной

Установлено, что содержание полисахаридов в древесной зелени максимально в летний период, уменьшение содержания происходит к осени и начинает возрастать к весне (Рисунок 3). Благоприятным временем для заготовки древесной зелени ели обыкновенной с целью выделения полисахаридов являются летние месяцы.

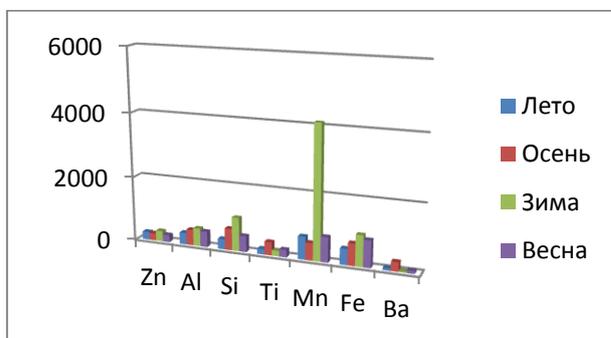
Исследование элементного состава

В результате проведённого исследования установлено, что содержание элементов зависит от органа ели обыкновенной (Рисунок 4).

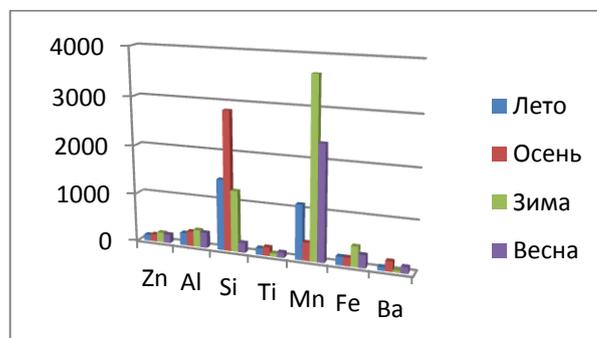
Ряд биологического поглощения элементов выглядит следующим образом:

Древесная зелень: Si>Mn>Al>Fe>Ti>Zn>Ba>Ni>Cu>Pb>Co>Mo>Cr>Sn.

Шишки: Si>Mn>Al>Zn>Fe>Cu>Ni>Ti>Ba>Co>Pb>Sn>Cr>Mo.



Сезонная динамика основных элементов в ветвях, мкг/кг.



Сезонная динамика основных элементов в хвое, мкг/кг.

Рисунок 4. Сезонная динамика основных элементов

В ветвях ели обыкновенной в наибольшем количестве накапливается марганец, железо и кремний (Рисунок 4). Хром, молибден и олово, обнаружены в ветвях в минимальных количествах. Для большинства металлов максимум содержания наблюдается в зимние месяцы. Содержание меди, алюминия, титана, железа, кобальта, никеля и свинца, снижается летом.

Содержание марганца и кремния в хвое ели обыкновенной наиболее подвержено сезонным изменениям (Рисунок 4). Максимальное накопление марганца наблюдается в зимний период, а кремния в осенний. Весной происходит постепенное снижение содержания марганца до минимального значения к осени. Содержание кремния начинает постепенно увеличиваться с минимального количества в весенний период, до максимального в осенний. Для остальных элементов разброс величин количественного содержания не велик.

Исследование пигментов

Содержание пигментов в хвое ели обыкновенной подвержено сезонным изменениям.

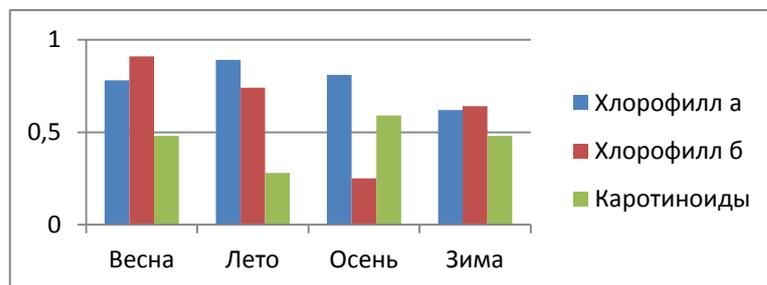


Рисунок 5. Сезонная динамика содержания пигментов в хвое ели обыкновенной

Исследования показали (Рисунок 5) целесообразность заготовки хвои ели обыкновенной с максимальным содержанием хлорофиллов в весенне-летний период, а заготовку хвои для получения каротиноидов необходимо проводить осенью.

Исследование аскорбиновой кислоты

Содержание аскорбиновой кислоты подвержено сезонным колебаниям с максимумом накопления зимой и весной и минимальным значением летом.

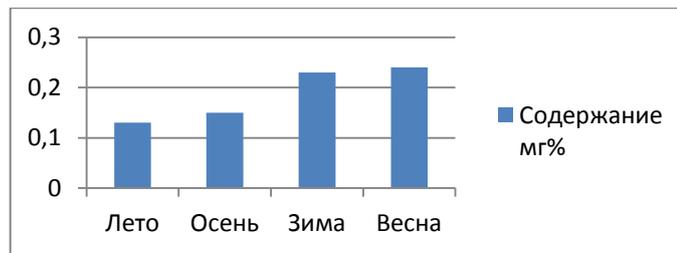


Рисунок 6. Динамика накопления аскорбиновой кислоты в древесной зелени ели обыкновенной, мг %

Накопление аскорбиновой кислоты в весенний период (Рисунок 6) обусловлено высокой интенсивностью биосинтетических процессов, происходящих в хвое. Летний период характеризовался наиболее низким уровнем содержания аскорбиновой кислоты.

Анатомическое исследование хвои и шишек ели обыкновенной

Для анатомического исследования ели обыкновенной шишек диагностическое значение представляет: семенная чешуя и кроющая чешуя.

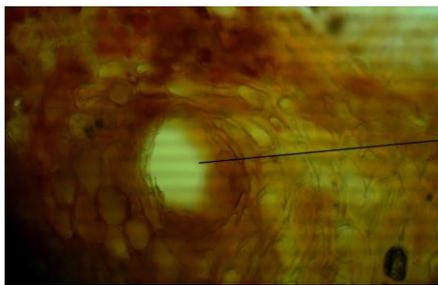


Рис. 7. Смоляной ход (Ув.×400)

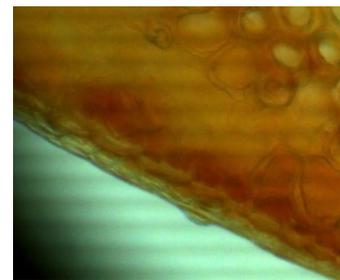


Рис. 8. Клетки эпидермиса (Ув.×400)

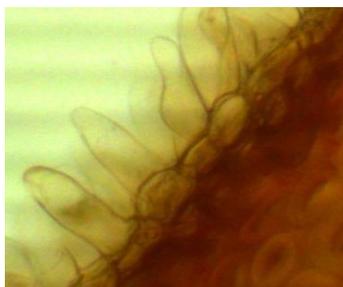


Рис. 9. Волоски эпидермиса внутренней поверхности семенной чешуи (Ув.×400)

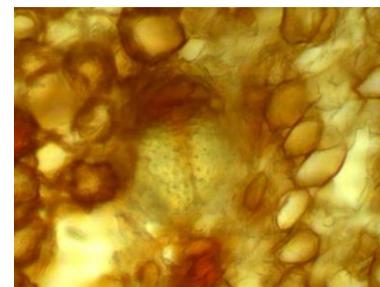


Рис. 10. Проводящий пучок (Ув.×100)

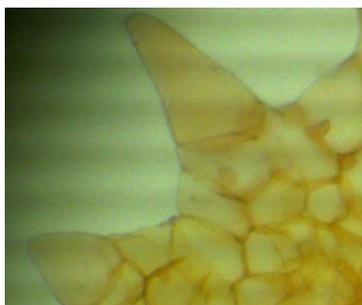


Рис. 11. Волоски края кроющей чешуи (Ув.×400)



Рис. 12. Устьица кроющей чешуи (Ув.×400)

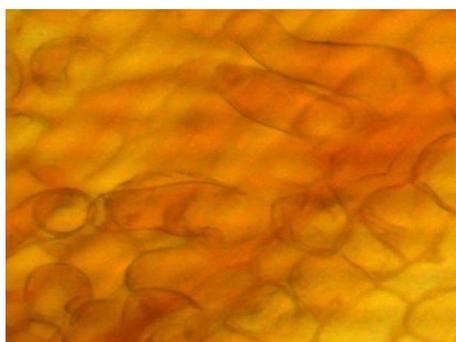


Рис. 13. Волоски кроющей чешуи (Ув.×400)

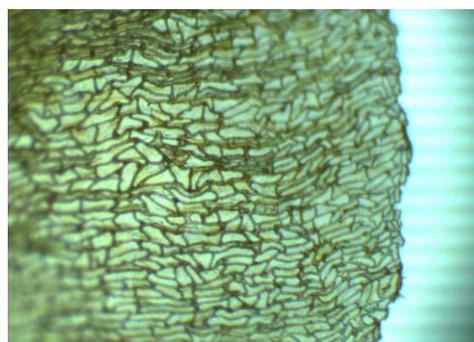


Рис. 14. Клетки крыла семени (Ув.×100)

Установлены диагностические признаки семенной чешуи: клетки эпидермиса с обеих сторон, овальные, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы (Рисунок 8); простые одноклеточные, реже двухклеточные волоски сосочковидной или конической формы (Рисунок 9); диаметр смоляных ходов (Рисунок 7) увеличивается от верхушки к основанию чешуи, центральный ход большего размера особенно у основания чешуи; проводящие пучки, мелкие сдавленные по 8-10 штук (Рисунок 10).

Для кроющей чешуи определены следующие анатомические диагностические признаки: по краю чешуи видны многоклеточные простые волоски конической формы (Рисунок 11); в верхней части кроющей чешуи и вдоль центральной жилки видны мелкие устьица (Рисунок 12); на внешней поверхности кроющей чешуи одноклеточные, реже двухклеточные извилистые волоски продолговатой или конической формы (Рисунок 13).

Клетки свободного конца крыла семени вытянутые с четковидно-утолщенными оболочками (Рисунок 14).

Установленные анатомические диагностические признаки шишек ели обыкновенной, включены в фармакопейную статью «Ели обыкновенной шишки», в раздел «Микроскопия».

Исследование фармакологической активности

Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести водорастворимый полисахаридный комплекс древесной зелени и ели обыкновенной шишек к классу 4 малотоксичных веществ ($LD_{50} > 5000$). Пектиновые вещества древесной зелени и ели обыкновенной шишек относятся к 3 классу опасности согласно ГОСТ 121007-76, LD_{50} - от 815 до 3250 мг/кг в зависимости от фракции.

Наибольшей противовоспалительной активностью обладает фракция ВРПК шишек и ВРПК ветвей, процент торможения составляет 65% и 68,3% соответственно. ВРПК древесной зелени тормозит образование отека в сравнении с контролем на 54,6%. Пектиновые вещества древесной зелени и шишек оказались менее активными.

ВРПК шишек и ветвей показывают примерно равную противовоспалительную активность в сравнении с нимесулидом, одним из часто назначаемых препаратов группы НПВС.

Таблица 2 - Определение антибактериальной и противогрибковой активности эфирного масла ели обыкновенной и его отдельных фракций

Объект исследования	Зона задержки роста, мм		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Фракция № 1	27,3	12,6	42,6
Фракция № 2	28,0	7,0	42,7
Фракция № 3	17,0	11,3	30,6
Цельное эфирное масло	12,0	11,3	28,3

Самыми активными в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* оказались фракции № 1 и 2 (Таблица 2), представленные в основном монотерпенами, из этого следует, что антимикробная активность эфирного

масла обусловлена в основном монотерпеновыми соединениями. Цельное эфирное масло показало наименьшую антибактериальную и противогрибковую активность.

Результаты исследования сорбционной активности показали, что все полисахаридные фракции древесной зелени и ели обыкновенной шишек обладают достаточно высокой сорбционной активностью (Таблица 3). Сорбционная активность фракций шишек (232-239,56 мг/г) выше чем у полисахаридных фракций древесной зелени (219,3-198,1), а также превосходит активность препаратов сравнения (уголь активированный 230,9 мг/г, диоксид кремния 211,5 мг/г).

Разработка фармакопейной статьи

Согласно требованиям, предъявляемым к современным стандартам качества на ЛРС, разработаны показатели норм качества ели обыкновенной шишек в зависимости от пути его использования.

Проведённые исследования позволили разработать новые разделы ФС: УФ-спектроскопию, качественные реакции, хроматографию (КБХ), определяющие подлинность сырья.

Установлены новые показатели качества сырья: сумма экстрактивных веществ извлекаемых водой, не менее 5%, дубильных веществ не менее 6%, золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной – не более 1%, а так же содержание радионуклидов, тяжёлых металлов.

Показатели: содержание эфирного масла, влажность, зола общая, другие части ели (хвоя, мелкие веточки и др.), органическая и минеральная примеси оставлены без изменений.

На основании проведённых исследований разработана фармакопейная статья «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*», взамен существующей фармакопейной статьи № 81 ГФ XI издания «Шишки ели обыкновенной».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённых исследований разработан нормативный документ на ели обыкновенной шишки, а так же обосновано использование в медицинской практике древесной зелени и ели обыкновенной шишек для создания лекарственных средств, обладающих противовоспалительным, сорбционным и антибактериальным действием.

Итоги выполненного исследования

1. Компонентный состав эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной более многообразен в сравнении с составом эфирного масла шишек, в составе обоих масел доминируют монотерпены. Установлено, что компонентный состав эфирного масла в течение всего года остается неизменным, что позволяет вести заготовку сырья круглогодично и вне зависимости от возраста растения и условий произрастания.
2. Получены полисахаридные фракции ВРПК и ПВ древесной зелени и шишек, цепи которых состоят в основном из остатков арабинозы и галактозы.
3. На основании результатов анализа элементного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной, показано, что содержание микроэлементов варьирует в зависимости от органа растения. В хвое и ветвях ели обыкновенной наблюдается увеличение содержания элементов преимущественно в зимние месяцы.
4. Установлено, что сумма хлорофиллов а/в в древесной зелени ели обыкновенной выше в весенне-летний период, каротиноидов - осенью. Содержание аскорбиновой кислоты в хвое ели повышается в зимне-весенний период.
5. В ходе морфолого-анатомического исследования ели обыкновенной шишек, установлены диагностические анатомические признаки, включённые в проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*».
6. Проведено сравнительное анатомическое исследование хвои трёх близких видов *Picea abies*, *Picea obovata*, *Abies sibirica*. Установлены основные отличительные анатомические признаки хвои пихты от двух видов ели, которые

будут иметь значение при анализе измельчённого сырья. Между *Picea abies* и *Picea obovata* значимых отличительных признаков не выявлено.

7. Проведена стандартизация и установлены показатели качества ели обыкновенной шишек: содержание эфирного масла, суммы экстрактивных веществ извлекаемых водой, дубильных веществ.

8. Разработан проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*», для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания, взамен существующей фармакопейной статьи № 81 ГФ XI издания «Шишки ели обыкновенной».

9. Показана выраженная противовоспалительная активность фракций ВРПК ветвей и шишек, сопоставимая с препаратом сравнения – «нимесулид». По результатам определения острой токсичности ВРПК древесной зелени и шишек ели отнесены к классу 4 малотоксичных веществ, а ПВ - к классу 3 умеренно токсичных.

Эфирное масло древесной зелени ели обыкновенной показало антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Отдельные фракции эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной показали более высокую антибактериальную активность. Сорбционная активность полисахаридных фракций шишек ели обыкновенной превышает сорбционную активность активированного угля и диоксида кремния.

Рекомендации

Разработанный проект ФС «Ели обыкновенной шишки» может быть использован в производственном процессе при получении эфирного масла, оценке его качества фармацевтическими предприятиями. Исследования химического состава и биологической активности эфирного масла и полисахаридных фракций сырья ели обыкновенной могут быть внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в разработке новых лекарственных средств на основе эфирного масла и полисахаридов древесной зелени и ели обыкновенной шишек.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гуляев, Д.К. Оптимизация стандартизации ели обыкновенной шишек / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, И.В. Коротков // **Современные проблемы науки и образования.** 2014. № 6. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16528>.
2. Гуляев, Д.К. Анатомическое и морфологическое изучение ели обыкновенной шишек *PICEAE ABIETIS STROBILI* / Д.К. Гуляев, А.Г. Анисимова, В.Д. Белоногова // **Медицинский альманах.** - 2015. - № 1. - С. 113-116.
3. Гуляев, Д.К. Изучение противовоспалительной активности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, Н.В. Лялина, И.П. Рудакова, В.Д. Белоногова // **Современные проблемы науки и образования.** - 2015. - № 6. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19958>.
4. Белоногова, В.Д. Изучение компонентного состава эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае / В.Д. Белоногова, И.В. Коротков, П.С. Мащенко, Д.К. Гуляев // **Фармация.** - 2015. - № 6. – С.14-16.
5. Гуляев, Д.К. Сезонная динамика микроэлементного состава древесной зелени ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, А.С. Власов // **Eastern European Scientific Journal.** - 2015. - № 3. – С. 40-44.
6. Гуляев, Д.К. Антимикробная и противогрибковая активность эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной и его отдельных фракций / Д.К. Гуляев, В.В. Новикова, В.Д. Белоногова // **Медицинский альманах.** - 2015. - № 4. - С. 2013-2014.
7. Гуляев, Д.К. Сезонная изменчивость компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной *PICEAE ABIETIS (PINACEAE)* / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, П.С. Мащенко // **Фундаментальные исследования.** - 2015. - № 7. - С. 14-19.
8. Гуляев, Д.К. Фармакогностическое изучение древесной зелени и шишек ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, И.В. Коротков // **Вестник**

Пермской государственной фармацевтической академии. - 2013. - № 11. - С. 44-47.

9. Гуляев, Д.К. Фитохимическое исследование древесной зелени ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, И.В. Коротков // Сборник научно-практической конференции с международным участием, посвященный тридцатилетию Ярославской государственной медицинской академии, Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике». - Ярославль, 2014. - С. 74-76.

10. Кунц, Д.А. Изучение элементного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае / Д.А. Кунц, А.С. Власов, В.Д. Белоногова, Д.К. Гуляев // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. - 2014. - № 12. – С. 171-174.

11. Гуляев, Д.К. Изучение содержания полисахаридов древесной зелени ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, Н.В. Лялина, В.Д. Белоногова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. - 2015. - № 15. - С. 211-213.

12. Гуляев, Д.К. Изучение пигментов хвои ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, С.В. Иванова, В.Д. Белоногова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. - 2015. - № 15. - С. 209-210.

13. Гуляев, Д.К. Изучение сорбционных свойств полисахаридов древесной зелени и шишек ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, Н.В. Лялина // Сборник научных работ XIV Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований». - 2015. – № 5. - С.64-65.

14. Гуляев, Д.К. Исследование сезонной динамики компонентного состава эфирного масла подроста ели обыкновенной / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, П.С. Машенко // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. - 2015. - № 15. - С. 39-41.