

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

На правах рукописи

Гуляев Дмитрий Константинович

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

14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор Белоногова В.Д.

Пермь 2016

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1.СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ	16
1.1. Ботаническое описание ели обыкновенной	16
1.2. Ареал обитания	18
1.3. Химический состав БАВ ели обыкновенной	19
1.3.1. Эфирные масла	19
1.3.2. Углеводы	21
1.3.3. Фенольные соединения	24
1.3.4. Витамины	26
1.3.5. Аминокислоты	31
1.3.6. Липиды	33
1.3.7. Пигменты	34
1.3.7.1. Общая характеристика пигментов	34
1.3.7.2. Содержание пигментов в органах ели обыкновенной	36
1.4. Современное состояние микроскопических исследований древесной зелени и шишек ели обыкновенной	37
1.5. Фармакологическая активность БАВ ели обыкновенной и применение в медицине	38
Выводы к главе 1	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Объекты исследования	43
2.2. Методы исследования эфирных масел	45
2.2.1. Определение содержания эфирного масла	45
2.2.2. Получение фракций эфирного масла	46
2.2.3. Газожидкостная хроматография эфирных масел	46
2.3. Методы исследования полисахаридов	47
2.3.1. Определение содержания полисахаридов	47

2.3.2.	Получение полисахаридных фракций	48
2.3.3.	Качественные реакции на полисахариды	49
2.3.4.	Хроматографический анализ полисахаридов	50
2.3.5.	Определение физико-химических характеристик полисахаридов	50
2.4.	Методы исследования элементного состава	51
2.5.	Методы исследования пигментов	52
2.5.1.	Исследование качественного состава пигментов хвои ели обыкновенной	52
2.5.2.	Исследование содержания пигментов	53
2.6	Определение аскорбиновой кислоты в древесной зелени ели обыкновенной	54
2.6.1.	Качественный анализ аскорбиновой кислоты	54
2.6.2.	Исследование содержания аскорбиновой кислоты	54
2.7.	Методы микроскопического исследования	55
2.8.	Методы фармакологических исследований	56
2.8.1.	Исследование острой токсичности	56
2.8.2.	Исследование противовоспалительной активности	57
2.8.3.	Исследование антибактериальной и противогрибковой активности эфирного масла древесной зелени	57
2.8.4.	Исследование антибактериальной и противогрибковой активности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек	58
2.8.5.	Исследование сорбционной активности	59
2.9.	Общие методики стандартизации сырья	60
2.9.1.	Отбор проб для анализа	61
2.9.2.	Качественные реакции	61
2.9.3.	Круговая хроматография	61
2.9.4.	Уф-спектроскопия	62

2.9.5.	Определение числовых показателей	62
2.9.6.	Определение микробиологической чистоты	62
2.9.7.	Определение срока годности	62
ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ И ШИШЕК ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ		64
3.1.	Исследование эфирного масла	64
3.1.1.	Сравнительное исследование компонентного состава эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной	64
3.1.2.	Исследование компонентного состава фракций эфирного масла древесной зелени	68
3.1.3.	Исследование компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной, в зависимости от сезона года	71
3.1.4.	Исследование сезонной динамики накопления компонентного состава эфирного масла подрост ели обыкновенной	81
3.1.5.	Исследование содержания эфирного масла древесной зелени	84
3.1.6.	Исследование полноты перегонки эфирного масла	85
3.2.	Исследование полисахаридов	86
3.2.1.	Качественные реакции на полисахариды	86
3.2.2.	Выделение полисахаридных фракций	87
3.2.3.	Хроматографическое исследование полисахаридных фракций	88
3.2.4.	Влияние на содержание полисахаридов сезона года	90
3.2.5.	Определение физико-химических характеристик полисахаридов	90
3.3.	Исследование элементного состава	92
3.4.	Исследование пигментов	99
3.4.1.	Исследование качественного состава пигментов	99
3.4.2.	Исследование количественного содержания пигментов	100
3.5.	Исследование аскорбиновой кислоты	101
Выводы по главе 3		104

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ	
ХВОИ И ШИШЕК ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ	106
4.1. Исследование анатомического строения шишек ели	
обыкновенной	106
4.2. Исследование анатомического строения хвои ели	116
обыкновенной	
4.3. Сравнительный анализ анатомического строения древесной	
зелени и шишек <i>Picea abies</i> , <i>Picea obovata</i> и <i>Abies sibirica</i>	119
4.3.1. Сравнительный анализ анатомического строения шишек <i>Picea</i>	
<i>abies</i> , <i>Picea obovata</i> и <i>Abies sibirica</i>	119
4.3.2. Сравнительный анализ анатомического строения хвои <i>Picea</i>	
<i>abies</i> , <i>Picea obovata</i> и <i>Abies sibirica</i>	121
Выводы к главе 4	123
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ	
АКТИВНОСТИ	124
5.1. Исследование острой токсичности полисахаридов древесной	
зелени и шишек	124
5.2. Исследование противовоспалительной активности	
полисахаридов древесной зелени и шишек	126
5.3. Исследование антибактериальной активности	128
5.3.1. Исследование антибактериальной и противогрибковой	
активности эфирного масла древесной зелени	128
5.3.2. Исследование антибактериальной и противогрибковой	
активности полисахаридов древесной зелени и шишек	128
5.4. Исследование сорбционной активности полисахаридов	
древесной зелени и шишек	132
Выводы по главе 5	134
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ «Ели	
обыкновенной шишки»	135
6.1. Качественный анализ сырья	135

6.1.1.	Качественные реакции с водным извлечением ели обыкновенной шишек	135
6.1.2.	Круговая бумажная хроматография	136
6.1.3.	УФ-спектроскопия	137
6.2.	Количественный анализ сырья	137
6.2.1.	Определение содержания эфирного масла	138
6.2.2.	Определение содержания экстрактивных и дубильных веществ	140
6.3.	Числовые показатели	142
6.4.	Микробиологическая чистота	144
6.5.	Определение содержания тяжёлых металлов	146
6.6.	Определение срока годности сырья	147
	Выводы к главе 6	148
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	149
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ	152
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	153
	ПРИЛОЖЕНИЯ	168

ВВЕДЕНИЕ

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 так же 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. Так же 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 хвой и ели обыкновенной шишек. Для идентификации хвой 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 [23].

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 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 «Апифито групп». 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 цели и задач исследования, 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, рентгенофлюоресцентный 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, рентгенофлюоресцентного метода, ТСХ и БХ хроматографии; а так же морфолого-анатомических и фармакологических методов исследования. Проведена статистическая обработка результатов исследования по требованиям ГФ XII и с использованием программы «Microsoft Exel 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. Результаты, полученные в ходе диссертационной работы, использованы при чтении лекций для студентов по теме «Фитотерапия при заболеваниях верхних дыхательных путей». 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

1.1. Ботаническое описание ели обыкновенной

Ель обыкновенная, или европейская - *Picea abies* (L.) Karst. - хорошо знакомое всем вечнозеленое хвойное растение из семейства сосновых (*Pinaceae*) высотой 20-30 (до 40, а в Западной Европе до 50 м) с пирамидальной кроной. Рост в высоту не прекращается практически всю жизнь, и даже старые деревья сохраняют островерхую коническую форму. Ствол мало сбежистый, то есть постепенно уменьшается в диаметре от основания к вершине. Очень крупные деревья имеют толстые стволы диаметром у основания до 1 м. Кора ветвей красно-бурая, гладкая, на стволах буровато-серая, с неровной поверхностью, отслаивающаяся небольшими участками. Ветви располагаются правильными мутовками, каждый год отмечается новой мутовкой, что позволяет по их числу легко определить возраст дерева [4,48,56,59].

Молодые ветви густо покрыты листьями. Листья одиночные, жесткие, игольчатые, длиной до 2-2,5 см и толщиной 1-1,5 мм, темно-зеленые, блестящие, четырехгранные, заостренные на конце. Такие листья называют хвоей. Каждая хвоинка живет и держится на ветвях 6-7 (иногда 12) лет, в городских насаждениях жизнь хвои короче.

Растения однодомные: на одной особи развиваются и мужские и женские генеративные органы - шишки. В нижней части побега располагаются мужские шишки, в верхней - женские, более крупные по размерам, красновато-бурого цвета. Мужские шишки удлинненно-цилиндрические, имеют вид красновато-желтых шишечек длиной 2-2,5 см, у основания окружены светло-зелеными чешуйками. Мужские шишки имеют ось, к которой прикреплены чешуи – микроспорофиллы. Пыльца рассеивается в мае-июне, после чего мужские шишки опадают. Растения ветроопыляемые, каждая

пылинка снабжена двумя придатками - воздушными мешками, это обеспечивает ей исключительную летучесть. Наблюдения показали, что разнос пыльцы от дерева ели может достигать 8-10 км [4].

Женские шишки имеют ось, на которой сидят семенные чешуи, расположенные в пазухах мелких кроющих чешуй. Семенная чешуя – это сильно редуцированный и укороченный боковой побег. К концу весны или в начале лета семенные чешуи на женской шишке раздвигаются, что связано с распылением пыльцы, после опыления семенные чешуи вновь смыкаются. Шишки висячие, цилиндрические, плавно закругленные на обоих концах, длиной 10-16 см и диаметром 3-4 см. Вначале они красного - коричневого цвета, потом зеленеют, а когда становятся зрелыми, буреют. Семена темно-бурые, яйцевидной формы, мелкие - в 1 кг насчитывается 105-110 тысяч еловых семян [22].

Созревают семена ели в сентябре-октябре, высыпаются из шишек только зимой и ранней весной, но сами раскрывшиеся шишки продолжают висеть на дереве еще довольно долго.

Размножается ель семенным путем. В урожайные годы на 1 га елового леса может оказаться до 5 миллионов семян. Семена сохраняют всхожесть до 10 лет. За первый год жизни всходы достигают всего 4-5 см высоты. И в последующие годы сеянец не отличается быстрым ростом - к 10 годам ель вырастает на 1-2 м. Лишь с 15-20 лет рост ели ускоряется, самый большой прирост (до 70 см в год) в возрасте 35-65 лет [49,56].

Ель обыкновенная вступает в период семяношения в 25-30 лет, а в густом лесу – в 50-70 лет. Семенные годы повторяются через 3-7 лет. Общая продолжительность жизни еловых деревьев - от 200 до 400 лет, но отдельные деревья достигают возраста в 600 и даже 800 лет.

Ель обыкновенная – легко переносит морозы, высокую температуру переносит плохо. Является теневыносливым древесным растением, избегает заболоченные участки. В неблагоприятных условиях, например на северной границе леса, образует стланиковую форму. Корневая система ели

обыкновенной залегает на глубине от 0,8 до 1 м, и следовательно, плохо противостоит ветровалу. Растение имеет достаточно тонкую кору и поэтому, уязвима перед лесными пожарами. [56].

1.2. Ареал обитания

Ель обыкновенная – наиболее широко распространенный вид из всего рода *Picea*. Ареал вида захватывает север, восток и юго-запад Европы и часть Азии. В азиатской части материка фитоценозы с участием ели обыкновенной сменяются растительными фитоценозами с елью сибирской. На севере Европы границы ареала установить практически невозможно, поскольку фитоценозы с елью обыкновенной плавно переходят в экосистемы с финской елью.

Ель обыкновенная растет одиночными деревьями, группами из нескольких растений или в сообществах с лиственными и хвойными растениями. На северо-западе Евразии образует сплошные леса, получившие название – ельники. Южнее, в смешанных лесах, ель обыкновенная выступает как компонент леса, в процентном отношении составляющий от 10 до 50 % всех деревьев.

В южных областях Европы ель обыкновенная растет только в горных местностях – на Балканах, в Альпах и в Карпатах. В смешанных лесах соседями ели обыкновенной могут являться дуб, бук, рябина, ольха. Также ель обыкновенная образует фитоценозы с хвойными деревьями – сосной обыкновенной, елью сибирской, лиственницей европейской [20,56,78].

Большинство образцов сырья ели обыкновенной собрано на территории Ильинского района Пермского края. Этот район относится к Камско-Печорско-Западно-Уральской подпровинции Урало-Западносибирской таежной провинции. В нем выделяют два подрайона с преобладанием сельскохозяйственных земель, около 25-50% территории, и с преобладанием осиновых и березовых лесов на месте южно-таежных темнохвойных лесов, около 6-10%. Лесопокрытые земли в первом подрайоне составляют 35-55%, а

во втором 75-85%. Ильинский район относится к зоне с низкой антропогенной нагрузкой [21,67].



Рисунок 1. Районы заготовки сырья в Пермском крае (Ильинский, Красновишерский, Ординский).

1.3. Химический состав БАВ ели обыкновенной

1.3.1. Эфирное масло

Ель обыкновенная имеет богатый состав эфирного масла. Компонентный состав эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной представлен преимущественно монотерпенами: β -пинен, β -мирцен, β -фелладрен, сантен, Δ^3 -карен, сабинен, камфен, трициклен, лимонен, α -пинен, α -терпинолен, фенхол, камфора, изоборнеол, борнеол, терпинен-4-ол, α -терпинеол, α -терпинолен, циклосативен, борнилацетат.

В состав эфирного масла древесной зелени ели входят и сесквитерпены: гумулен, лонгифолен, лонгициклен, α -цедрен, кариофиллен, α -кариофиллен,

копаен, α -мууролен, γ -мууролен, α -баргамотен, α -фармензен, аромадендрен, α -бисаболол, мууролол, α -кадиол [13,55,78,115].

Содержание эфирного масла в древесной зелени ели в течение года имеет два максимума, весной – в мае и осенью – в сентябре. В летние месяцы наблюдается спад содержания эфирного масла, вызванный преимущественно воздействием высокой температуры воздуха. Повышение содержания эфирного масла в сентябре связано с завершением формирования хвои. Зимой, эфирного масла накапливается меньше в связи с замедлением обменных процессов [11,74].

В каждом органе ели содержание эфирного масла различное. Так, в коре (0,38% от абсолютно сухого вещества) эфирного масла содержится больше чем в древесной зелени (0,1-0,2%) и древесине ствола и ветвей (0,04%). Это, прежде всего, связано с разной интенсивностью процессов синтеза в органах [97].

Большинство исследований эфирных масел ели посвящено изучению эфирного масла хвои, тогда как литературных данных по компонентному составу эфирного масла ели обыкновенной шишек ограничено. В эфирном масле шишек ели обыкновенной были идентифицированы монотерпены: α -пинен, β -пинен, мирцен, Δ^3 -карен, лимонен, борнилацетат, борнеол [30,31,144].

По данным других исследований компонентный состав шишек представителей семейства сосновых более многообразен и представлен монотерпенами и сесквитерпенами [140].

Для древесины хвойных пород характерно наличие смоляных ходов. Содержимым смоляных ходов является вязкая тягучая масса под названием живица. Живица представляет собой смесь терпеноидов и смоляных кислот. Терпеноиды живицы представлены в основном монотерпеновыми соединениями, в меньшей степени сесквитерпенами и дитерпенами [83].

1.3.2. Углеводы

Преобладающей формой растворимых форм углеводов в хвое ели являются олигосахариды. Основной максимум их содержания в хвое приходится на ноябрь-январь, до 12-17% от сухого сырья. Минимальное содержание для данной формы углеводов наблюдается в весенне-летний период.

Для хвои ели четко различимы два максимума в содержании углеводов – январь и май, июнь. В марте – апреле в хвое ели содержание углеводов снижается, что объясняется оттоком пластических веществ к почкам [55].

Одним из основных углеводов хвои ели является крахмал. Крахмал в хвое накапливается в период активного роста, содержание крахмала в хвое остаётся высоким до осени. В сентябре начинается резкое снижение содержания крахмала, которое длится до весеннего периода.

Для двух и четырёхлетней хвои характерно увеличение содержания крахмала в июне. В молодой хвое содержание крахмала достаточно низкое в течение всего срока вегетации.

В марте и июле наблюдается максимальное содержание крахмала для двухлетней хвои, для трёхлетней хвои характерен максимум в июле и ноябре [55,66].

У моносахаридов хвои ели наблюдается максимум накопления в январе, а минимум в июне, что связано с периодом интенсивного роста. Моносахаридов в хвое ели в течение года содержится больше чем дисахаридов. Содержание моносахаридов в хвое ели начинает постепенно увеличиваться с приходом осени, содержание моносахаридов остаётся высоким до прихода весны. Весной содержание моносахаридов падает до минимального значения в июне. Благодаря большей лабильности дисахаридов, их содержание в течение года претерпевает большие изменения [55].

В древесине ели были обнаружены не целлюлозные полисахариды – галактоглюкоманнан (Рисунок 2) и арабиноглюкуроноксилан.

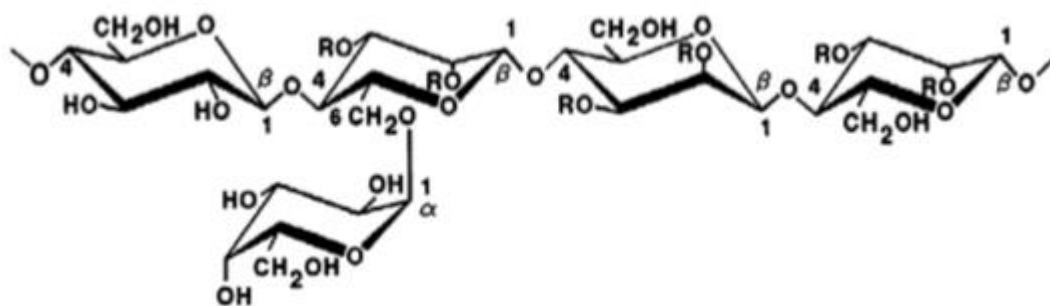


Рисунок 2. Структурная формула галактоглокоманнана.

Галактоглокоманнан состоит из остатков галактозы, глюкозы и маннозы. Арабиноглюкуронооксиланы представлены арабино-4-*о*-метилглюкуронооксиланом, состоящим из остатков арабинозы, ксилозы и глюкуроновой кислоты [127,142].

Глюкогалактоманнан, являясь веществом с большой молекулярной массой, проникает в кишечник и начинает адсорбировать воду. При этом полисахарид разбухает, занимая значительное пространство в кишечнике, тем самым препятствует всасыванию сахаров и реадсорбции желчи.

Водорастворимые полисахариды и пектины древесины видов ели так же представлены арабиногалактаном (Рисунок 3), подобно лиственнице сибирской [142].

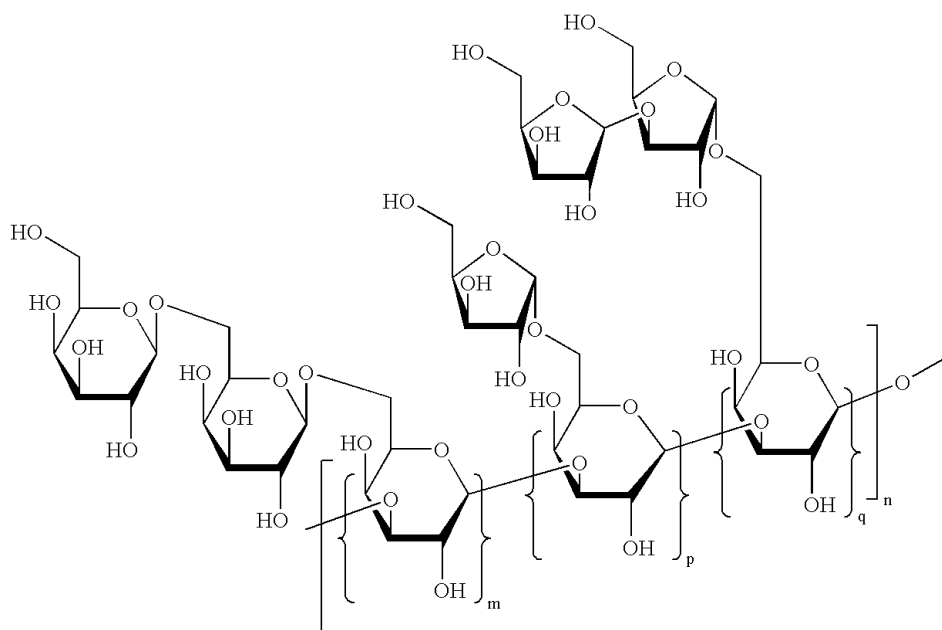


Рисунок 3. Структурная формула арабиногалактана.

Древесина лиственницы сибирской содержит до 15% арабиногалактана. Его макромолекула имеет разветвлённую структуру. Главную цепь арабиногалактана составляют звенья галактозы, скреплённые между собой гликозидными связями. Боковые цепи состоят из арабинозы, галактозы и уроновых кислот (галактуроновая, глюкуроновая) [1].

Множество работ посвящено исследованию фармакологической активности арабиногалактана. Арабиногалактан является иммуномодулятором активирующим ретикулоэндотелиальную систему, так же увеличивает фагоцитарный индекс. Его действие проявляется на всех стадиях фагоцитарного процесса, активируя хемотаксис, адгезию, поглотительную и бактерицидную способность перитонеальных макрофагов [60].

На основе арабиногалактана западной лиственницы получена пищевая иммуностимулирующая добавка «ImmunEnhancerTM AG». Ежедневный приём данной пищевой добавки в дозе 20 мг/кг, обеспечивает повышение иммунного ответа благодаря усилению пролиферации иммунных клеток и активации системы комплемента.

Железосодержащие производные арабиногалактана могут использоваться для лечения и профилактики железодифицитной анемии.

На основе арабиногалактана лиственницы сибирской разработаны биологически активные добавки иммуномодулирующего и пребиотического действия: Фларабин, Лавитол-арабиногалактан, Лакбин, Араглин-Д.

Кроме того, у арабиногалактана обнаружена умеренная антибактериальная активность в отношении некоторых штаммов, а так же гастропротективная и сорбционная активность [51,113].

Полисахариды ели обыкновенной древесной зелени и шишек в основном представлены веществами сходными по структуре с арабиногалактаном, арабиноглюкуроноксианом и глюкогогалактоманнаном. Это обстоятельство позволяет судить о достаточно широкой фармакологической активности полисахаридных фракций ели обыкновенной.

1.3.3. Фенольные соединения

Фенольные соединения представлены в основном: простыми фенолами, гидроксикоричными, гидроксibenзойными спиртами, альдегидами и кислотами, флавоноидами, стильбенами, лигнанами, дубильными веществами и лигнином [8].

Эти вещества находятся в растениях в виде сложных эфиров и о-гликозидов, в свободной или связанной форме. Сложные эфиры ароматических соединений состоят в основном из высших алифатических спиртов и фенолкислот. Чаще всего, кислотной составляющей сложных эфиров является феруловая, иногда кумаровая кислота [114]. О-гликозидирующим углеводом фенольных соединений в основном является β -D-глюкоза, реже – фруктоза, рамноза, арабиноза, ксилоза и дисахарид – рутроза. Эти углеводы встречаются в основном в пиранозной форме, а рамноза, арабиноза и ксилоза – в фуранозной форме [107].

В ответ на техногенное загрязнение окружающей среды в органах ели изменяется состав и повышается содержание веществ вторичного метаболизма (фенолкислот и производных ацетофенона) [2].

В хвое древесной зелени содержится 62-116 мг/г хинной и 14-40 мг/г шикимовой. На долю хинной и шикимовой кислот приходится до 50% от общего содержания фенолкарбоновых кислот. Общее содержание всех фенолокислот составляет 0.05-0.07% от сухой хвои и 0.02% от сухой коры [32,109]. Фенолокислоты в свободном виде обычно не содержатся в растениях, т.к. вовлекаются в процессы биосинтеза лигнина и флавоноидов, либо взаимодействуют с сахарами, кислотами, терпенами и другими соединениями [125]. В хвое ели обыкновенной идентифицированы сложные эфиры хинной и шикимовой кислот, например: хлорогеновая кислота (кофеил-3-хинная), найденная в молодой хвое ели обыкновенной [134].

В разных органах ели обыкновенной были идентифицированы производные фенолкислот: из древесины – ванилин и п-оксибензальдегид;

гликозиды кумарола и кониферола в корнях; 9-глюкопиранозид кониферилового спирта, п-кумаровый и конифериловый альдегиды в коре. В хвое ели обыкновенной идентифицированы дигидроксиконифериловый спирт, а в молодой хвое 4-О-β-глюкопиранозид кониферилового спирта [106,117,118,121,122,132].

Одним из основных компонентов низкомолекулярных фенольных соединений хвои ели является п-гидроксиацетофенон. Содержание п-гидроксиацетофенона 0,2-0,3% от массы сухой хвои, по другим данным его содержание колеблется от 0,15 до 0,5% [96,126]. Гликозидом ацетофенона является пицеин, содержание которого от 0,05 до 0,4% от массы свежей хвои. В хвое ели были идентифицированы: 4-гидроксиацетофенон, 3,4-дигидроксиацетофенон, 3-метокси-4-гидроксиацетофенон [14,47,111,112].

Среди всех представителей семейства сосновых стильбены были найдены только в ели и сосне. В ели обыкновенной были идентифицированы пицеатаннол, астрингенин и изорапонтингенин, пицеид, резвератрол [31,110,119,132,133,139]. Стильбены находятся в основном в коре, в хвое и шишках они содержатся в меньшем количестве [137].

Основными гликозидами низкомолекулярных фенольных соединений хвои ели являются кониферин (4-О-β-D-глюкопиранозид кониферола) и пицеин (4-О-β-D-глюкопиранозид ацетофенона). Содержание пицеина в хвое ели колеблется от 0,05% от массы сухого сырья весной, до 0,3% зимой.

В хвое ели идентифицированы 3-гликозид кемпферола и кверцитина, нарингенин-7-О-глюкопиранозид, эриодиктол-7-О-глюкопиранозид, 7-О-β-глюкопиранозид таксифолина и ампелопсина [131,133,139]. В корнях ели европейской был найден таксифолин-3-О-β-глюкопиранозид [122].

В органах ели обыкновенной идентифицированы катехины: (+)-катехин, (+)-галлокатехин, (-)-эпигаллокатехин, (-)-эпигаллокатехингаллат, (-)-эпикатехингаллат. Содержание (+)-катехина в хвое ели обыкновенной от 0 до 453 мг/кг сухой массы, содержание постоянно меняется в течение года [3,57].

Флавоноиды более характерны для других представителей семейства сосновых сосны, пихты и лиственницы.

В молодых шишках ели обыкновенной были найдены 3-О-β-глюкопиранозид пеларгонидина, цианидина, пеонидина, дельфинидина [133].

В хвое и древесине представителей рода *pinus* были идентифицированы лигнаны. Для ели характерны ларицезинол, лиовил, матарезинол, изоларицезинол, секоизоларицезинол, пинорезинол содержание которых, находится в пределах 0,03-0,09% от абсолютно сухой хвои [63,106].

В хвое ели обыкновенной были идентифицированы и некоторые гликозиды лигнанов: β-D-ксилопиранозид изоларицезинола, α-O-β-глюкопиранозид изоларицезинола, O-α-L-рамнопиранозид 2,3-дигидро-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-3-(гидроксиметилен)-7-метокси-5-бензофуран-пропанола, 9-O-β-глюкопиранозид секоизоларицезинола.

В древесине хвойных пород содержится до 28-30% лигнина. В древесной зелени ели в хвое содержится 19,1% лигнина, в тонких ветках 28,4%, в древесине 28,1% [94,137].

1.3.4. Витамины

Витаминный состав древесной зелени ели обыкновенной представлен достаточно широко (Таблица 1). В древесной зелени содержится значительное количество аскорбиновой кислоты, токоферолов, витамина К, витаминов группы В, каротиноидов и флавоноидов, обладающих Р-витаминной активностью [55,93].

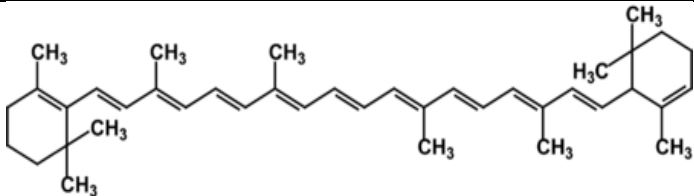
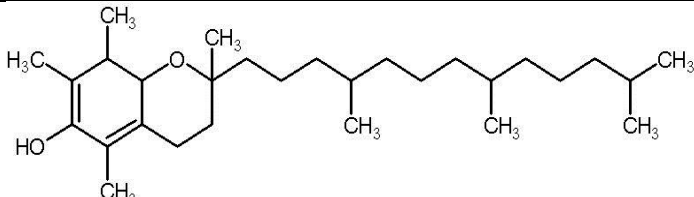
Хвоя ели является богатейшим источником аскорбиновой кислоты. В хвое ели в 6 раз больше аскорбиновой кислоты, чем в лимоне и апельсине, и в 25 раз больше, чем в луке и картофеле. Накопление аскорбиновой кислоты повышается в зимние и весенние месяцы, а летом наблюдается минимальное значение с постепенным повышением содержания осенью до зимнего максимума [100].

Содержание токоферола в хвое ели наиболее высоко в период с октября по февраль. В весенне-летний период содержание токоферолов падает, что связано с окончанием периода покоя и активизацией ростовых процессов. Содержание витамина Е зависит от возраста хвои. В трёхлетней хвое витамина Е в 2 раза больше чем в однолетней [81].

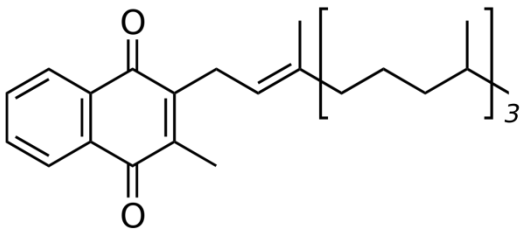
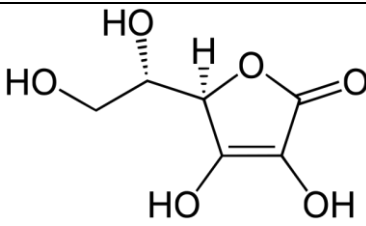
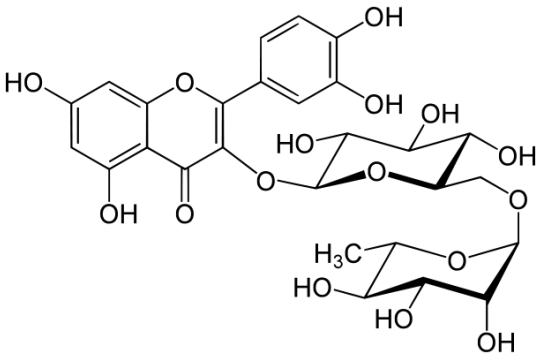
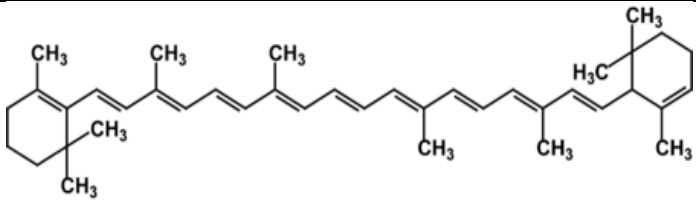
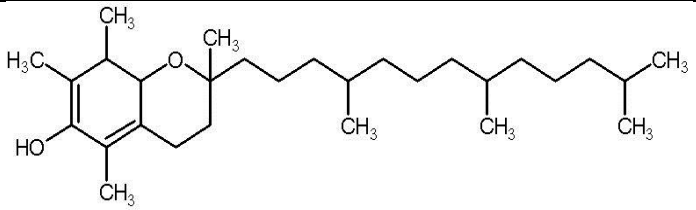
Хвоя ели так же богата каротиноидами. В состав каротиноидов входят α -каротин, β -каротин, виолаксантин, лютеин, зеаксантин, атероксантин и неоксантин.

В свежей еловой хвое витамина К содержится около 7,0-18,0 мг/кг. Содержание этого витамина в коре и побегах почти на порядок ниже. Концентрация витамина К в хвое ели зимой выше чем летом [58].

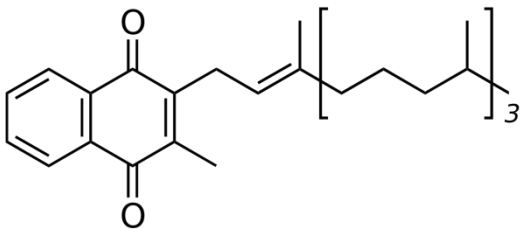
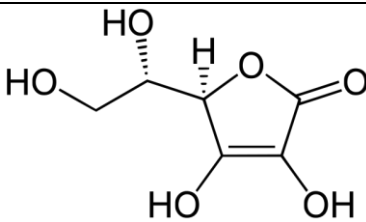
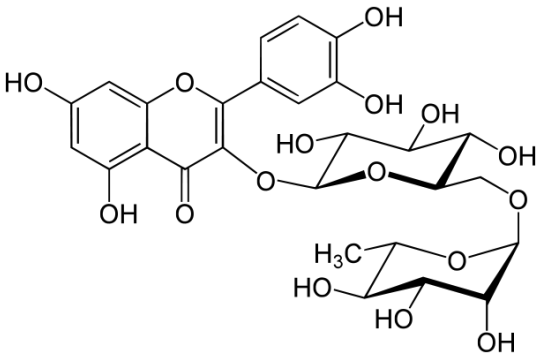
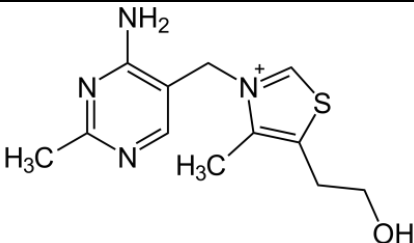
Таблица 1 - Содержание витаминов в хвое ели (мг/кг сухого сырья)

Название витамина	Структурная формула	Содержание
1	2	3
β -Каротин (провитамин А)		75,0-480,0
Токоферол (витамин Е)		12,0-20,0

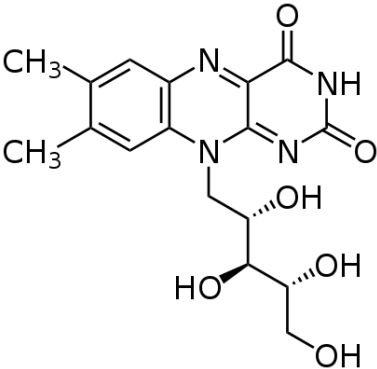
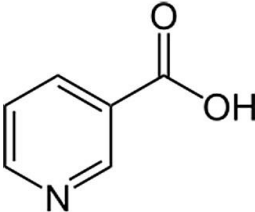
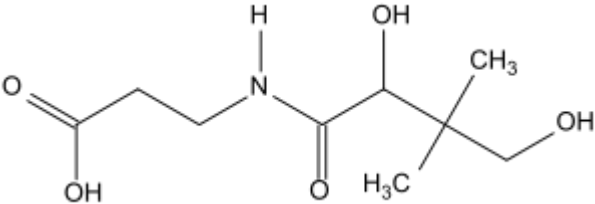
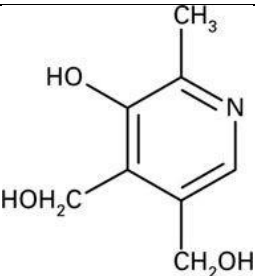
Продолжение таблицы 1

1	2	3
Филлохинон (витамин К)		7,0-18,0
Аскорбиновая кислота (витамин С)		3100,0- 5850,0
Флавоноиды (витамин Р)		800,0-2300,0
β-Каротин (провитамин А)		75,0-480,0
Токоферол (витамин Е)		12,0-20,0

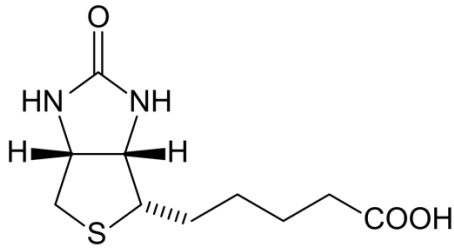
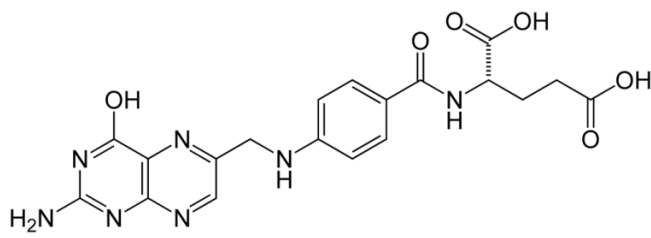
Продолжение таблицы 1

1	2	3
Филлох инон (витамин К)		7,0-18,0
Аскорбиновая кислота (витамин С)		3100,0- 5850,0
Флавоноиды (витамин Р)		800,0-2300,0
Тиамин (витамин В ₁)		9,0-80,0

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Рибофлавин (витамин В ₂)		50,0-70,0
Никотиновая кислота (витамин В ₃)		1,0-6,2
Пантотеновая кислота (витамин В ₅)		2,0-31,0
Пиридоксин (витамин В ₆)		0,4-0,2

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Биотин (витамин В ₇)		0,01-0,2
Фолиевая кислота (витамин В ₉)		1,0-13,0

Данные согласно (Левин, Репях, 1984) [55].

1.3.5. Аминокислоты

Составными элементами белковых молекул являются аминокислоты. Недостаток поступления аминокислот с пищей может привести к снижению физической и умственной работоспособности, замедлению роста и развития у детей, нарушению деятельности желёз внутренней секреции и др.

Ель обыкновенная является богатым источником аминокислот, как заменимых, так и незаменимых [55,63].

Таблица 2 - Аминокислотный состав белка хвои ели обыкновенной

Аминокислота	Содержание, % от массы сухой хвои
1	2
Лизин	0,48
Гистидин	0,15
Аргинин	0,46
Аспарагиновая кислота	0,44

Продолжение таблицы 2

Треонин	0,25
Серин	0,23
Глютаминовая кислота	0,55
Пролин	0,16
Глицин	0,33
Валин	0,30
Метионин	0,04
Изолейцин	0,21
Лейцин	0,38
Тирозин	0,14
Фенилаланин	0,28
Цистин+цистеин	0,16
Триптофан	0,02
Аланин	0,32
Сумма	4,9

Данные согласно (Васильев С.Н., Рошин В.И., Фелеке С., 1996).

Согласно исследованиям (Васильев С.Н., Рошин В.И., Фелеке С., 1996) [13], в состав белка хвои ели входят 19 аминокислот. Максимум содержания свободных аминокислот приходится на весенне-летний период (до 2% от массы сухого сырья), в осеннее время их содержание постепенно уменьшается, с минимумом в октябре (0,7%). К осени и зимой наблюдается стабилизация, а ранней весной – увеличение их содержания. Гораздо богаче аминокислотами оказалась молодая хвоя, где их содержится в 2-4 раза, чем в двух- трёхлетней.

Глутаминовая, аспарагиновая и γ -аминомасляная кислоты, аргинин, пролин, α -аланин составляют 77% всего аминокислотного состава всего растущего побега. Набор аминокислот в середине июня беднее, а общая их концентрация в 4 раза ниже, чем в растущей почке [13,55].

1.3.6. Липиды

К липидам – относятся вещества, извлекаемые гидрофобными растворителями. Их можно условно разделить на фосфолипиды, гликолипиды и нейтральные липиды (углеводы, свободные кислоты глицериды, воск).

Содержание фосфолипидов и гликолипидов в хвое ели повышается в осенне-зимний период, что может быть связано с подготовкой растения к низким температурам. Содержание нейтральных липидов имеет два максимума преимущественно весной и осенью [55].

В древесной зелени молодых елей содержится в 1,5-2 раза больше липидов чем в древесной зелени возрастных деревьев [11].

Основным компонентом смоляных кислот древесной зелени ели обыкновенной является дегидроабиетиновая кислота. Так же были идентифицированы абиетиновая, пимаровая, сандракопимаровая, изопимаровая, пинифоловая. Эфиры смоляных кислот в основном представлены этилдегидроабиеатом, этилнеоабиеатом, метилдегидроабиеатом.

Среди тритерпеновых спиртов древесной зелени основными являются: β -ситостерин, капестерин (следы), циклоартенол, 24-метиленциклоартенол.

Высшие жирные кислоты древесной зелени ели обыкновенной представлены: ундекановой, тридекановой, миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линоленовой, изолиноленовой, линолевой, арахидоновой и бегановой [13].

Хвойный воск состоит в основном из эфиров высших ациклических диолов и ω -гидроксикарбоновых кислот (более 80 %), и около 8 % свободных кислот. [38].

1.3.7. Пигменты

1.3.7.1. Общая характеристика пигментов

На сегодняшний день известно порядка десяти хлорофиллов. Все виды хлорофиллов различимы по химическому строению, окраске, распространению среди живых организмов. У всех высших растений содержатся хлорофиллы *a* и *b*. Хлорофиллы нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях. Хлорофиллы *a* и *b* различаются по цвету: хлорофилл *a* имеет сине-зеленый оттенок, а хлорофилл *b* — желто-зеленый. По химическому строению хлорофиллы — сложные эфиры дикарбоновой органической кислоты — хлорофиллина и двух остатков спиртов — фитола и метилового. Эмпирическая формула — $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$. В центре молекулы хлорофилла расположен атом магния, который соединен с четырьмя атомами азота пиррольных колец.

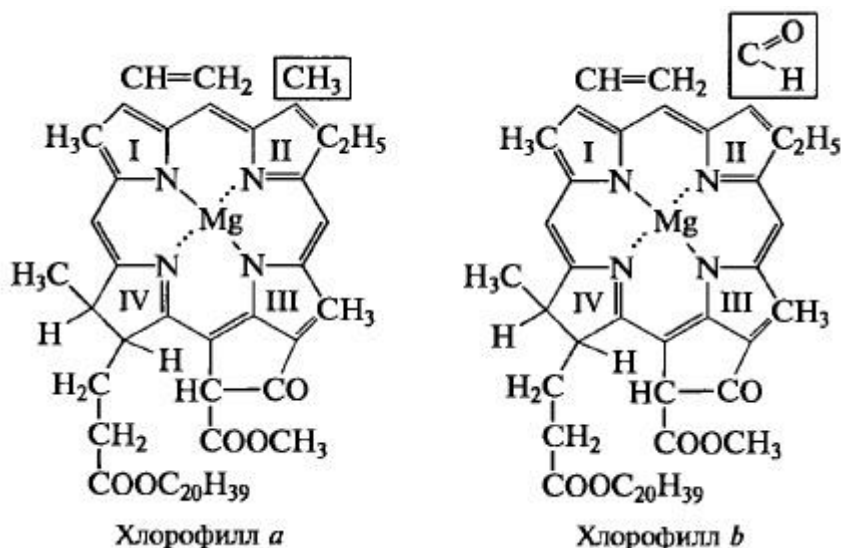


Рисунок 4. Структурные формулы хлорофиллов *a/b*.

Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* тем, что у него ко второму пиррольному кольцу присоединена не метильная, а альдегидная группа, поэтому хлорофилл *b* содержит кислорода на один атом больше, а водорода — на два атома меньше (Рисунок 4). Молекулу хлорофилла делят на две части: порфириновое ядро (гидрофильная часть) и фитольный хвост (гидрофобная углеводородная часть). Таким образом, молекула хлорофилла полярна. Эта полярность молекулы обуславливает ее расположение в мембранах хлоропластов [18].

Одной из специфических черт строения хлорофилла является наличие в его молекуле помимо четырех гетероциклов еще одной циклической группировки из пяти углеродных атомов — цикlopентанона. В цикlopентановом кольце содержится кетогруппа, обладающая большой реакционной способностью [101,144].

Водорастворимыми производными хлорофилла являются хлорофиллины – продукты щелочного гидролиза пигмента. В результате гидролиза от хлорофилла очень легко отщепляется фитол, несколько медленнее метилэфирная группа, разрушается цикlopентановое кольцо и образуется три свободные карбоксильные группы. Свободный хлорофиллин в форме трикарбоновой кислоты очень неустойчив и потому его обычно переводят в более стабильную форму – соли натрия или калия. Спектр максимального поглощения хлорофиллина натрия, получаемого из древесной зелени в промышленных масштабах, располагается в сине-фиолетовой (406–410 нм) и красной (656–662 нм) области, также имеется максимум 498–508 нм [72].

Наряду с зелеными пигментами в хлоропластах содержатся пигменты, относящиеся к группе каротиноидов. Каротиноиды — это желтые и оранжевые пигменты алифатического строения, производные изопрена. Характерным представителем каротиноидов является β -каротин.

Каротиноиды содержатся во всех высших растениях и у многих микроорганизмов. Это самые распространенные пигменты с разнообразными функциями. Основными представителями каротиноидов у высших растений являются два пигмента — каротин (оранжевый) и ксантофилл (желтый). Каротин состоит из 8 изопреновых остатков. При разрыве углеродной цепочки пополам и образовании на конце спиртовой группы каротин превращается в 2 молекулы витамина А. Поглощение света каротиноидами, их окраска, а также способность к окислительно-восстановительным реакциям обусловлены наличием конъюгированных двойных связей. В отличие от хлорофиллов каротиноиды не поглощают красные лучи, а также не обладают способностью

к флуоресценции. Подобно хлорофиллу каротиноиды в хлоропластах находятся в виде нерастворимых в воде комплексов с белками [53,90,91].

1.3.7.2. Содержание пигментов в органах ели обыкновенной

Содержание зелёных пигментов ели в годичном цикле подвержено изменениям. По одним данным содержание хлорофиллов начинает увеличиваться летом и достигает максимума в осенние месяцы. Зимой содержание хлорофиллов постепенно снижается и весной достигает минимальной отметки. По другим данным содержание хлорофилла А существенно отличается от содержания хлорофилла Б. Осенью наблюдается параллельное уменьшение содержания обоих пигментов, но в ноябре, содержание хлорофилла А продолжает уменьшаться, хлорофилла Б увеличивается. В летние месяцы наблюдается обратная динамика [90].

Содержание каротиноидов в хвое имеет два максимума и два минимума. Первый максимум наблюдается весной до бутонизации, второй максимум наблюдается осенью. Среди каротиноидов в хвое ели, наибольшее содержание приходится на лютеин, около 70%. На долю виолаксантина приходится около 12%, неоксантина 10%, атераксантина 8% и зеаксантина до 5,5% от общей суммы каротиноидов. Для хвойных растений максимум накопления виолаксантина приходится на летне-осенний период, а зеаксантина в зимне-весенний период.

Заметное воздействие на синтез каротина оказывают почва и тип леса. В черничниковом типе леса ель накапливает его в хвое в среднем 90 мг/кг сухого сырья, а в брусничниковом – 78 мг/кг. *Picea abies* содержит меньшее количество хлорофиллов и каротиноидов, чем сосна и можжевельник. Но при этом содержание пигментов в хвое *picea abies* остаётся более стабильным в течение года [55,101].

1.4. Современное состояние микроскопических исследований древесной зелени и шишек ели обыкновенной

В литературе приводятся в основном данные анатомического строения хвои ели обыкновенной [103,124]. Шишкам ели обыкновенной уделяется гораздо меньшее внимание исследователей.

Фармакопейным видом сырья в России являются шишки ели обыкновенной. В Государственную фармакопею Российской Федерации XI издания включена фармакопейная статья «Шишки ели обыкновенной». Согласно фармакопейной статье «Шишки ели обыкновенной основными анатомическими диагностическими признаками являются: клетки эпидермиса, покрытые толстым слоем кутикулы; волоски сосочковидной или конической формы, расположенные на внутренней стороне; кутикула, маслянистые включения и содержимое смоляных ходов окрашивается раствором судана III в оранжевый цвет. В препарате кроющей чешуи с поверхности видны клетки эпидермиса с четковидно-утолщёнными оболочками, многоклеточные простые волоски на верхушке чешуи. В кожуре семени – толстостенные каменистые клетки с тёмно-бурым содержимым, крыло семени представлено клетками с четковидно-утолщёнными оболочками [27,115].

Однако микроскопические признаки шишки ели представлены не достаточно полно. Остаётся актуальным дальнейшее микроскопическое исследование, а так же получение микрофотографий диагностических признаков в соответствии с требованиями ОСТ 915500.05.001-00 [70].

Анатомическое строение хвои ели обыкновенной исследовано достаточно подробно. Клетки эпидермиса с толстым слоем кутикулы с внешней стороны. Кутикула защищает хвою от повреждения и потери влаги. В эпидермисе так же присутствуют устьица, с расположенными напротив субстомальными полостями. Под эпидермисом располагается слой гиподермы, представленный склеренхимными клетками, с сильно утолщёнными оболочками. Гиподерма придаёт хвое устойчивость к излому.

Мезофилл хвой ели обыкновенной представлен хлорофиллоносными паренхимными клетками. В мезофилле хвой, ближе к гиподерме находится смоляной ход.

Проводящий цилиндр окружает эндодерма со слегка одревесневшими стенками, в самом цилиндре находятся проводящие элементы (флоэма, ксилема), а так же трансфузионная ткань и клетки склеренхимы [102,103,124,136].

1.5. Фармакологическая активность БАВ ели обыкновенной и применение в медицине

Отвар из шишек ели обыкновенной обладает антибактериальным, спазмолитическим, отхаркивающим, противовоспалительным действием. Применяется при ангине, тонзиллитах, ларингитах, фарингитах, гайморитах, вазомоторных ринитах, а так же при катарах верхних дыхательных путей, пневмонии [87].

При почечнокаменной болезни и почечных коликах рекомендован к применению препарат «Пинабин», состоящий из смеси равных частей эфирного масла хвой ели или сосны с персиковым маслом. Препарат расслабляет гладкую мускулатуру мочевыводящих путей, а так же обладает антибактериальным действием [19].

Препарат «Ропрен» создан на основе полипренолов, выделенных из хвой ели обыкновенной (*Picea abies*). Препарат «Ропрен» проявляет гастропротективное и гиполипидемическое действие. В результате приёма ропрена происходит восстановление мембран гепатоцитов благодаря ингибированию процессов перекисного окисления. После двух недель приёма ропрена наблюдается снижение показателей активности аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз (АЛТ, АСТ). Нормализуется детоксикационная функция печени, содержание билирубина, повышенный уровень печёночных трансаминаз. Ропрен рекомендуется применять в

основном при: циррозе печени, токсическом поражении печени (алкогольные, лекарственные, наркотические), гепатитах, жировой дистрофии печени [88].

БАД «Лесмин» получают из хвои ели обыкновенной и сосны обыкновенной в состав которого входят: производные хлорофилла, каротиноды, витамин Е, витамины группы К, фитоситостерин, макро- и микроэлементы, полипренолы, сквален, фитонциды. Лесмин рекомендован: в качестве средства для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ, для повышения иммунитета и улучшения кроветворной функции, как сорбент при отравлениях (тяжёлыми металлами, лекарствами и т.д), для повседневной профилактики туберкулёза, для нормализации липидного обмена, при авитаминозах [71].

Простые фенольные соединения ели европейской обладает противовирусной активностью по отношению к вирусам гриппа А и В, РС вируса и ПГ-3. Сумма фенольных соединений, извлекаемых водой, в концентрации 2.5 мг/мл подавляет активность вирусов гриппа А и В уже через 10 минут в 100000 раз, а через 30 минут происходит их полная инактивация. Проявляют активность против возбудителей дизентерии, стафилококков, а так же обладают мощной фунгицидной активностью, в особенности против дерматофиллов [96].

Фенольные соединения и флавоноиды ели европейской с орто-дигидроксигруппой стимулируют активность 3-индолилуксусной кислоты и благодаря этому способствуют росту растений. Фенолы с мета-гидроксильной группой наоборот, ускоряют разрушение 3-индолилуксусной кислоты, угнетая рост растений [43,129].

Эфирное масло молодых побегов ели обыкновенной оказывает антибактериальное действие в основном против грамм - положительных микроорганизмов, и практически не активно против грамм – отрицательных [16,114].

Стильбены обладают высокой фунгистатической активностью в том числе и к дереворазрушающим грибам, а так же действуют угнетающе на центральную нервную систему [31,110].

Хлорофиллин натрия, выделенный из древесной зелени ели, оказывает положительное действие при лечении лейкоза у детей [110].

Тритерпеновый спирт древесной зелени ели – β -ситостерин обладает гипополипидемической активностью. Он может быть рекомендован больным с нарушениями липидного обмена [52].

Алкалоиды ели обыкновенной выполняют защитную функцию против насекомых и травоядных млекопитающих [130]. В литературе имеются данные о антибактериальной активности алкалоидов ели обыкновенной против штаммов: *Candida glabrata* и *Candida Albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Cereus*, *Salmonella enterica* [108,138].

Полисахаридные фракции шишек ели обладают противоопухолевым действием. Внутривенное введение полисахаридных фракций в дозе 10-20 мг/кг, через 24 часа после трансплантации опухоли, значительно увеличивало время выживания мышей. Найдена противовирусная активность против вируса гриппа и герпес вируса. Введение полисахаридных фракций шишек ели, мышам, инфицированным *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, значительно увеличивало время выживания мышей [127].

Полисахаридные фракции хвои ели обладают антиатерогенной активностью, по способности связывать атерогенные липопротеиды кислая полисахаридная фракция превосходит гепарин. Так же полисахариды хвои достоверно улучшают фагоцитарный показатель [69].

Благодаря низкой степени этерификации, пектины хвойных растений могут использоваться в качестве средств профилактики отравлений, интоксикаций на вредном производстве. Так же могут использоваться для производства мармелада с подобными свойствами [95].

Выводы к главе 1.

1. Обобщены данные об ареале произрастания и ботанической характеристике ели обыкновенной. Ареал вида захватывает север, восток и юго-запад Европы и часть Азии. Из этого следует, что ель обыкновенная является широко распространенным растением на территории России и Пермского края, поэтому дальнейшее фармакогностическое исследование данного вида является актуальным.
2. Наиболее изучен у ели обыкновенной химический древесной зелени, хвои и коры ели, тогда как данные по химическому составу шишек в литературе в литературе встречаются реже.
2. Наиболее изученным классом веществ древесной зелени ели обыкновенной являются фенольные соединения. Древесная зелень ели богата простыми фенольными соединениями преобладающим из них является п-гидроксиацетофенон, содержание которого выше чем у других представителей семейства *Pinaceae*.
3. Древесная зелень ели содержит значительное количество аминокислот, в том числе незаменимых, а так же витаминов (в хвое ели в 6 раз больше аскорбиновой кислоты, чем в лимоне и апельсине, и в 25 раз больше, чем в луке и картофеле). Следовательно, древесную зелень ели обыкновенной можно рассматривать в качестве концентратора аскорбиновой кислоты.
4. Состав эфирного масла ели является многокомпонентным. Преобладающими компонентами в составе эфирного масла являются монотерпены.
5. Слабо изучены полисахариды ели обыкновенной. Основное количество научных работ посвящено изучению моно и олигосахаридов ели. Хотя, водорастворимые полисахариды и пектины сосны, пихты и лиственницы в настоящее время пользуются популярностью исследователей.
6. Ель обыкновенная используется в официальной медицине. На основе БАВ ели получены такие препараты как: «Пинабин» и «Ропрен». В литературе

имеются данные о наличии фармакологической активности у разных групп БАВ ели.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись: древесная зелень (охвоенные ветви ели обыкновенной диаметром не более 8 мм) и шишки ели обыкновенной (*Picea abies*). Образцы сырья собраны на территории Ильинского, Красновишерского, Ординского районов Пермского края в период с 2011 по 2015 год. Данные об объектах исследования приведены в таблицах 3-4.

Таблица 3 - Образцы древесной зелени ели обыкновенной

№ образца	Место сбора образца	Дата сбора
1	2	3
1	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Рябова	Июль 2011 г.
2	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Рябова	Ноябрь 2011 г.
3	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Рябова	Апрель 2012 г.
4	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Рябова	Август 2013- Август 2014 г.
5	Пермский край, Ильинский р/он, правый берег реки Обва	Август 2013- Август 2014 г.
6	Пермский край, Ильинский р/он, левый берег реки Обва	Август 2013- Август 2014 г.
7	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Малахи	Август 2013- Август 2014 г.
8	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Гари	Август 2013- Август 2014 г.
9	Пермский край, Красновишерский район, окр. п. Сейсмопартия	Ноябрь 2014 г.

Продолжение таблицы 3

1	2	3
10	Пермский край, Ординский район, окр. д. Опачёвка	Ноябрь 2014 г.
11	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Демёнки	Январь 2015 г.
12	Пермский край, Ильинский р/он, окр. д. Рябова	Апрель-май 2015 г.

Таблица 4 - Образцы шишек ели обыкновенной

№ образца	Место сбора образца	Дата сбора
1	2	3
1	Пермский край, Ильинский район, окр. д. Рябова	Июнь 2011 г.
2	Пермский край, Ильинский район, окр. д. Демёнки	Июнь 2011 г.
3	Пермский край, Ильинский район, окр. села Сретенского	Июнь 2011 г.
4	Пермский край, Красновишерский район, окр. п. Сейсмопартия	Июнь 2011 г.
5	Пермский край, Ординский район, окр. д. Опачёвка	Июнь 2011 г.
6	Пермский край, Ильинский район, окр. д. Рябова	Июль 2012 г.
7	Пермский край, Красновишерский район, окр. п. Сейсмопартия	Июль 2012 г.
8	Пермский край, Ординский район, окр. д. Опачёвка	Июль 2012 г.

Продолжение таблицы 4

1	2	3
9	Пермский край, Ильинский район, окр. д. Малахи	Июль 2013 г.
10	Пермский край, Ильинский район, окр. д. Рябова	Июль 2014 г.

Шишки ели обыкновенной были собраны летом до созревания семян и высушены воздушно-теневым способом.

Древесную зелень ели обыкновенной заготавливали с диаметром ветвей не более 0,8 см, согласно ГОСТ 21769-76 [24]. Заготовка сырья древесной зелени для исследования влияния на химический состав БАВ сезона года, проводилась круглогодично. Для получения эфирного масла использовали свежее сырьё древесной зелени, для остальных исследований использовалось сырьё, высушенное воздушно-теневым способом.

2.2. Методы исследования эфирных масел

2.2.1. Определение содержания эфирного масла

Содержание эфирного масла определяли методом 1 (ГФ XI с. 290) [26]. Навеску измельченного сырья около 20 г (точная навеска) помещали в широкогорлую круглодонную колбу вместимостью 1000 мл (а), приливали 300 мл воды и закрывали резиновой пробкой (б) с обратным холодильником (в). В пробке снизу укрепляли металлические крючки, на которые при помощи тонкой проволоки подвешивали градуированный приёмник (г). Колбу с содержимым нагревали и кипятили в течение 2 часов. После окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры, измеряли объём масла в градуированной части. Содержание эфирного масла в объёмно – весовых процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)},$$

где V – объём эфирного масла в мл; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе высушивании сырья в %.

Цена деления градуированной части приёмника 0,025 мл.

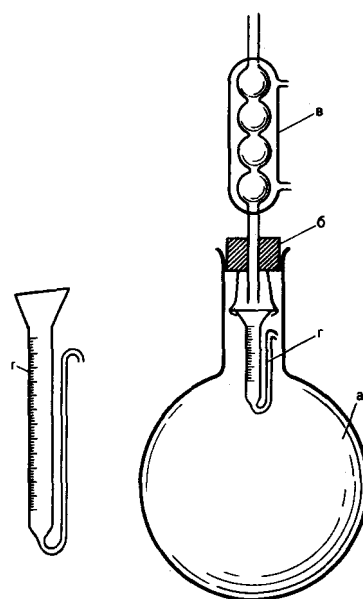
а – широкогорлая круглодонная колба

б – резиновая пробка

в – обратный шариковый холодильник

г - градуированный приемник

Рисунок 5. Прибор для определения содержания эфирного масла методом 1.



2.2.2. Получение фракций эфирного масла

Фракции эфирного масла получали с помощью аппарата Гинзберга [25]. Навеску измельчённой древесной зелени массой 100 г помещали в широкогорлую круглодонную колбу вместимостью 1000 мл (а), приливали 300 мл воды и закрывали резиновой пробкой (б) с обратным холодильником (в). В пробке снизу укрепляли металлические крючки, на которые при помощи тонкой проволоки подвешивали градуированный приёмник. Для получения фракций, через 30, 60 и 120 мин (фракции № 1,2,3 соответственно) собирали эфирное масло с помощью шприца в ампулу, а в колбу помещали чистый приемник и продолжали отгонку. Затем изучали компонентный состав каждой собранной фракции.

2.2.3. Газожидкостная хроматография эфирных масел

Эфирное масло получали методом Гинзберга [26]. 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 мин (фракции 1,2,3 соответственно), с помощью

одноразового шприца и запаивали в ампулы. После сбора каждой фракции в колбу помещали чистый приёмник.

Хромато-масс-спектрометрический анализ эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C. Температура испарителя 250 °C, t^0 колонки – 70 °C, выдерживается в течение 5 мин, а затем повышается до 310 °C со скоростью 10 °C в минуту и выдерживается в течение 10 мин. Температура интерфейса – 310 °C, объём вводимой пробы 1 мкл, газ носитель гелий, деление потока – 1:10, ионизация методом электронного удара.

2.3. Методы исследования полисахаридов

2.3.1. Определение содержания полисахаридов

Содержание полисахаридов определяли по методике, разработанной Бубенчиковым Р.А. [10].

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром 2 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляли 200 мл воды, нагретой до температуры кипения. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, и извлекали полисахариды при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяли дважды, прибавляя 200 и 100 мл воды.

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

25 мл раствора А помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 75 мл спирта 96%, перемешивали, подогревали на водяной бане в течение 30 мин. Содержимое колбы фильтровали через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр. Остаток на

фильтре предварительно промывали 15 мл смеси спирта 96% с водой (3:1), 10 мл смеси этилацетата и спирта 96% (1:1). Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, затем в сушильном шкафу, при температуре 100-105 °С до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)},$$

X – содержание полисахаридов, %;

m_1 - масса фильтра, г;

m_2 - масса фильтра с осадком, г;

m - навеска сырья, г;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %

2.3.2 Получение полисахаридных фракций

Полисахаридные фракции из древесной зелени и шишек ели обыкновенной выделяли по методу Н.К. Кочеткова [64], адаптированной нами для ели обыкновенной.

Навеску воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц диаметром 5 мм. Для удаления пигментов, смоляных кислот, фенольных соединений, навеску сырья около 100 г предварительно экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета до появления чистого растворителя.

Далее из сырья экстрагировали водорастворимый полисахаридный комплекс горячей водой в соотношении 1:10 при температуре 80 °С. Экстракцию повторяли 2 раза в тех же условиях. Объединённые экстракты упаривали под вакуумом и осаждали водорастворимый полисахаридный комплекс трёхкратным количеством спирта 96%.

Шрот после выделения водорастворимого полисахаридного комплекса экстрагировали в течение часа смесью аммония оксалата раствора 0,25% (ГФ

XII. С. 233) и щавелевой кислоты раствора 0,25% (ГФ XII. С. 419) (1:1), в соотношении 1:10. Экстракцию повторяли дважды в тех же условиях. Добавление оксалата аммония и щавелевой кислоты приводит к обменной реакции образования нерастворимых оксалатов кальция и магния, при этом происходит разрушение поперечных мостиков между цепями протопектина без значительного снижения степени полимеризации углеводных цепей. Извлечения объединяли, упаривали под вакуумом и осаждали протопектины добавлением четырёхкратного количества спирта 96%. Полученные фракции очищали многократным промыванием спиртом 80%.

2.3.3. Качественные реакции на полисахариды

Реакции проводили на отваре ели обыкновенной шишек и древесной зелени по методике (ГФ XI с. 147) [27].

1. Реакция осаждения спиртом 96%. К 10 мл извлечения прибавляли 30 мл спирта 96% и перемешивали. Наблюдали появление хлопьевидных сгустков.
2. Реакция с 5% раствором тимола (ГФ XII. С. 385) [28] и серной кислоте концентрированной. К 0,5 мл извлечения прибавляли 2-3 капли 5% раствора тимола и осторожно наслаивали 1 мл серной кислоты концентрированной. Наблюдали появление коричневого кольца на границе слоёв жидкости.
3. Реакция с 0,2% раствором антраона в серной кислоте концентрированной. К 0,5 мл извлечения прибавили 2 мл 0,2% раствора антраона в серной кислоте концентрированной. Пробирку встряхивали и оставляли на 15 мин. Наблюдали появление тёмно-синего окрашивания [49].

Приготовление раствора 0,2% раствора антраона в серной кислоте концентрированной. Около 0,2 г антраона (ТУ 6-09-081833.ч) (точная масса), перекристаллизованного из бензола (ГОСТ 595575 ч.д.а.), помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли около 1,0 г тиомочевины (ГОСТ 6344-73 ч.д.а.) (точная масса), растворяли в небольшом количестве серной

кислоты концентрированной и доводили объем раствора в колбе этим же растворителем до метки.

Перекристаллизация антрона. 10 г антрона растворяли в 90 мл горячего бензола (ГОСТ 5955-75). К полученному раствору медленно, при постоянном перемешивании, по каплям прибавляли 30 мл холодного эфира петролейного. Выпавший осадок (кристаллы светло-зеленого цвета) отфильтровывали.

2.3.4. Хроматографический анализ полисахаридов

Для определения моносахаридного состава, выделенных фракций, проводили их кислотный гидролиз раствором серной кислоты 2М в запаянных ампулах при 105 °С в течение 10 часов. Моносахаридный состав гидролизатов определяли с помощью восходящей хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии на пластинах «Силуфол» и «Сорбфил», в системах растворителей: БУВ 4:1:5, этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода 18:3:1:4. Хроматограммы обрабатывали анилинфталатным реактивом, проявляли в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С до появления окраски [22].

2.3.5. Определение физико-химических характеристик полисахаридов

Влажность полисахаридных фракций древесной зелени шишек ели обыкновенной определяли на анализаторе влажности «Эвлас 2М». Зольность определяли по методике, приведённой в ГФ XII издания [137]. Молекулярную массу полученных фракций определяли вискозиметрическим методом [49].

Определение содержания свободных и этерифицированных карбоксильных групп проводили по методике (Данченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов) [25,39].

К навеске полисахаридов около 1,0 г (точная навеска), смоченных спиртом для предотвращения комкования, при перемешивании добавляли 100 мл воды, нагретой до 40 °С для лучшего растворения. Навеску полисахаридов растворяли в течение 2-х ч при периодическом перемешивании и титровали

0,1 М раствором NaOH до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с. Индикатор – фенолфталеин. Содержание свободных карбоксильных групп (K_{CB}) находили по формуле:

$$K_{CB} = \frac{V_{NaOH}}{a} \cdot 0.45\%,$$

где V_{NaOH} – количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшее на титрование, мл, 1 мл NaOH соответствует 0,0045 г карбоксильных групп, а – навеска полисахаридов, г.

К нейтрализованной пробе при определении свободных карбоксильных групп, добавляли 50 мл 0,1 М раствора NaOH для омыления метоксилированных карбоксильных групп. Колбу оставляли на 2 ч в темноте при комнатной температуре. После омыления метоксилированных карбоксильных групп, в колбу добавляли 50 мл 0,1 М раствора HCl, её избыток оттитровывали 0,1 М раствором NaOH. Количество этерифицированных карбоксильных групп ($K_{Эт}$) определяли по формуле:

$$K_{Эт} = \frac{V_{NaOH}}{a} \cdot 0.45\%,$$

где V_{NaOH} – объём 0,1 М раствора NaOH, пошедший на второе титрование, мл, а – навеска полисахаридов, г.

Общее количество карбоксильных групп находили путём суммирования количества свободных и этерифицированных групп:

$$K_{общ} = K_{CB} + K_{Эт}, \%$$

Степень этерификации (СЭ) определяли как отношение содержания этерифицированных групп к общему содержанию карбоксильных групп:

$$СЭ = \frac{K_{Эт}}{K_{общ}} \cdot 100\%$$

2.4. Методы исследования элементного состава

Для изучения микроэлементного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной использовали рентгено-флюоресцентный метод. Навеску около 10 г сухого сырья измельчали до порошка, помещали в тигель и сжигали на

плитке до прекращения дымления. Затем, тигли помещали в муфельную печь при температуре 600 °С, выдерживали в муфельной печи около 2 ч, до полного озоления и отсутствия черной угольной массы. После полного охлаждения тиглей добавляли азотную кислоту 50% (ГФ XII. С. 223) [28] и выпаривали её на плитке, избегая разбрызгивания, затем помещали в муфельную печь при температуре 600 °С на 1 ч. После этого в зольном остатке проводили качественный и количественный анализ элементного состава на энергодисперсионном спектрометре Quantix.

2.5. Методы исследования пигментов

2.5.1. Исследование качественного состава пигментов хвои ели обыкновенной

Определение пигментов хвои ели обыкновенной методом бумажной хроматографии проводили по (Сапожникову Д.И и др. 1955) [99].

Навеску сырья около 0,5 г, тщательно растирали в сухой фарфоровой ступке с небольшим количеством углекислого кальция (на кончике шпателя) до сухого мелкого порошка. Измельченное сырьё настаивали в течение 5 мин с 3-5 мл растворителя (смесь спирта 96% и ацетона в соотношении 3:1). После отстаивания, экстракт осторожно сливали. Для окончательной экстракции пигментов порошок промывали порцией спирта 96%, и общий объем экстракта доводили растворителем до 10 мл.

На два листа хроматографической бумаги размером 18×18 см на расстоянии 2 см от нижнего края, полосой в 12 см наносили по 1 мл полученной вытяжки пигментов. После нанесения вытяжки бумагу хорошо подсушивали до полного испарения растворителя, свортывали в цилиндр и помещали в хроматографическую камеру для разгонки.

В камеру предварительно (за 15 мин) наливали 30 мл смеси бензол-петролейный эфир (в объемном отношении 2:1). Уровень растворителя должен быть ниже нанесенной полосы пигментов. Камеру плотно закрывали.

Через 30 мин, когда фронт растворителя поднялся на 12 см, хроматограмму вынимали и подсушивали.

2.5.2. Исследование содержания пигментов

Количество хлорофиллов а/б и сумму каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом с использованием методических разработок (Ермакова Е.А., 1988) [41].

Навеску хвои около 0,15 г (точная навеска) помещали в фарфоровую ступку, добавляли диоксида кальция (на кончике шпателя), промытого кварцевого песка и растирали с 2-3 мл ацетона. К растертой массе добавляли 4-5 мл ацетона и снова растирали несколько минут. После отстаивания раствора экстракт осторожно сливали по палочке в воронку с фильтром. Экстракцию небольшими порциями растворителя повторяли до полноты экстракции пигментов. Затем фильтрат переливали через сухую стеклянную воронку в мерную колбочку на 25 мл. Далее содержимое колбочки доводили растворителем до метки, закрывали каучуковой пробкой, тщательно взбалтывали, и использовали для определения концентрации пигментов.

Оптические плотности пигментных вытяжек определяли с помощью спектрофотометра СФ 2000 по центрам поглощения: для хлорофиллов а и б – 644 и 662 нм, для каротиноидов – 440,5 нм.

Концентрацию пигментов рассчитывали по уравнению для 100% ацетона (по Хольму-Веттштейну):

$$C_{\text{хл.а}} = 9,784 D_{662} - 0,990 D_{644};$$

$$C_{\text{хл.б}} = 21,426 D_{644} - 4,650 D_{662};$$

$$C_{\text{хл.а}} + \text{хл.б} = 5,134 D_{662} + 20,436 D_{644};$$

$$C_{\text{кар.}} = 4,695 D_{440,5} - 0,268 C_{\text{хл.а}} + \text{хл.б}$$

Определив концентрацию пигмента, находили его содержание в опытном материале в процентах от массы хвои, по формуле:

$$A = \frac{C \times V}{P \times 1000}, \text{ где}$$

A – содержание пигмента в мг на 1 грамм навески;

C – концентрация пигмента в мг/л;

V – объём вытяжки пигмента (мл);

P – навеска хвои (г).

2.6. Определение аскорбиновой кислоты в древесной зелени ели обыкновенной

2.6.1. Качественный анализ аскорбиновой кислоты

Для обнаружения и идентификации витамина C в сырье использовали метод тонкослойной хроматографии [53].

Навеску сырья массой около 1 г, заливали 10 мл спирта 40%, перемешивали, оставляли на 15 мин и фильтровали. На линию старта пластинки «Силуфол» с помощью капилляра наносили 0,01 мл полученного извлечения, в качестве свидетеля использовали 0,01 мл 0,1% раствора РСО аскорбиновой кислоты. Хроматографическую пластинку помещали в предварительно насыщенную хроматографическую камеру со смесью растворителей: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5), и хроматографировали восходящим способом. По окончании хроматографирования пластинку вынимали из камеры, высушивали и просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм.

2.6.2. Исследование содержания аскорбиновой кислоты

Проводили по методике определения содержания аскорбиновой кислоты в плодах шиповника (ГФ XI выпуск 2. С. 294) [27]. Навеску сырья массой 20 г, помещали в фарфоровую ступку, где тщательно растирали со стеклянным порошком (около 5 г), постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивали 10 мин. Затем смесь размешивали и извлечение фильтровали. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносили 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2% раствора хлористоводородной кислоты, 13 мл воды, перемешивали и титровали из микробюретки 0,001 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (ГФ XI. вып. 1. С. 296) до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30-60 с. Титрование продолжали не более 2 мин. В случае интенсивного

окрашивания фильтрата или высокого содержания в нем аскорбиновой кислоты [расход 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия более 2 мл], обнаруженного пробным титрованием, исходное извлечение разбавляли водой в 2 раза или более.

Содержание аскорбиновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 0,000088 \times 300 \times 100 \times 100}{m \times 1 \times (100 - W)},$$

где 0,000088 - количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, в граммах; V - объем 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, пошедшего на титрование, в миллилитрах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.7. Методы микроскопического исследования

Анатомические признаки шишек и хвои ели обыкновенной 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.

Микропрепараты готовили согласно фармакопейной методике микроскопического и микрохимического изучения лекарственного растительного сырья (ГФ XII. С. 160) [28]. Реактивы были приготовлены по общепринятым методикам [28,40].

Кутикулу, содержащее смоляных ходов, эфирное масло окрашивали раствором Судана III. Срезы помещали на часовое стекло в раствор Судана III (ГФ XI. вып. 1. С. 299) [26] около 15 мин, промывали водой и помещали в глицерин на предметном стекле. Окрашиваемые элементы наблюдались под микроскопом в жёлто-оранжевом свете.

Кроющие чешуи шишки перед приготовлением микропрепарата просветляли кипячением с натрия гидроксида раствором 5% (ГФ XI. вып. 1. С. 300) [26] в течение 10 минут. При этом клетки приобретали красно-жёлтую окраску.

Были приготовлены временные микропрепараты шишек: поперечный срез верхней, центральной, нижней части семенной чешуи, препарат кроющей чешуи с поверхности, препарат крыла семени с поверхности. Измерены: толщина среза семенной чешуи, волоски наружной и внутренней поверхности семенной чешуи, клетки склеренхимы, паренхимы, смоляные ходы; клетки кроющей чешуи, волоски кроющей чешуи, устьица; клетки крыла семени. Так же приготовлены временные микропрепараты поперечного среза хвои ели обыкновенной, ели сибирской, пихты сибирской. Результаты измерений статистически обработаны программы *Microsoft office excel* 2007.

2.8. Методы фармакологических исследований

2.8.1. Исследование острой токсичности

Эксперименты выполнены на 64 белых нелинейных мышах обоего пола, массой 24-30 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Мыши содержались в специальных клетках в условиях стационарного вивария. В работе соблюдались правила по содержанию, защите, использованию лабораторных животных, а также рекомендаций из руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [82].

Для исследования использовали экспресс метод определения средней летальной дозы Прозоровского В.В [76]. Вещества вводили однократно в дозах от 1000 до 5000 мг/кг, перорально с помощью желудочного зонда. После введения экстракта оценивали состояние животных в течение 6 ч непрерывно. Отмечали отсутствие или наличие случаев летальности животных. По результатам эксперимента вещества относили к классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007-7.

2.8.2. Исследование противовоспалительной активности

Определение противовоспалительной активности полисахаридов древесной зелени и шишек ели обыкновенной, проводили на крысах массой 180-220 г, обоего пола, группа включала 6 животных. Животные содержались в виварии на обычном рационе при свободном доступе к воде.

Определение противовоспалительной активности проводили на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1% водного раствора каррагинина. Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отёка, оценивали онкометрически [82] до введения и через 4 ч после введения раствора каррагинина. Исследуемые вещества вводили перорально в дозе 50 мг/кг за 1 ч до введения флогогенного агента. Контролем служили животные, не получавшие препарата. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента.

О наличии противовоспалительной активности судили по выраженности торможения воспалительной реакции.

2.8.3. Исследование антибактериальной и противогрибковой активности эфирного масла древесной зелени

Антибактериальную и противогрибковую активность эфирного масла определяли диско-диффузионным методом в агаре на твердых питательных средах. Для этого в чашки Петри одинакового диаметра, с ровным плоским дном, установленные на горизонтальном столике, разливали расплавленный мясопептонный агар (МПА). Затем засеивали сплошным «газоном» тест – микроорганизмы в разведении 10^{-5} . В качестве тест – культур использовали суточные бульонные культуры микроорганизмы *Staphylococcus aureus* 6538P ATCC, *Escherichia coli* 25922 ATCC, и 48-часовую бульонную культуру *Candida albicans* ATCC 885-653. На засеянную поверхность помещали диск, пропитанный 0,5 мл испытуемых фракций эфирного масла ели обыкновенной.

Чашки выдерживали в термостате при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 24 ч (для бактерий) и при $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, в течение 48 ч (для грибов). По диаметру зон задержки роста тест-микроорганизмов судили об активности эфирного масла [120].

2.8.4. Исследование антибактериальной и противогрибковой активности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек

Антибактериальную активность определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [98]. Определение проводили в отношении фармакопейных штаммов: Гр+ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, Гр- *Escherichia coli* ATCC 25922.

Посевы проводили в мясопептонный бульон, pH 7,0, с различной концентрацией испытуемых соединений. Далее готовили ряд серийных разведений соединения с двукратно уменьшающейся концентрацией. Культуры выращивали на скошенной агаризированной среде. Для исследования использовали 18-20 ч культуру. Для приготовления рабочей взвеси микробов производили смыв выросшей культуры изотоническим раствором натрия хлорида и изготавливали исходное разведение с концентрацией 500 млн. микробных тел в 1 мл смыва по бактериальному стандарту. Полученную взвесь разводили стерильным МПБ в 100 раз. Этот рабочий раствор (концентрация 5 млн. микробных тел в 1 мл) в количестве 0,1 мл вносили в пробирки с серийными разведениями изучаемого соединения. В итоге, микробная нагрузка при определении антимикробной активности составила 250 000 микробных тел в 1 мл.

Фиксацию результатов производили через 18-20 часов выдержки контрольных и опытных пробирок в термостате при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Отмечали наличие или отсутствие роста бактериальных культур под действием исследуемых соединений. За действующую дозы принимали минимальную подавляющую концентрацию веществ (МПК, мкг/мл), которая задерживает рост соответствующего тест-микроба. Последняя пробирка с

задержкой роста (прозрачный бульон) соответствует МПК препарата в отношении данного штамма.

Противогрибковую активность определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [98]. Определение проводили в отношении фармакопейного штамма: *Candida albicans* ATCC 885-653. Посевы проводили в жидкую среду Сабуро с различной концентрацией испытуемых соединений. Для определения противогрибковой активности использовалась 18-20 часовая культура. Для приготовления рабочей взвеси грибка производили смыв выросшей культуры изотоническим раствором натрия хлорида и изготавливали исходное разведение с концентрацией 500 млн. грибковых тел в 1 мл смыва по стандарту. Полученную взвесь разводили стерильной жидкой средой Сабуро в 100 раз. Этот рабочий раствор (концентрация – 5 млн. грибковых тел в 1 мл) в количестве 0,1 мл вносили в пробирки с серийными разведениями изучаемого соединения. Таким образом, нагрузка при определении противогрибковой активности составила 150000 грибковых тел в 1 мл. Учёт результатов проводили через 18-20 ч выдержки контрольных и опытных пробирок при температуре 25 °С. Регистровали наличие или отсутствие роста грибковой культуры под действием полисахаридных фракций.

За действующую дозу принимали минимальную подавляющую концентрацию (МПК, мкг/мл), которая задерживает рост соответствующего тест-гриба. Последняя пробирка с задержкой роста (прозрачная пробирка) соответствует МПК вещества в отношении данного штамма.

2.8.5. Исследование сорбционной активности

Сорбционную активность полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной определяли по методике на уголь активированный осветляющий древесный порошкообразный [5]. Навеску полисахаридов около 0,15 г (точная навеска) исследуемого образца помещали в колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 200 мл рабочего стандартного образца РСО метиленового

синего, встряхивали в течение 1 ч, отбирали аликвоту объемом 5 мл, помещали в стакан и при перемешивании добавляли 20 мл спирта 96% (для осаждения комплекса полисахаридов с красителем, который не полностью удаляется центрифугированием).

Затем центрифугировали, отбирали аликвоту 1 мл и прибавляли 2 мл спирта 96%, смешивали и измеряли оптическую плотность. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца первого РСО₁ метиленового синего. Для его приготовления также отбирали аликвоту 1 мл РСО, прибавляли 2 мл спирта 96% и смешивали. В качестве раствора сравнения использовали спирт 96%. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Сорбционную активность в миллиграммах метиленового синего на один грамм абсолютно сухого образца (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(A_1 \cdot A_0) \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 1000 \cdot 100}{A_1 \cdot 1000 \cdot 50 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора; A_1 – оптическая плотность раствора РСО₁ метиленового синего; m_0 – навеска испытуемого образца, г; m_1 – навеска РСО метиленового синего, г; W – влажность испытуемого образца, %.

2.9. Общие методики стандартизации сырья

Настоящий проект Фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки» разрабатывался в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения», ГФ XII, часть 1, «Руководством по стандартизации лекарственных средств», «Планом построения ФС на лекарственное растительное сырье» для включения в ГФ XII, предложенным ЦФМС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, взамен статьи 81 ГФ XI издания, выпуск 2 «Шишки ели обыкновенной» - «*Strobili piceae abietis*».

2.9.1. Отбор проб для анализа

Отбор проб для товароведческого анализа ели обыкновенной шишек проводили в соответствии с ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб» [73].

2.9.2. Качественные реакции

Приготовление извлечения ели обыкновенной шишек (ГФ XI стр. 147).

1. На предметное стекло наносят 1 каплю отвара ели шишек, добавляют 1 каплю 1% раствора железоаммонийных квасцов (ГФ XI стр. 300, постепенно появляется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).
2. На предметное стекло наносят 1 каплю отвара, добавляют 1 каплю свежеприготовленного раствора желатина, появляется белый осадок (дубильные вещества).

Приготовление 1% раствора желатина (ГОСТ 11293-89). 1 грамм желатина отвешивают в мерную колбу на 100 мл, заливают водой и оставляют набухать при комнатной температуре $1,5 \pm 0,5$ ч. Колбу с набухшим желатином помещают в термостат при температуре 55 °С и при осторожном перемешивании растворяют желатин 30-40 минут. Раствор фильтруют и доводят водой до метки.

2.9.3. Круговая бумажная хроматография

Приготовление отвара ели обыкновенной шишек (ГФ XI с. 147) [27]. Сырье, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 10 мм, заливают водой комнатной температуры в соотношении 1:10. Настаивали в плотно закрытом инфундирном аппарате или в соответствующей емкости на кипящей водяной бане при частом перемешивании в течение 30 мин. Процеживали без предварительного охлаждения.

На бумажную хроматографическую пластинку, на точку старта наносили 0,05 мл извлечения упаренного наполовину.

Пластинку с нанесенной пробой сушили на воздухе в течение 10 мин, помещали в камеру с уксусной кислотой 15% и хроматографировали. Когда фронт подвижной фазы пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, сушат под тягой в течение 15 мин, опрыскивали 2% спиртовым раствором алюминия хлорида (ГФ XI стр. 226) и выдерживали в сушильном шкафу при температуре $(100 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, затем просматривали в УФ – свете при 254 нм.

2.9.4. УФ-спектроскопия

Спектр поглощения раствора Б, (полученного по стандартной методике определения флавоноидов в траве зверобоя, ГФ XI с.) [27], в области от 300 до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 396 нм (рутин).

Приготовление отвара ели обыкновенной шишек (ГФ XI с. 147) [27].

2.9.5. Определение числовых показателей

Определение числовых показателей ели обыкновенной шишек: влажности, золы общей, золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной, содержания эфирного масла, экстрактивных веществ, дубильных веществ, примесей, проводили по стандартным методикам ГФ XI и ГФ XII издания [26,27,28].

2.9.6. Определение микробиологической чистоты

Определение микробиологической чистоты проводили согласно статье ГФ XII «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» [28].

2.9.7. Определение сроков годности сырья

Срок годности сырья определяли на образцах, хранившихся в сухом, хорошо проветриваемом помещении, в защищенном от света месте, в

бумажных мешках по ГОСТ 17768-90 в лабораторных условиях. На протяжении всего срока хранения, проводили анализ содержания БАВ (эфирного масла, экстрактивных веществ, дубильных веществ) испытания проводили в 5 повторностях. Определение числовых показателей проводили по методикам ГФ XI и ГФ XII издания [26,27,28].

ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ И ШИШЕК ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

3.1. Исследование эфирного масла

Эфирные масла являются одним из наиболее ценных классов веществ ели обыкновенной. Компонентный состав эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной изучен не достаточно полно и нуждается в дальнейших исследованиях.

Эфирное масло получали с помощью аппарата Гинзберга (раздел 2.2.1). Компонентный состав эфирного масла определяли на газожидкостном хроматографе (раздел 2.2.2).

3.1.1. Сравнительное исследование компонентного состава эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной

Представляло интерес изучить компонентный состав эфирного масла разных органов ели обыкновенной. Образцы древесной зелени (Таблица 3, образец № 2) и шишек (Таблица 4, образец № 1) были собраны осенью с деревьев, произрастающих в одинаковых условиях на территории Ильинского района Пермского края.

Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Компонентный состав эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной

№ п/п	Компоненты эфирного масла	Образцы эфирного масла древесной зелени					
		Ель № 1	Ель № 2	Ель № 3	Ель № 4	Ель № 5	Ель № 6

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8
1	β -пинен	+	-	+	+	+	+
2	β -мирцен	-	-	+	+	+	+
3	Δ^3 -карен	+	-	+	+	+	+
4	4-карен	-	-	+	+	+	+
5	Лимонен	-	+	-	+	+	+
6	α -пинен	+	+	+	+	+	+
7	Камфора	+	+	-	+	+	+
8	Оцимен	-	-	+	+	+	-
9	Борнеол	+	+	+	+	+	+
10	Терпинен-4-ол	+	+	+	+	+	+
11	α -терпинен	+	+	+	+	+	+
12	Геранилгераниол	-	-	+	-	-	-
13	Камфен	-	+	+	+	+	+
14	Лигустрал	-	-	+	-	-	-
15	Борнеол	+	+	+	+	+	+
16	Борнил ацетат	+	+	+	+	+	+
17	Цис- α -сантаол	-	-	+	-	-	-
18	Лонгициклен	-	-	+	-	-	-
19	Фарнезол	+	+	+	+	+	+
20	Цедрен	-	+	+	+	-	+
21	2-Метил-2-борнен	+	+	-	-	-	-
22	α -Калакорен	-	+	-	-	+	-
23	Каур-16-ен	-	-	-	+	-	-
24	Кариофиллен	+	+	+	+	+	+
25	α -бисаболол	-	+	+	-	+	+
26	Изоаромадендрен эпоксид	-	-	+	+	+	+

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8
27	Копаен	+	+	+	+	+	+
28	1н-Циклопропазулен-7-ол-декагидро-1,1,7-триметил-4-метилен	-	-	+	-	-	-
29	Спатуленол	-	+	+	-	+	+
30	Нафтален	+	+	+	-	-	+
31	1,4-Метаноазулен-9-ол-декагидро-1,5,5,8а-тетраметил	-	-	+	-	+	+
32	Мууролол	-	-	+	-	+	-
33	Транс-а-бергамотен	-	+	-	-	-	-
34	Каур-16-ен	-	-	-	+	-	-
35	Неролидол	-	+	-	-	-	-
36	Глобулол	-	-	-	+	+	-
37	Фитол	-	+	+	-	-	+
38	7-Ацетил-2-гидрокси-2-метил-5-изопропилбициклононан	-	-	+	+	+	+
39	α -кадинол	+	+	+	-	+	+
40	Сквален	+	+	+	+	+	+

Анализ показал, что компонентный состав в образцах эфирного масла древесной зелени не является однородным (Таблица 5). Основные компоненты (α –пинен, борнилацетат, борнеол и др.) присутствуют в каждом образце. Компоненты эфирного масла, по которым образцы отличаются друг от друга, могут быть нативными или возникают в процессе перегонки и анализа

эфирного масла [92]. Так например, такие компоненты как терпинен-4-ол, α -терпинеол образуются преимущественно в процессе гидродистилляции, в результате гидролиза, дегидратации, карбо- и гетероциклизации других соединений.

Фитол – дитерпеновый ациклический спирт, есть все основания полагать, что он является нативным. Но, поскольку фитол входит в состав молекулы хлорофилла, то при длительном кипячении может протекать гидролитическая деструкция хлорофилла и высвобождение фитола. В компонентном составе эфирного масла древесной зелени преобладающими являются основные 15—20 компонентов, а по присутствию остальных, образцы могут существенно различаться.

В таблице 6 представлены результаты исследования компонентного состава эфирного масла шишек ели обыкновенной. Шишки были собраны летом с деревьев произрастающих в одинаковых условия (бор зеленомошник).

Таблица 6 - Компонентный состав эфирного масла шишек ели обыкновенной

№	Компоненты эфирного масла	Образцы эфирного масла шишек					
		Ель № 1	Ель № 2	Ель № 3	Ель № 4	Ель № 5	Ель № 6
1	2	3	4	5	6	7	8
1	α -пинен	+	+	+	+	+	+
2	β -мирцен	+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8
3	Δ^3 -Карен	+	+	+	+	+	+
4	Лимонен	+	+	+	+	+	+
5	β -пинен	+	-	+	+	+	+
6	Камфора	+	-	-	-	-	+
7	Борнеол	+	+	+	+	+	+
8	Борнил ацетат	+	+	+	+	+	+
9	Терпинен-4-ол	+	+	+	+	+	+
10	α -терпинеол	+	-	+	+	-	+
11	Фарнезен	+	+	+	-	+	+
12	Копаен	-	-	+	-	+	-

Основными компонентами эфирного масла шишек ели обыкновенной являлись борнил ацетат и α -пинен. Анализ эфирного масла показал, что компонентный состав эфирного масла шишек более постоянный, чем у древесной зелени. Это может говорить о том что, биохимические процессы в древесной зелени идут значительно интенсивнее и с использованием гораздо большего числа соединений, для выполнения различного рода функций (Белоногова В.Д., Гуляев Д.К., и др. 2015) [7].

3.1.2. Исследование компонентного состава фракций эфирного масла древесной зелени

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.

Результаты исследования представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Компонентный состав эфирного масла и отдельных фракций древесной зелени ели обыкновенной

№	Вещество	Содержание, % от цельного масла			
		Фракция № 1	Фракция № 2	Фракция № 3	Цельное эфирное масло
1	2	3	4	5	6
1	Камфен	10,55	5,53	3,99	2,38
2	β -Пинен	5,41	2,83	1,28	1,39
3	β -Мирцен	2,41	1,55	1,08	1,43
4	α -Фелладрен	0,1	0,07	0,06	-
5	Камфора	6,03	6,63	0,93	2,61
6	α -Пинен	6,75	3,92	-	3,06
7	Лимонен	5,56	13,62	3,49	6,01
8	Δ^3 -Карен	0,31	0,28	0,13	0,08
9	α -Терпинеол	1,13	3,46	1,09	0,6
10	Терпинен-4-ол	-	1,24	0,44	0,6
11	Фенхол	-	-	-	0,11
12	Борнеол	4,73	7,42	2,27	2,25
13	Борнил ацетат	28,94	33,06	25,4	22,46
14	Кариофиллен	0,45	0,86	1,09	0,92
15	α -Кариофиллен	0,4	0,57	-	1,01
16	Копаен	0,14	0,39	0,87	0,1
17	Сантолина триен	-	0,06	-	0,41

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6
18	Изоборнеол	0,18	0,28	0,39	0,12
19	Циклоизосатинен	-	0,21	-	-
20	Аромадендрен	-	0,12	-	0,05
21	α -фарнезен	0,18	0,06	0,04	0,03
22	Эпи- бициклосесквифелладрен	-	0,05	-	0,14
23	Неролидол	-	0,13	0,27	1,4
24	Цис- α -бисаболен эпоксид	-	-	0,42	0,16
25	Мууролол	-	0,72	1,73	1,73
26	α -Кадинол	-	0,82	2,29	7,79
27	Квинолинедол	-	-	-	10,23
28	Сапатуленол	-	0,42	0,93	1,02
29	Гумулен	-	-	2,54	-
30	α -Кубебен	-	-	-	0,34

В результате исследования было установлено, что различия между фракциями не только в качественном, но и в количественном соотношении. Цельное эфирное масло представлено большим количеством компонентов, по сравнению с отдельными фракциями. Содержание монотерпенов уменьшается с каждой последующей фракцией. Наибольшее количество монотерпенов отмечено в первой фракции, а наименьшее во фракции № 3 и цельном эфирном масле. Тяжелолетучие компоненты (аромедендрен, неролидол, мууролол, α -кадинол и др.) практически отсутствуют во фракции № 1, и их количество постепенно возрастает в последующих фракциях. Основным компонентом в каждой фракции и цельном эфирном масле является борнилацетат. Его доля значительно превышает содержание остальных компонентов в каждой фракции.

3.1.3. Исследование компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной, в зависимости от сезона года

Исследования сезонной динамики компонентного состава эфирного масла интересны в первую очередь потому, что необходимо выяснить, оказывает ли влияние время года на наличие или отсутствие отдельных компонентов эфирного масла, и на основании этого сделать заключение о возможности круглогодичной заготовки древесной зелени для получения эфирного масла.

Эфирное масло получали из свежей древесной зелени, заготовленной на территории Ильинского района Пермского края в течение всего года, в разных условиях произрастания (Таблица 8).

Таблица 8 - Места произрастания образцов

Номер образца	Фитоценоз
1	2
Образец № 4	Ельник зеленомошник, правый берег реки Обва
Образец № 5	Сосняк зеленомошник, левый берег реки Обва
Образец № 6	Ельник брусничник
Образец № 7	Смешанный лес

При исследовании сезонной динамики компонентного состава важно учитывать так же условия произрастания растений (Таблица 8), поэтому сбор образцов проводился с деревьев разных мест обитания.

Результаты исследования сезонной динамики компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной представлены в таблицах 9-12.

Таблица 9 - Компонентный состав эфирного масла зимних образцов

№ п/п	Компонент	Содержание в % (от цельного эфирного масла) Образцы эфирного масла древесной зелени			
		№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
1	2	3	4	5	6
1.	β -Пинен	5,64	1,76	6,19	3,43
2.	β -Мирцен	5,04	2,32	6,63	2,46
3.	α -фелладрен	0,17	0,31	-	-
4.	Δ^3 -Карен	10,65	12,05	-	-
5.	4-Карен	-	-	1,33	-
6.	Лимонен	26,92	20,36	23,98	-
7.	α -Пинен	0,57	4,0	19,48	10,22
8.	α -Терпинолен	-	1,82	-	-
9.	Фенхол	0,21	0,15	-	0,24
10.	Камфора	8,06	3,06	6,71	2,23
11.	Изоборнеол	0,26	-	-	0,14
12.	Борнеол	10,22	4,18	-	3,39
13.	Терпинен-4-ол	1,43	1,06	0,82	1,77
14.	α -Терпинеол	3,20	-	-	6,89
15.	Фенхилацетат	0,10	-	-	-
16.	Камфенол	0,16	-	-	-
17.	Цитронелол	-	-	-	0,65
18.	Борнилацетат	12,27	36,33	13,46	36,95
19.	α -Лонгипинен	0,10	0,43	1,70	1,97
20.	Сейхеллен	0,37	1,26	4,47	3,25
21.	Циклоизосативен	-	-	-	0,33
22.	Кариофиллен	-	0,22	0,97	2,89
23.	α -Кариофиллен	-	0,27	0,52	3,06

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
24.	α -Кубебен	-	-	-	0,23
25.	α -Мууролен	1,09	0,76	0,44	1,13
26.	α -Бергамотен	-	-	0,11	-
27.	α -Фарнезен	0,12	0,09	-	-
28.	Аромадендрен	0,12	-	-	-
29.	α -Бисаболен эпоксид	0,23	-	0,34	-
30.	α -Бисаболол	-	0,32	-	0,39
31.	Спатуленол	-	0,57	-	0,46
32.	Мууролол	0,97	0,74	0,72	1,88
33.	α -Кадинол	1,07	1,01	0,82	2,15

Изучение компонентного состава зимних образцов показало, что в эфирном масле содержится около 25 компонентов независимо от местообитания (Таблица 9).

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

Во всех образцах основу эфирного масла составляют 8-10 компонентов (борнилацетат, борнеол, камфора, Δ^3 -карен, α -пинен, β -пинен лимонен, α -кадинол) с содержанием каждого более 2% от цельного масла. Остальные компоненты содержатся в гораздо меньшем количестве, или могут отсутствовать.

Доминирующим компонентом в образцах зимнего сбора является борнилацетат, отмечено высокое содержание лимонена, Δ^3 -карена.

Наблюдается зависимость по содержанию между борнилацетатом и борнеолом, Δ^3 -кареном и α -пиненом, Δ^3 -кареном и лимоненом, борнилацетатом и α -пиненом, борнеолом и α -пиненом, борнилацетатом и лимоненом. При увеличении содержания одного компонента уменьшается содержание другого компонента пары.

В образце № 7 отсутствует лимонен, при достаточно высоком содержании его в остальных зимних образцах. На фоне уменьшения содержания лимонена наблюдается увеличение содержания борнилацетата, что указывает на определенное взаимодействие между двумя компонентами.

В образцах № 4 и № 5 Δ^3 -карен присутствует в значительном количестве, при этом наблюдается взаимосвязь по содержанию с α -пиненом. В образцах № 6,7 наблюдается обратная зависимость.

Содержание камфоры, так же существенно варьирует в зависимости от фитоценоза.

В образце № 7 увеличено содержание некоторых сесквитерпенов: кариофиллена, α -кариофиллена, мууролола, α -кадинола.

Таблица 10 - Компонентный состав эфирного масла весенних образцов

№ п/п	Компонент	Содержание в % (от цельного эфирного масла) Образцы эфирного масла древесной зелени			
		№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
1	2	3	4	5	6
1.	β -Пинен	7,96	1,64	1,62	3,74
2.	β -Мирцен	2,97	1,32	1,52	1,74
3.	Δ^3 -Карен	1,47	0,15	-	0,16
4.	Лимонен	-	14,73	14,38	18,08
5.	Оцимен	-	-	0,40	1,24
6.	α -Пинен	0,48	3,49	2,37	5,70

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6
7.	Фенхол	0,21	0,36	0,28	0,28
8.	Камфора	5,62	0,43	6,11	3,75
9.	Изоборнеол	0,42	0,93	-	-
10.	Борнеол	11,12	20,02	11,90	7,24
11.	Терпинен-4-ол	1,65	1,13	0,94	0,99
12.	α -Терпинеол	6,19	4,97	3,82	3,49
13.	Камфенол	-	0,10	-	-
14.	Борнилацетат	29,24	29,41	35,24	32,56
15.	α -Лонгипинен	-	-	0,90	-
16.	Сейхеллен	-	-	0,50	1,22
17.	Кариофиллен	0,96	-	0,39	0,74
18.	α -Кариофиллен	1,34	0,19	0,41	0,88
19.	Копаен	0,40	-	-	-
20.	α -Мууролен	1,44	0,86	1,78	0,80
21.	Неролидол	0,26	-	0,17	-
22.	α -Бергамотен	-	-	0,21	0,98
23.	α -Фарнезен	-	-	-	0,17
24.	Аромандендрен	0,23	0,16	-	-
25.	α -Бисаболол	-	-	-	0,11
26.	Спатуленол	0,85	0,66	-	0,66
27.	α -Цедрен	-	0,11	-	-
28.	Мууролол	2,41	1,97	1,19	1,12
29.	α -Кадинол	2,55	2,24	1,42	1,31
30.	Сквален	2,84	-	-	-

Основным компонентом эфирного масла весенних образцов является борнилацетат (Таблица 10). Обнаружено высокое содержание: борнеола, β -

пинена, лимонена. Отмечается снижение содержания каренов в весенних образцах, по сравнению с образцами эфирного масла, полученными в другое время года. Δ^3 -Карен обладает местным раздражающим действием, поэтому уменьшение содержания Δ^3 -карена в весенних образцах, улучшает потребительские характеристики эфирного масла.

Самое высокое содержание борнеола в течение года отмечено весной. α -Фелладрен отсутствует в образце № 4 (ельник зеленомошник), в то время как он был обнаружен в образцах из ельника зеленомошника зимой, летом и осенью. α -Фелладрен обнаружен в основном в образцах из ельника зеленомошника, что указывает на взаимосвязь с фитоценозом.

α -Лонгипинен обнаружен в эфирном масле на протяжении всего года, за исключением весенних образцов. Весной, α -лонгипинен идентифицирован только в образце № 6 (ельник брусничник). На содержание α -лонгипинена большее влияние оказывает время года, а не фитоценоз.

Содержание лимонена весной остается достаточно высоким во всех образцах, за исключением образца № 4. Отсутствие лимонена в образце № 4 может быть связано с увеличением содержания β -пинена и α -терпинеола.

Таблица 11 - Компонентный состав эфирного масла летних образцов

№ п/п	Компонент	Содержание в % (от цельного эфирного масла) Образцы эфирного масла древесной зелени			
		№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
1	2	3	4	5	6
1.	β -Пинен	6,85	-	2,94	2,76
2.	β -Мирцен	4,39	-	2,52	2,42
3.	α -фелладрен	0,18	-	-	-
4.	2-Карен	-	2,05	-	-
5.	Δ^3 -Карен	0,33	-	10,83	5,97

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	6
6.	4-Карен	-	-	0,11	1,41
7.	Лимонен	26,96	1,13	16,94	19,14
8.	Оцимен	-	-	0,75	-
9.	α -Терпинолен	1,85	-	-	-
10.	α -Пинен	12,62	1,16	0,37	-
11.	Фенхол	0,21	0,61	0,18	0,18
12.	Камфора	4,79	11,90	1,61	2,50
13.	Изоборнеол	0,28	0,34	-	-
14.	Борнеол	8,33	7,63	3,60	2,50
15.	Терпинен-4-ол	0,74	1,25	1,31	0,35
16.	α -Терпинеол	2,08	3,53	3,19	0,81
17.	Борнилацетат	22,13	30,29	32,93	39,19
18.	α -Лонгипинен	0,46	0,67	1,43	-
19.	Циклоизосативен	0,09	-	-	-
20.	Бициклогермакрен	-	-	-	0,43
21.	Сейхеллен	0,81	2,40	1,25	0,35
22.	Сантолина триен	-	-	0,20	-
23.	Кариофиллен	-	1,77	0,53	0,16
24.	α -Кариофиллен	-	-	0,90	-
25.	Копаен	-	-	0,27	-
26.	α -Кубебен	-	-	0,51	-
27.	α -Мууролен	0,46	-	1,34	1,87
28.	Неролидол	0,18	-	-	0,12
29.	α -Фарнезен	-	0,61	-	0,12
30.	Туйопсен	-	-	-	0,12
31.	α -Бисаболол	-	0,29	-	-
32.	Спатуленол	-	0,38	-	-

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	6
33.	Мууролол	0,29	1,0	1,67	2,20
34.	α -Кадинол	0,31	2,25	2,18	2,70

В летних образцах основным компонентом остается борнилацетат (Таблица 11). Уменьшение содержание борнилацетата в образце № 4, может быть связано с увеличением содержания лимонена, α -пинена и борнеола.

В образце № 5 отсутствуют β -пинен, β -мирцен, Δ^3 -карен, постоянно присутствующие в эфирном масле древесной зелени. Вместо Δ^3 -карена в составе эфирного масла присутствует 2-карен.

С медицинской точки зрения, увеличение содержания камфоры в эфирном масле представляет интерес. Камфора входит в состав некоторых сердечнососудистых препаратов. Применяется и самостоятельно при острой и хронической сердечной недостаточности, гипотонии, как стимулятор дыхания [22].

В образцах, собранных в ельнике зеленомошнике (образец № 4), наблюдается более низкое содержание α -пинена в сравнении с остальными фитоценозами. Однако, летом в образцах из ельника зеленомошника наблюдается резкое увеличение содержания α -пинена, тогда как в образцах № 5,6,7 его содержание уменьшается.

Таблица 12 - Компонентный состав эфирного масла осенних образцов

№ п/п	Компонент	Содержание в % (от цельного эфирного масла) Образцы эфирного масла древесной зелени			
		№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
1	2	3	4	5	6
1.	β -Пинен	24,56	2,23	1,93	2,45

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
2.	β -Мирцен	8,05	4,02	0,93	1,88
3.	α -фелладрен	0,21	-	-	0,15
4.	Δ^3 -Карен	0,10	-	-	-
5.	4-Карен	24,46	-	0,92	-
6.	Лимонен	-	-	9,97	14,64
7.	Оцимен	2,70	-	-	-
8.	α -Терпинолен	-	1,63	-	0,95
9.	α -Пинен	0,66	9,70	7,64	9,91
10.	Фенхол	-	0,11	-	0,22
11.	Камфора	3,06	11,56	1,07	1,69
12.	Изоборнеол	-	0,22	-	0,14
13.	γ -Терпинен	-	0,39	-	-
14.	Борнеол	3,06	12,94	1,37	2,12
15.	Терпинен-4-ол	0,98	1,37	0,60	1,0
16.	α -Терпинеол	0,27	6,02	0,41	2,63
17.	Борнилацетат	23,64	30,26	44,40	38,32
18.	α -Лонгипинен	0,89	0,46	1,04	1,0
19.	Изомиокорен	-	0,91	-	-
20.	α -цедрен	-	-	1,04	0,16
21.	Сейхеллен	1,22	-	-	1,38
22.	Кариофиллен	0,83	1,77	-	-
23.	α -Кариофиллен	1,03		0,22	-
24.	Копаен	-	0,17	-	0,34
25.	α -Мууролен	0,23	1,52	0,72	0,88
26.	Неролидол	-	-	-	0,25
27.	α -Бергамотен	-	-	-	0,19

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
28.	α -Фарнезен	0,13	0,29	0,18	-
29.	Аромадендрен	0,64	0,25	1,41	0,15
30.	α -Бисаболол	-	-	-	0,20
31.	Спатуленол	-	0,12	-	-
32.	Мууролол	-	1,90	3,28	2,57
33.	α -Кадинол	-	2,12	4,09	2,89
34.	Тунбергол	-	-	5,04	-

Доминирующим компонентом древесной зелени осенью, как и на протяжении всего года, является борнилацетат (Таблица 12). В образце № 4 вновь наблюдается низкое содержание борнилацетата, что связано прежде всего с увеличением содержания β -пинена, β -мирцена и 4-карена.

Содержание камфары и борнеола наибольшее в образце № 5, при достаточно низком содержании в остальных образцах, отсутствуют лимонен и карены.

Установлено, что осенью в образцах наблюдается низкое содержание лимонена, Δ^3 -карен отсутствует, за исключением образца № 4, где его содержание незначительно. Исходя из результатов исследований, можно отметить, два максимума по содержанию Δ^3 -карена зимой и летом.

В образце № 6 обнаружен тунбергол, относящийся к классу сесквитерпенов. Стоит отметить достаточно высокое содержание тунбергола по сравнению с остальными сесквитерпенами (5,04%).

Тунбергол, сейхеллен и туйопсен – впервые обнаружены нами в эфирном масле древесной зелени ели обыкновенной (Гуляев Д.К., и др. 2015) [35].

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.

Фитоценоз оказывает значительное влияние на содержание отдельных компонентов. Об этом свидетельствует порядок накопления БАВосенью в образце № 4(ельник зеленомошник) 4-карена содержится 24,46%, а в остальных осенних образцах 4-карен отсутствует, либо содержится в незначительном количестве. Это может быть связано с особенностями внешней среды, а так же с внутренними процессами в растении, происходящими в момент сбора сырья.

3.1.4. Исследование сезонной динамики накопления компонентного состава эфирного масла подроста ели обыкновенной

Исследования сезонной динамики компонентного состава эфирного масла древесной зелени молодых деревьев необходимо для понимания влияния сезонов года на состав эфирного масла. Кроме того, необходимо сравнить состав эфирного масла молодых и более зрелых деревьев. Это нужно для установления возможности использования древесной зелени молодых деревьев для получения эфирного масла.

Результаты исследования представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Сезонная динамика содержания, компонентов эфирного масла древесной зелени подроста ели обыкновенной

№ п/п	Название компонента	Содержание в % (от цельного эфирного масла)			
		Зима	Весна	Лето	Осень
1	2	3	4	5	6
1.	β -Пинен	1,28	7,21	4,80	6,05
2.	β -Мирцен	1,08	3,35	3,59	2,83
3.	α -фелладрен	0,06	0,12	-	0,11
4.	Δ^3 -Карен	6,13	0,22	0,41	12,94

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6
5.	4-Карен	-	1,23	-	1,88
6.	Лимонен	7,97	14,38	-	18,52
7.	Оцимен	-	0,40	1,53	0,17
8.	α -Терпинолен	-	-	1,53	-
9.	α -Пинен	1,54	2,37	10,33	-
10.	Фенхол	0,23	0,28	0,37	0,15
11.	Камфора	0,68	0,11	0,58	6,98
12.	Изоборнеол	0,39	0,17	1,02	0,13
13.	Борнеол	2,27	4,64	18,67	3,58
14.	Терпинен-4-ол	0,44	1,02	1,62	3,94
15.	α -Терпинеол	1,09	2,98	5,61	3,94
16.	Борнилацетат	38,00	39,81	30,29	25,82
17.	α -Лонгипинен	0,98	-	1,41	0,72
18.	α -Цедрен	-	1,26	-	0,16
19.	Сейхеллен	1,12	0,96	0,11	1,38
20.	Сантолина триен	-	0,15	-	-
21.	Кариофиллен	0,39	0,91	-	-
22.	α -Кариофиллен	0,09	0,14	-	-
23.	Копаен	-	-	0,93	-
24.	α -Кубебен	0,03	-	0,19	0,14
25.	α -Мууролен	0,71	0,21	1,05	0,90
26.	Неролидол	-	-	-	0,46
27.	α -Фарнезен	0,04	-	0,60	0,11
28.	β -Фарнезен	-	-		0,10
29.	Аромадендрен	0,13	-	0,25	0,14
30.	α -Бисаболол	0,42	-	-	-

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6
31.	Спатуленол	0,93	-	-	-
32.	Мууролол	1,73	1,19	1,57	1,62
33.	α -Кадинол	2,29	1,31	1,76	1,86

В эфирном масле древесной зелени подроста ели к преобладающим компонентам относятся монотерпены (Таблица 13). Основным компонентом в течение всего года в эфирном масле древесной зелени молодых деревьев является борнилацетат (25,82-39,91%). В значительном количестве содержатся: лимонен, Δ^3 -карен, борнеол. Максимальное содержание α -пинена в эфирном масле древесной зелени подроста ели обыкновенной наблюдается летом, в остальное время года его содержание уменьшается.

Содержание камфоры в весенне-летний период незначительно, осенью наблюдается резкое увеличение её содержания. Содержание β -пинена и β -мирцена минимальное зимой, в остальное время года их содержание увеличивается

Доля сесквитерпеновых соединений в эфирном масле древесной зелени ели обыкновенной значительно меньше монотерпенов. Среди сесквитерпенов основными компонентами являются α -кадинол, мууролол, α -мууролен, содержание остальных сесквитерпенов не превышает 1%.

В целом, монотерпеновая фракция эфирного масла древесной зелени подроста ели обыкновенной мало подвержена сезонным изменениям. Все основные компоненты монотерпеновой фракции присутствуют в разное время года, различия наблюдаются только в количественном их соотношении.

Сесквитерпеновая фракция подвержена сезонным переменам, но её доля в цельном эфирном масле достаточно мала, поэтому установленная разница в сезонном содержании некоторых сесквитерпенов, вероятно не оказывает значительного влияния на качество эфирного масла.

Полученные данные указывают на возможность круглогодичной заготовки древесной зелени подроста ели обыкновенной в качестве сырья для получения эфирного масла.

В эфирном масле древесной зелени подроста елей входят все основные компоненты, характерные для эфирного масла взрослых деревьев (Таблицы 9,10,11,12). На основании полученных данных можно сделать вывод о целесообразности заготовки древесной зелени подроста ели обыкновенной с целью получения эфирного масла.

3.1.5. Исследование содержания эфирного масла древесной зелени

В силу того, что время года оказывает влияние на компонентный состав эфирного масла, представляло интерес изучить выход эфирного масла на протяжении всего вегетационного периода. Образцы для анализа заготавливались с одних и тех же деревьев. Первую часть образца анализировали на следующий день после сбора (свежее сырьё), вторую часть образца исследовали после сушки воздушно-теневым способом в течение месяца (сухое сырьё). Определение содержания эфирного масла проводили по методу Гинзберга (раздел 2.2.1).

Результаты исследования представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Выход эфирного масла из древесной зелени ели обыкновенной в разное время года

Время года	Выход эфирного масла, %	
	Свежее сырьё	Сухое сырьё
1	2	3
Зима	0,37±0,03	0,16±0,02
Весна	0,33±0,02	0,12±0,01
Лето	0,29±0,03	0,1±0,01
Осень	0,35±0,02	0,15±0,03

Содержание эфирного масла подвержено сезонным изменениям (Таблица 14). Наибольшее количество эфирного масла отмечается в зимний и осенний период. Летом наблюдается снижение содержания эфирного масла, что связано с усилением испарения под воздействием высоких температур. В сухом сырье, содержание эфирного масла уменьшается более чем в 2 раза. Это связано с тем, что компонентный состав эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной представлен в основном легко летучими монотерпеновыми соединениями.

3.1.6. Исследование полноты перегонки эфирного масла

Эфирное масло получали по методике (раздел 2.2.1). Воду, оставшуюся после отгонки эфирного масла запаивали в ампулы и анализировали на газожидкостном хроматографе (раздел 2.2.2).

Результаты исследования представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Определение компонентного состава воды после 120 минут перегонки эфирного масла древесной зелени

Вещества	Образцы воды после 120 мин перегонки			
	Ель № 1	Ель № 2	Ель № 3	Ель № 4
1	2	3	4	5
Кариофиллен	+	+	+	+
Сквален	+	+	+	+
7-Ацетил-2-гидрокси-2-метил- 5-изопропилбициклононан	+	+	+	+

Установлено, что во всех образцах воды после отгонки эфирного масла содержится лишь три тяжелолетучих компонента. Из этого следует вывод, что увеличение времени перегонки более 2 ч не имеет смысла.

3.2. Исследование полисахаридов

Исследование растительных полисахаридов является достаточно актуальным в настоящее время. Если ранее полисахариды использовались в основном как вспомогательные вещества: формообразователи, загустители, стабилизаторы в мазях и линиментах, эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий и суспензий, диспергирующие агенты, наполнители, связывающие, скользящие вещества в производстве таблеток, косметические средства и др. [45,57]. Сейчас, всё чаще растительные полисахариды рассматриваются как действующие вещества для создания лекарственных препаратов и биологически активных добавок [81].

Исследованию полисахаридов ели обыкновенной, посвящено гораздо меньшее количество работ, чем другим представителям семейства *Pinaceae* – сосне, лиственнице и пихте [46,79]. Однако полисахариды ели обыкновенной могут представлять интерес для медицинского применения.

3.2.1. Качественные реакции на полисахариды

Наличие полисахаридов в образцах древесной зелени и шишек ели обыкновенной доказали с помощью качественных реакций (раздел.2.3.4). Результаты приведены в таблице 16.

Таблица 16 - Результаты качественных реакций на полисахариды

Реакции	Эффект реакции	Древесная зелень	Шишки
1	2	3	4
Осаждение спиртом 96%	Хлопьевидный осадок полисахаридов	+	+

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4
С 5%-ным раствором тимола и серной кислотой концентрированной	Коричневое кольцо на границе слоев жидкостей	+	+
С 0,2% раствором антраона в серной кислоте концентрированной.	Темное сине-зеленое окрашивание	+	+

Положительные результаты реакций с водными извлечениями древесной зелени и шишек свидетельствуют о наличии в сырье полисахаридов.

3.2.2. Выделение полисахаридных фракций

Используя вышеперечисленный способ (раздел. 2.3.5), получены следующие полисахаридные фракции:

- 1) Водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПК);
- 2) Пектиновые вещества (ПВ).

Таблица 17 Выход полисахаридных фракций

Сырьё	Выход фракции, % к сырью	
	ВРПК	ПВ
1	2	3
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 установлен для шишек ели обыкновенной (Таблица 17). Петиновых веществ накапливается больше в ветвях ели обыкновенной.

3.2.3. Хроматографическое исследование полисахаридных фракций

Хроматографический анализ показал относительное сходство моносахаридного состава гидролизатов полисахаридных фракций древесной зелени и шишек.

Полисахаридные фракции, полученные по методике (глава 2.3.2), представлены водорастворимым полисахаридным комплексом и пектиновыми веществами. Данные фракции были получены отдельно из древесной зелени и шишек. Образец древесной зелени так же разделили на хвою и ветви.

Таблица 18 - Моносахаридный состав гидролизатов ВРПК древесной зелени и шишек ели обыкновенной

Фракции	Моносахаридный состав			
	Арабиноза Rf 0,25	Галактоза Rf 0,45	Глюкоза Rf 0,27	Рамноза Rf 0,39
1	2	3	4	5
ВРПК древесной зелени	+	+	-	-
ВРПК хвои	+	+	-	-
ВРПК ветвей	+	+	-	-
ВРПК шишек	+	+	-	-

В таблице 18 приведены данные хроматографического анализа гидролизатов водорастворимого полисахаридного комплекса древесной зелени и шишек ели обыкновенной, методом восходящей бумажной хроматографии и тонкослойной хроматографии. В каждой из фракций присутствует арабиноза и галактоза, глюкоза и рамноза в исследуемых образцах отсутствует.

Таблица 19 - Моносахаридный состав гидролизатов пектиновых веществ древесной зелени и шишек ели обыкновенной

Фракции	Моносахаридный состав			
	Арабиноза Rf 0,25	Галактоза Rf 0,45	Глюкоза Rf 0,27	Рамноза Rf 0,39
1	2	3	4	5
ПВ древесной зелени	+	+	-	-
ПВ хвои	+	+	-	-
ПВ ветвей	+	+	-	-
ПВ шишек	+	+	-	-

В таблице 19 представлены результаты хроматографического анализа гидролизатов пектиновых веществ древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Данные таблицы показывают, что в гидролизатах пектиновых веществ древесной зелени и шишек ели обыкновенной присутствуют арабиноза и галактоза, глюкоза и рамноза в исследуемых гидролизатах отсутствует.

3.2.4. Влияние на содержание полисахаридов сезона года

Содержания полисахаридов определяли в образцах древесной зелени ели обыкновенной, собранных в разное время года в пределах одного и того же фитоценоза.

Результаты исследования представлены на рисунке 6.



Рисунок 6. Динамика накопления полисахаридов в древесной зелени ели обыкновенной.

В результате исследования установлено, что содержание полисахариды накапливаются в древесной зелени максимально в летний период, их содержание снижается к осени, и начинает возрастать весной (Рисунок 6). Таким образом установлено, что благоприятным временем для заготовки древесной зелени ели обыкновенной с целью выделения полисахаридов являются летние месяцы. Летний максимум содержания суммы полисахаридов может быть связан с фазой интенсивного роста хвои.

3.2.5. Определение физико-химических характеристик полисахаридов

Анализ органолептических и физико-химических показателей проводили согласно методикам (глава 2.3.6.).

Результаты исследования представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Органолептические и физико-химические показатели полисахаридов

Показатели	ВРПК древесной зелени	ВРПК шишек	ПВ древесной зелени	ПВ шишек
1	2	3	4	5
Вкус	Слабо- Кислый, хвойный	Слабо- кислый	Слабо- кислый	Слабо- кислый
Запах	Хвойный, слабый	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Цвет	Светло- серый	Светло- коричневый	Светло- бежевый	Светло- бежевый
Свободные карбоксильные группы, %	5,58	6,45	10,64	9,65
Этерифицированные группы, %	8,22	7,7	10,58	9,75
Степень этерификации, %	40,43	45,58	49,12	49,74
Влажность, %	6,73±0,8	6,9±0,5	7,23±0,92	6,88±0,77
Зольность, %	1,74±0,08	1,44±0,1	1,23±0,08	1,02±0,11
Молекулярная масса, г/моль	10462	9105	6973	7723

В ходе органолептического анализа установлено, что по вкусу полисахаридные фракции не отличаются, каждая фракция имеет слабокислый вкус, при этом ВРПК древесной зелени характеризуется слегка

хвойный оттенок. Запах у полученных фракций отсутствует, ВРПК древесной зелени имеет лёгкий хвойный запах. Влажность и зольность полисахаридных фракций находится на уровне 6-7% и 1,02-1,74% соответственно. Молекулярная масса ВРПК древесной зелени и шишек выше чем у пектиновых веществ данного сырья.

Установлено, что пектиновые вещества древесной зелени и шишек ели обыкновенной относятся к низко этерифицированным пектинам, содержание остатков метилового спирта менее 50%.

Степень этерификации влияет на желирующую способность пектина, и некоторые фармакологические свойства. При высокой степени этерификации (более 50% метоксильных групп) пектины образуют студень при содержании сахара более 50%. В свою очередь, низкоэтерифицированный пектин желируется в присутствии сахара в растворе менее 50%. Низкоэтерифицированные пектины способны показывать хорошие результаты в качестве сорбента. Кроме того, низкая степень этерификации пектина говорит о хорошей желирующей способности, а значит, возможно использование в пищевой промышленности, и фармацевтической в качестве вспомогательных веществ.

3.3. Исследование элементного состава

Микроэлементы являются составной частью любого растительного и животного организма. Микроэлементы жизненно необходимы растению в достаточных количествах, поскольку без них не могут протекать основные физиолого-биохимические реакции растения.

В животном организме и организме человека недостаточное поступление микроэлементов с пищей может вызывать микроэлементозы. Поэтому изучение содержания микроэлементов в разных частях данного вида сырья, а так же сезонной динамики их накопления, является актуальной задачей исследования.

Исследование проводили на 2-х образцах древесной зелени (№ 3,8; таблица 3) и одном образце шишек (№ 1, таблица 4), собранных в условиях одного фитоценоза. Результаты исследования представлены в таблицах 21-23.

Таблица 21 - Сравнительный анализ содержания микроэлементов в древесной зелени и шишках ели обыкновенной

Элемент	Содержание мкг/кг					
	Древесная зелень, мкг/кг			Шишки, мкг/кг		
	Ель № 1	Ель № 2	Ель № 3	Ель № 1	Ель № 2	Ель № 3
1	2	3	4	5	6	7
Cu	7.3	7.27	7.22	25.61	22.08	22.65
Zn	118.03	129.73	131.68	140.5	115.54	125.44
Al	318.6	336.3	317.67	187.7	206.5	204.5
Si	1939.2	2041.0	1978.46	358.8	337.5	326.8
Ti	181.7	173.2	167.03	8.57	8.92	8.43
Cr	-	-	-	-	0.19	-
Mn	326,3	336,8	332,47	312.2	230.9	326.54
Fe	161.9	151.2	165.66	136.8	115.22	116.34
Co	0.71	1.82	1.35	1.82	1.24	1.36
Ni	9.44	8.32	9.37	12.37	13.38	14.56
Pb	1.38	1.46	1.57	0.15	0.33	0.12
Mo	0.09	0.01	0.03	0.15	0.07	0.04
Sn	-	-	-	0.27	0.05	0.09
Ba	138.1	9.23	15.6	2.0	1.67	1.66

Как следует из полученных результатов (Таблица 21), содержание элементов зависит от органа ели обыкновенной. Содержание некоторых микроэлементов в древесной зелени и шишках примерно одинаково: Mn, Fe, Zn, Co, Pb, Mo. В древесной зелени содержится большее количество Al, Si, Fe по сравнению с шишками. В древесной зелени и шишках ели обыкновенной наблюдается высокое содержание кремния. Это можно объяснить тем, что в растительных тканях кремний входит в состав полиуронидов. На одну молекулу пектина цитрусовых (молекулярная масса 100–200 кДа) приходится от 10 до 20 атомов Si. Ферментативный гидролиз пектинов и гиалуроновой кислоты показывает, что Si связан в них с органическим веществом ковалентными связями, выполняя роль «сшивающего» элемента [51].

В шишках в свою очередь, наблюдается большее содержание таких элементов как Cu, Cr, Ni, Sn.

Ряд биологического поглощения микроэлементов 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.

Таблица 22 - Влияние на содержание элементов в хвое периода вегетации, мкг/кг

Элемент	Содержание мкг/кг			
	Лето	Осень	Зима	Весна
1	2	3	4	5
Cu	6,08±0,21	5,34±0,25	8,26±0,05	4,67±0,23
Zn	122,45±1,21	147,3±0,7	202,03±7,33	181,27±4,84
Al	256,37±19,23	304,33±25,84	352,63±9,15	315,97±6,31

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5
Si	1455,67±126,7	2845,7±123,66	1254,6±121,61	2022,2±10,38
Ti	138,27±1,7	176,6±5,67	66,33±2,46	107±9,25
Cr	0	0	3,27±0,31	0
Mn	1124,53±23,12	373,97±11,78	3655,67±70,94	2361,33±89,64
Fe	174,87±4,82	175,33±7,05	417,7±21,81	267,17±17,89
Co	7,22±0,19	2,26±0,06	14,93±0,54	9,15±0,19
Ni	4,37±0,48	7,60±0,87	10±0,85	31,86±2,77
Pb	1,45±0,11	1,56±0,21	1,88±0,18	2,77±0,27
Mo	0,53±0,09	0,21±0,03	0,17±0,02	0,06±0,01
Sn	0,07±0,01	0	0,52±0,09	0,47±0,06
Ba	74,23±9,54	209,33±2,2	41,43±1,88	134,53±13,6

Наибольшее содержание, среди элементов хвои ели обыкновенной, приходится на марганец и кремний (Таблица 22). Хром, молибден и олово содержатся в хвое в минимальных количествах, или могут отсутствовать в зависимости от времени года. Медь, цинк, алюминий, марганец, железо, кобальт и олово имеют максимум накопления зимой. Содержание остальных элементов колеблется в зависимости от периода вегетации. Хром накапливается в хвое ели обыкновенной только зимой, а в остальное время отсутствует.

Ряд биологического поглощения микроэлементов для хвои ели обыкновенной в зависимости от времени года:

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

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

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

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

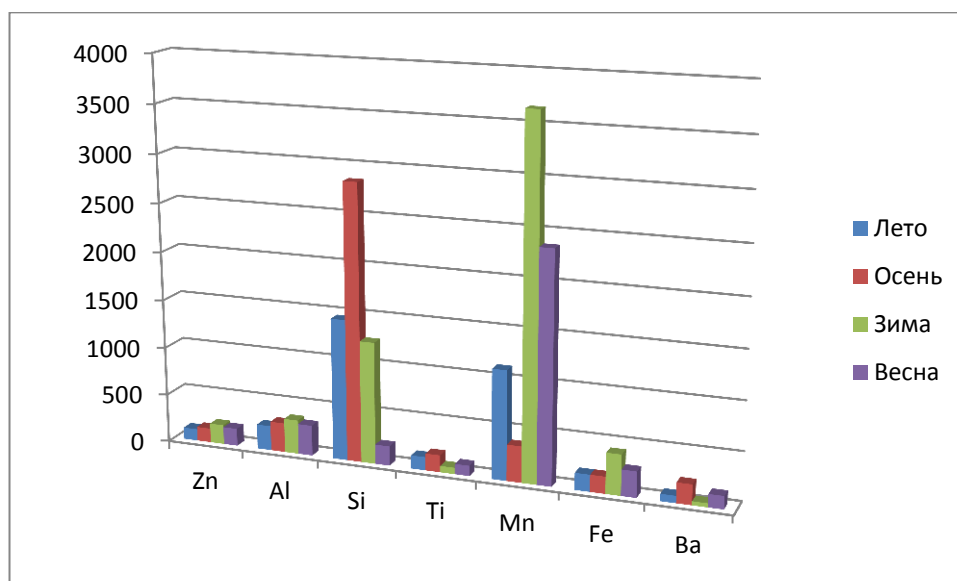


Рисунок 7. Сезонная динамика основных микроэлементов в хвое ели обыкновенной, мкг/кг.

Содержание марганца и кремния в хвое ели обыкновенной наиболее подвержено сезонным изменениям (Рисунок 7). У марганца максимум накопления приходится на зиму, а кремния на осень. Весной наблюдается постепенное снижение содержания марганца до минимального значения осенью. Кремний же начинает постепенно накапливаться с минимального значения весной, до осеннего максимума. У остальных микроэлементов разброс величин содержания не велик.

Таблица 23 - Содержание микроэлементов в ветвях в течение года, мкг/кг

Элемент	Лето	Осень	Зима	Весна
Cu	20,36±0,49	28,09±1,07	22,27±1,37	24,03±0,15
Zn	244,37±18,62	221,5±11,7	323,93±15,46	225,8±6,22
Al	363,4±30,41	482,9±16,08	554,1±50,05	485,1±5,87
Si	319,47±29,86	670,2±38,57	1037,2±102,57	496,83±35,7
Ti	167,93±9,99	407,8±17,67	170,93±7,8	226,9±2,69

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4	5
Cr	0	0	4,733±0,4	0,21±0,02
Mn	709,27±40,01	537,67±34,11	4122,67±180,62	775,3±17,01
Fe	495,47±57,25	682,67±53,25	962±60,88	836,73±36,86
Co	1,34±0,11	3,54±0,34	21,4±0,95	2,74±0,26
Ni	10,95±0,62	13,41±0,42	12,93±0,55	23,52±0,64
Pb	3,98±0,63	6,62±0,25	6,68±0,37	8,64±0,55
Mo	0	0,18±0,04	0,05±0,01	0
Sn	0,16±0,02	0	0,2±0,01	0
Ba	67,93±1,29	289,73±2,65	38,3±3,35	85,33±6,05

В ветвях ели обыкновенной наибольшее содержание приходится на марганец, железо и кремний (Таблица 23). Хром, молибден и олово, обнаружены в ветвях в незначительных количествах. Для большинства металлов максимум содержания наблюдается в зимние месяцы. Содержание меди, алюминия, титана, железа, кобальта, никеля и свинца, снижается летом. Кроме того, содержание остальных элементов летом так же снижается. Таким образом, содержание микроэлементов в ветвях, в основном увеличивается к зиме, и существенно снижается в летний период, в период активного роста и развития.

Ряд биологического поглощения микроэлементов в ветвях ели обыкновенной в зависимости от времени года:

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

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

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

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

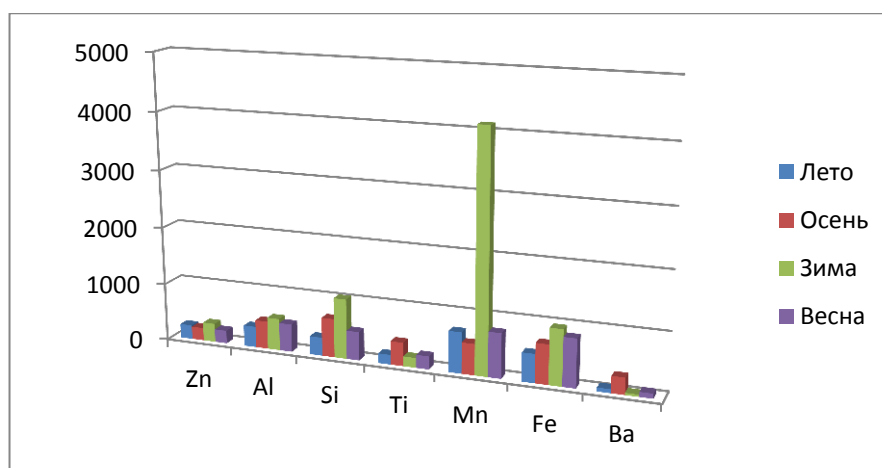


Рисунок 8. Сезонная динамика основных микроэлементов в ветвях, мкг/кг.

Содержание марганца в ветвях резко увеличивается в зимний период после осеннего минимума (Рисунок 8), весной вновь наблюдается снижение содержания. Для кремния характерно плавное накопление, начиная с минимального значения летом, и заканчивая зимним максимумом, с постепенным снижением содержания весной. Подобный график содержания характерен и для железа. Для большинства металлов максимум содержания в зимние месяцы. Барий и титан больше накапливаются летом (Гуляев Д.К., и др. 2015) [36].

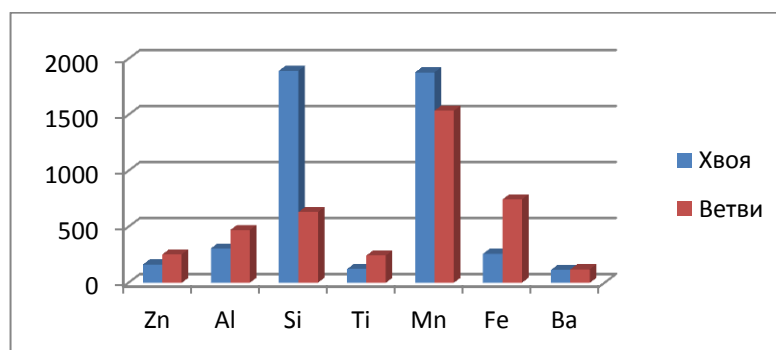


Рисунок 9. Содержание основных микроэлементов в хвое и ветвях ели обыкновенной (среднее значение по основным периодам вегетации), мкг/кг.

Сравнивая содержание основных микроэлементов хвои и ветвей ели обыкновенной (Рисунок 9), установлено, что в ветвях элементов содержится больше, за исключением кремния и марганца, которых больше накапливается в хвое.

3.4. Исследование пигментов

Фотосинтетические пигменты играют в жизни растения важную роль, являясь главными фоторецепторами фотосинтетического аппарата клетки. Пигментный состав считается одним из наиболее информативных показателей, характеризующих состояние фотосинтетического аппарата хвойных растений [90,91].

Проведено изучение состава и содержания пигментов в хвое ели обыкновенной.

3.4.1. Исследование качественного состава пигментов

Пигментный состав хвои ели обыкновенной изучали по методике, представленной в (разделе 2.5.1).



Рисунок 10. Схема хроматограммы пигментов древесной зелени ели обыкновенной.

Окрашенные полосы на хроматограмме, представленной на рисунке 10, демонстрируют наличие хлорофиллов а и b, а так же каротиноидов согласно (Сапожникову Д.И) [99].

3.4.2. Исследование количественного содержания пигментов

Содержание пигментов в хвое ели обыкновенной подвержено сезонным изменениям [90,100]. Для определения оптимальных сроков заготовки сырья, с целью получения хлорофиллов и каротиноидов, представляет интерес изучение сезонной динамики накопления пигментов в хвое ели обыкновенной.

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически при длине волны 644 и 662 нм - для хлорофиллов а и b, 440,5 – для каротиноидов (Приложение 1).

Результаты исследования содержания пигментов в хвое ели обыкновенной представлены на рисунке 11.

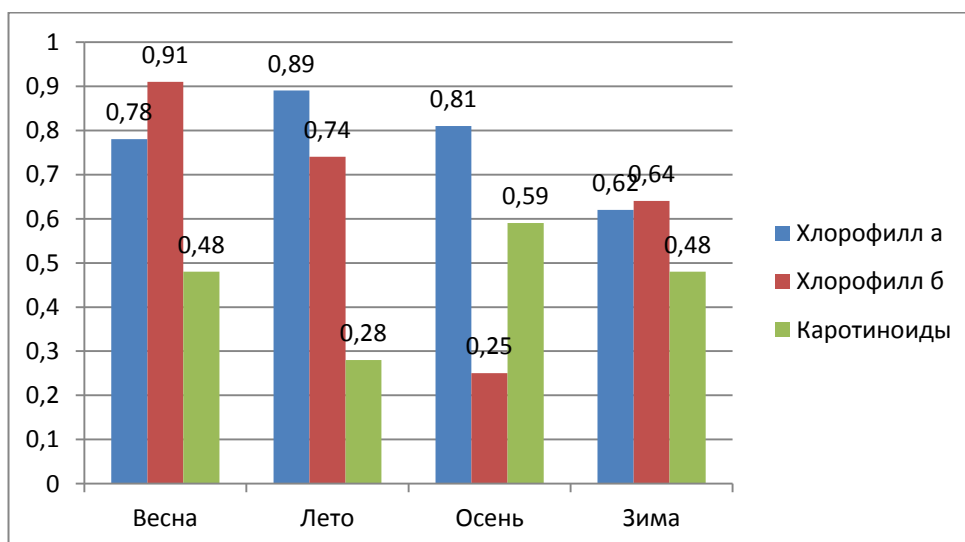


Рисунок 11. Сезонная динамика содержания пигментов в хвое ели обыкновенной, мг/г.

На основании экспериментальных данных (Рисунок 11) можно сделать вывод, что содержание хлорофилла «б» максимальное приходится на весну и лето, значительное снижение наблюдается к осени. Содержание хлорофилла «а» максимальное весной, летом и осенью, уменьшается зимой. Сумма пигментов выше в весенне-летний период.

Каротиноиды содержатся в хвое ели обыкновенной в меньшем количестве по сравнению с хлорофиллами. Содержание каротиноидов

подвержено сезонным колебаниям с максимумом накопления осенью и минимальным значением летом.

Таким образом, исследования показали целесообразность заготовки хвои ели обыкновенной с максимальным содержанием хлорофиллов в весенне-летний период, а заготовку хвои для получения каротиноидов необходимо проводить осенью.

3.5. Исследование аскорбиновой кислоты

В народной медицине древесную зелень ели используют как противогинготное средство. Представляло интерес изучить содержание аскорбиновой кислоты в древесной зелени ели обыкновенной, а так же динамику накопления аскорбиновой кислоты в разное время года.

Определение аскорбиновой кислоты в древесной и шишках ели обыкновенной проводили по методике (раздел 2.6.1).

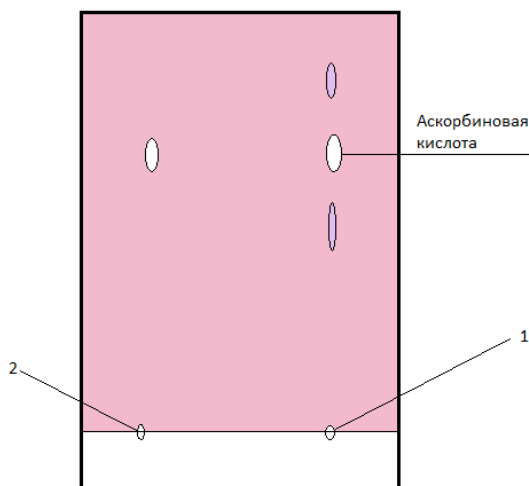


Рисунок 12. Хроматограмма аскорбиновой кислоты.

1-водное извлечение из древесной зелени; 2-PCO аскорбиновой кислоты.

На светлом флуоресцирующем фоне, на уровне фиолетового пятна стандарта обнаруживалась в виде пятна фиолетового цвета с величиной R_f около 0,6 аскорбиновая кислота (Рисунок 12). Затем хроматограмму

проявляли из пульверизатора раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Аскорбиновая кислота обнаруживалась в виде белого пятна на розовом фоне с величиной R_f около 0,6.

Содержание аскорбиновой кислоты определяли по методике представленной в (разделе 2.6.2). Определение проводили на сухом сырье (сушка в течение двух недель воздушно-теневым способом).

Результаты представлены на рисунке 13.

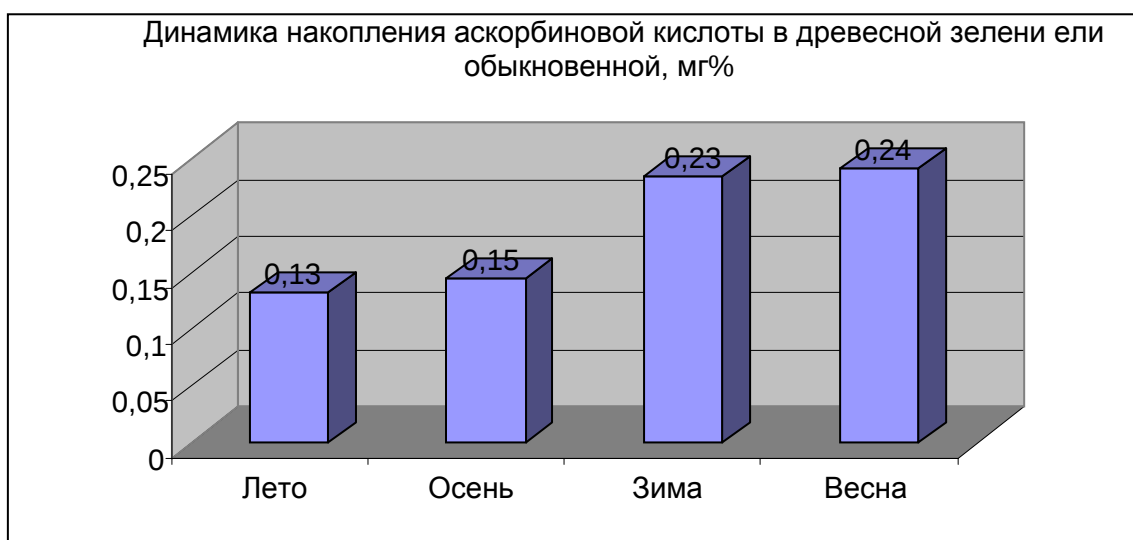


Рисунок.13. Динамика накопления аскорбиновой кислоты в древесной зелени ели обыкновенной, мг%.

Установлено, что содержание аскорбиновой кислоты подвержено сезонным колебаниям с максимумом накопления зимой и весной и минимальным значением летом.

Известно, что содержание аскорбиновой кислоты в растениях увеличивается в условиях стресса, поэтому в период пониженных температур (зима) повышение содержания аскорбиновой кислоты объясняется антистрессовой защитной функцией [53].

Накопление аскорбиновой кислоты в весенний период (Рисунок 13) обусловлено высокой интенсивностью биосинтетических процессов, происходящих в хвое, в результате которых образуются питательные

вещества и витамины, необходимые для формирования генеративных органов. Летний период характеризовался наиболее низким уровнем аскорбиновой кислоты, это обусловлено активацией процесса дыхания в период более высоких температур, когда активно используется аскорбиновая кислота.

Таблица 24 - Содержание аскорбиновой кислоты при разных способах обработки

Образец	Способ обработки	Содержание аскорбиновой кислоты, %
1	2	3
Древесная зелень	Свежая	0,38±0,02
Древесная зелень	Сушка при температуре 4-8 °С	0,21±0,03
Древесная зелень	Воздушно-тенивая сушка при температуре 15-20 °С	0,18±0,03
Молодые побеги	Свежие	0,39±0,04

Наибольшее содержание аскорбиновой кислоты обнаружено в молодых побегах и свежей древесной зелени, а наименьшее в древесной зелени, высушенной воздушно-тенивым способом при температуре 15-20 °С (Таблица 24). Также установлено высокое содержание аскорбиновой кислоты в сырье, высушенном при температуре 4-8 °С. Исходя из этого, можно сделать вывод, что режим сушки при температуре 4-8 °С является оптимальным.

Выводы к главе 3.

1. Проведено исследование компонентного состава эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной:

- Компонентный состав эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной более многообразен, чем компонентный состав шишек. Состав обоих эфирных масел представлен преимущественно монотерпенами.
- Установлено, что компонентный состав отдельных фракций эфирного масла древесной зелени различен. Первые фракции состоят в основном из легколетучих монотерпеновых соединений, последние содержат больше сесквитерпенов.
- Исследована сезонная динамика компонентов эфирного масла древесной зелени. Установлено, что компонентный состав эфирного масла варьирует в зависимости от времени года и места произрастания образца. Но, в целом, в составе эфирного масла древесной зелени в разных количествах присутствуют основные компоненты в течение всего года, что позволяет вести заготовку сырья для получения эфирного масла круглогодично. Сезонная динамика компонентного состава эфирного масла древесной зелени молодых деревьев так же указывает на возможность использования данного сырья круглогодично.

2. Получены полисахаридные фракции ВРПК и ПВ древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Проведено исследование химического состава и содержания полисахаридов в древесной зелени и шишках. Моносахаридный состав гидролизатов полисахаридных фракций представлен арабинозой и галактозой.

3. Проведено исследование микроэлементного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Так же изучена сезонная динамика содержания микроэлементов в древесной зелени. Установлено, что содержание микроэлементов варьирует в зависимости от органа растения. В хвое ели

обыкновенной, как и в ветвях, наблюдается увеличение содержания микроэлементов в зимние месяцы.

4. Изучено содержание хлорофиллов а/б и каротиноидов в древесной зелени. Установлено, что следует вести заготовку древесной зелени с максимальным содержанием хлорофиллов в весенне-летний период, а с максимальным содержанием каротиноидов осенью.

5. Установлено, что повышение содержания аскорбиновой кислоты происходит в зимне-весенний период.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ХВОИ И ШИШЕК ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Нами проведено изучение анатомического строения ели обыкновенной шишек и хвои. Анатомическое исследование имеет большое значение для установления подлинности лекарственного растительного сырья, отличия его от примесей. Результатом исследования анатомического строения является комплекс основных диагностических признаков, ели обыкновенной шишек и хвои.

4.1. Исследование анатомического строения шишек ели обыкновенной

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

Семенная чешуя у молодых шишек удлинненно – овальной формы, зеленовато – коричневого цвета, длиной 8-10 мм, шириной 5-7 мм. У более зрелых шишек семенные чешуи значительно крупнее - длиной 2,5-2,7 см, шириной 1,4-1,5 см, широко ромбические, на верхушке усеченные, неравнозубчатые, у основания клиновидно - суженные; их поверхность зеленовато - или светло - коричневая, в верхней части блестящая, у основания более темная, матовая.

Кроющие чешуи длиной 3-4 мм, шириной 1,2-1,6 мм, ланцетовидные, пленчатые, с вытянутой бахромчатой по краю верхушкой, красновато - коричневого цвета.

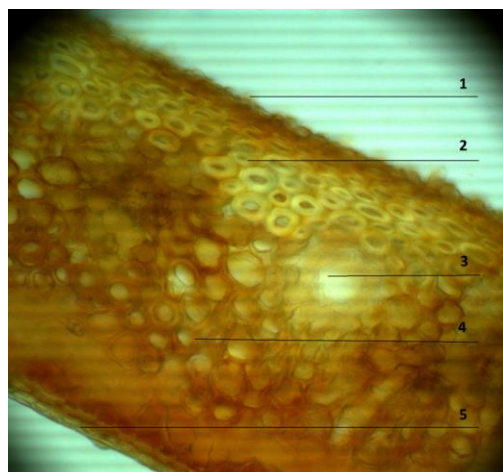


Рисунок 14. Поперечный срез семенной чешуи шишки ели.

1-двухклеточные волоски (Увеличение $\times 40$); 2-клетки склеренхимы; 3-смоляные ходы;

4-паренхимные клетки; 5-клетки эпидермиса.

Цельное сырьё. При рассмотрении поперечного среза семенной чешуи (Рисунок 14) в средней части видны клетки эпидермиса с обеих сторон, овальные, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы(5). На поверхности чешуи, особенно на внутренней стороне, расположены простые одноклеточные, реже двухклеточные волоски сосочковидной или конической формы(1). На внешней стороне волоски меньшего размера и расположены реже. Под эпидермисом с обеих сторон расположены клетки склеренхимы с сильно утолщёнными и полуудревесневшими оболочками(2). Количество слоёв склеренхимы от верхушки к основанию семенной чешуи увеличивается. В средней части мезофилла расположены тонкостенные паренхимные клетки(4), хлорофиллоносные зелёные у молодых шишек, и отмирающие коричневого и светло-коричневого цвета у более зрелых. В мезофилле расположены проводящие пучки (8-12 штук), сдавленные мелкие в верхней части и более крупные у основания чешуи. Диаметр смоляных ходов(3) увеличивается от верхушки к основанию чешуи, центральный ход большего размера особенно у основания чешуи.

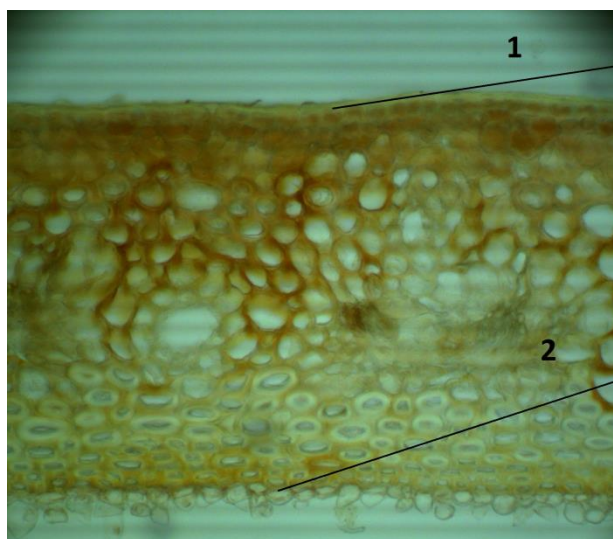


Рисунок 15. Срез верхней части семенной чешуи (Увеличение $\times 40$).

1-внешняя сторона; 2-внутренняя сторона.

На срезе верхней части семенной чешуи (Рисунок 15) с внешней стороны семенной чешуи(1) видны клетки эпидермы с толстым слоем кутикулы, под эпидермой расположен слой колленхимы, а с внутренней стороны чешуи(2) под эпидермисом расположен слой склеренхимы.

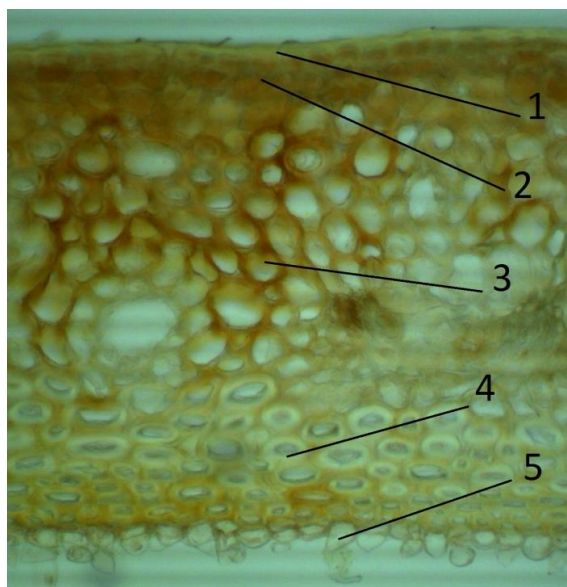


Рисунок 16. Эпидермис и колленхима верхней части семенной чешуи (Увеличение $\times 40$).

1-Эпидермис с толстым слоем кутикулы; 2-слой колленхимы; 3-паренхима; 4-склеренхима; 5-волоски.

Слой колленхимы под эпидермисом внешней стороны семенной чешуи (Рисунок 16) присутствует только на поперечных срезах в верхней части семенной чешуи. В средней и нижней части семенной чешуи под эпидермисом слой колленхимы отсутствует, его сменяет склеренхима.

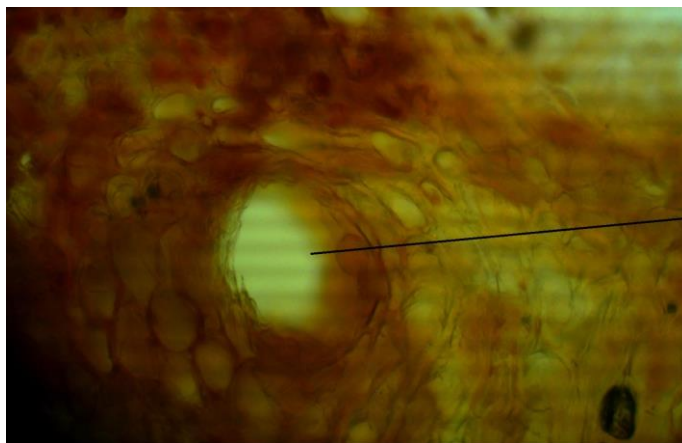


Рисунок 17. Смоляной ход (Увеличение $\times 400$).

Смоляные ходы тянутся от основания до верхушки семенной чешуи (Рисунок 17), обычно около 8 – 10 штук на каждой.

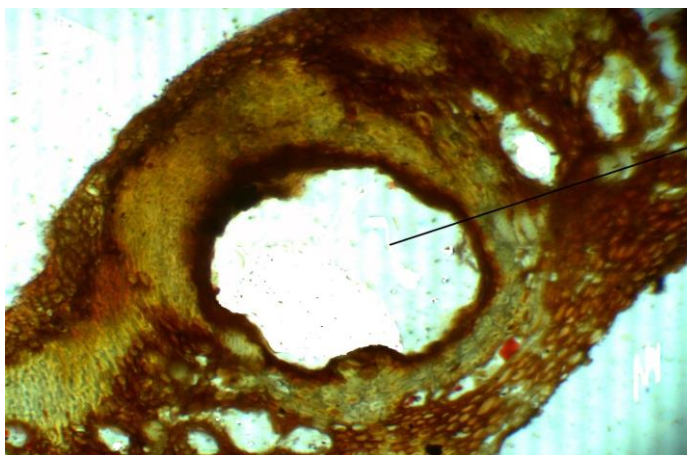


Рисунок 18. Центральный смоляной ход (Увеличение $\times 40$).

Центральный смоляной ход, у основания семенной чешуи имеет в несколько раз больший диаметр по сравнению с диаметром смоляного хода верхней части чешуи (Таблица 25, рисунок 18). У основания семенной чешуи клетки склеренхимы образуют гораздо большее количество слоёв клеток в сравнении с центральной и верхней частью чешуи. Клетки паренхимы, одревесневшие, и образуют полости.

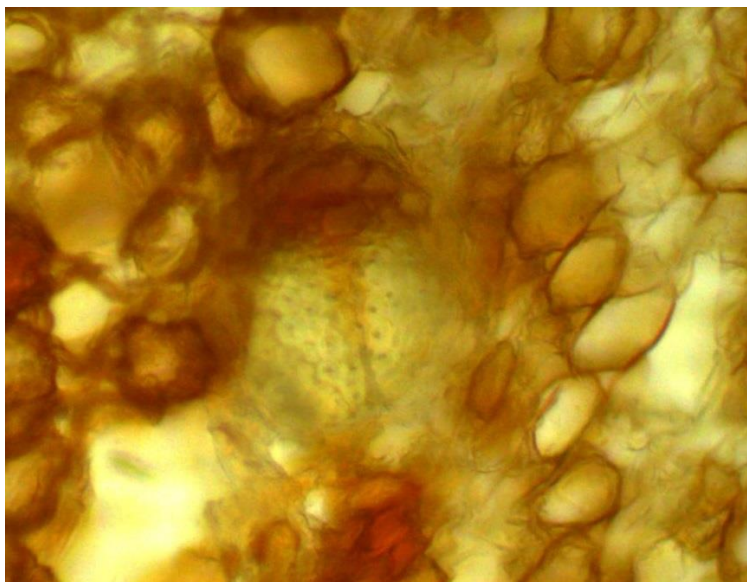


Рисунок 19. Проводящий пучок (Увеличение $\times 400$).

Проводящие пучки, мелкие, сдавленные, обычно расположены по 8 – 12 штук вдоль всей семенной чешуи (Рисунок 19).

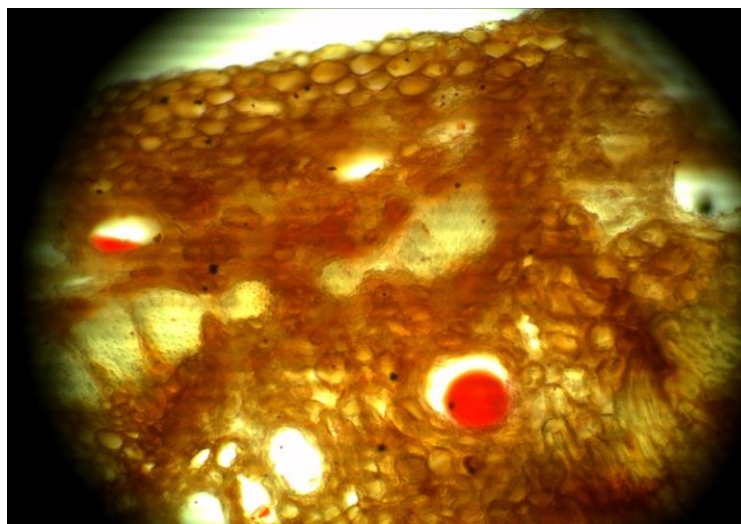


Рисунок 20. Смоляной ход после обработки суданом III (Увеличение $\times 100$).

Содержимое смоляных ходов, а так же маслянистые включения в виде мелких капель в клетках эпидермиса и мезофилла окрашиваются раствором судана III в красно-оранжевый цвет (Рисунок 20).

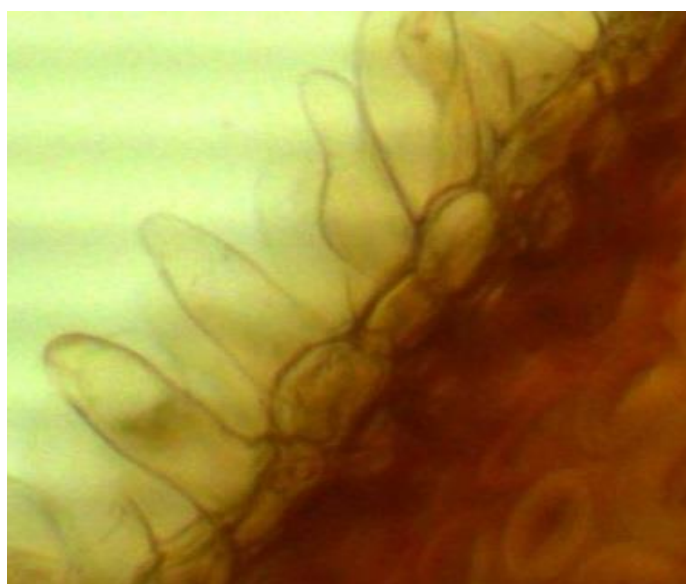


Рисунок 21. Эпидермис внутренней поверхности семенной чешуи (Увеличение $\times 400$).

Одноклеточные, реже двуклеточные волоски сосочковидной или конической формы, длиной $0,67 \pm 0,25$ мм, образуют сплошной покров на внутренней поверхности семенной чешуи (Рисунок 21). Слой кутикулы более тонкий, чем на внешней поверхности.

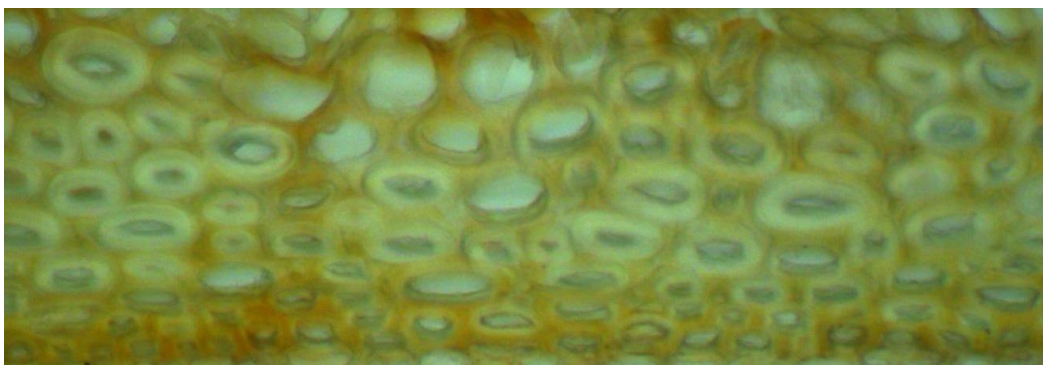


Рисунок 22. Клетки склеренхимы (Увеличение $\times 100$).

Клетки склеренхимы находятся под эпидермисом (Рисунок 22), образуют сплошной механический пояс вдоль всей семенной чешуи. Клетки длиной $0,61 \pm 0,15$ мм толстостенные, крупные преимущественно продолговатой или круглой формы желтого или светло-желтого цвета.

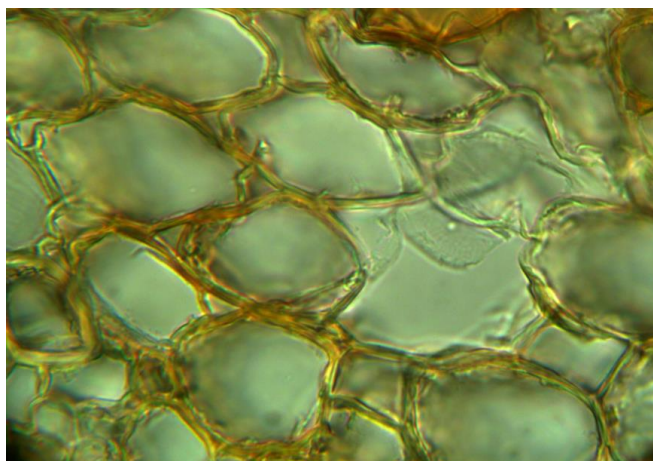


Рисунок 23. Клетки паренхимы (Увеличение $\times 400$).

Паренхимные клетки семенной чешуи тонкостенные, продолговатой формы у молодых шишек, и толстостенные с полуодревесневшими стенками у более зрелых (Рисунок 23). Паренхимные клетки длиной $0,62 \pm 0,18$ мм заполняют всё пространство мезофилла семенной чешуи.

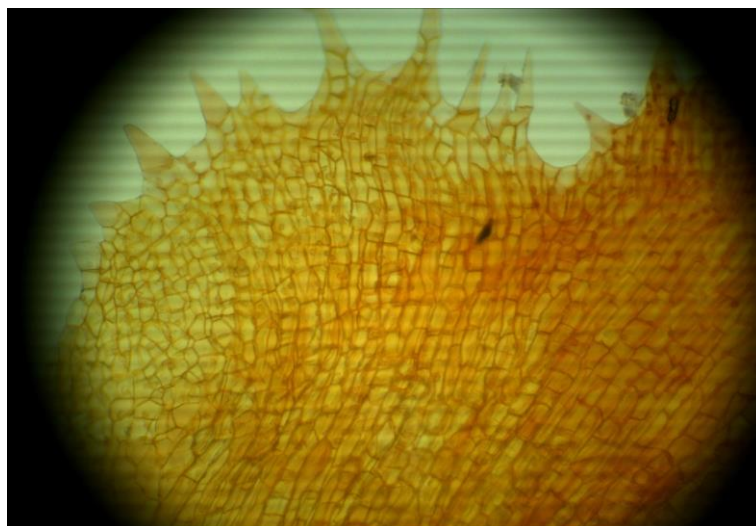


Рисунок 24. Кроющая чешуя (Препарат с поверхности, увеличение $\times 100$).

На препарате кроющей чешуи с поверхности (Рисунок 24) видны вытянутые клетки с четковидно - утолщенными оболочками, расположенные плотно без межклетников.

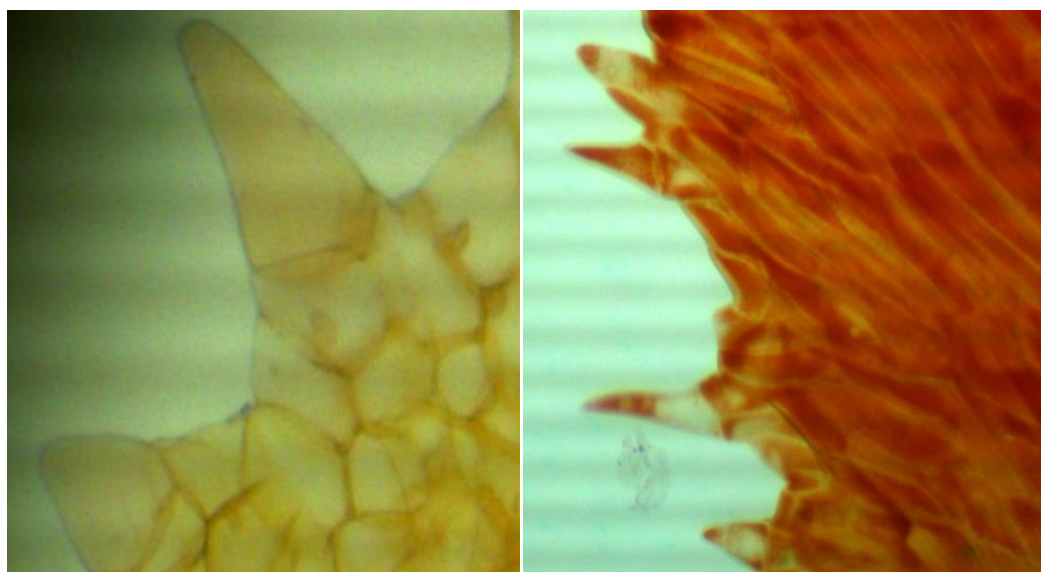


Рисунок 25. Волоски кроющей чешуи (Препарат с поверхности, увеличение $\times 100$).

По краю чешуи видны многоклеточные простые волоски конической формы (Рисунок 25).

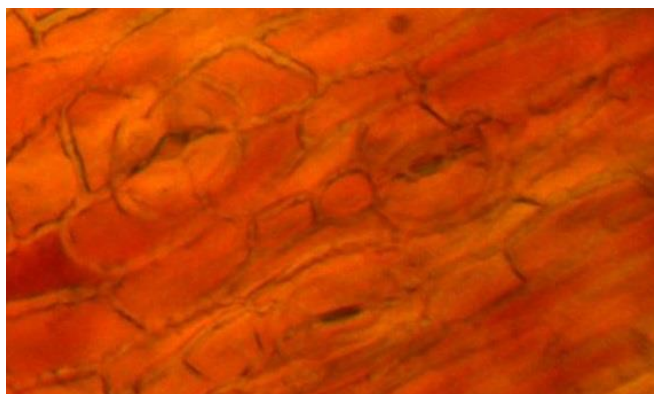


Рисунок 26. Устья кроющей чешуи (Препарат с поверхности, увеличение $\times 400$).

В верхней части кроющей чешуи и вдоль центральной жилки видны мелкие устья (Рисунок 26).

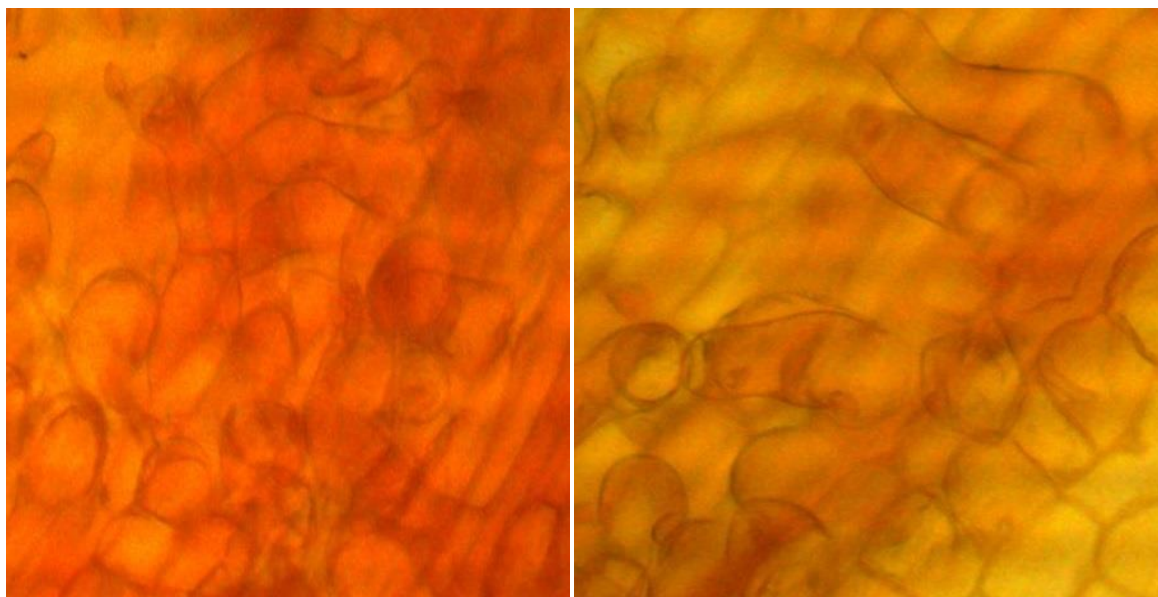


Рисунок 27. Волоски кроющей чешуи (Препарат с поверхности, увеличение $\times 400$).

На внешней поверхности кроющей чешуи видны одноклеточные, реже двухклеточные извилистые волоски продолговатой или конической формы (Рисунок 27). Волоски расположены на внешней поверхности вдоль центральной жилки ближе к основанию чешуи.

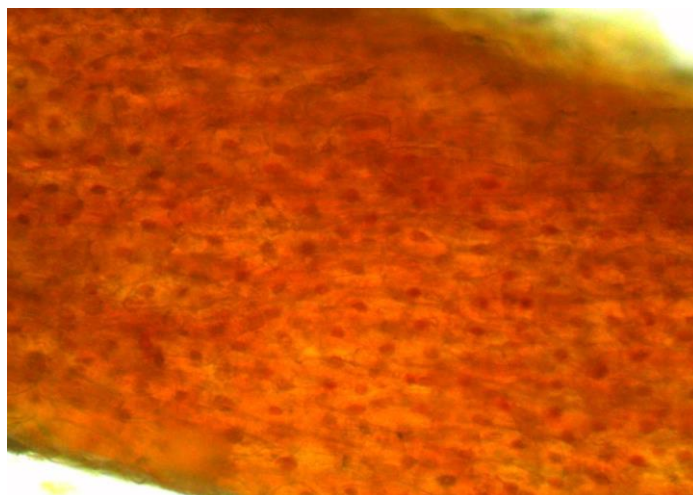


Рисунок 28. Кожура семени (Препарат с поверхности, увеличение $\times 100$).

На препарате кожуры семени (Рисунок 28) с поверхности видны толстостенные каменистые клетки с темно-коричневым содержимым.

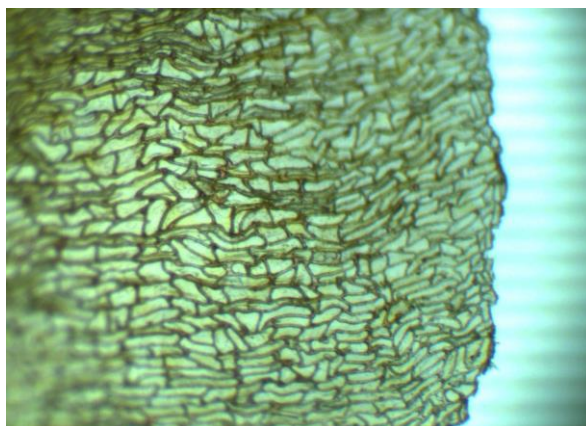


Рисунок 29. Клетки крыла семени (Препарат с поверхности, увеличение $\times 100$).

Клетки свободного конца крыла семени вытянутые с четковидно-утолщёнными оболочками (Рисунок 29).

Таблица 25 - Диаметр смоляных ходов семенной чешуи (мм)

Параметры	Диаметр центрального смоляного хода	Диаметр остальных смоляных ходов
Верх семенной чешуи	$0,27 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,01$

Продолжение таблицы 25

1	2	3
Центр семенной чешуи	$0,93 \pm 0,15$	$0,09 \pm 0,02$
Низ семенной чешуи	$1,77 \pm 0,78$	$0,13 \pm 0,05$

Как следует из результатов (Таблица 25), максимальный диаметр смоляных ходов увеличивается от верхней части к основанию чешуи. Размеры центрального смоляного хода значительно отличаются от остальных смоляных ходов. Длина и ширина увеличивается так же от верхушки к основанию.

Измельченное сырье. Кусочки сырья различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 10 мм.

При рассмотрении видны кусочки семенной чешуи коричневого, светло - коричневого, зеленовато – коричневого цвета. Кроющиеся чешуи, измельченные или целые красновато-коричневого цвета. Семена яйцевидные, коричневые, длиной до 5 мм, шириной до 3 мм. Видны частички крыла семени разного размера и формы.

Порошок. Коричневого, красно - коричневого, зеленовато – коричневого цвета, проходящий сквозь сито с отверстиями размером 0,16 мм.

4.2. Исследование анатомического строения хвои ели обыкновенной

Хвоя ели обыкновенной представляет собой – одиночные жёсткие игольчатые листья, длиной 2-2,5 см и шириной 1-1,5 мм. Хвоя четырёхгранной формы, заострённая на конце, тёмно-зелёная, блестящая.

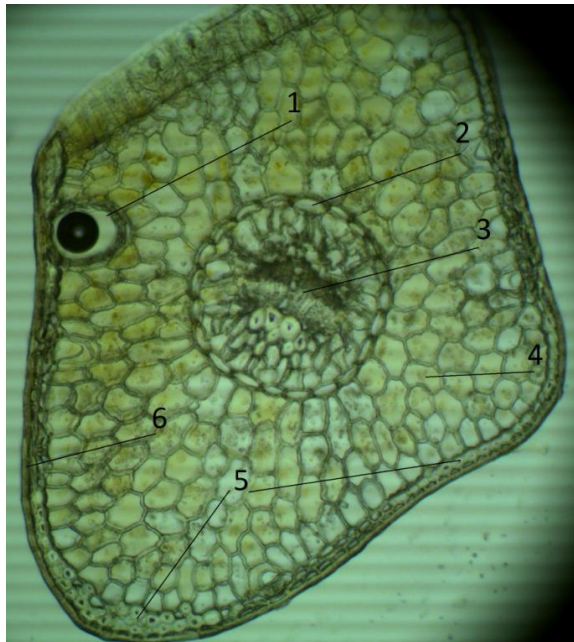


Рисунок 30. Поперечный срез хвои ели обыкновенной (Увеличение $\times 100$). 1-смоляной ход; 2-эндодерма; 3-центральный проводящий пучок; 4-паренхима; 5-гиподерма; 6-эпидерма.

На поперечном срезе хвои ели обыкновенной (Рисунок 30) видны клетки эпидермиса с толстым слоем кутикулы, под эпидермисом клетки гиподермы, в мезофилле расположена ассимиляционная складчатая паренхима, центральный проводящий цилиндр окружает эндодерма.



Рисунок 31. Хвоя ели (Увеличение $\times 400$). 1 – эпидермис; 2 – гиподерма; 3 – паренхима мезофилла.

Различимы два слоя: наружный – эпидермис и внутренний – гиподерма. Снаружи эпидермис покрыт толстым слоем кутикулы. (Рисунок 31). Клетки мезофилла хвой представлены складчатой паренхимой.

Гиподерма расположена под эпидермисом по всему периметру хвой. Клетки гиподермы длиной $0,71 \pm 0,18$ мм, представлены склеренхимой с сильно утолщённой стенкой.

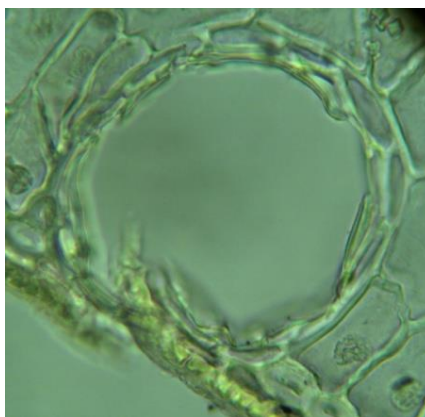


Рисунок 32. Смоляной ход (Увеличение $\times 400$).

Смоляной ход расположен в мезофилле хвой (Рисунок 32). Стенки смоляного хода состоят из выстилающего эпителия, по периферии смоляной ход окружает складчатая паренхима. Диаметр смоляного хода около $0,98 \pm 0,21$ мм.

Смоляные ходы хвой могут выполнять и защитную функцию, против насекомых и травоядных животных. Содержимое смоляного хода представляет собой органическую жидкость, содержащую терпеноиды, смоляные кислоты и другие соединения [102].

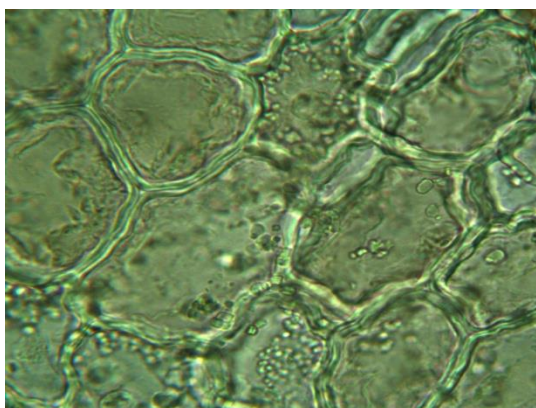


Рисунок 33. Клетки мезофилла хвой (Увеличение $\times 400$).

Складчатая паренхима расположена в мезофилле хвой (Рисунок 33), имеет извилистые толстые стенки. Длина клеток - $0,61 \pm 0,11$ мм.



Рисунок 34. Устьице хвой (Увеличение $\times 400$). 1- Складчатая паренхима; 2 – транспирационная полость; 3 – замыкающие клетки; 4 – устьичная щель.

Устьица хвой представляют собой образования эпидермиса, состоящие из двух замыкающих клеток и нескольких околоустьичных клеток (Рисунок 34). Устьица предназначены для газообмена и испарения воды. Клетки паренхимы, в месте соприкосновения с устьищем образуют небольшую транспирационную полость. Количество устьиц на поперечном срезе около $7,79 \pm 0,45$.



Рисунок 35. Проводящая система хвой (Увеличение $\times 400$). 1 – эндодерма; 2 – трансфузионная ткань; 3 – клетки склеренхимы; 4 – флоэма; 5 – ксилема.

Эндодерма (1) служит для соединения проводящей системы и мезофилла хвой (Рисунок 35). Ксилема хвой ели обыкновенной представлена трахеидами. Флоэма представлена ситовидными клетками. Для ели характерна более развитая ксилема по сравнению с флоэмой [102].

4.3. Сравнительный анализ анатомического строения древесной зелени и шишек *Picea abies*, *Picea obovata* и *Abies sibirica*

Сравнительное анатомическое исследование древесной зелени и шишек двух видов ели и пихты, прежде всего, применимо для анализа измельчённого сырья. Цельное же сырьё достаточно просто отличить по внешним признакам, тогда как для установления подлинности измельчённого сырья необходимо определить ряд диагностических признаков.

4.3.1. Сравнительный анализ анатомического строения шишек *Picea abies*, *Picea obovata* и *Abies sibirica*

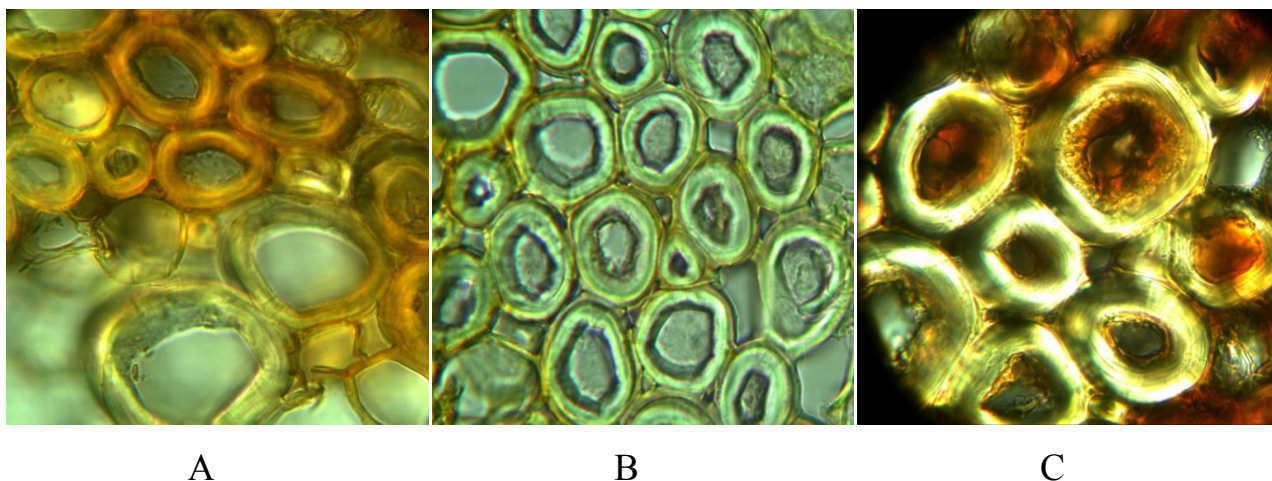
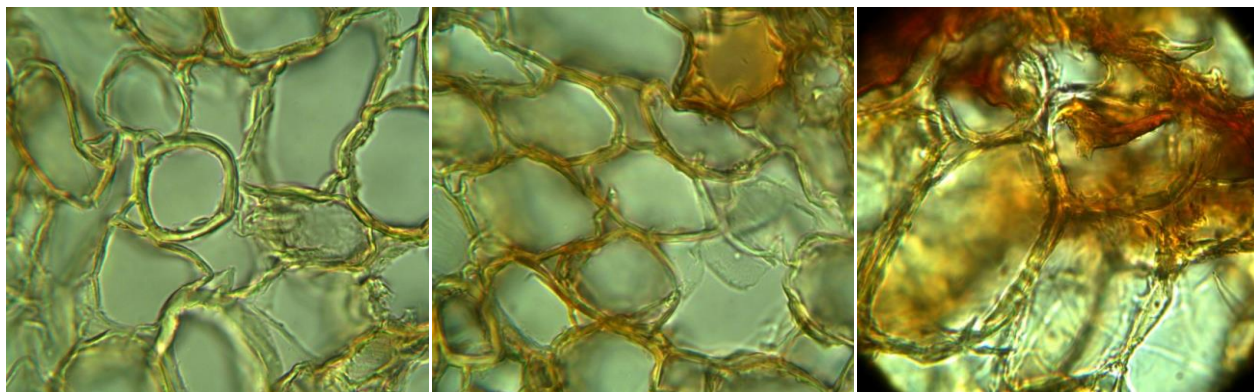


Рисунок 36. Склеренхима семенной чешуи (Увеличение $\times 400$). А – *Picea abies*, В – *Picea obovata*, С – *Abies sibirica*.

Клетки склеренхимы семенной чешуи (Рисунок 36) у обоих видов ели крупные, толстостенные с одревесневшими стенками. Склеренхимные клетки пихты имеют более толстую стенку. Склеренхима пихты не образует

сплошного слоя клеток, количество слоёв клеток меньше чем у ели. Длина клеток всех трёх видов около 0,6 мм (Таблица 26)



А

В

С

Рисунок 37. Паренхима семенной чешуи (Увеличение $\times 400$). А – *Picea abies*, В – *Picea obovata*, С – *Abies sibirica*.

Паренхимные клетки семенной чешуи обоих видов ели тонкостенные (Рисунок 37), продолговатой формы у молодых шишек, и толстостенные с полуодревесневшими стенками у более зрелых. Клетки паренхимы пихты значительно крупнее (Таблица 26), имеют толстую стенку, которая быстро одревесневает.



А

В

С

Рисунок 38. Волоски семенной чешуи (Увеличение $\times 400$). А – *Picea abies*, В – *Picea obovata*, С – *Abies sibirica*.

Волоски семенной чешуи ели обыкновенной (Рисунок 38) многоклеточные и одноклеточные, сосочковидной или конической формы, суженные на конце. Волоски семенной чешуи ели сибирской большего

размера (Таблица 26), преимущественно продолговатой формы, не сужены на конце и расположены гуще.

Волоски семенной чешуи пихты многоклеточные и одноклеточные, сосочковидной или конической формы, значительно крупнее волосков ели и расположены реже.

Таблица 26 - Размеры клеток семенной чешуи *Picea abies*, *Picea obovata* и *Abies sibirica*

Тип клеток	Длина клеток (мм)		
	<i>Picea abies</i>	<i>Picea obovata</i>	<i>Abies sibirica</i>
1	2	3	4
Склеренхима семенной чешуи	0,61±0,15	0,6±0,13	0,62±0,15
Волоски семенной чешуи	0,67±0,25	0,75±0,36	0,98±0,56
Паренхима семенной чешуи	0,62±0,18	0,62±0,13	0,71±0,2

4.3.2. Сравнительный анализ анатомического строения хвои *Picea abies*, *Picea obovata* и *Abies sibirica*

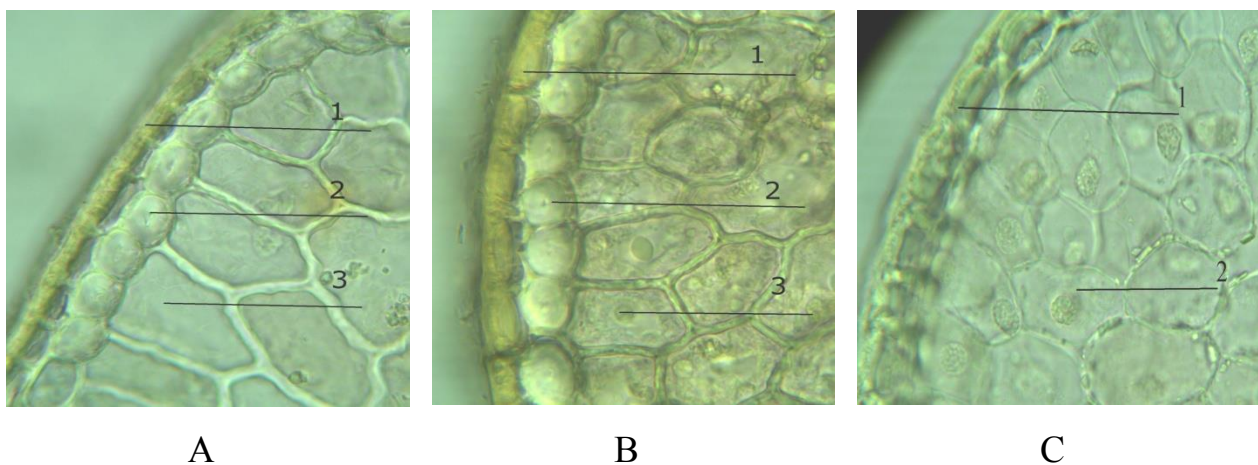
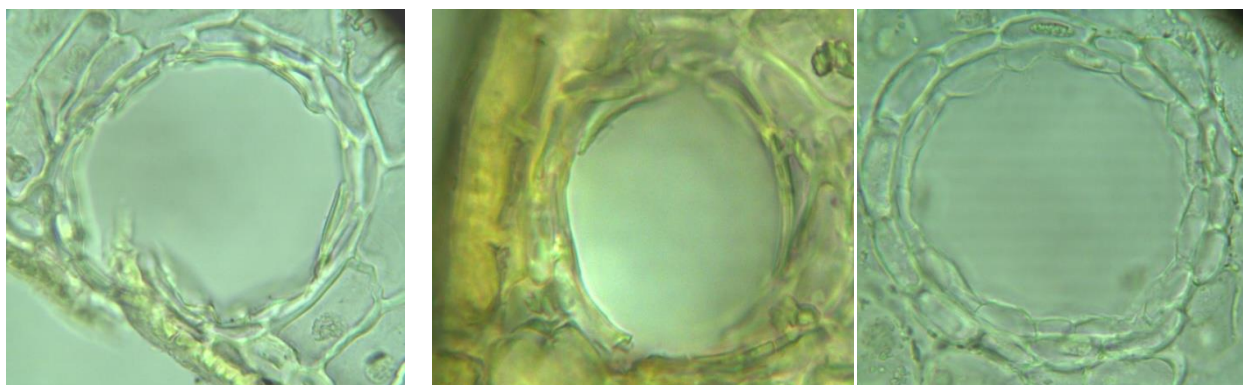


Рисунок 39. Хвоя (Увеличение $\times 400$). А – *Picea abies*, В – *Picea obovata*, С – *Abies sibirica*. 1 – эпидермис; 2 – гиподерма; 3 – паренхима мезофилла.

Эпидермис хвои ели обыкновенной (Рисунок 39) имеет слой кутикулы тоньше, чем у ели сибирской и пихты. Под эпидермисом у обоих видов ели расположен слой гиподермы, представленный склеренхимой, который у пихты отсутствует. Длина клеток гиподермы у обоих видов ели примерно равна (Таблица 27). Гиподерма придаёт хвое обоих видов ели большую прочность и твёрдость.

Клетки паренхимы пихты отличаются по форме. Для паренхимы ели характерна продолговатая форма, а для пихты от округлой до яйцевидной. Паренхимные клетки ели сибирской больше по длине клеток ели обыкновенной и пихты (Таблица 27).



А

В

С

Рисунок 40. Смоляной ход (Увеличение $\times 400$). А – *Picea abies*, В – *Picea obovata*, С – *Abies sibirica*.

Смоляной ход расположен в мезофилле хвои всех трёх исследуемых растений (Рисунок 40). Смоляной ход хвои пихты большего диаметра $1,06 \pm 0,21$ мм (Таблица 27). В остальном характерных отличий соляных ходов не наблюдается.

Таблица 27 - Сравнение размеров клеток хвои ели обыкновенной, ели сибирской и пихты сибирской

Тип клеток	Длина клеток, мм		
	Ель обыкновенная	Ель сибирская	Пихта сибирская
1	2	3	4

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4
Паренхима	0,61±0,11	0,76±0,15	0,53±0,09
Гиподерма	0,46±0,06	0,5±0,05	-
Эндодерма	0,71±0,18	0,82±0,13	0,49±0,1
Смоляной ход (диаметр)	0,98±0,21	0,93±0,26	1,06±0,21

- отсутствие

Значительных отличий по длине клеток ели обыкновенной и ели сибирской не выявлено (Таблица 27). Клетки паренхимы и эндодермы пихты заметно меньше подобных клеток обоих видов ели, а смоляной ход хвои пихты наоборот, большего диаметра.

Выводы к главе 4.

1. Определены особенности анатомического строения шишек ели обыкновенной, которые включены в проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки» раздел «Микроскопия».
2. Проведено сравнительное анатомическое исследование хвои и шишек ели обыкновенной, ели сибирской и пихты сибирской. Между двумя видами ели значительных отличий в анатомическом строении не выявлено, имеются отличия только по размерам клеток. Хвоя и шишки пихты кроме размеров клеток также имеют отличия от ели и по анатомическому строению и расположению паренхимы хвои и шишек, по отсутствию гиподермы в хвое.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Древесная зелень и шишки ели обыкновенной являются богатейшим источником биологически активных веществ. Из всего многообразия классов веществ данного вида сырья, особого внимания заслуживают полисахариды и эфирные масла.

Для растительных полисахаридов и эфирных масел характерно наличие широкого спектра фармакологического действия [16,89,114,127]. Кроме того, растительные полисахариды и эфирные масла не токсичны для организма человека [40].

Учитывая литературные данные о биологической активности данных групп веществ и результаты проведённого фитохимического исследования, было проведено исследование фармакологической активности и острой токсичности полисахаридных фракций и эфирного масла древесной зелени и шишек ели обыкновенной.

5.1. Исследование острой токсичности полисахаридов древесной зелени и шишек

Исследование острой токсичности полисахаридных фракций проводили по стандартной методике (раздел 2.8.1).

Результаты исследования представлены в таблице 28.

Таблица 28 - Определение острой токсичности полисахаридных фракций ели обыкновенной

Фракция	ЛД ₅₀ , перорально (мг/кг)	Класс токсичности согласно ГОСТ 12.1.007-76
1	2	3

Продолжение таблицы 28

1	2	3
ВРПК шишек	>5000	Малотоксично
ВРПК древесной зелени	>5000	Малотоксично
ВРПК хвои	>5000	Малотоксично
ВРПК ветвей	>5000	Малотоксично
ПВ шишек	3250	Умеренно токсично
ПВ древесной зелени	815	Умеренно токсично
ПВ хвои	1290	Умеренно токсично
ПВ ветвей	2390	Умеренно токсично

Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести водорастворимый полисахаридный комплекс древесной зелени и шишек ели обыкновенной к классу 4 малотоксичных веществ ($LD_{50} > 5000$). При исследовании острой токсичности ВРПК древесной зелени и шишек ели обыкновенной у всех экспериментальных животных не выявлено симптомов отравления, а так же летального исхода. Установлено, что LD_{50} ВРПК находится на уровне > 5000 мг/кг, исследование более высоких доз ограничено возможными объёмами введения фракций лабораторным животными.

ВРПК шишек и древесной зелени обладает гораздо меньшей токсичностью по сравнению с пектиновыми веществами, полученными из тех же органов. Пектиновые вещества органов ели отнесены к классу 3 (умеренно токсичные).

5.2. Исследование противовоспалительной активности полисахаридов древесной зелени и шишек

Исследовали противовоспалительную активность у водорастворимого полисахаридного комплекса и пектиновых веществ древесной зелени ели обыкновенной. Определение противовоспалительной активности проводили на модели острого воспалительного отека, методика (раздел 2.8.2).

На основе полученных результатов определяли эффект торможения в процентах к контрольному уровню. О наличии противовоспалительного действия судили по выраженности торможения воспалительной реакции. Если этот показатель был более 30%, результат учитывался как положительный.

Результаты исследования представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Противовоспалительная активность полисахаридных фракций ели обыкновенной

Фракция	% прироста стопы через 4 ч	% торможения через 4 ч
1	2	3
ВРПК шишек	37,6±12,9 p<0,001	65,0
ВРПК древесной зелени	49,7±9,9 p<0,001	54,6
ВРПК хвои	53,4±6,9	49,8
ВРПК ветвей	34,8±2,2 p<0,001	68,3
ПВ шишек	55,3±4,9 p<0,001	49,5

Продолжение таблицы 29

1	2	3
ПВ древесной зелени	52,3±11,5 p<0,001	52,2
ПВ хвои	44,3 p<0,001	58,4
ПВ ветвей	71,2 p<0,001	34,9
Контроль	109,5±4,7	
Препарат сравнения (Нимесулид)	33,9±6,8 p<0,001	68,1

p – достоверность в сравнении с контролем

Результаты представленные в таблице 29 демонстрируют достаточно высокий уровень противовоспалительной активности фракций полисахаридов древесной зелени и шишек ели обыкновенной.

Наибольшей активностью обладает фракция ВРПК шишек и ВРПК ветвей, процент торможения составляет 65% и 68,3% соответственно. ВРПК шишек и ветвей показывают примерно равную противовоспалительную активность в сравнении с нимесулидом, одним из наиболее популярных препаратов из группы НПВС. Стоит отметить, что полисахаридные фракции древесной зелени и шишек могут применяться и в гораздо больших дозах, их относительная безвредность подтверждена данными определения острой токсичности (Таблица 29). ВРПК древесной зелени тормозит образование отека в сравнении с контролем на 54,6%.

Пектиновые вещества древесной зелени и шишек оказались менее активными, чем водорастворимые полисахариды, за исключением пектиновых веществ хвои, которые оказались активнее ВРПК древесной зелени и хвои (Гуляев Д.К., и др. 2015) [33].

Следует отметить, что полисахаридные фракции вводились крысам в малой дозе 50 мг/кг. Малая токсичность полученных фракций позволяет использовать данные субстанции в гораздо больших дозах, что так же может способствовать увеличению противовоспалительной активности.

Результаты исследований противовоспалительной активности указывают на перспективность дальнейших исследований полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной.

5.3. Исследование антибактериальной активности

Эфирные масла разных видов растений обладают достаточно высокой антибактериальной активностью [17,66,77,86], так же имеются данные и о противогрибковой активности эфирных масел [15]. Эфирное масло ели обыкновенной так же оказывает антибактериальное действие [104]. Интерес представляют исследования, связанные с фракционированием эфирного масла с целью усиления активности.

Большой интерес представляют данные об антибактериальном действии растительных полисахаридов [12,44,54,67]. Полисахариды древесной зелени и шишек ели обыкновенной могут обладать схожей антибактериальной активностью.

5.3.1. Исследование антибактериальной и противогрибковой активности эфирного масла древесной зелени

В литературе имеются данные о том, что отдельные фракции эфирного масла могут обладать более выраженным антибактериальным действием по сравнению с цельным эфирным маслом [42]. Первые фракции обогащаются легколетучими компонентами, последние фракции наоборот – тяжелолетучими компонентами. Различия в компонентном составе фракций могут повлиять на их активность.

Антибактериальную и противогрибковую активность эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной и его отдельных фракций, определяли диско-диффузионным методом (раздел 2.8.3) в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Механизм антибактериального действия эфирных масел, скорее всего связан с деструкцией цитоплазматических мембран микроорганизмов, снижением их проницаемости, уменьшением активности аэробного дыхания микробов [54].

Результаты исследования представлены в таблице 30.

Таблица 30 - 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>
1	2	3	4
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

Как следует из полученных результатов (Таблица 30), самой активной по отношению *Staphylococcus aureus* оказалась фракция №2. Цельное эфирное масло показало наименьшую антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus*. Фракции № 1 и №2 представлены в основном монотерпенами (Таблица 7), из этого вероятно следует, что антибактериальная активность эфирного масла обусловлена в основном монотерпеновыми соединениями.

По отношению к *Escherichia coli*, эфирное масло древесной зелени ели обыкновенной и его фракций показали низкую активность.

В отношении *Candida albicans*, наибольшую активность показали фракции №1 и №2. В целом, противогрибковая активность эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной и его отдельных фракций выше, чем антибактериальная.

По мере уменьшения содержания монотерпенов, уменьшается и антибактериальная активность. Цельное масло имеет самую низкую активность, так как доля монотерпенов в общей массе компонентов эфирного масла уменьшается (Гуляев Д.К., и др. 2015) [34].

Таким образом, в результате проведённых исследований показано, что фракции эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной обладают достаточно высокой антибактериальной и противогрибковой активностью, что позволяет рассматривать их в качестве противомикробного средства для лечения бактериальных поражений кожи и дыхательных путей. А так же определяет перспективность дальнейших исследований в этой области.

5.3.2. Исследование антибактериальной и противогрибковой активности полисахаридов древесной зелени и шишек

Проведено исследование антибактериальной и противогрибковой активности водорастворимого полисахаридного комплекса и пектиновых веществ древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Антибактериальную активность определяли по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, а противогрибковую по отношению к *Candida albicans* (раздел 2.8.3).

Возможный механизм терапевтического действия пектиновых веществ, связан с тем, что пектины, попадая в кишечник, образуют гели, препятствующие прикреплению бактерий к стенке кишечника. Механизм антибактериального действия пектинов связан со способностью закислять реакционную среду до pH 3,0, вызывая кислотное повреждение структур и белков бактериальной клетки. Дополнительно к этому могут протекать и

другие процессы, например, омыление этерифицированных карбоксильных групп с образованием соли (натриевой, калиевой, кальциевой и др.) и микроколичеств метилового спирта, безвредных для макроорганизма, но губительных для микроорганизмов [54].

Результаты исследования представлены в таблице 31.

Таблица 31 - Антибактериальная и противогрибковая активность полисахаридов древесной зелени и шишек ели обыкновенной

№	Полисахаридная фракция	Наименование микроорганизма	МПК, разведение
1	2	3	4
1	ВРПК шишек	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P ATCC	1:40
		<i>Escherichia coli</i> 25922 ATCC	1:20
		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	1:20
2	ВРПК древесной зелени	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P ATCC	1:10
		<i>Escherichia coli</i> 25922 ATCC	1:10
		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	1:10
3	Пектиновые вещества шишек	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P ATCC	1:20
		<i>Escherichia coli</i> 25922 ATCC	1:5
		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	1:10

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4
4	Пектиновые вещества древесной зелени	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P ATCC	1:10
		<i>Escherichia coli</i> 25922 ATCC	1:10
		<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	1:10

В результате проведённых исследований установлено, что водорастворимый полисахаридный комплекс и пектиновые вещества древесной зелени шишек ели обыкновенной обладают низкой антибактериальной и противогрибковой активностью. Более выраженное антибактериальное и противогрибковое действие наблюдается у водорастворимого полисахаридного комплекса шишек.

5.4. Исследование сорбционной активности полисахаридов древесной зелени и шишек

Сорбционную активность оценивали по способности полисахаридов поглощать метиленовый синий. Метиленовый синий является маркером для большинства медицинских сорбентов (угли активированные, лигнины, углерод-минеральные сорбенты и др.) [18], при концентрации 0,15% в 50 мл на 0,15-0,2 г сорбента. Данный краситель моделирует класс токсинов с молекулярной массой до 500 а.е.м (креатин, мочева кислота, барбитураты и др.).

Сорбционную активность определяли у водорастворимого полисахаридного комплекса и пектиновых веществ древесной зелени и шишек ели обыкновенной. В качестве препаратов сравнения использовали уголь активированный и диоксид кремния, методика (раздел 2.8.4).

Результаты исследования представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Сорбционная активность полисахаридных фракций по метиленовому синему

Орган растения	Сорбционная активность фракций, мг/г	
	ВРПК	Пектиновые вещества
1	2	3
Древесная зелень	218,69±1,1	198,1±1,84
Хвоя	218,71±1,56	218,45±0,63
Ветви	219,3±1,72	208,53±0,58
Шишки	232,88±2,17	239,56±2,07
Препарат сравнения		
Уголь активированный	230,9±1,12	
Диоксид кремния	211,5±1,42	

В результате исследований было установлено, что все фракции древесной зелени и шишек ели обыкновенной обладают достаточно высокой сорбционной активностью. Сорбционная активность фракций шишек (232-239,56 мг/г) выше чем у полисахаридных фракций древесной зелени (219,3-198,1), а так же превосходит активность препаратов сравнения (уголь активированный 230,9 мг/г, диоксид кремния 211,5 мг/г). Самая низкая активность наблюдается у пектиновых веществ древесной зелени 198,1 мг/г.

Водорастворимый полисахаридный комплекс хвои и веток показывает примерно одинаковую сорбционную активность с водорастворимым полисахаридным комплексом древесной зелени. Пектиновые вещества древесной зелени имеют более низкую активность, чем пектиновые вещества отдельно хвои и ветвей.

Результаты исследований сорбционной активности показывают возможность применения полисахаридных фракций древесной зелени и шишек в качестве сорбента. Полученные данные, указывают на

перспективность дальнейшего изучения полисахаридных фракций шишек ели обыкновенной.

Выводы к главе 5.

1. Проведено исследование острой токсичности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной. ВРПК древесной зелени и шишек был отнесён к классу «малотоксичных веществ» $LD_{50} > 5000$ мг/кг. Пектиновые вещества древесной зелени и шишек отнесены к классу «умеренно токсичных веществ» LD_{50} 3250 мг/кг у ПВ древесной зелени, 1290 у ПВ хвои, 2390 у ПВ ветвей, 815 мг/кг у ПВ шишек.
2. Установлено, что полисахаридные фракции (ВРПК и ПВ) обладают противовоспалительной активностью. Самыми активными оказались фракция ВРПК ветвей и ВРПК шишек, тормозящие образование каррагенинового отёка лапки крысы на 68,3% и 65% соответственно.
3. Исследована антибактериальная активность эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной и его отдельных фракций, а так же полисахаридных фракций древесной зелени и шишек. По отношению к *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* самыми активными оказались фракции эфирного масла древесной зелени №1 и №2, их активность превышает антибактериальное действие цельного эфирного масла. Полисахаридный фракции показали низкую активность.
4. Определена сорбционная активность полисахаридных фракций древесной зелени и шишек. Самую высокую сорбционную активность показали ВРПК и ПВ шишек, превышающую сорбционную активность препаратов сравнения – угля активированного и диоксида кремния.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ

«Ели обыкновенной шишки»

В последние годы, наряду с поиском новых лекарственных растений, проводится углубленное изучение фармакопейных растений, издавна применяемых в медицине. Эти исследования направлены, прежде всего, на разработку объективных методов стандартизации [6].

Согласно требованиям, предъявляемым к современным методам стандартизации ЛРС, необходимо разработать показатели норм качества сырья в зависимости от пути его использования при производстве лекарственных средств [84].

6.1. Качественный анализ сырья

6.1.1. Качественные реакции с водным извлечением ели обыкновенной шишек

Методики получения извлечения и качественных реакций, представлены в *разделе 2.9.2*. Полученные результаты представлены в таблице 33.

Таблица 33. Качественные реакции с водным извлечением ели обыкновенной шишек.

Группа БАВ	Реакция	Ожидаемый эффект	Результат
Дубильные вещества	С 1% раствором железоммонийных квасцов	Чёрно-зелёное окрашивание	Чёрно-зелёное окрашивание
Дубильные вещества	С 1% раствором желатина	Белый осадок	Белый осадок

6.1.2. Круговая бумажная хроматография

Круговая хроматография на бумаге является быстрым, надежным, недорогим методом, не требующим применения дорогостоящих растворителей и материалов.

На точку старта наносят 0,05 мл отвара, упаренного до $\frac{1}{2}$ объема (раздел 2.9.3).

Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру с 15% уксусной кислотой и хроматографируют. Когда фронт подвижной фазы пройдет 10 см от линии старта, пластинку вытаскивают из камеры, и после пятнадцатиминутной сушки, опрыскивают 2% спиртовым раствором алюминия хлорида и выдерживают в сушильном шкафу при температуре $(100 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, затем просматривают в УФ - свете.

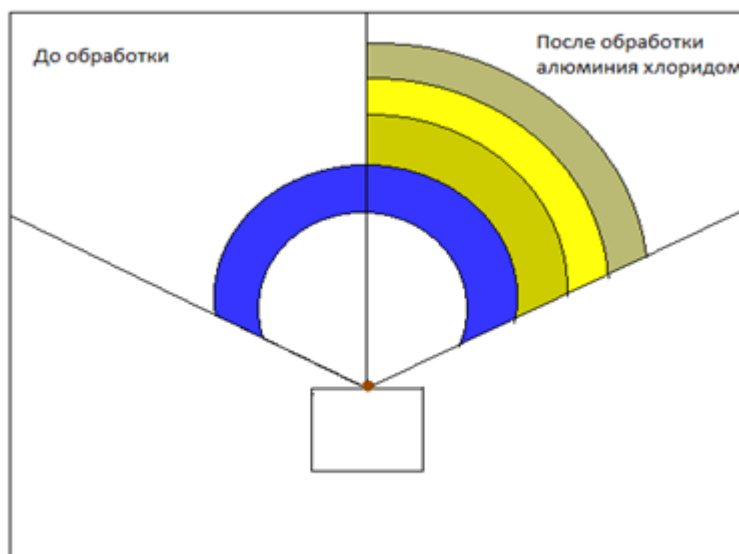


Рисунок 41. Схема хроматограммы водного извлечения из ели обыкновенной шишек.

При рассмотрении хроматограмм в УФ-свете при длине волны 360 нм, появляется окрашенная зона R_f 0,25 сине-голубого цвета (нижний край хроматографической пластинки). После обработки хроматограммы 2% спиртовым раствором алюминия хлорида, появляются окрашенные зоны: R_f

0,25 сине-фиолетового цвета остается неизменной, R_f 0,39 темно-желтого цвета (выше зоны сине-фиолетового цвета), R_f 0,52 желтого цвета (флавоноиды, выше зоны темно-желтого цвета), зона R_f 0,72 темного цвета (верхний край хроматографической пластинки).

6.1.3. УФ-спектроскопия

В проект фармакопейной статьи предлагаем включить спектр поглощения раствора Б, полученного по стандартной методике определения флавоноидов в траве зверобоя. УФ-спектр раствора Б в области от 300 до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 396 нм (Рисунок 47).

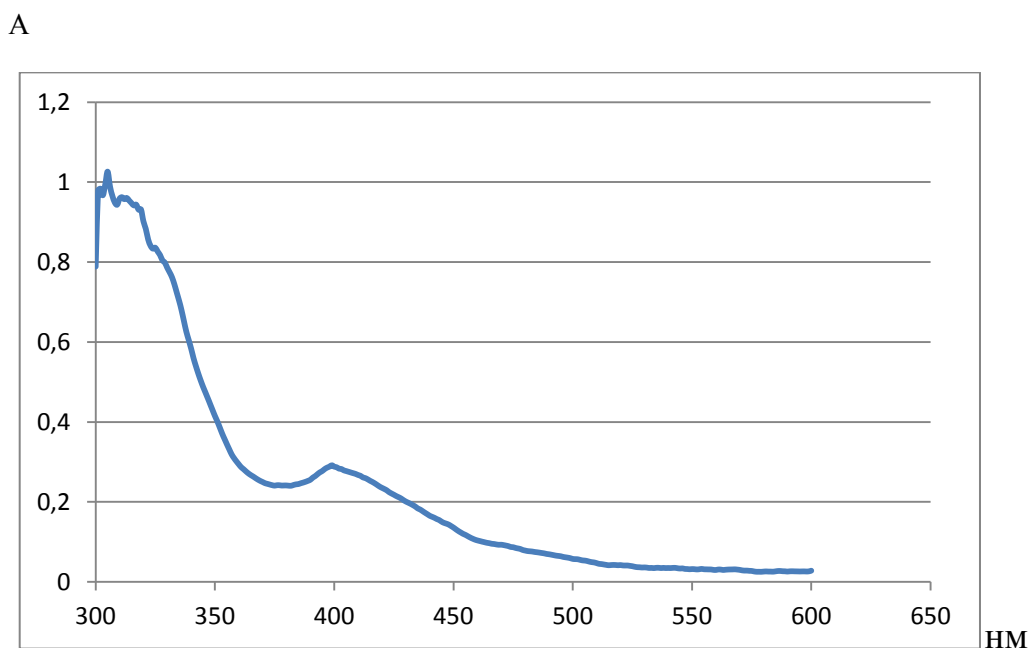


Рисунок 42. Уф-спектр извлечения из ели обыкновенной шишек.

6.2. Количественный анализ сырья

Оценку качества сырья ели обыкновенной, согласно статьи 81 ГФ XI издания проводят по содержанию эфирного масла. Данный показатель даёт неполную оценку качества сырья, с учетом всех групп биологически

активных веществ, и поэтому, необходима разработка более специфичного метода стандартизации.

Мы предлагаем проводить оценку качества сырья ели обыкновенной шишек, не только по содержанию эфирного масла, но и по содержанию экстрактивных и дубильных веществ, так как данное сырье используется в экстенпоральной рецептуре для получения отваров и входит в состав сборов.

6.2.1. Определение содержания эфирного масла

На выделение эфирного масла и его компонентов из растительного сырья, существенно влияет: соотношение воды и сырья, pH среды, продолжительность дистилляции.

Эфирное масло получали из сырья измельченного и просеянного сквозь сито с различным диаметром отверстий. Использовали различные варианты соотношения воды и сырья, время дистилляции.

Результаты определения представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Влияние продолжительности дистилляции на выход эфирного масла

Время перегонки	Количество эфирного масла, мл
1	2
30 мин	0,03
60 мин	0,01
90 мин	0,01
120 мин	Тонкая пленка

Как видно из результатов исследования (Таблицы 34), с увеличением времени перегонки уменьшается количество отгоняемого масла с каждой последующей фракцией. Самый большой объем масла отгоняется в первые 30 минут перегонки (0,03 мл). Таким образом, время перегонки эфирного масла не должно превышать 1,5 часа. При перегонке после двух часов в приемнике появляется лишь тонкая пленка эфирного масла, поэтому дальнейшую перегонку можно считать не целесообразной. Кроме того, дальнейшая перегонка может привести к расслоению эфирного масла и частичному выбросу более тяжелой фракции из приемника.

Результаты определения представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Влияние соотношения воды и сырья, степени измельченности на выход эфирного масла

Соотношение воды и сырья	Содержание эфирного масла, %			
	Размер частиц			
	2 мм	3 мм	4 мм	5 мм
1	2	3	4	5
1:10	0,36	0,36	0,33	0,39
1:20	0,28	0,15	0,28	0,32
1:30	0,26	0,26	0,26	0,32

Установлено, что наибольшее содержание эфирного масла определяется при следующих условиях процесса:

- соотношение воды и сырья 1:10;
- измельченность 5 мм;
- время перегонки 1,5 часа.

Таблица 36 - Содержание эфирного масла в цельном и измельчённом сырье

№	Содержание эфирного масла, %	
	Цельное сырьё	Измельчённое сырьё
1	2	3
1	0,39	0,3
2	0,32	0,43
3	0,32	0,52
4	0,3	0,31
5	0,26	0,38
6	0,39	0,38
7	0,31	0,33
8	0,32	0,36

6.2.2. Определение содержания экстрактивных и дубильных веществ

Для более объективной оценки качества сырья при получении из него лекарственных форм целесообразно проводить оценку качества сырья не только по содержанию эфирного масла, но и по содержанию экстрактивных и дубильных веществ. Это дает более полную оценку так как, терапевтический эффект данного вида сырья обусловлен всей суммой экстрактивных веществ, а не только эфирным маслом.

Ели обыкновенной шишки содержат большое количество дубильных веществ. Дубильные вещества вносят определенный вклад в фармакологическую активность и на основании их количественного содержания можно сделать вывод о качестве данного вида сырья.

Определение содержания экстрактивных веществ, проводили по методике ГФ XII [28]. В качестве экстрагента использовали воду очищенную, так как ели обыкновенной шишки используется для получения

отвара. Определение количественного содержания дубильных веществ, проводили по методике ГФ XI издания выпуск 1 стр. 286 [26].

Результаты определения представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Содержание экстрактивных и дубильных веществ в ели обыкновенной шишках

Образцы сырья	Дубильные вещества, %		Экстрактивные вещества, %	
	Цельное сырьё	Измельчённое сырьё	Цельное сырьё	Измельчённое сырьё
1	2	3	4	5
1	6,78±0,32	6,66±0,21	5,32±0,15	5,19±0,12
2	6,23±0,12	6,33±0,18	5,64±0,23	5,26±0,12
3	6,15±0,11	6,18±0,1	5,27±0,13	5,64±0,24
4	6,89±0,23	6,77±0,2	5,28±0,1	5,34±0,15
5	6,53±0,1	6,58±0,2	6,05±0,54	6,15±0,38
6	7,66±0,31	7,51±0,35	5,93±0,32	5,89±0,15
7	7,56±0,2	7,5±0,32	5,98±0,38	5,2±0,11
8	7,32±0,34	7,55±0,12	5,19±0,05	5,25±0,2

Содержание дубильных веществ в ели обыкновенной шишках, колеблется от 6,15% до 7,66%. Предлагаем включить в ФС, содержание дубильных веществ не менее 6%.

Содержание экстрактивных веществ в ели обыкновенной шишках колеблется от 5,19 до 6,15%. Предлагаем включить в ФС, содержание дубильных веществ не менее 5%.

Таблица 38. Метрологическая характеристика количественного определения дубильных веществ в ели обыкновенной шишках

n	f	X	S ²	S	S _x	P, %	t (p,f)	ΔX	ε, %
10	9	7,55	0,070	0,265	0,083	95	2,26	0,189	2,5

Относительная ошибка при доверительной вероятности 95% составила 2,5% (Таблица 38).

Таблица 39. Метрологическая характеристика количественного определения экстрактивных веществ в ели обыкновенной шишках

n	f	X	S ²	S	S _x	P, %	t (p,f)	ΔX	ε, %
10	9	5,677	0,032	0,179	0,057	95	2,26	0,128	2,25

Относительная ошибка при доверительной вероятности 95% составила 2,25% (Таблица 39).

6.3. Числовые показатели

В сырье ели обыкновенной шишек, были определены следующие числовые показатели: влажность, зола общая, зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной, содержание эфирного масла, содержание экстрактивных веществ, содержание дубильных веществ, примеси, степень измельченности. Результаты исследований представлены в таблицах 40,41.

Таблица 40- Числовые показатели ели обыкновенной шишек (цельное сырьё)

№	Влажность %	Зола общая, %	Зола не растворимая в 10% HCl, %	Других частей ели, %	Органи - ческой примеси, %	Минера - льной примеси, %
1	2	3	4	5	6	7
1	5,34	1,58	0,25	0,1	0,2	-
2	5,33	1,62	0,38	0,5	0,01	0,04
3	5,68	3,35	0,3	0,75	0,1	0,02
4	5,12	5,35	0,57	0,23	0,08	-
5	6,32	4,21	0,5	0,12	-	-
6	6,48	5,21	0,55	0,45	0,02	0,02
7	6,16	4,32	0,31	0,35	-	0,02
8	6,11	4,28	0,56	0,5	-	-

Таблица 41 - Числовые показатели ели обыкновенной шишек (измельчённое сырьё)

№	Влаж- ность %	Зола общая, %	Зола не раствори мая в 10% HCl, %	Частицы не проходя щие сквозь сито с отверсти ями диаметр ом 7 мм, не более 3,5%	Частицы проходя щие сквозь сито с отверсти ями диаметр ом 0,5 мм, не более 30%	Органи - ческой примеси %	Минера- льной примеси %
1	2	3	4		5	6	7
1	5,34	1,58	0,34	3,2	16	0,2	-

Продолжение таблицы 41

1	2	3	4	5	6	7	8
2	5,33	1,62	0,51	2,94	21,16	0,01	-
3	5,68	3,35	0,35	2,86	19,22	0,1	0,02
4	5,12	5,35	0,48	3,35	16,04	0,08	-
5	6,32	4,21	0,62	3,16	17,11	-	0,02
6	5,18	3,48	0,44	2,8	20,8	-	-
7	5,32	4,16	0,5	2,94	21,04	0,2	-
8	5,48	4,32	0,4	3,03	20,15	-	-

Анализ образцов сырья ели обыкновенной шишек позволил установить следующие числовые показатели: *Цельное сырье*. Эфирного масла не менее 0,2%; экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 5%; дубильных веществ не менее 6%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной – не более 1%,; других частей ели (хвоя, мелкие веточки и др.) не более 5%; органической смеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%.

Измельченное сырье. Эфирного масла не менее 0,3%; экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 5%; дубильных веществ не менее 6%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной – не более 1%, частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 3,5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 30%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%.

6.4. Микробиологическая чистота

Определение микробиологической чистоты проводили по методике. ГФ XII часть 1, ОФС «Микробиологическая чистота», категория 4Б, предусматривается количественное определение жизнеспособных бактерий и

грибов (микробное число). В 1 г сырья допускается не более 10^7 общего числа аэробных бактерий, общего числа грибов – 10^5 , а также – *Escherichia coli* не более 10^2 .

Результаты определения представлены в таблице 42.

Таблица 42. Содержание микроорганизмов (грибов (ОЧГ) и аэробных бактерий (ОЧБ)) в шишках ели обыкновенной

№ п/п	Образец ЛРС	Общее число бактерий		Общее число грибов		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		Найдено	По НД	Найдено	По НД	Найдено	По НД	Найдено	По НД
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Ели шишки № 1	0	$<10^7$	1112	$<10^5$	0	0	0	0
2.	Ели шишки № 2	0	$<10^7$	1010	$<10^5$	0	0	0	0
3.	Ели шишки № 3	0	$<10^7$	400	$<10^5$	0	0	0	0
4.	Ели шишки № 4	0	$<10^7$	1230	$<10^5$	0	0	0	0
5.	Ели шишки № 5	0	$<10^7$	1070	$<10^5$	0	0	0	0

Продолжение таблицы 42

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6.	Ели шишки № 6	0	$<10^7$	812	$<10^5$	0	0	0	0
7.	Ели шишки № 7	0	$<10^7$	613	$<10^5$	0	0	0	0
8.	Ели шишки № 8	0	$<10^7$	1131	$<10^5$	0	0	0	0
9.	Ели шишки № 9	0	$<10^7$	740	$<10^5$	0	0	0	0
10.	Ели шишки № 10	0	$<10^7$	902	$<10^5$	0	0	0	0

В результате исследования установлено, что общее число бактерий равняется нулю, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, так же не были обнаружены в данном лекарственном растительном сырье. Общее число грибов варьирует от 400 до 1230 колоний, при этом укладываясь в норму.

6.5. Определение содержания тяжёлых металлов

Определение содержания тяжёлых металлов проводили по методике, описанной в ГФ XII издания [28], в зольном остатке. Содержание свинца определяли рентгенофлюоресцентным методом на энергодисперсионном спектрометре Quantix.

В результате проведённого исследования окраска испытуемых растворов образцов ели обыкновенной шишек не превышала окраску эталонного раствора по ГФ XII.

Таблица 43 - Содержание свинца в ели обыкновенной шишках

№ образца	Содержание свинца в образцах, мкг/кг	Содержание свинца, % от допустимого уровня
1	0,15	0,0025
2	0,33	0,0055
3	0,12	0,002
4	0,28	0,0046
5	0,23	0,0038

Норма содержания свинца для растительного сырья, согласно требованиям СанПиН 2.3.2 1078-01, не должна превышать 6,0 мг/кг. В результате проведённого исследования содержание свинца в ели обыкновенной шишках варьирует от 0,002 до 0,0055% от указанной нормы содержания (Таблица 43).

6.6. Определение срока годности сырья

Таблица 44 – определение срока годности ели обыкновенной шишек

№	Дата анализа	Эфирное масло, %	Экстракт - тивные вещества %	Дубильные вещества, %	Влажность, %	Зола общая, %
1	2	3	4	5	6	7
1	09.2011	0,36	5,12	6,81	7,53	1,54

Продолжение таблицы 44

	09.2012	0,24	5,19	6,78	5,88	1,58
	09.2013	0,21	5,56	6,88	5,55	1,51
2	09.2011	0,38	5,17	6,25	5,59	1,67
	09.2012	0,31	5,26	6,23	5,34	1,62
	09.2013	0,25	5,31	6,17	5,38	1,71
3	09.2011	0,35	5,66	6,15	6,37	3,81
	09.2012	0,28	5,64	6,15	6,16	3,35
	09.2013	0,25	5,55	6,23	5,58	3,23
4	09.2011	0,29	5,34	6,22	6,34	5,35
	09.2012	0,26	5,29	6,26	6,22	5,31
	09.2013	0,23	5,59	6,3	5,57	5,17
5	09.2011	0,31	6,05	6,29	6,93	4,21
	09.2012	0,28	5,93	6,28	6,77	4,33
	09.2013	0,2	5,98	6,35	5,78	4,34

По результатам исследования (Таблица 44) был установлен срок годности для сырья ели обыкновенной шишек - 2 года.

Выводы к главе 6.

1. Разработан проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*», в замен существующей фармакопейной статьи № 81 ГФ XI издания «Шишки ели обыкновенной».
2. Разработаны новые разделы: УФ-спектроскопия, качественные реакции, круговая хроматография на бумаге, позволяющие определять подлинность сырья.
3. Установлены новые показатели качества сырья: сумма экстрактивных веществ извлекаемых водой, не менее 5%, дубильных веществ не менее 6%. Предложено проводить оценку качества данного вида сырья не только по содержанию эфирного масла, но и по содержанию дубильных и экстрактивных веществ.

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. Компонентный состав отдельных фракций эфирного масла древесной зелени различен. Первые фракции состоят в основном из легколетучих монотерпеновых соединений, последние содержат больше сесквитерпенов. В результате исследования влияния условий произрастания, сезонов года и возраста на изменчивость компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной установлено, что в составе эфирного масла в разных количествах присутствуют основные компоненты в течение всего года, что позволяет вести заготовку сырья для получения эфирного масла круглогодично и вне зависимости от возраста растения и условий произрастания.
2. Из древесной зелени и шишек ели обыкновенной получены полисахаридные фракции ВРПК и ПВ, цепи которых состоят в основном из остатков арабинозы и галактозы.
3. Анализ микроэлементного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной показал, что содержание микроэлементов варьирует в зависимости от органа растения. В хвое и ветвях ели обыкновенной наблюдается увеличение содержания микроэлементов преимущественно в зимние месяцы.

4. Сумма хлорофиллов а/б 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 исследования анатомического строения ели обыкновенной шишек, получены микрофотографии диагностических признаков семенной, кроющей чешуй и крыла семени. Данные микрофотографии включены в проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки - *Piceae abietis strobili*».
6. Проведено сравнительное исследование анатомического строения 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*», включенный в Государственную фармакопею XIII издания, в замен существующей фармакопейной статьи № 81 ГФ XI издания «Шишки ели обыкновенной».
9. Данные исследования фармакологической активности говорят о достаточно высокой противовоспалительной активности фракций ВРПК ветвей и шишек, сопоставимой с препаратом сравнения – нимесулидом. В результате исследования острой токсичности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели установлено, что ВРПК можно отнести к классу 4 малотоксичных веществ, а ПВ можно отнести к классу 3 умеренно токсичных. Показана выраженная антибактериальная активность эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной 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 СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

ГЖХ – газожидкостная хроматография;

ВРПК – водорастворимый полисахаридный комплекс;

ПВ – пектиновые вещества;

ФС – фармакопейная статья;

ГФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации;

БАВ – биологически активные вещества;

УФ – ультрафиолетовый;

А.Е.М – атомные единицы массы;

БУВ – бутанол-уксусная кислота-вода;

МПБ – мясопептонный бульон;

МПК – минимальная подавляющая концентрация.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова, Г.Ф. Водорастворимые вещества лиственницы и возможности их использования / Г.Ф. Антонова, Н.А. Тюкавкина // Химия древесины. - 1983. - № 2. - С. 89-96.
2. Артемкина, Н.А. Содержание фенолов в коре ели на разных стадиях техногенной сукцессии биоценозов Кольского полуострова / Н.А. Артемкина, Т.Г. Горбачёва // Химия растительного сырья. - 2009. - № 2. - С. 111-116.
3. Артемкина, Н.А. Флавоноиды древесной зелени ели европейской *Picea abies* (L.) Karst / Н.А. Артемкина, И.В. Забегаева, В.И. Рощин // Химия и технология растительных веществ. - Сыктывкар, 2000. - С. 21.
4. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. - М., - 1983. – 340 с.
5. Бабешина, Л.Г. Исследование полисахаридов некоторых видов рода *Sphagnum* L. / Л.Г. Бабешина, Я.В. Горина, Л.П. Колоколова, Е.А. Краснов // Journal of Siberian Federal University. - 2010. - Вып. 3. - С. 413-422.
6. Белоногова В.Д. Ресурсы, экологическая безопасность и фитохимическое исследование дикорастущих лекарственных растений Пермского края: Автореферат дис. докт. фарм. наук / 15.00.02. Белоногова Валентина Дмитриевна – Москва, 2009 – 46 с.
7. Белоногова, В.Д. Изучение компонентного состава древесной зелени и шишек ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае / В.Д. Белоногова, И.В. Коротков, П.С. Машенко, Д.К. Гуляев // Фармация. - 2015. - № 6. - С.14-16.
8. Блажей, А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый. – М.: Мир, 1977. – 260 с.
9. Берлинсон, М.Я. Применение хлорофиллина натрия при лечении лейкопениях у детей / М.Я. Берлинсон // Использование живых элементов дерева. - 1969. – С. 113-115.

10. Бубенчиков, Р.А. Изучение фенольных соединений и полисахаридов травы фиалки скальной / Р.А. Бубенчиков // Башкирский химический журнал. - №1, том 18. - 2011. - С.128-139.
11. Бузина, Г.В. Титрометрический метод количественной и качественной характеристики пектиновых веществ / Г.В. Бузина, О.Ф. Иванова, Л.Б. Сосновский // Хлебопекарная и кондитерская пром-сть. – 1965. – № 4. – С. 15-18.
12. Вальшев, А.В. Антимикробная активность пектинов и их производных / А. В. Вальшев // Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН. - 2013. - №3. - С. 1-6.
13. Васильев, С.Н. Экстрактивные вещества древесной зелени *Picea abies* (L.) Karst / С.Н. Васильев, В.И. Рощин, С. Фелеке // Растительные ресурсы. - Вып. 1-2. - 1996. - С. 151-176.
14. Васильев, С.Н. Исследование кинетических закономерностей процесса извлечения биологически активных веществ из древесной зелени / С.Н. Васильев, В.И. Ягодин, В.И. Рощин, Р.Ш. Абиев // ИВУЗ Лесной журнал. - 1995. - №5-6. - С.44-47.
15. Великородов, А.В. Изучение химического состава и противогрибковой активности эфирного масла *Lophanthus anisatum* Benth. / А.В. Великородов, В.Б. Ковалёв, А.Г. Тырков // Химия растительного сырья. Астрахань, 2010. - №2. - С. 143-146.
16. Владыкина, Д.С. Влияние компонентного состава на антимикробные и парфюмерные свойства эфирных масел ели Д.С. Владыкина, С.А. Ломаткин, Е.В. Литвинова, О.Г. Выглазов // Труды БГТУ. - 2013. - №4. - С. 193-196.
17. Водолазова, С.В. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С.В. Водолазова, М.А. Мяделец, М.Р. Карпова // Сибирский медицинский журнал. - 2011. Том 26. - №2 - Вып. 2. - С. 54-58.

18. Воробьёв В.Н. Практикум по физиологии растений: учебное пособие / Невмержитская Ю.Ю., Хуснетдинова Л.З., Якушенкова Т.П. – Казань, 2013. – 80 с.
19. Гаммерман, А.Ф. Дикорастущие лекарственные растения / А.Ф. Гаммерман, И.И. Гром. – М.: Медицина. – 1976. - С. 21.
20. Гаммерман, А. Ф. Лекарственные растения: Справочное пособие / А.Ф. Гаммерман, Г.Н. Кадаев, А.А. Яценко-Хмелевский. – М. Высшая школа. – 1984. – С. 400.
21. Говорухин, В.С. Флора Урала. / В.С. Говорухин. – Сверд. Обл. изд-во, 1937. – 538 с.
22. Головкин, Б.Н. Биологически активные вещества растительного происхождения: Справочник в 3-х томах / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер. – М.: Наука, 2001. - 216 с.
23. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Стандартиформ, 2007. - 3 с.
24. ГОСТ 21769-76. Зелень древесная. Технические условия. – М. 1985. 5 с.
25. ГОСТ 29186-91. Пектин. Технические условия. – М.: Издательство стандартов, 1992. – 21 с.
26. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа. / МЗ СССР. - XI изд - М.: Медицина, 1990. – 336 с., ил.
27. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. /МЗ СССР. - XI изд. - М.: Медицина, 1990. – 400 с., ил.
28. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издания, часть 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 С.
29. Горяев, М.И. Характеристика химических соединений, входящих в состав эфирного масла / М.И. Горяев // Издательство академии наук Казахской ССР. - Алма-Ата, 1952. - Т.№1. - 371 с.

30. Горяев, М.И. Эфирные масла флоры СССР / М.И. Горяев // Издательство академии наук Казахской ССР. - Алма-Ата, 1952. - Т.2. - 378 с.
31. Громова, А.С. Стильбены из коры некоторых видов семейства Pinaceae / А.С. Громова, В.И. Луцкий, Н.А. Тюкавкина // Химия древесины. - 1979. - №3. - С. 103-109.
32. Громова, А.С. Фенолокислоты и их производные из коры некоторых видов пихты, ели и сосны / А.С. Громова, В.И. Луцкий, Н.А. Тюкавкина // Химия древесины. - 1978а. - №4. - С. 99-102.
33. 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>.
34. 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.
35. Гуляев, Д.К. Сезонная изменчивость компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной *PICEAE ABIETIS (PINACEAE)* / Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, П.С. Машенко // Фундаментальные исследования. - 2015. - № 7. - С. 14-19.
36. 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.
37. Гурьев, А.М. Исследование острой токсичности комплекса водорастворимых полисахаридов корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.) / А.М. Гурьев, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов // Бюллетень сибирской медицины. - 2010. - №1. - С. 36-40.

38. Дайнеко, И.П. Изучение химического состава хвойного воска / И.П. Дайнеко, А.В. Пранович, В.Ф. Рубанова, Л.П. Белов // Химия растительного сырья. - 2005. - №1. - С. 13-18.
39. Данченко, Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов: учебное пособие / Л.В. Данченко. – М.: ДеЛи, 2000. – 255 с.
40. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Лодыгина. – М.: Медицина, 1977. - С. 33.
41. Ермакова, А.Е. Методы биохимического исследования. – Л.: Агропромиздат, 1988. – С. 430.
42. Ефремов, Е.А. Состав и бактерицидная активность отдельных фракций эфирного масла пихты сибирской / Е.А. Ефремов // Молодежь и наука: Сборник материалов VI Всероссийской Научно – технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Красноярск, 2011. - С. 89-93.
43. Запрометов, М.Н. Основы биохимии фенольных соединений / М.Н. Запрометов. - М.: Высшая школа, 1974. – 212 с.
44. Злобин, А.А. Антиоксидантная и антимикробная активность пектинов ряда растений европейского севера / А.А. Злобин, Е.А. Мартинсон, Ю.С. Оводов // Известия Коми научного центра УРО РАН. Выпуск 3. Сыктывкар, 2011. - С. 33-37.
45. Иванова, Л.А. Технология лекарственных форм / Л.А. Иванова. – М.: Медицина. - Т.2.1991. – 544с.
46. Иванова, Н.В. Общая характеристика полисахаридов коры лиственницы / Н.В. Иванова, Р.Г. Оводова, В.А. Бабкин // Химия растительного сырья. - 2006. - №1. - С. 15-20.
47. Иванова, С.З. Ацетофеноны хвои некоторых видов семейства Pinaceae / С.З. Иванова, С.А. Медведева, Н.А. Тюкавкина // Химия древесины. - 1978. - № 1. - С. 103-108.
48. Исаев, А.С. Лесной комплекс в составе производительных сил Сибири / А.С. Исаев // Развитие производительных сил Сибири и задачи ускорения

научно-технического прогресса: мат. Всерос. конф. - Красноярск, 1985. - С. 6–22.

49. Кисловская Т.П. Биологически активные вещества культур сосны и ели Среднего Урала // Лесные биологические вещества: мат. междунар. семинара. Хабаровск, 2001. - С. 296–297.

50. Колесников, М.П. Формы кремния в растениях / М.П. Колесников // Успехи биологической химии, Т.41. – 2001. – С. 301-332.

51. Колхир, В.К. К оценке фармакологических свойств арабиногалактана / В.К. Колхир, Н.А. Тюкавкина, А.И. Багинская, М.Ф. Минеева // Тез докл. III Росс. нац. конгресса «Человек и лекарство». -Москва. - 1996. - С. 27.

52. Криворученко, И.Б. Влияние β -ситостерина на уровень липидов крови у больных атеросклерозом с различными типами нарушения обмена липидов / И.Б. Криворученко // Использование биологически активных веществ дерева. – Рига, 1973. – С. 120.

53. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУ», 2004. – С. 228-230.

54. Лазарева Е.Б., Меньшиков Д.Д. Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике. Антибиотики и химиотер. - 1999. 44(2): 37-40.

55. Левин, Э.Д. Переработка древесной зелени / Э.Д. Левин, С.М. Репях. - М: Лесная промышленность, 1984. - 115 с.

56. Лир, Х. Физиология древесных растений / Х. Лир, Г. Польстер, Г.И. Фидлер. - М.: Мир, 1974. - 422 с.

57. Литвинова, В.И. Сезонная динамика (+)-катехина в хвое видов *Picea* и *Pinns* / В.И. Литвинова, И.Ю. Ивонис, П.В. Кялина, Б.В. Хохлин // Растительные ресурсы. 1983. - Т.19. - Вып.2. - С. 224-228.

58. Лукьянова, Л.М. Температурная зависимость реакции виолаксантинового цикла в хвое ели и пихты при разном освещении / Л.М. Лукьянова // Ботан. журнал. - 1976. -Т.61. - №5. - С.738-742.

59. Мамаев, С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений / С.А. Мамаев. -М. 1972. - 284 с.
60. Медведева, С.А. Арабиногалактан лиственницы – перспективная полимерная матрица для биогенных металлов / С.А. Медведева, Г.П. Александрова, В.И. Дубровина, Н.А. Тюкавкина // *Butlerov Commun.* - 2002. - №7. - Р. 45–49.
61. Мелвин-Хьюз, Е.А. Равновесие и кинетика реакций в растворах / Е.А. Мелвин-Хьюз. – М.: Химия. - 1975. – 472 с.
62. Миронов, П.В. Белки цитоплазмы меристем почек ели: динамика аминокислотного состава / П.В. Миронов, Е.В. Алаудинова, Ю.С. Шимова // *Химия растительного сырья.* – 2007. - №4. – С. 95-100.
63. Модонова, Л.Д. Лигнанные соединения древесины ели сибирской (*Picea obovata*) / Л.Д. Модонова, Н.А. Тюкавкина // *Химия и использование лигнина.* – Рига, 1974. - С. 73-86.
64. Несмеянова, В.А. Методы исследования углеводов / В.А. Несмеянова, А.Я. Хорлина. - М.: Мир, 1975. - С. 445.
65. Николаевский, В.В. «Ароматерапия. Справочник» / В.В. Николаевский. – М.: Медицина, 2000. -С. 93-292.
66. Новицкая, Ю.Е. Особенности физико-биохимических процессов в хвое и побегах ели в условиях севера / Ю.Е. Новицкая. - Л. Наука, 1971. - 285 с.
67. Овеснов, С. А. Особо охраняемые территории Пермской области / С.А. Овеснов. - Пермь.: Книжный мир, 2002. - С. 464.
68. Оводова, Р.Г. Выделение, характеристика и физиологическая активность полисахаридов из хвои / Р.Г. Оводова, Е.А. Кушникова, С.В. Попов, О.А. Бушнева// *Проблемы химии древесины и лесохимии.* – Сыктывкар, 1997. - С. 56- 61.
69. Оводов, Ю.С. Полисахариды цветковых растений: Структура и биологическая активность / Ю.С. Оводов // *Биоорганическая химия.* 1998. - Т. 24. - №7. - С. 483-501.

70. О государственных стандартах качества лекарственных средств: приказ Минздрава РФ от 01.11.2001 № 388 (вместе с «Ост 91500.05.001-00. Отраслевой стандарт. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения») [Электронный ресурс] // справ.-правовая система «Консультант плюс. – URL: <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req> (дата обращения: 30.04.13 г.).
71. Осидак, Л.В. Лесмин – хвойные таблетки использование для оздоровления, в комплексной терапии и профилактике гриппа и других ОРВИ: методическое пособие для врачей / Л.В. Осидак. - Санкт-Петербург, 2008. - 28 с.
72. 11. ОСТ 56-33-85. Хлорофиллин натрия водный: технические условия. 1985. - 12 с.
73. ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб» // Фармация. – 2003. – № 6. – С. 3-8.
74. Петренко, Е. В. Изменчивость липидного комплекса древесной зелени пихты и ели и возможность её совместной переработки / Е.В. Петренко, В.В. Полянская, В.Н. Паршакова // Вестник Крас. ГАУ. - 2009. - № 6. -С. 88-92.
75. Петренко Е.С. Изменчивость числа смоляных ходов в хвое сосны обыкновенной / Е.С. Петренко // Лесоведение. - 1967. - № 6. - С. 76-83.
76. Прозоровский, В.В., Прозоровская В.М. Экспресс метод определения средней летальной дозы / В.В. Прозоровский // Фармакология и токсикология. – 1978. - № 4. – С. 497-502.
77. Райкова, С.В. Антимикробная активность эфирного масла мяты перечной (*Mentha piperita*) / С.В. Райкова, А.Г. Голиков, М. Б. Шуб // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2011. - Т. 7. - №4. - С. 787-790.
78. Растительные ресурсы СССР. Голосеменные растения, их химический состав, использование. – СПб.: Наука, 1993. - Т 9. – 465 с.
79. Речкина Е.А. Переработка древесной зелени сосны обыкновенной с получением пектиновых веществ: автореферат дис. канд. тех. наук: 05.21.03 / Речкина Екатерина Александровна. – Красноярск, 2012. – 17 с.

80. Рожкова, С.А. Гепатопротекторные свойства водорастворимого полисахаридного комплекса из травы коровяка, семян подорожника и тыквы / С.А. Рожкова, Л.И. Иванова, Ю.Г. Пушников // Материалы VI Российского научного конгресса «Человек и лекарство». – М., 1999. – С. 438.
81. Рощин В.И. Состав, строение и биологическая активность терпеноидов ели, сосны и пихты: автореф. дисс. док. хим. наук: 05.21.03/ Рощин Виктор Иванович. 1995. – 35 с.
82. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
83. Рязанова, Т.В. Продукты переработки терпеноидов живицы / Т.В. Рязанова, Г. В. Тихомирова, И.С. Почекутов // Российский химический журнал. - 2004. - № 3. - С. 95-107.
84. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 39-41.
85. Сидоренко, С.В. Клиническое значение резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / С.В. Сидоренко // Российские медицинские науки. - 1998. - № 1. - С. 28-34.
86. Струкова, Е.Г. Воздействие эфирных масел сибирского региона на условно - патогенные микроорганизмы / Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова // Химия растительного сырья. - 2009. - № 4. - С. 79-82.
87. Сувак, В.Ф. Применение настоя из почек и шишек ели обыкновенной в качестве средства, обладающего антимикробным, спазмолитическим и десенсибилизирующим действием // Патент СССР №1437780. 1975. Бюл. изобр. № 7.
88. Султанов, В.С. Клиническое исследование гепатопротектора «Ропрен» при заболеваниях гепатобилиарной системы / В.С. Султанова, Е.Н. Лаптева, В.И. Рощин, Т.Н. Трофимова // Гастроэнтерология. - 2010. - №44. - С. 7-11.

89. Сычёв, И.А. Биологическая активность растительных полисахаридов / И.А. Сычёв, О.В. Калинкина, Е.А. Лаксаева // Российский медико-биологический вестник имени академика Павлова. - 2009. - Вып. 4. - С. 115-121.
90. Титова, М.С. Особенности фотосинтезирующей активности хвои интродуцированных видов *Picea* в дендрарии горнотаежной станции / М.С. Титова // Фундаментальные исследования. – 2013. - № 1-1.- С. 128-132.
91. Титова, М.С. Содержание фотосинтетических пигментов в хвое *Picea abies* и *Picea koraiensis* / М.С. Титова // Вестник ОГУИ. - № 12. - 2010. - С. 9-12.
92. Ткачёв, В.А. Исследование летучих веществ растений: Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова / В.А. Ткачёв, 2008. - 969 с.
93. Томчук, Р.И. Использование лесосечных отходов хвойных пород / Р.И. Томчук, Г.И. Томчук, Н.Ф. Дорожон, А.В. Альтман // Лесозаготовка и лесосплав. - 1983. - Вып. 1. - 25 с.
94. Тюкавкина, Н.А. Лигнанные соединения хвои некоторых видов семейства Pinaceae / Н.А. Тюкавкина // Химия древесины. - 1977. - № 6. - С. 94-96.
95. Ушанова, В.М. Изучение влияния функциональных групп пектинов из коры хвойных пород на их студнеобразующие свойства / В.М. Ушанова, Н.Г. Батура, З.К. Воробьёв // Хвойные бореальной зоны. - № 3-4. - 2008. - С. 362-364.
96. Фелеке А.С. Фенольные соединения древесной зелени ели европейской. *Picea abies* (L) Karst: автореф. дисс. на соиск. учен. степ., канд. хим. наук: 05.21.03/ Фелеке Асау Сисай. - СПб. 1997. – 16 с.
97. Фуксман, И.Л. Влияние природных и антропогенных факторов на метаболизм веществ вторичного происхождения у древесных растений:

- автореферат дис. докт. биологических наук: 03.00.16/ Фуксман Ирма Людвиговна. - Санкт-Петербург, 1999. – 42 с.
98. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учеб. пособие для послевуз. проф. образования врачей / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е издание, переработанное и дополненное. – М.: Медицина, 2005. – С. 829.
99. Шлык, А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы физиологии растений. - М.: Наука, 1971. – С. 154-170.
100. Ягодин, В.И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени / В.И. Ягодин. - П.: ЛГУ, 1981. – 254 с.
101. Яцко, Я.Н. Пигментный аппарат вечнозеленых растений на севере: автореферат диссертации кандидата биологических наук: 03.01.05/ Яцко Яков Николаевич. – Санкт-Петербург, 2010. – С.23.
102. Bercu, R. Anatomical comparative study of *Larix deciduas* Mill. and *Picea abies* (L.) Karsten (Pinaceae) leaf / R. Bercu, D.R. Popoviciu // Annals of R.S.C.B. - 2013. Vol.XVIII. - P. 172-177.
103. Burescu, L. Anatomical, morphological, and cytological comparative study of leaves and cotyledons from forestry species / L. Berescu, D.M. Cachita, C. Craciun // Annals of R.S.C.B. - Vol. XIX. - 2015. - P. 61-66.
104. Canillac, N. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *staphylococcus aureus*, and coliform bacteria / N. Canillac, A. Mourey // Food Microbiology. - 2001. - P. 261-268.
105. Da Silva, B.P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Melocactus depressus* / B.P. Da Silva, J.P. Parente // Planta Medica. - 2002. - V.68. - № 1. - P. 74–76.
106. Ekman, R. Analysis of the nonvolatile extractives in Norway spruce sapwood and heartwood / R. Ekman // Acta. Academiae Abonensis. Ser.B. - 1979. - VoL 39. - № 4. P. 1-20.

107. Fengel, D., Wegener G. Wood: ultrastructure, chemistry reaction. – Berlin / D. Fengel, G. Wegener, 1989. - 616 p.
108. Fihrrqust, P. An alkaloid of Norway spruce (*Picea abies*) possesses powerful antibacterial and antifungal potential / P. Fihrrqust, V. Virjamo, R. Julkunen-Titto // *Planta Med.* - 2014. - P. 183-198.
109. Grisebach, H. In: The Biochemistry of Plant Phenolics / H. Grisebach, G.F. Van Sumere, P.J. Lea // Oxford Clarendon Press. - 1985. - C. 185-198.
110. Hammerbacher, A. A common fungal associate of the spruce bark beetle metabolizes the stilbene defenses of Norway spruce / A. Hammerbacher, A. Schmidt, N. Wadke [and others] // *Plant Physiology.* - 2013. - Vol. 162. - P. 1324-1336.
111. Hoque, E. Norway spruce die back: isolation, biologikal activity, measurement on concentration of p-hydroxyacetophenone and its O-glucoside (picein) by gas-chromatography / E. Hoque // *Eur. J. Forest. Pathol.* - 1984a. - Vol. 14. - № 6. – P. 377-382.
112. Hoque, E. Norway spruce die back: isolation of p-hydroxyacetophenone from diseased shoots of *Picea abies* / E. Hoque // *Phytochemistry.* - 1984. - Vol.23. - № 4. – P. 923-925.
113. Kaneo, Y. Pharmacokinetics and biodisposition of fluorescent-labeled arabinogalactan in rats / Y. Kaneo, T. Ueno, Y. Yamaguchi [and others] // *Int. J. Pharm.* - 2000. - V. 201. - № 1. - P. 59–69.
114. Kartnig, T. Antimicrobial activity of the essential oil of yang pine shoots (*Picea abies* L.) / T. Kartnig, F. Still, F. Reinthaler // *Journal of Ethnopharmacology.* - Vol.35. - 1991. - P. 155-157.
115. Klimuk, A.A. A lower cretaceous seed cones provides the earliest fossil record for *Picea* (*Pinaceae*) A.A. Klimuk, R.A. Stockey // *American journal of botany.* - Vol. 99. - 2012. - P. 1069-1082.

116. Kocak, A. Identification of essential oil composition of four *Picea Mill.* (*Pinaceae*) species from Canada / A. Kocak, O. Kilic // Journal of Agricultural Science and Technology. - 2014. - P. 209-214.
117. Kraus, C. Phenolic compounds from Ageing Shots of *Picea abies* / C. Kraus, G. Spiteller // Z. Naturforsch. - 1997. - № 52C. - P. 308-312.
118. Kraus, C. Comparison of Phenolic compounds from galls and shots of *Picea abies* / C. Kraus, G. Spiteller // Phytochemistry. - 1997. - Vol.44. - №1. - P. 59-60.
119. Li, S.H. Diastereomeric stilbene glucoside dimmers from the bark of Norway spruce (*picea abies*) / S.H. Li, X.M. Niu, S. Zahn, J. Weston // Phytochemistry. - 2008. -P. 772-782.
120. Lorian, V. Antibiotics in Laboratory Medicine / V. Lorian // Fourth ed. Williams and Wikins. – Baltimore, 1996. - 889 p.
121. Norin, T. Extractives from the bark of common spruce, *Picea abies* (L) Karst / T. Norin, B. Winnel // Acta Chem. Scand. - 1972. - Vol.26. - № 6. - P. 2289-2296.
122. Pan, H. Phenolic extractives from root bark of *Picea abies* / H. Pan, L.N. Lundgren // Phytochemistry. - 1995. - Vol. 39. - № 6. - P. 1423-1428.
123. Pan, H. Studies on Phenolic and Terpenoid constituents exfracted from bark of Birch, Spruce and Pine in Sweden / H. Pan // Dr. Phil.-thesis, Uppsala. - 1995. – 280 p.
124. Ratknik, M. Morpho-anatomical characteristics and content of nutritive macro elements in needles of fir and spruce and their varieties in Serbia / M. Ratknik, Z. Miletic, B. Nolic // Arch. Biol. Sci. – Belgrade, 2013. - P. 1479-1490.
125. Reberuo, P. Plant Phenolics / P. Reberuo. - New York. - 1979. – 254 p.
126. Richter, C.M. Phenolic Compounds in Needles of Norway Spruce Trees in Relation to Novel Forest Decline. II. Studies on Trees from Two Sites in Western Germany / C.M. Richter, A. Wild // Z. Naturforsch. - 1994. - Bd.49. - P. 619-627.

127. Sakagami, H. Antitumor, antiviral and immunopotentiating activities of Pine cone extracts: potential medicinal efficacy of natural and synthetic lignin-related materials / H. Sakagami, Y. Kawazoe, N. Komatsu, A. Simpson // *Anticancer research*. - 1991. - P. 881-888.
128. Shimizu, K. Chemistry of hemicelluloses // *Wood and Cellulosic Chemistry. Edition* / K. Shimizu. - New York, USA. - P. 177 – 214.
129. Shiratori, S. Studies on the constituents of Acereae plants. XII. Two new diarylheptanoid glycosides from *Aser triflomm* / S. Shiratori, S. Nagumo, T. Inoue // *Chem. Phami. Bull.* - 1994. - Vol.42. - № 4. - P. 960-962.
130. Shtykova, L. Latex coatings containing antifeedants: Formulation, characterization, and application for protection of conifer seedlings against pine weevil feeding / L. Shtykova, M. Masuda, C. Erikson // *Progress in organic coating*. - 2008. - P. 160-166.
131. Slimestadt, R. Ampelopsin 7-glucoside and other dihydroflavonol 7-glucosides from needles of *Picea abies* / R. Slimestadt, M. Andersen, G.W. Francis // *Phytochemistry*. 1994. - Vol.35. – P. 550-552.
132. Slimestadt, R. Amount of flavonols and stilbenoids during needle development of *Picea abies*; variations between provenances / R. Slimestadt // *Skand. J. of Forest Researsch.* – 1997. - № 3. - P. 325-330.
133. Slimestad, R. Chemical studies of flavonoids from Norway spruce. *Picea abies*. Isolation, sfructure elucidation and seasonal changes of flavonoids and other phenolics from needles and cones / R. Slimestad // *Department of Chemistry, University of Bergen*. - 1997. - 53p.
134. Slimestad, R., Hostettmami K. Characterisation of phenolic constituents from juvenile and mature needles of Norway spruce by means of high performance liquid chromatography-mass spectrometry / R. Slimestad // *Phytochemical analysis*. - 1996. № 7. - P. 42-48.

135. Slimestad, R. Preparative separation of phenolic compounds from *Picea abies* by high-speed counter-current chromatography / R. Slimestad, A. Marston, K. Hostettmaier // J. Chromatogr. A. - 1996. - № 719. - P. 438-443.
136. Soukupova, J. Comparative study of two spruce species in a polluted mountains region / J. Soukupova, B.N. Rock, J. Albrechtova // New Phytologist. - 2001. - P. 133-145.
137. Strack, D. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles / D. Strack, J. Heilemann, V. Wray, H. Dirks // Phytochemistry. - 1989. - Vol.28. - P. 2071-2078.
138. Tawara, L. Toxic piperidine alkaloids from pine (*Pinus*) and spruce (*Picea*) trees. New structures and a biosynthetic hypothesis / L. Tawara, A. Blokhin, T.A. Foderaro // Journal of organic chemistry. - 1993. - P. 4813-4818.
139. Theander, O. Hydrophilic extractives from the needles of Scots pine and Norway spruce / O. Theander // Svensk Papperstidning. - 1982. - P. 64-68.
140. Tumen, I. Yields and constituents of essential oil from cones of *Pinaceae* spp. Natively grown in Turkey / I. Tumen, H. Hafizoglu, A. Kilic, H. Sivrikaya // Molecules. - 2010. - Vol.15. - P. 5797-5806.
141. Weissmann, G. Untersuchung der Rindenextrakte von *Picea abies* (L) Karst / G. Weissmann // Holz Roh- und Werkst. - 1981. - Bd. 39. - № 11. - S. 457-461.
142. Willför, S. Structural features of water-soluble arabinogalactans from Norway spruce and Scots pine heartwood / S. Willför, R. Sjöholm, C. Laine, B. Holmbom // Wood Sci. Technol. - 2002. - Vol.36, - P. 101 – 110.
143. Willför, S. Polysaccharides in some industrially important softwood species / S. Willför, A. Sundberg, J. Hemming, B. Holmbom // Wood Sci. Technol. - 2005. - Vol.39. - P. 245 – 258.
144. Zule J., Tisler V., Zurej A., Torelli N. Isolation and characterization of essential oil from the cones of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) european larch (*Larix decidula* Mill.) and scots pine (*Pinus sylvestris*) / J. Zule, V. Tisler, A. Zurej [and others] // Zbornik gozdarstva in lesarstva. - Vol.71. - 2013. - P. 159 – 172.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. УФ-спектры определения содержания пигментов ели обыкновенной;
2. Хроматограммы компонентного состава эфирного масла ели обыкновенной шишек и древесной зелени;
- 3-4. Акты о внедрении;
5. Проект фармакопейной статьи «Ели обыкновенной шишки»;
6. Направительное письмо в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» от 21.05.2015 г. № 039/406.
7. Заявка на патент «Средство, на основе полисахаридов ели обыкновенной шишек, обладающее противовоспалительной активностью».

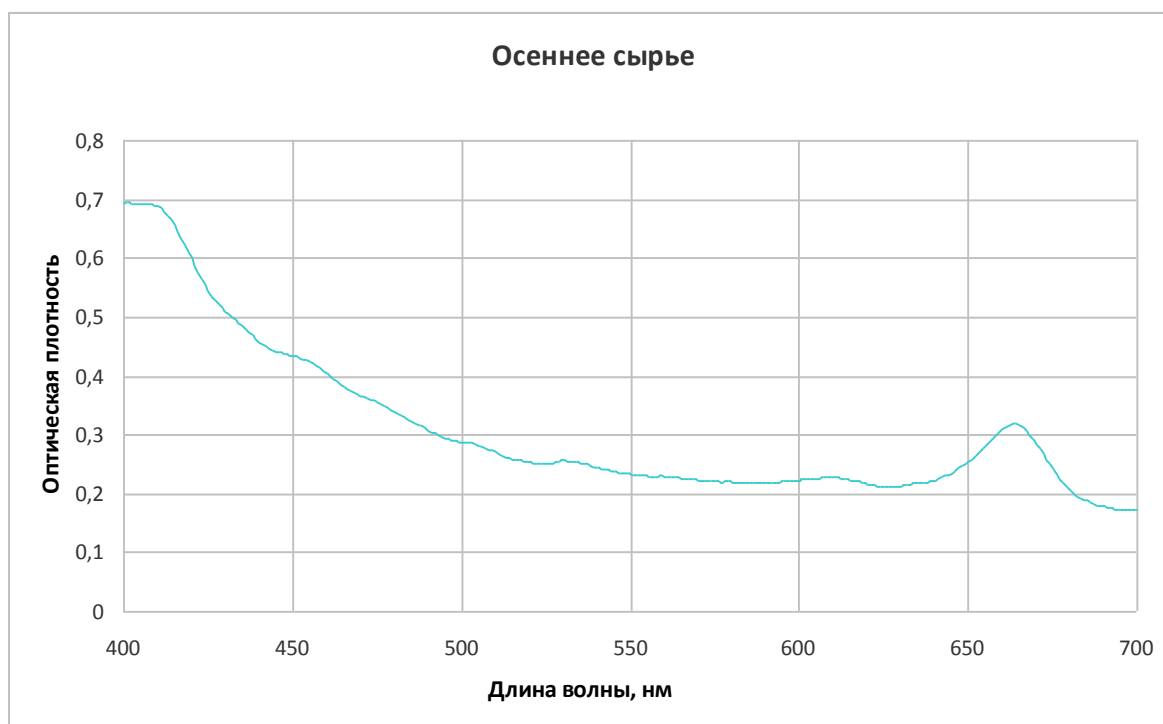


Рисунок 1. Спектр поглощения хлорофиллов а/б и каротиноидов осенней хвои.

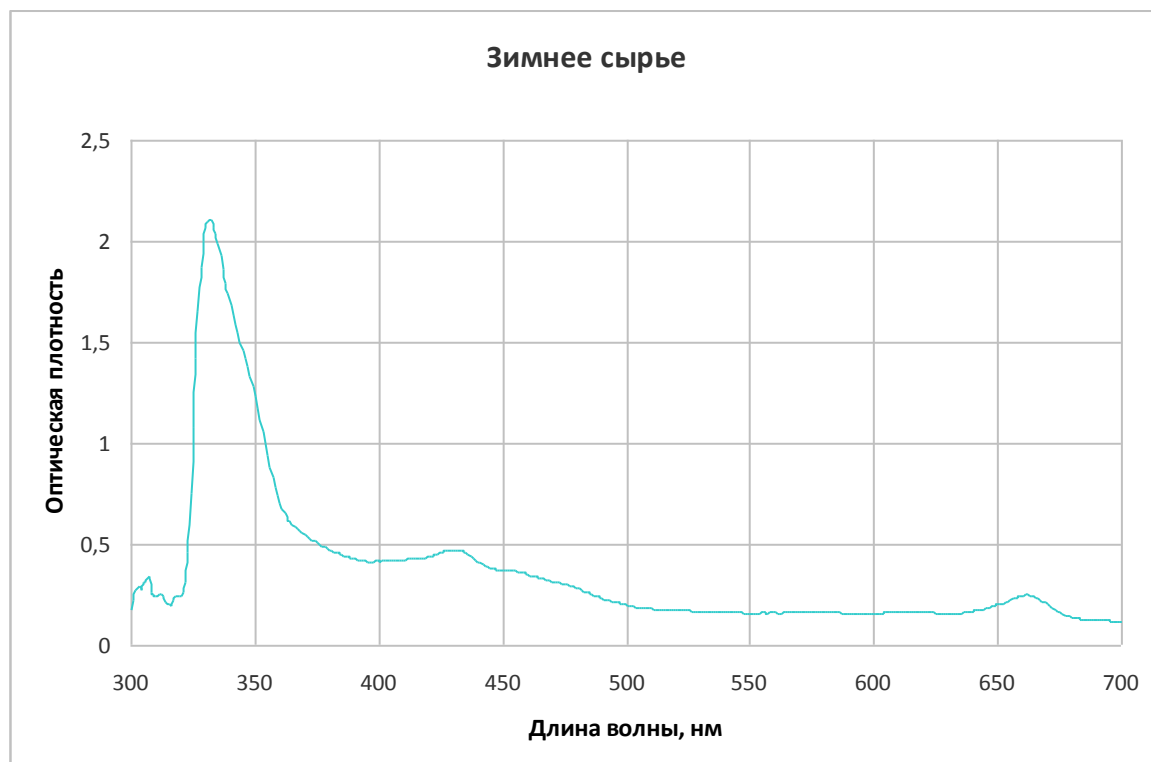


Рисунок 2. Спектр поглощения хлорофиллов а/б и каротиноидов зимней хвои.

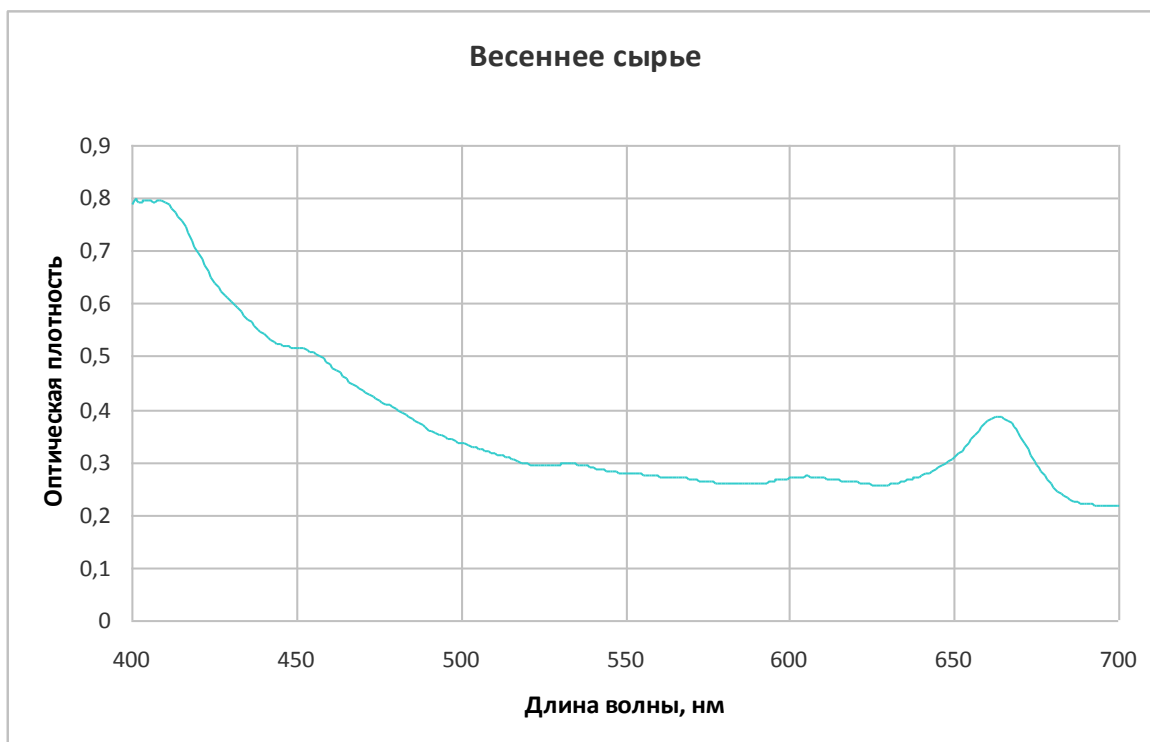


Рисунок 3. Спектр поглощения хлорофиллов а/б и каротиноидов весенней хвои.

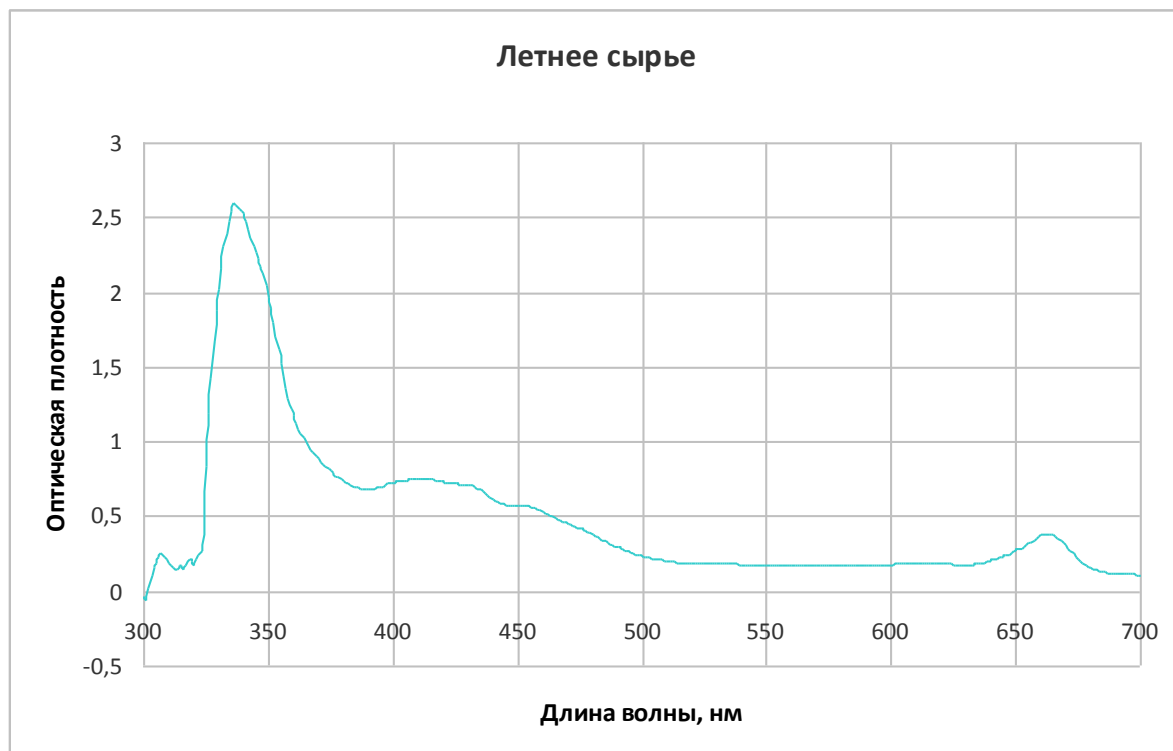


Рисунок 4. Спектр поглощения хлорофиллов а/б и каротиноидов летней хвои.

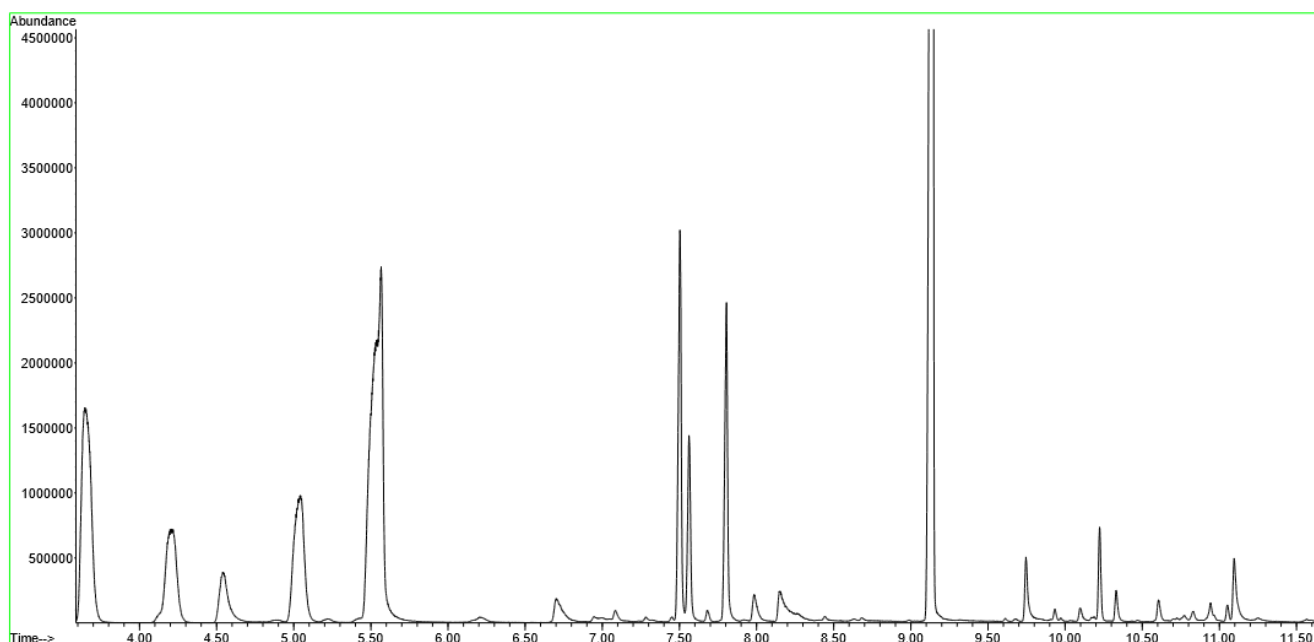


Рисунок 1. Хроматограмма фракции № 1 эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

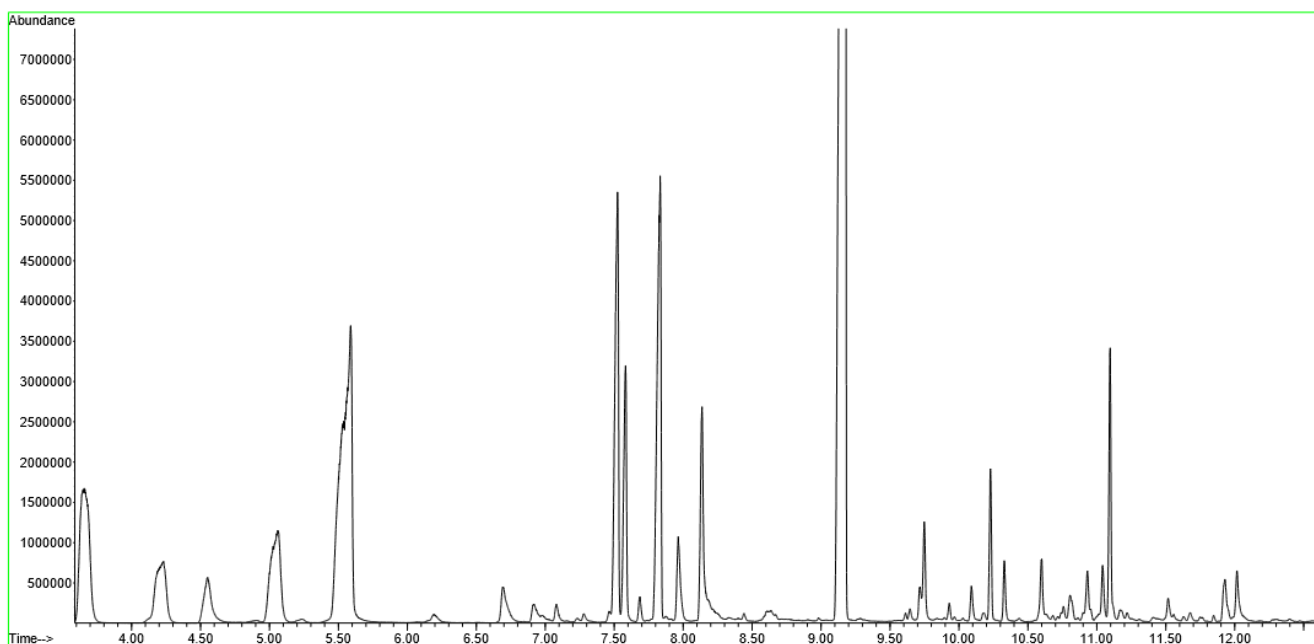


Рисунок 2. Хроматограмма фракции № 2 эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

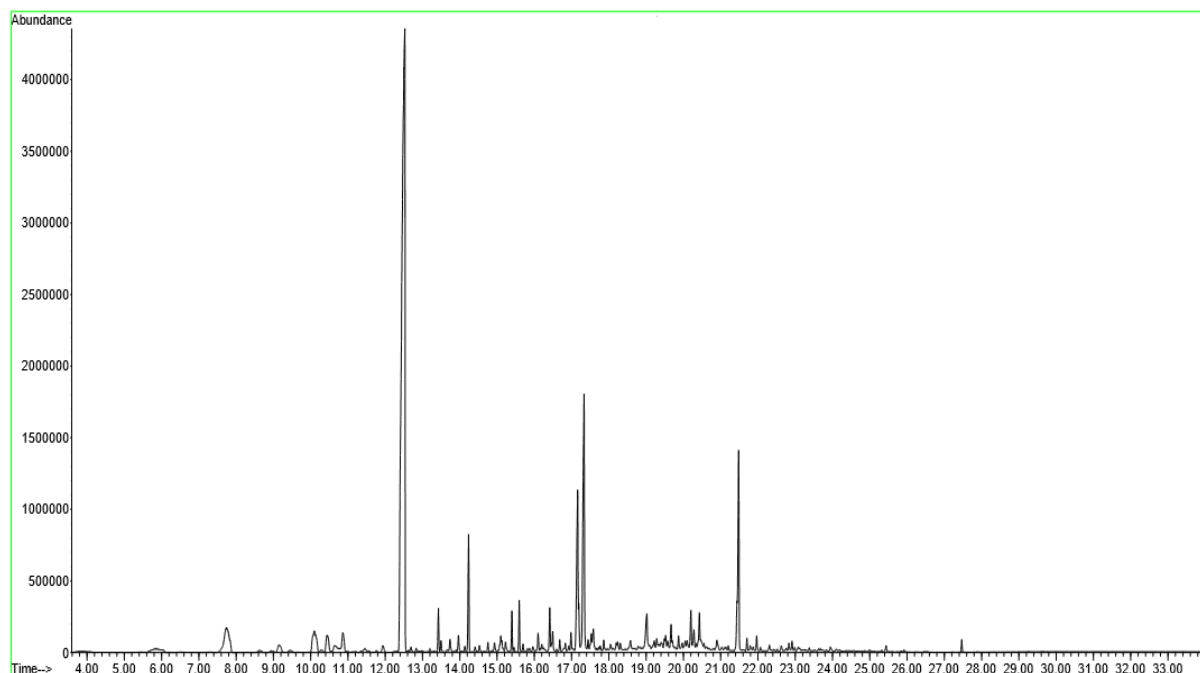


Рисунок 3. Хроматограмма фракции № 3 эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

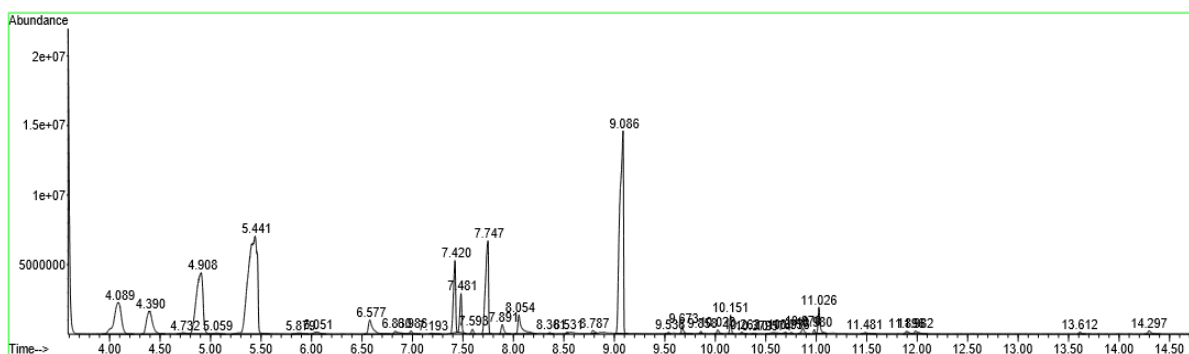


Рисунок 4. Хроматограмма летнего образца эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

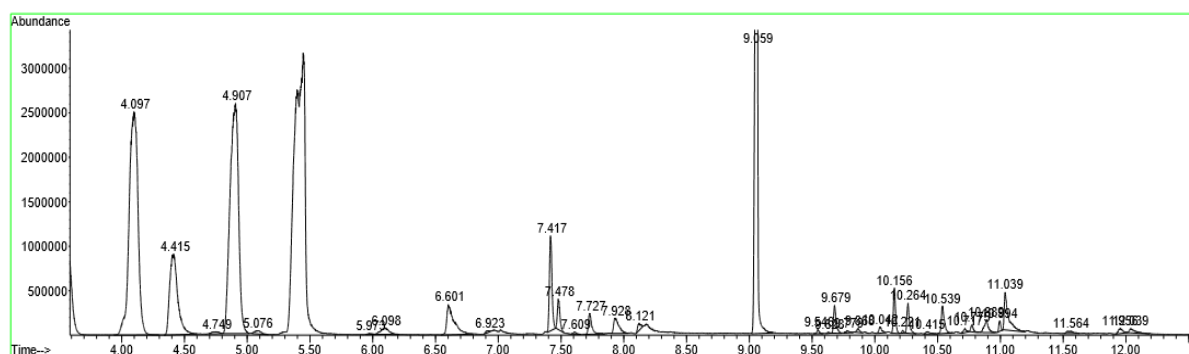


Рисунок 5. Хроматограмма осеннего образца эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

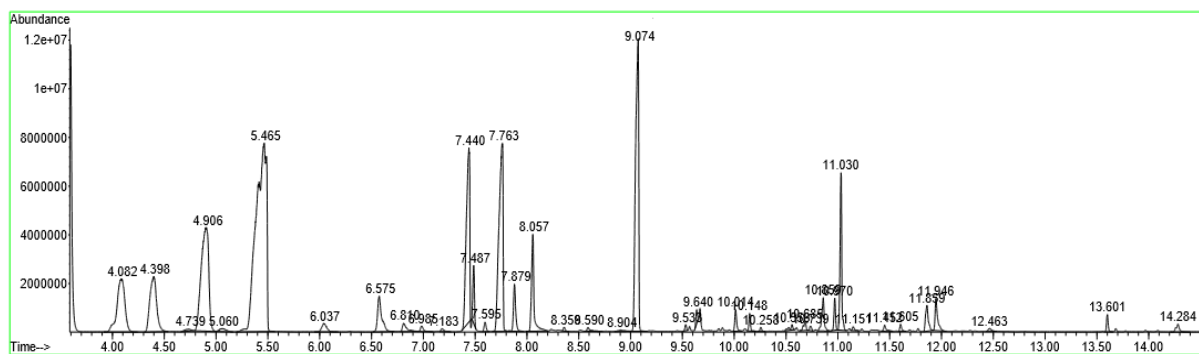


Рисунок 6. Хроматограмма зимнего образца эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

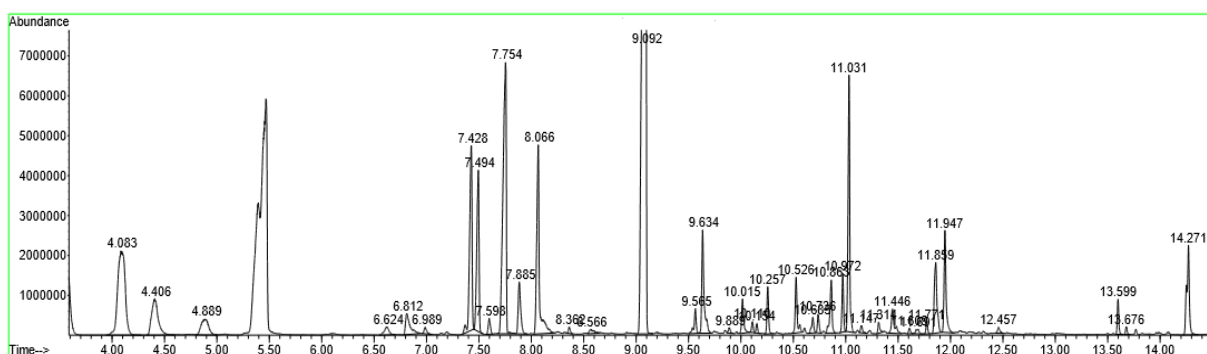


Рисунок 7. Хроматограмма весеннего образца эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной.

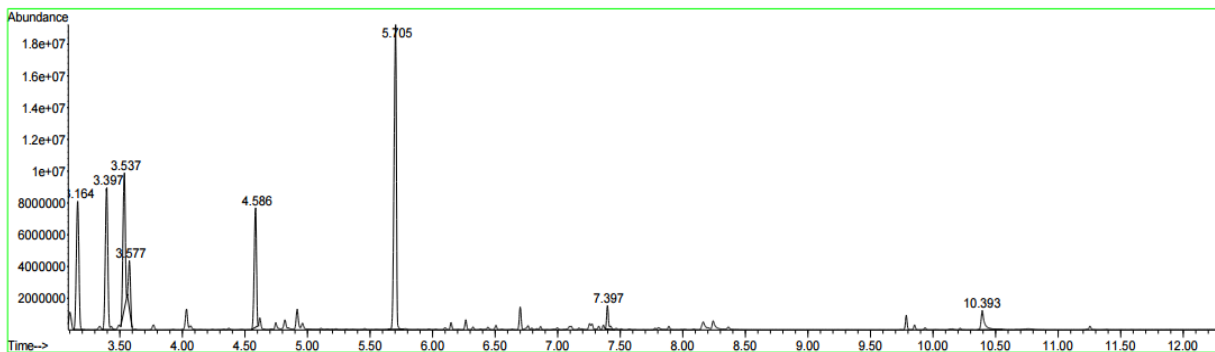


Рисунок 7. Хроматограмма эфирного масла ели обыкновенной шишек.

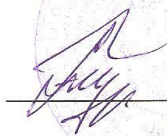
«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной работе

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России,

кандидат фармацевтических наук,

доцент

 А.Ю. Турышев

«14» сентября 2015 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Результатов кандидатской диссертации *Гуляева Дмитрия Константиновича* на тему: «Фармакогностическое исследование ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармакогнозии с курсом ботаники государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Пермской государственной фармацевтической академии Министерства здравоохранения Российской Федерации

Комиссия в составе доктора фармацевтических наук, профессора Белоноговой В.Д., кандидата фармацевтических наук, доцента Курицына А.В., кандидата фармацевтических наук, доцента Донцова А.А. подтверждает использование результатов, полученных Гуляевым Д.К. в ходе работы над кандидатской диссертацией «Фармакогностическое исследование ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае», в образовательном процессе при обучении студентов по специальности «Фармация» на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники.

Доктор фармацевтических наук, профессор  Белоногова В.Д.

Кандидат фармацевтических наук, доцент  Курицын А.В.

Кандидат фармацевтических наук, доцент  Донцов А.А.

614990 г. Пермь, ул. Полевая, 2

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО НПК «Апифито групп»

 Каменских А.С.

« 11 »  2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

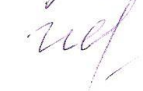
Результатов диссертационной работы Гуляева Дмитрия Константиновича «Фармакогностическое исследование древесной зелени и шишек ели обыкновенной, произрастающей в Пермском крае», представленной на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, в работу ООО НПК «Апифито групп»

Комиссия в составе главного технолога ООО НПК «Апифито групп» Веселковой Татьяны Алексеевны, технолога ООО НПК «Апифито групп» Иванцовой Любови Витальевны составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Гуляева Дмитрия Константиновича внедрены в работу ООО НПК «Апифито групп».

Разработанные показатели качества ели обыкновенной шишек используются при оценке качества сырья для получения эфирного масла и апробированы в работе предприятия.

Экспериментальные данные по исследованию древесной зелени ели обыкновенной используются на предприятии в производственном процессе эфирного масла.

Глав. технолог ООО НПК «Апифито групп»  Веселкова Т.А.

Технолог ООО НПК «Апифито групп»  Иванцова Л.В.

г. Пермь, ул. Трамвайная, д.33

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

«Утверждаю»

«Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»

Генеральный директор

_____ А.Н. Миронов

«____» _____ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ели обыкновенной шишки

ФС 42 – XXXXX –

Piceae abietis strobili

цельные, измельчённые».

Взамен ГФ Х1, вып.2,

ст.81

Срок введения установлен

с «____» _____ г.

Срок действия

до «____» _____ г.

Собранные летом до созревания семян и высушенные шишки дикорастущего и культивируемого растения ели обыкновенной – *Picea abies* (L.) Karst., сем. сосновых Pinaceae.

Издание официальное

Перепечатка

воспрещена

Внешние признаки.

Цельное и измельченное сырьё.

Сырьё исследуют невооруженным глазом с помощью лупы 10х в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья».

Цельное сырьё. Внешние признаки. Цельное сырьё. Шишки овально - цилиндрические или продолговато - эллиптические, длиной 3-14 см, шириной 1,5-5 см; чешуя двух типов: наружная – кроющая и внутренняя – семенная. Обе чешуи срастаются друг с другом. Шишки образованы спирально расположенными кроющими чешуями, в пазухах которых имеются более крупные семенные чешуи. Кроющие чешуи длиной 3-4 мм, шириной 1,2-1,6 мм, ланцетовидные, пленчатые, с вытянутой бахромчатой по краю верхушкой, красновато - коричневого цвета. Семенные чешуи у молодых шишек удлинённо - овальные, зеленовато - коричневые, длиной 8-10 мм, шириной 5-7 мм, у более зрелых шишек семенные чешуи значительно крупнее - длиной 2,5-2,7 см, шириной 1,4-1,5 см, широко ромбические, на верхушке усечённые, неравно-зубчатые, у основания клиновидно-суженные; их поверхность зеленовато - или светло - коричневая, в верхней части блестящая, у основания более темная, матовая. У основания каждой семенной чешуи лежат два семени, прикрытые пленчатым крылом. Семена яйцевидные, коричневые, длиной до 5 мм, шириной до 3 мм; свободный конец крыла длиной до 11 мм, шириной до 6 мм; Между семенными чешуями часто заметны смолистые выделения.

Запах ароматный, своеобразный, вкус водного извлечения вяжущий, горьковато - пряный.

Измельченное сырье. Кусочки сырья различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 10 мм.

При рассмотрении видны кусочки семенной чешуи коричневого, светло - коричневого, зеленовато – коричневого цвета. Кроющие чешуи, измельченные или целые красновато-коричневого цвета. Семена яйцевидные, коричневые, длиной до 5 мм, шириной до 3 мм. Видны частички крыла семени разного размера и формы. Запах ароматный. Вкус водного извлечения вяжущий, горьковато - пряный.

Порошок. Коричневого, красно - коричневого, зеленовато – коричневого цвета, проходящий сквозь сито с отверстиями размером 0,16 мм. Запах ароматный. Вкус водного извлечения вяжущий, горьковато - пряный.

Микроскопия.

Цельное сырье. Анализ проводят в соответствии с указаниями статьи «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств из него» (ОФС 42- , ГФ XII).

При рассмотрении поперечного среза семенной чешуи в средней части видны клетки эпидермиса с обеих сторон, овальные, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы особенно с внешней стороны.

На поверхности чешуи, особенно на внутренней стороне, расположены простые одноклеточные, реже двухклеточные волоски сосочковидной или конической формы. На внешней стороне волоски меньшего размера и расположены реже. Под эпидермисом с обеих сторон расположены 1-4 слоя механических клеток с сильно утолщенными и более или менее (в зависимости

от стадии развития шишки) одревесневшими оболочками, пронизанными тонкими порам. На срезе верхней части семенной чешуи с внешней стороны:

видны клетки эпидермиса с толстым слоем кутикулы, под эпидермисом расположен слой колленхимы. С внутренней стороны клетки эпидермиса с тонким слоем кутикулы, а под эпидермисом расположен слой склеренхимы. На срезе центральной и нижней части чешуи, с обеих сторон, под эпидермисом находится слой склеренхимы. Клетки склеренхимы с сильно утолщёнными и полуудревесневшими оболочками. Количество слоёв склеренхимы от верхушки к основанию семенной чешуи увеличивается. В срединной части мезофилла расположены тонкостенные паренхиматозные клетки. Паренхиматозные клетки хлорофилловые, зелёные, у молодых шишек, и отмирающие коричневого, светло-коричневого цвета часто смятые и сдавленные, у более зрелых. В срединной части мезофилла расположены смоляные ходы и коллатеральные проводящие пучки (8-12 шт). Проводящие пучки сдавленные, мелкие в верхней части и более крупные у основания чешуи. Диаметр смоляных ходов увеличивается от верхушки к основанию чешуи.

Кутикула, содержащее смоляных ходов, а так же маслянистые включения, в виде мелких капель в клетках эпидермиса и мезофилла, окрашиваются раствором судана III в красно-оранжевый цвет.

В препарате кроющей чешуи с поверхности видны: вытянутые клетки эпидермиса с четковидно-утолщёнными оболочками. На верхушке чешуи и по краю – многоклеточные и реже одноклеточные простые волоски. В верхней части кроющей чешуи и вдоль центральной жилки видны мелкие устьица. На внешней поверхности кроющей чешуи видны одноклеточные, реже двухклеточные волоски продолговатой и конической формы. Волоски расположены на внешней поверхности вдоль центральной жилки ближе к основанию чешуи. У основания чешуи расположены 2, реже 3 смоляных хода, которые достигают половины длины чешуи.

В коже семени с поверхности видны толстостенные каменистые клетки с темно-бурым содержимым. Клетки крыла семени вытянутые с четковидно-утолщёнными оболочками.

Измельченное сырье.

При рассмотрении поперечного среза частичек семенной чешуи видны клетки эпидермиса с обеих сторон, овальные, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы.

На поверхности семенной чешуи расположены простые одноклеточные, реже двухклеточные волоски сосочковидной или конической формы. На внешней стороне волоски меньшего размера и расположены реже. Под эпидермисом с обеих сторон расположены 1-4 слоя механических клеток с сильно утолщенными и более или менее (в зависимости от стадии развития шишки) одревесневшими оболочками, пронизанными тонкими порам. С внутренней стороны клетки эпидермиса с тонким слоем кутикулы, а под эпидермисом расположен слой склеренхимы. Клетки склеренхимы с сильно утолщёнными и полуодревесневшими оболочками. В срединной части мезофилла расположены тонкостенные паренхиматозные клетки. Паренхиматозные клетки хлорофилловые, зелёные, у молодых шишек, и отмирающие коричневого, светло-коричневого цвета часто смятые и сдавленные, у более зрелых. В срединной части мезофилла расположены смоляные ходы и проводящие пучки.

Кутикула, содержащее смоляных ходов, а так же маслянистые включения, в виде мелких капель в клетках эпидермиса и мезофилла, окрашиваются раствором судана III в красно-оранжевый цвет.

В препарате кроющей чешуи с поверхности видны: вытянутые клетки эпидермиса с четковидно-утолщёнными оболочками. На верхушке чешуи и по краю – многоклеточные и реже одноклеточные простые волоски. В верхней части кроющей чешуи и вдоль центральной жилки видны мелкие устьяца. На внешней поверхности кроющей чешуи видны одноклеточные, реже двухклеточные волоски продолговатой и конической формы. Волоски расположены на внешней поверхности вдоль центральной жилки ближе к основанию чешуи. У основания чешуи расположены 2, реже 3 смоляных хода, которые достигают половины длины чешуи.

В кожуре семени с поверхности видны толстостенные каменистые клетки с темно-бурым содержимым. Клетки крыла семени вытянутые с чётковидно-утолщёнными оболочками.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка видны обрывки клеток эпидермиса, толстостенные, покрытые толстым слоем кутикулы. Обрывки одноклеточных или двуклеточных волосков сосочковидной или конической формы. Видны обрывки механических клеток с одревесневшими оболочками, пронизанные тонкими порами, мелкие капли маслянистых включений, окрашенные раствором судана III в красно-оранжевый цвет и толстостенные каменистые клетки.

Качественные реакции.

1. На предметное стекло наносят 1 каплю отвара ели шишек, добавляют 1 каплю 1% раствора железоаммонийных квасцов, постепенно появляется черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).
2. На предметное стекло наносят 1 каплю отвара, добавляют 1 каплю свежеприготовленного 1% раствора желатина, появляется белый осадок (дубильные вещества).

Примечание. 1. Приготовление отвара ели обыкновенной шишек (ГФ XI стр. 147). Сырье, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 10 мм, заливают водой комнатной температуры в соотношении 1:10. Настаивают в плотно закрытом инфундирном аппарате или в соответствующей емкости на кипящей водяной бане при частом перемешивании в течение 30 минут. Процеживают без предварительного охлаждения.

2. Приготовление 1% раствора железоаммонийных квасцов (ГФ XI стр. 300). 1 г железоаммонийных квасцов растворяют в воде и разбавляют до 100 мл.
3. Приготовление 1% раствора желатина (ГОСТ 11293-89). 1 грамм желатина отвешивают в мерную колбу на 100 мл, заливают водой и оставляют набухать при комнатной температуре $1,5 \pm 0,5$ ч. Колбу с набухшим желатином помещают в термостат при температуре 55°C и при осторожном

перемешивании растворяют желатин 30-40 минут. Раствор фильтруют и доводят водой до метки.

Хроматография.

На бумажную хроматографическую пластинку, на точку старта наносят 0,05 мл извлечения (полученного см. раздел качественные реакции) упаренного на половину.

Пластинку с нанесенной пробой сушат на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру с 15% уксусной кислотой и хроматографируют. Когда фронт подвижной фазы пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат под тягой в течение 15 мин, опрыскивают 2% спиртовым раствором алюминия хлорида и выдерживают в сушильном шкафу при температуре $(100 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, затем просматривают в УФ - свете.

При рассмотрении хроматограмм в УФ-свете при длине волны 360 нм, появляется окрашенная зона R_f 0,25 сине-голубого цвета (нижний край хроматографической пластинки). После обработки хроматограммы 2% спиртовым раствором алюминия хлорида, появляются окрашенные зоны: R_f 0,25 сине-фиолетового цвета остается неизменной, R_f 0,39 темно-желтого цвета (выше зоны сине-фиолетового цвета), R_f 0,52 желтого цвета (флавоноиды, выше зоны темно-желтого цвета), зона R_f 0,72 темного цвета (верхний край хроматографической пластинки).

Примечание. Приготовление 2% раствора алюминия хлорида (ГФ XI стр. 226). 2 грамма алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта этилового 96% в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96%.

Спектр (УФ – спектр)

Спектр поглощения раствора Б, (полученного по стандартной методике определения флавоноидов в траве зверобоя), в области от 300 до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 396 нм (рутин).

Числовые показатели. Цельное сырье. Эфирного масла не менее 0,2%; экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 5%; дубильных веществ не менее 6%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; других частей ели (хвоя, мелкие веточки и др.) не более 5%; органической смеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%.

Измельченное сырье. Эфирного масла не менее 0,3%; экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 5%; дубильных веществ не менее 6%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 3,5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 30%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ Х11 часть 1, ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота», категория 4Б.

Количественное определение.

Экстрактивные вещества.

1. Аналитическую пробу № 3 измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) помещают в коническую колбу, заливают 100 мл воды очищенной и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин, а затем настаивают 45 мин при комнатной температуре, фильтруют и объем полученного извлечения доводят водой до 100 мл. 5мл водного извлечения выпаривают в стеклянном бюксе досуха и взвешивают (ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» ГФ Х11, методика 2). Экстрагент вода очищенная.

Эфирные масла.

2. Аналитическую пробу № 3 измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Содержание эфирного масла

определяют в 20,0 г измельченного сырья методом 1, время перегонки 1,5 ч (см. статью «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье» ГФ XI, вып. 1, с. 290).

Дубильные вещества

Аналитическую пробу № 3 измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Определение проводят согласно статьи ГФ XI выпуск 1 стр. 286 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье».

Тяжелые металлы. Определение проводится согласно ОФС 42- «Определение содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье», ГФХII изд.

Остаточные количества пестицидов. Определение проводится согласно ОФС 42_ «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье», ГФХI1 изд.

Радиоактивность. Содержание радионуклидов проводится на пяти сериях лекарственного растительного сырья в соответствии с нормами СанПиН 2.3.2.1078-01 и по методикам ОФС 42-0011-03 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций - 90 и цезий -137. Отбор проб, анализ и оценка результатов».

Упаковка. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2, с. 381-384.

«Ангро». Цельное сырье упаковывают по 25 кг в мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226- 88; по 50 кг в мешки тканевые продуктовые по ГОСТ 30 090-93; по 25 кг в ящики из листовых древесных материалов по ГОСТ 5959-80, выстланных внутри бумагой оберточной по гост 8273-75, или бумагой мешочной по ГОСТ 2228-81, или подпергаментом по ГОСТ 1760-86.

На упаковку наклеивают этикетку из бумаги этикетировочной по ГОСТ 7625-86, бумаги писчей по ГОСТ 18510-87.

Пачки. Измельченное сырьё фасуют по 50 г в пачки картонные по ГОСТ 12 303-80, с внутренним пакетом бумажным по гост 24 3 70-80, изготовленным из бумаги оберточной марки «А» по гост 8273-75 или подпергамента по гост 1760-86; Пачки картонные изготовлены из бумаги для упаковывания пищевых продуктов по гост 7247-90, или картона по ГОСТ 7933-89, или картона типа «хром-эрзац» по ТУ 5453-015-04 766 356-95 или импортного, разрешенного к использованию МЗ РФ.

Транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.

При фасовке по 100 г., содержимое трех пачек, взятых из средней пробы, взвешивают и вычисляют среднюю массу сырья в одной упаковке. Отклонение от номинальной массы не должно превышать + 5% (в соответствии с ОСТ 64-4-338-85).

Маркировка. В соответствии с ГОСТ 6077 -80, ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2, с. 384. На пачке указывается предприятие изготовитель товарный знак, название лекарственного средства на латинском и русском языках, массу при влажности 12%, назначение, способ употребления, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, штрих-код, срок годности, условия отпуска «Безрецептурный», соответствие продукции требованиям ВДУ ГН 2.6.005-93 по содержанию радионуклидов «Продукция прошла радиационный контроль СанПин 2.3.2.560-96 и СанПиН 2.3.2.1078-01».

Ангро. Цельное сырьё. На этикетке указывают: наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес, название лекарственного средства на русском и латинском языках, масса 25 или 50 кг при влажности 13 %, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия хранения, «Продукция прошла радиационный контроль».

Пачки. На пачке указывают: наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес, название лекарственного средства на русском и латинском языках, масса 50 г при влажности 13 %, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия хранения,

условия отпуска, способ применения и дозы (включая методику приготовления водного извлечения, условия его хранения, срок его годности и путь введения), «Продукция прошла

радиационный контроль», штриховой код.

Маркировка транспортной упаковки в соответствии с ГОСТ 14 192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 6077—80, ГОСТ 17 768—90 и ГФ XI, вып. 2, с. 385.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и действующей Государственной Фармакопеей. В сухом защищенном от света месте.

Срок годности. 2 года.

Фармакологическая группа. Противовоспалительное средство.

Назначение. Для получения: отвара.

Примечание. Методики анализа, реактивы, методики определения числовых показателей описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XI издания и Государственной Фармакопеи XII издания.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
государственное бюджетное образовательное
учреждение
высшего профессионального образования
**«Пермская государственная
фармацевтическая академия»**

Министерства здравоохранения Российской
Федерации
(ГБОУ ВПО ПГФА Минздрав России)
Юридический адрес: Россия, 614990, г.Пермь,
ул. Екатерининская, 101
Почтовый адрес: Россия, 614990, г.Пермь,
ул. Полевая, 2

Тел. (342) 233-55-01; Факс: (342) 233-55-01;
E-mail:
ИНН 5902291011; КПП 590201001

21.05.2015 № 039/406
на № _____ от _____

Минздрав Российской Федерации
Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
Генеральному директору
Миронову А.Н.
127051 Москва, Петровский бульвар д.

Уважаемый Александр Николаевич!

Направляем Вам проект фармакопейной статьи на ели обыкновенной
шишки, а также пояснительную записку к данной ФС. Проект ФС «Ели
обыкновенной шишки» - 7 листов; пояснительная записка к проекту ФС «Ели
обыкновенной шишки» - 24 листа; приложение к Пояснительной записке
«Ели обыкновенной шишки» -14 листов;

И.о. Ректора государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Пермская государственная фармацевтическая
академия» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, доктор
фармацевтических наук, профессор



Е.В. Орлова

Срок представительства (заполняется в случае назначения иного представителя без представления доверенности)		Регистрационный (е) номер (а) патентного(ых) поверенного(ых)	
(72) Автор	Полный почтовый адрес места жительства, включающий официальное наименование страны и ее код по стандарту ВОИС ST. 3		
Белоногова Валентина Дмитриевна Рудакова Ирина Павловна Гуляев Дмитрий Константинович	Россия, RU, 614107, г. Пермь, ул. Лебедева 34, кв. 36 Россия, RU, 614017, г. Пермь, ул. Тургенева 25, кв. 76 Россия, RU, 614013, г. Пермь, ул. Академика Королёва 14, кв. 124		
Я _____ (полное имя) прошу не упоминать меня как автора при публикации сведений ☐ о заявке ☒ о выдаче патента. Подпись автора			
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИЛАГАЕМЫХ ДОКУМЕНТОВ:		Кол-во л. в 1 экз.	Кол-во экз.
☒ описание изобретения		4	3
☐ перечень последовательностей			
☒ формула изобретения (кол-во пунктов формулы _____)		1	3
☐ чертеж(и) и иные материалы			
☒ реферат		1	3
☒ документ об уплате патентной пошлины (указать) - за регистрацию заявки на изобретение и принятие решения по результатам формальной экспертизы - за проведение экспертизы заявки на изобретение по существу и принятие решения по её результатам ☐ документ, подтверждающий наличие оснований ☐ для освобождения от уплаты патентной пошлины ☐ для уменьшения размера патентной пошлины ☐ для отсрочки уплаты патентной пошлины		1 1	1 1
☐ копия первой заявки (при испрашивании конвенционного приоритета)			
☐ перевод заявки на русский язык			
☐ доверенность			
☐ другой документ (указать)			
Фигуры чертежей, предлагаемые для публикации с рефератом _____			

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ оригиналов документов заявки	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
☐ (86) <i>(регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством)</i> ☐ (87) <i>(номер и дата международной публикации международной заявки)</i>	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ 614990, Россия, г.Пермь, ул. Полевая д.2., ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации Телефон/ факс: (342) 233-55-01; 236-90-50; E-mail: perm@pfa.ru	
З А Я В Л Е Н И Е о выдаче патента Российской Федерации на изобретение	В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Средство, на основе полисахаридов ели обыкновенной шишек, обладающее противовоспалительной активностью		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, г.Пермь, ул. Полевая д.2, 614990 Указанное лицо является ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком, исполнитель работ _____ <i>(указать наименование)</i> ☐ исполнителем работ по ☐ государственному ☐ муниципальному контракту, заказчик работ _____ <i>(указать наименование)</i>		ОГРН КОД страны по стандарту ВОИС ST. 3 <i>(если он установлен)</i>
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ Указанное(ые) ниже лицо(а) назначено(назначены) заявителем(заявителями) для ведения дел по получению патента от его(их) имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности		Является ☐ Патентным(и) поверенным(и) ☐ Иным представителем Телефон:
Фамилия, имя, отчество (если оно имеется)		Факс:
Адрес:		E-mail:

ЗАЯВЛЕНИЕ НА ПРИОРИТЕТ (Заполняется только при испрашивании приоритета более раннего, чем дата подачи заявки)

Прошу установить приоритет изобретения по дате

- 1 ☐ подачи первой заявки в государстве-участнике Парижской конвенции по охране промышленной собственности
(п.1 ст.1382 Гражданского кодекса Российской Федерации) (далее - Кодекс)
- 2 ☐ поступления дополнительных материалов к более ранней заявке (п.2 ст. 1381 Кодекса)
- 3 ☐ подачи более ранней заявки (п.3 ст.1381 Кодекса)
(более ранняя заявка считается отозванной на дату подачи настоящей заявки)
- 4 ☐ подачи/приоритета первоначальной заявки (п. 4 ст. 1381 Кодекса), из которой выделена настоящая заявка

☐ № первой (более ранней, первоначальной) заявки

☐ Дата
испрашиваемого
приоритета

(33) Код страны
подачи
по стандарту
ВОИС ST. 3
(при испрашивании конвенционного
приоритета)

1.

2.

3.

ХОДАТАЙСТВО ЗАЯВИТЕЛЯ:

- ☐ осуществить публикацию сведений о заявке ранее установленного срока (п.1 ст. 1385 Кодекса)
- ☐ начать рассмотрение международной заявки ранее установленного срока (п.1 ст. 1396 Кодекса)
- ☒ провести экспертизу заявки на изобретение по существу (п.1 ст. 1386 Кодекса)

Подпись

Ректор ГБОУ ВПО «Пермская государственная
фармацевтическая академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
кандидат фармацевтических наук, доцент



А.Ю. Турышев

Подпись заявителя или патентного поверенного, или иного представителя заявителя, дата подписи (при подписании от имени юридического лица подпись руководителя или иного уполномоченного на это лица удостоверяется печатью)

Описание изобретения

Изобретение относится к фармации и медицинской промышленности, а именно, к способу получения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья, и касается получения водорастворимых полисахаридов из шишек ели обыкновенной (*Picea abies* (L. Karst.)), обладающих противовоспалительной активностью.

Известен способ получения продуктов из древесной зелени сосны обыкновенной, включающий измельчение древесной зелени и экстракцию, выделение экстракта и остатка, отстаивание полученного экстракта, отделение воска сырца, отгонку растворителя и эфирных масел, омыление жирорастворимой фракции упаренного экстракта натриевой щелочью. Экстракцию проводят бензином или гексаном, экстракцию остатка проводят в две стадии: первую - 80-90%-ным водным раствором этилового спирта при температуре 80-85°C в течение 3-5 ч при жидкостном модуле 1:3 с отделением экстракта и шрота, вторую гидролиз-экстракцию шрота осуществляют эквимольной смесью 0,5%-ного раствора оксалата аммония и 0,5%-ной щавелевой кислоты при температуре 60-80°C в течение 30-120 мин при жидкостном модуле 1:5-1:10 с последующим выделением пектиновых веществ добавлением этилового спирта. Изобретение позволяет получать пектиновые вещества в виде отдельного продукта.

Известен способ получения полисахаридов из древесной зелени хвойных растений включающий измельчение, экстракцию, концентрирование, осаждение этиловым спиртом, центрифугирование и сушку, экстракцию древесной зелени проводят этилацетатом и хлороформом, экстракцию остатка проводят в три ступени: первую - дистиллированной водой, вторую - подкисленной соляной кислотой водой, третью - водным раствором гидроксида калия, осадок, выпавший после осаждения этиловым спиртом, растворяют в воде и диализуют против дистиллированной воды, сушку целевого продукта ведут лиофильно. Кроме того, экстракцию пектиновых полисахаридов на первой ступени проводят трижды

дистиллированной водой при периодическом перемешивании при 65-75°C в соотношении сырье:раствор 1:7-10 в течение 1-2 ч; экстракцию пектиновых полисахаридов на второй ступени проводят трижды подкисленной соляной кислотой водой при pH 3.8-4.2 при 55-75°C и периодическом перемешивании в соотношении сырье:раствор 1:7-10 в течение 1-2 ч; экстракцию глюкуроноксила на третьей ступени проводят пятикратно водным раствором 4-7%-ного гидроксида калия при 20-25°C при периодическом перемешивании в соотношении сырье:раствор 1:7-10 в течение 1-2 ч; на третьей ступени полученный экстракт охлаждают до температуры 10-15°C и подкисляют соляной кислотой до pH 4.5-5.0; раствор гидроксида калия содержит 7-12 мМ боргидрид натрия; в качестве сырья используют свежесобранную предварительно измельченную древесную зелень пихты сибирской (*Abies sibirica*).

В данных способах, в качестве сырья используются в основном древесная зелень, тогда как шишки наряду с древесной зеленью, являются отходами лесозаготовок.

Задачей изобретения является получение водорастворимых полисахаридов из отходов лесозаготовок (шишек ели обыкновенной), обладающих противовоспалительной активностью.

Пример 1 / получение целевого продукта из шишек ели обыкновенной. Навеску воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц диаметром 5 мм. Для удаления пигментов, смоляных кислот, фенольных соединений, навеску сырья около предварительно экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета до появления чистого растворителя.

Далее из сырья экстрагировали водорастворимый полисахаридный комплекс горячей водой в соотношении 1:10 при температуре 80 °C. Экстракцию повторяли 2 раза в тех же условиях. Объединённые экстракты упаривали под вакуумом и осаждали водорастворимый полисахаридный комплекс трёхкратным количеством спирта 96%. Полученный осадок

отфильтровывали и высушивали. Выход водорастворимого полисахаридного комплекса (ВРПК) из ели обыкновенной шишек составляет $2,5 \pm 0,54\%$.

Полисахаридные цепи водорастворимого полисахаридного комплекса шишек ели обыкновенной, по результатам хроматографического анализа гидролизатов, в основном состоят из остатков арабинозы и галактозы.

Для исследования острой токсичности ВРПК шишек ели обыкновенной использовали экспресс метод определения средней летальной дозы Прозоровского В.В [1]. Вещества вводили однократно в дозах от 1000 до 5000 мг/кг, перорально с помощью желудочного зонда. После введения экстракта оценивали состояние животных в течение 6 ч непрерывно. Отмечали отсутствие или наличие случаев летальности животных.

По результатам определения острой токсичности ВРПК шишек отнесены к классу 4 (малотоксичные вещества) по ГОСТ 12.1.007-7 [2], с $LD_{50} > 5000$ мг/кг.

Противовоспалительная активность определяли на крысах массой 180-220 г, обоего пола, группа включала 6 животных. Животные содержались в виварии на обычном рационе при свободном доступе к воде.

Определение противовоспалительной активности ВРПК шишек проводили на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1% водного раствора каррагинина. Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отека, оценивали онкометрически [3] до введения и через 4 ч после введения раствора каррагинина. Исследуемые вещества вводили перорально в дозе 50 мг/кг за 1 ч до введения флогогенного агента. Контролем служили животные, не получавшие препарата.

О наличии противовоспалительной активности судили по выраженности торможения воспалительной реакции. Результаты исследования противовоспалительной активности полисахаридных фракций представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Противовоспалительная активность ВРПК шишек ели обыкновенной

Фракция	% прироста стопы через 4 ч	% торможения через 4 ч
1	2	3
ВРПК шишек	37,6±12,9 p<0,001	65,0
ВРПК древесной зелени	49,7±9,9 p<0,001	54,6
Контроль	109,5±4,7	
Препарат сравнения (Нимесулид)	33,9±6,8 p<0,001	68,1

p – достоверность в сравнении с контролем

По результатам исследования (Таблица 1) установлено, что ВРПК древесной зелени и шишек проявляют выраженную противовоспалительную активность, тормозя образование отёка на 54,6 и 65,0% соответственно, в сравнении с контролем. Противовоспалительная активность ВРПК шишек оказалась выше, и находится на уровне препарата сравнения нимесулида (68,1%). Стоит отметить, что ВРПК шишек являются природным соединением, относительная безвредность которого подтверждена данными определения острой токсичности.

Список литературы

1. Прозоровский, В.В., Прозоровская В.М. Экспресс метод определения средней летальной дозы / В.В. Прозоровский // Фармакология и токсикология. – 1978. - № 4. – С. 497-502.
2. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Стандартиформ, 2007. - 3 с.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

Реферат

Средство, на основе полисахаридов ели обыкновенной шишек, обладающее противовоспалительной активностью

Изобретение относится к фармации и медицинской промышленности, а именно, к способу получения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья, и касается получения водорастворимых полисахаридов из шишек ели обыкновенной (*Picea abies* (L. Karst.)), обладающих противовоспалительной активностью.

Предложен водорастворимый полисахаридный комплекс ели обыкновенной шишек, обладающий противовоспалительной активностью. Представляющее полисахарид, состоящий из остатков арабинозы и галактозы.

Водорастворимый полисахаридный комплекс ели обыкновенной шишек получают предварительной обработкой измельчённого сырья хлороформом в аппарате Сокслета, с последующей экстракцией водорастворимого полисахаридного комплекса горячей водой в соотношении 1:10 при температуре 80 °С, упариванием экстракта, осаждением и сушкой готового продукта.

Конечным результатом является получение вещества, обладающего выраженной противовоспалительной активностью, а также низкой токсичностью.

Формула изобретения

Водорастворимый полисахаридный комплекс ели обыкновенной шишек, представленный разветвлённой цепью из звеньев арабинозы и галактозы, обладающий противовоспалительной активностью и низкой токсичностью.