

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

На правах рукописи

ШАМИЛОВ АРНОЛЬД АЛЕКСЕЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДОВ
ARCTOSTAPHYLOS ADANS., *VACCINIUM* L., *PRUNELLA* L. КАК
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И
ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦИИ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
Оленников Даниил Николаевич,
доктор фармацевтических наук

Пятигорск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Список сокращений	21
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS., <i>VACCINIUM</i> L., <i>PRUNELLA</i> L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	24
1.1. Краткая характеристика семейства <i>Ericaceae</i>	24
1.1.1. Ботанико-таксономическая характеристика рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	24
1.1.2. Химический состав представителей рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	25
1.1.3. Фармакологическая активность рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	27
1.2. Ботанико-таксономическая характеристика рода <i>Vaccinium</i> L.	30
1.2.1. Химический состав <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	31
1.2.2. Фармакологическая активность <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	34
1.2.3. Химический состав <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	37
1.2.4. Фармакологическая активность <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	39
1.2.5. Химический состав <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	41
1.2.6. Фармакологическая активность <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	43
1.2.7. Химический состав <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	45
1.2.8. Фармакологическая активность <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	48
1.2.9. Химический состав <i>Vaccinium oxycoccus</i> L.	52
1.2.10. Фармакологическая активность <i>Vaccinium oxycoccus</i> L.	53
1.3. Ботанико-таксономическая характеристика рода <i>Prunella</i> L.	60
1.3.1. Химический состав рода <i>Prunella</i> L.	61
1.3.2. Фармакологическая активность видов рода <i>Prunella</i> L.	64
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	68
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	70
2.1. Объекты исследования	70
2.2. Оборудование и реактивы	73
2.3. Методики выделения	76
2.3.1. Выделение полисахаридов	76
2.3.2. Выделение фенольных соединений	76
2.4. Хроматографические методы анализа	80
2.5. Физико-химические методы анализа	82
2.6. Секвенирование	83
2.7. Фармакологические исследования	83
2.8. Статистическая обработка	85

ГЛАВА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ПОДЛИННОСТИ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS, <i>VACCINIUM</i> L. И <i>PRUNELLA</i> L.	86
3.1.1. Морфолого-диагностические признаки рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	86
3.1.2. Анатомо-диагностические признаки рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	90
3.1.3. Определение основных групп биологически активных веществ видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans. методом тонкослойной хроматографии	92
3.1.4. ДНК-штрихкодирование растений рода <i>Arctostaphylos</i> Adans. молекулярно-генетическим методом	98
3.2.1. Морфолого-диагностические признаки рода <i>Vaccinium</i> L.	99
3.2.2. Анатомо-диагностические признаки видов рода <i>Vaccinium</i> L.	111
3.2.3. Определение основных групп биологически активных веществ видов рода <i>Vaccinium</i> L. методом тонкослойной хроматографии	117
3.2.4. ДНК-штрихкодирование растений рода <i>Vaccinium</i> L. молекулярно-генетическим методом	127
3.3.1. Морфолого-диагностические признаки видов рода <i>Prunella</i> L.	129
3.3.2. Анатомо-диагностические признаки видов рода <i>Prunella</i> L.	137
3.3.3. Определение основных групп биологически активных веществ видов рода <i>Prunella</i> L. методом тонкослойной хроматографии	142
3.3.4. ДНК-штрихкодирование растений рода <i>Prunella</i> L. молекулярно-генетическим методом	148
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	149
ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ВИДОВ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS, <i>VACCINIUM</i> L. И <i>PRUNELLA</i> L.	151
4.1. Фенольные соединения побегов и листьев видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	151
4.2. Фенольные соединения побегов и листьев видов рода <i>Vaccinium</i> L.	155
4.3. Фенольные соединения травы видов рода <i>Prunella</i> L.	173
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4	180
ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ВИДОВ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS., <i>VACCINIUM</i> L. И <i>PRUNELLA</i> L.	182
5.1.1. Полисахаридный комплекс листьев видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	182
5.1.2. Белковый и аминокислотный состав листьев видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	184
5.1.3. Элементный состав листьев видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	185
5.2.1. Полисахаридный комплекс сырья видов рода <i>Vaccinium</i> L.	187
5.2.2. Белковый и аминокислотный состав побегов и листьев видов рода <i>Vaccinium</i> L.	191
5.2.3. Элементный состав побегов и листьев видов рода <i>Vaccinium</i> L.	193
5.3.1. Полисахаридный комплекс травы видов рода <i>Prunella</i> L.	193

5.3.2.	Белковый и аминокислотный состав травы видов рода <i>Prunella</i> L.	198
5.3.3.	Элементный состав травы видов рода <i>Prunella</i> L.	199
	ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	200
	ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛЯ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДА <i>ARCTOSPHYLOS</i> ADANS., <i>VACCINIUM</i> L. И <i>PRUNELLA</i> L.	202
6.1.	Выбор стандартного образца	202
6.2.	Стандартизация сырья видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	203
6.2.1.	Толокнянки листья	203
6.3.	Стандартизация сырья видов рода <i>Vaccinium</i> L.	216
6.3.1.	Брусники обыкновенной листья	216
6.3.2.	Черники листья	225
6.3.3.	Голубики обыкновенной листья	239
6.3.4.	Клюквы болотной побеги	249
6.4.	Стандартизация сырья видов рода <i>Prunella</i> L.	258
6.4.1.	Черноголовки трава	258
	ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6	276
	ГЛАВА 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЖИМОВ СУШКИ, НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И СРОКОВ ХРАНЕНИЯ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS., <i>VACCINIUM</i> L. И <i>PRUNELLA</i> L.	278
7.1.1.	Определение режимов сушки сырья видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	278
7.1.2.	Определение некоторых показателей качества сырья видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	279
7.1.3.	Определение сроков годности сырья видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	281
7.2.1.	Определение режимов сушки сырья видов рода <i>Vaccinium</i> L.	283
7.2.2.	Определение некоторых показателей качества сырья видов рода <i>Vaccinium</i> L.	283
7.2.3.	Определение сроков годности сырья видов рода <i>Vaccinium</i> L.	289
7.3.1.	Определение режимов сушки сырья видов рода <i>Prunella</i> L.	292
7.3.2.	Определение некоторых показателей качества сырья видов рода <i>Prunella</i> L.	292
7.3.3.	Определение сроков годности сырья видов рода <i>Prunella</i> L.	295
	ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 7	297
	ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS., <i>VACCINIUM</i> L., <i>PRUNELLA</i> L.	298
8.1.	Фармакологические исследования сырья видов рода <i>Arctostaphylos</i> Adans.	298
8.1.1.	Оценка острой токсичности	298
8.1.2.	Оценка антиоксидантной активности	298
8.1.3.	Оценка диуретической активности	300

8.1.4.	Оценка нейропротекторной активности	301
8.1.5.	Оценка антитирозиновой активности	303
8.1.6.	Оценка актопротекторной активности	303
8.2.	Фармакологические исследования сырья видов рода <i>Vaccinium</i> L.	304
8.2.1.1.	Оценка острой токсичности <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	304
8.2.1.2.	Оценка антиоксидантной активности <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	304
8.2.1.3.	Оценка диуретической активности <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	306
8.2.1.4.	Оценка нейропротекторной активности <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	306
8.2.1.5.	Оценка антитирозиновой активности <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	308
8.2.1.6.	Оценка актопротекторной активности <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	308
8.2.2.1.	Оценка острой токсичности <i>Vaccinium myrtillus</i> L. и <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	309
8.2.2.2.	Оценка антиоксидантной активности <i>Vaccinium myrtillus</i> L. и <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	309
8.2.2.3.	Оценка диуретической активности <i>Vaccinium myrtillus</i> L. и <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	311
8.2.2.4.	Оценка нейропротекторной активности <i>Vaccinium myrtillus</i> L. и <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	312
8.2.2.5.	Оценка антитирозиновой активности <i>Vaccinium myrtillus</i> L. и <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	314
8.2.2.6.	Оценка актопротекторной активности <i>Vaccinium myrtillus</i> L. и <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	314
8.2.3.1.	Оценка острой токсичности <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	315
8.2.3.2.	Оценка антиоксидантной активности <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	315
8.2.3.3.	Оценка диуретической активности <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	317
8.2.3.4.	Оценка нейропротекторной активности <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	317
8.2.3.5.	Оценка антитирозиновой активности <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	319
8.2.3.6.	Оценка актопротекторной активности <i>Vaccinium uliginosum</i> L.	319
8.2.4.1.	Оценка острой токсичности <i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	320
8.2.4.2.	Оценка антиоксидантной активности <i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	320
8.2.4.3.	Оценка диуретической активности <i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	322
8.2.4.4.	Оценка нейропротекторной активности <i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	322
8.2.4.5.	Оценка антитирозиновой активности <i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	324
8.2.4.6.	Оценка актопротекторной активности <i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	324
8.3.	Фармакологические исследования сырья видов рода <i>Prunella</i> L.	325
8.3.1.	Оценка острой токсичности	325
8.3.2.	Оценка антиоксидантной активности	325

8.3.3.	Оценка диуретической активности	327
8.3.4.	Оценка нейропротекторной активности	328
8.3.5.	Оценка антитирозиновой активности	331
8.3.6.	Оценка актопротекторной активности	331
	ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 8	333
	ГЛАВА 9. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ЛРС, СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДОВ <i>ARCTOSTAPHYLOS</i> ADANS., <i>VACCINIUM</i> L., <i>PRUNELLA</i> L.	334
	ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 9	336
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	338
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	339
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	344
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1	385
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2	389
	ПРИЛОЖЕНИЕ 3	399
	ПРИЛОЖЕНИЕ 4	473
	ПРИЛОЖЕНИЕ 5	480
	ПРИЛОЖЕНИЕ 6	525
	ПРИЛОЖЕНИЕ 7	556
	ПРИЛОЖЕНИЕ 8	570

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Важнейшей задачей современной фармацевтической отрасли является разработка и внедрение отечественных аналогов лекарственных растительных препаратов (ЛРП), а также поиск эффективных путей использования лекарственных растений (ЛР) и растительного сырья (ЛРС) в соответствии с принципами научной медицины. В связи с этим существуют реальные возможности успешного развития стратегии фармацевтической отрасли в Российской Федерации до 2030 года благодаря значительному прогрессу в области изучения химического состава лекарственных растений и их фармакологических свойств (Куркин В.А. и др., 2018). В этой связи является актуальным внедрение в отечественную медицинскую практику новых видов ЛРС и продуктов их переработки, при этом расширение ассортимента фитопрепаратов требует совершенствования системы стандартизации и контроля их качества (Бубенчикова В.Н. и др., 2016).

В плане решения современных проблем фармакогнозии особое методологическое значение приобретает понятие – ведущая группа биологически активных соединений (БАС). Благодаря ей сохраняется классическая фармакогнозия при наличии в растительном сырье нескольких химических групп БАС, обладающих разнообразной биологической активностью. При этом успешно решаются аналитические и технологические задачи, объясняются все особенности фармакотерапевтического действия фитопрепарата, а также прогнозируются эффекты, ранее неизвестные данному растению (Куркин В.А. и др., 2023).

В течение последних 15-20 лет фармакогнозия получила новые научные данные в области изучения химического состава лекарственных растений. Прогресс в этой сфере обусловлен использованием современных спектральных и физико-химических методов исследования. Применение спектроскопии ^1H - и ^{13}C -ЯМР, масс-спектрометрии позволило ученым изучить структуру различных биологически активных веществ. Внедрение методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) расширило возможности для стандартизации лекарственных растений и фитопрепаратов, что нашло отражение в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (Куркин В.А., 2019).

При большом перечне инструментальных методов еще одной из возникающих проблем является выбор правильных подходов к стандартизации ЛРС. Возможным решением является комбинация физических, физико-химических, химических и биологических методов анализа (цифровая микроскопия, ультрафиолетовая спектрофотометрия, ТСХ, ВЭЖХ, газовая хроматография (ГХ), инфракрасная спектрометрия (ИК-спектрометрия), ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) и масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез (КЭ), генетические исследования и другие. При использовании всех современных инструментальных методов

необходимо научно обосновывать выбор одного из них и предлагать его в качестве метода и методики стандартизации ЛРС (Куркин В.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П., 2016).

В настоящее время наряду с существующими методами фармакогностического анализа целесообразным представляется совместное применение молекулярно-генетических методов. Это объясняется тем, что примеси и заменители ЛРС зачастую трудно отличить от аутентичного материала по химическому составу, а использование морфолого-анатомических признаков для определения видовой принадлежности растений обычно затруднительно или вообще невозможно, когда приходится иметь дело с тонко измельченными порошками, а именно в таком виде поступают на фармацевтический рынок многие виды лекарственного сырья (Жохова Е.В. и др., 2018).

Также одним из недостатков определения подлинности ЛРС микроскопическим методом (световая микроскопия) нередко является вариабельность анатомо-диагностических признаков ЛРС в зависимости от различных факторов: размера частиц, способа измельчения, специфической обработки сырья (сырье традиционной китайской медицины), использования вспомогательных веществ в лекарственных растительных препаратах (Бобкова Н.В., 2021).

Следует также отметить: в литературных источниках появились сведения, что для большинства видов внутри рода наблюдается межвидовая гибридизация, которая при несущественных изменениях во внешних признаках ведет к значительным трансформациям в их биосинтезе и, как следствие, химическом профиле и фармакологическом действии (Horn K., 2006).

В описанных случаях наличие или отсутствие контаминации в аналитическом образце, возможно, установить с помощью ДНК-баркодинга (ДНК-штрихкодирования). Это объясняется тем, что данный метод является одним из самых современных и эффективных при определении подлинности ЛРС (Повыдыш М.Н. и др., 2007; Simmler C. et al., 2017).

В связи с развитием аналитической приборной базы в настоящее время наблюдается тенденция к разработке, совершенствованию, унификации и валидации новых и уже существующих методик контроля качества сырьевых источников растительного происхождения. На примере Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания по сравнению с ГФ СССР 11 издания прослеживается увеличение количества фармакопейных статей на ЛРС с 82 до 107, а также заметное улучшение их методического наполнения, то есть качества представленных методик. Также прослеживается тенденция к использованию методологического подхода, заключающегося в оценке качества ЛРС и ЛРП, как правило, не по одной, а по нескольким группам БАС (Рязанова Т.К. и др., 2022).

В ГФ РФ XIV издания для определения подлинности ЛРС активно используются хроматографические методы, а также различные методы макро- и микроскопии. При

определении качества сырья в разделе «Испытания» введен сепарационный метод анализа – ВЭЖХ, который позволяет определить доминирующий компонент. Современные высокоселективные аналитические приборы позволяют ученым установить химический профиль лекарственных растений, обосновать новые подходы к стандартизации ЛРС и фитопрепаратов, содержащих разные классы веществ, предложить новые современные методики анализа давно изученных объектов. Точное определение БАС растительных объектов позволяет адекватно выбирать методику стандартизации, основное по содержанию соединение как вещество для определения подлинности вида и зачастую рода. Полные данные о химическом составе ЛРС позволят прогнозировать фармакологическую активность ЛРП и впоследствии учитывать это при разработке технологии возможной лекарственной формы. Речь идет о разных этапах - начиная от глубокого фитохимического анализа и завершая конечным продуктом – лекарственным препаратом.

Неотъемлемыми компонентами растений являются фенольные соединения, полисахариды, белки и т.д. Так, из 107 ФС – 39 (36,4 %) включают стандартизацию по содержанию флавоноидов, 9 (8,4 %) – по содержанию дубильных веществ, 6 (5,6 %) – по содержанию антраценпроизводных, 4 (3,7 %) – по содержанию лигнанов, 3 по – содержанию фенологликозидов, 3 (2,8 %) – по содержанию фенолокислот, 2 (2,8 %) – по содержанию фенилпропаноидов, 1 (1,4 %) – по содержанию кумаринов. Всего по фенольным соединениям 67 статей из 107, что в процентной соотношении составляет 62,6 % (Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания, 2018). Видно, что значительный удельный вес видов ЛРС анализируется по содержанию фенольных соединений, среди которых основную часть составляют флавоноиды (Куркин В.А., 2023).

В настоящее время особую значимость приобретают лекарственные средства растительного происхождения, применяемые для профилактики и лечения различных заболеваний. В этом отношении особый интерес представляют вторичные метаболиты лекарственных растений, которые в силу большого структурного разнообразия обладают широким спектром биологической активности (Куркин В.А., 2018).

Ряд научных статей показывает, что выделение из растительного объекта одного класса БАВ и очистка от других ведет к снижению фармакологического эффекта. Также при разработке лекарственных форм ученые учитывают химический состав и физико-химические параметры индивидуальных соединений. Полисахариды не только имеют выраженные фармакологические свойства, но и способны адсорбировать на себе другие вещества, влиять на их растворимость и, как следствие, на биодоступность конечного продукта (Au T.K. et al., 2001).

Исходя из вышеизложенного, актуальным является научное обоснование методологического подхода исследования лекарственных растений (толокнянка обыкновенная,

толокнянка кавказская, брусника обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская, голубика высокорослая, клюква болотная, черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная), общими для которых является наличие фенольных соединений с использованием современных методов анализа, применяемых в фармации, в том числе в современной фармакогнозии, а также разработка алгоритма исследования на примере видов трех родов, произрастающих на территории РФ, в том числе на Северном Кавказе, таких как *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Степень разработанности темы исследования. Исследования Рязановой Т.К. были сфокусированы на создании единой концепции, которая включает принципы выбора метода и системного подхода к анализу лекарственных растений и продуктов их переработки (ЛРС и ЛРП). Основной целью исследований являлась разработка технологии получения фармакопейных стандартных образцов для оценки качества ЛРС и ЛРП. Важным аспектом являлась также подготовка нормативной документации по качеству ЛРС и ЛРП, учитывались современные данные о химическом составе, методологических подходах к анализу изучаемых растений и продуктов их переработки. Обеспечение соблюдения принципов системного подхода и соответствие нормативным документам по качеству фармакопейных стандартных образцов - одна из основных задач исследований (Куркин В.А., Рязанова Т.К.). Рязанова Т.К. для определения арбутина в ЛРС и ЛРП предлагала метод ВЭЖХ.

Учеными ведутся исследования по изучению растений семейства Вересковые флоры Сибири, Дальнего Востока (Белоусов М.В., 2004), Европейской части России (Фурса Н.С., Таланов А.А., 2010). Так, Белоусов М.В. (2004) установил химический состав и фармакологическую активность для некоторых растений семейства Вересковые флоры Сибири, а Таланов А.А. для голубики болотной флоры Европейской части страны, однако значительное количество видов флоры Кавказа до сих пор является малоизученными.

Изучение морфологических, биологических особенностей и изменчивости некоторых видов рода черноголовки в зависимости от экологических условий произрастания на среднем и южном Урале является актуальной задачей (Болотник Е.В., 2018) и в Сибири (Дмитрук С.И., 1989). Виды рода, произрастающие на Кавказе, ранее не изучались.

Исходя из вышеизложенного, прослеживается фрагментарный и зачастую разрозненный характер химических и фармакологических исследований. Кроме того, химический состав охваченных в нашем исследовании объектов значимо отличался в работах разных исследователей, вследствие чего выявленный одними исследователями вид фармакологической активности не подтверждался в других работах.

Стоит отметить, что исследуемые объекты имеют единую химическую общность (фенольные соединения) и виды фармакологического действия.

Уделяя внимания химическому составу, авторы только в редких случаях обращали внимания на показатели, характеризующие подлинность и качество сырья исследуемых объектов.

Актуальным является разработка методологического подхода к стандартизации фармакопейных и нефармакопейных видов ЛРС (на примере видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.), содержащего преимущественно фенольные соединения (флавоноиды, фенилпропаноиды, простые фенолы), с последовательным применением современных инструментальных возможностей, а также обосновать объективные показатели качества лекарственного сырья, содержащих данную группу БАС.

Цель исследования – экспериментально-теоретическое обоснование методологических подходов к стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения, на примере некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. и выявление перспектив использования их в фармации.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Провести анализ научной литературы по химическому составу и фармакологической активности растений родов *Arctostaphylos* Adans. (толокнянка обыкновенная и толокнянка кавказская), *Vaccinium* L. (брусника обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская, голубика обыкновенная и клюква болотная) и *Prunella* L. (черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая и черноголовка разрезная).

2. Научно обосновать целесообразность использования современных методов определения подлинности для исследуемых видов ЛРС (люминесцентная микроскопия, тонкослойная хроматография (ТСХ) и ДНК-штрихкодирование), установить их диагностические признаки на примере сырья некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

3. Исследовать фенольные соединения видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. с использованием современных физико-химических методов анализа. Определить ведущую группу БАС и ее доминирующий компонент.

4. Определить количественное содержание полисахаридных фракций (водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества) и их мономерный состав для видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.. Для выделенных полисахаридов установить физико-химические константы (среднюю молекулярную массу, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения и для ПВ сорбционная способность).

5. Установить содержание белкового, аминокислотного и элементного состава в сырье родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

6. Научно обосновать на примере некоторых образцов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. возможность использования метода капиллярного электрофореза для анализа сырья, содержащего арбутин, хлорогеновую и розмариновую кислоту, а также флавоноида – гиперозида. Разработать и валидировать для каждого ЛРС методики количественного определения основных групп БАС с учетом исследуемых современных подходов в аналитической химии. Разработать методики анализа определения ведущей группы БАС по суммарному содержанию и с помощью сепарационного метода доминирующий компонент.

7. Установить показатели качества для внесения в ФС и проекты ФС в раздел «Испытания» для образцов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., а также определить оптимальные режимы сушки и сроки годности на предлагаемые виды ЛРС.

8. В соответствии с современными требованиями разработать проекты ФС для внесения в ГФ РФ XIV издания (толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья) и предложить проекты на новые виды сырья родов *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

9. Исследовать виды фармакологической активности извлечений, полученных из сырья родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

10. Разработать методологический подход и предложить алгоритм изучения растений, содержащих в качестве ведущей группы БАС – фенольные соединения. Научно обосновать критерии подлинности и качества ЛРС с использованием современных методов анализа.

Научная новизна. Впервые с использованием разных видов микроскопического анализа (стерео-, люминесцентная микроскопия, микроскопия в проходящем свете) определены показатели подлинности ЛРС, заключающиеся в комплексе диагностических признаков: для родов *Arctostaphylos* Adans., и *Vaccinium* L. *Prunella* L. по наличию и характеру люминисценции на листовой пластинке трихом, млечников, сети жилок, черешка и кутикулы, а также анатомо-диагностических признаков дополнительно черешка листа для всех исследуемых видов ЛРС, для клюквы болотной – побегов и плодов и для видов черноголовки – стеблей, цветков и семян.

Впервые для исследуемых видов предложен метод ТСХ для внесения в раздел ГФ РФ на ЛРС «Определение основных групп биологически активных веществ», предусматривающий в качестве СО диагностическое, доминирующее соединение. Впервые для исследуемых видов предложен метод секвенирования генома как альтернативный и объективный метод, с помощью которого были выявлены внутривидовые участки ДНК.

Впервые для исследуемых видов предложена схема выделения фенольных соединений и полисахаридного комплекса (водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ) с детальным установлением их компонентного состава. Впервые изучен белковый (в том числе

аминокислотный) и элементный состав. Для всех образцов, заготовленных во флоре Северного Кавказа, фитохимический анализ проведен впервые.

Из листьев брусники обыкновенной выделены 27 соединений, 3 из которых являются новыми – 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (вакцинизид А), кверцетин-3-О-{2"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид В) и кверцетин-3-О-{2"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид. Из побегов данного растения выделено 17 соединений, 3 из которых являются новыми: катехин-О-гликозидами, (-)-эпикатехин-3-О-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид D), (+)-катехин-3-О-{4"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид E) и (+)-катехин-3-О-(2",4"-ди-О-галлоил)-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид F). Впервые из травы черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной, заготовленной во флоре Северного Кавказа, было выделено 18 соединений, 1 из которых является новым - кверцетин-3-О-(4"-ксилозил-6"-рамнозил)-глюкозид.

Впервые для полисахаридного комплекса (ВРПС и ПВ), выделенного из исследуемых объектов, определены физико-химические константы (средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность, сорбционная способность).

Впервые для всех исследуемых видов ЛРС были разработаны, валидированы и предложены методики количественного определения суммы фенологликозидов, фенолокислот и флавоноидов (УФ- спектроскопия) и основного по содержанию компонента в сумме (метод КЭ).

Впервые определены для исследуемых видов ЛРС (за исключением толокнянки обыкновенной листьев, брусники обыкновенной листьев) режимы сушки, показатели качества сырья и сроки годности.

Впервые для внесения в ФС ГФ РФ XIV издания на толокнянку обыкновенной листья и брусники обыкновенной листья предложена спектрофотометрическая методика (взамен титриметрического метода) определения арбутина. Впервые разработаны проекты ФС на сырье «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки трава».

Впервые проведен первичный скрининг извлечений полученных из исследуемых видов ЛРС с использованием различных экстрагентов, таких как вода очищенная, спирт этиловый 40%, спирт этиловый 70% и спирт этиловый 96%. Впервые в результате фармакологических исследований был сделан вывод, что извлечения из вышеперечисленных образцов обладают поливалентным профилем активности, зависящим, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

Научная новизна исследования подтверждена патентом РФ на изобретение № 2794752 (от 24.04.2023) «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Теоретическая и практическая значимость. Проведенные исследования некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. перспективны для дальнейшего внедрения в медицинскую практику в качестве ЛРС источников, содержащих в качестве ведущей группы БАС - фенольные соединения. Данные исследования будут способствовать увеличению сырьевой базы за счет близкородственных видов растений, а также расширению номенклатуры эффективных отечественных лекарственных препаратов.

Получены новые сведения по химическому составу исследуемых объектов. В результате проведенных исследований разработано 6 проектов ФС: «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья», «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки травы», предоставленные в компанию «Марьин Луг» ИП Повышева.

Внедрение в практику. В ходе исследования были разработаны методики определения подлинности и качества ЛРС, а также обоснованы предельные значения показателей качества для изучаемых объектов «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья». Данные результаты вошли в проекты ФС, которые внесены в ГФ РФ XIV издания. Также установлены нормы показателей качества, которые вошли в проекты ФС на «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки травы» (компании «Марьин Луг» ИП Повышева). На все вышеперечисленные виды ЛРС разработаны инструкции по сбору и сушки, которые утверждены в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН).

Результаты диссертационного исследования находят применение в учебной работе, используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», а также для входного контроля качества ЛРС на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО».

Методология и методы исследования. Основой данного исследования является поиск, анализ и систематизация литературных данных, связанных с исследованием растений родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., содержащих фенольные соединения в качестве ведущей группы БАС; изученность химического состава; фармакологических видов активности; подходов к методам стандартизации; разработки нормативной документации. На основе полученных данных обобщены и представлены выводы, которые определяют теоретическое и практическое значение данного диссертационного исследования.

При выполнении комплексных фармакогностических исследований использовались хроматографические (ВЭЖХ, ТСХ, колоночная хроматография (КХ), бумажная хроматография (БХ) и ионообменная хроматография), физико-химические (оптическая микроскопия, спектрофотометрия, КЭ, ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия, вискозиметрия, кондуктометрия, атомно-эмиссионная спектрометрия, титрование), генетические (ДНК-штрихкодирование), фармакологические и статистические методы анализа.

Установленные морфолого-анатомические признаки с применением стерео- и люминесцентной микроскопии, а также ДНК-штрихкодирование позволят безошибочно определять видовую принадлежность ЛРС как в цельном и измельченном, так и порошкованном сырье.

Выявленные фармакологические свойства (включая антиоксидантную, нейропротекторную, диуретическую, актопротекторную и антигиперлипидемическую активность) для экстрактов, полученных из исследуемых видов лекарственных растений, являются основой для дальнейших более глубоких биологических исследований.

Разработанный методологический подход, представленный в виде алгоритма исследования фармакопейных и нефармакопейных растений, содержащих в качестве основных групп БАС преимущественно фенольные соединения, будут рассматриваться для изучения перспективных для фармации растений, содержащих не только фенольные соединения, с последующей стандартизацией их сырья при внедрении в фармацевтическую практику.

Разработка методологии исследования базировалась на поиске и анализе литературных данных, степени изученности, актуальности темы, формулировании цели и задач исследования и состоял из следующих этапов: I этап – определение мест естественного произрастания производящего растения, сбор его сырья, внесение гербарного образца (подписанный флористом с присвоенным ваучерным номером) в электронную базу; II этап - установление показателей подлинности ЛРС в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ (показатели подлинности по внешним и микроскопическим признакам с использованием стерео- и люминесцентной микроскопии; для растений, имеющих близкородственные виды или способных образовывать гибридные формы, используется ДНК-штрихкодирование; метод ТСХ используется для определения подлинности по характеру, наличию пятен и значению R_f на хроматографической пластинке); III этап – определение времени сбора ЛРС и обоснование способа и режимов сушки; IV этап – установление химического состава фармакопейных и нефармакопейных растений с обоснованным и последовательным использованием современных инструментальных методов анализа; V этап – разработка методик качественного и количественного содержания БАС с последующим мониторингом фармакологической активности для сырья содержащего фенольные соединения; VI – выделение и установление

структуры соединений, ранее не описанных в литературе, при помощи колоночной хроматографии с использованием методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии (при необходимости подвергают стандартизации и рекомендуют в качестве стандартных фармакопейных образцов с последующим мониторингом фармакологической активности); VII этап – установление показателей качества ЛРС (влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание экстрактивных веществ, срок годности, условия сушки и заготовки) с использованием современных инструментальных методов анализа для внесения в проект ФС; VIII этап – определение количественного содержания биополимеров - полисахаридов и белков как основных компонентов экстракционных лекарственных форм с последующим анализом их компонентного состава и установлением физико-химических констант; IX этап – определение качественного и количественного состава других классов БАС с использованием методов ТСХ, ГХ, ВЭЖХ, СФ и КЭ. При обнаружении новых соединений, ранее не описанных в литературе, выделяют их методом КХ и устанавливают структуру с использованием методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии (при целесообразности подвергают стандартизации и рекомендуют в качестве стандартных фармакопейных образцов с последующим исследованием фармакологической активности).

Положения, выдвигаемые на защиту:

- Результаты исследования и установления морфолого-анатомических признаков ЛРС с помощью стерео-, люминесцентной микроскопии и микроскопии в проходящем свете.
- Результаты подобранных условий методом ТСХ для определения основных групп БАВ по доминирующему компоненту.
- Результаты фитохимического исследования изучаемых объектов (фенольный и полисахаридный комплекс, содержание белка и его аминокислотного состава, а также элементного состава).
- Результаты исследования физико-химических констант полисахаридов (ВРПС и ПВ), включая среднюю молекулярную массу, поверхностную активность, изоэлектрическую точку, коэффициент распределения и сорбционную способность, были получены для всех объектов, изучаемых в данном исследовании.
- Методики определения качественного и количественного содержания основных классов БАС с целью определения качества ЛРС и внесения в ФС ГФ РФ или в проект ФС.
- Результаты изучения режимов сушки и сроков годности ЛРС.
- Разработанные проекты ФС и инструкции по сбору и сушке на ЛРС видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. .

➤ Результаты проведенного первичного фармакологического скрининга извлечений, полученных из всех исследуемых объектов.

Степень достоверности. Полученные результаты в ходе экспериментальной работы, сформулированные выводы и практические рекомендации базируются на достаточном объеме выполненных исследований, реализованных на оборудовании, которое имеет соответствующие сертификаты и свидетельства о поверке. Достоверность результатов подтверждена соответствующими графиками, таблицами и рисунками. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны, согласно требованиям действующей нормативной документации с использованием программы «MicrosoftExcel 2016». Проанализирован значительный объем литературных источников как отечественных, так и на иностранных языках, а также ФС из ГФ РФ и других стран.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Фармакогностическое и ботаническое изучение лекарственных растений», посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, доктора фармацевтических наук, профессора Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2015 г); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития» (г. Курск, 2016 г); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, доктора фармацевтических наук, профессора Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2017 г); Международной научной конференции «90 лет – От растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 2021 г); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ история, современность, перспективы», посвященной 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (г. Самара, 2021 г); международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора фармацевтических наук Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2022 г); 8-й международной научно-методической конференции «Фармообразование 2022» «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (г. Воронеж, 2022 г); международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее», посвященной 87-летию Курского государственного медицинского университета (г. Курск, 2022 г); VIII международной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (г. Пенза, 2022); международной научно-практической конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора фармацевтических

наук Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2023 г); научно-практической конференции «Гаммермановские чтения» (г. Пермь, 2023); международной научно-практической конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора фармацевтических наук Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2024 г).

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск).

Публикации. Результаты, полученные в ходе экспериментальной работы и вошедшие в диссертацию, отражены в 21 опубликованной печатной работе, в том числе 21 статье - в журналах из списка ВАК, 8 статей в базе данных Scopus; в том числе 12 статей в журналах, которые включены в международные базы данных (МБД). Получен 1 патент на изобретение: «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Личный вклад автора. Автором выбрано научное направление, проведены экспериментальные исследования, а также обобщены и аргументированы полученные данные. Результаты исследований были опубликованы, и автор сыграл главную роль в подготовке и написании научных работ с соавторами. Более того, автор успешно внедрил результаты своей диссертационной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствует шифру специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты, полученные в ходе выполнения экспериментальной работы, соответствуют области специальности, пунктам 2, 3 и 6 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает 9 глав, изложенных на 384 страницах печатного текста, проиллюстрировано 109 рисунками, содержит 167 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», 7 глав собственных исследований, заключения, общих выводов, списка литературы, представленного 458 источниками, в том числе 299 на иностранном языке; приложение изложено на 208 страницах печатного текста, проиллюстрировано 184 рисунками, содержит 37 таблиц.

Введение включает в себя актуальность выбранной темы диссертационной работы, определение цели и формулировку задач исследования, отражение научной новизны и практической значимости исследования, а также обозначение основных положений, которые будут выдвинуты на защиту. Введение также включает описание методологии и методов исследования, информацию о публикациях и апробации работы.

Глава 1 – Обзор литературы сформирован на основе данных отечественных и зарубежных авторов, в которой отражено современное состояние изученности представителей родов *Arctostaphylos* Adans. (толокнянка обыкновенная, толокнянка кавказская), *Vaccinium* L. (брусника обыкновенная, голубика обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская, клюква болотная) и *Prunella* L. (черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная), в которой описана ботанико-таксономическая характеристика видов представленных родов, их химический состав, методы анализа БАС и фармакологическая активность.

Глава 2 содержит информацию об объектах исследования и использованных методах исследования.

В **главе 3** представлены исследования по установлению показателей подлинности макро- и микроскопическими методами анализа с использованием стерео- и люминесцентной микроскопии, а также представлены данные, полученные в результате ДНК-штрихкодирования исследуемых образцов. Для раздела «Определение основных групп биологически активных веществ» разработаны методики на основе ТСХ по основному содержанию в смеси фенольных соединений компоненту.

Глава 4 содержит результаты фитохимического исследования ЛРС, в которой отражен компонентный состав основной группы БАС – фенольные соединения.

В **главе 5** результаты исследования биополимеров (полисахариды и белки), как естественных БАС экстракционных лекарственных форм, а также сведения об их компонентном составе, физико-химических константах (полисахаридов), которые имеют значения при разработке лекарственной формы. Представлены сведения о качественном и количественном содержании минерального состава ЛРС.

В **главе 6** изложены методы количественного анализа по сумме веществ (фенологликозиды, флавоноиды и фенилпропаноиды) и основному по содержанию компоненту методом КЭ (полученные результаты подтверждены методом ВЭЖХ). Для разработанных методик были определены валидационные параметры, рекомендуемые ГФ РФ XIV издания.

Глава 7 включает в себя установленные для каждого вида ЛРС обязательные нормы качества для внесения в проект ФС, сроки годности и режимы консервации (сушки) анализируемых образцов.

В **главе 8** представлены фармакологические исследования извлечений, полученных из сырья видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Глава 9 содержит методологию в виде алгоритма с кратким описанием этапов анализа лекарственных растений и их сырья, содержащих преимущественно фенольные соединения.

Диссертация завершается заключением и списком литературы.

В приложениях представлены ареалы произрастания и описание производящих растений, фотографии гербарных образцов и ЛРС, микрофотографии исследуемых объектов, ВЭЖХ хроматограммы, электрофореграммы, графические диаграммы, таблицы с расчетами, спектральные характеристики ЯМР-, ^1H - и ^{13}C - выделенных соединений. В приложении 8 представлены акт внедрения на проекты ФС (компания «Марьин Луг» ИП Повышева), инструкции по сбору и сушке ЛРС (утвержденные в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН), акты о внедрении результатов научной и инновационной деятельности в ФГБОУ «Воронежский государственный университет» и на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО». Подтверждение от ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России о соавторстве в разработке Фармакопейных статей ФС.2.5.0063.18 «Брусники обыкновенной листья» и ФС.02.5.0099.18 «Толокнянки обыкновенной листья».

Список сокращений

Ala – аланин

Ara – арабиноза

Arg – аргинин

Asp – аспарагиновая кислота

BAD – проапоптотический белок семейства Bcl-2 участвующий в инициации апоптоза

EtAc – этилацетат

EtOH – спирт этиловый

Fuc – фукоза

Gal – галактоза

GalA – галактуроновая кислота

Glc – глюкоза

GlcA – глюкуроновая кислота

Glu – глутаминовая кислота

GLUT-4 – кардиальный инсулинзависимый белок-переносчик глюкозы

Gly – Глицин

HepG2 – линия клеток гепатомы человека

His – гистидин

HR-ESI-MS – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением высокого разрешения

HMBC – гетероядерная многосвязная корреляционная (в двухмерной ЯМР спектроскопии)

Ile – изолейцин

ITS1 – транскрибируемый спейсер

Leu – лейцин

Lys– лизин

Man – манноза

MCI GEL CHP20P – высокопористая стирол-дивинилбензольная полимерная смола

MeOH – спирт метиловый

Met – метионин

(n=3); (n=6) – число повторов эксперимента, соответственно 3; 6

p53 – белок-супрессор опухоли

Phe – фенилаланин

Pro – пролин

R_f – хроматографическая подвижность

Rha – рамноза

Rho-ГТФазы – семейство клеточных сигнальных белков, «малых» G-белков

SD – Standard deviation (disambiguation) стандартное, статистическое отклонение
Sac – сахароза
Ser – серин
Tyr – тирозин
Thr – треонин
Val – валин
Xyl – ксилоза
АОА – антиоксидантная активность
БАВ – биологически активные вещества
БАС – биологически активное соединение
БО – брусника обыкновенная
БХ – бумажная хроматограмма
в.с.с. – воздушно-сухое сырье
ВРПС – водорастворимый полисахарид
ПВ – пектиновые вещества
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором
ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором
ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с фотодиодно-матричным детектором, с ионизацией электрораспылением и масс- детектором
ГБ – голубика обыкновенная
ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
ГЖХ – газожидкостная хроматография
ГСО – государственный стандартный образец
ГХ/МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия
Д – детектор
КБ – клюква болотная
КБР – Кабардино-Балкарская Республика
кВ – киловольт
КР – качественная реакция
КХ – колоночная хроматография
КЧР – Карачаево-Черкесская Республика
КЭ – капиллярный электрофорез
ЛУК – ледяная уксусная кислота

ЛПВП – липопроотеиды высокой плотности
ЛПНП – липопроотеиды низкой плотности
ЛР – лекарственное растение
ЛРС – лекарственное растительное сырье
м.м. – молекулярная масса
мМ – миллимолярный раствор
НД – нормативный документ
НСООН – муравьиная кислота
н.п. – нуклеотидная позиция
НФ – неподвижная фаза
окр. – окрестности
ПВ – пектиновые вещества
ПС – полисахарид
ПФ – подвижная фаза
РСО – рабочий стандартный образец
СОВС – стандартный образец вещества-свидетеля
ТК – толокнянка кавказская
ТО – толокнянка обыкновенная
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТТТ – тысяч теоретических тарелок;
ТФУ – трифторуксусная кислота
ФМП – 1-фенил-3-метил-5-пиразолон
ФС – фармацевтическая статья
ЦП – ценопопуляция
ЧерниК – черника кавказская
ЧернО – черника обыкновенная
ЧК – черноголовка крупноцветковая
ЧО – черноголовка обыкновенная
ЧР – черноголовка разрезная
ЭВ – экстрактивные вещества
ЭСА – эмиссионно-спектральный анализ
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
ЯМР ¹H – протонный ядерный магнитный резонанс
ЯМР ¹³C – ядерный магнитный резонанс на ядрах углерода-13

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS., *VACCINIUM* L., *PRUNELLA* L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Краткая характеристика семейства *Ericaceae*

Семейство вересковых включает в себя больше 100 родов и свыше 3000 видов растений. Большинство вересковых – кустарники или кустарнички, иногда травы, в том числе сапрофитные, встречаются и крупные деревья. Среди кустарниковых и кустарничков имеются стелющиеся формы. Некоторые представители этого семейства представляют собой кустарники с длинными цепляющимися побегами. Среди них известны эпифиты. Большая часть эпифитных вересковых может произрастать также на скалах и гребнях гор, где они значительно меняют свой облик. В настоящее время семейство включает 26 подсемейств [167].

1.1.1. Ботанико-таксономическая характеристика рода *Arctostaphylos* Adans.

По данным The Plant List, в мировой флоре встречаются 75 принятых видов рода *Arctostaphylos* и 113 синонимов [435].

Согласно классификации и филогении цветковых растений А.Л. Тахтаджяна род *Arctostaphylos* принадлежит к семейству *Ericaceae*; подсемейству *Arbutoideae*. Подсемейство представлено 5 родами: *Arbutus*, *Comarostaphylos*, *Ornithostaphylos*, *Arctostaphylos* (включая *Xylococcus*) и *Arctous* [381, 384, 408]. Ряд видов, традиционно рассматривавшихся в составе рода *Arctostaphylos*, сейчас выделены в небольшой род *Arctous*: толокнянка альпийская (*Arctostaphylos alpina*) рассматривается как *Arctous alpina* (L.) Nied.; вид *Arctostaphylos rubra* (Rehder & E.H.Wilson) Fernald – как *Arctous rubra* (Rehder & E.H.Wilson) Nakai. [408].

Род *Arctostaphylos* Adans., согласно данным С.К. Черепанова, на территории России разделен на *A. caucasica* Lipsch. и *A. uva-ursi* (L.) Spreng. Толокнянка кавказская – *Arctostaphylos caucasica* Lipsch. – реликтовый, эндемичный вид среднегорий Большого Кавказа. Таксономический статус вида оспаривается: ряд ученых считают его конспецифичным с *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., другие рассматривают в ранге подвида – *Arctostaphylos uva-ursi* Spreng. subsp. *caucasica* Kvaratzchelia (nomen nudum) = *A. uva-ursi* (L.) Spreng. subsp. *caucasica* (Lipsch) A. Schreter, третьи придерживаются мнения валидности вида [123].

Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. – вечнозеленый кустарничек. Молодые побеги зеленые, двулетние побеги желто-бурые, трехлетние – оливковые. Листья очередные, плотные, кожистые, цельные по краю, обратнойцевидные, сужены в короткий черешок, имеют темно-зеленый цвет сверху и светло-зеленый цвет снизу. Цветки кувшинчатые, бледно-розового оттенка. Плод - костянка [128]. На территории нашей страны произрастает в Европейской части России, Восточной и Западной Сибири, а также на Дальнем Востоке (приложение 1, табл. 1).

Arctostaphylos caucasica Lipsch. – вечнозеленый кустарник, произрастающий в горах западного Закавказья и Северного Кавказа. Встречается в сосновых лесах, расположенных в горах и в высокогорных районах, на каменистых и глинистых поверхностях выходов известняков. Листья характеризуются большим размером, широкой формой и заостренной верхушкой. Края листьев немного утолщены, а их обилие на годовичных побегах не такое плотное. Однако приведенные характеристики маловероятно, что являются видовыми, так как они не влияют на генеративные органы и к тому же не достаточно устойчивы (крупнолистные экземпляры толокнянки обнаруживаются как в альпийских регионах, так и на островах Алеутского архипелага.). Этот факт позволяет рассматривать толокнянку кавказскую как разновидность (подвид) обыкновенной толокнянки и использовать ее наравне с типичным видом [123].

1.1.2. Химический состав представителей рода *Arctostaphylos* Adans.

В стеблях и листьях толокнянки обыкновенной учеными были обнаружены такие соединения, как фенологликозиды, флавоноиды (включая антоцианы), фенилпропаноиды, сапонины, лигнаны, иридоиды, танины, полисахариды, тритерпеноиды, эфирное масло и минеральные элементы (табл. 1.1) [33, 86, 381].

Таблица 1.1 – Химический состав различных частей рода *Arctostaphylos* Adans.

<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.		
№ n/n	Класс соединения	Компонентный состав и морфологическая часть растения
1	Фенолы, фенолгликозиды	<i>Листья</i> Гидрохинон [261, 262, 275], арбутин [21, 53, 74, 164, 340], параметоксифенол [249], метиларбутин [394], пикезид (4-ацетилфенил-β-D-глюкопиранозид и пикезида тетраацетат [258]. <i>Листья, побеги, корни</i> 1,2,3,4,6-пента-О-галлоил-β-D-глюкоза, арбутин, 6"-галлоиларбутин, 1,2,3,6-тетра-О-галлоил-β-D-глюкоза – кроме корней, пикетин, пикетин 6"-галлоилпикетин – кроме листьев, галловая кислота, бергенин – только для корней; галлоилгликозидов (1,6-ди-О-галлоилглюкоза, 3,4,6-три-О-галлоилглюкоза, 1,2,3,4,6-пента-О-галлоилглюкоза [271, 303, 304, 306], галлоиларбутин [292].
2	Флавоноиды	<i>Листья, побеги, корни</i> Кверцетин, кверцетин-3-галактозид, кверцетин-3-глюкозид, кверцетин-3-арабинофуранозид, кверцетин-3-рамнозид, кверцетин-3-рутинозид, кверцетин-3-гентиобиозид [78, 86, 339]. <i>Листья</i> Кверцетингаллоилгексозид, кверцетин-3-рамнозид, мирицетин, мирицетин гексозид, мирицетин пентозид, кемпферол, кемпферол гексозид, кемпферол пентозид [187, 339].

3	Антоцианы	<i>Листья</i> Цианидин и дельфинидин [441].
4	Катехины	<i>Листья, побеги, корни</i> (+)-катехин, (-)-эпикатехин, (-)-эпигаллокатехин – кроме корней, (-)-эпикатехингаллат – кроме листьев, (+)-галлокатехингаллат – кроме корней, (-)-эпигаллокатехингаллат – кроме корней, (-)-эпигаллокатехинметилгаллат, (-) – эпигаллокатехиндигаллат – только в побегах [78].
5	Таннины	<i>Листья, побеги, корни</i> Корилагин, хебуловая кислота [78, 86].
6	Фенилпропаноиды	<i>Листья, побеги, корни</i> Кофейная кислота, 5-О-кофеилхинная кислота, 3-О-кофеилхинная кислота, 4-О- кофеилхинная кислота, 1,3-ди-О-кофеилхинная кислота, 3,5-ди-О-кофеилхинная кислота, коричная кислота, 2-гидроксикоричная кислота, 2-метоксикоричная кислота, феруловая кислота, изоферуловая кислота – кроме корней, метилгаллат и галловая кислота [187] – кроме корней <i>Побеги</i> п-гидроксibenзойная, п-кумаровая, кофейная, сиреневая, ванилиновая кислоты [78]. <i>Листья</i> Протокатеховая и эллаговая кислоты, корилагин, метилгаллат [53, 385].
7	Полисахариды	<i>Листья</i> (из 200 г) ВРПСс – 0,708 г; ВРПСч-0,512 г; ПВ – 6,39 г; ГцА - 2.06 г и ГцБ 1,12 г. ВРПСс - арабиноза, глюкоза, маноза, рамноза, галактуроновая кислота; ВРПСч – арабиноза, глюкоза, маноза, рамноза, ксилоза, галактуроновая кислота; ПВ – арабиноза, галактоза, глюкоза, рамноза, ксилоза, галактуроновая кислота; ГцА – арабиноза, галактоза, глюкоза, маноза, рамноза, ксилоза, галактуроновая и глюкуроновая кислоты; ГцБ – арабиноза, галактоза, глюкоза, маноза, рамноза, ксилоза, галактуроновая и глюкуроновая кислоты [76, 77].
8	Иридоиды	<i>Листья</i> Монотропеин [248].
9	Тритерпеноиды	<i>Листья</i> Олеаноловая (488 ± 42 мг/кг), урсоловая (1034 ± 43 мг/кг), маслиновая (11 ± 3мг/кг) и корозоловая кислоты (16 ± 2 мг/кг) [407], эритродиол, ацетат α-амирин, α-амирин, β-амирин, уваол, лупеол [130].
10	Эфирное масло	<i>Листья</i> α-терпинен (7,8%), линалоол (7,3%), гексадекановая кислота (4,5%), (Е)-гераниол ацетон (4,1%), гераниол (3,0%), гексагидрофарнезил ацетон (2,3%), тимол (2,0%), изоментол (1,9%), 6-метил-3,5-гептадиен-2-он (1,8%), додекановая кислота (1,8%), (Е,Е)-2,4-декадиенал (1,7%), риеслинг ацетал (1,4%), борнеол (1,4%), цис-линалоолоксид (фураноид) (1,3%), гераниаль (1,3%), (Е)-β-ионон (1,3%), линолевая кислота (1,2%), α-хумулен (1,2%), тетрадекановая кислота (1,2%), терпинен-4-ол

		(1,0%). В эфирном масле на долю монотерпенов приходится 35,6%, сесквитерпеноидов - 7,4 % [359].
11	Элементный состав	<i>Корни, листья, стебли</i> Mn, Fe, Zn, Cu, Cr, Ni, Pb, Co, Cd. Наиболее высоким содержанием элементов отличаются корни, при этом наблюдается постепенное снижение концентрации в ряду: корни>стебли>листья>плоды [4].

1.1.3. Фармакологическая активность рода *Arctostaphylos* Adans.

НД на толокнянки листья входят в фармакопеи Российской Федерации, Республики Беларусь, Японии, США, Европейскую фармакопею (X издание), Британскую фармакопею, Американскую травяную фармакопею, Немецкую гомеопатическую фармакопею [30, 31, 182, 208, 410]. В ГФ СССР XI издания толокнянки обыкновенной листья стандартизируются по содержанию арбутина - методом йодиметрического титрования [32], в Европейской Фармакопее методов ВЭЖХ [208].

В народной медицине род *Arctostaphylos* Adans. применяется (листья и побеги) как диуретическое и антисептическое средство. Кроме того, толокнянки обыкновенной листья и кавказской обладают антигельминтным, вяжущим, седативным, гемостатическим, тонизирующим действием, а также нормализующим обмен веществ [33, 86].

Извлечения, полученные на основе сырья толокнянки обыкновенной (т. обыкновенной), используются как в классической традиционной, так и в альтернативной медицине. Наиболее известным видом терапевтической активности листьев толокнянки является воздействие на мочеполовую систему, которое, выражается в диуретическом, нефролитическом и антибактериальном действии [49, 50]. Извлечение из т. обыкновенной предотвращало развитие факторов риска нефролитиаза, которое сопровождалось выраженным увеличением диуреза у крыс-самок линии Wistar [221]. При этом извлечения из т. обыкновенной практически не влияют на экскрецию электролитов с мочой [177]. Стоит отметить, что курсовое введение водного извлечения из листьев т. обыкновенной способствовало повышению активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты глутатионового ряда в почках [420].

Применение водного экстракта из листьев т. обыкновенной в качестве адьювантного терапевтического средства уменьшало проявление рецидивирующего бактериального цистита у женщин [276].

В связи с тем, что имеются сведения о канцерогенном действии гидрохинона (агликона арбутина), рекомендованный курс лечения фитопрепаратами толокнянки составляет не более 14 дней [446]. Однако, недавнее исследование фармакобезопасности экстрактов толокнянки, проведенное Park J.B. с коллегами (2018 г.), показало, что извлечения на основе сырья т. обыкновенной не оказывают значимого токсического влияния на организм человека [341].

Высокий уровень токсикологической безопасности экстрактов, полученных из сырья т. обыкновенной, был подтвержден в работе Saeed F. с коллегами (2014 г.). Данное исследование проводилось на кроликах, которые получали водно-спиртовой экстракт из листьев т. обыкновенной в дозе 25 мг/кг в день (в течение 3 месяцев). В итоге было установлено, что у животных, получавших экстракт, значимых отклонений в изменении биохимических, гематологических показателей, функциональной активности сердца, почек и печени, а также липидном профиле по сравнению с контрольной группой не установлено, что предполагает низкую токсичность т. обыкновенной [374].

Эффективность водного извлечения из т. обыкновенной в комбинации с ибупрофеном как альтернативного терапевтического подхода к лечению цистита было подтверждено в серии клинических исследований. Экстракт т. обыкновенной в дозе 105 мг 3 раза в день в сочетании с ибупрофеном к стандартной терапии фосфомицином (3 г в сутки) существенно улучшало клинический статус пациенток с бактериальным циститом. При этом авторами в случае использования альтернативного фитотерапевтического подхода к вспомогательной терапии рекомендуется снижение дозы антибактериального препарата, что делает лечение более безопасным и уменьшает лекарственную нагрузку на пациента [161]. Работа Moore M. и соавторов продемонстрировала, что, несмотря на то, что при изолированном введении экстракт т. обыкновенной не оказывает существенного влияния на течение цистита у женщин, добавление данного извлечения к антибиотикотерапии существенно увеличивало безопасность терапии и позволило в дальнейшем отказаться от антибактериального средства каждой седьмой женщине, принимавшей участие в исследовании [318].

Положительное влияние извлечений из т. обыкновенной на изменение функциональной активности почек многими авторами связывается с высоким содержанием арбутина в сырье и диуретической активностью [398]. Однако не стоит отрицать другие виды фармакологических эффектов, например, прямого антибактериального действия. Экстракты, полученные на основе сырья т. обыкновенной, обладают широким спектром антибактериального действия, включая резистентные штаммы и возбудителей особо опасных инфекций. Так работа, проведенная Cybulska P. с коллегами в 2011 году, показала, что экстракт, полученный из листьев т. обыкновенной, подавлял рост резистентных культур *N. gonorrhoeae* с диапазоном минимальной ингибирующей концентрации 0,25-32 мкг/мл. При этом исследовалась активность в отношении штаммов *N. gonorrhoeae*, устойчивых к большому спектру антибактериальных препаратов: тетрациклину, β -лактамам, антибиотикам, стрептомицину, эритромицину, азитромицину и ципрофлоксацину [195].

Экстракты надземных частей т. обыкновенной обладают антимикробной активностью в отношении грамотрицательных бактерий: *E. coli* и *Proteus vulgaris*. При этом эффект вероятно

связан с наличием фенологликозидов [236]. Водный экстракт листьев т. обыкновенной обладает антимикробной активностью в отношении *Helicobacter pylori*, реализуемой благодаря наличию дубильных веществ [168]. Также извлечения из т. обыкновенной проявляют антибактериальную активность в отношении редких, но достаточно высокопатогенных бактерий. Этанольный экстракт из листьев т. обыкновенной в достаточно низких концентрациях подавлял рост бактериальной культуры *C. violaceum* штамма ATCC 31532 дикого типа [413].

Наличие в сырье т. обыкновенной в качестве превалирующего соединения арбутина может являться основанием для использования экстрактов толокнянки в дерматологической практике в качестве противовоспалительного или депигментирующего средства. Применение экстракта полученного путем экстракции спиртом этиловый 70% из листьев т. обыкновенной в дозе 100 мг/кг (*per os*) уменьшал экссудативную фазу воспалительной реакции. При этом по степени эффективности экстракт т. обыкновенной незначительно уступал действию преднизолона и усиливал его активность при комбинированном применении [271]. Также работа Matsuda H. и коллег (1991 г.) позволила установить противовоспалительную активность извлечения из т. обыкновенной. Так на модели каррагенанового отека и адьювантного артрита применение экстракта т. обыкновенной в дозе 50 мг/кг снижало выраженность воспалительного отека у крыс [302]. По последним данным противовоспалительная активность извлечений на основе сырья т. обыкновенной может быть связана с подавлением внутриклеточной провоспалительной сигнальной трансдукции, опосредованной активацией toll-подобных рецепторов 2 и 4 подтипа. Снижение интенсивности воспалительной реакции на фоне применения экстрактов т. обыкновенной опосредуется уменьшением лейкоцитарной миграции в очаг воспаления и снижением интенсивности реакций Nf-kB пути [49]. Кроме того, в основе противовоспалительных свойств может лежать способность экстрактов т. обыкновенной коагулировать белки воспалительного экссудата, что сопровождается существенным снижением отека [377].

Депигментирующая активность извлечений из т. обыкновенной была исследована в ряде экспериментальных работ. Авторы изучали антитирозиновые свойства извлечения (экстрагент – спирт метиловый 50%). Было установлено, что экстракт проявлял высокую ингибирующую активность по отношению к тирозиназе грибов и существенно уменьшал синтез меланина [303]. Антитирозиновые свойства были установлены и для извлечения (экстрагент – спирт этиловый 50%) из листьев т. обыкновенной [304]. Также водное извлечение из листьев т. обыкновенной входит в состав патентованного комбинированного средства, предназначенного для отбеливания кожи [325].

Возможно применение экстрактов т. обыкновенной в качестве средств коррекции метаболических нарушений, возникающих при сахарном диабете. Swanston-Flatt S. K. с

соавторами (1989 г.) провели исследование, в ходе которого выявили гипогликемическую активность на мышах. Авторами было установлено, что добавление в стандартную диету экстракта, полученного из листьев т. обыкновенной, уменьшало полидипсию, гиперфагию и снижало концентрацию глюкозы в крови [400].

Широко известны антиоксидантные и нейропротективные свойства растительных экстрактов. Данные виды фармакологической активности извлечений, полученных на основе сырья т. обыкновенной, были изучены в нескольких экспериментальных исследованиях.

Экстракт из листьев т. обыкновенной в дозе 100 мг/мл подавлял образование TNF- α и избыточных количеств оксида азота, что предотвращало гибель мышечных нейрональных клеток N-11 [186]. Антиоксидантные свойства экстракта полученного путем экстракции спиртом этиловым 70% из листьев т. обыкновенной были изучены Mohd Azman NA. с коллегами в 2016 г. на модели генерации ABTS и метоксил-радикала. Авторским коллективом было установлено существенное ингибирование образования данных радикалов при внесении в среду экстракта т. обыкновенной из расчета 100 мг/мл [315].

Согласно Amarowicz R. и Pegg R.B. (2013 г.), экстракт из листьев т. обыкновенной проявляет антипролиферативные свойства в культуре клеток карциномы человека. В данном исследовании получали экстракт (экстрагент - спирт этиловый 80%) из свежих листьев. Авторы доказали, что экстракт ингибировал пролиферацию пяти линий клеток карциномы человека, а именно MCF-7-молочной железы, HT-29-толстой кишки, DU-145-предстательной железы, SK-MEL-5-кожи и MDA-MB-435-карциномы кожи. Антипролиферативную активность авторы связывали с галлотанинами, присутствующими в листьях, и индукцией каскада апоптотических реакций [166, 381].

1.2. Ботанико-таксономическая характеристика рода *Vaccinium* L.

Род *Vaccinium* L. включает более 350 видов, из них 13 произрастают во флоре России [138]. Фармакопейным видом многих стран является вид *Vaccinium vitis-idaea* L. и *Vaccinium myrtillus* L. [30, 31, 208].

Согласно классификации и филогении цветковых растений А.Л. Тахтаджяна, род *Vaccinium* принадлежит к семейству Ericaceae, подсемейству *Vaccinioideae* (триба: *Oxydendreae*, *Vaccinieae*, *Gaultherieae*), триба *Vaccinieae* [род: *Gaylussacia*, *Vaccinium* (в том числе *Oxycoccus*), *Symphysia*, *Thibaudia*, *Satyria*, *Agapetes* (включая *Pentapterigium*), *Didonica*, *Lateropora*, *Notopora*, *Utleia*, *Gonocalyx*, *Dimorphanthera*, *Paphia*, *Cavendishia*, *Orthaea*, *Macleania*, *Psammisia*, *Mycerinus*, *Polyclita*, *Anthopteropsis*, *Ceratostema*, *Semiramisia*, *Oreanthes*, *Siphonandra*, *Pellegrinia*, *Disterigma*, *Sphyraspermum*, *Diogenesia*, *Rusbya*, *Themistoclesia*, *Plutarchia*, *Demosthenesia*, *Anthopterus*, *Costera*] [384, 408].

Подсемейство *Vaccinium* L. включает в себя древесные растения различного облика – от небольших деревьев до кустарничков. Венчик – сростнолепестный, редко свободнолепестковый, кувшинчатый или трубчатый. Пыльники разных типов, лишены шелковистых нитей. Завязь верхняя или нижняя. Плод – ягода [128] (Приложение 1, табл. 2).

Брусника обыкновенная - небольшой полукустарник, достигающий высоты до 25 см, характеризующийся округлыми веточками с беловатой опушенностью побегов. Листья кожистые, зимующие, эллиптические или обратнояйцевидные, у вершины тупые или выемчатые слегка зазубренные или цельнокрайние, с завернутым книзу краем, на коротких опушенных черешках, сверху тёмно-зелёные, снизу бледные с темно-бурыми рассеянными железками. Цветки на коротких опушенных красноватых цветоножках, на концах прошлогодних веточек собраны короткой, но густой поникающей 2-8-цветковой кистью, обладают слабым, но приятным запахом.

Из видов, встречающихся в пределах границ Российской Федерации (распространённый на Кавказе), а также за пределами нашей страны (Юго-Восточная Болгария и в Северный Иран) третичный реликт – черника кавказская (*Vaccinium arctostaphylos* L.), представляющий собой листопадный кустарник или деревце высотой до 3 м со съедобными плодами, произрастающий в колхидских лесах и на полянах (Приложение 1, табл. 2) [138].

1.2.1. Химический состав *Vaccinium vitis-idaea* L.

В различных частях брусники обыкновенной (б. обыкновенной) исследователями из разных стран были обнаружены фенологликозиды, фенилпропаноиды, флавоноиды, в том числе антоцианы, дубильные вещества, кумарины, стильбены, стероиды, эфирное масло, органические кислоты, моносахара, сапонины (табл. 1.2) [384]. Листья брусники стандартизируются по содержанию фенологликозида – арбутина, в Государственной Фармакопее СССР XI издания используется титриметрический метод – йодиметрическое титрование [32], в Европейской фармакопее стандартизацию проводят методом ВЭЖХ[208].

Таблица 1.2 – Химический состав различных частей *V. vitis-idaea* L.

№ п/п	Класс соединения	Компонентный состав и морфологическая часть растения
1	Фенолы, фенологликозиды	<i>Листья</i> Арбутин [59, 215, 357, 362], гидрохинон [215], 2''-кофеил-арбутин [295], β-D-глюкозид гидрохинона, фраксин [428], пирозид, салидрозид [158], <i>Плоды</i> Фенол, этилфенол, тимол, карвакрол, О-гидроксифенол [158]. <i>Побеги</i> Арбутин, 4-гидроксифенил-β-генциобиозид [86, 158].
2	Флавоноиды	<i>Листья, стебли, плоды</i>

		Гиперозид (кверцетин-3-О-β-галактозид), кемпферол-пентозид, кемпферол-диоксигексозид, изокверцитрин (кверцетин-3-О-β-глюкозид), кверцетин (кверцетин-3-О-α-рамнозид), кверцетин-3-О-(4''-3-гидрокси-3-метилглутароил)-α-рамнозид, реиноутрин (кверцетин-3-О-β-ксилозид), кверцетин-О-(гексоза-диоксигексозид), кверцетин-3-О-α-арабинопиранозид, авикулярин (кверцетин-3-О-α-арабинофуранозид), кемпферол-(3-гидрокси-3-метилглутароил) [206]. <i>Листья</i> Рутин (кверцетин-3-О-рутинозид), кверцетин-3-О-глюкуронид, кемпферол-3-О-глюкуронид [295], гиперозид (кверцетин-3-О-галактозид), кверцетин-3-О-арабинозид, кверцетин-3-О-рамнозид [280]. В плодах - кверцетин-3-О-[4''-(3-гидрокси-3-метилглутароил)]-α-рамнозид, кверцетин-3-О-α-рамнозид, кверцетин-3-О-β-глюкозид, кверцетин-3-О-β-галактозид, кверцетин-3-О-α-арабинофуранозид, кверцетин-3-О-α-ксилопиранозид и кверцетин-3-О-α-арабинопиранозид [255, 369], кверцетин-3-О-β-галактопиранозид [199, 368].
3	Проантоцианы	<i>Листья и плоды</i> Процианидин Б1, процианидин Б3, процианидин А1, циннамтаннин Б1, эпикатехин-(4β→8)-эпикатехин-(4β→8, 2β→О→7)-катехин и эпикатехин-(4β→6)-эпикатехин-(4β→8, 2β→О→7)-катехин [233], процианидина С1, процианидина А2 [362]. <i>Плоды</i> Сумма проантоцианов (71% от суммы фенольных соединений, мажорным компонентом из которых является тример А-типа) [297, 370].
4	Антоцианы	<i>Плоды и листья</i> Цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид [206, 417]. <i>Плоды</i> Цианидин-3-галактозида (58%), цианидин-3-арабинозида (35%) и цианидин-3-глюкозида (7%) от суммы антоцианов [202], цианидин-3-О-самбубиозид, пеларгонин-3-О-глюкозид, пеонидин-3-О-галактозид, цианидин-3-О-ксилозид, цианидин-3-О-(6''-О-ацетил) глюкозид [29]. Пеонидин-3-глюкозид (4,2%) [183, 284].
5	Катехины	<i>Плоды</i> (+)-катехин и (-)-эпикатехин [297, 370]
6	Фенилпропаноиды	<i>Плоды, листья, побеги</i> Феруловая кислота, кумароил-гексоза-гидроксифенол, кофеил-гексоза-гидроксифенол, [206]. <i>Листья</i> Транс-5-О-кофеилхинная кислота, п-кумароил ацетил арбутин, п-кумароил арбутин, кофеил-гексоза-гидроксифенол, 4-О-кофеил-хинной кислотой (криптохлорогеновая кислота), 3-О-кофеил-хинной кислотой (хлорогеновая кислота) [235, 245]. <i>Плоды</i> Коричная кислота (41.2 ± 2.36 мг/г) [203], кофейная кислота (3,4-диоксикоричная кислота) - 6,2 % [455] на долю всех фенолокислот 7% [255]

7	Стильбены	<i>Свежие плоды</i> Ресвератрол (5,88 мкг/г) [371], транс-ресвератрола (30,00 ± 2,8 мкг/г) [203]
8	Кумарины	<i>Листья</i> Фраксин (фраксетин-8-О-глюкозид) [428].
9	Тритерпеноиды	<i>Корневища, стебли, плоды, листья</i> Олеаноловая и урсоловая кислота, содержание олеаноловой кислоты, для плодов – 1,00%, листьев – 0,61%, побегов – 0,32%, корневища – 0,35%. Содержание урсоловой кислоты для плодов – 0,71%, листьев – 0,41%, побегов – 0,24%, корневища – 0,29% [402]. <i>Листья и плоды</i> α-амирин, β-амирин, бетулин, циклоартанол, эритродиол, ферненол, фриеделин, лупеол, свертенол, таракастерол, урсенал, уваол) [401].
10	Стероидные соединения	<i>Листья и плоды</i> Кампестерол, ситостерол, стигмастадиенон, стигмастерол [401]. <i>Побеги</i> Даукостерин [270]. <i>Семена</i> β-ситостерин, 24-метиленициклоартанол, кампестерин, циклоартенол, стигмаста-7,24(24')-диен-3-β-ол, стигмаста-8,24(24')-диен-3-β-ол, стигмаста-3-β-ол, стигмаста-5,24(24')-диен-3-β-ол, 4-метилстигмаста-7,24(24')-диен-3-β-ол [270, 429].
11	Эфирное масло	<i>Листья</i> α-терпинен (17,0%), пентакозан (6,4%), (Е,Е)-α-фарнезен (4,9%), линалоол (4,7%) и (Z)-гекс-3-ен-1-ол (4,4%), гексадекановая кислота (4,5%), (Е)-геранилацетон (4,1%), п-ментан (19,8%), фарнезан (5,7%), кариофиллан (3,7%), эвдесман (3,0%), 10-эпи-γ-эудесмол (3,0%) β-кариофиллен (2,9%), гептакозан (2,9%), нонакозан (2,0%) и гераниол (1,5%). В эфирном масле на долю монотерпеноидов приходится 27,4 %, на долю сесквитерпеноидов 18,7% [359].
12	Органические кислоты	<i>Плоды</i> Лимонная (20,0 г/кг), яблочная (2,27 г/кг), винная (3,379 г/кг), фумаровая (35,6 г/кг) и шикимовая кислоты (40,9 г/кг) [311].
13	Моносахариды	<i>Плоды</i> Глюкоза (37,9 г/кг), фруктоза (29,2 г/кг) и сахароза (0,45 г/кг) [311]. <i>Листья</i> Арабиноза (15,9 моль%), галактоза (14,2 моль%), глюкоза (22,3 моль%), манноза (30,1 моль%), рамноза (0,2 моль%) и ксилоза (5,9 моль%), уроновая кислота (15,3 моль%), [77].

Juho Hokkanen с соавторами в 2009 году опубликовали статью о химическом составе б. обыкновенной и промежуточной, гибридной формы брусники и черники (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.). Авторы идентифицировали в листьях 51 соединение фенольной природы в гибридном виде. При этом отмечали, что химический профиль гибридной формы включал в себя полный набор БАС родительских видов [235].

В 2011 году Anja K. и соавторы подтвердили информацию об образовании межвидового гибрида [280].

1.2.2. Фармакологическая активность *Vaccinium vitis-idaea* L.

Установлено, что извлечения, полученные из брусники обыкновенной, обладают обширным спектром фармакологической активности, включающим в себя антиоксидантное [233] противовоспалительное [380], антинеопластическое [308], липидокорректирующее [458] нейтропротективное [263], гипогликемическое, [227], антиапоптотическое [246], противовирусное [330] и антибактериальное [438] действия.

Значительное количество экспериментальных исследований посвящено изучению антиоксидантных свойств извлечений из б. обыкновенной. Так в работе Но К.У. с соавторами (1999 г.) показано, что танины, полученные из листьев и плодов б. обыкновенной, обладают способностью ингибировать процессы перекисного окисления липидов, что подтверждалось снижением образования ТБК-активных продуктов. В данном исследовании установлены ингибирующие свойства танинов б. обыкновенной в отношении супероксид-радикала [233].

В другом исследовании, установлено, что этилацетатное извлечение из плодов б. обыкновенной, содержащее фенолокислоты, катехины, процианидины и фенологликозиды, *in vitro* подавляло окисление липопротеинов низкой плотности, что может косвенно свидетельствовать о наличии у данного извлечения антиатеросклеротических и ангиопротекторных свойств [297].

Кроме того, для различных извлечений из б. обыкновенной характерно наличие антирадикальной и хелатирующей активности. При этом, установлено, что спиртовой экстракт листьев обладает скевенджерными свойствами по отношению к гидроксил- и ABTS-радикалам, также данный экстракт характеризовался наличием металлохелатирующей активности [362].

Доказано, что наличие прямой антиоксидантной активности у экстрактов из листьев б. обыкновенной может лежать в основе антиапоптотического действия. Экстракт листьев б. обыкновенной в исследовании *in vitro* дозозависимо подавлял каскад реакций АФК-индуцированного апоптоза в культуре клеток кардиомиоцитов человека, при этом данное действие авторами связывалось с высоким содержанием антоцианов в анализируемом экстракте [246].

Помимо антиоксидантных свойств — «классического» вида фармакологической активности для объектов природного происхождения, извлечения из плодов и листьев б. обыкновенной характеризуются наличием антибактериальных свойств. В работе Но К.У. с коллегами (2001 г.) приводятся данные, свидетельствующие о том, что в эксперименте продемонстрирована антимикробная активность димеров процианидина б. обыкновенной по

отношению возбудителей инфекций пародонта - *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*. Было выяснено, что эти соединения, хотя проявляют не выраженный эффект, но проявляют терапевтическое действие, сопоставимое с таким широко используемым антибиотиком, как тетрациклин, в лечении инфекционного пародонтита [384, 232].

В работе, проведенной Toivanen M. и др., было установлено, что экстракт плодов б. обыкновенной обладал антимикробной активностью, которая сравнима с активностью стрептавидина, в отношении бактерии *Neisseria meningitidis* Pili.. Была доказана, как противобактериальная активность самого экстракта, так и его способностью подавлять адгезию *Neisseria meningitidis* Pili. к эпителиоцитам человека [384, 412].

Помимо экстракта из плодов б. обыкновенной, антибактериальными свойствами обладает также извлечение, полученное из листьев *Vaccinium vitis-idaea*, что было доказано в исследовании Wojnicz D. с коллегами (2012 г.), где водное извлечение из листьев б. обыкновенной демонстрирует бактерицидную активность в отношении штамма *E. coli*, выделенного из мочи пациентов, страдающих бактериальным пиелонефритом [384, 438].

Экстракт листьев и плодов б. обыкновенной обладает противокашлевым и муколитическим свойствами, что делает его эффективным вспомогательным средством при лечении инфекций верхних дыхательных путей [384, 428].

Извлечения, полученные из плодов б. обыкновенной, помимо антибактериальной активности, обладают противогрибковыми и противовирусными свойствами. В научной статье исследователей Cioch M. и его коллег (2012 г.) была продемонстрирована фунгицидная активность экстракта плодов брусники в отношении патогенных грибов рода *Aspergillus*, *Penicillium* и *Saccharomyces* [192, 384].

Исследование, проведенное Nikolaeva-Glomb L. с соавторами, позволило выявить высокий уровень противовирусной активности экстракта плодов б. обыкновенной. Было установлено, что метанольный экстракт плодов б. обыкновенной, исследованный в лабораторных условиях (in vitro), угнетает размножение ряда широко распространенных и высоко вирулентных патогенов, включая полиовирус типа 1 (PV-1) и вируса Коксаки B1 (CV-B1), респираторно-синцитиальный вирус человека типа A2 (HRSV-A2) и вируса гриппа A/H3N2 [330, 384].

Известно, что некоторые экстракты растений, включая гинко билоба, обладают нейропротекторными свойствами. Лекарственные препараты, созданные на основе этих экстрактов, предоставляют перспективы для поиска эффективных нейропротекторов из природных источников [426]. В этой связи был проведен ряд экспериментальных исследований, посвященных оценке нейропротекторной активности извлечений из б. обыкновенной. В работе Kelly E. и соавторов, сообщается, что экстракт плодов б. обыкновенной обладает сильным

нейропротекторным эффектом в условиях экспериментальной глутамат-опосредованной эксайтотоксичности и β -амилоид-связанной нейротоксичности. Это открывает перспективу использования данного экстракта в лечении нейродегенеративных заболеваний головного мозга, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. В контексте использования плодов б. обыкновенной, фиксируется сложный механизм воздействия, включающий регуляцию обмена кальция и активацию сигнального пути NF-kB. Более того, этот процесс приводит к восстановлению митохондриального мембранного потенциала и снижению активности воспалительных цитокинов, таких как ФНО- α [263, 384]. В связи с наличием доказанных антицитокиновых свойств у извлечений из б. обыкновенной перспективным является оценка противовоспалительного и иммуностропного потенциала данного объекта, что в свою очередь было исследовано Shaikh R.U. и коллег (2015 г.). Выполненные ими эксперименты позволили установить ЦОГ-ингибирующие свойства для экстракта плодов б. обыкновенной, были подтверждены антицитокиновые свойства данного объекта. При этом предполагается высокая терапевтическая эффективность экстракта в лечении, как острых, так и вяло текущих хронических воспалительных процессов [380].

Среди лекарственных препаратов на основе растительных экстрактов выделяются не только средства для лечения различного рода заболеваний головного мозга - нейропротекторы, но антинеопластические средства – предназначенные для терапии онкологических заболеваний. В исследовании Du Q. и соавторов (2015 г.) установлена противораковая активность 4-[(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-окси]-фенола – аналога гидрохинона, который в качестве одного из действующих компонентов идентифицируется в извлечениях, полученных из б. обыкновенной. В культуре клеток C26 рака толстого кишечника 4-[(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)-окси]-фенол. Оно способствовало подавлению активности антиапоптотических белков Bcl-2 и активации протеинов Вах, а также вызвало активацию каспаза-зависимого пути апоптоза [200, 384].

Проведенное исследование Misikangas M. и его коллегами подтвердило, что при добавлении пищи, содержащей порошок плодов б. обыкновенной, в рацион животных, рост злокачественных опухолей толстого кишечника у мышей уменьшается более чем на 60% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Ученые отмечают, что данный порошок проявляет антираковую активность, связанную с уменьшением активности онкогенов, таких как β -катенин, циклин D1, аденозиндезаминаза, экто-5-нуклеотидаза и простагландин E2 (при взаимодействии с рецепторами EP4) [312, 384].

Также в исследовании Fan Z.L и коллег (2012 г.) показано радиопротекторное действие антоцианов, извлеченных из плодов б. обыкновенной, выражаемое в восстановлении всех ветвей кроветворения, нормализации фагоцитарной активности у животных, в условиях острого

радиационного воздействия, что может являться отсылкой к антинеопластическим свойствам извлечений, полученных из б. обыкновенной [209].

Кроме вышеперечисленных видов фармакологической активности, извлечения из брусники характеризуются наличием гипогликемических свойств, что в условиях широкого распространения инсулинрезистентного сахарного диабета и ограниченности доступных фармакологических методов для коррекции этого заболевания, становится актуальной разработка эффективных альтернативных методов лечения повышенного уровня сахара в крови [384]. Работа, проведенная Eid Н.М. с соавторами (2014 г.), продемонстрировала значительный потенциал гликемического контроля плодов б. обыкновенной у мышей C57BL/6 в условиях инсулин резистентного сахарного диабета. При этом были установлены потенциальные механизмы гипогликемического действия изучаемого объекта, включающего в себя: увеличение активности глюкозотранспортных метаболических систем (GLUT4), АМФК (аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа) и Akt (протеинкиназа В) в скелетных мышцах [204]. Кроме того АМФК-активирующие свойства извлечений из б. обыкновенной были доказаны в исследовании Eid Н.М. и др. (2010 г.), при этом было установлено, что активация АМФК в поперечнополосатой мускулатуре, вызванное применением плодов б. обыкновенной, характеризовалась отсутствием разобщения реакций переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи исключая возможность возникновения гиперлактатемии при использовании средств на основе б. обыкновенной. Это значительно отличает данный объект от активаторов АМФК, таких как метформин, которые традиционно применяются при инсулинорезистентном сахарном диабете [205, 384].

Немало важно, что помимо непосредственно гипогликемического действия извлечения из б. обыкновенной при сахарном диабете проявляют плеiotропность фармакологического действия. Так в работе Reichert К.Р. и др. показано, что применение плодов б. обыкновенной в условиях экспериментального сахарного диабета способствовало снижению проявления диабетических осложнений со стороны центральной нервной системы [364], а в исследовании Zhu Y. и коллег (2015 г.) продемонстрировано, что на фоне применения плодов б. обыкновенной отмечалось снижение концентрации липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и увеличение фракции липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови [458]. Следует отметить, что гипогликемические свойства извлечений из б. обыкновенной были подтверждены клиническими данными [291].

1.2.3. Химический состав *Vaccinium arctostaphylos* L.

Так, первые работы в СССР по изучению различных частей черники кавказской (ч. кавказская) проводились учеными из Грузинской ССР (Мжананадзе В.В., Дуршимидзе С.В.) с

1970 г. по 1981 г [40, 69, 70]. В качестве основных БАВ ч. кавказской являются фенольные соединения, тритерпеноиды, углеводы, тритерпеноиды, высшие жирные кислоты, эфирное масло, моносахара (табл. 1.3).

Таблица 1.3 – Химический состав различных частей *V. arctostaphylos* L.

<i>№ n/n</i>	<i>Класс соединения</i>	<i>Компонентный состав и морфологическая часть растения</i>
1	Фенолы, фенологликозиды	<i>Листья</i> Арбутин, кофеиларбутин, п-кумароиларбутин [40, 69, 70]. <i>Плоды</i> п-кумароиларбутин [40, 69, 70].
2	Флавоноиды	<i>Листья</i> Рутин, изокверцитрин, гиперин, астрагалин, афзелин, кемпферол [68, 70, 72], кверцетин [266, 316].
3	Антоцианы	<i>Плоды</i> 3-L-арабинозид пеонидина, 3-L-арабинозид, 3-L-арабинозид цианидина, 3-O-β-D-глюкозид петунидина, 3-O-β-D-глюкозид мальвидина, 3-O-β-D-глюкозид дельфинидина, [66, 67, 71, 329], самбубиозид дельфинидина [279]. Суммы антоцианов $86,56 \pm 2,46$ мг в 10г экстракта [267].
4	Фенилпропаноиды	<i>Листья и плоды</i> Хлорогеновая, неохлорогеновая, криптохлорогеновая, салициловая, синаповая, кофейная, феруловая, сиреневая, 1-кофеилхинная, 3-п-кумароилхинная, 3,5-дикофеилхинная, 5-п-кумароилхинная, розмариновая, галловая, протокатеховая, п-кумаровая, генистовая, транс-коричная кислоты, п-кумароилгалактозил глюкозид, кумароил-арабинозу. <i>Плоды</i> Галловая, протокатеховая, гентизиновая, п-гидроксibenзойная, п-кумаровая, м-гидроксibenзойная, хлорогеновая, кофейная, феруловая, сиринговая, синапиновая, салициловая и транскоричная кислоты [40, 73, 171, 309]. Содержание хлорогеновой кислоты до 0,16%, цикориевой кислоты до 1,25 %. <i>Листья</i> Содержание хлорогеновой кислоты до 3,51% [190].
5	Тритерпеноиды	<i>Побеги</i> Урсоловая и олеаноловая кислоты [130].
6	Кумарины	<i>Листья</i> 6,7-дигидроксикумарин [69, 70].
7	Высшие жирные кислоты	<i>Побеги</i> Гексадекановая кислота [378].
8	Моносахариды	<i>Плоды</i> L-арабиноза, D-галактоза, ксилоза, глюкоза и рамноза [253]
9	Эфирное масло	<i>Побеги</i> Гексадекановая кислота (27,0%), витиспирин (6,5%), бета-ионон (5,9%) и сандаракопимарадиен (4,8%%) от суммы всей летучей фракции [378].

1.2.4. Фармакологическая активность *Vaccinium arctostaphylos* L.

На территории России в 1981 году Дурмишидзе С.В. с соавторами в эксперименте было выявлено противовоспалительное и диуретическое действие экстрактов, полученных из листьев ч. кавказской [40].

В 2009 году была определена гипогликемическая активность экстракта из сухих плодов ч. кавказской (экстрагент – спирт этиловый 70%). Экстракт в дозе 350 мг заключенный в капсулы (2,45 мг антоцианов) в клинических испытаниях снижал уровень глюкозы натощак и через 2 часа после приема пищи, а также уровни гликозилированного гемоглобина. Авторы рекомендовали использовать экстракт ч. кавказской пациентам при диабете 2 типа [265]. Позднее авторы выявили гипогликемическую активность полученного экстракта в испытаниях на пациентах в возрасте 20–60 лет. В результате было зафиксировано снижение в крови уровня общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также наблюдалось увеличение уровня ЛПВП [267]. Продолжив клинические испытания в 2019 году Kianbakht S. выявил гипотензивную активность сухого экстракта в дозе 400 мг на 50 пациентах, получавших по 400 мг экстракта (3 раза в день, в течение трех месяцев). Наблюдалось снижение систолического (с 152 до 140 мм рт. ст.) и диастолического артериального давления (снизилось с 90 до 82 мм рт. ст.). Следовательно, авторы рекомендуют экстракт для коррекции артериального давления пациентам с гипертонической болезнью в сочетании с избыточной массой тела и ожирением [266].

В 2011 году Feshani A.M. с соавторами получил сухой экстракт (экстрагент – спирт этиловый 96%) из плодов ч. кавказской. В эксперименте на животных (самцах крыс Wistar) на модели аллоксанового диабета подтвердили гипогликемическую активность, связанную с антиоксидантным действием экстракта. В эксперименте оценивали экспрессию рибонуклеазы поджелудочной железы, кардиального инсулинзависимого белка-переносчика глюкозы (GLUT-4), изменения профилей липидов плазмы и активности антиоксидантных ферментов. Было зафиксировано повышение экспрессии всех показателей. Также исследования *in vitro* выявили ингибирующее действие экстракта на активность кишечных ферментов мальтазы и сахаразы [213].

Позднее Baugami A. подтвердил влияние сухого экстракта из листьев ч. кавказской (экстрагент – вода очищенная) в дозе 100 мг (в течении 16 дней) на уровень глюкозы в крови. Опыты проводились на аллоксан-диабетических самцах крыс. В результате экстракт понижал уровень глюкозы в крови натощак, общий холестерин и уровень триглицеридов, при этом наблюдалось повышение концентрации инсулина и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [176].

Soltani R. с соавторами оценили влияние экстракта, полученного из плодов ч. кавказской (экстрагент – спирт этиловый 70%) на липидный профиль, уровень высокочувствительного С-реактивного белка и окислительный стресс у пациентов с гиперлипидемией. Сухой экстракт в дозе 500 мг (с содержанием антоцианов 45 ± 2 мг) принимали 50 пациентов старше 18 лет с гиперлипидемией (курс лечения 4 недели). Наблюдалось снижение общего холестерина, ЛПНП, триглицеридов и малонового диальдегида, при этом уровень ЛПВП и высокочувствительного С-реактивного белка не изменялся. Авторы рекомендовали экстракт для лечения дислипидемии и профилактики развития атеросклероза [390].

Khalili A. с соавторами была выявлена гипотензивная активность водного экстракта, полученного из листьев ч. кавказской. На модели ренопаренхиматозной артериальной гипертензии вызванной у крыс самцов в дозах 10, 25 или 75 мг/кг было выявлено, что сухой экстракт обладал гипотензивным действием, а при более высокой дозе не вызывал рефлекторной тахикардии [264].

Ravan A.P. с соавторами провел исследования по определению гепатопротекторной активности сухого экстракта (экстрагент - спирт метиловый 75%) из листьев ч. кавказской на модели поражения печени крыс четыреххлористым углеродом. Животным вводили 100 мг экстракта (содержал фенолокислоты - $48,5 \pm 1,43$ мг + флавоноиды - $18,53 \pm 0,55$ мг) в виде водного раствора внутривентрально. Авторы анализировали ферменты печени (щелочная фосфатаза, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, общий и прямой билирубин, γ -глутамилтрансфераза, общий белок и альбумин в сыворотке крови), а также содержание малонового диальдегида в гомогенате печени. В результате чего был сделан вывод, что экстракт обладает антиоксидантной активностью в концентрации 250 мкг/мл за счет уменьшения уровня малонового диальдегида, связанного с ингибированием перекисного окисления липидов и поглощением свободных радикалов [363].

Mohammadi-Aloucheh R. с соавторами выявил антибактериальную активность наночастиц ZnO и нанокомпозитов ZnO/CuO, синтезированных с использованием экстракта плодов черники кавказской. В результате исследования ученые сделали вывод, что наночастицы с экстрактом плодов черники кавказской разрушали мембрану патогенных бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [314].

Исследования по выявлению противоопухолевой активности наночастиц селена и сухого экстракта плодов ч. кавказской были проведены Gharbavi M. и его коллегами *in vitro*. Это связано с тем, что в настоящее время ряд работ посвящен эффективности направленной доставки лекарственных препаратов на основе наночастиц в область онкологии. Полученные авторами наночастицы имели сферическую форму и совместимые размеры с дзета-потенциалом.

Результаты исследования показали подавление роста опухолевых клеток молочной железы [218].

1.2.5. Химический состав *Vaccinium myrtillus* L.

Интерес к сырьевым источникам черники обыкновенной на территории России берет свое начало с 1952 года. Начиная с 2010 года исследования возобновлены Самарской школой фармакогностов под руководством Куркина В.А. В результате Рязановой Т.К. были обоснованы теоретические и практические подходы к стандартизации растительных источников БАВ, в том числе представителей рода *Vaccinium* L [89]. Компонентный состав черники обыкновенной (ч. обыкновенной) представлен в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Химический состав различных частей *V. myrtillus* L.

№ n/n	Класс соединения	Компонентный состав и морфологическая часть растения
1	Фенолы, фенологликозиды	<i>Побеги и листья</i> Арбутин, метиларбутин [298]. <i>Листья и плоды</i> Гидрохинон, монотропезид, асперулозид [214, 216].
2	Флавоноиды	<i>Листья и плоды</i> Гиперин, рутин, гиперозид, мератин, астрагалин, кверцетин, кверцитрин, изокверцитрин, авикуляринморин, кверцетина-3-глюкуронид [6, 344, 367], кемпферол [328, 338, 405]. <i>Побеги</i> Кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид. Содержание суммы (0,62-1,02% в пересчете на рутин) [57].
3	Антоцианы	<i>Плоды</i> Дельфинидин 3-глюкозид, петунидин 3-арабинозид, дельфинидин 3-галактозид, цианидин 3-галактозид, дельфинидин 3-арабинозид, цианидин 3-глюкозид, петунидин-3-галактозид, цианидин 3-арабинозид, петунидин 3-глюкозид, пеонидин 3-галактозид, пеонидин-3-глюкозид, мальвидин 3-арабинозид, мальвидин 3-галактозид, и пеонидин, мальвидин 3-глюкозид, [58, 220, 244, 247, 278, 367], мальвидин-3-глюкопиранозид, мальвидин-3-галактопиранозид [243] и мальвидин 3-О-арабинопиранозид [305].
4	Проантоцианы	<i>Листья</i> Процианидин В2 [405]. <i>Плоды</i> Продельфинидины и процианидины [356]
5	Катехины	<i>Листья</i> (+)-катехин, (–)-эпикатехин [405], (+)-галлокатехин, (–)-эпигаллоилкатехингаллат [399]. <i>Плоды</i> Катехин, эпикатехин [344], эпигаллоилкатехингаллат, галлокатехин [133].
6	Фенилпропаноиды	<i>Листья</i> Кофейная, п-кумаровая, синапиновая, феруловая, хлорогеновая, галловая кислоты [178, 338, 405].

		<i>Плоды</i> Хлорогеновая, феруловая, п-кумаровая, кофейная, коричная, эллаговая и галловая кислоты [321, 344], сиреневая кислота [331, 348]
7	Тритерпеноиды	<i>Листья и плоды</i> α - и β -амирин, α - и β -амиренон, цитростадиенол (в плодах), циклоартанол, эритродиол, лупеол, 24-метиленициклоартанол, уваол, олеаноловый и урсоловый альдегиды и олеаноловая, урсоловая, 2 α -гидроксиолеаноловая и 2 α -гидроксиурсоловая кислоты, А-фридулеан-3 β -ол, С-фридурс-7-ен-3 β -ол и тараксастерол [184, 403].
8	Стероидные соединения	<i>Листья и плоды</i> Кампестерол, холестерин, ситостерол, ситостанол, стигмастадиенон, стигмастерол, стигмаста-3,5-диен-7-он [403].
9	Стильбены	<i>Плоды</i> Транс-резвератрол стильбена (0,002 мг/г) [259, 344, 434]. Резвератрол стильбена (7,25 мг/г) [405].
10	Каротиноиды	<i>Плоды</i> Лютеин, β -каротин, 9Z- β -каротин, виолаксантин, неоксантин, зеаксантин, антераксантин и β -криптоксантин [260].
11	Органические кислоты	<i>Плоды</i> Лимонная (22,9 $\pm$ 2,5 мг/г), галактуронозная (0,589 $\pm$ 0,072мг/г), яблочная (55,9 $\pm$ 1,7мг/г), щавелевая (0,245 $\pm$ 0,038мг/г), шикимовая (0,234 $\pm$ 0,010мг/г) и хинная (12,2 $\pm$ 2,5мг/г) кислоты [163, 345, 415].
12	Высшие алифатические углеводы	<i>Листья</i> Тетратриакоктан, тритриакоктан, генэйкозан, трикозан, дотриакоктан, гентриакоктан, тетракозан, пентакозан, триакоктан, нонакозан, гептакозан и октакозан [376].
13	Моносахариды	<i>Листья</i> Арабиноза (16,9моль%), галактоза (17,3 моль%), глюкоза (25,7 моль%), манноза (27,4 моль%), рамноза (следы), ксилоза (0,7 моль%), уронозная кислота (11,9 моль%) [77].
14	Высшие жирные кислоты	<i>Плоды</i> 10,16-дигидроксигексадекановая, 16-гидроксигексадекановая, 9,10-эпокси-18-гидроксиоктадекановая, 9,10-эпокси-18гидроксиоктадец-12-еновая, 9,10,18-тригидроксиоктадец-12-еновая, 16-гидрокси-10-октогексадекановая, 18-гидроксиоктадец-9-еновая, 20-гидроксиэйкозановая, 9,10,18-тригидроксиоктадекановая и 20-гидроксидокозановая кислоты [86]. <i>Семена</i> Метилгексадеканоат 4,61мг/г; метиллинолеат (ω -6) 38,68мг/г, метилолеат (ω -9) 18,14мг/г, метил α -линоленат, ω -3 37,79мг/г, метилстеарат (метилоктадеканоат) 0,55мг/г, 8,11,14-эйкозатриеновая кислота, метиловый эфир 0,11мг/г, цис-11,14-эйкозодиеновая кислота, метиловый эфир 0,11мг/г [405].

1.2.6. Фармакологическая активность *Vaccinium myrtillus* L.

Куркин В.А. с соавторами в своих исследованиях выявили влияние водных (сок, стабилизированный этанолом, из свежих плодов, настой побегов 1:10) и водно-спиртовых (извлечение 1:1 70% этанолом из свежих и воздушно-сухих плодов, 1:1 70% и 40% этанолом из побегов) извлечений плодов и побегов черники обыкновенной (ч. обыкновенной) на функцию выделительных органов, а именно почек. [51]. В эксперименте белым крысам вводили 50 мг/кг и 100 мг/кг препарата из свежих плодов, который усиливал диурез, салурез и креатининурия на 49% и 85% соответственно для двух доз; экстракт из свежих плодов в дозе 50 мг/мл усиливал диурез на 25% после 4 часов и 41% через сутки; настой побегов - на 22% через 4 часа. Максимальный диуретический эффект достигался через 4 часа после введения водных извлечений и не изменялся через 24 часа, при этом в течение суток увеличивался эффект после введения экстракта из свежих плодов. Дозозависимый эффект наблюдался при исследовании сока свежих плодов. Уменьшение диуреза наблюдали при введении животным экстрактов из воздушно-сухих плодов и побегов. Отобранная моча анализировалась на концентрацию натрия, калия и креатинина. Наблюдаемый диуретический эффект авторы связывали со снижением канальцевой реабсорбции и повышением клубочковой фильтрации [49, 51].

Yao Y., и Vieira A. изучили антиоксидантную активность экстрактов из плодов рода *Vaccinium* L., в том числе ч. обыкновенной, собранных в Финляндии. Была выявлена антиоксидантная активность с потенциальным отношением к митохондриальной дисфункции и нейротоксичности. Результаты анализа показали, что экстракт ч. обыкновенной эффективно ингибировал окисление (на 50%), что в 1,5-4 раза выше, чем у других видов рода [445].

Исследования по выявлению гипополидемии активности, проведенные Zhu Y. и его коллегами, позволили сделать заключение, что экстракт из плодов ч. обыкновенной достоверно снижал в сыворотке крови концентрацию холестерина ЛПНП и повышал ЛПВП [458].

Aboonabi A. со своими коллегами провели исследование, в ходе которого выявлено антиатерогенное и антитромбоцитарное влияние антоцианов из плодов ч. обыкновенной. Основываясь на результаты клинических испытаний, авторы сделали вывод, что экстракт в дозе 320 мг (в течение 4 недель) значительно снижал кардиометаболический риск (уровень глюкозы, липидный профиль, уровень высокочувствительного С-реактивного белка, конфигурацию активации тромбоцитов, вызванную аденозиндифосфатом). Однако уровень мочевой кислоты и ЛПВП не изменялся, а между уменьшением значения высокочувствительного С-реактивного белка, ЛПНП и фибриногена была замечена положительная зависимость [160].

Экстракт плодов ч. обыкновенной в дозе 120 мг/день улучшал когнитивные функции у мышей с болезнью Альцгеймера. Li J. и его коллеги предполагают, что положительный

результат достигается путем подавления экспрессии воспалительных факторов и усиления экспрессии гомеостатических факторов микроглии [288].

Антоцианы, полученные из плодов ч. обыкновенной, оказывали противовоспалительный эффект и уменьшали выделение цитокинов. Piberger Н. и соавторы на модели экспериментального колита, вызванного 2,5% раствором декстрансульфата натрия, выявили уменьшение секреции IFN- γ и фактора некроза опухоли мезентериальными лимфатическими узлами [346].

Возможность использования экстракта плодов ч. обыкновенной при оральном мукозите была описана в работе Davarmanesh М. и его коллег. У животных, получавших 300 мг/кг экстракта (с содержанием 36% антоцианов) симптомы мукозита были менее выражены, чем у группы, не получавших экстракт [196].

Alhosin М. со своими коллегами исследовал экстракт из плодов ч. обыкновенной на проапоптотические свойства, связанные с редокс-чувствительной каспазой-3 в В-клетках хронического лимфоцитарного лейкоза путем воздействия на путь Bcl-2/Bad лимф

оцитарного лейкоза. Клинические результаты выявили дозозависимые эффекты на В-клетки хронического лимфоцитарного лейкоза и отсутствия воздействия на моноклеарные клетки периферической крови. Авторы результат связывали с наличием в экстракте дельфинидин-3-О-глюкозида и дельфинидин-3-О-рутинозида [165].

В работе Маурамо М. и его коллег найдено подтверждение антиканцерогенного действия сухих экстрактов, полученных из плодов ч. обыкновенной в дозах - 2, 5, 10 и 25 мкг/мл при карциноме полости рта (*in vitro* и *in vivo*). Контрольная группа животных получала 0,01 мг/мл цетуксимаба. Авторы отметили, что с увеличением дозы фиксировалась цитостатическая активность, которая влияла на пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, в отличие от препарата сравнения [307].

Антигистаминное действие антоцианов экстракта плодов ч. обыкновенной было выявлено Yamaura К. с коллегами в эксперименте на мышах путем ингибирования дегрануляции тучных клеток, вызванной введением 2,4,6-тринитро-1-хлорбензола. Антоцианы черники обыкновенной снижали аллергическую реакцию (зуд) у животных в эксперименте [443].

Антимикробная активность экстракта листьев ч. обыкновенной была выявлена румынскими учеными Ștefănescu В.Е. с соавторами. Авторы выявили антиоксидантный эффект, антимутагенные свойства по отношению к *Salmonella typhimurium* и высокую антимикробную активность, что было связано с наличием в экстракте полифенольных соединений [393].

Bao L. с соавторами вводили экстракт из плодов ч. обыкновенной в дозах 50, 100 и 200 мг/кг в течении 5 дней (*per os*), при этом наблюдалось восстановление уровня мочевины и

креатинина; уменьшение уровня малонового диальдегида, оксида азота и ксантиноксидазы; улучшение способности тканей почек поглощать радикалы кислорода и подавлять перекисное окисление липидов, которое в свою очередь привело к уменьшению окислительного стресса и повреждения почек [174].

В работе Hoggard N. с соавторами выявлено влияние экстракта из плодов ч. обыкновенной на постпрандиальную гликемию и уровень инсулина при сахарном диабете II типа. В клинических испытаниях пациенты получали 0,47 г экстракта (эквивалентно 50 г свежих плодов). Авторы фиксировали постепенное снижение глюкозы и инсулина, при этом состав кишечных, панкреатических и противовоспалительных пептидов не менялся [234].

Венгерский ученый Takács I. и его коллеги исследовали влияние экстракта из листьев черники обыкновенной на гипергликемию, инициированную крахмалом при диабете. В результате авторы наблюдали подавление активности ферментов α -глюкозидазы и α -амилазы (*in vitro*) и гипергликемии (*in vivo*). При этом экстракт не оказал цитотоксического эффекта, достоверно снижал уровень глюкозы в крови равноценно препарату сравнения – акарбозе [406].

Гепатопротекторная активность на модели фиброза печени, вызванного четыреххлористым углеродом (у мышей самцов), была описана у ряда авторов. Ученые в эксперименте доказали, что при введении экстракта из плодов ч. обыкновенной в дозе 10 мг/кг наблюдается подавление окислительного стресса, образование фактора некроза опухоли- α , трансформирующего фактора роста- β 1, актина гладких мышц и гидроксипролина, следовательно активация звездчатых клеток печени и увеличение синтеза коллагена [197].

Wang Y. и его коллеги исследовали экстракт ч. обыкновенной на фоне дегенерации сетчатки глаза. При введении экстракта увеличивалась выработка уровня супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы, уменьшалась концентрация малонового диальдегида, снижалась активность противовоспалительных цитокинов и ангиогенных факторов, что было в основе ретинопротекторной активности [431].

Позднее Rai S.K. с соавторами исследовали антоциановые ингибиторы Rho-ГТФазы. В результате исследования была выявлена высокая способность к связыванию с Rho-ГТФазой у цианидина и дельфинида, которые были получены из плодов ч. обыкновенной, по сравнению с митомицином. Следовательно, экстракт из плодов черники обыкновенной является перспективным средством при глаукоме [361].

1.2.7. Химический состав *Vaccinium uliginosum* L.

На территории России различные виды сырья голубики обыкновенной изучались Ярославской школой фармакогностов под руководством Фурсы Н.С. Значительная часть работ опубликована его учеником Талановым А.А [107, 110, 113, 119, 131]. Проведенный анализ

литературных данных показывает, что в составе листьев, плодов и побегов голубики обнаружены следующие компоненты: простые фенолы и их гликозиды, флавоноиды, процианидины, катехины, фенилпропаноиды, кумарины, тритерпеноиды, органические кислоты, витамины, полисахариды, аминокислоты, микро- и макроэлементы, а также высшие жирные кислоты (табл. 1.5) [100, 114, 115, 124].

Таблица 1.5 – Химический состав различных частей *V. uliginosum* L.

<i>№ n/n</i>	<i>Класс соединения</i>	<i>Компонентный состав и морфологическая часть растения</i>
1	Фенолы, фенологликозиды	<i>Листья</i> Арбутин (1,8-3,1%) [79, 132]. <i>Плоды</i> Арбутин (0,9-1,9%)[106, 117].
2	Флавоноиды	<i>Плоды</i> Рутин, кверцетин, лютеолин-7-глюкозид [116] мирицетин, ларицитрин, изорамнетин, сиригетин, гиперозид [277], кемпферол, изокверцитрин [252], кверцетин-3-О- α -L-арабинопиранозид, мирицетин-3-О- β -D-галактопиранозид, сиригетин-3-О- β -D-галактопиранозид [281, 425] Сумма флавоноидов в плодах - 0,008-0,139%. <i>Листья</i> Кемпферол, мирицетин, лютеолин, кверцетин, кверцитрин, изокверцитрин, дегидрокверцетин, глюкозид кверцетина [79]. Сумма флавоноидов в листьях - 2,06%-4,34% [112].
3	Антоцианы	<i>Плоды</i> Цианидин-арабинозида, цианидин-галактозида, мальвидин-глюкозида и мальвидин-арабинозида, дельфинидин-галактозида, дельфинидин-глюкозида, дельфинидин-арабинозида, цианидин-глюкозида, петунидин-галактазида, петунидин-глюкозида, пеонидин-галактозида, петунидин-арабинозида, пеонидин-глюкозида, мальвидин-галактозида, пеонидин-арабинозида, цианидин-3-О- β -D-глюкопиранозид [141, 172, 294, 423, 425].
4	Процианидины	<i>Плоды</i> Процианидин димер А и димер В, процианидин тример А и тример В [297].
5	Катехины	<i>Плоды</i> Катехин, эпикатехин, эпигаллокатехингаллат [297].
6	Фенилпропаноиды	<i>Плоды</i> Неохлорогеновая, коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая, п-кумаровая, синаповая, феруловая, салициловая, п-гидроксibenзойная, бензойная, гентизиновая, сиреневая кислоты [79, 95, 281]; эпигаллокатехингаллат, метилхлорогенат [281]. Сумма фенилпропаноидов в плодах - 0,89-2,03%. <i>Листья</i> Хлорогеновая, п-кумаровая, синаповая, феруловая и изохлорогеновая кислоты [79]. Сумма фенилпропаноидов в листьях - 2,78 - 7,42% [116].

7	Кумарины	<i>Плоды</i> Дигидрокумарин, умбеллиферон [116].
8	Дубильные вещества	<i>Плоды</i> До 7% [96]. <i>Листья</i> До 15% [96].
9	Тритерпеноиды	<i>Листья</i> Урсоловая кислота, β -ситостерин-D-глюкозид, β -ситостерин, α -амирин [326].
10	Моносахариды	<i>Побеги с листьями</i> Свободные сахара (фруктоза, глюкоза, сахароза), связанные сахара (арабиноза, ксилоза, галактоза, глюкоза, манноза) [97, 456]. <i>Листья и плоды</i> Пентозы (арабиноза, ксилоза) и гексозы (глюкоза, галактоза), с преобладанием вторых [115, 116].
11	Органические кислоты	<i>Листья</i> Левулиновая (доминирующая), малоновая, лимонная, янтарная, бензойная, яблочная, фенилуксусная кислоты [395]. <i>Плоды</i> Янтарная, малоновая, щавелевая, азелаиновая, фумаровая, 2-гидрокси-3-метилглутаровая кислоты [95].
12	Витамины	<i>Листья</i> Аскорбиновая кислота [9].
13	Высшие жирные кислоты	<i>Листья</i> Пальмитиновая (доминирующая), миристиновая, тетракозановая, арахиновая, стеариновая, лауриновая, пальмитолеиновая, трикозановая, капроновая, пентадекановая, геникозановая [375], додекадикарбоновая кислоты [95]. <i>Стебли и плоды</i> Трикозановая, капроновая, пентадекановая, хенейкозановая, гидроксипальмитиновая, пальмитолеиновая, гентизиновая, кислоты [375, 395].
14	Аминокислоты	Корни, стебли, листья, плоды, цветки 8 основных незаменимых (валин, изолейцин, лейцин, метионин, треонин, фенилаланин, лизин, триптофан), кроме того 12 заменимых (аланин, глицин, серин, тирозин, цистеин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, аргинин, гистидин, пролин, глутамин). Содержание уменьшалось в следующем порядке: листья, цветки, плоды, стебли, корни [102, 103, 108, 109, 125].
15	Элементный состав	<i>Корни, побеги, листья и плоды</i> Ca, P, Al, K, Mg, Si, Na, B, Ba, Be, Br, V, Bi, W, Gd, Ga, Hf, Ge, Ho, Dy, Eu, Fe, Au, In, Yb, Y, I, Cd, Co, La, Li, Lu, Mn, Cu, Mo, As, Nd, Ni, Sn, Pr, Hg, Rb, Sm, Pb, Se, Ag, Sr, Sb, Tl, Ta, Ti, Te, Tb, Th, Tm, U, Cr, Cs, Ce, Zn, Zr). Содержание K, Ca, Mg, P, Mn, Fe, Zn, Al, Na, Ba, Rb, B, Sr преобладало [84, 98, 101, 111, 118]. <i>Плоды</i> Na, Ca, Mn, Co, Mo, Cr, Se, K, Mg, Fe, Cu, P, Zn, B, Si, Ni, W, V, As, Li; токсичные – Al, Cd, Hg, Ba, Pb, Bi, Ga, Sn, Sr, Zr, Be, In, Yb, Ag, Ti, Ge) [84, 98, 101, 111, 118].

1.2.8. Фармакологическая активность *Vaccinium uliginosum* L.

Määttä-Riihinen K.R. выявил антиоксидантную активность фракций, полученных из плодов голубики обыкновенной (г. болотной). Методика была основанна на взаимодействии метиллинолеата и ЛПНП человека. В результате было определено, что катехины наиболее активны как агенты, предотвращающие перекисное окисление липидов. По мнению авторов, все фракции хорошо ингибировали окисление метиллинолеата, а по отношению к ЛПНП человека катехины действовали как антиоксиданты [297].

Антиоксидантную активность экстрактов из плодов г. болотной выявили Wang Li-Jin с соавторами. Анализ проводили, ингибируя радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту (ABTS). Выявленную активность авторы обосновывают наличием фенольного комплекса [425].

По-мнению Jung-In Choi с соавторами в основе ретинопротекторного действия экстракта из плодов г. болотной лежит антиоксидантное действие полифенольного комплекса. В эксперименте было доказано, что на фоне введенного натрия селенита, который вызывал окислительный стресс в хрусталике глаза, полифенольная фракция нивелировала окисление [191].

Позднее Буренкова Ю.П. установила антиоксидантную активность фенольных соединений из листьев г. болотной. Для оценки антиоксидантной активности автор использовал метод, основанный на ингибировании автоокисления адреналина в щелочной среде. Выявленный эффект автор связывает со способностью флавоноидов ингибировать альдозоредуктазу [25].

Макаревич А.М. и Решетников В.Н. подтвердили вышеперечисленные результаты относительно антиоксидантной активности экстрактов, полученных из сырьевых источников г. болотной. Авторы установили положительную корреляцию антиоксидантной активности, что очевидно, связано с большим количеством фенольных соединений, включая антоцианы [65].

Фотопротекторное действие экстрактов из плодов г. болотной было определено BaеJi-Young с соавторами на облученных УФ-светом кожных фибробластах человека. Авторы считают, что экстракт ослабляет повреждающее действие, вызванное УФ-светом, которое вызвало выработку активных форм кислорода (АФК) с последующим действием на ДНК по средствам митохондриального комплекса р53 и BADd. Также наблюдалось подавление разрушения коллагена и снижение воспалительных реакций за счет модуляции фактора NF-κB и MAPK-зависимых путей [172].

Choi Jung-In с соавторами выделили полифенольную фракцию из плодов г. болотной по методике Lee B. L. [281]. Антиоксидантное действие полученной фракции в эксперименте

способствовало уменьшению катарактальных явлений за счет ингибирования опосредованного кальпаином протеолиза [191].

По утверждению Ma Lu Yao с соавторами потребление плодов г. болотной ускоряет восстановление остроты зрения при фотообесцвечивании меланина глаз. Ответственной за данный эффект группой БАС являются антоцианы, которые в пигментных эпителиальных клетках сетчатки снижают фактор роста сосудистых эндотелиальных клеток и активируют передачу сигналов Akt, в связи, с чем г. болотная является профилактическим, функциональным продуктом питания при заболеваниях сетчатки глаз [296].

Liu J. с соавторами исследовали экстракт плодов г. болотной по выявлению противоопухолевой активности на культивируемых опухолевых клетках Hep-G2, Caco-2 и 3T3-L1, посеянных в модифицированной среде Игла Дульбекко. В результате наблюдалось подавление роста культивируемых как предраковых, так и злокачественных эпителиальных клеток ротовой полости человека [294].

В эксперименте на животных Тарабанко В.Е. и соавторами была выявлена радипротекторная активность экстракта из плодов г. болотной. На фоне приема экстракта выживаемость мышей увеличивалась от 6,3% до 47-53%. Авторы связывают полученные результаты с наличием антоцианов в исследуемом экстракте. При этом наблюдалось увеличение скорости восстановления красных кровяных телец и тромбоцитов в крови, улучшение минимальных параметров (количество красных кровяных телец и гематокрит) крови после облучения [120].

Из метанольного извлечения, полученного из плодов г. болотной Zhou T. с соавторами, были получены три фракции: органические кислоты и сахара (F1), фенольные соединения (F2), в том числе антоцианы, и проантоцианидины (F3). Антимикробная активность фракций была выявлена, на посевах с патогенами пищевого происхождения (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* и *Vibriopara haemolyticus*). В результате фракция F3 обладала наибольшим антимикробным действием. Наиболее чувствительным штаммом к фракции F3 оказался *V. parahaemolyticus* [456].

Известно, что антоцианы уменьшают воспалительные процессы, а также хронические заболевания, связанные с ожирением. Фенольные кислоты, флавоноиды и процианидины в экстракте из плодов г. болотной отвечают за антибактериальную и противовоспалительную активность, в том числе при метаболическом синдроме. Антоцианы воздействуют на активность ядерного фактор-каппа В (NF-каппаВ) и регуляцию баланса провоспалительных цитокинов, что позволяет рекомендовать экстракт для усиления кератиноцитарного барьера полости рта [296].

Ряд работ, связанных с гипогликемической активностью сырьевых источников, проводились на территории России. В работе Морозова В.Е. и его коллег в эксперименте на животных доказано, что настои из побегов голубики обыкновенной, собранных на территории Хабаровского края, обладают глюкозурической и выраженной гипогликемической активностью [75].

Благодаря выявленному Талановым А.А. и Фурсой Н.С. составу сахаров в различных органах голубики обыкновенной, авторы предположили, что это растение можно использовать при сахарном диабете [107].

Метаболизм антоцианов г. болотной облегчает эндотелиальную дисфункцию, связанную с токсичностью липидов, и снижает сосудистые осложнения, связанные с диабетом, поскольку некоторые из метаболитов могут восстанавливать гликозаминогликаны клеточной поверхности и ослаблять эндотелиальное воспаление. Также увеличивается секреция инсулина, снижается резистентность к нему и усиливается регенерация β -клеток. Полифенолы ингибируют α -амилазу и α -глюкозидазу, способствуя экспрессии глюкозного транспортера 2 типа (GLUT-2) и рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором гамма (PPAR γ), которые контролируют воспалительный путь. Состояние организма при диабете поддерживается тем, что экстракт голубики оказывает антиоксидантный эффект и влияет на течение хронических заболеваний, связанных с ожирением [296].

Экстракт из плодов г. болотной предотвращает хронические заболевания, связанные с ожирением, благодаря содержанию в ней антоцианов и полифенолов. Антоцианы обуславливают подавление трех генов и снижение адипогенного фактора фосфо-Akt (фосфо-протеинкиназы B). Полифенолы подавляют экспрессию генов PPAR и ацетил-КоА-карбоксилазы и повышают экспрессию мРНК. Прием экстракта листьев г. снижает массу тела и улучшает инсулинорезистентность, а также предотвращает ожирение у мышей с диетой с высоким содержанием жиров [296].

Было обнаружено, что олигомерный проантоцианидин в листьях г. болотной может подавлять экспрессию РНК вируса гепатита С. Предварительная обработка антоцианом голубики может подавлять образование активных форм кислорода, предотвращать повреждение митохондрий и даже дисфункцию печени. Полифенолы ингибируют накопление триглицеридов в клетках HepG2. Редокс-ответ, направленный на предотвращение негативного воздействия селенидов на мозг и печень крыс, был связан с содержанием веществ, таких как хлорогеновая кислота и флавоноиды, которые проявляют выраженные антиоксидантные свойства. Гепатопротекторный эффект голубики и хитозана способствовал снижению активности аргиназы в печени и уровня орнитина, а также повышал уровни оксида азота и глутатиона [296].

В ряде литературных источников имеются сведения, что антоцианы г. болотной обладают кардиопротекторным действием (при повреждениях циклофосфамидом), блокируют окислительный стресс и апоптоз кардиомиоцитов, предотвращая их гипертрофию, связанную с норадреналином, путем снижения активности кальпаина и окислительного стресса [296].

Полифенольные соединения г. болотной способны регулировать ремоделирование сосудов и улучшать функцию эндотелия, проявляя антигипертензивные свойства. Фенолокислоты г. болотной способствуют транспорту контролируемых факторов транскрипции Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) антиоксидантных белков в эндотелиальные клетки сосудов. Флавоноиды и полифенолы г. болотной эффективны в регуляции первичной гипертензии из-за подавления активности растворимого ангиотензинпревращающего фермента [296].

Полисахариды г. болотной подавляют скорость роста опухоли, что может обуславливать иммуномодулирующие свойства. Иммунорегуляторный эффект флавоноидов из листьев проявляется подавлением фактора некроза опухолей TNF- α через сигнальные пути и NF- κ B. Полифенолы оказывают посредническую роль на эпигенетические механизмы. Ожирение, вызванное диетой с высоким содержанием жиров, нарушает системную иммунную функцию, оказывая пагубное влияние на Т-клеточную гиперплазию и иммунные способности спленцитов [296].

Фурса Н.С. с соавторами исследовали листья г. болотной, собранные в Архангельской, Вологодской, Ивановской, Костромской, Мурманской, Псковской, Тверской, Ярославской областях, Республике Карелия и Республике Коми (Россия), Витебской области (Беларусь), Львовской и Ивано-Франковской областях (Украина). По мнению авторов фенологликозиды, гидроксикоричные кислоты, которые содержатся в листьях г. болотной, обладают уроантисептическим и мочегонным действием [132].

Талановым А.А. было выявлено актопротекторное и стресспротективное действие экстракта полученного из плодов г. обыкновенной при использовании метода «открытого поля» на лабораторных животных [116].

Nees Н. с соавторами в эксперименте выявил, что свежие плоды г. болотной в эксперименте снижали апоптоз и облегчали гистопатологические исследования мозга крыс, получавших D-галактозу. Авторы утверждают, что антидепрессантные эффекты экстракта могут быть опосредованы контролирующими моноаминергическими системами и глюкокортикоидами, что обусловлено нейропротекторным действием и антагонизмом рецепторов серотонина 5-НТ. Цианид-3-О-галактозид отвечает за защиту ЦНС, улучшая при этом когнитивные и поведенческие функции в процессе старения. Этилацетатная фракция из листьев г. болотной усиливает нейрональную передачу сигналов в головном мозге, опосредуют

функцию памяти и удаление глюкозы, а также замедляют нейродегенерацию за счет внеклеточной сигнальной киназы и белка, связывающий элемент цАМФ-ответа, а также путём нейротрофического фактора головного мозга и экспрессией генов в головном мозге [296].

1.2.9. Химический состав *Vaccinium oxycoccos* L.

Сырьевые источники клюквы болотной представлены основными классами БАС: фенологликозидами, флавоноидами (включая антоцианы), процианидинами, катехинами, фенилпропаноидами, тритерпеноидами, иридоидами, органическими кислотами, витаминами, углеводами, стильбенами и высшими жирными кислотами (табл. 1.6).

Таблица 1.6 – Химический состав различных частей *V. Oxycoccos* L.

<i>№ n/n</i>	<i>Класс соединения</i>	<i>Компонентный состав и морфологическая часть растения</i>
1	Фенолы, фенологликозиды	<i>Побеги</i> Арбутин [159] <i>Плоды</i> β-фенилацетат, β-фенилэтанол [159]
2	Флавоноиды	<i>Плоды</i> Кверцетин, кверцетин-3-О-арабинофуранозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-рамнозид, кверцетин-3-О-ксилозид, кверцетин-3-О-арабинопиранозид, мирицетин, мирицетин 3-О-галактозид, мирицетин 3-О-ксилозид, мирицетин 3-О-арабинопиранозид, мирицетин 3-О-арабинофуранозид, мирицетин 3-О-рамнозид, кемпферол, 3-глюкозид, кемпферол [199, 327]. <i>Побеги</i> Морин, гесперидин, мирицетин, кверцетин, кверцетин-3-О-галактозид и кверцетин-3-О-рутинозид [203].
3	Антоцианы	<i>Плоды</i> Цианидин-3-глюкозид, цианидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид [417], пеонидин-3-О-галактозид [194, 199]. Содержание антоцианов колеблется от 13,6 до 171 мг/100 г [194].
4	Процианидины	<i>Плоды</i> Процианидин димер А (эпикатехин- (2β→7,4β →8)-катехина), димер В (эпикатехин-(4β→8)-катехин), тример А и тример В [293, 297, 418, 422].
5	<i>Катехины</i>	<i>Плоды</i> (+)-катехин и (-)-эпикатехин [297], и (-)-эпигаллолокатехин, и (±)-галлолкатехин, эпигаллолкатехин [86].
6	Фенилпропаноиды	<i>Плоды</i> Хлорогеновая, коричная, феруловая и п-кумаровая кислоты [203] ванильная, протокатехиновая и сиринговая кислоты, кумароилглюкоза, синаповая кислота [194]. Суммарное содержание - 15-20 мг/100 г [194].
7	Иридоиды	<i>Плоды</i>

		Кумароил-иридоидные гликозиды: 10-н-транс- и 10-н-цис-кумароил-1 [179]
8	Тритерпеноиды	<i>Свежие плоды</i> Урсоловая (до 150 мг/100 г), олеаноловая кислоты (до 40 мг/100 г), цис-3-О-п-гидроксициннамоил-урсоловая кислота (12-16мг/100 г) [322], транс-3-О-п-гидроксицинамоил-урсоловая кислота (42-60 мг/100 г) [45, 179]. <i>Семена</i> Урсоловая и олеаноловая кислоты [179].
9	Высшие жирные кислоты	<i>Плоды</i> 20-гидроксидокзановая, 16-гидрокси-10-октогексадекановая, 9,10-эпокси-18-гидроксиоктадец-12-еновая, тригидроксиоктадец-12-еновая, 9,10,-эпокси-18-гидроксиоктадекановая, 9,10,18-тригидроксиоктадекановая, 16-гидроксигексадекановая, 9,10,18- 18-гидроксиоктадец-9-еновая, 10,16-дигидроксигексадекановая и 20-гидроксиэйкозановая кислоты [64, 256]
10	Моносахариды	<i>Плоды</i> Арабиноза (46%), глюкоза (40%), ксилоза (12%) и следовые количества галактозы (2%) [396].
11	Органические кислоты	<i>Свежие плоды</i> Лимонная кислота (4,5г/100 г), щавелевая, винная, салициловая, уксусная, пировиноградная, глиоксиоловая, γ-окси-а-кетомасляная и α-кетоглутаровая кислоты [64].
12	Витамины Свежие плоды	<i>Свежие плоды</i> Аскорбиновая кислота (134 мг/100 г) [179], ретинол (до 0,64 мг/100 г), тиамин (до 0,64 мг/100 г), рибофлавин (до 0,31 мг/100 г), пантотеновая кислота (0,025 мг/100 г), пиридоксин (0,010 мг/100 г), никотиновая кислота (до 0,1 мг/100 г) [7, 64, 139].
13	Элементный состав Плоды	<i>Плоды</i> K, Na, Ca, Mg, P, Fe, Mn, Cu, Z, Pb, Ni, Co, Cr, Ag, Ba, B, Mo, Sn, Sr, Ti, W, I, Si и Al [64].
14	Стильбены Плоды	<i>Плоды</i> Транс-резвератрол [203].
15	Алифатические углеводороды Плоды	<i>Плоды</i> Тритриаконтан, дотриаконтан, трикозан, тетракозан, пентакозан, генейтриаконтан, триаконтан, гексакозан, гептакозан, нонакозан, октакозан [376].

1.2.10. Фармакологическая активность *Vaccinium oxycoccos* L.

J. Cote с соавторами обосновал механизм антимикробного действия экстракта плодов клюквы болотной (к. болотной). Автор считает, что адгезия патогенов ткани хозяина является одним из важнейших предварительных этапов колонизации бактерий и последующей инфекции. Неспособность патогена связываться с клеточной поверхностью приводит к вымыванию микроорганизма, не вызывая контаминации. Исследования механизма адгезии микроорганизма к ткани хозяина привели к пониманию того, что они опосредуются специфическими гликопротеиновыми рецепторами, называемыми фимбриями или лектинами на поверхности

бактериальных клеток, которые могут специфически связываться с сахарами, присутствующими на поверхности слизистых или кишечных клеток ткани хозяина [194].

В клиническом исследовании Jepson R.G. с соавторами пришли к выводу, что употребление клюквенного сока в течение 12 месяцев снижает риск возникновения инфекций мочевыводящих путей, особенно у женщин с рецидивирующими инфекциями мочевыводящих путей (ИМП) [251].

В последнее десятилетие антимикробная активность клюквы была продемонстрирована по отношению к другим группам болезнетворных патогенных бактерий, включая *Helicobacter pylori*, сальмонелл, золотистого стафилококка, кишечной палочки, и кампилобактера.

Исследования Neto C.C. с соавторами показало, что наличие высокомолекулярных компонентов клюквы может также оказывать благоприятное влияние на ингибирование фимбрий штаммов *Helicobacter pylori*. Считается, что это действие против *Helicobacter pylori* оказывает потенциальное ингибирующее действие на развитие язвенной болезни и рака желудка [327].

Puurponen-Pimia с соавторами сообщили о значительном ингибирующем действии различных концентраций экстрактов из плодов клюквы против бактерий рода *Salmonella* и *Staphylococcus*. При использовании сублимированного ягодного порошка 2 мг/мл оба патогенных штамма бактерий были явно поражены [356]. Влияние богатой антоцианами и проантоцианами фракции, выделенной из клюквенного сока, было изучено на антибактериальную активность [287]. Золотистый стафилококк был единственным штаммом, который проявлял некоторую восприимчивость к четырем из 10 исследованных фракций, богатых антоцианом, в то время как переменная восприимчивость была у *Enterococcus faecalis* и *Micrococcus luteus* [194].

В 2015 году Jiadong Sun с соавторами определили, что добавление сока клюквы может ингибировать присутствие бактерий в моче и уменьшать симптомы ИМП, связанные с бактериурией и пиурией [396].

Bodet C. с соавторами в своей научной работе предоставили данные, что клюква также продемонстрировала потенциальный ингибирующий эффект против бактерий, участвующих в кариесе зубов и заболеваниях пародонта [181].

Duarte S. с соавторами в 2006 г. исследовали влияние компонентов клюквы на активность глюкозилтрансферазы В, адсорбированной на покрытой слюной поверхности гидроксиапатита. Их результаты показали, что по сравнению с фракциями (флавонолы, проантоцианидины, антоцианы) экстракт из свежих плодов клюквы демонстрировал самый высокий процент ингибирования глюкозилтрансферазной активности [201].

Фенольные соединения клюквы также могут играть важную роль в борьбе с заболеваниями пародонта – группой воспалительных заболеваний, инициируемых специфическими грамотрицательными бактериями, которые приводят к разрушению соединительной ткани. Гингивит (воспаление десен) и пародонтит (прогрессирующее разрушение опоры зуба – пародонтальной связки и альвеолярной кости) в основном вызваны инфекциями *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia*.

Влияние проантоцианидина А-типа на ингибирование роста бактерий можно объяснить несколькими механизмами - дестабилизацией цитоплазматической мембраны, проницаемостью клеточной мембраны, ингибированием внеклеточных микробных ферментов, прямым действием на микробный метаболизм и лишением субстратов, необходимых для микробного роста. Известно, что проантоцианидины образуют комплексы с металлами, что связано со свойствами О-дифенольной группы, с чем связывают отрицательный эффект в отношении биодоступности основных микроэлементов, особенно железа и цинка. Уменьшение концентрации железа ограничивает рост бактерий. Авторы сделали вывод, что способность связывать железо представляет собой еще один механизм, посредством которого проантоцианидины ингибируют бактериальную активность [194].

Dorota Wojnicz с соавторами в своей научной статье привели сведения о том, что кишечная палочка теряет способность к адгезии на клетках мочевого пузыря у людей, которые употребляли клюквенный сок, клюквенный порошок или проантоцианидины, извлеченные из плодов клюквы [439].

Антиоксидантные свойства клюквы болотной характеризуют ее как одной из лучших среди многих других плодов благодаря химическому составу, представленному производными бензойной и коричной кислот, а также флавонолами. Экстракты клюквы (обработанный клюквенный сок) различаются по содержанию различных групп фенольных соединений и способности к продуцированию свободных радикалов. При употреблении клюквы увеличилась антиоксидантная способность плазмы и снижалась концентрация окисленных ЛПНП у мужчин [372].

Jeffrey B. Blumberg с соавторами в своей научной работе предоставили аналогичные данные о влиянии клюквенного сока на антиоксидантную активность и циркулирующие в плазме крови, окисленные ЛПНП у женщин с метаболическим синдромом. Антоцианы проявляли активность по защите от свободных радикалов и демонстрировали антиоксидантную активность в липидсодержащих гидрофильных средах, так как в них были эмульгированы липиды разной плотности. Было показано, что антоциановые изоляты и богатые антоцианами смеси биофлавоноидов обеспечивали защиту от перекисного окисления липидов [179].

Kaisu R. с соавторами утверждают, что антиоксидантный эффект антоцианов будет варьироваться в зависимости от вида и сорта клюквы. Димерные и олигомерные процианидины типа-B обладают большей активностью по отношению к радикалам перерикиси водорода, чем катехины, что, вероятно, связано с наличием у них интерфлавоноидной связи, увеличивающей электрон-делокализационную способность фенильного радикала. Полимеризованные цепи катехиновых мономеров, образующих процианидиновые тримеры, обычно обладают пониженной способностью предотвращать радиационное повреждение липидной системы, но их антиоксидантная активность повышается в водной фазе [297].

Zheng W. с соавторами сообщили, что антоцианы обуславливают 54,2% результата антиоксидантной активности клюквы, в то время как вклад флавонолов составляет 34,6% [455].

Когда Porter M.L. с соавторами сравнили антиоксидантную активность шести фракций фенольных соединений плодов клюквы, производных коричной кислоты, антоцианов, флавонолов и проантоцианидинов, они обнаружили, что фракции, содержащие тримеры, гептамеры, пентамеры проантоцианидинов, более эффективно ингибируют окисление ЛПНП [350].

Xiangjiu He и Rui Hai Liu изучали антиоксидантную активность 20 соединений, выделенных из плодов клюквы, три соединения (урсоловая кислота, кверцетин и 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол-3-O- β -D-глюкопиранозид) проявляли высокую антиоксидантную активность. Авторами было проведено сравнение этих веществ с аскорбиновой кислотой по антиоксидантной и антипролиферативной активности в отношении клеток HepG2 [229].

Кверцетин как один из основных компонентов экстракта из плодов клюквы болотной может связывать Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} и Zn^{2+} . Наиболее предпочтительной частью в химической структуре кверцетина для связывания Fe^{2+} и Fe^{3+} является С-кольцо. Секвестрация и последующее истощение свободного железа могут ослаблять выработку стимулируемых железом радикалов и ингибировать поглощение бактерий и железа опухолями [226].

Влияние флавоноидов клюквы оценивали по влиянию на линии опухолевые клетки мочевого пузыря человека (PT4, SCABER, и SW-780) и не онкогенными клеток человека (SV-SK). В испытании были: кверцетин-3-O-глюкозид, изорамнетин, мирицетин и кверцетин, которые демонстрировали высокий дозозависимый ингибирующий эффект на клеточный рост раковых клеток в мочевом пузыре с IC_{50} значений в диапазоне 8-92 μ M. Кроме того, изорамнетин и мирицетин обладали очень низкой ингибирующей активностью против SV-HUC даже при испытании в высоких концентрациях (>200 μ M) по сравнению с клетками рака мочевого пузыря, что указывает на их специфическую цитотоксичность для раковых клеток. Полученные данные позволили авторам предположить, что изорамнетин и кверцетин-3-O-глюкозид могут быть активными формами в профилактике рака мочевого пузыря и

подчеркивают важность метаболизма для профилактики рака мочевого пузыря диетами, богатыми клюквой [250].

Однако кверцетин-3-О-глюкозид проявлял наиболее высокую активность среди исследованных флавоноидов. Поскольку глюкуронидирование широко рассматривается как этап детоксикации в метаболизме кверцетина, глюкуронид кверцетина не проявлял ингибирующий эффект на рост в линиях опухолевых клеток мочевого пузыря [310, 333].

По мнению Jeevan K.P. и соавторов хиноны являются окислителями и электрофильными по своей природе, а воздействие этих химических веществ, как известно, цитотоксично. Биологическая активность полифенолов может опосредоваться внутриклеточными метаболитами хинон/метид хинона. Кверцетин в более высоких концентрациях ($>100 \mu\text{M}$) генерирует токсические хиноны, которые проявляют цитотоксический и апоптотический эффекты. Таким образом, кверцетин может выступать в качестве прооксиданта и токсичного полифенола. Однако, метиды хинона/хинон реактивны, их стабильность варьирует от минут и часов и, следовательно, они относительно нестабильны [250].

Yifei Wang с соавторами провели исследование, которое показало, что кверцетин, полученный из экстракта клюквы, влияет на активность развития рака яичников. По сравнению с кверцетиновыми гликозидами агликон кверцетин проявлял более высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток. Кверцетин индуцировал апоптоз и повышал чувствительность к цисплатину в раковых клетках [432].

Ajay P. с соавторами изучили пролиферативную способность проантоцианидиновой фракции из плодов клюквы. Данная работа показывает, что проантоцианидиновая фракция эффективна в качестве хемосенсибилизаторов, значительно снижая дозировки химиотерапевтических средств, необходимых для достижения аналогичной или улучшенной эффективности химиотерапии. При одновременном приеме проантоцианидиновой фракции испытуемой группой пациентам разрешено было снизить дозу параплатина, при этом сохранялся основной терапевтический эффект. Было показано, что экстракты клюквы ингибируют экспрессию матричных металлопротеиназ, связанных с миграцией опухолей и пролиферацией в клетках опухоли яичников. Авторы утверждали, что цитотоксичность наблюдалась за счет проантоцианидиновой фракции, но вполне вероятно, что другие компоненты клюквы, такие как кверцетин и урсоловая кислота, способствовали ингибированию матричных металлопротеиназ. Данное исследование свидетельствует о том, что лечение проантоцианидиновой фракцией клюквы клеток рака яичников приводило к значительным морфологическим изменениям, связанных с апоптозом и последующему ингибированию матричной металлопротеиназы [388].

Miwako Kondo с соавторами изучили пролиферативную способность урсоловой кислоты, полученной из плодов клюквы. Она показала ингибирующую способность по отношению к клеткам рака молочной железы, шейки матки, легких и лейкоза [313].

Xiangjiu He с соавторами в своем научном труде подтвердили антипролиферативную способность кверцетина и урсоловой кислоты по отношению к раковым клеткам молочной железы, а также по отношению к раковым клеткам печени [229].

Каскады, включающие фосфорилирование или дефосфорилирование белков сигнальной трансдукции, в конечном счете, влияют на активность факторов транскрипции белков, которые стимулируют или ингибируют транскрипцию различных генов. Считается, что благодаря этому механизму фенолы могут вмешиваться в несколько этапов, ведущих к развитию злокачественных опухолей, включая инактивацию канцерогенов и ингибирование экспрессии мутантных генов. Фенолы могут активировать ферментативную систему детоксикации (фаза II) и предотвратить окислительное повреждение ДНК - важный фактор в возрастном развитии рака.

Доказано, что эллаговая кислота является мощным антиканцерогенным средством. Одним из основных механизмов, с помощью которых эллаговая кислота может оказывать противоопухолевое действие, является модуляция метаболизма токсинов окружающей среды, предотвращая тем самым инициацию канцерогенеза, индуцированного этими химическими веществами. Исследования уже показали, что эллаговая кислота является мощным ингибитором ДНК-топоизомеразы, которые вовлечены в канцерогенез [194].

Seeram N.P. сообщил, что экстракт плодов клюквы (200 мкг/мл) может ингибировать пролиферацию опухолевых клеток полости рта, толстой кишки и предстательной железы человека [379].

Аналогичные эффекты в своем исследовании наблюдали He X. and Lui R.H., проведенном, с некоторыми очищенными фракциями плодов клюквы, включая общую фенольную фракцию (200 мкг/мл), антоциановую фракцию (7,1 мкг/мл), проантоцианидиновую фракцию (6,5 мкг/мл). Кверцетин (40,90 μM) и кверцетин глюкозид (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол-3-О- β -D-глюкопиранозид - 49,22 μM), выделенные из клюквы болотной, также ингибировали пролиферацию раковых клеток печени человека [229].

Данные, полученные Neto C.C. с соавторами, утверждают, что фенольные соединения плодов клюквы предотвращают рак путем снижения клеточной инвазии и метастазирования, ингибируя активность матриксных металлопротеиназ и воспалительных процессов, включая активность циклооксигеназы. Проантоцианы клюквы ингибировали рост карцином легких, аденокарциномы толстой кишки, рака шейки матки и хронический миелолейкоз клеток K562 в диапазоне 20-110 $\mu\text{g/l}$, а олигомер проантоцианидина, состоящий из 4-7 единиц эпикатехина с 1

или 2 типами связей, может ингибировать рост опухолей легких, толстой кишки и лейкемии в дозе от 20 до 80 мкг/мл [327].

Madrigal-Santillán E. с соавторами в своём исследовании показали, что экстракт плодов клюквы (экстрагент – спирт этиловый 70%) значительно предотвращает повреждение, индуцируемое бензо(α)пиреном у мышей, тем самым снижая частоту образования микроядер. По мнению авторов это связано с антиоксидантным действием экстракта [299].

По мнению Mora S. и соавторов атеросклероз является воспалительным заболеванием, что связано с изменением С-реактивного белка (СРБ) и других биомаркеров воспаления, сигнализирующих о риске сердечно-сосудистой системы (ССС) [319]. Употребление свежих плодов клюквы и продуктов её переработки оказывали противовоспалительное действие и снижали концентрацию воспалительных цитокинов в эксперименте. Несколько исследований показывают, что биоактивные вещества плодов клюквы подавляют активацию макрофагов и Т-клеток, подвергающихся воздействию соответствующих противовоспалительных агентов [180, 241].

В исследовании Zhu Y. с соавторами сообщается, что потребление очищенной смеси антоцианов в количестве 320 мг/сут приводит к значительному снижению уровня СРБ, растворимой белковой молекулы адгезии сосудистых клеток (VCAM-1) и плазменного интерлейкина-1 у пациентов с гиперхолестеринемией [457].

Youdim K.A. с соавторами обнаружили, что антоцианы плодов клюквы оказывают аналогичное действие на микрососудистые эндотелиальные клетки и действуют на снижение экспрессии молекулы межклеточной адгезии и моноцитарного хемотаксического протеина-1 после воздействия противовоспалительных цитокинов [448].

Имеются сведения, что клюква влияет на обмен липидов в печени. В исследовании было показано, что клюквенный экстракт из плодов может защитить от двух основных метаболических осложнений ожирения, резистентности к инсулину и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), независимо от изменений массы тела или ожирения. Заметное снижение отложения жира в печени на фоне применения экстракта из плодов клюквы мышами сопровождалось снижением активности печеночной инактивации, о чем свидетельствовало снижение экспрессии мРНК, фактора некроза опухоли альфа (TNF-α). Важно отметить, что более низкий уровень малонового диальдегида (МДА) в печени мышей указывало на снижение перекисного окисления липидов. Возможно, это объясняется более низкой доступностью триглицеридов в печени мышей, получавших клюквенный экстракт. Кроме того, клюквенный экстракт может противодействовать АФК-индуцированному перекисному окислению липидов в печени, облегчая воспаление и тем самым снижая образование АФК [268].

Shannon L. с соавторами обнаружили, что лечение экстрактом плодов клюквы (200 мг/кг один раз в день) пероральным введением в течение 8 недель не только влияло на вес печени и уровень печеночных триглицеридов, но и значительно снижало конечную массу тела и массу висцеральной жировой ткани. Добавление экстракта в рацион ослаблял воспалительные процессы, связанные с прогрессированием стеатоза до стеатогепатита, и обеспечивал дополнительную поддержку эффективности этого пищевого продукта для смягчения неалкогольной жировой болезни печени [219].

Marcia da Silva Pinto с соавторами провели исследования, результаты которого свидетельствуют о том, что водный экстракт из плодов клюквы может быть рекомендован при лечении гипергликемии через его способность к ингибированию α -глюкозидазы одновременно с низким ингибированием α -амилазы, в результате чего наблюдалось уменьшение нежелательных побочных эффектов. Таким образом, авторы обосновали возможность использования экстракта плодов клюквы при лечении диабета типа 2 и связанной с ним гипертонии [347].

Ahmed A. с соавторами провели научное исследование свойств плодов клюквы против кардиомиопатии. Клинические и экспериментальные исследования показали, что повышенный окислительный стресс играет критическую роль в последующей кардиомиопатии и сердечной недостаточности, связанных с лечением доксорубицином (ДОКС). Способность клюквенного экстракта защищать от ДОКС-индуцированной высокой смертности и интенсивности выпота считалась ранним признаком кардиопротекции. Это было подтверждено электрокардиограммой (ЭКГ). У крыс в группе ДОКС наблюдалось снижение частоты сердечных сокращений, депрессия сегмента ST и удлинение интервалов ST и QT. Эти изменения отражали аритмию, нарушения проводимости и ослабление функции левого желудочка. Введение экстракта плодов клюквы заметно уменьшало окислительный стресс у группы мышей, которым вводили ДОКС. Кроме того, активность антиоксидантных ферментов каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы была значительно снижена, в то время как активность миелопероксидазы была значительно повышена в ответ на введение ДОКСа по сравнению с контрольными крысами. Результаты исследования показали, что клюквенный экстракт смягчил снижение активности антиоксидантных ферментов. В частности, защитные свойства экстракта клюквы авторами были связаны с проантоцианидинами. Данная группа подавляла повреждения ДНК, индуцированных ДОКС [207].

1.3. Ботанико-таксономическая характеристика рода *Prunella* L.

Род *Prunella* L., по классификации системы магнолиофитов А.Л. Тахтаджяна относится к семейству яснотковые (*Lamiaceae*), подсемейство *Lamioideae* [408].

В мировой флоре числятся около 15 видов рода *Prunella* L. [85], из которых три обитают на территории России. Распространенным видом является *Prunella vulgaris* L., также известная как черноголовка обыкновенная. Она представлена в Европе, на Кавказе, в Западной и Северной Сибири, а также в Средней Азии. Другими видами являются *Prunella laciniata* L. (черноголовка разрезная) и *Prunella grandiflora* L. (черноголовка крупноцветковая). Эти виды распространены в Восточной Европе, на среднем и южном Урале, а также на Кавказе [17, 43, 138]. При сомestном произрастании встречаются гибридные формы черноголовок (*P. bicolor* G. Beck. – *P. grandiloquent* x *P. laciniata* L.; *P. intermedia* Link. – *P. vulgaris* L. x *P. laciniata* L.) [129, 138].

Род *Prunella* L. – травянистый многолетник с характерным ползучим корневищем. Стебель приподнимающийся, чаще прямостоячий. Листья черешковые, за исключением верхних пар, которые обычно имеют яйцевидную или продолговатую форму. Цветки собраны в поникающие мутовки (в головчатые или колосовидные соцветия). Соцветия чаще яйцевидной, реже продолговатой формы. Венчик у черноголовок двугубый, фиолетовый, сине-фиолетовый, красноватый или желтоватый (в зависимости от вида) (Приложение 1, табл. 3) [43, 129, 408].

1.3.1. Химический состав рода *Prunella* L.

С начала прошлого столетия многие исследователи изучали химический состав различных видов рода *Prunella* L., данные о котором представлены в виде таблицы. 1.7 [1, 151].

Таблица 1.7 – Химический состав различных частей видов рода *Prunella* L.

<i>Prunella vulgaris</i> L.		
№ n/n	Класс соединения	Компонентный состав и морфологическая часть растения
1	Фенологликозиды	<i>Соцветия</i> 5-О-β-D (6'-салицил)-глюкопиранозид гентизиновой кислоты [87, 222].
2	Флавоноды	<i>Трава</i> Кверцетин [38, 39, 81], кемпферол (содержание в цветках – 0,03%; в листьях – 0,05%; в стеблях – 0,02%; в корнях – 0,02%), рутин (содержание в цветках – 0,25%; в листьях – 0,48%; в стеблях – 0,12%; в корнях – 0,02%) [136], изокверцитрин, гиперин, гиперозид, 7-О- β-D-глюкопиранозид апигенина (содержание в цветках – 0,03%; в листьях – 0,03), 3-О-β-D-галактозид кверцетина, 3-О-α-L-рамнопиранозид кемпферола, 3-О- β-D-глюкопиранозид кемпферола, 5,7,3',4'-тетраоксифлавоон (лютеолин), 3-О- α -L-рамнопиранозид кверцетина, 5,7,3',4'-тетраокси-6- О- β-D-глюкопиранозил флавоон, 5,3',4'-триокси-7- О- β-D-глюкопиранозил флавоон (цинарозид) [37, 39, 290]. В траве сумма флавоноидов до 20 мг/г [16].
3	Фенилпропаноиды	<i>Трава</i> Кофейная (до 0,64 мг/г), сиреневая (до 2,8 мг/г) розмариновая

		(до 31,2 мг/г), феруловая (до 0,44 мг/г), п-кумаровая (до 0,8 мг/г) [2, 11, 12], хлорогеновая, неохлорогеновая, и п-гидроксикоричная кислоты [37, 38, 240]. <i>Соцветия</i> 3,4,α-тригидроксиметил фенилпропионат, 3,4,α-тригидроксибутилфенилпропионат [85, 290], п-кумаровая кислота, метилрозмаринат, этилрозмаринат, бутилрозмаринат, этилкофеат [18].
4	Кумарины	<i>Трава</i> Умбеллиферон, эскулетин, скополетин, содержание кумаринов (от 0,26 - 0,40%) [36].
5	Углеводы и их производные	<i>Трава</i> Рафиноза, прунеллин [269, 324, 404]
6	Моно- и сесквитерпеноиды	<i>Трава</i> Камфора, фенхон, цис-эудесма-6,11-диен, 1,10-диэпикубенол, спатуленол, гермакрен D [320].
7	Дитерпеноиды	<i>Соцветия</i> Таншинон [224], фитол [85, 283].
8	Тритерпеноиды	<i>Соцветия</i> Вульгарсапонин А, 16-оксо-17-деметил-3β,24-дигидроксиолеан-12-ен-3-О- β-D-глюкорозид (прунеллозид А) [224]. <i>Трава</i> β-амирин, урсоловая, олеаноловая [313, 314, 315, 343] и бетулиновая кислоты, арыонглюкозид I, нига-ичигозиды F1,F2, серикозид, привулозиды А, В, 2α, 3α-дигидроксиурс-12-ен-28-овая кислота [313], 2α-гидроксиурсоловая кислота, 3β-гидроксиолеан-12-ен-28-аль, олеан-12-ен-3β,28-диол-28-аль, урсан-12-ен-28-аль, урсан-12-ен-3β,28-диол [450, 452], 23-гидроксиурсоловая кислота, (3β,4β,16α)-17-карбокси-16,24-дигидрокси-28-норолеан-12-ен-3-ил-4-О- β-D-ксилопиранозил-β-D-глюкопиранозидуруновая кислота, метиловый эфир, метиловый эфир (3β,4β,16α)-17-карбокси-16,24-дигидрокси-28-норолеан-12-ен-3-ил-β-D-глюкопиранозидуруновая кислоты, эфир (3β,4β)-24-гидрокси-16-оксо-28-норолеан-12-ен-3-ил-4-О-β-D-ксилопиранозил- β-D-глюкопиранозидуруновая кислота, 2α,3α,24-тригидроксиурса-12,20(30)-диен-28-овая кислота, 2α,3α,24-тригидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота, 2α,3β-дигидроксиурс-12-ен-28-овая кислота, 2α,3α,24-тригидроксиурс-12-ен-28-овая кислота [316], 2α,3β-дигидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота [317], 3-О-(6'-бутирил)- β-глюкопиранозид 3,16,24-тригидроксиолеан-12-ен-28-овой кислоты (вульгарсапонин В) [308, 312, 313, 319], 3β,13β-дигидроксиолеан-11-ен-28-овой кислоты [319, 378, 433].
9	Дубильные вещества	<i>Трава</i> До 7 % [85].
10	Стероиды	<i>Трава</i> Стигмастерин, стигмаст-7-ен-3β-ол; в траве – β-ситостерин, α-спинастерин, даукостерин, (22E,20S,24S)-стигмаста-7,22-диен-3-он; соцветиях – стигмаста-7,22-диен-он [223].
11	Антоцианы	<i>Соцветия</i> Пеларгонидин, производные цианидина и дельфинидина [18,

		37].
12	Антрахиноны	<i>Соцветия</i> Реин [87,223].
13	Азотсодержащие соединения	<i>Трава</i> Мелатонин. <i>Соцветия</i> Ацетат аурантиамида [188].
14	Полиацетиленовые соединения	<i>Трава</i> Октадека-9,11,13-трииновая и транс-октадец-13-ен-9,11-дииновая кислота [447].
15	Витамины	<i>Трава</i> Витамин С, каротин [85].
16	Высшие жирные кислоты	<i>Трава</i> Октадеценовая кислота [33, 85].
17	Иридоиды	<i>Трава</i> Сумму иридоидов [85].
18	Жирное масло	<i>Семена</i> Жирное масло (до 16 %) [87].
19	Элементный состав	<i>Соцветия</i> K>Ca>Si>Mg>P>Al>Fe=Mn=Na> Sr>Zn>Cu>Ni>Pb>Co>Mo>Cd=As=Hg [135].
<i>Prunella grandiflora L.</i>		
1	Флавоноиды	<i>Соцветия</i> Гиперозид. <i>Трава</i> Кверцетин, , 3-глюкозид кверцетина, кемпферол, рутин [18, 230]. В траве сумма флавоноидов до 19 мг/г [16].
2	Фенилпропаноиды	<i>Трава</i> Кофейная (до 1,6 мг/г), сиреневая (до 6,59 мг/г) розмариновая
3	Углеводы и их производные	<i>Соцветия</i> (до 52,3 мг/г), феруловая (до 8,2 мг/г), п-кумаровая (до 3,82 мг/г) [2, 11, 12], хлорогеновая, неохлорогеновая, и 4-кофеоилхинная кислоты [18, 87]. Вербаскоза [230]. <i>Листья</i> Седогептуроза [230].
4	Тритерпеноиды	<i>Трава</i> Урсоловая и олеаноловая кислоты [83].
<i>Prunella laciniata L.</i>		
1	Флавоноиды	<i>Трава</i> Кверцетин, кемпферол, рутин, 3-О-глюкозид кемпферола, 3-О-глюкозид кверцетина [18].
2	Фенилпропаноиды	<i>Трава</i> Неохлорогеновая, кофейная, хлорогеновая, 4-кофеоилхинная кислоты [18, 87].
3	Углеводы и их производные	<i>Трава</i> Рафиноза [324].

1.3.2. Фармакологическая активность видов рода *Prunella* L.

Около 200 лет виды чернойголовки используются в традиционной медицине Китая [85]. Это объясняется широтой биологической активности различных частей этих растений [2, 13, 14, 34, 35]. В некоторых странах чернаяголовка обыкновенная (ч. обыкновенная) является фармакопейным видом [182, 208, 343], на территории Китая она признана официальным растением и используется в составе различных сборов. В настоящее время наряду с имеющимся большим объемом сведений о составе ее биологически активных веществ ученые различных стран продолжают фитохимические исследования растения [212, 389].

Исходя из доступных литературных данных, виды рода *Prunella* L. широко применяются в качестве гемостатических, ранозаживляющих, противовоспалительных, антимикробных, жаропонижающих, отхаркивающих, тонизирующих и антикомплементарных средств [13, 14, 15, 342, 300]. Эти виды проявляют эффективность в следующих случаях: рак щитовидной железы, средостении, лимфогранулематоз, лимфома, бронхит, респираторные заболевания, кровохарканье, импетиго, псориаз, скрофулез, себорея, эксудативный диатез, ларингит, нефрит, геморрой, диарея, туберкулез горла, кожи и легких, дифтерия, дизентерия, гипертензия, артрит, ревматический полиартрит, лимфаденит, гипертиреоз, тиреотоксикоз, гастралгия, эпилепсия, цинга, лейкорея, мастит, митрит, кольпит, ушибы и вывихи [33, 85].

Zheng M.S. и Zhang Y.Z. По результатам исследования, проведенного, с использованием системы ИФА обнаружили положительные показатели на наличие антител к гепатиту В (HBsAg) у различных растений, произрастающих в Китае. Особенно высокую активность продемонстрировал экстракт из травы чернойголовки обыкновенной [454].

Клинически было подтверждено целесообразное использование водного экстракта из этой травы в случаях герпетического кератита, так как наблюдается производство антител к вирусу типа 1 (HSV1). Дополнительно было выявлено влияние полисахаридов чернойголовки обыкновенной на вирус простого гриппа 2 (ВПГ-2) при концентрации 20,1 мкг/мл, а также наблюдалась эффективность против штаммов ВПГ-1, устойчивых к ацикловиру [189, 365, 451].

В процессе исследования, проведенного Tabbal H.D. и его коллегами, было выявлено, что в водном экстракте травы чернойголовки обыкновенной содержатся полисахариды, обладающий активностью в отношении ВИЧ.

В 1993 году Yamasaki K. с соавторами обнаружили растения, эффективные при лечении заболевания ВИЧ-1 [404]. Одним из таких растений была чернаяголовка обыкновенная, экстракт которой в концентрации 16 мкг/мл снижал репликацию ВИЧ-1 [442]. Впоследствии и другие авторы подтвердили влияние водного и спиртового экстрактов из травы чернойголовки обыкновенной в различных концентрациях на способность тормозить активность ВИЧ-1 [274].

Наиболее активное воздействие на лимфоциты было обнаружено у экстракта, полученного из различных растений и содержащего клеточную киназу, гомологичную Src 2. Хомякам был введен метанольный экстракт из травы черноголовки обыкновенной в дозе от 0,1 до 1000 мкМ. По результатам исследования было выявлено, что данный экстракт снижает экспрессию генов интерлейкин-2 на 50% в клетках линии юркат при концентрации 8 мкМ, а также оказывает влияние на уровень внутриклеточного кальция после активации Т-клеток (в концентрации от 1,4 до 140 мкМ) [162].

Guo J. с соавторами рекомендовали использование отвара из травы черноголовки обыкновенной для лечения доброкачественной гиперплазии предстательной железы [225]. Эксперименты доказали, что экстракт травы черноголовки обыкновенной может быть использован в качестве эффективного лечебного средства для эстроген-зависимых процессов, таких как эндометриоз, рак матки и молочной железы, как показали исследования [193].

В результате эксперимента Wang Y. с соавторами установил, что при употреблении в пищу ч. обыкновенной у животных страдающих поражением печени наблюдалась пролиферация поврежденных тканей [430].

Feng L. с соавторами из травы черноголовки обыкновенной выделил олеаноловую кислоту и определил ее влияние на клетки аденокарциномы легких [212]. Фотопротекторное действие фенольных соединений ч. обыкновенной изучала Psotova J. с соавторами. В исследовании оценивали защитные функции фенольного комплекса УФ излучения на кератиноциты человека линии (HaCaT). Экстракт травы в концентрациях от 1 до 75 мг/л (в течение 4 часов) подавлял генерацию активных форм кислорода, уменьшал внутриклеточное перекисное окисление липидов, повышал уровень АТФ и глутатиона [354].

Lee H. и Lin J.Y. установили антимуtagenные свойства экстракта травы черноголовки обыкновенной [282]. Fang X. и его коллеги провели исследование, в результате которого было открыто иммуномодулирующее свойство травы черноголовки обыкновенной. Они обнаружили, что фракция, содержащая полисахаридный комплекс, стимулирует выработку оксида азота из клеток макрофагов (типов клеток иммунной системы) родственных видов - RAW264.7 и BV2 клеток головного мозга мышей [210]. В ходе дальнейших исследований, проведенных Harput U.S. и его коллегами, было обнаружено, что водные экстракты как черноголовки обыкновенной, так и черноголовки разрезной также обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным действием [228].

Tony Yuqi Tang в своей работе установил, что настой из травы черноголовки обладал иммуносупрессивным эффектом, не вызывая нежелательных побочных явлений при длительном применении. Кроме того, этот настой оказался надежным при сопутствующих заболеваниях, таких как гипертония, сахарный диабет и язвенная болезнь желудка [409].

Jun M.S. с соавторами была исследована активность спиртового экстракта цветков двух видов черноголовки - обыкновенной и разрезной - в лабораторных условиях. Исследования, проведенные Jun M.S. и его коллегами, показали противовоспалительное действие данных экстрактов. В связи с этим авторы рекомендуют использование данных экстрактов в качестве перспективных противовоспалительных средств, применяемых при сепсисе [254].

Позднее исследование, проведенное Lee S.W. и его соавторами, было посвящено изучению противовоспалительной активности фитокомплекса, полученного из растения клематис маньчжурский, трихозанта кириллова и черноголовки обыкновенной на хондроцитах крыс линии RCJ3.1C.18.

В результате исследования было установлено, что экстракт обладает противовоспалительной активностью, которая, по мнению авторов, связана с ингибированием апоптоза хондроцитов [286]. В 2007 году Song Y.W. с соавторами подтвердили эффективность использования фитокомплекса из трех растений, в том числе травы черноголовки обыкновенной при лечении остеоартрита [391].

Zdarilová A. с соавторами рассмотрели возможность использования экстракта из травы черноголовки обыкновенной при пародонтите и хроническом гингивите в дозе 5, 10 и 25 мкг/мл. Научно-исследовательская группа во главе с Zdarilová A. рассмотрела возможность применения экстракта травы черноголовки обыкновенной для лечения пародонтита и хронического гингивита. В ходе клинических испытаний было установлено, что использование экстракта с дозировками 5, 10 и 25 мкг/мл положительно сказывается на состоянии заболевания. Исследователи рекомендуют использовать экстракт черноголовки обыкновенной в лечении пародонтита и хронического гингивита [449].

Совместно с коллегами, Shin T.Y. проводил исследование аллергической реакции немедленного типа с использованием антигистаминного водного экстракта травы черноголовки обыкновенной. Для этого они инъектировали крысам экстракт в различных дозировках, варьирующихся от 0,005 до 1 г/кг. В результате наблюдались дозозависимые изменения уровня гистамина в крови [386].

Psotova J. с соавторами на изолированных кардиомиоцитах крыс определяли кардиопротекторную активность этилацетатной фракции из травы черноголовки обыкновенной. Исследования указали на кардиопротекторную активность этой фракции в диапазоне концентраций от 0,005 до 0,05 г/мл. Более того, ее применение демонстрировало цитопротекторный эффект, способствующий сохранению и защите клеток организма [355].

Исследование, проведенное Skottova N. и ее коллегами, показало, что экстракт из травы черноголовки обыкновенной эффективно снижает уровень сахара в крови у экспериментальных животных [389]. Другое исследование, проведенное Zheng J. с и его соавторами, привело к

выводу, что при дозировке 100 мг/кг, экстракт травы черноголовки обыкновенной усиливает антигипергликемическое действие экзогенного инсулина [453].

После введения 500 мкг фенольного комплекса, выделенного из травы черноголовки обыкновенной, после 1 часа, было замечено значительное снижение уровня глюкозы, которое произошло за счет препятствия глюконеогенезу и гликогенолізу. Эти результаты позволяют заключить, что экстракт черноголовки обыкновенной может снизить риск развития сахарного диабета второго типа[416].

В китайской медицине обнаружено, что трава ч. обыкновенный имеет лечебное действие при дисменорее, связанной с эндометриозом. Ученые Huang J.C. и его коллеги провели экспериментальные исследования на клетках Ishikawa, используя свежесобранную траву ч. обыкновенной. В результате исследования было зафиксировано подавление пролиферации эпителиальных клеток, полученных от человеческого эндометрия [239].

Позже Xiang T. и его коллеги провели клинические исследования, чтобы оценить эффективность и безопасность применения ч. обыкновенной для лечения дисфункциональных маточных кровотечений (ДМК). Большинство женщин, участвующих в эксперименте, заметили остановку кровотечения и восстановление нормального менструального цикла в определенные сроки [414].

Был рассмотрен фитокомплекс в качестве препарата для защиты печени, состоящий из ч. обыкновенной. На крысах с алкогольным поражением печени проводились исследования. В течение двадцати дней анализируемый фитокомплекс демонстрировал защитное действие на печень в условиях гепатоза. Данная работа была финансирована грантом сеульского медицинского национального университета (Фонд Гранта KRF-005-F00077) [173].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Таким образом, критический анализ литературных источников позволил сделать вывод, что некоторые растения рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. широко распространены в различных частях мировой флоры. Род *Arctostaphylos* Adans. на территории России представлен двумя видами, при этом один из них представитель Кавказа. Род *Vaccinium* L. – 13 видами, 4 из которых произрастают на Кавказе; род *Prunella* L. – 3 видами, все они встречаются во флоре Кавказа. Некоторые из них являются типичными представителями Кавказа и Закавказья, такие как черника кавказская, черника обыкновенная, брусника обыкновенная, три вида черноголовки и толокнянка кавказская. Видовая принадлежность последнего среди ряда ученых имеет дискуссионный характер. Также было отмечено, что химический профиль основных групп БАВ одних и тех же видов зависит от ареала произрастания, климатических условий, режимов консервации сырья. Кроме того, в Европе было зафиксировано скрещивание видов (*V. vitis-idaea* x *V. myrtillus*), приводящее к образованию гибридного вида (*Vaccinium* x *intermedium* Ruthe L.). Способность образовывать гибридные формы также наблюдается среди видов рода *Prunella* L. При совместном произрастании встречаются гибридные формы черноголовок (*P. bicolor* G. Beck. – *P. grandiloquent.* x *P. laciniata* L.; *P. intermedia* Link. – *P. vulgaris* L. x *P. laciniata* L.). Гибридные формы зачастую, кроме набора анатомо-морфологических признаков родительских экземпляров, приобретают за счет гибридизации новые признаки, в том числе изменения наблюдаются и в химическом составе, следовательно, и в биологической активности.

2. Учитывая способность некоторых видов образовывать, гибридные формы целесообразно рассмотреть возможность введения в перечень методик определения подлинности метод секвенирования генома. При этом в качестве показателей подлинности учитывать не только профиль генома, а также хемотаксономические маркеры для вида или целого рода, отвечающие за основные виды фармакологической активности.

3. Известно, что некоторые вышеперечисленные растения в нашей стране недостаточно хорошо изучены, в частности растения флоры Кавказа, другие, напротив, изучены и при этом нуждаются в плановом пересмотре их нормативной документации с учетом использования современных отечественных, доступных, простых и в тоже время эффективных методик. Все вышесказанное показывает актуальность дальнейшего изучения химического состава растений рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. флоры России, в том числе и Кавказа с целью использования их в научной медицине, например, толокнянки кавказской, наряду с толокнянкой обыкновенной, черники кавказской наряду с черникой обыкновенной и др. Для этого необходимо также изучение и их фармакологической активности, которая у данных растений изучена недостаточно.

4. Приоритетным также является расширение номенклатуры эффективных отечественных препаратов при различных патологических процессах за счет доступных сырьевых источников, произрастающих на территории России.

5. В ГФ СССР 11 издания для определения фенологликозида – арбутина в сырье толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной использовалось титриметрическая методика, что, согласно литературным данным, свидетельствовало о большой ошибке при установлении количественного содержания исходного компонента. При этом имеется ряд научных статей, которые показывают актуальность разработки и использования методов электронной спектроскопии и сепарационных методов анализа.

6. Таким образом, критерием выбора для исследования ЛРС представителей двух родов и трех семейств (род *Arctostaphylos* Adans.: толокнянки обыкновенной листья, толокнянки кавказской листья; род *Vaccinium* L.: брусники обыкновенной листья, голубики обыкновенной листья, черники обыкновенной листья, черники кавказской листья, клюквы болотной побеги; рода *Prunella* L.: черноголовки обыкновенной трава, черноголовки крупноцветковой трава и черноголовки разрезной трава) в качестве репрезентативных образцов объясняется: схожестью фармакологического действия (антиоксидантная, противовоспалительная, антимикробная, гипогликемическая и др. виды активности), преобладающей группой соединений (фенольные соединения), потенциалом к культивированию, возможностью заготовки сырья от дикорастущих растений и широтой ареала произрастания.

В связи с чем, перечисленные объекты являются обоснованными для разработки и апробации заявленной методологии.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования были ЛРС представленные в фармакопее: брусники обыкновенной листья и толокнянки обыкновенной листья, а также нефармакопейные виды ЛРС: голубики обыкновенной листья, клюквы болотной побеги, черники обыкновенной и черники кавказской листья, толокнянки кавказской листья, видовую принадлежность которых устанавливали методом секвенирования генома. Из рода *Prunella* L. в исследовании использовали траву трех видов: черноголовки обыкновенной (ч.об.), черноголовки крупноцветковой (ч.к.), черноголовки разрезной (ч.р.).

Листья и побеги собирали в фазу созревания плодов, листья фармакопейных объектов – согласно требованиям фармакопейных статей (ФС). Траву видов черноголовки собирали в фазу цветения – начала плодоношения. Места и даты сбора сырья представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Описание объектов исследования их место сбора и дата

Вид	Место сбора	Сроки сбора
Брусника обыкновенная	1. берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика (КБР)	сентябрь 2019 г.
	2. поселок Белая Березка, Трубчевский район. Брянская область	август 2019 г.
	3. ленточный бор, Павловский район, Алтайский край	сентябрь 2019 г.
	4. Кудымкарский район, Пермский край	весна 2018 г.
	5. деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область	август 2019 г.
	6. Учинское водохранилище, Мытищинский район, Московская область	весна 2019 г.
Толокнянка обыкновенная	1. Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	август 2019 г.
	2. гора Малый Иремель, Челябинская область	июнь 2019 г.
	3. Турочакский район, Республика Алтай	сентябрь 2019 г.
	4. деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область	август 2019 г.
Толокнянка кавказская	1. плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, КЧР	сентябрь 2020 г.
Черника обыкновенная	1. Берег реки Харбас, Зольский район, КБР (сентябрь 2019 г.)	август 2019 г.
	2. Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл	август 2019 г.
	3. окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика	сентябрь 2020 г.

	4. окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР	июнь 2019 г.
	5. окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан	июль 2019 г.
Черника кавказская	1. Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея	сентябрь 2020 г.
	2. Яворова поляна, окрестности поселка Гузерипль, Майкопский район, Республика Адыгея	сентябрь 2020 г.
	3. 1 км западнее Партизанской поляны, бассейн реки Белой, окрестности поселка Гузерипль, Майкопский район, Республика Адыгея	сентябрь 2020 г.
	4. окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край	октябрь 2019 г.
	5. окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР	июнь 2019 г.
Клюква болотная	1. Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	август 2019 г.
	2. окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область	август 2019 г.
	3. Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл	сентябрь 2019 г.
	4. Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь	август 2021 г.
	5. Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь	август 2021 г.
Голубика болотная	1. Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	август 2019 г.
	2. окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область	август 2019 г.
	3. гора Малый Ирмель, Челябинская область	июнь 2019 г.
	4. Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл	август 2019 г.
	5. Ирмель, Челябинская область	июнь 2019 г.
Черноголовка обыкновенная	1. перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР	июль-август 2019 г.
	2. Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	август 2019 г.
	3. берег реки Харбас, Зольский район, КБР	сентябрь 2019 г.
	4. окрестности озера Курортное, г. Нальчик, КБР	август 2020 г.
	5. юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край	июль 2020 г.

Черноголовка крупноцветковая	1. перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР	июль-август 2019 г.
	2. сосновый лес по дороге на Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край	август 2020 г.
	3. окрестности горной вершины Красивый Курган, Малокарачаевский район, КЧР	август 2020 г.
	4. окрестности горы Кабан, городской округ Кисловодск, Ставропольский край	август 2020 г.
	5. окрестности горы 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край	август 2020 г.
Черноголовка разрезная	1. окрестности горы Лысой, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край	август 2020 г.
	2. юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край	июль 2020 г.
	3. окрестности горы Дубровка, городской округ Пятигорск, Ставропольский край	август 2020 г.
	4. окрестности горы 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край	август 2020 г.
	5. юго-восточные окрестности горы Бештау, Ставропольский край	август 2020 г.

Видовую принадлежность всех собранных образцов сырья подтвердили д-р биол. наук Гончаров М.Ю. (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) и канд. биол. наук Шильников Д.С. (БИН РАН). Образцам, используемым в сквозном анализе, а именно при разработке методик оценки подлинности и испытаний, а также в фармакологическом исследовании, присвоены ваучерные номера при монтировке гербария (табл. 2.2 и Приложении 2, рис. 2.1-2.10).

Все гербарные образцы хранятся в Перкальском дендрологическом парке (подразделение Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН).

Таблица 2.2 – Сведения о гербарных образцах (места заготовки, ваучерные номера)

Вид	Место сбора	Ваучерный номер
Брусника обыкновенная	берег реки Харбас, Зольский район, КБР	PALE 004908
Толокнянка обыкновенная	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	PALE004930
Толокнянка кавказская	плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, КЧР	PALE004906-PALE004909
Черника обыкновенная	берег реки Харбас, Зольский район, КБР	PALE 005073.
Черника кавказская	Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея	PALE 005082
Клюква болотная	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	PALE 011156
Голубика болотная	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	PALE 004931
Черноголовка обыкновенная	перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР	PALE 013957
Черноголовка крупноцветковая	перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР	PALE 013959
Черноголовка разрезная	окрестности горы Лысой, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край	PALE 013953

Сушку сырья проводили воздушно-теневым способом, а также с использованием ИК-сушильного шкафа и конвективной принудительной суши. Влияние способа сушки на стабильность ведущей группы БАС и их доминирующих компонентов определяли согласно валидированных методик (см. главу 7).

2.2. Оборудование и реактивы

Исследование проводили с использованием реактивов класса чистоты «ч.д.а.», «х.ч.». Реактивы для ВЭЖХ имели соответствующий класс чистоты, заявленный в сертификате качества. Титрованные, буферные растворы, индикаторы, прочие реактивы готовили согласно методикам ГФ РФ XIV издания [31].

Исследование проводили на следующих приборах, проходящих ежегодную поверку:

- автоматический анализатор аминокислот AAA 400 (ООО «INGOS», Лабораторные приборы, Чехия);
- амплификатор T100 (Bio-Rad, США);
- весы аналитические ЛВ 210-А (ООО «Сартогосм», Россия);
- видеокамера Levenhuk C310 NG (КНР);
- видеоокуляр Heye HУ-1139 (КНР);
- генетический анализатор 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США);
- денситометр ERI-10 (CarlZeiss, Германия);
- дифракционный спектрограф ДФС-8-1 (ОАО «Корпорация ВСМПО-АВИСМА», Россия);
- жидкостной хроматограф Agilent 1260 InfinityLC (Agilent Technologies, США) со спектрофотометрическим детектором и колонкой GeminiNX-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм с размером пор 110 Å; Phenomenex, США);
- жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США) со спектрофотометрическим детектором Dionex VWD-3100,
- жидкостной хроматограф LC-20 Prominence (с фотодиодным детектором SPD-M30A Shimadzu, Columbia, MD, США) и колонку Shim-pakPREP-ODS (20×250 мм, d 15 мкм, Shimadzu);
- жидкостной хроматограф LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, США), соединенный с фотодиодно-матричным детектором (ФДМД) и 3q-детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС; electrospray ionization, ESI), и колонку ProntoSIL-120-5-C18 AQ (75×2 мм, Ø 5 мкм; Metrohm AG, Herisau, Швейцария);
- инфракрасный сушильный шкаф Универсал СД-4Т;
- испаритель ротационный Qyte-2A (Qiyu Industrial (Shanghai) Co., Ltd.)
- кондуктометр Эксперт-002;
- микроскоп биологический Микромед 1 (вар. 3-20) (ООО «Наблюдательные приборы», Россия);
- микроскоп люминесцентный Микромед 3 ЛЮМ (ООО «Наблюдательные приборы», Россия);
- микрошприц Hamilton Gastight Syringe #3 1701 N SYR 10 мкл (Phenomenex, США);
- муфельная печь МИМП-3М (ЗАО «МИУС», Россия);
- набор сит (диаметр отверстий -7, 5, 3, 2, 1, 0,25 мм.)
- перемешивающее устройство LOIPLS-120 (ЛАБ-ПУ-02) (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Россия);

- рН-метр Hanna Edge 2002-02 (HANNA Instruments Inc., Венгрия);
- система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105М» с кварцевым капилляром с диаметром капилляра 75 мкм, $L_{\text{общ}}/L_{\text{эф}} = 50/60$ см (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия);
- спектрометр VXR 500S (Varian, Palo Alto, США);
- спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия). Спектральный диапазон 190-1100 нм;
- сушильный шкаф ШСУ-М;
- хроматограф «Хромос А02» (Хромос Инжиниринг, Россия), снабженный УФ-детектором ECD2000 (ECOM, Чехия) и колонкой Luna C18 (250×4,6 мм, заполнена октадецилсиликагелем с размером частиц 5 мкм; Phenomenex, США);
- центрифуга SIGMA 2-16P («Сигма Лаборцентрифуген ГмбХ», Германия)

Хроматографический анализ проводили с использованием хроматографических пластин марки Sorbfil (ООО «ИМИД», Россия) ПТСХ-П-В-УФ и ПТСХ-АФ-А-УФ размером 100×100 мм (тип сорбента: силикагель СТХ-1ВЭ и силикагель СТХ-1А; зернение: 8-12 и 5-17 мкм; толщина слоя: 100 и 110 мкм, связующее: силиказоль; УФ индикатор: УФ-254; тип подложки: ПЭТФ и Al). Растворы для анализа методом капиллярного электрофореза фильтровали с использованием мембранных фильтров Владипор типа МФАС-Б-4 с диаметром диска 25 мм (ЗАО НТЦ «Владипор», Россия). Извлечения из ЛРС после окончания экстракции фильтровали через бумажные обеззоленные фильтры «Красная лента» (ООО «МЕЛИОР XXI», Россия).

Для колоночной хроматографии (КХ) использовали полиамид, Сефадекс LH-20, нормально- и обращенно-фазовый силикагель (SiO_2 и ОФ- SiO_2 соответственно) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США), MCIgelCHP20P (Supelco, St. Louis, MO, США).

В молекулярно-генетическом исследовании использовали праймеры ITS1P (Синтол, Россия; ЗАО Евrogen, Россия), Еnscyclo-полимеразу (ЗАО Евrogen, Россия), набор для выделения и очистки амплифицированных фрагментов ДНК Monarch (NEB, США).

Результаты измерений получали и обрабатывали с помощью программного обеспечения:

- Мульти Хром (версия 1.5, ООО «Амперсенд», Россия);
- сканирование для спектрофотометра СФ-2000 (версия 4.06).
- Эльфоран (версия 3.2.5);
- BLAST (NCBI, США).
- HAYEAR;
- Lab Solutions (Shimadzu, Япония);
- MEGA 5.2 и 4.1 (США);

- Top View (x86).

2.3. Методики выделения

2.3.1. Выделение полисахаридов

Выделение полисахаридных комплексов проводили методом последовательной экстракции сырья, предварительно обезжиренного в аппарате Сокслета петролейным эфиром с последующим удалением фенольной фракции экстракцией спиртом этиловым 70% [20, 22, 145].

2.3.2. Выделение фенольных соединений

Фенольные соединения выделяли из воздушно-сухих стеблей и листьев брусники обыкновенной (образец №1) и травы черноголовки (ч. крупноцветковая – образец №1, ч. обыкновенная – образец №1, черноголовка разрезная – образец №1) согласно схемам, представленным на рисунках 2.1, 2.2, 2.3 и 2.4. Номера соединений соответствуют названиям, представленным в главе 4.

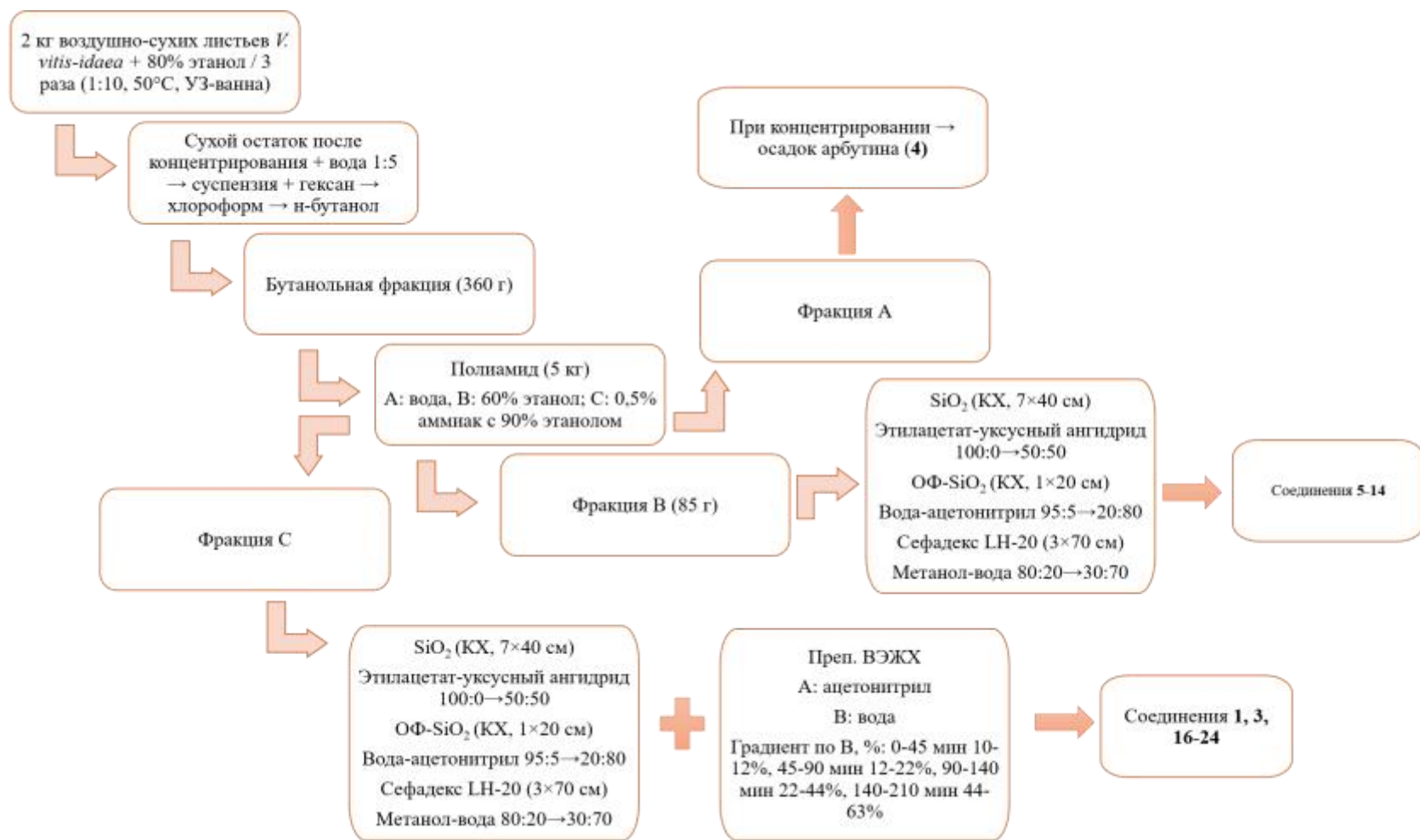


Рисунок 2.1 – Схема выделения фенольных соединений из листьев *Vaccinium vitis-idaea* L.

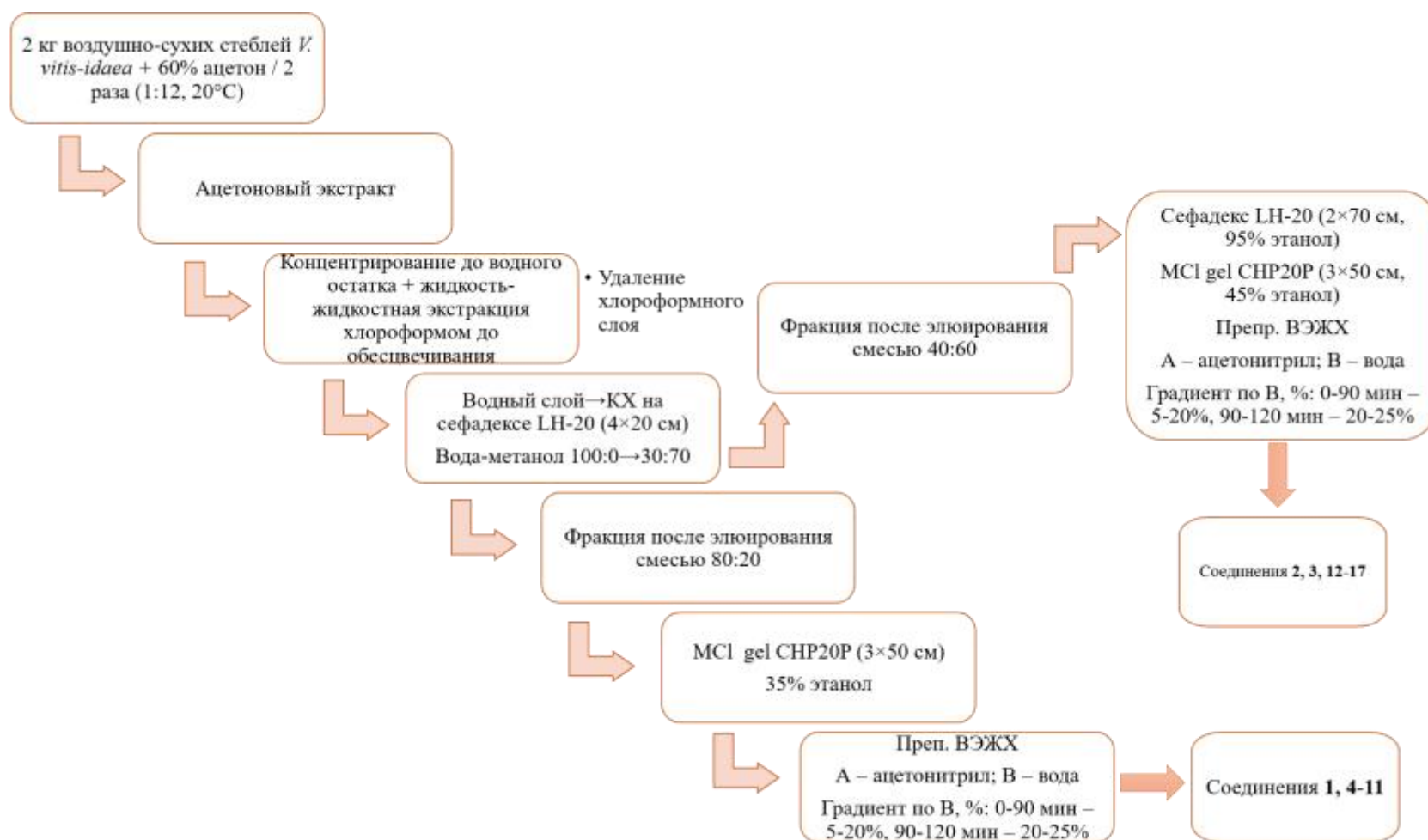


Рисунок 2.2 – Схема выделения фенольных соединений из стеблей *Vaccinium vitis-idaea* L.

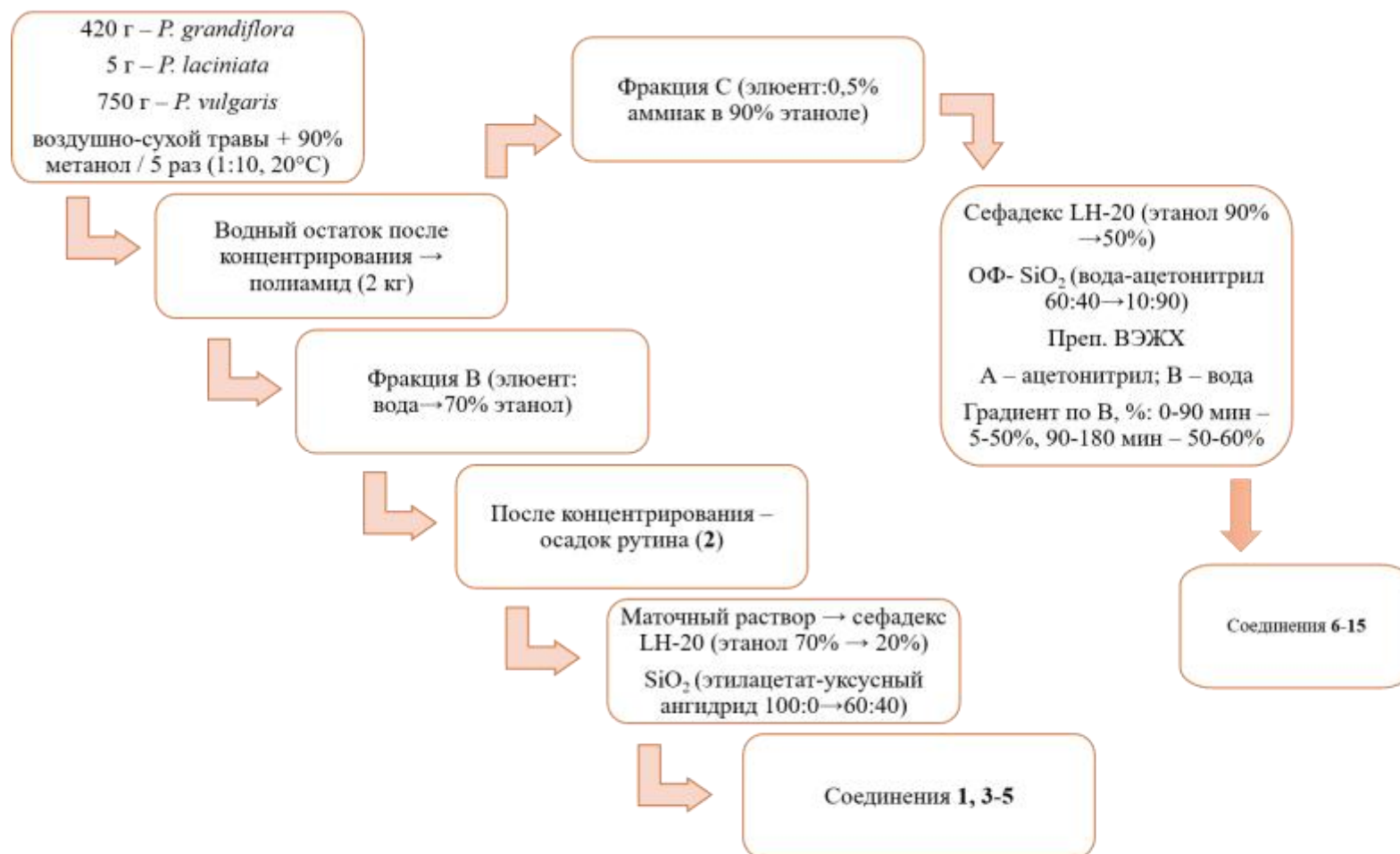


Рисунок 2.3 – Схема выделения фенольных соединений из травы видов рода *Prunella* L.

2.4. Хроматографические методы анализа

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Фенольные соединения

Анализ фенольных соединений проводили на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, США), соединенный с фотодиодно-матричным детектором (ФДМД) и 3Q-детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС; electrospray ionization, ESI) и колонкой GLC Mastro C18 (150 mm × 2,1 mm × 3 μm; Shimadzu, Kyoto, Япония) в градиентном режиме [382, 383, 334, 335].

Подтверждение результатов определения основных по содержанию компонентов методом КЭ проводили на хроматографе Стайер (Аквилон, Россия), снабженного колонкой Luna C18 (Phenomenex, США) размером 150 x 4,6 мм (зернение сорбента 5 мкм) в изократическом режиме элюирования.

Арбутин

Подвижная фаза: смесь 0,05 М раствора кислоты фосфорной и ацетонитрила в соотношении 97:3, скорость потока – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл, детектирование пиков осуществляли спектрофотометрически при 280 нм. Пробоподготовка включала разведение 1 мл неочищенных спиртовых извлечений из б. обыкновенной листьев и 3 мл неочищенных спиртовых извлечений из т. обыкновенной и т. кавказской листьев подвижной фазой до 10 мл. Определение содержания арбутина в ЛРС проводили с использованием площади пика арбутина на хроматограммах растворов стандартного образца (Sigma-Aldrich, 0,003216% раствор арбутина в спирте этиловом 70%).

Хлорогеновая кислота

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,5% водный раствор муравьиной кислоты (20:80), детекцию пиков осуществляли при длине волны 330 нм. Перед введением проводили разведение аликвоты извлечений в мерных колбах подвижной фазой в следующих соотношениях: 1,0 мл исходного извлечения голубики болотной листьев в мерной колбе вместимостью 10 мл, 3 мл извлечений черники обыкновенной и черники кавказской листьев в мерной колбе вместимостью 25 мл, клюквы болотной побегов. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл, температура колонки и образца – 20 °С. Параллельно в тех же условиях проводили анализ растворов СО кислоты хлорогеновой (диапазон концентраций 0,000796 – 0,009552%). Расчет количественного содержания хлорогеновой кислоты проводили по уравнению зависимости аналитического сигнала от концентрации стандартного образца, полученного при анализе серии растворов СО хлорогеновой кислоты.

Розмариновая кислота

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1%; водный раствор фосфорной кислоты (25:75), детекция пиков при длине волны 330 нм. Перед введением 2,0 мл исходного извлечения чернойголовки травы помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70%. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл, температура колонки и образца – 20 °С. Определение содержания розмариновой кислоты в траве чернойголовки проводили с использованием площади пика розмариновой кислоты на хроматограммах растворов стандартного образца (Sigma-Aldrich, 0,0052% раствор СО в спирте этиловом 70%).

Полисахариды

Анализ мономерного состава полисахаридных комплексов проводили после кислотного гидролиза каждого образца в среде трифторуксусной кислоты и последующей предколоночной дериватизацией 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном (ФМП) на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, США) со спектрофотометрическим детектором и колонкой Gemini NX-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм с размером пор 110 Å; Phenomenex, США) в градиентном режиме [185, 397, 337, 427].

Тонкослойная хроматография

Разработку методик определения подлинности проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) путем подбора оптимальной элюирующей системы, состав которых выбирали в соответствии с выбранным маркерным соединением с использованием литературных данных [31, 122, 155, 208, 421]. Валидацию разработанных методик проводили по показателям специфичность, робастность (устойчивость), воспроизводимость [31, 155].

Денситометрия

Количественное определение моносахаров после гидролиза полисахаридных фракций (раздел 2.4.3) проводили методом тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием зон адсорбции [21, 127].

Бумажная хроматография

Анализ мономерного состава полисахаридных фракций, выделенных из травы видов рода *Prunella* L., проводили согласно методикам [46, 92, 93, 94, 134, 140].

Ионообменная хроматография

Метод использовался для определения состава аминокислот в образцах ЛРС с предварительным выделением сырого протеина согласно ГОСТ 32195 – 2013 (ISO 13903:2005). Анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот ААА 400 с пост-колоночной дериватизацией разделенных аминокислот нингидрином [20, 145].

2.5. Физико-химические методы анализа

Спектрофотометрия

Определение суммы фенольных соединений и флавоноидов проводили на спектрофотометре СФ-2000 в УФ- и видимом диапазоне (200-400 нм и 300-500 нм). Испытуемые извлечения и растворы сравнения помещали в кварцевые кюветы с толщиной слоя поглощения 1 см. Обработку спектров поглощения проводили в программе сканирования для спектрофотометра СФ-2000 (версия 4.06).

Капиллярный электрофорез

Идентификацию и количественное определение маркерных компонентов проводили на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105М» с кварцевым капилляром с диаметром капилляра 75 мкм, $L_{\text{общ}}/L_{\text{эф}} = 50/60$ см. Ведущие электролиты готовили согласно ГОСТ 4919.2-2016 [3, 88, 91, 154].

Оптическая микроскопия

Анатомический анализ образцов ЛРС проводили согласно требованиям ГФ РФ XIV издания (ОФС.1.5.3.0003.15). В качестве просветляющей жидкости использовали водный раствор натрия гидроксида 3% и раствор хлоралгидрата. Полученные микропрепараты изучали на микроскопе люминесцентном Микромед 3 ЛЮМ и микроскопе биологическом Микромед 1 (вар. 3-20). Фотографии получали с помощью видеоокуляра НУ-1139 в программе НАУЕАR.

Люминесцентная микроскопия

Автолюминесценцию образцов сырья наблюдали на микроскопе люминесцентном Микромед 3 ЛЮМ в спектральном диапазоне возбуждения люминесценции 410-550 нм.

Стереомикроскопия

Анатомические признаки сырья исследуемых видов устанавливали с помощью микроскопа OlympusSC50 (Япония) и камеры Levenhuk C310 NG (США).

Вискозиметрия

Метод использовали для определения молекулярной массы и изоэлектрической точки полисахаридных фракций [137, 157].

Кондуктометрия

Метод использовали для определения способности полисахаридных макромолекул к проникновению через клеточную мембрану на модели жидкость-жидкостной экстракции между неполярным растворителем – этилацетатом – и полярным растворителем – водой очищенной [137, 157].

Определение поверхностной активности полисахаридов

Те же растворы полисахаридных фракций, для которых определяли вязкость и далее рассчитывали среднюю молекулярную массу, использовали для определения наличия поверхностной активности с помощью сталагмометра Траубе и прибора Ребиндера [137, 157].

Атомно-эмиссионная спектроскопия

Минеральный состав золы общей, полученной после прокаливания воздушно-сухого сырья ЛРС в муфельной печи МИМП-3М по методики ГФ РФ XIV издания [31] устанавливали на дифракционном спектрографе ДФС-8-1 методом атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС), в котором атомизатором служит электрическая дуга [143, 145].

Титрование

Наличие и содержание функциональных групп пектиновых веществ, травы видов рода *Prunella* L., проводили методом кислотно-основного титрования [24, 44].

Определение сорбционной способности пектиновых веществ

Адсорбционную способность пектиновых веществ устанавливали на примере сорбции метиленового синего [5, 19].

Также проводили определение сорбционной способности коммерческих образцов энтеросорбентов как препаратов сравнения – Полисорб МП, Активированный уголь, Неосмектин®, Альфасорб® - в тех же условиях, что и для ПВ.

2.6. Секвенирование

Сравнительное изучение маркерных участков генома хлоропластов проводили на генетическом анализаторе 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в несколько этапов: выделение ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием праймеров и аппарата для ПЦР в реальном времени [366, 436], амплификация, секвенирование с последующей обработкой результатов в программе MEGA 5.2.2 [42, 82].

2.7. Фармакологические исследования

Фармакологическая часть исследования включала определение нейропротекторной, диуретической, антитирозиновой, актопротекторной, антиоксидантной активности.

Исследование проводили с сухими экстрактами после концентрирования извлечений, полученных согласно схемам:

1) *диуретическая, антиоксидантная, антитирозиновая, нейропротекторная активность*: для оценки активности получали сухие экстракты путем экстракции сырья водой и водно-спиртовыми смесями [146, 148, 149, 382];

2) *актопротекторная активность*: сухие экстракты из травы видов черноголовки получали путем экстракции сырья водой очищенной [80].

Экспериментальные животные

Исследование было проведено на 107 мышах-самцах линии Balb/c с массой от 25 до 27 грамм и 300 крысах-самцах линии Wistar с массой от 200 до 220 г. Все животные проходили микробиологический контроль и находились в двухнедельном карантине перед началом эксперимента. Все манипуляции с животными и условия содержания соответствовали нормам экспериментальной этики (Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, September 22, 2010).

Оценка «острой токсичности»

Оценка «острой токсичности» проводилась при использовании широко применяемого метода определения токсичности химических веществ в остром тесте – процедура «Up and Down». Основные принципы этого метода представлены в Руководстве по оценке пероральной токсичности химических соединений № 425 Организации экономического сотрудничества и развития (OECD № 425) [332].

Антиоксидантная активность

Антирадикальные свойства исследуемых сухих остатков изучали в два этапа: *in vitro* на модельных средах генерации DPPH, супероксид и гидроксил радикалов [353] и *in vivo* по определению в сыворотке крови животных изменения активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и каталазы (САТ), а также концентрации ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в пересчете на малоновый диальдегид [29, 352]

Полученные сухие экстракты, растворенные в спирте этиловом 70 %, вносили в среду инкубации в следующем диапазоне концентраций: 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 125 мкг/мл и 62,5 мкг/мл. При проведении *in vitro* исследования в качестве положительного контроля использовали кверцетин (HunanWarrant Pharmaceuticals, КНР) в аналогичном диапазоне концентраций.

В *in vivo* тестировании крысы-самцы линии Wistar содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением требований международных норм экспериментальной этики (Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, September 22, 2010).

Исследуемые сухие экстракты вводили животным в дозе 100 мг/кг (*per os* в виде водной суспензии). На данном этапе в качестве референтного соединения использовали кверцетин в дозе 100 мг/кг, вводимый по аналогичной исследуемым сухим остаткам схеме.

Нейропротекторная активность

Исследование проведено на 90 крысах-самцах линии Wistar, весом 220-240 грамм, полученных из специализированного питомника лабораторных животных под названием

«Рапполово». Содержание и манипуляции, проводимые с животными, соответствовали положениям Directive 2010/63 / EU. Оценку активности проводили на модели перманентной фокальной ишемии головного мозга [351], где в качестве референта использовали стандартизованный экстракт гинкго билоба (EGB 761) в дозе 35 мг/кг [426]. Вводимая доза для изучаемых извлечений была выбрана на основании ранее проведенных исследований и составила 50 мг/кг. Оценивали скорость мозгового кровотока, размер зоны некроза определяли трифенилтетразолиевым методом [28]. Определение концентрации лактата проводили с использованием стандартного набора реактивов «Арбис+» в сыворотке крови методом энзиматической колориметрии.

Антитирозиназная активность

Сухие экстракты анализируемых извлечений растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до получения раствора с конечной концентрацией 1000 мкг/мл. Далее готовили серии двукратных разведений маточного раствора с диапазоном концентрации производного 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамид: 500 мкг/мл; 250 мкг/мл; 125 мкг/мл и 62,5 мкг/мл. В качестве референтов использовалась койевая кислота, полученная от Hunan Warrant pharmaceuticals (КНР) в том же диапазоне концентраций [351].

Тесты выполнялись в триплетном варианте. IC_{50} μ г/мл рассчитывали методом пробит-анализа.

Диуретическая активность

Сухие экстракты растворяли в воде очищенной и вводили животным в дозе 100 мг/кг [352], референтные препараты – фуросемид в дозе 10 мг/кг [426] и спиронолактон в дозе 25 мг/кг [301]. Эксперимент включал определение концентрации ионов кальция, натрия, магния и калия в сыворотке крови [149, 61].

Актопротекторная активность

Влияние сухих экстрактов на уровень физической работоспособности животных проводили по методике, представленной в статье Воронкова А.В. и соавторов [419].

2.8. Статистическая обработка

Результаты экспериментов подвергали анализу статистическими методами, рекомендуемыми ГФ РФ XIV изд. Расчет статистических параметров проводили в Microsoft Excel 2016 согласно требованиям ГФ РФ XIV издания [31].

Результаты фармакологических испытаний статистически обрабатывали и выражали в виде $M \pm SEM$. Сравнение групп средних осуществляли методом ANOVA с пост-обработкой Ньюмена-Кейсла при $p < 0,05$. В работе применяли программный пакет статистического анализа «STATISTICA 6.0» (StatSoft, США).

ГЛАВА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ПОДЛИННОСТИ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS, *VACCINIUM* L. И *PRUNELLA* L.

Одними из основных показателей подлинности ЛРС является детальное описание морфологических и микроскопических признаков, комплекс которых позволяет безошибочно давать заключение о соответствии наименованию сырья, поступившего на анализ. При определении вышеуказанных признаков был использован метод люминесцентной и стереомикроскопии. Уже в ГФ РФ XIII издания внесен раздел «Определение основных групп биологически активных веществ», в котором наблюдается тенденция использования метода ТСХ, где рассматривается наличие основных и сопутствующих веществ, что впоследствии по их количеству и характеру является определением подлинности. В главе 1 представлены литературные данные, свидетельствующие об образовании гибридных форм видов внутри изучаемых родов. В подобных случаях не всегда возможно дать безошибочное заключение о подлинности. Нами была предпринята попытка использования одного из самых современных и эффективных методов определения подлинности ЛРС - молекулярно-генетический метод.

Генетические исследования были выполнены в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии ФГБНУ ВНИИСХМ под руководством кандидата биологических наук Евгения Евгеньевича Андропова, за что ему выражается благодарность.

3.1.1. Морфолого-диагностические признаки рода *Arctostaphylos* Adans.

Морфологические признаки листа *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.

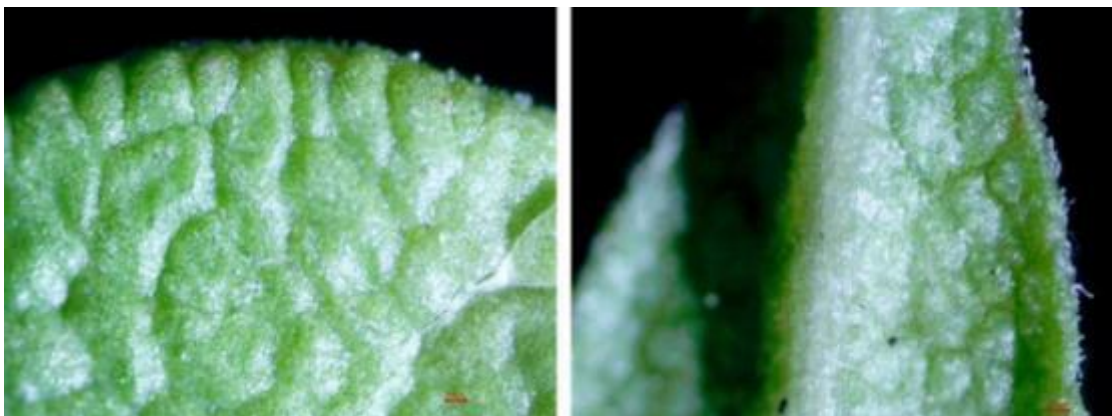
Цельное сырье толокнянки обыкновенной представлено смесью цельных или частично измельченных листьев. Листья мелкие, кожистые, ломкие, обратно-яйцевидной или удлинненно-овальной формы, иногда с небольшой выемкой, на верхушке закругленные, к основанию клиновидно-суженные, с очень коротким черешком. Длина листьев 1-2,2 см, ширина 0,5-1,2 см. Жилкование сетчатое. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на верхней поверхности листа жилки заметно вдавлены. Черешки листьев в поперечном сечении округло-треугольной формы. Цвет листьев с верхней стороны темно-зеленый, с нижней стороны немного светлее (Приложение 3, рис. 3.1-1). Запах отсутствует, вкус водного извлечения сильно вяжущий, горьковатый.

Измельченное сырье представлено кусочками листьев различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев различной формы, на верхней поверхности

жилки вдавлены. Цвет темно-зеленый или зеленый. Запах отсутствует, вкус водного извлечения сильно вяжущий, горьковатый.

Порошок сырья представлен кусочками листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев от зеленого до темно-зеленого цвета. На верхней стороне листа просматриваются вдавленные жилки. Цвет порошка темно-зеленый или зеленый. Запах отсутствует, вкус водного извлечения сильно вяжущий, горьковатый.

В процессе проведения стереомикроскопического исследования выявлено, что листья т. обыкновенной обладают кожистой структурой, характеризуются плотностью с обеих сторон и имеют мелкие трихомы вдоль края листа. Кроме того, на верхней стороне листа они блестящие, не покрыты волосками. Отчетливо видна разветвленная сеть жилок на поверхности листа (особенно отчетливо с верхней стороны) (рис. 3.1).

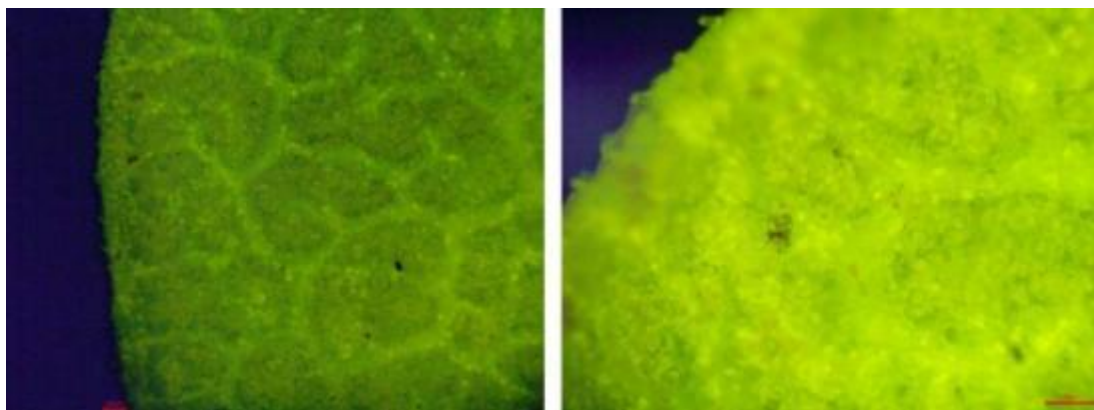


А – Верхняя сторона листа

Б – Нижняя сторона листа у основания

Рисунок 3.1 – Фрагменты верхней и нижней стороны листа толокнянки обыкновенной (ув.×40)

Люминесценция обеих поверхностей листа толокнянки обыкновенной слабая, ткани верхней стороны имеют желтовато-зеленую, большая люминесценция характерна для жилок. На нижней стороне листа заметна яркая люминесценция устьичного аппарата (рис. 3.2).



А – Верхняя сторона листа

Б – Нижняя сторона листа

Рисунок 3.2 – Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа толокнянки обыкновенной (ув.×40)

Морфологические признаки листа *Arctostaphylos caucasica* L.

Таксономический статус толокнянки кавказской оспаривается: одни исследователи считают его конспецифичным с *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. [138], другие рассматривают в ранге подвида - *Arctostaphylos uva-ursi* Spreng. subsp. *caucasica* Kvaratzchelia = *A. uva-ursi* (L.) Spreng. subsp. *caucasica* (Lipsch) A.Schreter, третьи придерживаются мнения валидности вида [123]. При установлении морфологических признаков цельного, измельченного и порошкового сырья толокнянки кавказской листьев была отмечена незначительное расхождения в размерах листовой пластинки (Приложение 3, рис. 3.1-2). В связи, с чем описание данного сырья имеет идентичность с толокнянкой обыкновенной (раздела 3.1.1). С помощью стереомикроскопии наблюдали, что нижняя и верхняя стороны листа толокнянки кавказской гладкие, блестящие, покрыты кутикулой, наблюдается отчетливо заметная сеть жилок, в которых, предположительно, располагаются млечники. Край листовой пластинки и верхушка листа загнуты на нижнюю сторону. Встречаются редкие железистые образования. Трихомы многочисленные, удлиненные, располагаются по краю листовой пластинки и на черешке (рис. 3.3 и 3.4).

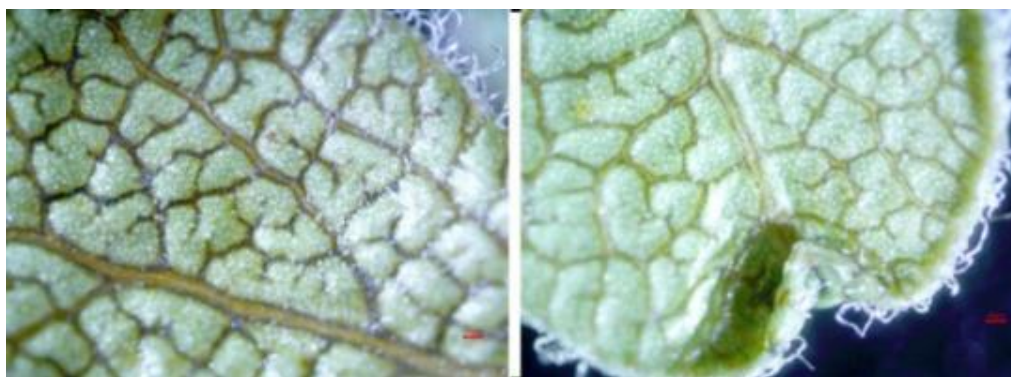


Рисунок 3.3 – Фрагменты нижней стороны листа толокнянки кавказской (ув.×40)

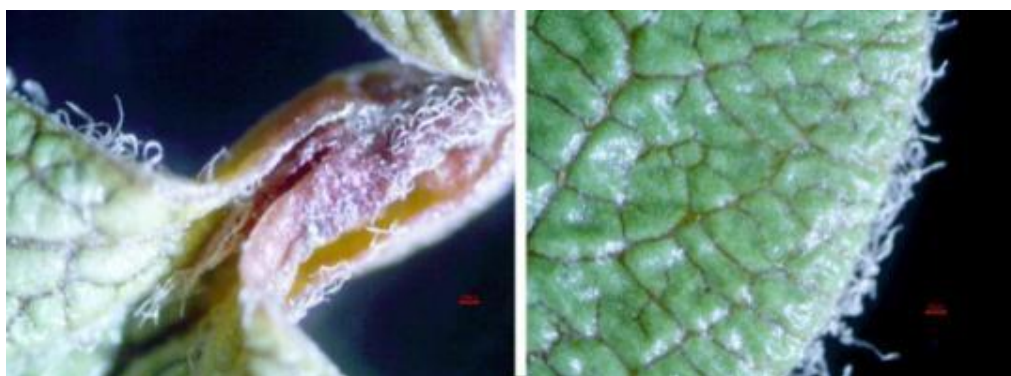
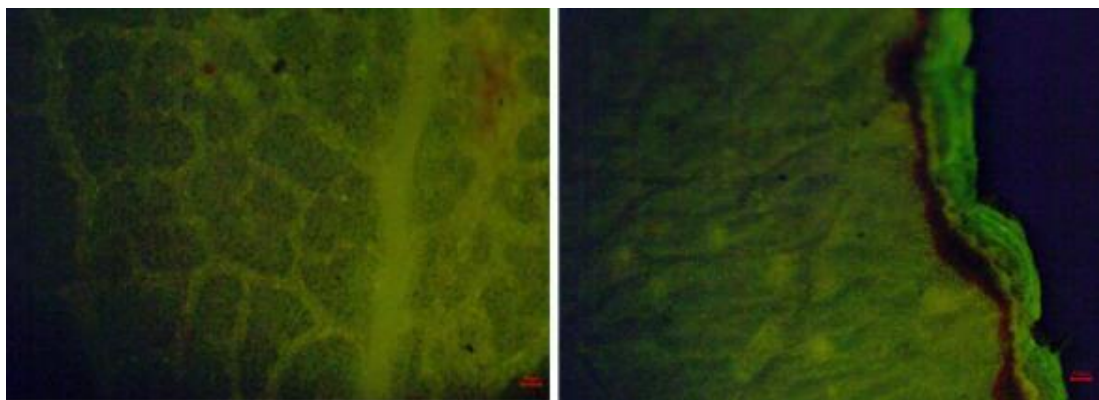


Рисунок 3.4 – Фрагменты верхней стороны листа толокнянки кавказской (ув.×40)

Автолюминесценция тканей листа толокнянки кавказской не сильно выражена, ткани имеют желтовато-коричневое свечение и зеленоватое по краю листа. Наибольшее свечение характерно для жилок, что можно объяснить высокой концентрацией химических соединений в них. Ткани черешка люминесцируют красноватым оттенком. При использовании увеличения ×100 на нижней стороне листа наблюдаются многочисленные устьица, замыкающие клетки

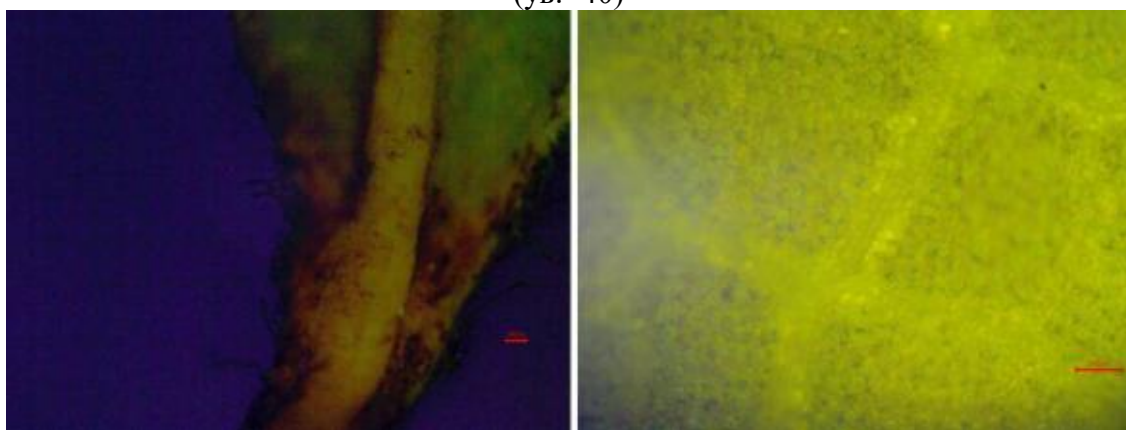
которых имеют яркое желтое свечение (рис. 3.5 и 3.6). Сравнительная характеристика морфологических признаков видов рода *Arctostaphylos* (L.) Adans. представлена в таблице 3.1.



А – Верхняя сторона листа

Б – Нижняя сторона листа

Рисунок 3.5 – Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа толокнянки кавказской (ув.×40)



А – Черешок листа

Б – Нижняя сторона листа

Рисунок 3.6 – Фрагменты черешка листа (ув.×40) и нижней стороны листа (ув.×100) толокнянки кавказской

Таблица 3.1 – Сравнительная характеристика морфологических признаков видов *Arctostaphylos* Adans.

Объект	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	<i>Arctostaphylos caucasica</i> L.
Кутикула	+	+
Сеть жилок	+↓	+↓
Млечники	-	+
Железистые волоски	-	-
Простые волоски по краю	+	+
Простые волоски на черешке	+	+
Железистые волоски по краю	-	-
Простые волоски на поверхности	-	-
Люминесценция листовой пластинки	Желтовато-зеленая	Желтоватая, выражена снизу и по жилкам
Люминесценция черешка	Желтовато-зеленая	Желтоватая, красноватый оттенок
Люминесценция выделительного аппарата	-	Желтоватая

*↓ -нижняя сторона листа, ↑ – верхняя сторона листа, + – признак ярко выражен, - – признак не выражен, +/- – признак слабо выражен.

Из данных таблицы 3.1 видно, что с помощью стереомикроскопии были выявлены и визуализированы основные морфологические признаки некоторых представителей рода *Arctostaphylos* (L.) Adans.

Основными признаками, определяющими подлинность толокнянки листьев, является: строение трихом по краю листовой пластинки и черешке и люминесцентная характеристика сети жилок на нижней стороне листа и устьичного аппарата.

Полученные результаты будут использованы для экспресс-идентификации подлинности сырья «толокнянки листа» на основе морфологических и диагностических признаков, которые также будут учтены при его сборе, чтобы минимизировать возможные ошибки. Данные диагностические признаки будут рекомендованы для внесения в ФС «Толокнянки листа» как дополнительные признаки определения подлинности.

3.1.2. Анатомо-диагностические признаки рода *Arctostaphylos* Adans.

*Микроскопические признаки листа *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.*

При рассмотрении с поверхности верхней стороны листа толокнянки обыкновенной видны основные клетки эпидермиса многоугольной формы с прямыми утолщенными боковыми стенками. Также просматриваются игольчатые кристаллы оксалата кальция (Приложение 3, рис. 3.7). На нижней стороне листа толокнянки обыкновенной видны клетки эпидермиса многоугольной формы с прямыми утолщенными боковыми стенками, устьица анамоцитного типа, крупные, округлые, с широко раскрытой устьичной щелью, расположены группами или одиночно на нижней стороне листа. Каждое устьице окружено 5-9 побочными клетками, которые содержат крупные многочисленные включения округлой или призматической формы (Приложение 3, рис. 3.8).

На поперечном срезе листа толокнянки обыкновенной в области центральной жилки виден некрупный проводящий пучок центральной жилки, не выступающий за пределы листовой пластинки. Над ним и под ним имеется уголковая колленхима. Вблизи от центральной жилки находятся проводящие пучки боковых жилок (рис. 3.9). Также на поперечном срезе листа толокнянки обыкновенной видны часто расположенные небольшие проводящие пучки, не выступающие за пределы листовой пластинки, крупные воздухоносные полости губчатой паренхимы (Приложение 3, рис. 3.10). На поперечном срезе края листа толокнянки обыкновенной просматриваются крупные воздухоносные полости губчатой паренхимы (Приложение 3, рис. 3.11).

На поперечном срезе черешка листа толокнянки обыкновенной видны волоски с бородавчатой поверхностью, толстостенные клетки эпидермиса, под ними — уголковая колленхима. Проводящий пучок один коллатеральный (Приложение 3, рис. 3.12). На фрагменте

эпидермиса черешка листа толокнянки обыкновенной часто встречаются слегка изогнутые 2-3-клеточные волоски (Приложение 3, рис. 3.13). При этом клетки эпидермиса толстостенные, расположены плотно и рядами (Приложение 3, рис. 3.14).

Микроскопические признаки листа *Arctostaphylos caucasica* L.

При рассмотрении фрагмента листа с поверхности верхнего эпидермиса листа толокнянки кавказской видны многоугольные основные клетки эпидермиса, игольчатые кристаллы, объединенные группами (Приложение 3, рис. 3.15). По краю листа толокнянки кавказской видны длинные двуклеточные простые волоски, прижатые к поверхности листа. Базальная клетка волоска, расширенная к основанию, терминальная клетка сильно вытянутая, длиннее базальной (Приложение 3, рис. 3.16).

На фрагменте нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской просматриваются устьица анамоцитные, округлые, с широко раскрытой устьичной щелью, расположенные группами (Приложение 3, рис. 3.17). На фрагменте нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской в области жилки заметно опушение длинными простыми двуклеточными волосками вдоль жилки. (Приложение 3, рис. 3.18) Побочные клетки устьиц содержат многочисленные включения (Приложение 3, рис. 3.19). На фрагменте нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской в области жилки вдоль проводящих пучков заметна кристаллоносная обкладка. Также присутствуют включения в клетках, вокруг устьиц (Приложение 3, рис. 3.20).

На поперечном срезе листа толокнянки кавказской в области центральной жилки виден некрупный проводящий пучок центральной жилки, не выступающий за пределы листовой пластинки. Над ним и под ним имеется уголкового колленхима. Вблизи от центральной жилки находятся проводящие пучки боковых жилок. Столбчатая паренхима многорядная, в губчатой паренхиме – крупные межклетники (Приложение 3, рис. 3.21).

На поперечном срезе черешка листа толокнянки кавказской с поверхности видны волоски, толстостенные клетки эпидермиса, под ними - уголкового колленхима, еще глубже залегает паренхима с межклетниками. Проводящий пучок некрупный, один, коллатеральный со склеренхимной обкладкой (Приложение 3, рис. 3.22).

Исходя из полученных результатов анатомического исследования двух видов толокнянки (толокнянка обыкновенная и толокнянка кавказская) можно сделать вывод, что значимых отличительных признаков между исследуемыми объектами нет.

По всей видимости, толокнянка кавказская является подвидом толокнянки обыкновенной и ошибочно вынесено биологами в отдельный вид.

Для исследуемых видов впервые были описаны такие анатомические признаки как характеристика побочных клеток окружающие устьица и содержащиеся в них кристаллы

призматической формы, а также наличие проводящих пучков боковых жилок, которые располагаются вблизи центральной жилки. Отнесенная в отдельный вид биологами толокнянка кавказская была исследована впервые.

Полученные анатомические признаки будут рекомендованы для внесения в ФС на «Толокнянки листья».

3.1.3. Определение основных групп биологически активных веществ видов рода *Arctostaphylos* Adans. методом тонкослойной хроматографии

Разработка новых и совершенствование существующих методик определения подлинности и оценки качества ЛРС, подразумевает определение доминирующего соединения, по которому проводится стандартизация ЛРС и ЛРП на его основе [74].

Опираясь на литературные данные и, на результаты собственных исследований, представленных в главе 4, доминирующим компонентом в сумме фенологликозидов, для сырья видов толокнянки является арбутин, в сумме флавоноидов – гиперозид. В связи, с чем объективно рассматривать данные соединения как основные для определения подлинности методом ТСХ.

Определение арбутина в толокнянке листьях

Приготовление извлечения. Для получения извлечения, мы использовали 0,5 грамм (точная навеска) высушенных листьев толокнянки, измельченных до размера частиц около 1 мм. Затем, к этим добавили 100 мл этилового спирта (содержащего 70% спирта), и взвесили колбу с сырьем и экстрагентом. Процесс экстракции проходил в течении 45 минут на водяной бане. После экстракции, колбу охлаждали и восполняли количество потерянного спирта до первоначальной массы. Затем проводили фильтрацию с использованием обеззольный фильтр «Красная лента» d=15,0 (ООО «МЕЛИОР XXI») (Раствор А). 10,0 мл полученного извлечения вносили в стеклянную хроматографическую колонку диаметром 1,5 см и высотой 25 см, заполненную 3,0 г алюминия оксида нейтрального для хроматографии (L40/250 мкм), предварительно промытой 5 мл спирта этилового 70% (Раствор Б).

С целью подбора оптимальных условий разделения доминирующего компонента, в сумме фенологликозидов – арбутина. Раствор Б в количестве 10, 30, 60 и 90 мкл наносили на линию старта хроматографической платиники Sorbfil ПТСХ-АФ-А и ПТСХ-П-А размер 10×15. Были использованы 5 различных систем растворителей, зафиксирован эффективный диапазон времени насыщения камеры 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут. Рядом наносили 10 мкл раствор СО арбутина. Хроматограмму просушивали в течении 5 минут и помещали в камеру, хроматографируя восходящим способом. После прохождения фронта растворителя на 80-90 % длины хроматограммы от линии старта, ее вынимали высушивали под тягой, после чего

обрабатывали в одном случае - диазореактивом, во втором случае – раствором натрия фосфорномолибдатом 10%. После чего хроматограммы помещали в сушильный шкаф и выдерживали при 100-105 °С в течении 10 минут. Используемые системы элюентов и полученные значения коэффициента подвижности R_f зон адсорбции, обнаруженные после обработки диазореактивом и, представлены в таблице 3.2 и 3.3 (Приложение 3, рис. 3.23).

Приготовление раствора СО арбутина. Около 0,01 г СО арбутина помещали в мерную колбу на 10,0 мл, прибавляли 8 мл спирта этилового 70% и нагревали до полного растворения, охлаждали и доводили тем же спиртом до метки.

Приготовление раствора натрия фосфорномолибдата 10%. Около 5,0 г натрия фосфорномолибдата помещали в мерную колбу на 50,0 мл, прибавляли 30 мл спирта этилового 70% и нагревали до полного растворения, охлаждали и доводили тем же спиртом до метки.

Таблица 3.2 – Хроматографические параметры арбутина в различных элюирующих системах, для извлечений из листьев видов *Arctostaphylos* (L.) Adans.

№ п/п	Элюент	$R_f \pm 0,02$		Окраски с диазореактивом	Окраска с натрия фосфорномолибдатом
		$R_f \pm 0,02$ Стандартный образец (арбутин)	$R_f \pm 0,02$ Исследуемое извлечение		
1	<i>n</i> -бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2)	0,60	0,61	Темно-оранжевая	Синяя
2	Уксусная кислота 15%	0,89	0,90	Темно-оранжевая	Синяя
3	Хлороформ-спирт этиловый (6:4)	0,60	0,59	Темно-оранжевая	Синяя
4	Хлороформ-спирт этиловый-вода (26:16:3)	0,76	0,76	Темно-оранжевая	Синяя
5	Этилацетат-муравьиная кислота-вода (88:6:6)	0,50	0,50	Темно-оранжевая	Синяя

Таблица 3.3 – Определение арбутина в листьях видов *Arctostaphylos* (L.) Adans. из разных мест произрастания (элюент - этилацетат-муравьиная кислота-вода 88:6:6)

№ п/п	Место произрастания	R_f
1	Стандартный образец арбутина	0,50
Толокнянки обыкновенной листья		
1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)	0,48
2	Гора Малый Ирмель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	0,50
3	Турочакский район, Республика Алтай (сентябрь 2019 г.)	0,49

4	Деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	0,50
Толокнянки кавказской листья		
5	Плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, КЧР (сентябрь 2020 г.)	0,50

Таким образом, опробованы различные элюирующие системы и определены оптимальные условия хроматографирования, позволяющие провести разделение арбутина в извлечении полученных из листьев видов *Arctostaphylos* (L.) Adans. методом ТСХ. На обоих использованных видах хроматографических пластинках наблюдалось четкое разделение арбутина от сопутствующих веществ и полное совпадение R_f значения с раствором СО.

Валидацию методики испытания на подлинность согласно ГФ РФ XIV изд. включало доказательство специфичности методики [31]. Разработанные условия определения подлинности толокнянки листьев методом ТСХ позволяют установить присутствие доминирующего компонента - арбутина, при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО арбутина по значению фактора удерживания и окрашиванию при использовании выбранного детектирующего агента. Параметр «робастность» нами установлена по влиянию времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля и эффективность разделения арбутина от сопутствующих соединений (табл. 3.4).

Таблица 3.4 – Определение параметра «робастность» методики определения основной группы БАВ в толокнянке листьях (n=3)

№ п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин)	$R_f 0,02$ стандартный образец	$R_f \pm 0,02$ исследуемое извлечение
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,43	0,44
4	30	0,51	0,50
5	40	0,51	0,50
6	50	0,50	0,49
7	60	0,49	0,48

Установлено, что оптимальное время насыщения хроматографической камеры не менее 30 мин, в ненасыщенной камере не наблюдается разделение суммы БАВ.

Параметр «воспроизводимость» оценивали по эффективности разделения арбутина и сопутствующих фенольных соединений на двух типах хроматографических пластин: с полимерной и алюминиевой подложкой. Анализ проводится в разные дни и разными аналитиками (табл. 3.5).

Таблица 3.5 – Определение параметра «воспроизводимость» методики определения основной группы БАВ в толокнянке листьях (n=3)

Аналитик	ПТСХ-П-А		ПТСХ-АФ-А	
	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
1	0,50	0,51	0,49	0,50
2	0,49	0,50	0,51	0,50
3	0,49	0,49	0,50	0,51

Целесообразно использование сорбента – силикагеля, нанесенного на алюминиевую или полимерную подложку, с получением сходных ТСХ-профилей и значений фактора удерживания при проведении анализа в разные дни и разными аналитиками.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ в толокнянке листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В или алюминиевой ПТСХ-АФ-А подложками, элюент – этилацетат-муравьиная кислота-вода (88:6:6), проявители - раствора натрия фосфорномолибдата 10%, оптимальный объем пробы – 60 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца арбутина 10 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором натрия фосфорномолибдата 10% - 10 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в видимом свете.

На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдалось зона адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции СО арбутина ($R_f=0,50$) и 2 зоны адсорбции синего цвета выше и ниже зоны адсорбции арбутина, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

Определение гиперозида в толокнянке листьях

С целью подбора оптимальных условий разделения доминирующего компонента, в сумме флавоноидов – гиперозид. Раствор А в объеме 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мкл наносили на хроматографические пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А-УФ и ПТСХ-П-А-УФ размером 10×10 см. зоны адсорбции детектировали просматриванием в видимом и УФ-свете (при обработке парами аммиака и алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%).

Были использованы 10 различных систем растворителей, зафиксирован эффективный диапазон времени насыщения камеры 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут. Рядом наносили 5 мкл раствор СО гиперозида. Хроматограмму просушивали в течение 5 минут и помещали в камеру, хроматографируя восходящим способом. После прохождения фронта растворителя на 80-90 % длины хроматограммы от линии старта, ее вынимали высушивали под тягой, затем обрабатывали последовательно - парами аммиака, а затем алюминия хлоридом спиртовым

раствором 2%. После чего хроматограммы помещали в сушильный шкаф и выдерживали при 100-105 °С в течение 3 минут. И использованные системы элюентов и полученные значения коэффициента подвижности R_f зон адсорбции, обнаруженные после обработки детектирующими реактивами, представлены в таблице 3.6 (Приложение 3, рис. 3.24). Каждая из систем прошла испытание со стандартным образцом и извлечением с расчетом для них величины (R_f) (таблица 3.6).

Приготовление раствора СО гиперозида. Около 0,0125 г СО гиперозида помещали в мерную колбу на 25,0 мл, прибавляли 20 мл спирта этилового 70% до полного растворения, охлаждали и доводили тем же спиртом до метки.

Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривали в видимом и УФ-свете, далее обрабатывали парами аммиака и алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%. После обработки каждым реактивом повторно просматривали в видимом и УФ-свете при 254 нм (табл. 3.7).

Таблица 3.6 – Хроматографические параметры гиперозида в различных элюирующих системах, для извлечений из листьев видов *Arctostaphylos* (L.) Adans.

№ п/п	Элюент	R_f , стандартный образец	R_f , исследуемый образец
1	Вода-метиленхлорид-метанол-этилацетат (5:10:11:20)	0,67	0,62
2	Хлороформ- этиловый спирт- вода (26:14:3)	0,82	0,82
3	ЛУК-муравьиная кислота-вода-этилацетат (11:11:26:100)	0,80	0,83
4	Вода- метанол (20:80)	Нет разделения	Нет разделения
5	Этилацетат-ацетон-толуол-муравьиная кислота (20:10:10:5:5)	0,49	0,50
6	Хлороформ-метиловый спирт(8:2)	0,20	0,21
7	Вода-метиленхлорид-метанол-этилацетат (10:20:22:40)	Нет разделения	Нет разделения
8	Этилацетат-толуол(5:95)	Нет разделения	Нет разделения
9	Метанол-метиленхлорид (7:93)	Нет разделения	Нет разделения
10	Этиацетат-вода-ЛУ-муравьиная кислота (10:2,6:1,1:1,1)	0,57	0,57

Таблица 3.7 – Характеристика детектирующих реагентов для определения гиперозида в листьях видов *Arctostaphylos* (L.) Spreng. методом ТСХ

№ п/п	Детекция	Окрашивание хроматографических зон
1	Видимый свет	Желто-зеленое окрашивание
2	УФ-свет(254)	Серое окрашивание
3	Пары аммиака водного раствора 25%	Желто-коричневое окрашивание
4	Пары аммиака водного раствора 25% в УФ-свете (254 нм)	Желто-зеленое свечение
5	Алюминия хлорида спиртового раствора 2%	Желтый
6	Алюминия хлорида спиртового раствора 2% и УФ-свете(254 нм)	Желто-коричневое свечение

Таблица 3.8 – Определение гиперозида в листьях видов *Arctostaphylos* (L.) Adans. из разных мест произрастания (элюент - этилацетат-ацетон-толуол-муравьиная кислота 20:10:10:5:5)

№ п/п	Место произрастания	R _f
1	Стандартный образец гиперозида	0,50
Толокнянки обыкновенной листья		
1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)	0,51
2	Гора Малый Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	0,50
3	Турочакский район, Республика Алтай (сентябрь 2019 г.)	0,51
4	Деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	0,52
Толокнянки кавказской листья		
5	Плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, КЧР (сентябрь 2020 г.)	0,50

По результатам испытаний из всех систем была выбрана одна с учетом лучшего проявления и разделения хроматографических зон – этилацетат-ацетон-толуол-муравьиная кислота (20:10:10:5:5). В данной системе были проведены испытания с образцами толокнянки кавказской и толокнянки обыкновенной листьев из разных мест. Наилучшее разделение фиксировали при использовании пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ, проявители - пары аммиака и алюминия хлорид спиртовой раствор 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем раствора стандартного образца гиперозида 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки алюминия хлоридом спиртовым раствором 2% – 3 минуты (табл. 3.8, Приложение 3, рис. 3.24).

Разработанные условия определения подлинности толокнянки листьев методом ТСХ позволяют установить присутствие мажорного компонента - гиперозида, при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО гиперозида по значению фактора удерживания и окрашиванию при

использовании выбранного детектирующего агента. Параметр «робастность» нами установлена по влиянию времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля и эффективность разделения гиперозида от сопутствующих соединений (табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Определение параметра «робастность» методики определения основной группы БАВ в толокнянке листьях (n=3)

№ п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин)	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,46	0,45
4	30	0,51	0,50
5	40	0,50	0,49
6	50	0,49	0,51
7	60	0,49	0,48

Установлено, что оптимальное время насыщения хроматографической камеры не менее 30 мин, в ненасыщенной камере не наблюдается разделение суммы БАВ (табл. 3.9).

Параметр «воспроизводимость» оценивали по эффективности разделения гиперозида и сопутствующих фенольных соединений на двух типах хроматографических пластин: с полимерной и алюминиевой подложкой. Анализ проводится в разные дни и разными аналитиками (табл. 3.10).

Таблица 3.10 – Определение параметра «воспроизводимость» методики определения основной группы БАВ в толокнянке листьях (n=3)

Аналитик	ПТСХ-П-А-УФ		ПТСХ-АФ-А-УФ	
	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец (n=3)	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
1	0,49	0,49	0,51	0,49
2	0,50	0,49	0,50	0,50
3	0,51	0,50	0,49	0,51

По итогам испытаний выявлено в среднем 2-3 зоны адсорбции, среди которых со стандартным образцом гиперозида ($R_f=0,50$) совпадает зона с желто-зеленым свечением. Остальные хроматографические зоны проявляются серым и зеленым свечением.

3.1.4. ДНК-штрихкодирование растений рода *Arctostaphylos* Adans. молекулярно-генетическим методом

Длина участков ITS1 после выравнивания в программе MEGA для видов вересковых составила 710 п.н. Среди последовательностей для всех видов вересковых обнаружено 267

полиморфных позиций, среди которых в 99 позициях происходила только одна замена. Внутри рода *Arctostaphylos* последовательности ITS1 маловариабельны. Исследуемые виды можно идентифицировать по заменам 145 (G/C) - *Arctostaphylos caucasica* и 509 (A/G) - *Arctostaphylos uva-ursi*. На основании полученных данных, а также данных о последовательностях интрона ITS1 из GenBank толокнянка кавказская вероятнее является не самостоятельным видом, а подвидом толокнянки обыкновенной.

Таким образом, нами предложена следующая схема оценки подлинности толокнянки листьев: после выделения и секвенирования растительной ДНК (см. раздел 2.6) полученную последовательность нуклеотидов интрона ITS1 в программе MEGA анализируют с приведенными ниже последовательностями (Приложение 3, табл. 3.1). Для этого проводят выравнивание через ClustalW, далее обрезают начало и конец последовательностей, получая цепочки длиной 710 н.п. После этого определяют совпадение последовательностей по приведенным выше позициям.

3.2.1. Морфолого-диагностические признаки рода *Vaccinium* L.

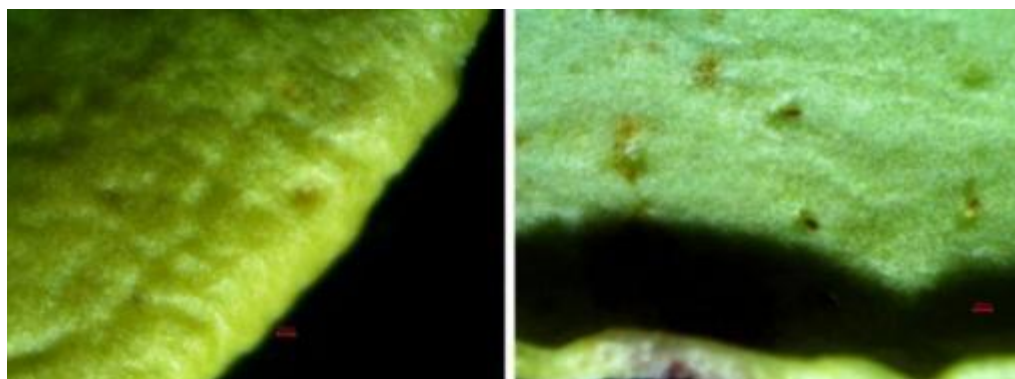
*Морфологические признаки листа *Vaccinium vitis-idaea* L.*

Цельное сырье представлено смесью цельных или частично измельченных листьев. Листья короткочерешковые, кожистые, эллиптические или обратнойцевидные, на верхушке притупленные или слабовеямчатые с цельными или слегка зазубренными, завернутыми вниз краями, длиной 7-30 мм, шириной 5-15 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) на нижней поверхности листа видны многочисленные темно-коричневые точки (железки). Черешки листьев в поперечном сечении округло-треугольной формы, покрытые волосками. Цвет листьев от темно-зеленого до светло-зеленого (Приложение 3, рис. 3.2). Запах отсутствует, вкус водного извлечения горький, вяжущий.

Измельченное сырье представлено кусочками листьев различной формы, проходящих сквозь сито диаметром отверстий 3 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев различной формы, на нижней поверхности листьев многочисленные темно-коричневые точки (железки). Цвет темно-зеленый или светло-зеленый. Запах отсутствует, вкус водного извлечения горький, вяжущий.

Порошок представлен кусочками листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев от светло-зеленого до темно-зеленого цвета с многочисленными точками (железками) на нижней поверхности листа. Цвет порошка темно-зеленый или светло-зеленый. Запах отсутствует, вкус водного извлечения горький, вяжущий.

С помощью стереомикроскопии наблюдали, что верхняя сторона листовой пластинки голая, блестящая, лишенная трихом и покрытая кутикулой. Края листа загнут на нижнюю сторону. Трихомы по краю листа отсутствуют. На нижней поверхности листа визуализируются железки коричневатого цвета. Черешок короткий, опушенный (рис. 3.7).



А – Верхняя сторона листа

Б – Нижняя сторона листа

Рисунок 3.7 – Фрагменты верхней и нижней стороны листа брусники обыкновенной (ув.×40)

Люминесценция тканей листовой пластинки б. обыкновенной яркая, с обеих сторон. У основания листа и на черешке заметна желтоватая люминесценция редких трихом (рис. 3.8). Железки имеют коричневую люминесценцию (рис. 3.9).

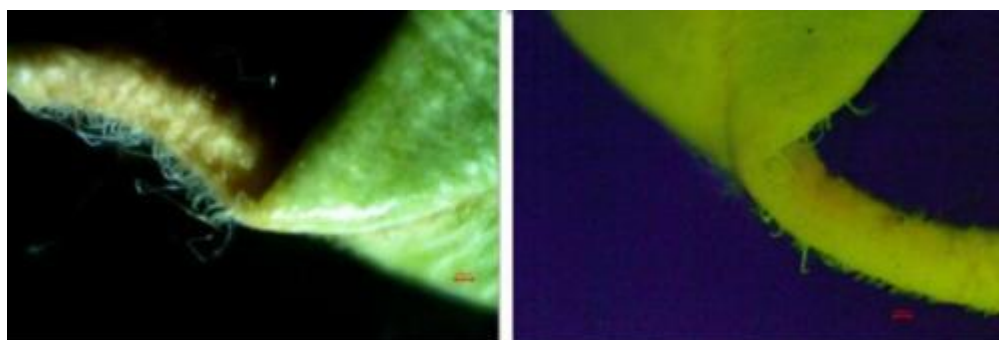


Рисунок 3.8 – Люминесценция тканей черешка листа брусники обыкновенной (ув.×40)

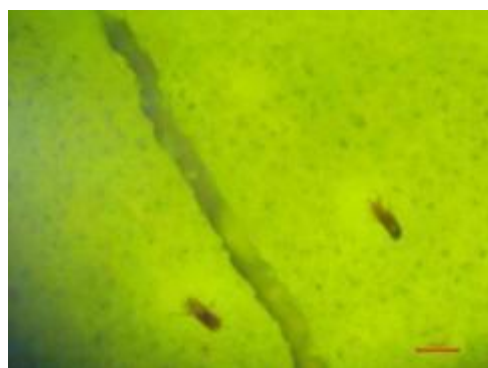


Рисунок 3.9 – Люминесценция тканей нижней стороны листа брусники обыкновенной (ув.×40)

Морфологические признаки листа *Vaccinium myrtillus* L.

Цельное сырье представлено цельными или частично измельченными листьями, простыми, короткочерешковыми до 3 мм длиной, без прилистников. Состоит из тонких листьев

яйцевидной или эллиптической формы от 9 до 40 мм длиной и 2-20 мм шириной; верхушка листа заостренная, основание слегка сердцевидное или закругленное с мелкопильчато-зубчатым краем; жилкование сетчатое. Цвет листьев с верхней стороны - зеленый, темно-зеленый, красновато-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, серо-зеленый, коричневатозеленый (Приложение 3, рис. 3.3-1). Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье представлено кусочками листьев различной формы и черешков, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с мелкопильчато-зубчатым краем от серовато-зеленого, светло-зеленого до темно-зеленого цвета. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горьковато-вяжущий.

Порошок сырья представлен кусочками листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев от серовато-зеленого, светло-зеленого до темно-зеленого цвета. Цвет порошка темно-зеленый, серо-зеленый или светло-зеленый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горьковато-вяжущий.

При использовании стереомикроскопии фиксировали, что листья черники обыкновенной тонкие и без кутикулы. Верхняя сторона листа голая, сеть жилок не выражена. Край листа слегка завернут на нижнюю сторону (рис. 3.10). На нижней стороне листа хорошо выделяется сеть жилок. Головчатые трихомы располагаются по краю листа и по жилкам снизу листа. Они имеют бесцветную прикрепляющую их к эпидермису клетку и многоклеточную головку с буровато-оранжевым содержимым. Черешок короткий, деревянистый, опушение отсутствует (рис. 3.11).

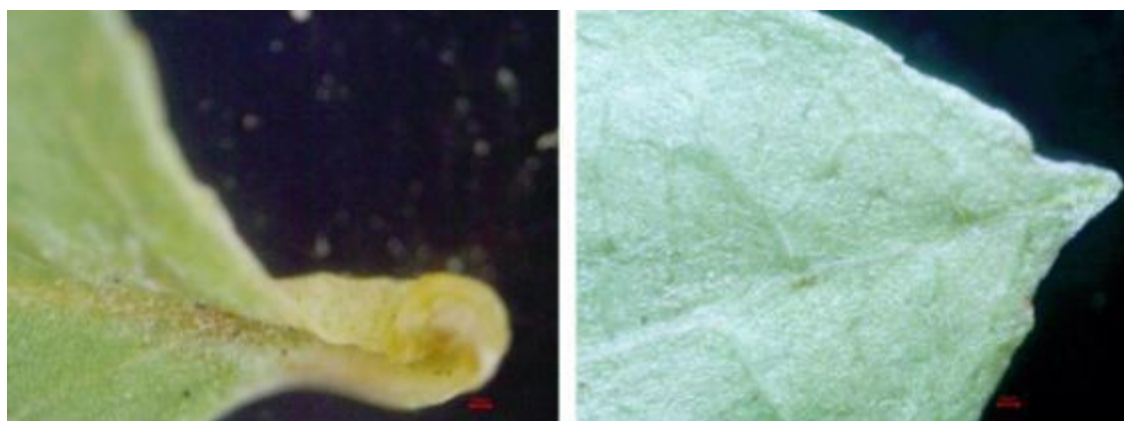
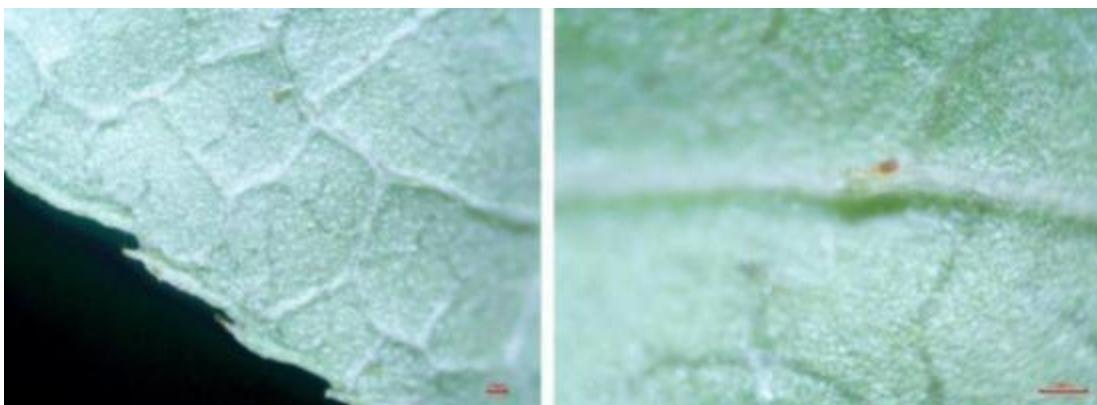
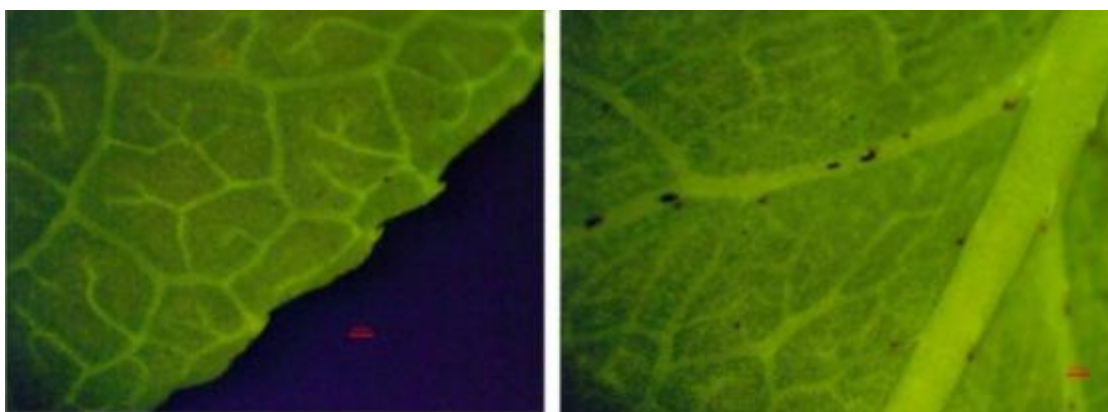


Рисунок 3.10 – Фрагменты верхней стороны листа черники обыкновенной (ув.×40)



А – Край нижней стороны листа(ув.×40) Б – Нижняя сторона листа (ув.×100)
Рисунок 3.11 – Фрагменты нижней стороны листа черники обыкновенной

Люминесценция тканей верхней стороны листа хорошо выражена, свечение желтовато-зеленого цвета. Отчетливо заметно яркое свечение жилок и оснований, железистых трихом по кончикам зубцов по краю листа (рис. 3.12-А). Люминесценция тканей нижней стороны листа более выражена, что особенно заметно при рассмотрении свечения тканей жилок. Железистые трихомы имеют своеобразное свечение – основание люминесцирует ярким зеленоватым цветом, а головка имеет оранжевый или коричневатый оттенок (рис. 3.12-Б).



А – Верхняя сторона листа Б – Нижняя сторона листа
Рисунок 3.12 – Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа черники обыкновенной (ув.×40)

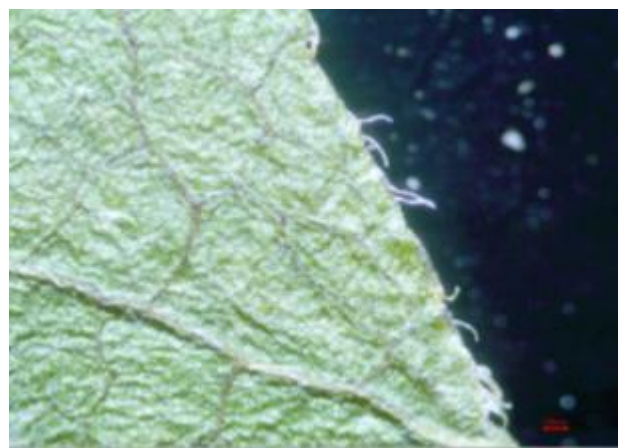
Морфологические признаки листа *Vaccinium arctostaphylos* L.

Цельное сырье представлено цельными или частично измельченными листьями, простыми, короткочерешковыми до 2 мм длиной, без прилистников. Листовая пластинка продолговатой или яйцевидно-продолговато формы от 60 до 80 мм длиной и 15-35 мм шириной; верхушка листа заостренная, к обеим сторонам сужена с мелкопильчато-зубчатым краем; жилкование сетчатое. Цвет листьев с верхней стороны - зеленый, темно-зеленый, красновато-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, серо-зеленый, коричневато-зеленый (Приложение 3, рис. 3.3-2). Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье представлено кусочками листьев различной формы и черешков, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с мелкопильчато-зубчатым краем от серовато-зеленого, светло-зеленого до темно-зеленого цвета. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, слегка горьковато-вяжущий.

Порошок представлен кусочками листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листьев от серовато-зеленого, светло-зеленого до темно-зеленого цвета. Цвет порошка серовато-зеленого, светло-зеленого или темно-зеленого цвета. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, слегка горьковато-вяжущий.

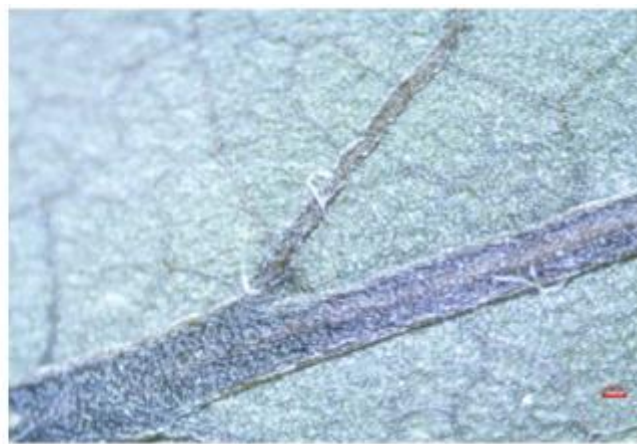
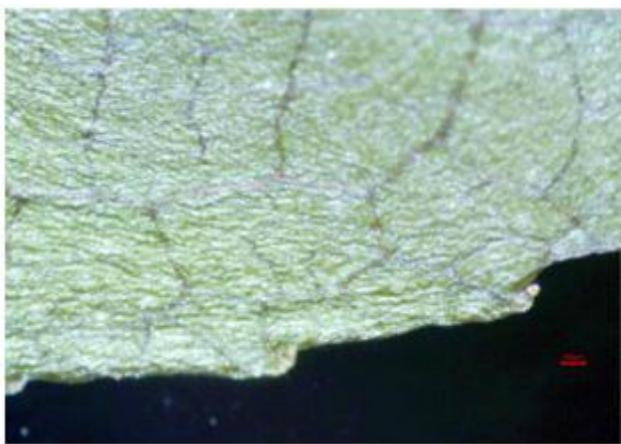
С помощью стереомикроскопии наблюдали, что листовая пластинка черники обыкновенной тонкая, без кутикулы. Верхняя сторона листа опушена, трихомы простые, белого цвета, располагаются по жилкам листа, сеть жилок хорошо выражена, жилки имеют желтовато-бурое окрашивание, предположительно, из-за наличия млечников (рис. 3.13-А). Край листа слегка завернут на нижнюю сторону, у молодых листьев у основания листа встречаются простые волоски (рис. 3.13-Б). На нижней стороне листа хорошо выделяется сеть жилок, по которым располагаются редкие простые волоски белого цвета (рис. 3.14-А). Головчатые трихомы располагаются по краю листа и по жилкам снизу листа. Они имеют бесцветную прикрепляющую их к эпидермису клетку и многоклеточную головку с буровато-оранжевым содержимым (рис. 3.14-Б). Черешок короткий, деревянистый, густо опушенный (рис. 3.15).



А – Верхняя сторона листа

Б – Край верхней стороны листа

Рисунок 3.13 – Верхняя сторона листа и край у основания листовой пластинки черники кавказской (ув.×40)



А – Верхняя сторона и край листа (ув.х30) Б – Нижняя сторона листа (ув.х40)
Рисунок 3.14 – Фрагменты верхней и нижней стороны листа черники кавказской



Рисунок 3.15 – Черешок листа черники кавказской (ув.х40)

Люминесценция тканей верхней стороны листа не выражена, свечение коричневатозеленого цвета. Отчетливо заметно яркое зеленоватое свечение жилок, а также трихом. По кончикам зубцов по краю листа визуализируется зеленоватое свечение оснований железистых волосков и оранжевое выделительных клеток. Люминесценция тканей нижней стороны листа более выражена, зеленоватого цвета, жилки имеют желтовато-оранжевую люминесценцию. Отчетливо заметно свечение устьичного аппарата, как на верхней, так и нижней стороне (на темном фоне желтовато-зеленая люминесценция), что представлено на рисунках 3.16, 3.17 и 3.18.

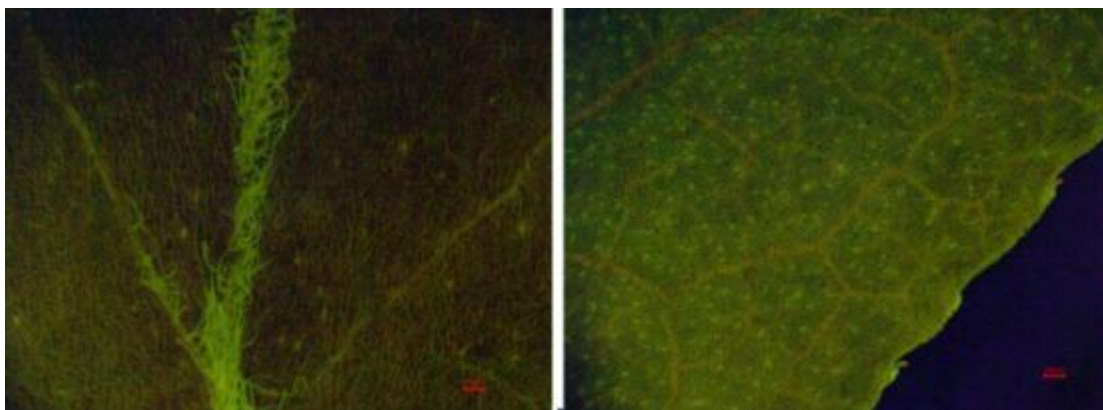
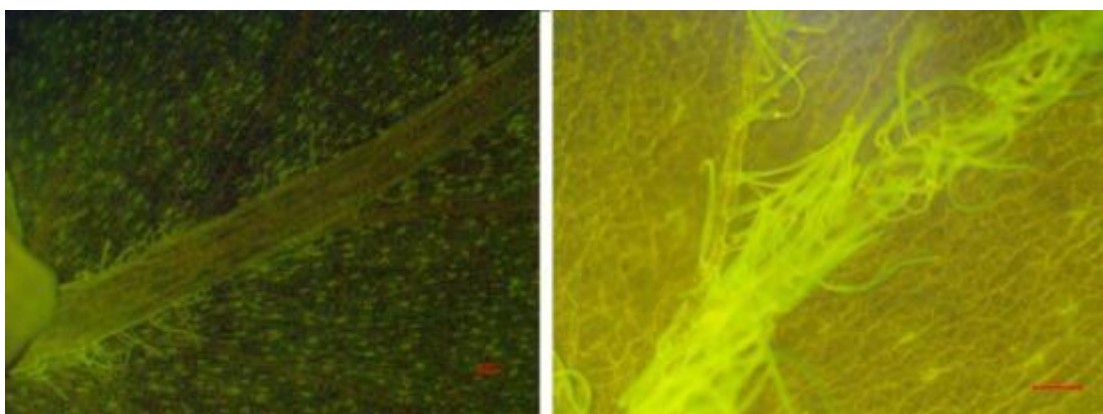


Рисунок – 3.16 Люминесценция тканей верхней стороны листа (ув.×40)



А – Нижняя сторона листа (ув.×40)

Б – Нижняя стороны листа (ув.×100)

Рисунок 3.17 – Люминесценция тканей нижней стороны листа черники кавказской

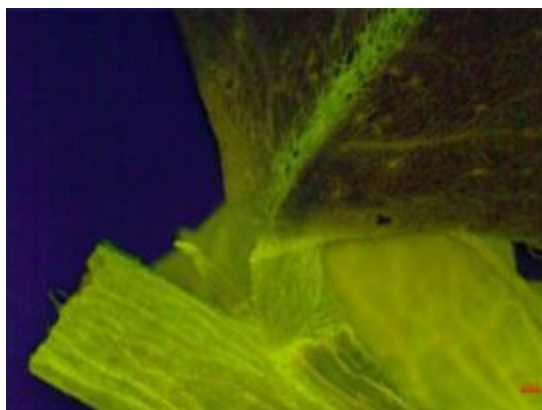


Рисунок 3.18 – Люминесценция тканей верхней стороны листа и черешка

Морфологические признаки листа *Vaccinium uliginosum* L.

Цельное сырье представлено цельными или частично измельченными листьями, простыми, короткочерешковыми до 1 мм длиной, без прилистников. Листовая пластинка кожистая, голая, цельнокрайняя, с загнутыми книзу краями, обратнойцевидной или эллиптической формы от 5 до 40 мм длиной и 4-25 мм; верхушка листа округлая или туповатая, основание клиновидное с; жилкование перисто-сетчатое. Цвет листьев с верхней стороны - зеленый, светло-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, сизоватый с выдающимися

жилками (Приложение 3, рис. 3.4). Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

Измельченное сырье представлено смесью кусочков листьев различной формы и черешков, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с цельным краем от зеленого, светло-зеленого, до сизого цвета. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

Порошок представлен кусочками листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листьев от зеленого, светло-зеленого, до сизого цвета. Цвет порошка зеленого, светло-зеленого или сизого цвета. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

С помощью стереомикроскопии листа голубики обыкновенной выявлено, что верхняя поверхность листа плотная, покрыта кутикулой. Жилки отчетливо выражены, более светлые, чем окраска листовой пластинки. Визуализируются редкие овальные образования, предположительно, железки. На молодых листьях ближе к основанию встречаются мелкие одноклеточные трихомы (рис. 3.19).

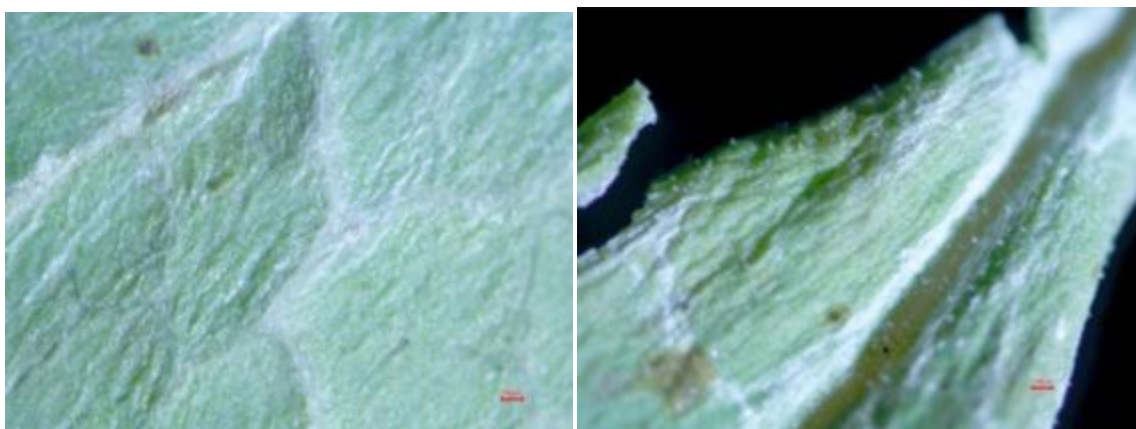


Рисунок 3.19 – Фрагменты верхней стороны листа голубики обыкновенной (ув. ×40)

На поверхности нижней стороны листа г. обыкновенной заметна сильная складчатость эпидермиса, отчетливо выделяются жилки (рис. 3.20). Край листа заворачивается на нижнюю сторону, по краю листа встречаются редкие трихомы. Также на нижней стороне визуализируются округлые блестящие железки (рис. 3.21).

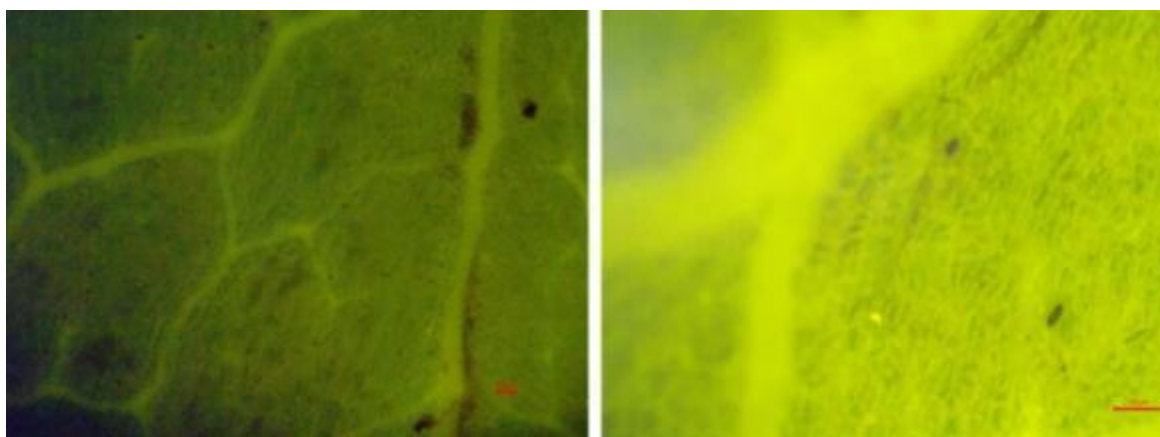


Рисунок 3.20 – Фрагменты нижней стороны листа голубики обыкновенной (ув. $\times 40$)



Рисунок 3.21 – Фрагменты края листа голубики обыкновенной (ув. $\times 40$)

При оценке автолюминесценции листа голубики обыкновенной следует отметить, что верхняя сторона листа имеет слабое свечение, в основном люминесцирует жилка листа (желто-зеленое свечение) (рис. 3.15-А), на нижней поверхности свечение более выраженное. Железки имеют коричневое свечение (рис. 3.15-Б).



А – Верхняя сторона листа (ув. $\times 40$)

Б – Нижняя стороны листа (ув. $\times 100$)

Рисунок 3.22 – Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа голубики обыкновенной

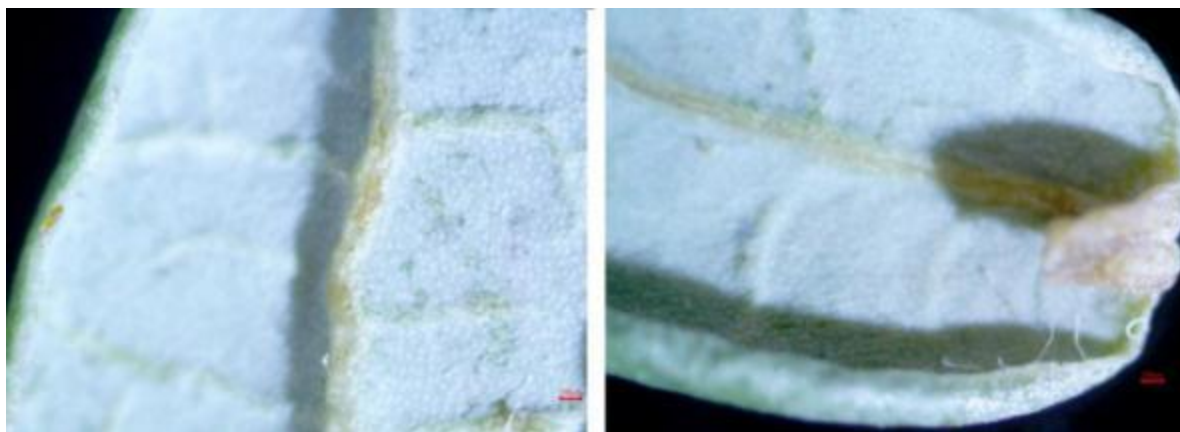
Морфологические признаки листа *Vaccinium oxycoccos* L.

Цельное сырье представлено смесью олиственных побегов, листьев и небольшого количества плодов. Листья очередные, простые, короткочерешковые до 1 мм длиной, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, кожистые, плотные, цельнокрайные длиной 5 - 16 мм, шириной 2 – 8 мм, с заострённой верхушкой и закруглённым основанием, с завернутым вниз краем; с верхней стороны листья тёмно-зелёные, блестящие, голые, с вдавленной средней жилкой; с нижней стороны голубовато-сизые с восковым налётом. Стебли цилиндрические, нитевидные, красновато-коричневые, опушённые. Плод – многосеменная красная или темно-красная ягода с сизоватым налетом, шаровидной формы от 10-20 мм в диаметре, сверху с остатками чашечки или со следом от него. Цвет - красный или темно-красный (Приложение 3, рис. 3.5). Запах у побегов отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горько-вяжущий.

Измельченное сырье представлено смесью кусочков стеблей, листьев и плодов, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с блестящей поверхностью темно-зеленого (верхняя сторона – кожистая), светло-зеленого, светло-серого цвета; кусочки цилиндрических стеблей с красновато-коричневым опушением; кусочки плода-ягоды красного или темно-красного цвета. Цвет темно-зеленый, светло-зеленый, светло-серый, красновато-коричневый. Запах слабый, неспецифичный. Вкус водного извлечения кисловатый, горько-вяжущий.

Порошок представлен кусочками листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты листьев с блестящей поверхностью темно-зеленого (верхняя сторона – кожистая), светло-зеленого, светло-серого цвета; кусочки стеблей с красновато-коричневым опушением; кусочки плода-ягоды красного или темно-красного цвета. Цвет порошка светло-зеленого, светло-серого цвета с красновато-коричневыми, красными или темно-красными вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горько-вяжущий.

С помощью стереомикроскопии наблюдали, что на верхней стороне листа клюквы болотной имеется плотный слой кутикулы, край листа загнут книзу. Снизу листа слой кутикулы менее плотный, заметны многочисленные устьица. По краю листа встречаются мелкие головчатые трихомы с коричневатым содержимым. Жилки сильно выделяются на нижней стороне листа. Устьица многочисленные. У основания листа по краю визуализируются вытянутые простые трихомы. Черешки короткие, сильно загнутые, деревянистые (рис. 3.23). .

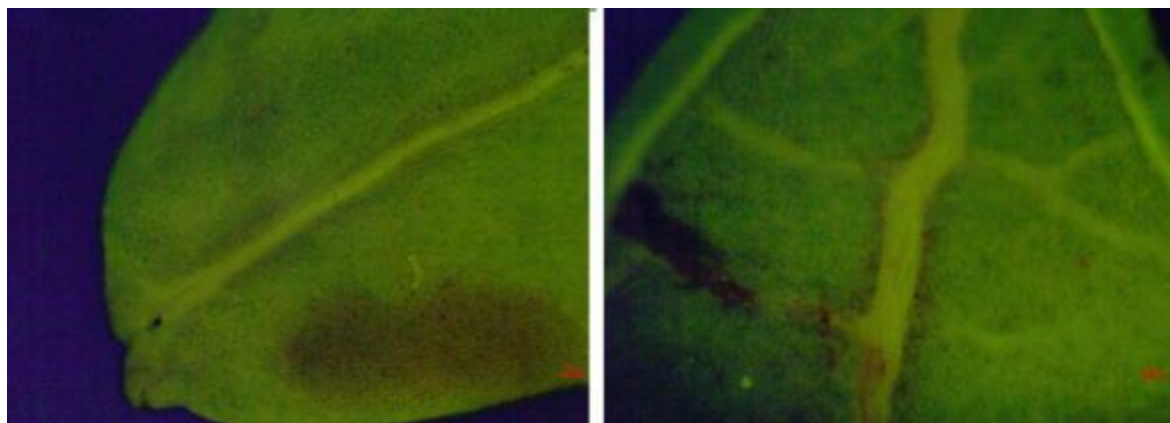


А – Нижняя сторона листа

Б – Нижняя стороны листа и черешок

Рисунок 3.23 – Фрагменты нижней стороны листа клюквы болотной (ув.×40)

Люминесценция верхней и нижней сторон листа клюквы болотной слабая, наибольшим свечением обладают жилки листа (желто-зеленое и красновато-коричневое свечение) (рис. 3.24).



А – Верхняя сторона листа (ув.×40)

Б – Нижняя стороны листа (ув.×100)

Рисунок 3.24 – Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа клюквы болотной

Как видно из таблицы 3.12 охарактеризованы основные морфологические признака некоторых представителей рода *Vaccinium* L. с использованием стереомикроскопии, что позволило выявить и визуализировать основные диагностические признаки изучаемых видов.

Основными признаками, определяющими подлинность изучаемых объектов, являются: наличие и строение трихом на листовой пластинке и черешке, а также люминесцентная характеристика выделительного аппарата.

Таблица 3.12 – Сравнительная характеристика морфологических признаков видов рода *Vaccinium* L.

Объект	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	<i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	<i>Vaccinium oxycoccos</i> L.
Кутикула	+	-	-	+/-	+
Сеть жилок	-	+↓	+	+↓	+↓
Млечники	-	-	+	-	-
Железистые волоски	+↓	+↓	+↓	+↓	-
Простые волоски по краю	-	+	+	-	+
Простые волоски на черешке	+	-	+	+	+
Железистые волоски по краю	-	+	+	-	+
Простые волоски на поверхности	-	-	+↓↑	+↑	-
Люминесценция листовой пластинки	Желтая	Желтоватая, выражена снизу, трихомы желтая	коричневатая, выражена снизу, трихомы ярко желтая	Желтоватая, выражена снизу	Желтовато-зеленая, красноватая вдоль жилок
Люминесценция черешка	Желтая	Желтоватая	Ярко - желтая	Желтовато-коричневая	Желтоватая
Люминесценция выделительного аппарата	Коричневая	Оранжевая, коричневая	Оранжево - желтая	Коричневая	-

*↓–нижняя сторона листа, ↑–верхняя сторона листа,

+ – признак ярко выражен, - – признак не выражен, +/- – признак слабо выражен

Полученные экспериментальные данные будут использованы для экспресс-определения подлинности исследуемых видов ЛРС по морфолого-диагностическим признакам, которые также будут учитываться при их заготовке, с целью сведения к минимуму ошибки при сборе. Данные диагностические признаки будут рекомендованы для внесения в НД как дополнительные признаки определения подлинности.

3.2.2. Анатомо-диагностические признаки видов рода *Vaccinium* L.

Микроскопические признаки листа *Vaccinium vitis-idaea* L.

При рассмотрении листа с поверхности верхнего эпидермиса листа брусники обыкновенной видны основные клетки эпидермиса с извилистыми боковыми стенками, клеточные стенки четковидно утолщены. В цитоплазме основных клеток эпидермиса есть включения. Вдоль жилки встречаются простые прямые или изогнутые одноклеточные волоски (Приложение 3, рис. 3.25). На фрагменте нижнего эпидермиса листа видны основные клетки эпидермиса с извилистыми боковыми стенками, вокруг железки основные клетки эпидермиса расположены розеткой, с менее извилистыми клеточными стенками. Устьица многочисленные, парацитные, мелкие. Клетки многоклеточной железки с коричневым содержимым. В железке различима короткая многоклеточная ножка и овальная многоклеточная головка (Приложение 3, рис. 3.26). На нижнем эпидермисе листа в области жилки видна многоклеточная железка. Вдоль проводящего пучка заметны призматические кристаллы (Приложение 3, рис. 3.27). На загнутом крае листа с верхней стороны видна многоклеточная железка, простой одноклеточный изогнутый волосок. По краю листа основные клетки эпидермиса прямостенные, из-под них просвечивает тяж склеренхимных волокон (Приложение 3, рис. 3.28 и 3.29).

На поперечном срезе загнутого края листа видны толстая кутикула, покрывающая верхний и нижний эпидермис и тяжи толстостенных склеренхимных волокон, заполняющие жесткий край листа (Приложение 3, рис. 3.30). На поперечном срезе листа в области центральной жилки на верхней поверхности листа видны простой волосок в области жилки, толстая кутикула с верхней стороны листа, проводящий пучок коллатеральный, снабжен склеренхимной обкладкой, под ним многослойная уголкообразная колленхима, пучок выступает с нижней стороны листа (Приложение 3, рис. 3.31). На поперечном срезе листа в области между жилками мезофилл листа представлен многослойной паренхимой (столбчатой и губчатой), под которой видна аэренхима с крупными воздухоносными полостями (Приложение 3, рис. 3.32). На фрагменте мезофилла листа с нижней стороны видна губчатая паренхима с крупными воздухоносными полостями (Приложение 3, рис. 3.33). На препарате с поверхности черешка листа вдоль жилки видно мощное опушение из извилистых одноклеточных волосков с коричневым содержимым, многоклеточная железка, прямостенные основные клетки

эпидермиса (Приложение 3, рис. 3.34). На поперечном срезе черешка листа, на поверхности черешка заметно опушение из одноклеточных волосков, под эпидермисом - 3-4-слойная колленхима, под которой видна паренхима с крупными межклетниками, запасающими воздух. Проводящий пучок один коллатерального типа (Приложение 3, рис. 3.35).

Исходя из результатов исследования для брусники листьев, впервые были выявлены следующие анатомические диагностические признаки: наличие включений в цитоплазме основных клеток эпидермиса, по краю листовой пластинки основные клетки эпидермиса прямостенные, из-под которых просвечивается тяж склеренхимных волокон. Также на поперечном срезе листа в области между жилками мезофилл листа был представлен многослойной паренхимой (столбчатой и губчатой), под которой обнаруживалась аэренхима с крупными полостями. На фрагменте мезофилла листа с нижней стороны просматривалась губчатая паренхима с крупными воздухоносными полостями. На поперечном срезе черешка листа под эпидермисом - 3-4-слойная колленхима, под которой видна паренхима с крупными межклетниками, запасающими воздух (аэренхима).

Впервые выявленные признаки для брусники обыкновенной листьев будут внесены в ФС «Брусники обыкновенной листья».

Микроскопические признаки листа *Vaccinium myrtillus* L.

При рассмотрении листа с поверхности на верхней стороне видны глубоко извилистые основные клетки эпидермиса (Приложение 3, рис. 3.36), а также в области крупной жилки, вдоль нее встречаются короткие одноклеточные толстостенные волоски и булавовидные железки. Устьица единичные (Приложение 3, рис. 3.37). По краю листовой пластинки просматриваются зубчики. На краях каждого зубчика есть булавовидные железки. Хорошо видна сеть жилок с характерным рисунком жилкования, проводящие пучки, даже самые мелкие имеют контрастную окраску. К каждой булавовидной железке подходит проводящий пучок (Приложение 3, рисунок 3.38). В области вершины листа встречаются булавовидные железки вдоль центральной жилки и единично на самой поверхности листа. Центральная жилка заходит в терминальный зубчик на вершине листа (Приложение 3, рис. 3.39). На нижнем эпидермисе листа черники обыкновенной видны многочисленные устьица, кристаллоносная обкладка жилок, булавовидная железка с многоклеточной ножкой и многоклеточной головкой (Приложение 3, рис. 3.40). Основные клетки эпидермиса извилистые. Встречаются парацитные и анизоцитные устьица (Приложение 3, рис. 3.41). На нижнем эпидермисе листа черники обыкновенной заметна кристаллоносная обкладка проводящих пучков (Приложение 3, рис. 3.42).

На поперечном срезе листа черники обыкновенной на верхней поверхности просматривается простой волосок в области центральной жилки, жилка выдается снизу листа, проводящий пучок коллатеральный, снабжен мощной склеренхимной обкладкой, под ним — многослойная колленхима. Столбчатый мезофилл однорядный, губчатый мезофилл с крупными межклетниками (Приложение 3, рис. 3.43).

На эпидермисе черешка листа черники обыкновенной видны четырехугольные толстостенные основные клетки эпидермиса, их содержимое неравномерно окрашено (Приложение 3, рисунок 3.44). На поперечном срезе черешка листа черники обыкновенной просматривается один проводящий пучок, коллатеральный, с обкладкой. В хлоренхиме заметны межклетники (Приложение 3, рис. 3.45).

Исходя из результатов исследования для черники обыкновенной листьев впервые были выявлены следующие анатомические диагностические признаки: сеть жилок с характерным рисунком жилкования, проводящие пучки, даже самые мелкие имели контрастную окраску. К каждой булавовидной железке подходил проводящий пучок. В области вершины листа встречались булавовидные железки вдоль центральной жилки и единично на самой поверхности листа.

Микроскопические признаки побегов *Vaccinium arctostaphylos* L.

При рассмотрении фрагмента листа с поверхности на верхней стороне видно, что основные клетки эпидермиса извилистые. Вдоль края листовой пластинки выражено опушение длинными тонкостенными бородавчатыми волосками с красноватым содержимым, имеются булавовидные железки с короткой многоклеточной ножкой и многоклеточной головкой (Приложение 3, рис. 3.46). На поверхности листа черники кавказской с верхней стороны в области жилки просматриваются многочисленные тонкостенные длинные волоски вдоль проводящих пучков (Приложение 3, рис. 3.47). При рассмотрении фрагмента листа с поверхности нижней стороны видно, что основные клетки эпидермиса извилистые. На поверхности листа единично встречаются булавовидные железки (Приложение 3, рис. 3.48). Также видны паразитные устьица (Приложение 3, рис. 3.49).

Лист черники кавказской с поверхности имеет оттянутую верхушку, по краю листовой пластинки и вдоль жилок наблюдается опушение из крупных одноклеточных волосков (Приложение 3, рис. 3.50). По краю листовой пластинки также имеются зубчики, которые оканчиваются булавовидными железками (Приложение 3, рис. 3.51).

На поперечном срезе листа черники кавказской верхний эпидермис листа покрыт толстым слоем кутикулы. Центральная жилка мощная, выдается с нижней стороны листа, над ней и под ней эпидермис снабжен простыми волосками. Проводящий пучок коллатеральный,

снабжен мощной склеренхимной обкладкой, под ним — многослойная колленхима. Столбчатый мезофилл однорядный, губчатый мезофилл с крупными межклетниками (Приложение 3, рис. 3.50). Основные клетки эпидермиса черешка лежат рядами, четырехугольные, прямостенные, с толстыми боковыми стенками. Видны крупные друзы оксалата кальция, обильное опушение из коротких одноклеточных загнутых на верхушке волосков (Приложение 3, рис. 3.51). На поперечном срезе черешка листа черники кавказской просматривается проводящий пучок один, коллатеральный, с обкладкой. В хлоренхиме заметны межклетники. Эпидермис подстилается угловой колленхимой. С поверхности черешки имеют обильное опушение (Приложение 3, рис. 3.52).

Исходя из результатов исследования для черники кавказской листьев впервые были выявлены следующие анатомические диагностические признаки: длинные, толстостенные, бородавчатые волоски с красноватым содержимым которые просматривались вдоль края листовой пластинки, толстый слой кутикулы который просматривался на поперечном срезе листа верхнего эпидермиса, обильное опушение черешка состоящее из коротких одноклеточных загнутых на верхушке волосков, где также просматривались крупные друзы оксалата кальция.

Все выявленные анатомические диагностические признаки будут рекомендованы для внесения в проект ФС «Черники листа».

Микроскопические признаки листа *Vaccinium uliginosum* L.

На препарате с верхней поверхности листа голубики обыкновенной заметны единичные эфирно-масличные железки. Опушение вдоль жилок простыми тонкостенными короткими одноклеточными волосками прямыми или слегка прижатыми к поверхности листа (Приложение 3, рис. 3.53). Опушение заметно в основном вдоль жилок (Приложение 3, рис. 3.54). Основные клетки эпидермиса изодиаметрические или прозенхимные вдоль жилки с прямыми или изогнутыми боковыми стенками без четковидного утолщения, содержимое окрашено неравномерно, присутствуют многочисленные включения (Приложение 3, рис. 3.55). На верхней стороне листа есть устьица (Приложение 3, рис. 3.56). На фрагменте верхнего эпидермиса листа видны эфирно-масличные железки округлой формы, состоящие из 4-5 клеток (Приложение 3, рис. 3.57). Фрагмент нижнего эпидермиса листа голубики обыкновенной в области края листовой пластинки имеет более интенсивно окрашенное содержимое, утолщенные боковые стенки, клетки по размерам крупнее, чем основные клетки эпидермиса вдали от края листовой пластинки (Приложение 3, рис. 3.58). Также заметны многочисленные устьица с широко раскрытой устьичной щелью, замыкающие клетки устьиц и нередко побочные клетки имеют розово окрашенное содержимое (Приложение 3, рис. 3.59), многоклеточные

сосочки, выступающие на нижней поверхности листа (Приложение 3, рис. 3.60) и парацистные устьица (Приложение 3, рис. 3.61).

На поперечном срезе листа голубики обыкновенной в области центральной жилки виден крупный коллатеральный проводящий пучок центральной жилки, выступающий за пределы листовой пластинки, окруженный мощной склеренхимной обкладкой, под проводящим пучком имеется колленхима. На верхней поверхности листа заметно опушение одноклеточными волосками. Мезофилл листа представлен однорядной столбчатой паренхимой и губчатой паренхимой с большими межклетниками (Приложение 3, рис. 3.62). В области проводящих пучков с верхней стороны листа происходит формирование углубления (жилки вдавленные). Боковые жилки не выступают за пределы листовой пластинки с нижней стороны листа. Мезофилл представлен однорядной столбчатой паренхимой и губчатой паренхимой с большими межклетниками (Приложение 3, рис. 3.63). В очертании срез треугольный. Проводящий пучок один, крупный, коллатеральный (Приложение 3, рис. 3.64). На препарате с поверхности черешка листа видны многочисленные простые тонкостенные короткие одноклеточные волоски. Основные клетки эпидермиса четырехугольные, с утолщенными боковыми стенками, содержимое клеток окрашено (Приложение 3, рис. 3.65).

Исходя из результатов исследования для голубики обыкновенной листьев впервые были выявлены следующие анатомические диагностические признаки: наличие устьиц и эфиромасличных железок на верхней стороне листа, оба края листовой пластинки имеет окрашенное содержимое, и фиксируется наличие одноклеточных волосков на верхней стороне листа.

Все выявленные анатомические, диагностические признаки будут рекомендованы для внесения в проект ФС «Голубики болотной листья».

Микроскопические признаки побегов *Vaccinium oxycoccos* L.

При рассмотрении листа с поверхности на верхней стороне видны извилистые основные клетки эпидермиса изодиаметрические или прозенхимные вдоль жилки, их боковые стенки четковидно-утолщенные, содержимое окрашено неравномерно (Приложение 3, рис. 3.66). На верхней поверхности листа также единично встречаются одноклеточные головчатые волоски (Приложение 3, рис. 3.67). Основные клетки верхнего эпидермиса имеют бесцветное, светло-розовое или красно окрашенное содержимое, в цитоплазме заметны включения в виде друз. У ярко окрашенных клеток верхнего эпидермиса видна центральная вакуоль в виде крупного светлого пятна, занимающего центральное положение в клетке (Приложение 3, рисунок 3.68). В эпидермисе встречаются склереиды звездчатой формы (Приложение 3, рис. 3.69). На нижней стороне листа с поверхности видны извилистые клетки эпидермиса, также просматриваются

устыица паразитного типа, замыкающие клетки которых имеют розовую окраску (Приложение 3, рис. 3.70). У ярко окрашенных основных клеток нижнего эпидермиса видна центральная вакуоль в виде крупного светлого пятна, занимающего центральное положение в клетке (Приложение 3, рис. 3.71). На нижней стороне листа жилки имеет мощную кристаллоностную обкладку (Приложение 3, рис. 3.72). По краю загнутого книзу листа тянутся прозенхимные клетки эпидермиса с прямыми или слабо извилистыми боковыми стенками и более темным содержимым (Приложение 3, рис. 3.73).

На поперечном срезе черешков листьев заметен один крупный проводящий пучок (Приложение 3, рис. 3.74). Клетки эпидермиса черешков листьев с поверхности в очертании четырехугольные или овальные, имеют красно окрашенное содержимое, расположены плотными рядами, имеют утолщенные (особенно в углах) боковые стенки (Приложение 3, рис. 3.75). В цитоплазме клеток мезофила черешков видны очень крупные многочисленные друзы (Приложение 3, рис. 3.76). На поперечном срезе листа клюквы болотной в области центральной жилки просматриваются основные клетки эпидермиса, которые с поверхности покрыты мощным слоем кутикулы, также видна однослойная палисадная ткань, губчатый мезофилл с крупными межклетниками, а ниже-аэренхима. Проводящие пучки закрытые коллатеральные, окружены мощной склеренхимой. Центральная, а иногда и крупные боковые жилки несколько выдаются снизу листа (Приложение 3, рис. 3.77).

Клетки эпидермиса кожуры плодов (эпикарп) заполнены красным содержимым. Клетки эпидермиса мелкие, прямостенные, в очертании многогранные или округлые, их боковые стенки заметно утолщены. С внутренней стороны кожуры плодов заметна однослойная колленхима, которая подстилает эпидермис и состоит из более крупных клеток со светло-розовым содержимым. Поскольку боковые стенки клеток колленхимы утолщены, их очертания просвечивают через слой клеток эпидермиса, создавая характерный микроскопический рисунок кожуры плодов клюквы (Приложение 3, рис. 3.78). Отдельные клетки эпидермиса могут иметь более интенсивный оттенок по сравнению с соседними (Приложение 3, рис. 3.79). Паренхима состоит из крупных рыхло лежащих тонкостенных клеток, заполненных светло-розовым содержимым, в их цитоплазме помимо центральной вакуоли видны многочисленные мелкие вакуоли (Приложение 3, рис. 3.80). Также имеются отдельные группы мелких клеток паренхимы содержащие друзы (Приложение 3, рис. 3.81). Эпидермис семенной кожуры однослойный по всей поверхности семени представлен палисадообразными слизевыми клетками. Субэпидермальный слой семенной кожуры представлен двумя слоями склереид (Приложение 3, рис. 3.82, 3.83). Склереиды субэпидермального слоя имеют широкий просвет, толстые клеточные стенки, пронизанные порами (Приложение 3, рис. 3.84).

На поперечном срезе верхней части стебля видны простые волоски эпидермиса с шершавой поверхностью, феллема, неопробковевшие клетки первичной коры, кольцо флоэмы, камбий. Широкое кольцо ксилемы и сердцевина с крупными паренхимными клетками подвергаются выраженному одревеснению (Приложение 3, рис. 3.85). На поперечном срезе средней части стебля с поверхности видны слой опробковевших клеток и многослойная первичная кора из одревесневших клеток. Кнаружи от центрального цилиндра развивается еще один тонкий слой опробковевших клеток, ниже расположены кольцевая многослойная флоэма, однослойный камбий, а также широкое кольцо ксилемы и сердцевина с крупными паренхимными клетками, которые подвергаются выраженному одревеснению (Приложение 3, рис. 3.86). Суберинизация клеток пробки происходит неравномерно и на препаратах стебля с поверхности видны как опробковевшие, заполненные коричневым содержимым, так и неопробковевшие узкие вертикально удлиненные клетки (Приложение 3, рис. 3.87). Основные клетки эпидермиса стебля прямостенные (Приложение 3, рис. 3.88).

Все вышеперечисленные анатомические, диагностические признаки будут рекомендованы для внесения в проект ФС «Клюквы болотной побегов».

3.2.3. Определение основных групп биологически активных веществ видов рода *Vaccinium* L. методом тонкослойной хроматографии

Исходя из литературных данных и результатов собственных исследований, представленных в главе 4, доминирующим компонентом в сумме фенологликозидов, для листьев брусники является арбутин; в сумме фенолокислот для листьев голубики обыкновенной, листьев черники обыкновенной, черники кавказской и побегов клюквы болотной являлась хлорогеновая кислота. В связи, с чем объективно рассматривать данные соединения как основные для определения подлинности методом ТСХ.

Определение арбутина в бруснике обыкновенной листьях.

Приготовление извлечения. При проведении исследований в качестве экстрагента был использован этиловый спирт 70%. При получении извлечения из б. обыкновенной листьев брали 0,5 грамм (точная навеска), измельченных до размера частиц 1 мм, добавляли к ним 100 мл спирта этилового 70%, взвешивали (колба+сырье+экстрагент) и экстрагировали в течение 45 минут на водяной бане. Колбу после экстракции охлаждали и восполняли количество потерянного спирта до первоначальной навески. Затем фильтровали через обеззоленный фильтр «Красная лента» d=15,0 (ООО «МЕЛИОР XXI»). 10,0 мл полученного извлечения вносили в стеклянную хроматографическую колонку диаметром 1,5 см и высотой 25 см, заполненную 3,0 г алюминия оксида нейтрального для хроматографии (L40/250 мкм), предварительно промытой 5 мл спирта этилового 70%.

Полученное извлечение в количестве 10, 30, 60 и 90 мкл наносили на линию старта хроматографической платинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А и ПТСХ-П-А размер 10×15 см. Были использованы 5 различных систем растворителей, зафиксирован эффективный диапазон времени насыщения камеры 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут. Рядом наносили 10 мкл раствор СО арбутина. Хроматограмму просушивали в течение 5 минут и помещали в камеру, хроматографируя восходящим способом. После прохождения фронта растворителя на 80-90 % длины хроматограммы от линии старта, ее вынимали высушивали под тягой и обрабатывали в одном случае - диазореактивом, во втором случае – раствором натрия фосфорномолибдатом 10%. После чего хроматограммы помещали в сушильный шкаф и выдерживали при 100-105 °С в течении 10 минут. И использованные системы элюентов и полученные значения коэффициента подвижности R_f зон адсорбции, обнаруженные после обработки диазореактивом и, представлены в таблице 3.13 и 3.14 (Приложение 3, рис. 3.89).

Приготовление раствора СО арбутина. Около 0,01 г СО арбутина помещали в мерную колбу на 10,0 мл, прибавляли 8 мл спирта этилового 70% и нагревали до полного растворения, охлаждали и доводили тем же спиртом до метки.

Приготовление раствора натрия фосфорномолибдата 10%. Около 5,0 г натрия фосфорномолибдата помещали в мерную колбу на 50,0 мл, прибавляли 30 мл спирта этилового 70% и нагревали до полного растворения, охлаждали и доводили тем же спиртом до метки.

Таблица 3.13 – Хроматографические параметры арбутина в различных элюирующих системах, для извлечений из листьев брусники обыкновенной

№ п/п	Элюент	$R_f \pm 0,02$ Стандартный образец (арбутин)	$R_f \pm 0,02$ Исследуемое извлечение	Окраски с диазореактивом	Окраска с натрия фосфорномолибдатом
1	<i>n</i> -бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2)	0,58	0,59	Темно-оранжевая	Синяя
2	Уксусная кислота 15%	0,87	0,88	Темно-оранжевая	Синяя
3	Хлороформ-спирт этиловый (6:4)	0,59	0,58	Темно-оранжевая	Синяя
4	Хлороформ-спирт этиловый-вода (26:16:3)	0,77	0,76	Темно-оранжевая	Синяя
5	Этилацетат-муравьиная кислота-вода (88:6:6)	0,51	0,50	Темно-оранжевая	Синяя

Таблица 3.14 – Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной из разных мест произрастания (элюент - этилацетат-муравьиная кислота-вода 88:6:6)

№ п/п	Место произрастания	R _f
1	Стандартный образец арбутина	0,51
Толокнянки обыкновенной листья		
1	берег реки Харбас, Зольский район, КБР (сентябрь 2019 г.)	0,51
2	Кудымкарский район, Пермский край (апрель 2019 г.)	0,50
3	поселок Белая Березка, Трубчевский район, Брянская область (август 2019 г.)	0,50
4	деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	0,51
5	ленточный бор, Павловский район, Алтайский край (сентябрь 2019 г.)	0,51

Таким образом, опробованы различные элюирующие системы и определены оптимальные условия хроматографирования, позволяющие провести разделение арбутина в извлечении из листьев б. обыкновенной методом ТСХ. На обоих использованных видах хроматографических пластинках наблюдалось четкое разделение арбутина от сопутствующих веществ и совпадение R_f значения с раствором СО.

Валидацию методики испытания на подлинность согласно ГФ РФ XIV изд. включало доказательство специфичности методики [31]. Разработанные условия определения подлинности брусники обыкновенной листьев методом ТСХ позволяют установить присутствие мажорного компонента - арбутина, при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО арбутина по значению фактора удерживания и окрашиванию при использовании выбранного детектирующего агента. Параметр «робастность» нами установлена по влиянию времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля и эффективность разделения арбутина от сопутствующих соединений (табл. 3.15).

Таблица 3.15 – Определение параметра «робастность» методики определения основной группы БАВ в толокнянке листьях (n=3)

№ п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин)	R _f ± 0,02, стандартный образец	R _f ± 0,02, исследуемое извлечение
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,46	0,45
4	30	0,50	0,49
5	40	0,49	0,49
6	50	0,51	0,50
7	60	0,49	0,50

Установлено, что оптимальное время насыщения хроматографической камеры не менее 30 мин, в ненасыщенной камере не наблюдается разделение суммы БАВ.

Параметр «воспроизводимость» оценивали по эффективности разделения арбутина и сопутствующих фенольных соединений на двух типах хроматографических пластин: с

полимерной и алюминиевой подложкой. Анализ проводится в разные дни и разными аналитиками (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Определение параметра «воспроизводимость» методики определения основной группы БАВ в толокнянке листьях

Аналитик	ПТСХ-П-А		ПТСХ-АФ-А	
	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец (n=3)	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение (n=3)	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец (n=3)	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение (n=3)
1	0,51	0,50	0,50	0,49
2	0,51	0,50	0,50	0,51
3	0,50	0,51	0,51	0,50

Целесообразно использование сорбента – силикагеля, нанесенного на алюминиевую или полимерную подложку, с получением сходных ТСХ-профилей и значений фактора удерживания при проведении анализа в разные дни и разными аналитиками.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ в бруснике обыкновенной листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В или алюминиевой ПТСХ-АФ-А подложками, элюент – этилацетат-муравьиная кислота-вода (88:6:6), проявители - раствора натрия фосфорномолибдата 10%, оптимальный объем пробы – 60 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца арбутина 10 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором натрия фосфорномолибдата 10% - 10 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в видимом свете.

На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдалась зона адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции СО арбутина ($R_f=0,50$) и 2 зоны адсорбции синего цвета выше и ниже зоны адсорбции арбутина, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

Определение хлорогеновой кислоты в видах рода *Vaccinium* L.

Приготовление извлечения

Для приготовления извлечения в каждом отдельном случае брали около 1,0 г (точная навеска) воздушно-сухого сырья (листьев черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и побегов клюквы болотной) с размером частиц 1 мм, добавляли к ним 50 мл спирта этилового 70%, далее взвешивали колбу с сырьем и экстрагентом, затем экстрагировали 60 минут на водяной бане, для листьев черники обыкновенной и черники кавказской; 30 минут на водяной бане, для голубики обыкновенной; 45 минут на водяной бане, для побегов голубики обыкновенной. После экстракции колбу охлаждали и восполняли

количество потерянного спирта до первоначальной навески. Затем фильтровали через фильтр «Красная лента» $d=15,0$.

Для разделения хлорогеновой кислоты для каждого извлечения были опробованы 10 различных систем растворителей (табл. 3.18), фиксировался эффективный диапазон времени насыщения камеры 0, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут. Рядом наносили 5 мкл раствора СО хлорогеновой кислоты. Хроматограмму просушивали в течение 5 минут и помещали в камеру, хроматографируя восходящим способом. После прохождения фронта растворителя на 80-90 % длины хроматограммы от линии старта, ее вынимали, высушивали под тягой, после чего обрабатывали последовательно - парами аммиака, а затем алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%. После чего хроматограммы помещали в сушильный шкаф и выдерживали при 100-105 °С в течение 3 минут. Используемые системы элюентов и полученные значения коэффициента подвижности R_f зон адсорбции, обнаруженные после обработки детектирующими реактивами, представлены в таблице 3.17, 3.18, 3.19 и 3.21 (Приложение 3, рис. 3.90-3.93). Каждая из систем прошла испытание со стандартным образцом и извлечением с расчетом для них величины (R_f) (табл. 3.20).

Приготовление раствора СО хлорогеновой кислоты. Около 0,02 г СО хлорогеновой кислоты помещали в мерную колбу на 25,0 мл, прибавляли 20 мл спирта этилового 70% до полного растворения, охлаждали и доводили тем же спиртом до метки.

Для проявления хроматографических зон адсорбции, хроматограмму просматривали в видимом и УФ-свете, далее обрабатывали парами аммиака и алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%. После обработки каждым реактивом повторно просматривали в видимом и УФ-свете (табл. 3.17).

Таблица 3.17 – Характеристика детектирующих реагентов для определения хлорогеновой кислоты в сырье видов рода *Vaccinium* L. методом ТСХ

№ п/п	Детекция	Окрашивание хроматографических зон
1	Видимый свет	Серое окрашивание
2	УФ – свет (254 нм)	Светло-зеленое свечение
3	Пары аммиака водного раствора 25%	Серое окрашивание
4	Пары аммиака водного раствора 25% в УФ-свете (254)	Желто-зеленое свечение
5	Алюминия хлорида спиртового раствора 2%	Не проявляет
6	Алюминия хлорида спиртового раствора 2% в УФ –свете (254 нм)	Голубое свечение

Таблица 3.18 – Хроматографические параметры хлорогеновой кислоты в различных элюирующих системах для сырья видов *рода* *Vaccinium* L.

№ п/п	Элюент	R _f , стандартный образец	R _f , исследуемое извлечение			
			Черники обыкновенной листья	Черники кавказской листья	Голубики обыкновенно й листья	Клюквы болотной побеги
1	Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (10:10:84)	0,51	0,52	0,51	0,49	0,53*
2	Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (8:8:84)	0,47	0,47	0,46	0,48	0,49
3	Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (11:11:27:100)	0,64	0,65	0,64	0,66	0,66
4	Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7:7:14:72)	0,48	0,49	0,50	0,49	0,50
5	Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7,5:7,5:18:67)	0,79	0,77	0,78	0,78*	0,81
6	Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7:7:14:72)	0,52	0,52*	0,53*	0,51	0,54
7	Вода-метанол-этилацетат (8:15:77)	0,17	0,21	0,20	0,19	0,19
8	Безводная муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота вода-этилацетат (11:11:26:100)	0,63	0,65	0,64	0,65	0,65
9	Безводная муравьиная кислота-метанол-вода-этилацетат (2,5:4:4:50)	0,51	0,49	0,50	0,51	0,53
10	Вода-ацетонитрил-ледяная уксусная кислота (78:19:31)	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения

*- значение R_f в системе растворителей с наилучшим разделением основного вещества.

Таблица 3.19 – Определение хлорогеновой кислоты в чернике листьях из разных мест произрастания (элюент - безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат 7:7:14:72)

№ п/п	Место произрастания	R _f
1	Стандартный образец хлорогеновой кислоты	0,52
<i>Черники обыкновенной листья</i>		
1	берег реки Харбас, Зольский район, КБР (сентябрь 2019)	0,52
2	Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	0,51
3	окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика (сентябрь 2020 г.)	0,50
4	окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	0,51
5	окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан (июль 2019 г.)	0,52
<i>Черники кавказской листья</i>		
1	Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	0,51
2	Яворова поляна, окрестности поселка Гузерипль, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	0,50
3	1 км западнее Партизанской поляны, бассейн реки Белой, окрестности поселка Гузерипль, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	0,50
4	окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край (сентябрь 2020 г.)	0,51
5	окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (сентябрь 2020 г.)	0,52

Таблица 3.20 – Определение хлорогеновой кислоты в голубике болотной листьях из разных мест произрастания (элюент - безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат 7:7:14:72)

№ п/п	Место произрастания	R _f
1	Стандартный образец хлорогеновой кислоты	0,79
<i>Голубики обыкновенной листья</i>		
1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)	0,78
2	окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область (август 2019 г.)	0,78
3	Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл (сентябрь 2019 г.)	0,78
4	Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь (август 2020 г.)	0,79
5	Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь (август 2020 г.)	0,79

Таблица 3.21 – Определение хлорогеновой кислоты в клюкве болотной побегах из разных мест произрастания (элюент - безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат 7:7:14:72)

№ п/п	Место произрастания	R _f
1	Стандартный образец хлорогеновой кислоты	0,51
<i>Клюквы болотной побеги</i>		
1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)	0,53
2	окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область (август 2019 г.)	0,52
3	гора Малый Иремель, Челябинская область (август 2019 г.)	0,51
4	плато Путорана, Красноярский край (август 2019 г.)	0,51
5	Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	0,51

Таким образом, опробованы различные элюирующие системы и определены оптимальные условия хроматографирования, позволяющие провести разделение хлорогеновой кислоты в извлечении из листьев черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и побегах клюквы болотной методом ТСХ. На обоих использованных видах хроматографических пластинках наблюдалось четкое разделение хлорогеновой кислоты от сопутствующих веществ и полное совпадение R_f значения с раствором СО.

Валидацию методики испытания на подлинность согласно ГФ РФ XIV изд. включало доказательство специфичности методики (табл. 3.24) [31]. Разработанные условия определения подлинности черники листьев, голубики обыкновенной листьев, клюквы болотной побегов методом ТСХ позволяют установить присутствие мажорного компонента – хлорогеновой кислоты, при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты по значению фактора удерживания и окрашиванию при использовании выбранного детектирующего агента. Параметр «робастность» нами установлена по влиянию времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля и эффективность разделения хлорогеновой кислоты от сопутствующих соединений (табл. 3.21, 3.22 и 3.23).

Таблица 3.22 – Определение параметра «робастность» методики определения основной группы БАВ для сырья видов рода *Vaccinium* L. (n=3)

№п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин)	R _f ± 0,02, стандартный образец (n=3)	R _f ± 0,02, исследуемое извлечение (n=3)
<i>Черники обыкновенной листья</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,47	0,46
4	30	0,52	0,51

5	40	0,51	0,52
6	50	0,51	0,51
7	60	0,50	0,50
<i>Черники кавказской листья</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,46	0,46
4	30	0,52	0,51
5	40	0,51	0,52
6	50	0,50	0,50
7	60	0,52	0,51
<i>Голубики обыкновенной листья</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,69	0,67
4	30	0,78	0,79
5	40	0,79	0,78
6	50	0,79	0,79
7	60	0,78	0,77
<i>Клюквы болотной побеги</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,47	0,44
4	30	0,52	0,51
5	40	0,50	0,51
6	50	0,51	0,52
7	60	0,52	0,50

Таблица 3.23 – Определение параметра «робастность» методики определения основной группы БАВ для сырья голубики обыкновенной и клюквы болотной (n=3)

№п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин)	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
<i>Голубики обыкновенной листья</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,69	0,67
4	30	0,78	0,79
5	40	0,79	0,78
6	50	0,79	0,79
7	60	0,78	0,77
<i>Клюквы болотной побеги</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,47	0,44
4	30	0,52	0,51
5	40	0,50	0,51
6	50	0,51	0,52
7	60	0,52	0,50

Таблица 3.24 – Определение параметра «воспроизводимость» методики определения основной группы БАВ в сырье видов рода *Vaccinium* L. (n=3)

Аналитик	ПТСХ-П-А-УФ		ПТСХ-АФ-А-УФ	
	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
<i>Черники обыкновенной листья</i>				
1	0,52	0,52	0,53	0,51
2	0,51	0,51	0,52	0,53
3	0,51	0,51	0,52	0,51
<i>Черники кавказской листья</i>				
1	0,51	0,50	0,50	0,51
2	0,52	0,50	0,50	0,50
3	0,51	0,52	0,52	0,52
<i>Голубики обыкновенной листья</i>				
1	0,80	0,79	0,79	0,78
2	0,78	0,78	0,80	0,78
3	0,79	0,80	0,79	0,79
<i>Клюквы болотной побеги</i>				
1	0,52	0,50	0,50	0,51
2	0,51	0,50	0,51	0,51
3	0,51	0,52	0,52	0,50

Целесообразно использование сорбента – силикагеля, нанесенного на алюминиевую или полимерную подложку, с получением сходных ТСХ-профилей и значений фактора удерживания при проведении анализа в разные дни и разными аналитиками.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ:

- В чернике листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7:7:14:72), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 2,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм.

На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдалось зона адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты ($R_f=0,52$) и 3 зоны адсорбции желтого цвета выше и светло-синего цвета ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

■ В голубике обыкновенной листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7,5:7,5:18:67), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм.

На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдалось зона адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты и 1 зоны адсорбции желтого цвета выше и светло-синего цвета ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты ($R_f=0,78$), а также допустимо наличие других зон адсорбции.

■ В клюкве болотной побегах: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (10:10:84), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм. На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдалось зона адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты ($R_f=0,53$) и 5 зон адсорбции (2-х желтого, 2-х бурого и 1 голубого цвета) выше и бурого цвета ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

3.2.4. ДНК-штрихкодирование растений рода *Vaccinium* L. молекулярно-генетическим методом

Длина участков ITS1 после выравнивания в программе MEGA для видов вересковых составила 710 п.н. Среди последовательностей для всех видов вересковых обнаружено 267 полиморфных позиций, среди которых в 99 позициях происходила только одна замена. Внутри рода *Arctostaphylos* Adans., последовательности ITS1 маловариабельны. Внутри рода *Vaccinium* L. по заменам в двух позициях: 168 (C/T), 215 (G/A), 322 (G/A) объединяются представители вида *Vaccinium vitis-idaea* L. которые могут быть использованы для идентификации ЛРС брусники обыкновенной. Следует отметить, что для вида *Vaccinium uliginosum* L. специфичные замены не

обнаружены. Позиция 250 характеризуется заменой А → Т, а позиция 567 – заменой А → G, которые встречаются только у представителей видов *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L. соответственно, что позволяет считать эти позиции специфичными для ЛРС «Черники листьев». Наиболее достоверно определить подлинность возможно для *Vaccinium oxycoccos* L., для побегов клюквы установлено 9 специфичных нуклеотидными заменами (табл. 3.25).

Таблица 3.25 – Варьирующие позиции нуклеотидных последовательностей ITS

№	Род	Вид	Позиция выравнивания
1	<i>Vaccinium</i> L.	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	168 (C/T), 215 (G/A), 322 (G/A)
2		<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	-
3		<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	250 (T/A)
4		<i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.	567 (G/A)
5		<i>Vaccinium oxycoccos</i> L.	121 (G/A), 140 (C/T), 154 (T/-), 257 (C/T), 469 (A/-), 496 (A/C), 542 (C/T), 578 (G/A), 642 (G/A)

С использованием программного пакета Mega 5.2.2 мы провели анализ массива последовательностей интрона ITS и построили матрицу соотношения нуклеотидных замен. Результаты данного исследования представлены в таблице 3.26. В таблице указаны процентные значения вероятности замены одного нуклеотида на другой. Из таблицы можно сделать вывод, что наиболее часто (33 процента) происходят транзиции нуклеотида А→G.

Таблица 3.26 – Соотношение нуклеотидных замен в исследуемых последовательностях интрона ITS.

	A	T	C	G
A	-	2.42	3.06	32.72
T	2.52	-	11.14	3.35
C	2.52	8.81	-	3.35
G	24.64	2.42	3.06	-

Таким образом, нами предложена следующая схема оценки подлинности сырья видов *Vaccinium* L: после выделения и секвенирования растительной ДНК (см. раздел 2.6) полученную последовательность нуклеотидов интрона ITS1 в программе MEGA анализируют с приведенными ниже последовательностями (Приложение 3, табл. 3.2). Для этого проводят выравнивание через Clustal W, далее обрезают начало и конец последовательностей, получая цепочки длиной 710 н.п. После этого определяют совпадение последовательностей по приведенным позициям.

3.3.1. Морфолого-диагностические признаки видов рода *Prunella* L.

Морфологические признаки травы *Prunella vulgaris* L.

Цельное сырье представлено смесью цельных и частично измельченных листьев, стеблей, соцветий, плодов и семян. Стебли четырехгранные, длиной до 15 см. Листья от яйцевидной до ланцетной формы длиной от 0,8 до 6 см, шириной от 0,5 до 1,5 см, цельнокрайние или городчато-зубчатые с туповатой верхушкой, часть листьев с черешками длиной от 0,5 до 2 см. Листорасположение супротивное, жилкование перисто-краевое. Встречаются прилистники от двух до четырех длиной от 0,3 до 1 см. Соцветие – колосовидный тирс, продолговатое от 1 до 5 см длиной. Прицветники почти широко яйцевидные, округлые от 0,3 до 1,2 см, перепончато-сетчатые, опушенные, на верхушке заостренные, по краю реснитчатые. Цветки в ложных мутовках, иногда формируются боковые соцветия, при основании которых имеется пара листьев на коротких черешках. Чашечка сидячая или расположена на короткой ножке, у основания имеет опушение, двугубая; нижняя губа до середины разделена пополам, с ланцетными зубцами; верхняя губа имеет три коротких зубца, тупой формы. Венчик имеет длину 0,5-1 см, в полтора-два раза длиннее чашечки, слабо выдающийся, двугубый; трубка венчика прямая. Содержит 4 тычинки, из которых две длинные которые находятся перед двумя короткими. Длинные тычинки имеют нити с прямым или слегка согнутым зубцом в шиловидной форме; столбик короче, и не превышает высоту венчика. Плод представляет собой яйцевидный или эллиптический ценобий, трехгранной формы, с гладкой поверхностью, состоящий из 3-4 семян. Листья зеленый с обеих сторон, стебли светло-коричневого цвета, верхняя часть стебля темно-зеленая. Прицветники разнообразного цвета от пурпурного до темно-фиолетового оттенка. Венчики имеют фиолетовый, реже фиолетово-белые цвет. Плоды и семена имеют темно-коричневый цвет. (Приложение 3, рис. 3.6-1). Запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Измельченное сырье представлено фрагментами листьев и черешков, стеблей, соцветий, плодов и семян, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты зеленых листьев; светло-коричневых стеблей и зелено-коричневатых черешков; фиолетовых или фиолетово-белых двугубых венчиков; пурпурных или темно-фиолетовых прицветников, опушенных по краю реснитчатыми волосками; чашелистики с острыми зубчатыми долями, темно-коричневые распавшиеся на зремы ценобии и семена. Цвет измельченного сырья зелено-коричневый, с фиолетовыми, темно-коричневыми, редко белыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Порошок представлен однородной смесью листьев и черешков, стеблей, соцветий, плодов и семян, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. При

рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) сырье однородное, зелено-фиолетово-коричневого цвета, встречаются семена. Цвет порошка зелено-коричневый, с фиолетовыми и темно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

При использовании стереомикроскопа видно, что на верхней стороне листовой пластинки присутствуют редкие простые волоски конусовидной формы. Край листа загнут на нижнюю сторону, по краю располагаются мелкие простые волоски. Жилки сильно вдавлены и выступают снизу листа, коричневатого цвета, где расположены простые многоклеточные волоски (3-7 клеток) (рис. 3.25). У некоторых волосков на нижней стороне листа одна или две клетки имеют спавшиеся стенки. Более интенсивное опушение наблюдается для молодых листьев. Черешок короткий, сильно опушен простыми волосками (рис. 3.26).

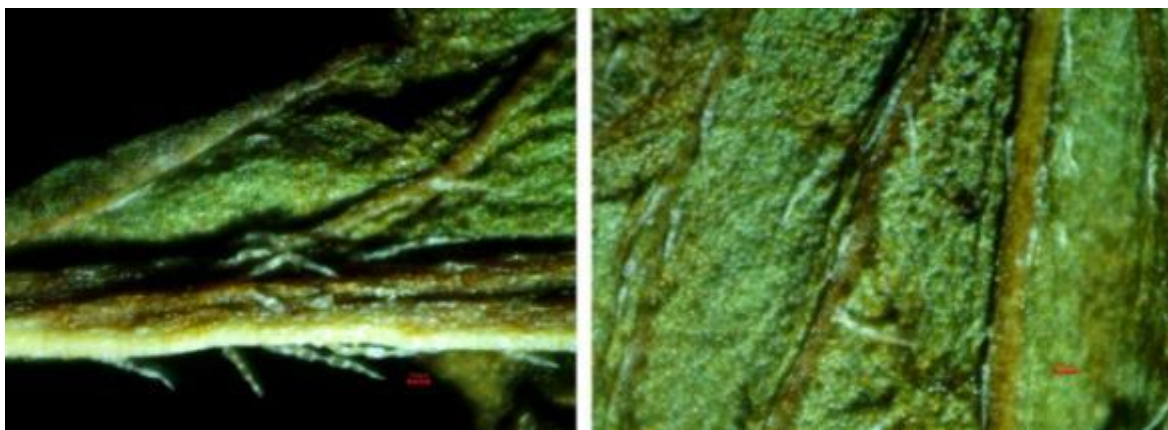
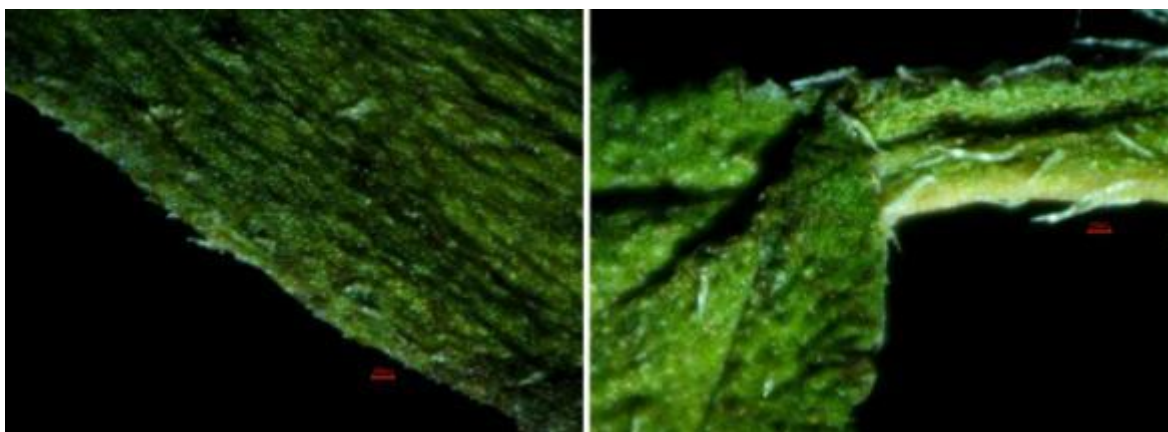


Рисунок 3.25 – Фрагменты нижней стороны листа черноголовки обыкновенной (ув. ×40)

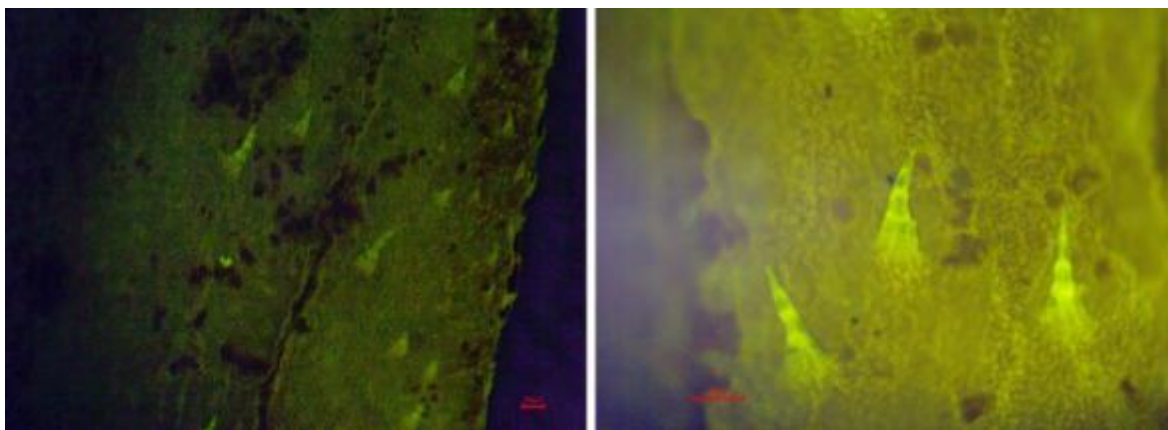


А – Верхняя сторона листа

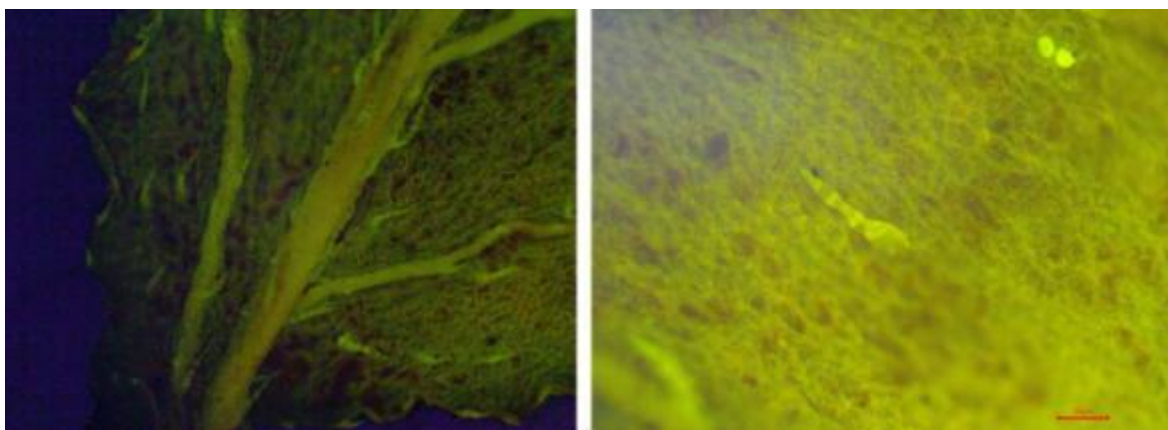
Б – Верхняя сторона листа, черешок

Рисунок 3.26 – Фрагменты верхней стороны листа черноголовки обыкновенной (ув. ×40)

Люминесценция тканей верхней стороны листа слабая, почти отсутствует, трихомы имеют яркое желто-зеленое свечение. При большем увеличении ткани приобретают желтовато-коричневую люминесценцию (рис. 3.27). На нижней стороне ткани листа имеют коричневатое свечение, жилка – желтовато-коричневое, трихом – желтовато-зеленое (рис. 3.28).



А – Верхняя сторона листа (ув.×40) Б – Верхняя сторона листа (ув.×100)
Рисунок 3.27 – Люминесценция тканей верхней стороны листа черноголовки обыкновенной



А – Нижняя сторона листа (ув.×40) Б – Нижняя сторона листа (ув.×100)
Рисунок 3.28 – Люминесценция тканей нижней стороны листа черноголовки обыкновенной

Морфологические признаки травы *Prunella grandiflora* L.

Цельное сырье представлено смесью цельных и частично измельченных листьев, стеблей, фрагментов соцветий, плодов и семян. Стебли четырехгранные, иногда ветвящиеся, длиной до 15 см длиной. Листья от яйцевидной до ланцетной формы длиной от 1,8 до 7 см, шириной от 0,5 до 3 см, слабо опушенные, по краю зубчатые, с заостренной верхушкой. Часть листьев с черешками длиной от 0,8 до 4 см. Листорасположение супротивное, жилкование перистопетлевое. Встречаются прилистники от двух до четырех яйцевидной формы длиной от 1 до 3 см, шириной 0,3 до 1 см. Соцветие – колосовидный тирс, продолговатое от 1 до 8 см, редко с парными листьями у основания. Прицветники почти округлой формы, перепончато-сетчатые, по краям реснитчатые, на верхушке заостренные. Чашечка двугубая, нижняя губа чашечки двураздельная на одну треть, зубцы ланцетные. Верхняя губа слегка трехраздельная, боковые доли уже средней, доли с зубцами. Венчик длиной от 1 до 2,5 см, в 2-4 раза длиннее чашечки, двугубый, иногда изогнутый. Имеется четыре тычинки, две из которых являются длинными и находятся впереди двух коротких. Длинные тычинки имеют нити с коротким тупым выступом. Венчик значительно короче столбика. Зрелый плод имеет округлую или яйцевидную форму,

который состоит из четырех семян, с голой, блестящей поверхностью, темно-коричневого цвета. Листья с обеих сторон зеленый, стебли светло-коричневого цвета, в верхней части зеленовато-фиолетовые. Прицветники могут иметь оттенки от зеленого до зелено-фиолетового цвета, а венчики сине-фиолетовые оттенок (Приложение 3, рисунок 3.6-2). Запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Измельченное сырье представлено фрагментами листьев и черешков, стеблей, соцветий, плодов и семян, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты зеленых листьев; светло-коричневых стеблей и зелено-коричневых черешков; сине-фиолетовых крупных длинных двугубых венчиков; зелено-фиолетовых прицветников, опушенных по краю реснитчатыми волосками; чашелистики с острыми зубчатыми долями, темно-коричневые плоды и семена. Цвет измельченного сырья зелено-коричневый, с фиолетовыми, сине-фиолетовыми, темно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Порошок представлен однородной смесью листьев и черешков, стеблей, соцветий, плодов и семян, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) сырье однородное, зелено-фиолетово-коричневого цвета, встречаются семена. Цвет порошка зелено-коричневый, с фиолетовыми, сине-фиолетовыми, темно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

При использовании стереомикроскопа видно, что на верхней стороне листовой пластинки присутствуют простые многочисленные трихомы с расширенным основанием. Край листа загнут на нижнюю сторону, по краю располагаются мелкие простые волоски. Жилки сильно вдавлены и выступают снизу листа, буроватого цвета, где расположено большое количество простых многоклеточных волосков (3-9 клеток). Клетки трихом имеют спавшиеся стенки через одну клетку (рис. 3.30 А). На нижней стороне листа визуализируются мелкие железки. Более интенсивное опушение наблюдается для молодых листьев. Цвет листовой пластинки зеленый, по краю с верхней стороны с фиолетовым оттенком (рис. 3.29). Черешок короткий, сильно опушен простыми волосками (рис. 3.30 Б).

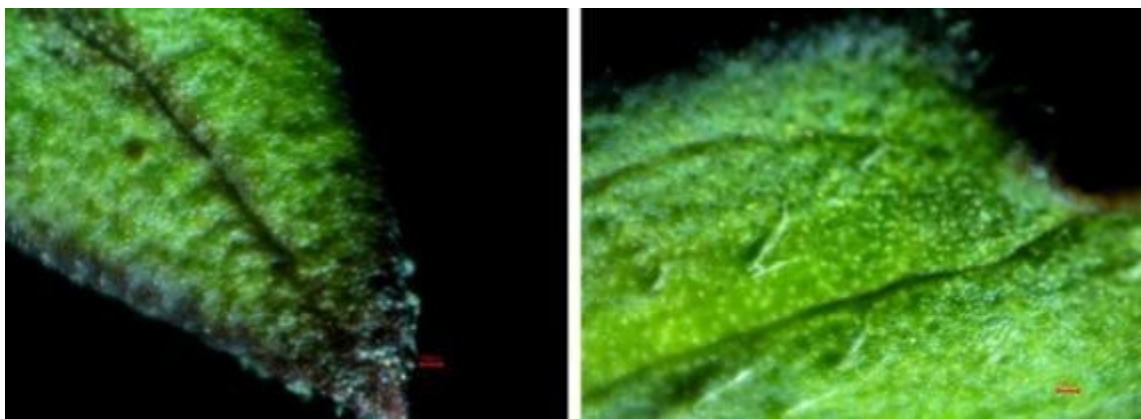
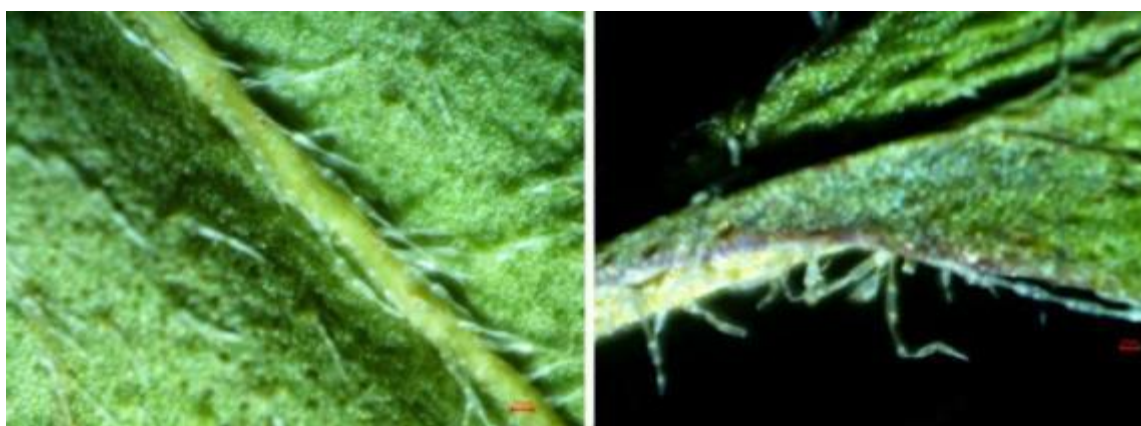


Рисунок 3.29 – Фрагменты верхней стороны листа черноголовки крупноцветковой (ув.×40)

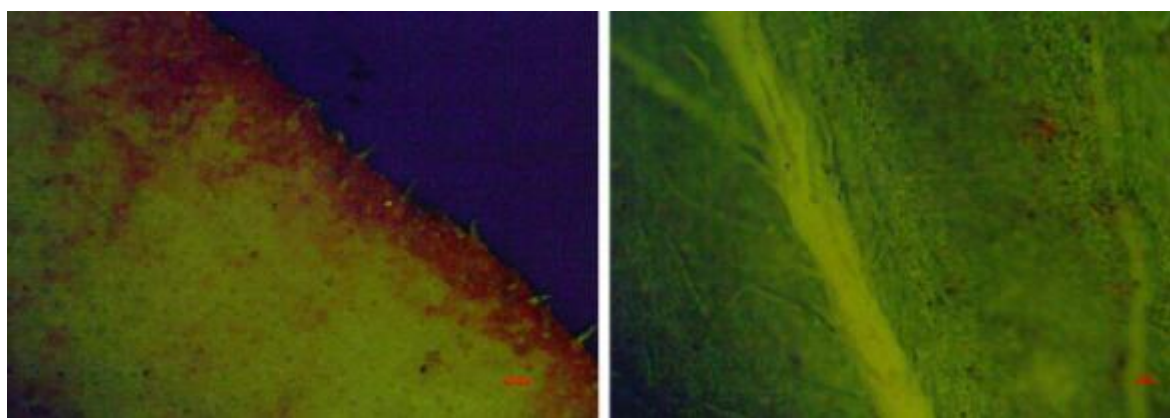


А – Нижняя сторона листа

Б – Черешок листа

Рисунок 3.30 – Нижняя сторона листа и черешок черноголовки крупноцветковой (ув.×40)

Люминесценция тканей верхней стороны листа желтоватая, по краю листовой пластины – красная (рисунок 3.31 А). Трихомы имеют желтоватое свечение (рисунок 3.31 Б). Снизу листа наблюдается желтоватое свечение трихом и жилок. При увеличении $\times 100$ можно отметить также ярко – желтую люминесценцию устьичного аппарата (рис. 3.32).



А – Верхняя сторона листа

Б – Нижней стороны листа

Рисунок 3.31 – Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа черноголовки крупноцветковой (ув.×40)

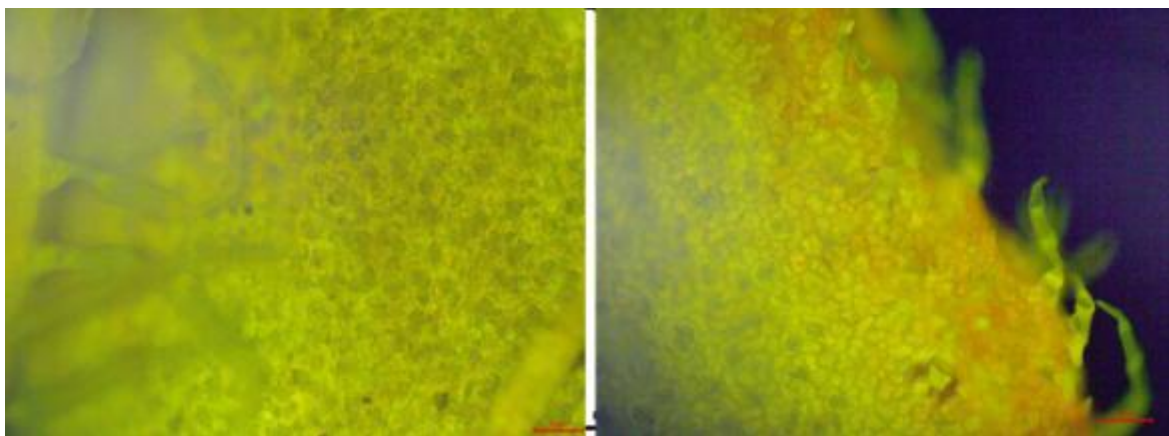


Рисунок 3.32 – Люминесценция тканей верхней стороны листа черноголовки крупноцветковой (ув.×100)

Морфологические признаки травы *Prunella laciniata* L.

Цельное сырье представлено смесью цельных и частично измельченных листьев, стеблей, фрагментов соцветий, плодов и семян. Все части растения густо опушенные. Стебли до 15 см четырехгранные, опушенные. Листья узкояйцевидные или продолговатые длиной от 2 до 6 см и шириной от 0,3 до 1 см, перистолопастные в нижней части, листья с черешками длиной от 1 до 2 см, кроме верхней пары листьев у соцветия. Верхушка листьев заостренная, листья, опушенные с обеих сторон. Листорасположение супротивное, встречаются парные прилистники длиной от 0,4 см до 1,0 см. Жилкование листьев перисто-краевое. Соцветие – колосовидный тирс от 2 до 4 см длиной. Прицветники перепончатые, почти округлые от 0,8 до 1,5 см. Чашечка двугубая, нижняя губа глубже середины двураздельная, с ланцетно-шиловидными, перепончато реснитчатыми зубцами, согнутыми вперед и заканчивающимися острием. Венчик двугубый, длиной от 0,6 см до 1,5 см, незначительно длиннее чашечки. Тычинок 4, к низу сросшиеся, две длинные тычинки расположены впереди пары коротких тычинок, тычиночные нити с бугорчатыми придатками. Плод – ценобий, округлый или яйцевидный с голой поверхностью, с 4 семенами. Листовая пластинка с двух сторон зеленая. Стебли - светло-коричневые, в верхней части темно-зеленые. Венчики имеют желто-белый оттенок. Плоды и семена темно-коричневого цвета (Приложение 3, рис. 3.6-3). Запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Измельченное сырье представлено фрагментами листьев и черешков, стеблей, соцветий, плодов и семян, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны фрагменты густо опушенных зеленых листьев; коричневых стеблей и зелено-коричневатых черешков; фиолетовых двугубых венчиков; зелено-фиолетовых прицветников, опушенных по краю реснитчатыми волосками; чашелистики с острыми зубчатыми долями, темно-коричневые распавшиеся на эремы ценобии и семена. Цвет измельченного сырья зелено-коричневый, с фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Порошок представлен однородной смесью листьев и черешков, стеблей, соцветий, плодов и семян, различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) сырье однородное, зелено-фиолетово-коричневого цвета, встречаются семена. Цвет порошка зелено-коричневый, с фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка горьковатый.

При использовании стереомикроскопа видно, что листовая пластинка черноголовки разрезной с верхней стороны покрыта многочисленными трихомами (наиболее опушенный вид из трех рассматриваемых в работе). Волоски более длинные, чем у других видов. Край листа загнут на нижнюю сторону, по краю располагаются удлинённые и многочисленные простые волоски (рисунок 3.33). Жилки сильно вдавлены и выступают снизу листа, желтого цвета, где расположено большое количество простых многоклеточных волосков (3-7 клеток). Клетки иногда спавшиеся (перекрученные) (рис. 3.34 и 3.35). Более интенсивное опушение наблюдается для молодых листьев. Цвет листовой пластинки зеленый, по краю с верхней стороны с фиолетовым оттенком. Черешок короткий, сильно опушен простыми многоклеточными волосками (рис. 3.33).

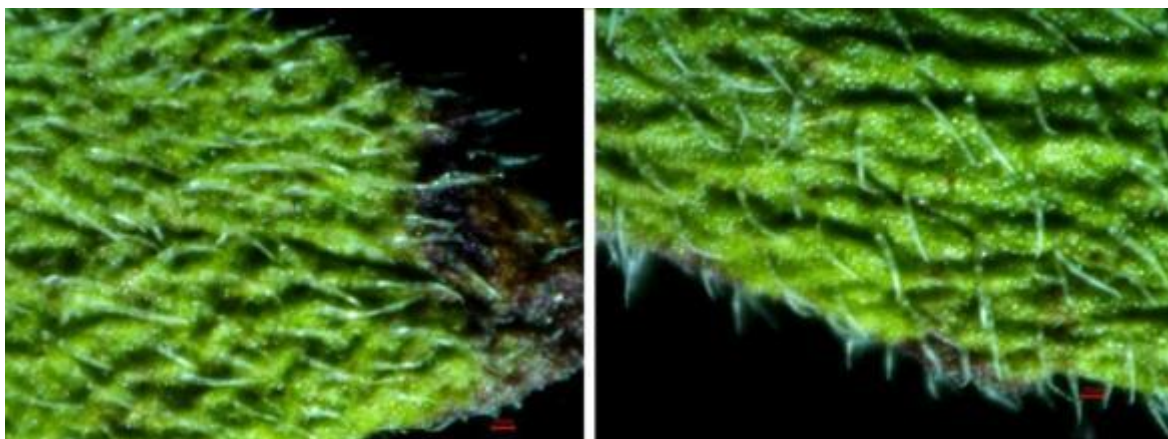


Рисунок 3.33 – Фрагменты верхней стороны листа черноголовки разрезной (ув.×40)

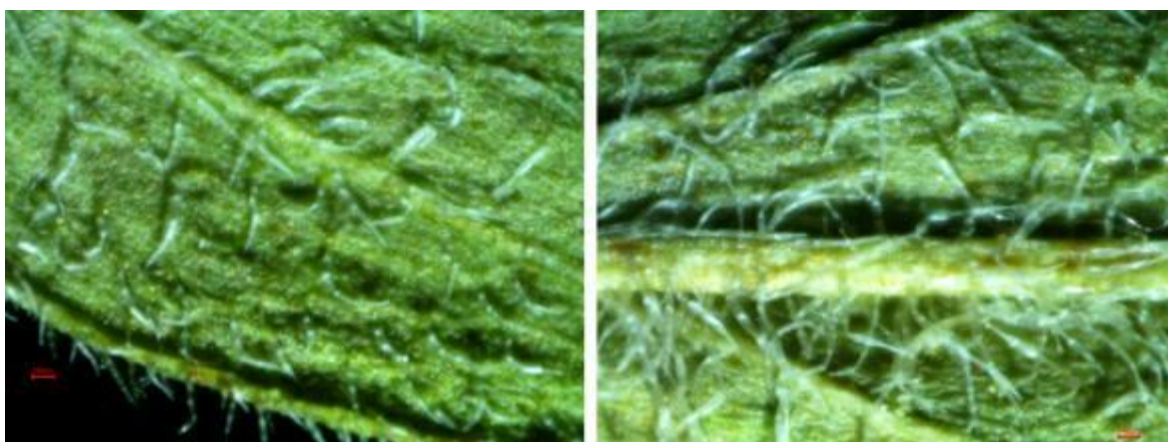


Рисунок 3.34 – Фрагменты нижней стороны листа черноголовки разрезной (ув.×40)

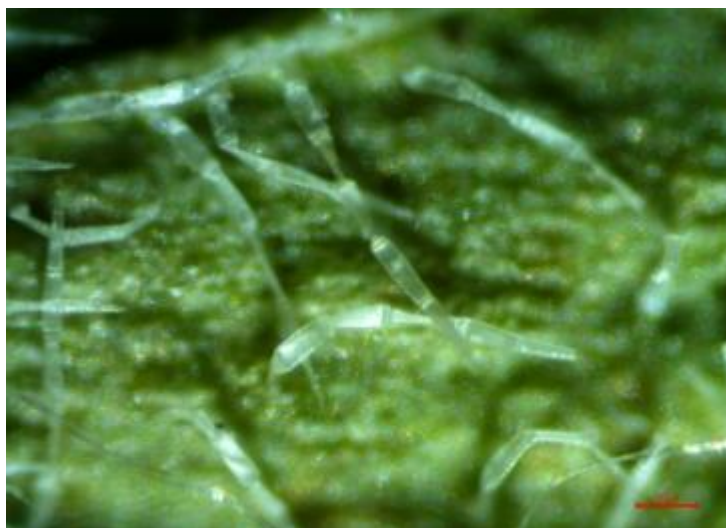
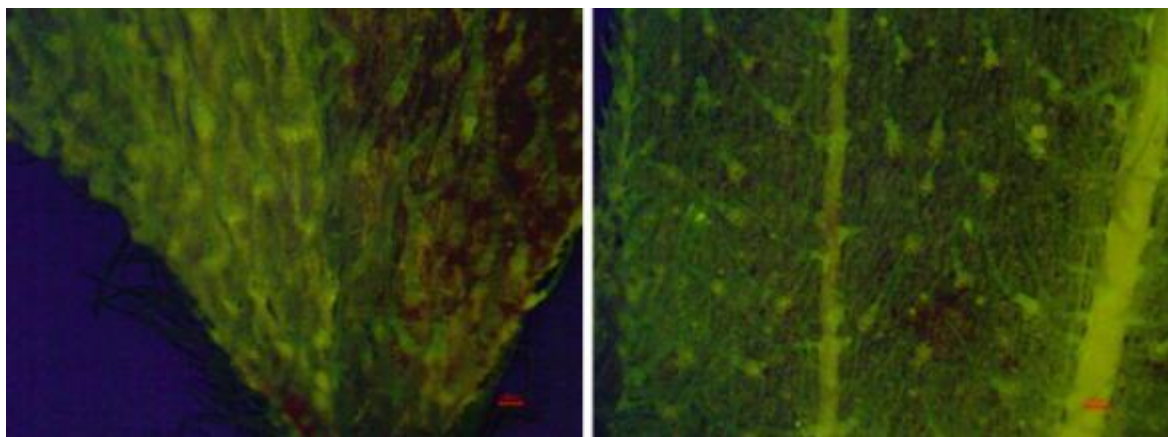


Рисунок 3.35 – Фрагменты нижней стороны листа черноголовки разрезной (ув.×100)

Люминесценция тканей обеих сторон листа не выражена, трихомы и жилки имеют желтовато-зеленое свечение (рис. 3.36 и 3.37).



А – Верхняя сторона листа

Б – Нижней сторона листа

Рисунок 3.36– Люминесценция тканей верхней и нижней стороны листа черноголовки разрезной (ув.×40)

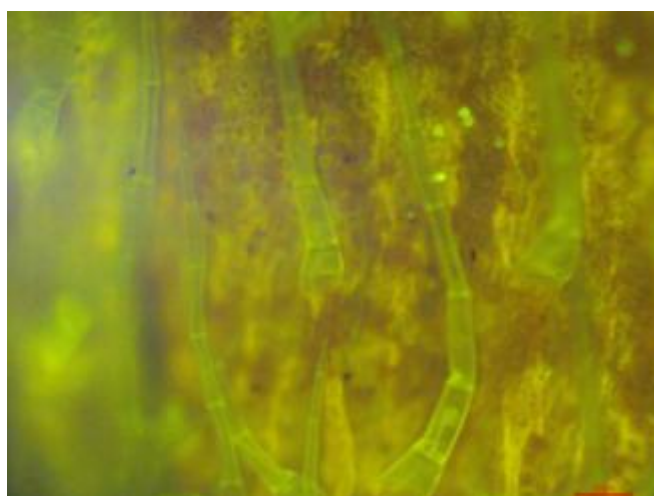


Рисунок 3.37 – Люминесценция тканей нижней стороны листа черноголовки разрезной (ув.×100)

Таблица 3.28 – Сравнительная характеристика морфологических признаков видов *Prunella* L.

Объект	<i>Prunella grandiflora</i> L.	<i>Prunella vulgaris</i> L.	<i>Prunella laciniata</i> L.
Кутикула	-	-	-
Сеть жилок	-	-	-
Млечники	-	-	-
Железистые волоски	+↓	-	-
Простые волоски по краю	+	+	+
Простые волоски на черешке	+	+	+
Железистые волоски по краю	-	-	-
Простые волоски на поверхности	+↓↑	+↓↑	+↓↑
Люминесценция листовой пластинки	Желтовато-зеленая, красноватая по краю	Слабая, трихомы - желтая	Слабая, трихомы - желтая
Люминесценция черешка	Желтоватая	Желтоватая	Желтоватая
Люминесценция выделительного аппарата	Желтоватая	-	-

*↓ – нижняя сторона листа, ↑ – верхняя сторона листа; ↓↑ – нижняя и верхняя сторона листа. + – признак ярко выражен, - – признак не выражен, +/- – признак слабо выражен.

В таблице 3.28 охарактеризованы основные морфологические признака некоторых представителей рода *Prunella* L. с использованием стереомикроскопии, визуализированы и зафиксированы основные диагностические признаки изучаемых видов.

Диагностическими признаками, определяющими подлинность травы видов рода *Prunella* L., являются: строение и наличие на листовой пластинке, и на черешке листа трихом, а также люминесцентная характеристика жилки расположенной на нижней стороны листа.

Полученные данные будут применяться для экспресс определения подлинности «черноголовковой травы» по морфолого-диагностических признакам. Вышеперечисленные признаки будут учтены при сборе ЛРС с целью снижения вероятности ошибки [147]. Данные диагностические признаки будут рекомендованы для внесения в НД на «Черноголовки траву» как дополнительные признаки определения подлинности.

3.3.2. Анатомио-диагностические признаки видов рода *Prunella* L.

Микроскопические признаки травы *Prunella vulgaris* L.

На препаратах с поверхности листа видны клетки верхнего эпидермиса со слабо извилистыми или прямыми стенками. Устьица имеют диацитный тип. Отчетливо просматриваются волоски головчатые с 1-клеточной ножкой и 2-клеточной головкой, пузыревидные волоски с розеткой клеток эпидермиса у основания и простые многоклеточные волоски по краю листа (Приложение 3, рис. 3.94 - 1-2). Клетки нижнего эпидермиса с глубоко извилистыми клеточными стенками, устьица многочисленные, могут наблюдаться поры гидатод.

Из трихом на нижнем эпидермисе встречаются головчатые волоски с одноклеточной ножкой и 2-клеточной головкой, эфирно-масличные железки с 4-клеточной головкой, по краю и жилкам расположены простые многоклеточные волоски (Приложение 3, рис. 3.94-3). На препаратах с поверхности стебля видны клетки эпидермиса прозенхимной формы с прямыми клеточными стенками, устьица немногочисленные, диацитного типа, встречаются головчатые волоски с короткой одноклеточной ножкой и 2-клеточной головкой (Приложение 3, рис. 3.94-4). Строение эпидермиса черешка листа схоже с эпидермисом стебля, наблюдается большее количество головчатых волосков, а также простых многоклеточных волосков. На поперечном срезе черешка листа видны три проводящих пучка: один крупный центральный и два боковых меньшего размера. Пучки закрытые коллатеральные. Центральный проводящий пучок окружен мощной обкладкой из склеренхимы, под эпидермисом расположены 1-2 слоя хлоренхимы, остальные клетки черешка представлены колленхимой (Приложение 3, рис. 3.94-5-6). Прицветники по краю густо опушены простыми многоклеточными волосками, эпидермис сложен клетками с глубоко извилистыми стенками, на верхней (внутренней) стороне наблюдаются эфирно-масличные железки с 4-клеточной головкой (Приложение 3, рис. 3.94-7-8). На препаратах с поверхности лепестков видны сосочковидные выросты, простые 1-2 клеточные волоски и пузыревидные головчатые волоски с одноклеточной ножкой и одноклеточной головкой, сетчато-спиральное утолщение клеточных стенок трахеальных элементов ксилемы, прозенхимные клетки эпидермиса с извилистыми клеточными стенками. На нижней (наружной) стороне лепестков также встречаются эфирно-масличные железки (Приложение 3, рис. 3.94 - 9-11). Чашелистики по краю покрыты простыми многоклеточными волосками, прозенхимные клетки эпидермиса с глубоко извилистыми клеточными стенками, у основания чашелистиков видны многочисленные эфирно-масличные железки (Приложение 3, рис. 3.94-12). В микропрепарате может наблюдаться рыльце пестика с пыльцевыми зернами. На поперечном срезе семени видны очень толстая семенная оболочка, эндосперм и зародыш. Эпидерма на полюсах семени и по центру боковых поверхностей имеет палисадообразные зоны. Высота клеток в этих зонах значительно превышает ширину, клетки крупнее основных клеток эпидермы. В семенной коже различаются: эпидерма с палисадными клетками, 2-4 рядный паренхимный слой, далее следуют механический, поперечный и пигментный слои, каждый представлен 1 рядом клеток (Приложение 3, рис. 3.94 - 13).

Порошок

В микропрепаратах порошка наблюдаются: фрагменты эпидермиса листьев с устьицами диацитного типа, эфирно-масличными железками и головчатыми волосками; видны фрагменты многоклеточных волосков с шероховатой поверхностью; фрагменты эпидермиса стеблей и черешков с прозенхимными клетками эпидермиса; части лепестков с сосочковидными

выростами; видны пыльцевые зерна шестибороздные, шаровидной формы, борозды с ровными краями и острыми концами, которые не сходятся у полюсов, могут встречаться фрагменты эпидермиса семенной кожуры с палисадным слоем слизевых клеток (Приложение 3, рисунок 3.94 -14-15).

Микроскопические признаки травы *Prunella grandiflora* L.

В препаратах с поверхности листьев на верхнем эпидермисе видны основные клетки со слабоизвилистыми стенками, устьица диацитного типа. Головчатые волоски имеют 1-клеточную ножку и 2-клеточную головку, вокруг ножки располагается розетка основных клеток эпидермиса; пузыревидные головчатые волоски состоят из 1-клеточной ножки и 1-клеточной головки; простые волоски одноклеточные, конусовидные (Приложение 3, рис. 3.95 - 1). На нижнем эпидермисе просматриваются эфирно-масличные железы, состоящие из короткой одноклеточной ножки, а также видны волоски простые, многоклеточные с грубо бородавчатой поверхностью, вдоль жилок кроющие простые волоски и головчатые волоски с короткой одноклеточной ножкой и 2-клеточной головкой. Клетки эпидермиса со слабо извилистыми клеточными стенками, устьица многочисленные. Листья по краю опушены простыми многоклеточными волосками (Приложение 3, рис. 3.95 - 2-3). На препаратах с поверхности стебля видны прозенхимные клетки эпидермиса с немногочисленными диацитными устьицами, встречаются головчатые волоски с короткой одноклеточной ножкой и 2-клеточной головкой, единичны кроющие простые многоклеточные волоски (Приложение 3, рис. 3.95 - 4). Эпидермис черешка листа сложен прозенхимными клетками, устьица также немногочисленные, диацитного типа; встречаются головчатые волоски и редко встречаются простые многоклеточные волоски. На поперечном срезе черешка листа видны очень крупный центральный и 2 крупных боковых проводящих пучка и мелкие периферические. Пучки закрытые коллатеральные. Все крупные проводящие пучки окружены мощной обкладкой из склеренхимы, также много колленхимы (Приложение 3, рис. 3.95 - 5-6). На препаратах с поверхности прицветников виден эпидермис, представленный клетками с извилистой стенкой, видны устьица (диацитный тип). Прицветники по краю имеют большое количество простых многоклеточных волосков, на верхнем и нижнем эпидермисе просматриваются простые многоклеточные, пузыревидные волоски, имеющие 1-клеточную ножку и 1-клеточную головку, головчатые волоски, имеющие 2-клеточную головку и 1-клеточной ножке, простые одноклеточные волоски конусовидной формы (Приложение 3, рис. 3.95 - 7-8). Верхний эпидермис лепестков сложен полусферическими выростами основных клеток эпидермиса, выступающими над поверхностью, видны эфирно-масличные железы с 4-клеточной головкой единичные. Нижний эпидермис представлен прозенхимными, с извилистыми стенками клетками, на которых имеются головчатые пузыревидные волоски

состоящие из короткой 1-клеточной ножки с 1-клеточной головки; 2-клеточные простые волоски (Приложение 3, рис. 3.95 - 9-10). Чашелистики с обеих сторон сложены клетками эпидермиса с извилистыми утолщенными клеточными стенками, устьица диацитного типа. По краю чашелистиков наблюдается большое количество волосков - одноклеточных конусовидных и простых 1-2 клеточных, вдоль жилок наблюдаются простые многоклеточные волоски, на эпидермисе просматриваются в большом количестве волоски простые конусовидные, состоящие из одной клетки и имеющие бородавчатую поверхность; головчатые волоски состоят из 2-клеточной головки на одноклеточной ножке, встречаются также водные поры гидатод; волоски пузыревидные, состоящие из 1-клеточной ножки и 1-клеточной головки. На нижнем (наружном) эпидермисе чашелистиков просматриваются эфирно-масличные железы, состоящие из 4-клеточной головки, расположенной на короткой ножке (Приложение 3, рис. 3.95 - 11-12). На поперечном срезе семян видны очень толстая семенная кожура, эндосперм и 2 семядоли зародыша. Эпидерма имеет палисадные зоны (обычно 5). Высота клеток в этих зонах значительно превышает ширину, клетки крупнее основных клеток эпидермы. В семенной кожуре различаются: тонкий паренхимный слой со спавшимися клетками, далее следует мощный механический и 1-слойный поперечный слой, представленные клетками с толстой клеточной стенкой, самый внутренний - тонкий одноклеточный пигментный слой (Приложение 3, рис. 3.95 - 13-14).

Порошок

В микропрепаратах порошка наблюдаются: фрагменты эпидермиса листьев с устьицами диацитного типа, эфирно-масличными железами и головчатыми волосками; видны фрагменты многоклеточных волосков с шероховатой поверхностью; фрагменты эпидермиса стеблей и черешков с прозенхимными клетками эпидермиса; части лепестков с полусферическим выростами; видны пыльцевые зерна шестибороздные, шаровидной формы, борозды с ровными краями и острыми концами, которые не сходятся у полюсов, могут встречаться фрагменты эпидермиса семенной кожуры с палисадным слоем слизевых клеток (Приложение 3, рис. 3.95 - 15-16).

Таким образом, при исследовании внешних признаков обнаружены различия в форме листовой пластинки и характере края листа: листья черноголовки разрезной имеют продолговатые или узкояйцевидные, при основании листья имеют зубцы или лопасти; у черноголовки обыкновенной листья от яйцевидной до ланцетной формы, чаще цельнокрайние, реже с городчато-зубчатым краем; у черноголовки крупноцветковой листья той же формы, что у черноголовки обыкновенной, с зубчатым краем; при этом только листья черноголовки крупноцветковой имеют перистопетлевое жилкование (у ч. обыкновенной и ч. разрезной листья имеют перистокраевое жилкование), а также имеются прилистники. Отличия в окраске и

размере венчика: у чернойголовки разрезной венчик бело-желтый и немного выступает из чашечки; у чернойголовки обыкновенной и ч. крупноцветковой венчик фиолетовый, при этом у ч. крупноцветковой венчик может быть сине-фиолетовым и длиннее чашечки в 2-4 раза.

К отличительным микроскопическим признакам относятся петioлярные признаки: в черешке листа ч. разрезной расположен один крупный закрытый коллатеральный пучок, в черешке листа ч. обыкновенной – три закрытых коллатеральных пучка (один крупный центральный и два боковых меньшего размера); в черешке листа ч. крупноцветковой наибольшее количество закрытых коллатеральных пучков – один крупный центральный, два крупных боковых и мелкие периферические. Устьичный аппарат диацитного типа. Эпидермис листьев чернойголовки разрезной характеризуется двумя типами устьиц: диацитного и аномоцитного типа.

Микроскопические признаки травы *Prunella laciniata* L.

На препаратах с поверхности листьев верхний эпидермис состоит из многоугольных клеток с прямыми стенками; устьица окружены 2-4 околоустьичными клетками (чаще 3). Устьица диацитного и аномоцитного типа. Волоски простые многоклеточные и одноклеточные. Видны единичные головчатые волоски, имеющие короткую ножку и 2-клеточную головку и вокруг которых образуется розетка основных клеток эпидермиса (Приложение 3, рис. 3.96 - 1). Нижний эпидермис листа представлен клетками с более извилистыми стенками, количество устьиц, головчатых и простых многоклеточных волосков на котором значительно больше, также фиксировали наличие эфирно-масличных железок с 4-клеточной головкой (Приложение 3, рис. 3.96 - 2). На препаратах с поверхности стеблей наблюдается опушение простыми многоклеточными волосками, а также головчатыми волосками, имеющими короткую ножку и 2-клеточную головку. Клетки эпидермиса стебля с прямыми стенками (прозенхимные), устьица в небольшом количестве (диацитный тип) (Приложение 3, рис. 3.96 - 6). На препаратах с поверхности черешков видно опушение простыми многоклеточными и головчатыми волосками, клетки эпидермиса прозенхимные, устьица многочисленные диацитного типа. На поперечном срезе черешка листа виден крупный закрытый моноколлатеральный проводящий пучок, окруженный обкладкой из склеренхимы и колленхимы, развита паренхима первичной коры со стороны ксилемы с нижней стороны листа (Приложение 3, рис. 3.96 - 3-5). На поверхности лепестков имеются вытянутые сосочковидные выросты, головчатые волоски с 2-клеточной головкой и пузыревидные волоски с 1-клеточной ножкой и 1-клеточной головкой, встречаются простые многоклеточные волоски. Наблюдается сетчато-спиральное утолщение клеточных стенок трахеальных элементов ксилемы, клетки эпидермиса с извилистыми клеточными стенками (Приложение 3, рис. 3.96 - 7-8). В микропрепарате обнаруживаются рыльце пестика с

пыльцой, столбик с нектарником (Приложение 3, рис. 3.96 - 9-10). Нижний (наружный) эпидермис чашелистиков обильно покрыт короткими и длинными простыми многоклеточными волосками, на верхнем (внутреннем) эпидермисе наблюдаются простые одноклеточные конусовидные волоски, поверхность которых бородавчатая, эфирно-масличные железки, имеющие 4-клеточную головку и короткую ножку, головчатые волоски, имеющие 2-клеточную головку на одноклеточной ножке. Клетки эпидермиса с глубоко извилистыми антиклинальными клеточными стенками (Приложение 3, рис. 3.96 - 11–12). Прицветники также имеют обильное опушение простыми многоклеточными волосками, количество волосков, их длина и обилие увеличивается от верхушки к основанию прицветников (Приложение 3, рис. 3.96 - 12-13). На поперечном срезе семени видны толстая многослойная семенная кожура, маслянистый эндосперм и зародыш. В семенной кожуре различаются: кутикула, толстый слой живых клеток эпидермы, в котором отдельные группы слизевых клеток образуют прозрачные округлые скопления, тонкий паренхимный слой (у незрелых семян многослойный и имеет зеленую окраску), мощный механический слой из колленхимных клеток, расположенных в 2-4 ряда, поперечный слой представлен 1 рядом клеток, пигментный слой — 1 ряд клеток (Приложение 3, рис. 3.96 - 14).

Порошок

В микропрепаратах порошка наблюдаются: фрагменты эпидермиса листьев с устьицами двух типов (аномоцитный и диацитный), на эпидермисе видны волоски головчатые и простые многоклеточные; на прицветных листьях зафиксированы эфирно-масличные железки; фрагменты эпидермиса стеблей и черешков представлены прозенхимными клетками, а также многочисленными простыми волосками; фрагменты венчика имеют сильно извилистые клетки эпидермиса, на которых просматриваются сосочковидные выросты; фрагменты семян с палисадным слоем слизевых клеток (Приложение 3, рис. 3.96 – 15).

Исследование внешних и микроскопических признаков травы трех видов рода черноголовка: черноголовки разрезной, ч. обыкновенной и ч. крупноцветковой, позволило установить общие и отличительные признаки, которые могут быть обнаружены при определении подлинности ЛРС «Черноголовки трава» [147].

3.3.3. Определение основных групп биологически активных веществ видов рода *Prunella* L. методом тонкослойной хроматографии

Характерным фенольным соединением для многих представителей семейства *Lamiaceae* является фенолокислота – розмариновая кислота. Основываясь на литературные данные и, на результаты собственных исследований, представленные в главе 4, доминирующим компонентом в сумме фенолокислот, для сырья видов черноголовка является розмариновая кислота. В связи, с

чем объективно рассматривать данное соединение как основное для определения подлинности черноголовки травы методом ТСХ.

Приготовление извлечения. Для получения извлечения в каждом индивидуальном случае необходимо брать примерно 1,0 г (точную массу) измельченной воздушно-сухой травы видов *Prunella* L. (*Prunella vulgaris* L., *Prunella grandiflora* L., и *Prunella laciniata* L.) с частицами размером 1 мм. Затем, к ЛРС добавляем 50 мл этилового спирта с содержанием 70%, после чего проводим взвешивание (колбы с сырьем и экстрагентом) и производим экстрагирование в течение 60 минут. После завершения экстракции, колбу охлаждаем и восполняем количество утраченного спирта до первоначальной массы. Затем фильтруем через обеззольный фильтр «Красная лента» d=15,0. Полученные извлечения в объеме 2,5, 5,0 и 7,5 и 10 мкл наносили на хроматографические пластинки марки Sorbfil (Россия) ПТСХ-П-В-УФ и ПТСХ-АФ-А-УФ размером 100×100 мм. Зоны адсорбции просматривали в видимом и УФ-свете (при обработке парами аммиака и алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%). Использовали стандартный образец розмариновой кислоты.

Приготовление раствора СО розмариновой кислоты. Около 0,0125 г СО розмариновой кислоты помещают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в 20 мл спирта этилового 70%. Далее раствор доводят до метрии спиртом этиловым 70% и перемешивают. Срок хранения раствора 3 месяца в плотно закупоренной посуде в прохладном, защищенном от света месте.

Зоны адсорбции проявляли различными проявителями, оценивая контрастность, специфичность и доступность детектирующего реактива (табл. 3.29, 3.30 и 3.31, приложение 3, рис. 3.97–3.99).

Таблица 3.29 – Характеристика детектирующих реагентов для определения розмариновой кислоты в траве видов черноголовки методом ТСХ

№ п/п	Детекция	Окрашивание хроматографических зон
1	Видимый свет	Серое окрашивание
2	УФ – свет (254 нм)	Светло-зеленое окрашивание
3	Пары аммиака водного раствора 25%	Оранжево-красное окрашивание
4	Пары аммиака водного раствора 25% в УФ-свете (254)	Ярко-зеленое свечение
5	Алюминия хлорида спиртового раствора 2%	Желтое окрашивание
6	Алюминия хлорида спиртового раствора 2% в УФ –свете (254 нм)	Светло-голубое свечение

Таблица 3.30 – Хроматографические параметры розмариновой кислоты в различных элюирующих системах для сырья видов *рода Prunella* L.

№ п/п	Элюент	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение		
			Черноголовки обыкновенной трава	Черноголовки крупноветковой трава	Черноголовки разрезной трава
1	Безводная муравьиная кислота-ацетон-толуол (1:6:11)	0,53	0,55	0,54	0,53
2	Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (6:6:90)	0,87	0,88	0,89	0,88
3	<i>n</i> -бутанол - ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2)	0,89	0,90	0,91	0,89
4	Толуол-этилацетат-безводная муравьиная кислота (3:7:0,1)	0,46	0,46	0,45	0,47
5	Этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (40:5:5)	0,93	0,96	0,95	0,95
6	Безводная муравьиная кислота-ацетон-метилхлорид (8,5:25:85)	0,69	0,68*	0,70*	0,69*
7	Хлороформ-этилацетат-уксусная кислота 5% (20:20:5)	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения
8	Толуол-хлороформ-ацетон-безводная муравьиная кислота (5:4:1:0,2)	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения
9	Этилацетат-вода-безводная муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота (100:26:11:11)	0,95	0,95	0,93	0,94
10	Толуол-этилацетат-безводная муравьиная кислота (7:2:1)	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения	Нет разделения
11	<i>n</i> -бутанол - ледяная уксусная кислота-вода (60:15:25)	0,78	0,81	0,80	0,79

*- значение R_f в системе растворителей с наилучшим разделением основного вещества.

Таблица 3.31 – Определение розмариновой кислоты в траве видов черноголовки из разных мест произрастания (элюент - безводная муравьиная кислота-ацетон-метиленхлорид 8,5:25:85)

№ п/п	Место произрастания	R _f
1	Стандартный образец розмариновая кислота	0,69
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>		
1	перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР (июль-август 2015 г.)	0,69
2	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)	0,68
3	берег реки Харбас, Зольский район, КБР (август 2019 г.)	0,68
4	окрестности озера Курортное, г. Нальчик, КБР (август 2019 г.)	0,70
5	юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (август 2019 г.)	0,69
<i>Черноголовки крупноцветковой трава</i>		
1	перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР (июль-август 2015 г.)	0,68
2	сосновый лес по дороге на Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2019 г.)	0,68
3	окрестности горной вершины Красивый Курган, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (август 2019 г.)	0,68
4	окрестности горы Кабан, городской округ Кисловодск, Ставропольский край	0,69
5	окрестности горы 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2019 г.)	0,69
<i>Черноголовки разрезной трава</i>		
1	окрестности горы Лысой, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край (июнь 2015 г.)	0,69
2	юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июнь 2019 г.)	0,69
3	окрестности горы Дубровка, городской округ Пятигорск, Ставропольский край (июнь 2019 г.)	0,69
4	окрестности горы 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (июнь 2019 г.)	0,69
5	юго-восточные окрестности горы Бештау, Ставропольский край (июнь 2019 г.)	0,69

Таким образом, опробованы различные элюирующие системы и определены оптимальные условия хроматографирования, позволяющие провести разделение розмариновой кислоты в извлечении из травы видов черноголовка методом ТСХ. На обоих использованных видах хроматографических пластинок наблюдалось четкое разделение розмариновой кислоты от сопутствующих веществ и совпадение R_f значения с раствором СО (табл. 3.32).

Валидацию методики испытания на подлинность согласно ГФ РФ XIV изд. включало доказательство специфичности методики [31]. Разработанные условия определения подлинности травы черноголовки методом ТСХ позволяют установить присутствие мажорного компонента – розмариновой кислоты, при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО розмариновой кислоты по значению фактора удерживания и окрашиванию при использовании выбранного детектирующего агента.

Параметр «робастность» нами установлена по влиянию времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля и эффективность разделения розмариновой кислоты от сопутствующих соединений (табл. 3.31).

Таблица 3.31 – Определение параметра «робастность» методики определения основной группы БАВ в сырье видов рода *Prunella* L. (n=3)

№ п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин)	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,63	0,62
4	30	0,69	0,68
5	40	0,68	0,68
6	50	0,70	0,69
7	60	0,69	0,68
<i>Черноголовки крупноцветковой трава</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,64	0,62
4	30	0,70	0,69
5	40	0,68	0,69
6	50	0,69	0,68
7	60	0,68	0,70
<i>Черноголовки разрезной трава</i>			
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,63	0,64
4	30	0,69	0,68
5	40	0,69	0,69
6	50	0,68	0,69
7	60	0,70	0,68

Таблица 3.32 – Определение параметра «воспроизводимость» методики определения основной группы БАВ в сырье видов рода *Prunella* L. (n=3)

Аналитик	ПТСХ-П-А-УФ		ПТСХ-АФ-А-УФ	
	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>				
1	0,68	0,67	0,70	0,69
2	0,70	0,68	0,69	0,69
3	0,69	0,69	0,69	0,68
<i>Черноголовки крупноцветковой трава</i>				
1	0,70	0,70	0,70	0,68
2	0,69	0,69	0,70	0,69
3	0,69	0,68	0,69	0,68
<i>Черноголовки разрезной трава</i>				
1	0,69	0,69	0,69	0,68
2	0,70	0,68	0,70	0,68
3	0,68	0,70	0,69	0,69

Целесообразно использование сорбента – силикагеля, нанесенного на алюминиевую или полимерную подложку, с получением сходных ТСХ-профилей и значений фактора удерживания при проведении анализа в разные дни и разными аналитиками.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ:

- В черноголовке траве: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – безводная муравьиная кислота-ацетон-метиленхлорид (8,5:25:85), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца розмариновой кислоты 7,5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм.

На хроматограммах испытуемых извлечений наблюдались зоны адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО розмариновой кислоты ($R_f=0,69$) и 2 зоны адсорбции (желтого и красного цвета) выше и 2 желтого и светло-синего цвета ниже зоны адсорбции розмариновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

3.3.4. ДНК-штрихкодирование растений рода *Prunella* L. молекулярно-генетическим методом

Длина участков ITS1 после выравнивания в программе MEGA для видов черноголовок составила 619 п.н. Среди последовательностей для всех видов черноголовок обнаружено 11 полиморфных позиций, среди которых в 8 позициях происходила только одна замена. Среди видов рода *Prunella* наиболее точно возможно установить подлинность по количеству специфичных нуклеотидных замен для *P. laciniata*, которую можно идентифицировать по 5 позициям нуклеотидных замен. *P. vulgaris* отличается по трем позициям нуклеотидных замен, а нуклеотидная последовательность *P. grandiflora* не имеет специфичных позиций (таблица 3.33).

Таблица 3.33 – Варьирующие позиции нуклеотидных последовательностей ITS

№	Род	Вид	Позиция выравнивания
1	<i>Prunella</i>	<i>Prunella vulgaris</i> L.	70 (G/A), 119 (T/A), 322 (G/A)
2	<i>L.</i>	<i>Prunella grandiflora</i> L.	-
3		<i>Prunella laciniata</i> L.	68 (G/A), 163 (A/G), 213 (C/G), 555 (A/G), 556 (G/T)

С использованием программного пакета Mega 5.2.2 мы провели анализ массива последовательностей интрона ITS и построили матрицу соотношения нуклеотидных замен. Результаты данного исследования представлены в таблице 3.34. В таблице указаны процентные значения вероятности замены одного нуклеотида на другой. Из таблицы можно сделать вывод, что наиболее часто (43 процента) происходят транзиции нуклеотида А→G.

Таблица 3.34 – Соотношение нуклеотидных замен в исследуемых последовательностях интрона ITS.

	A	T	C	G
A	-	3.18	5.1	43.12
T	3.02	-	0	5.67
C	3.02	0	-	5.67
G	22.96	3.18	5.1	-

Таким образом, нами предложена следующая схема оценки подлинности сырья видов черноголовка: после выделения и секвенирования растительной ДНК (см. раздел 2.6) полученную последовательность нуклеотидов интрона ITS1 в программе MEGA анализируют с приведенными ниже последовательностями (Приложение 3, таблица 3.3). Для этого проводят выравнивание через Clustal W, далее обрезают начало и конец последовательностей, получая цепочки длиной 619 н.п. После этого определяют совпадение последовательностей по приведенным позициям.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Проведено морфолого-анатомическое изучение двух видов рода *Arctostaphylos* (L.) Spreng. – толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской, в результате были выявлены следующие отличительные признаки:

2. Для толокнянки обыкновенной впервые было обнаружено на поперечном срезе листа в районе центральной жилки наличие небольшого проводящего пучка, который не выходит за пределы листовой пластинки, над и под которой просматривалась угловая колленхима. Так же наличие проводящих пучков боковых жилок вблизи центральной жилки. Впервые зафиксировано на поперечном срезе черешка наличие волосков с бородавчатой поверхностью. Отличительным признаком толокнянки обыкновенной от толокнянки кавказской, является наличие у второго на нижнем эпидермисе в области жилки простых двуклеточных волосков.

➤ С использованием метода ТСХ для двух видов толокнянки наблюдался схожий профиль по количеству и характеристике пятен на хроматографической пластинке. В толокнянке обыкновенной и толокнянке кавказской листьях в качестве доминирующих компонентов были определены фенологликозид – арбутин и флавоноид - гиперозид.

➤ При использовании метода секвенирования иттрона ITS1 наблюдались маловариабельные последовательности. Полученные данные позволяют отнести толокнянку кавказскую к подвиду толокнянки обыкновенной, но не как к самостоятельному виду.

3. Выявлены морфолого-анатомические признаки 5 видов рода *Vaccinium* L. – брусники обыкновенной, черники обыкновенной и кавказской, голубики обыкновенной и клюквы болотной, в результате впервые представлены для их сырья следующие диагностические признаки:

➤ Для брусники – наличие тяжа склеремхимных волокон по краю листовой пластинки (с поверхности листа) клеток прямостенного эпидермиса, губчатой паренхимы с крупными воздухоносными полостями (поперечный срез листа) и паренхимы с крупными межклетниками, запасующими воздух (поперечные срез черешка).

➤ Для черники обыкновенной – наличие булавовидных железок вдоль центральной жилки и единично на поверхности листа, а также проводящих пучков с контрастной окраской, которые подходят к каждой булавовидной железке.

➤ Для черники кавказской – наличие вдоль края листовой пластинки длинных, тонкостенных, бородавчатых волосков с красноватым содержимым (с поверхности листа). крупные друзы оксалата кальция, обильное опушение из коротких одноклеточных загнутых на верхушке волосков (поперечный срез черешка).

➤ Для голубики обыкновенной фиксировали наличие анатомических особенностей, таких как присутствие единичных эфирно-масличных железок, одноклеточных волосков, устьиц с широко раскрытой устьичной щелью на поверхности листа, а также многоклеточные сосочки, выступающие на нижней поверхности листа.

➤ С использованием метода ТСХ для четырех видов – черника обыкновенная, черника кавказская, голубика обыкновенная и клюква болотная были разработана методика определения их доминирующего компонента - хлорогеновой кислоты, для одного вида – брусники обыкновенной – методика определения арбутина.

4. Выявлены морфолого-анатомические признаки 3 видов рода *Prunella* L. – черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной с использованием люминисцентной и стереомикроскопии. Все выявленные диагностические признаки будут учтены при разработки ФС на сырье черноголовки.

➤ С использованием метода ТСХ для трех видов черноголовок была разработана методика определения розмариновой кислотой как доминирующего компонента.

5. Полученные результаты с использованием современных методов анализа (люминисцентная и стереомикроскопия, метод ТСХ для раздела «Подлинность» ФС подраздела «Определение основных групп биологически активных веществ») будут предложены для внесения в проекты ФС на изучаемые виды сырья.

6. Показана возможность использования метода секвенирования итрона ITS1 для установления подлинности сырья. Исследованные последовательности образуют достаточно однородный массив данных. При этом по всей длине последовательностей интрона ITS1 встречается ряд единичных замен, оказавшихся родо- и видо- специфичными, т.е. маркерными при выделении родов и видов. Таким образом, мы считаем целесообразным рассматривать некоторые замены в качестве независимых признаков подлинности для проведения молекулярно-генетической идентификации растительного сырья. При этом важно отметить, что последовательности участка ITS1 были идентичны у представителей вида, собранных в различных локациях.

ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS, *VACCINIUM* L. И *PRUNELLA* L.

Представленная глава 4 была выполнена под руководством доктора фармацевтических наук, заведующего лабораторией медико-биологических исследований института общей и экспериментальной биологии СО РАН, Даниила Николаевича Оленникова, за что ему выражается благодарность.

Важнейшим этапом исследования растительных объектов для последующего внедрения их сырья в медицинскую практику является детальный химический анализ основных групп БАВ. Корректно расшифрованный уникальный состав и количественное содержание впоследствии будут определять выбор методов стандартизации, а также виды фармакологической активности.

4.1. Фенольные соединения побегов и листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1, из побегов и листьев видов толокнянки центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0.45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения удаляли экстрагент, сухой остаток в количестве 10 мг растворяли в ацетонитриле 70% [383].

В листьях и стеблях *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. идентифицировано 34 соединения фенольной природы, впервые обнаружены 8 (4,6-ди-О-галлоил глюкоза; 2,3-ди-О-галлоил глюкоза; 6-О-галлоил арбутин; 1,4,6-три-О-галлоил глюкоза; 1,2,4,6-тетра-О-галлоил глюкоза; тетра-О-галлоил гексоза; тетра-О-галлоил гексоза) (рисунок 4.1). Полученные данные сравнивали с ранее опубликованной работой Оленникова Д.Н. [78]. Для *Arctostaphylos caucasica* Lipsch. все 37 соединений (рис. 4.2, табл. 4.1) были идентифицированы впервые, так как этот вид ранее не исследовался. Основными компонентами фенольных соединений двух видов являются: арбутин; 4,6-ди-О-галлоил глюкоза; 2,3-ди-О-галлоил глюкоза; 1,6-ди-О-галлоил глюкоза; 6-О-галлоил арбутин; 1,4,6-три-О-галлоил глюкоза; 1,2,4,6-тетра-О-галлоил глюкоза; тетра-О-галлоил гексоза; тетра-О-галлоил гексоза; кверцетин-3-О-галактозид; 1,2,3,4,6-пента-О-галлоил глюкоза [383]. Количественный состав компонентов представлен в таблице 4.2.

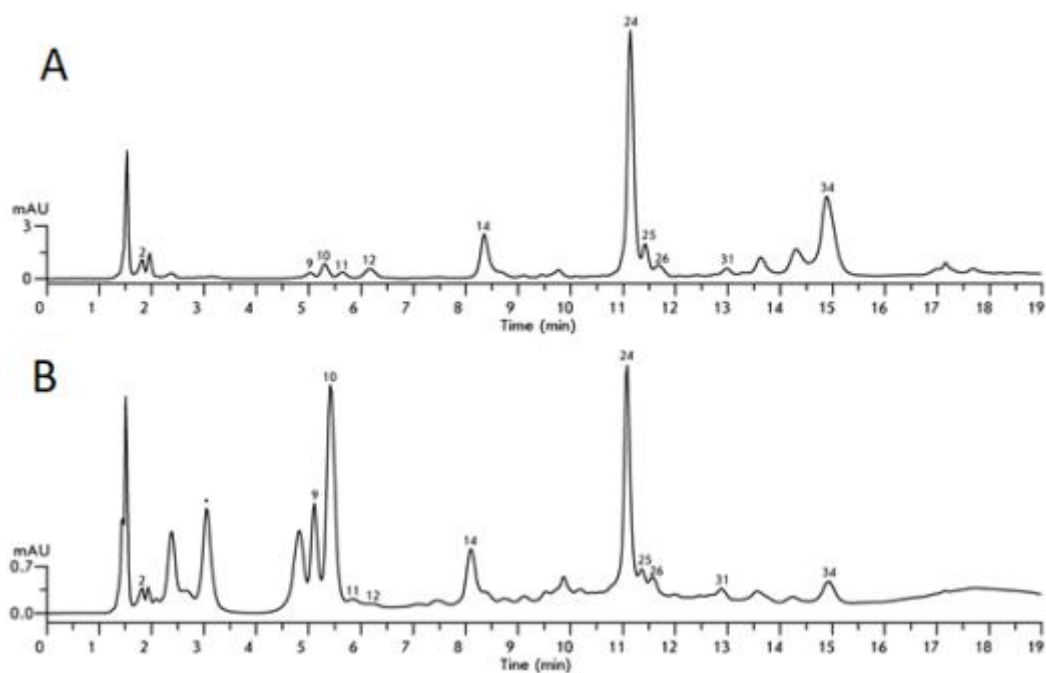


Рисунок 4.1 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС) извлечения из листьев (А) и стеблей (В) *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. в режиме регистрации основных пиков (отрицательная ионизация; сглаживание 54%). * – пицеин.

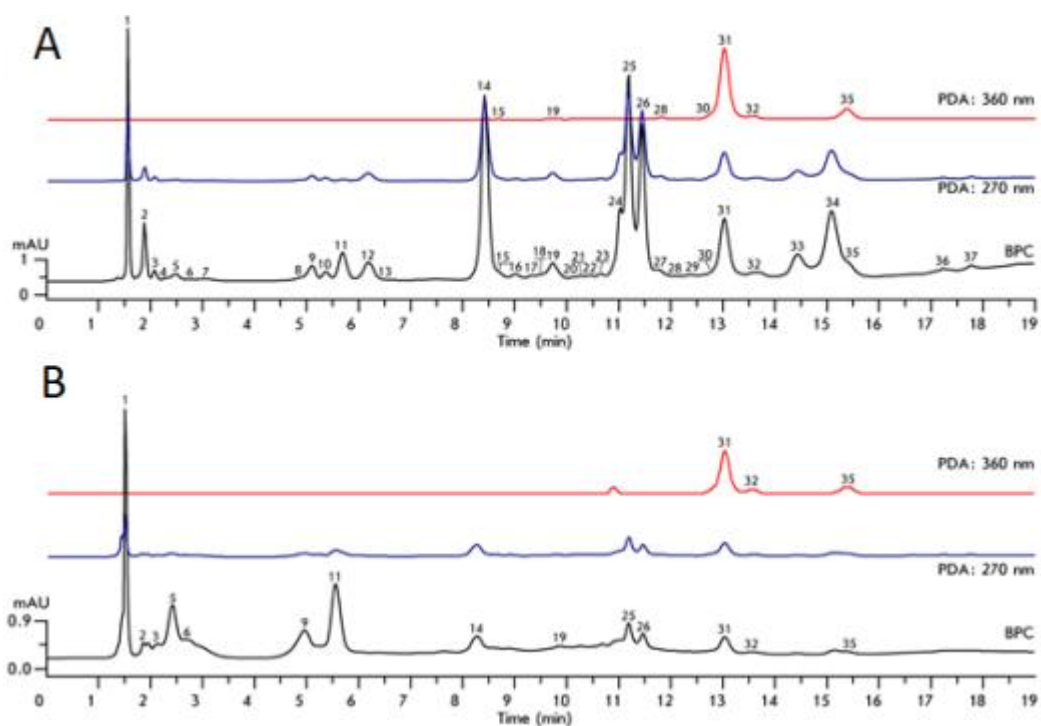


Рисунок 4.2 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС) извлечения листьев (А) и побегов (В) *Arctostaphylos caucasica* Lipsch. Детекторы: ДМД – фотодиодный, ВРС – масс-спектрометрический в режиме регистрации основных пиков (отрицательная ионизация; сглаживание 35%).

Таблица 4.1 – Хроматографические и спектральные параметры соединений, обнаруженных в роде *Arctostaphylos* (L.) Adans.

№ пика	tR, мин	Соединение*	[M-H] ⁻ , m/z	Ионы-аддукты и дочерние ионы (MS/MS), m/z
1	1.51	Галловая кислота ^S	169	
2	1.83	Арбутин ^S	271	317 [M+HCOOH] ⁻
3	2.08	1- <i>O</i> -Галлоил глюкоза ^S	331	[331]: 169 [(M-H)-Glc] ⁻
4	2.29	<i>O</i> -Галлоил гексоза ^L	331	[331]: 169 [(M-H)-Hex] ⁻
5	2.53	<i>O</i> -Метил арбутин ^S	285	331 [M+HCOOH] ⁻
6	2.75	<i>O</i> -Галлоил гексоза ^L	331	[331]: 169 [(M-H)-Hex] ⁻
7	3.04	<i>O</i> -Галлоил гексоза ^L	331	[331]: 169 [(M-H)-Hex] ⁻
8	4.83	Катехин ^S	289	
9	5.05	4,6-ди- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^S	483	[483]: 331 [(M-H)-Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-Gall-Glc] ⁻
10	5.38	2,3-ди- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^S	483	[483]: 331 [(M-H)-Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-Gall-Glc] ⁻
11	5.71	1,6-ди- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^S	483	[483]: 331 [(M-H)-Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-Gall-Glc] ⁻
12	6.21	6- <i>O</i> -Галлоил арбутин ^S	423	[423]: 271 [(M-H)-Gall] ⁻
13	6.51	Корилагин ^S	635	
14	8.45	1,4,6-Три- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^S	635	[635]: 483 [(M-H)-Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-2×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-2×Gall-Glc] ⁻
15	8.67	Кверцетин-ди- <i>O</i> -дезоксигексозид-три- <i>O</i> -гексозид ^L	1079	[1079]: 933 [(M-H)-dHex] ⁻ , 787 [(M-H)-2×dHex] ⁻ ; [1079→933]: 771 [(M-H)-dHex-Hex] ⁻ , 625 [(M-H)-2×dHex-Hex] ⁻ ; [1079→787]: 625 [(M-H)-2×dHex-Hex] ⁻ , 463 [(M-H)-2×dHex-2×Hex] ⁻ , 301 [(M-H)-2×dHex-3×Hex] ⁻
16	9.02	Эпикатехин ^S	289	
17	9.23	Три- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	635	[635]: 483 [(M-H)-Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-2×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-2×Gall-Hex] ⁻
18	9.51	Три- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	635	[635]: 483 [(M-H)-Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-2×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-2×Gall-Hex] ⁻
19	9.72	Кверцетин-ди- <i>O</i> -дезоксигексозид-ди- <i>O</i> -гексозид	917	[917]: 771 [(M-H)-dHex] ⁻ , 625 [(M-H)-2×dHex] ⁻ ; [917→771]: 609 [(M-H)-dHex-Hex] ⁻ , 463 [(M-H)-2×dHex-Hex] ⁻ ; [917→625]: 463 [(M-H)-2×dHex-Hex] ⁻ , 301 [(M-H)-2×dHex-2×Hex] ⁻
20	10.18	Три- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	635	[635]: 483 [(M-H)-Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-2×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-2×Gall-Hex] ⁻
21	10.29	Три- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	635	[635]: 483 [(M-H)-Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-2×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-2×Gall-Hex] ⁻

22	10.48	Три- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	635	[635]: 483 [(M-H)-Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-2×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-2×Gall-Hex] ⁻
23	10.67	Тетра- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	787	[787]: 635 [(M-H)-Gall] ⁻ , 483 [(M-H)-2×Gall] ⁻ ; [787→483]: 331 [(M-H)-3×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-3×Gall-Hex] ⁻
24	11.05	1,2,4,6-Тетра- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^S	787	[787]: 635 [(M-H)-Gall] ⁻ , 483 [(M-H)-2×Gall] ⁻ ; [787→483]: 331 [(M-H)-3×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-3×Gall-Glc] ⁻
25	11.24	Тетра- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	787	[787]: 635 [(M-H)-Gall] ⁻ , 483 [(M-H)-2×Gall] ⁻ ; [787→483]: 331 [(M-H)-3×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-3×Gall-Hex] ⁻
26	11.49	Тетра- <i>O</i> -галлоил гексоза ^L	787	[787]: 635 [(M-H)-Gall] ⁻ , 483 [(M-H)-2×Gall] ⁻ ; [787→483]: 331 [(M-H)-3×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-3×Gall-Hex] ⁻
27	11.77	Эпикатехингаллат ^S	441	[441]: 289 [(M-H)-Gall] ⁻
28	12.08	Эллаговой кислоты <i>O</i> -гексозид ^L	463	[463]: 301 [(M-H)-Hex] ⁻
29	12.47	Эллаговая кислота ^S	301	
30	12.78	Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид ^S	609	[609]: 463 [(M-H)-Rha] ⁻ , 301 [(M-H)-Rha-Glc] ⁻
31	13.03	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид ^S	463	[463]: 301 [(M-H)-Gal] ⁻
32	13.56	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкуронид ^S	477	[477]: 301 [(M-H)-GlcA] ⁻
33	14.48	Пента- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^L	939	[939]: 787 [(M-H)-Gall] ⁻ , 635 [(M-H)-2×Gall] ⁻ ; [939→635]: 483 [(M-H)-3×Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-4×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-4×Gall-Glc] ⁻
34	15.12	1,2,3,4,6-Пента- <i>O</i> -галлоил глюкоза ^S	939	[939]: 787 [(M-H)-Gall] ⁻ , 635 [(M-H)-2×Gall] ⁻ ; [939→635]: 483 [(M-H)-3×Gall] ⁻ , 331 [(M-H)-4×Gall] ⁻ , 169 [(M-H)-4×Gall-Glc] ⁻
35	15.51	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинозид ^S	433	[433]: 301 [(M-H)-Ara] ⁻
36	17.21	Урсоловой кислоты <i>O</i> - дезоксигексозид- <i>O</i> -гексозид ^L	763	[763]: 617 [(M-H)-dHex] ⁻ , 455 [(M-H)-dHex-Hex] ⁻
37	17.83	Урсоловой кислоты <i>O</i> -гексозид ^L	617	[617]: 455 [(M-H)-Hex] ⁻

* Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров с использованием веществ сравнения (S) и/или данных литературы (L).

Таблица 4.2 – Количественное содержание основных по содержанию соединений в анализируемых образцах (мг/г от массы воздушно-сухого сырья)

№ пика	Соединение	Толокнянка кавказская (образец №1)		Толокнянка обыкновенная (образец № 1)	
		Листья	Побеги	Листья	Побеги
2	Арбутин	7,37	1,79	7,49	1,14
9	4,6-Ди-О-галлоил глюкоза	2,38	1,16	2,04	3,00
10	2,3-Ди-О-галлоил глюкоза	1,07	<0,01	4,88	7,81
11	1,6-Ди-О-галлоил глюкоза	0,75	2,17	0,28	3,74
12	6-О-Галлоил арбутин	4,44	<0,01	4,82	0,64
14	1,4,6-Три-О-галлоил глюкоза	35,78	2,95	18,4	6,75
24	1,2,4,6-Тетра-О-галлоил глюкоза	6,82	<0,01	85,09	19,52
25	Тетра-О-галлоил гексоза	34,09	2,99	10,61	1,97
26	Тетра-О-галлоил гексоза	26,77	2,63	3,86	1,80
31	Кверцетин-3-О-галактозид	20,96	3,71	6,17	1,75
34	1,2,3,4,6-Пента-О-галлоил глюкоза	23,18	1,38	59,62	3,38

Как видно из данных таблицы 4.2 содержание основных действующих веществ было выше в листьях, чем в побегах. На основании полученных данных дальнейшие исследования проводили с листьями видов толокнянки.

4.2. Фенольные соединения побегов и листьев видов рода *Vaccinium* L.

Брусники обыкновенной побеги и листья

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1, из побегов и листьев брусники обыкновенной центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0.45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения экстрагент, сухой остаток в количестве 10 мг растворяли в ацетонитриле 70%.

В листьях брусники было идентифицировано 29 соединений фенольной природы: арбутин, О-кофеил арбутин (и 2 его изомера), протокатеховая кислота, катехин/эпикатехин димер, 4-О-кофеилхинная кислота, 1,3-ди-О-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-О-кофеилхинная кислота, процианидин А1, процианидин В1, процианидин В2, процианидин С1, кверцетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин О-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-О-дезоксигексозил-О-гексозид, кверцетин-3-О-ксилозид, кверцетин-3-О-арабинопиранозид, кверцетин-3-О-арабинофуранозид, кверцетин-3-О-рамнозид, кверцетин-3-О-(6"-ацетил)-глюкозид, кверцетин О-дезоксигексозид, кемпферол-3-О-рамнозид, кверцетин О-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-дезоксигексозид, кверцетин-3-О-{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид, кемпферол-3-О-{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид.

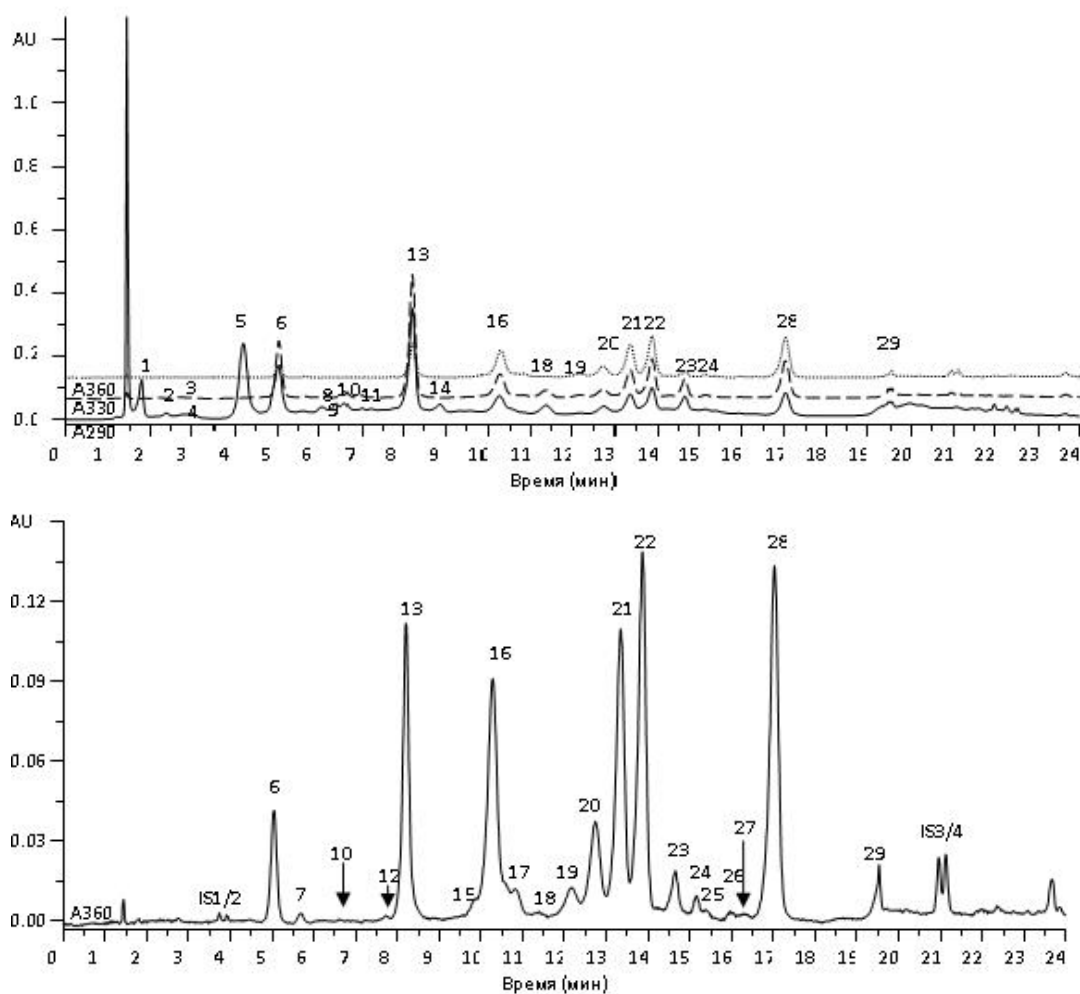


Рисунок 4.3 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) извлечения листьев *Vaccinium vitis-idaea*L., при λ 290, 330 и 360 нм. (Числами обозначено положение соединений 1–29 согласно табл. 4.3.)

Таблица 4.3 – Хроматографическая подвижность (t_R), УФ-, масс-спектрометрические данные соединений 1–29, обнаруженных в листьях *Vaccinium vitis-idaea*L.

№	t_R , мин	Соединение ^a	УФ-спектр, тип ^b	Масс спектр, m/z
1	1.76	Арбутин ^S	A	271[M-H] ⁻ 317 [M+HCOOH] ⁻
2	2.41	Протокатеховая кислота ^S	B	153 [M-H] ⁻
3	2.69	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	C	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 173, 135
4	3.02	Процианидин В ₁ ^S	D	577 [M-H] ⁻
5	4.21	Катехин/эпикатехин димер	D	577 [M-H] ⁻
6	5.01	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	C	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 165
7	5.64	1,3-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота ^S	C	515 [M-H] ⁻ , 353, 191, 179
8	6.09	Процианидин В ₂ ^S	D	577 [M-H] ⁻
9	6.45	(-)-Эпикатехин ^S	E	289 [M-H] ⁻
10	6.53	<i>O</i> -Кофеил арбутин (изомер 13) ^L	F	433 [M-H] ⁻ 271 [(M-H)-кофеил] ⁻
11	7.21	Процианидин С ₁ ^S	D	865 [M-H] ⁻
12	7.76	<i>O</i> -Кофеил арбутин (изомер 13) ^L	F	433 [M-H] ⁻ 271 [(M-H)-кофеил] ⁻

13	8.22	2- <i>O</i> -Кофеил арбутин ^S	F	433 [M-H] ⁻ 271 [(M-H)-кофеил] ⁻
14	8.82	Процианидин A ₁ ^S	D	591 [M-H] ⁻
15	9.80	Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид (рутин) ^S	G	609 [M-H] ⁻ 447 [(M-H)-Rha] ⁻ 301 [(M-H)-Rha-Glc] ⁻
16	10.26	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	G	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Gal] ⁻
17	10.83	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	G	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Glc] ⁻
18	11.41	Кверцетин <i>O</i> -(3-гидрокси-3-метилглутарил)- <i>O</i> -дезоксигексозид ^L	G	769 [M-H] ⁻ 609 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)] ⁻ 447 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-Rha] ⁻ 301 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-Glc] ⁻
19	12.09	Кверцетин-3- <i>O</i> -ксилозид (рейноутрин) ^S	G	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
20	12.72	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	G	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
21	13.38	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) ^S	G	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
22	13.91	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^S	G	447 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Rha] ⁻
23	14.58	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота ^S	C	515 [M-H] ⁻ , 353, 191, 179
24	15.14	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''-ацетил)-глюкозид ^S	G	505 [M-H] ⁻ 463 [(M-H)-ацетил] ⁻ 301 [(M-H)-ацетил-Glc] ⁻
25	15.43	Кверцетин <i>O</i> -дезоксигексозид ^L (изомер 24)	G	447 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Rha] ⁻
26	15.98	Кемпферол-3- <i>O</i> -рамнозид (афзелин) ^S	H	431 [M-H] ⁻ 285 [(M-H)-Rha] ⁻
27	16.38	Кверцетин <i>O</i> -(3-гидрокси-3-метилглутарил)-дезоксигексозид (изомер 28) ^L	G	607 [M-H] ⁻ 447 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)] ⁻ 301 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-Rha] ⁻
28	17.02	Кверцетин-3- <i>O</i> -{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид ^S	G	607 [M-H] ⁻ 447 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)] ⁻ 301 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-Rha] ⁻
29	19.51	Кемпферол-3- <i>O</i> -{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид ^S	H	591 [M-H] ⁻ 431 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)] ⁻ 285 [(M-H)-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-Rha] ⁻

^a Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров с использованием веществ сравнения (S) и/или данных литературы (L).

^b Тип УФ спектра: А – 281 нм; В – 260, 295 нм; С – 328±2 нм; D – 282 нм; Е – 278 нм; F – 285, 326 нм; G – 255±2, 266±2, 352±3; H – 265±2, 348±3.

Таблица 4.4 – Количественное содержание отдельных соединений в листьях *Vaccinium vitis-idaea* L. (образец №1)

№ пика	Соединение ^a	Содержание, мг/г ± S.D.
1	Арбутин	63,33 ± 1,29
6	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	8,49 ± 0,14
13	2- <i>O</i> -Кофеил арбутин	9,90 ± 0,23
16	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид)	2,51 ± 0,05
20	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин)	1,11 ± 0,02
21	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин)	2,77 ± 0,04
22	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин)	3,31 ± 0,07
23	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	4,87 ± 0,09
28	Кверцетин-3- <i>O</i> -{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид	3,75 ± 0,08

Исходя из данных таблицы 4.4, основными компонентами по содержанию листьев брусники являются феноглогликозид арбутин и его конъюгат 2-*O*-кофеил арбутин, 5-*O*-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, а также флавоноиды монозиды кверцетина - кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид.

Выделение веществ фенольной природы из брусники обыкновенной листьев

После предварительного хроматографического анализа нами было выделено из листьев брусники 24 соединения. Была проведена экстракция измельченных листьев брусники обыкновенной (2 кг) путем экстрагирования спиртом этиловым 70 % троекратно (1:10, 50 °C, УЗ-ванна), после чего извлечение концентрировали досуха, суспендировали в воде (1:5) и взвесь экстрагировали последовательно гексаном, хлороформом и *n*-бутанолом. Бутанольную фракцию (360 г) разделяли на полиамиде для КХ (5 кг), который элюировали водой (элюат А), 60% EtOH (элюат В) и 0.5% NH₃ в 90% EtOH (элюат С). Из элюата А при концентрировании выпадал осадок арбутина (56 г, 4). Элюат В (85 г) хроматографировали на SiO₂ (КХ, 7×40 см, EtOAc–Me₂CO 100:0→50:50), ОФ-SiO₂ (1×20 см, H₂O–MeCN 95:5→20:80) и Сефадексе LH-20 (3×70 см, MeOH–H₂O 80:20→30:70), что привело к выделению 11 соединений, идентифицированных как рутин (кверцетин-3-*O*-рутинозид, 14 мг, 5), гиперозид (кверцетин-3-*O*-галактозид, 1.6 г, 6), изокверцитрин (кверцетин-3-*O*-глюкозид, 35 мг, 7), рейноутрин (кверцетин-3-*O*-ксилозид, 27 мг, 8), гвайаверин (кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, 630 мг, 9), авикулярин (кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид, 820 мг, 10), кверцитрин (кверцетин-3-*O*-рамнозид, 2.1 г, 11), никотифлорин (кемпферол-3-*O*-рутинозид, 9 мг, 12), кемпферол-3-*O*-галактозид (11 мг, 13), астрагалин (кемпферол-3-*O*-глюкозид, 10 мг, 14) и афцелин (кемпферол-3-*O*-рамнозид, 25 мг, 15). Элюат С (63 г) разделяли как описано выше, а также с помощью преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–45 мин, 10–12%, 45–90

мин, 12–22%, 90–140 мин 22–44%, 140–210 мин 44–63%), что позволило получить **1** (25 мг), **2** (58 мг), **3** (46 мг), 5-О-кофеилхинную кислоту (2 г, **16**), 4,5-ди-О-кофеилхинную кислоту (1.4 г, **17**), 2'-О-кофеил-арбутин (8.3 г, **18**), 6'-О-кофеил-арбутин (21 мг, **19**), кверцетин-3-О-{6''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-глюкозид (22 мг, **20**), кверцетин-3-О-{6''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-галактозид (29 мг, **21**), кверцетин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-рамнозид (1.7 г, **22**), кверцетин-3-О-(6''-О-ацетил)-глюкозид (14 мг, **23**) и кемпферол-3-О-(6''-О-ацетил)-глюкозид (3 мг, **24**).

В результате хроматографического разделения этанольного извлечения из листьев б. обыкновенной с применением КХ на полиамиде, силикагеле, Сефадексе LH-20 и препаративной ВЭЖХ было выделено 24 соединения, в том числе новое производное арбутина **1** и два новых гликозида кверцетина **2** и **3**.

Для соединения **1** была определена молекулярная формула по данным HR-ESI-MS (эксп. 619.4504, расч. 619.4832 для $C_{30}H_{28}O_{13}Na$) и ^{13}C ЯМР спектроскопии. УФ спектр **1** характерен для производных кофейной кислоты, что подтверждалось результатами щелочного гидролиза (кофейная кислота), кислотного гидролиза (D-глюкоза) и масс-спектрометрии. В ИК спектре **1** обнаружены полосы, обусловленные присутствием этерифицированного карбонила (1695 см^{-1}) и ароматических колец ($1630, 1501\text{ см}^{-1}$). Данные ЯМР спектроскопии были близки к таковым 2''-О-кофеил арбутина, за исключением дополнительного набора сигналов кофейной кислоты. Сравнительный анализ расположения сигналов глюкопиранозы в спектрах **1** и арбутина указывает на наличие сдвига в слабое поле сигнала C-6' ($\delta_C 62.2 \rightarrow 65.1$) при одновременном сдвиге в сильное поле сигнала C-5' ($\delta_C 78.3 \rightarrow 75.2$), что характерно при замещении положения C-6'. Сильнопольные сдвиги сигналов C-1' ($\delta_C 103.5 \rightarrow 102.3$) и C-3' ($\delta_C 78.2 \rightarrow 76.1$) при слабом изменении положения сигнала C-2' указывает на наличие замещения у атома C-2'. В спектре НМВС наблюдались корреляции между сигналами H-2' и C-9'' ($\delta_H/\delta_C 5.11/168.3$) и H-6' и C-9''' ($\delta_H/\delta_C 4.25, 4.50/168.7$), что свидетельствует о расположении кофейных фрагментов у атомов C-2' и C-6' глюкопиранозы (Приложение 4, табл. 4.1). Таким образом, соединение **1** представляет собой 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин, которому дано название вакцинизид А (рис. 4.4) (Приложение 4, табл. 4.4).

Соединение **2** с молекулярной формулой $C_{27}H_{28}O_{15}$ (HR-ESI-MS: эксп. 591.4004, расч. 591.4548 для $C_{27}H_{27}O_{15}$) давало после кислотного гидролиза кверцетин и L-рамнозу, а после щелочного гидролиза был обнаружен кверцитрин (кверцетин-3-О-рамнозид). В ИК-спектре присутствовала полоса этерифицированного карбонила при 1720 см^{-1} , а УФ-спектр был идентичен таковому кверцитрина, что указывало на наличие ацильной группы в составе углеводного фрагмента. В масс-спектре дочерней ионизации обнаружен каскад ионов, указывающий на последовательное отщепление частиц с массой 62, 40 и 42 ($m/z 591 \rightarrow 529, 489,$

447), что характерно для эфиров 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислоты. Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР **2** были близки к спектрам 4''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-кверцитрина, кроме иного расположения сигналов рамнопиранозы. В спектрах ЯМР соединения **2** наблюдались сильные сдвиги в слабое поле сигналов Н-2'' (δ_{H} 4.18→5.31) и С-2'' (δ_{C} 70.6→72.4), указывая на присутствие заместителя по положению С-2'' углеводного фрагмента, что подтвердилось данными спектра НМВС, в котором были отмечены корреляции между сигналами Н-2'' (δ_{H} 5.31) и карбонилом С-1''' (δ_{C} 171.3) (Приложение 4, таблица 4.2). Полученные сведения указывали на строение **2** в виде 2''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-кверцитрина или кверцетин-3-O-{2''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозида (вакцинизид В) (рис. 4.4.).

Для соединения **3** была определена молекулярная формула $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_{19}$ (HR-ESI-MS: эксп. 735.5622, расч. 735.5708 для $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_{19}$). Результаты гидролиза и спектральное поведение (УФ, ИК, МС, ЯМР) указывали то, что **3** является ацил-кверцитрином, содержащим два фрагмента 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислоты. Расположение ацильных заместителей было установлено после анализа спектров ЯМР, в которых отмечены слабopольные сдвиги сигналов рамнопиранозы Н-2'' (δ_{H} 4.18→5.35), Н-4'' (δ_{H} 3.42→4.79), С-2'' (δ_{C} 70.6→72.6) и С-4'' (δ_{C} 71.9→73.0). В спектре НМВС выявлены корреляции между сигналами Н-2''/С-1''' ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5.35/171.2) и Н-4''/С-1''' ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4.79/171.7) (Приложение 4, табл. 4.2). Это свидетельствует о том, что **3** представляет собой кверцетин-3-O-{2''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид С) (рис. 4.4). Ранее было известно о существовании единственного эфира 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислоты и кверцитрина {4''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-кверцитрина}, выделенного из брусники обыкновенной.

Известные соединения листьев брусники обыкновенной были идентифицированы как арбутин (**4**), рутин (**5**), гиперозид (**6**), изокверцитрин (**7**), рейноутрин (**8**), гвайаверин (**9**), авикулярин (**10**), кверцитрин (**11**), никотифлорин (**12**), кемпферол-3-O-галактозид (**13**), астрагалин (**14**), афцелин (**15**), 5-O-кофеилхинная кислота (**16**), 4,5-ди-O-кофеилхинная кислота (**17**), 2'-O-кофеил-арбутин (**18**), 6'-O-кофеил-арбутин (**19**), кверцетин-3-O-{6''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-глюкозид (**20**), кверцетин-3-O-{6''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-галактозид (**21**), кверцетин-3-O-{4''-O-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-рамнозид (**22**), кверцетин-3-O-(6''-O-ацетил)-глюкозид (**23**) и кемпферол-3-O-(6''-O-ацетил)-глюкозид (**24**). Ранее в бруснике обыкновенной были обнаружены **4–12**, **14**, **16**, **18**, **22**, в то время как **13**, **17**, **19–21**, **23**, **24** выявлены в данном виде впервые.

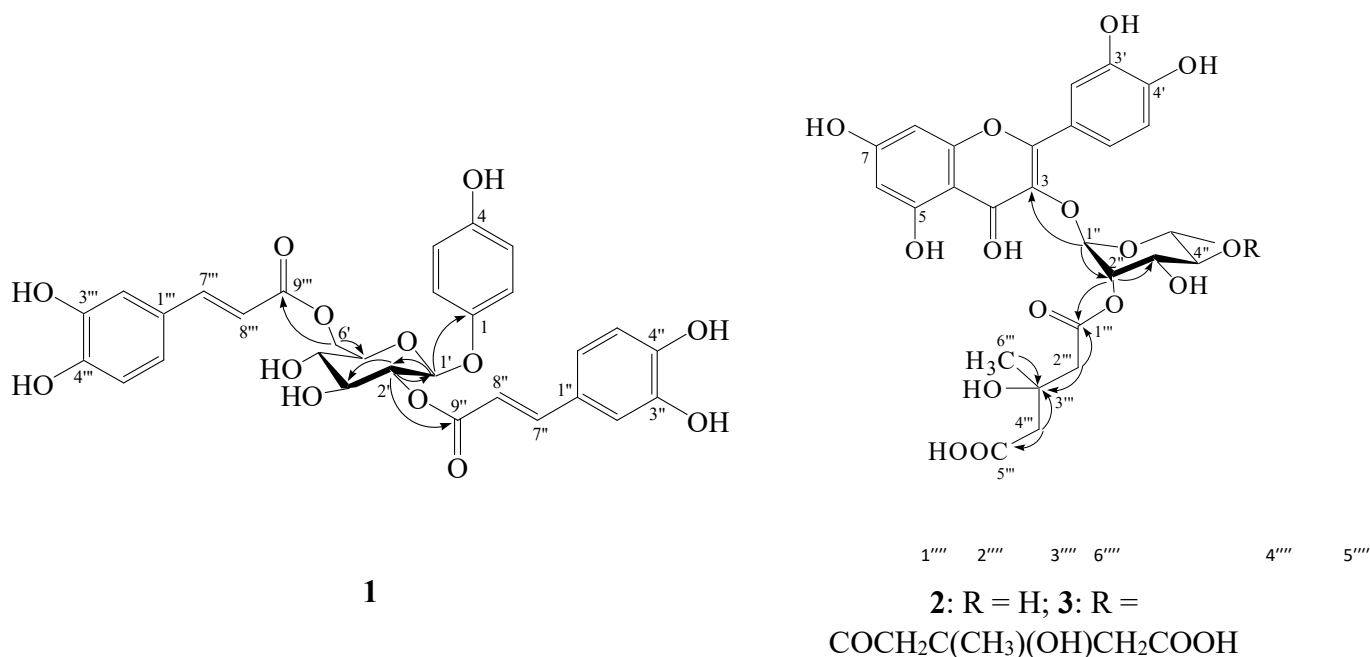


Рисунок 4.4 – Новые соединения из листьев *Vaccinium vitis-idaea* L.

Вакцинизид А (1). $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 285 пл., 328. HR-ESI-MS, m/z : 619.4504 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (расч. 619.4832 для $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_{13}\text{Na}$). ESI-MS, m/z (%): 619 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 597 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (5), 435 $[(\text{M}+\text{H})-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^+$ (27), 273 $[(\text{M}+\text{H})-2\times\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^+$ (34). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1695, 1630, 1501. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{H} , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{C} , м.д.) (Приложение 4, табл. 4.1).

Вакцинизид В (2). $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 254, 349. HR-ESI-MS, m/z : 591.4004 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (расч. 591.4548 для $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{O}_{15}$). ESI-MS, m/z (%): 591 $[\text{M}-\text{H}]^-$. MS²: [591] 529 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3]^-$ (16), 489 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4]^-$ (29), 447 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ (83), 301 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$ (100). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1720, 1650. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{H} , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{C} , м.д.) (Приложение 4, табл. 4.2).

Вакцинизид С (3). $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_{19}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 254, 348. HR-ESI-MS, m/z : 735.5622 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (расч. 735.5708 для $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_{19}$). ESI-MS, m/z (%): 735 $[\text{M}-\text{H}]^-$. MS²: [735] 673 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3]^-$, 633 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4]^-$ (2), 611 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3]^-$ (9), 591 $[(\text{M}-\text{H})-\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ (6), 571 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4]^-$ (18), 531 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3-2\times\text{C}_3\text{H}_4]^-$ (14), 529 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3-\text{C}_3\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ (4), 489 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3-2\times\text{C}_3\text{H}_4-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ (35), 447 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3-2\times\text{C}_3\text{H}_4-2\times\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ (79), 301 $[(\text{M}-\text{H})-2\times\text{CH}_2\text{O}_3-2\times\text{C}_3\text{H}_4-2\times\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$ (100). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1721, 1715, 1648. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{H} , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{C} , м.д.) (Приложение 4, табл. 4.2).

Проводили кислотный гидролиз с 2 М ТФУ и щелочной гидролиз с 1% NaOH. Фенольные соединения анализировали методом хромато-масс-спектрометрии, а углеводы –

методом ВЭЖХ после дериватизации с 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном и восстановительного аминирования с L-триптофаном (принадлежность к D/L-ряду). В продуктах кислотного гидролиза 1 была обнаружена D-глюкоза, 2 и 3 – кверцетин и L-рамноза, а после щелочного гидролиза 1 выявлена кофейная кислота, 2 и 3 – кверцитрин.

Таким образом из листьев брусники обыкновенной выделены новые соединения – вакцинизиды А–С (1–3), идентифицированные по данным химических превращений, УФ, ИК, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (1), кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (2) и кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (3) [335].

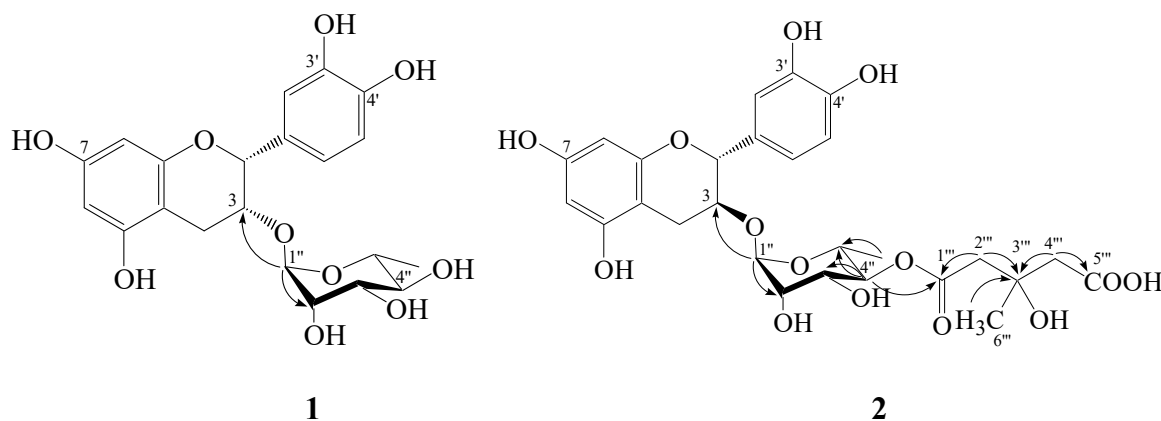
Выделение веществ фенольной природы из брусники обыкновенной побегов

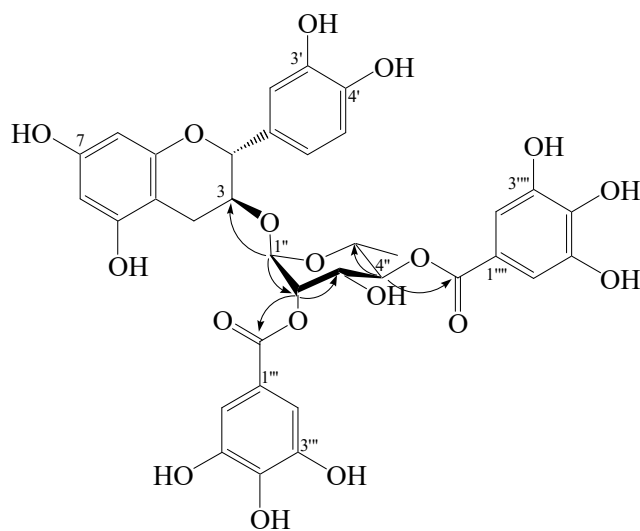
Экстракция и выделение соединений 1–17. Измельченные побеги б. обыкновенной (2 кг) экстрагировали дважды 60% ацетоном (1:12, 20°C) и ацетоновый экстракт концентрировали до водного остатка, который экстрагировали хлороформом до обесцвечивания. Водный слой хроматографировали на Сефадексе LH-20 (4×70 см, H₂O–MeOH 100:0→30:70). Фракции с Сефадекса LH-20, элюируемые 20% MeOH, разделяли на MCI gel CHP20P (3×50 см, 35% EtOH) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–90 мин 5–20%, 90–120 мин 20–25%), что позволило выделить **1** (18 мг), (+)-катехин (20.6 г, **4**), (-)-эпикатехин (1.2 г, **5**), (+)-галлокатехин (28 мг, **6**), (-)-эпигаллокатехин (6 г, **7**), (+)-галлокатехин галлат (5 мг, **8**), (-)-эпигаллокатехин галлат (3 мг, **9**), (+)-катехин-3-О-глюкозид (7 мг, **10**) и (+)-катехин-3-О-рамнозид (52 мг, **11**). Фракции с Сефадекса LH-20, элюируемые 60% MeOH, рехроматографировали на Сефадексе LH-20 (2×70 см, 95% EtOH), MCI gel CHP20P (3×50 см, 45% EtOH) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–30 мин 5–35%, 30–45 мин 35–45%, 45–100 мин 45–70%, 100–150 мин 70–86%). В результате были получены **2** (42 мг), **3** (22 мг), процианидины В1 (7.7 г, **12**), В2 (143 мг, **13**), В3 (26.4 г, **14**), В4 (25 мг, **15**), (-)-эпикатехин-(4 α →8)-(+)-катехин (6 мг, **16**), процианидин В3-3-О-рамнозид (192 мг, **17**).

Ацетоновое извлечение побегов брусники обыкновенной разделяли на Сефадексе LH-20, MCI gel CHP20P и преп. ВЭЖХ, что привело к выделению таких известных соединений, как (+)-катехин (**4**), (-)-эпикатехин (**5**), (+)-галлокатехин (**6**), (-)-эпигаллокатехин (**7**), (+)-галлокатехин галлат (**8**), (-)-эпигаллокатехин галлат (**9**), (+)-катехин-3-О-глюкозид (**10**), (+)-катехин-3-О-рамнозид (**11**), процианидины В1 (**12**), В2 (**13**), В3 (**14**), В4 (**15**), (-)-эпикатехин-(4 α →8)-(+)-катехин (**16**) и процианидин В3-3-О-рамнозид (**17**), а также трех новых катехин-О-гликозидов 1–3. Соединения **4** и **5** ранее были обнаружены в побегах брусники обыкновенной,

собранный в Румынии, 6, 7, 12, 14 – в побегах брусники обыкновенной, а присутствие 8–11, 13, 15–17 выявлено в данном виде впервые.

Соединение **1** с молекулярной формулой $C_{21}H_{24}O_{10}$ (HR-ESI-MS, m/z : эксп. 459.2511, расч. 459.3686 для $C_{21}H_{24}O_{10}Na$) давало положительную реакцию с ванилин-HCl реактивом, характерную для катехинов, и содержало в УФ-спектре максимум при 278 нм. В спектре ЯМР ^1H наблюдались сигналы при 4.89 (д, $J = 2.0$ Гц), 4.25 (м) и 2.69/2.89 м.д. (дд, $J = 4.0, 17.0$ Гц), свойственные флавановым протонам Н-2, Н-3 и Н-4, соответственно, а расположение сигналов ароматических протонов указывало на присутствие АВХ системы $\{\delta_H 6.74$ (дд, $J = 2.0, 8.1$ Гц), 6.85 (д, $J = 8.1$ Гц), 7.06 (д, $J = 2.0$ Гц) $\}$ (Приложение 4, таблица 4.6). После гидролиза с α -рамнозидазой соединение **1** давало (-)-эпикатехин и L-рамнозу, а в масс-спектре присутствовали сигналы ионов, вызванные удалением дезоксигексозы (m/z : $437 \rightarrow 291$). Расположение углеводного фрагмента у С-3 было определено после анализа спектра ЯМР ^{13}C , в котором наблюдалось смещение в слабое поле сигнала С-3 в сравнении с незамещенным (-)-эпикатехином ($\delta_C 67.0 \rightarrow 73.0$), что подтвердилось наличием корреляций в спектре НМВС между сигналами Н-1'' рамнозы и С-3 агликона ($\delta_H/\delta_C 5.40/73.0$). Таким образом, соединение **1** было охарактеризовано как (-)-эпикатехин-3-О- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид D) (рисунок 4.5). Известным 3-О-гликозидом (-)-эпикатехина является только его 3-О-глюкозид из *Cinnamotum cassia* (L.) J.Presl (*Lauraceae*).





3

Рисунок 4.5 – Новые соединения из побегов *Vaccinium vitis-idaea* L.

Вакцинизид D (1). $C_{21}H_{24}O_{10}$. УФ-спектр (MeOH, $\lambda_{\max}$, нм): 278. HR-ESI-MS, m/z : 459.2511 $[M+Na]^+$ (расч. 459.3686 для $C_{21}H_{24}O_{10}Na$). ESI-MS, m/z (%): 459 $[M+Na]^+$ (100), 437 $[M+H]^+$ (14), 291 $[(M+H)-C_6H_{10}O_4]^+$ (57). Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) (Приложение 4, таблица 4.3) (рисунок 4.5).

Вакцинизид E (2). $C_{27}H_{32}O_{14}$. УФ-спектр (MeOH, $\lambda_{\max}$, нм): 277. HR-ESI-MS, m/z : 579.4239 $[M-H]^+$ (расч. 579.4870 для $C_{27}H_{31}O_{14}$). ESI-MS, m/z (%): 579 $[M-H]^-$ (100), 289 $[(M-H)-C_6H_8O_4-C_6H_{10}O_4]^-$ (32). MS²: [579] 517 $[(M-H)-CH_2O_3]^-$ (25), 477 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4]^-$ (38), 435 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4-C_2H_2O]^-$ (63), 289 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4-C_2H_2O-C_6H_{10}O_4]^-$ (100). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1722, 1648. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) (Приложение 4, таблица 4.3) (рисунок 4.5).

Вакцинизид F (3). $C_{35}H_{32}O_{18}$. УФ-спектр (MeOH, $\lambda_{\max}$, нм): 273. HR-ESI-MS, m/z : 739.5003 $[M-H]^-$ (расч. 739.5598 для $C_{35}H_{31}O_{18}$). ESI-MS, m/z (%): 739 $[M-H]^-$ (100), 587 $[(M-H)-C_7H_4O_4]^-$ (9), 435 $[(M-H)-2 \times C_7H_4O_4]^-$ (26), 289 $[(M-H)-2 \times C_7H_4O_4-C_6H_{10}O_4]^-$ (52). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1722, 1651. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) (Приложение 4, таблица 4.3) (рисунок 4.5).

Ферментативный гидролиз проводили с α -рамнозидазой (**1**; **2** предварительно инкубировали с 0.05 М NaOH при 20 °С 2 ч) и танназой (**3**). В продуктах гидролиза **1** (2 мг) обнаружены (-)-эпикатехин (хиральная ВЭЖХ, $t = 25.5$ мин) и L-рамноза [18, 19], **2** (2 мг) – (+)-катехин (хиральная ВЭЖХ, $t = 51.3$ мин) и L-рамноза, **3** (10 мг) – (+)-катехин-3-O-рамнозид (3 мг, **11**; ВЭЖХ-МС, ЯМР, гидролиз с α -рамнозидазой) и галловую кислоту (ВЭЖХ-МС).

(+)-Катехин-3-O-рамнозид (11). $C_{21}H_{24}O_{10}$. УФ-спектр (MeOH, $\lambda_{\max}$, нм): 278. HR-ESI-MS, m/z : 437.3224 $[M+H]^+$ (расч. 437.3866 для $C_{21}H_{25}O_{10}$). ESI-MS, m/z (%): 437 $[M+H]^+$ (100), 289

$[(M+H)-C_6H_{10}O_4]^+$ (37). Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.): 4.52 (1H, д, $J = 8.1$, H-2), 3.90 (1H, м, H-3), 2.47 (1H, дд, $J = 8.3, 16.0$, H-4b), 2.89 (1H, дд, $J = 5.0, 16.0$, H-4a), 6.03 (1H, д, $J = 2.0$, H-6), 5.95 (1H, д, $J = 2.0$, H-8), 7.02 (1H, д, $J = 2.0$, H-2'), 6.81 (1H, д, $J = 8.1$, H-5'), 6.70 (1H, дд, $J = 2.0, 8.1$, H-6'), 5.39 (1H, д, $J = 1.8$, H-1''), 4.25 (1H, м, H-2''), 3.93 (1H, м, H-3''), 3.45 (1H, м, H-4''), 3.67 (1H, м, H-5''), 0.90 (1H, д, $J = 6.1$, H-6''). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.): 80.3 (C-2), 74.4 (C-3), 27.2 (C-4), 156.9 (C-5), 95.0 (C-6), 158.0 (C-7), 96.3 (C-8), 156.1 (C-9), 100.5 (C-10), 132.6 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.6 (C-3'), 145.3 (C-4'), 115.5 (C-5'), 120.4 (C-6'), 102.4 (C-1''), 70.2 (C-2''), 71.0 (C-3''), 71.5 (C-4''), 70.2 (C-5''), 17.7 (C-6'').

Хиральную ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе LCMS-8050, соединенном с колонкой Ceramospher RM-2 (4.6×150 мм, d 5 мкм; Shiseido Co., Ltd, Tokyo, Japan) и УФ-детектором (λ 278 нм), в режиме изократической элюции 1% CH_3COOH в MeOH при 22°C и скорости 500 мкл/мин. Время удерживания веществ сравнения: (-)-эпикатехин (Extrasynthese, Genay, France, №0977S, $\geq 99\%$) 25.7 мин, (+)-эпикатехин 29.6 мин, (-)-катехин (Sigma Aldrich, №C0567, $\geq 97\%$) 38.6 мин, (+)-катехин (Supelco, №43412, $\geq 99\%$) 51.4 мин.

В результате хроматографического разделения ацетонового извлечения побегов брусники обыкновенной были выделены новые катехин-О-гликозиды, идентифицированные по данным УФ, ИК, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как (-)-эпикатехин-3-О- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид D, 1), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид E, 2) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид F, 3) [334].

Черники обыкновенной листья

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1, из листьев черники обыкновенной, центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0.45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения удаляли экстрагент, сухой остаток в количестве 10 мг растворяли в ацетонитриле 70% [382].

В чернике обыкновенной листьях было идентифицировано 9 соединений фенольной природы: 4-О-кофеилхинная кислота, 5-О-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-О-кофеилхинная кислота, кофейная кислота, кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-арабинопиранозид, кверцетин-3-О-арабинофуранозид и кверцетин-3-О-рамнозид [382].

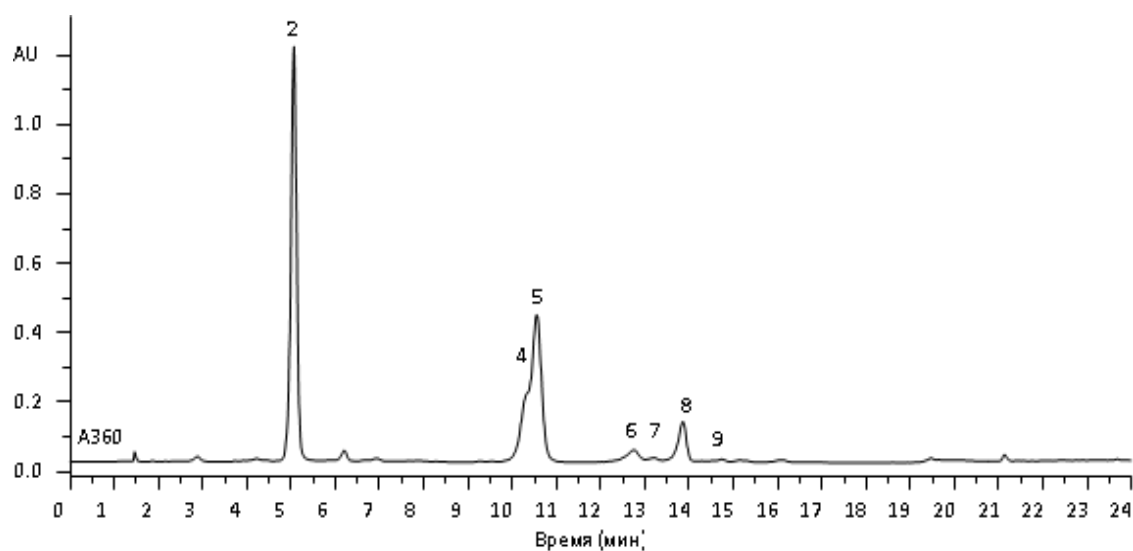
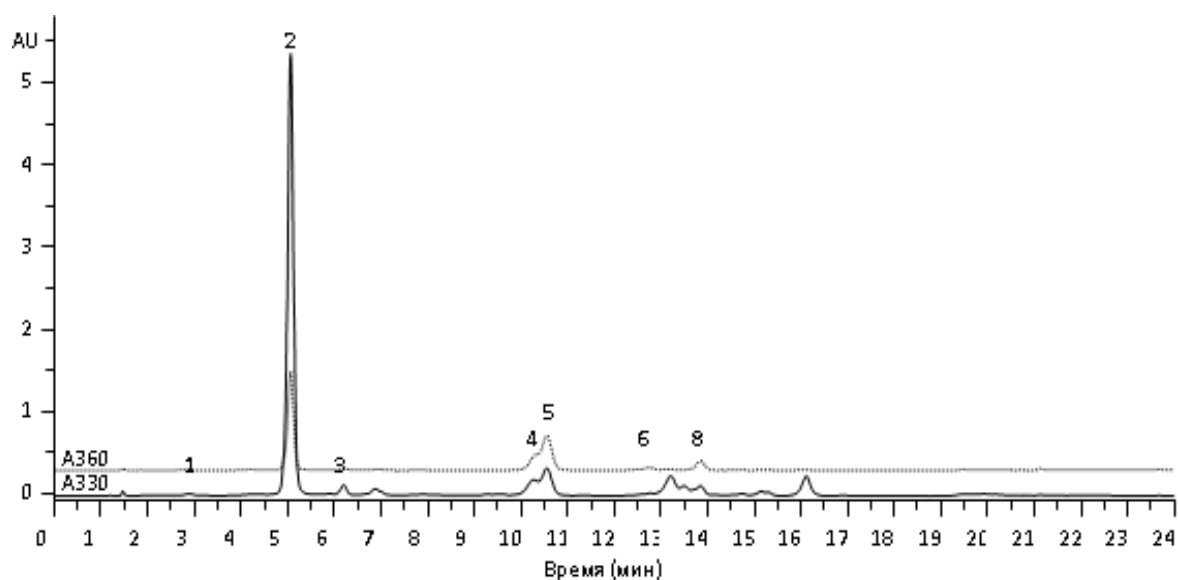


Рисунок 4.6 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) извлечения листьев *Vaccinium myrtillus* L. при λ 330 и 360 нм. (Числами обозначено положение соединений 1–9 согласно табл. 4.5).

Таблица 4.5 – Хроматографическая подвижность (t_R), УФ- масс-спектрометрические данные соединений 1–9, обнаруженных в листьях *Vaccinium myrtillus* L.

№ пика	t_R , мин	Соединение ^a	УФ-спектр, тип ^б	Масс спектр, m/z
1	2.69	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	A	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 173, 135
2	5.01	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	A	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 165
3	6.14	Кофейная кислота ^S	A	179 [M-H] ⁻
4	10.26	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	B	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Gal] ⁻
5	10.83	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	B	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Glc] ⁻
6	12.72	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻

7	13.38	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
8	13.91	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^S	B	447 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Rha] ⁻
9	14.58	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота ^S	A	515 [M-H] ⁻ , 353, 191, 179

^a Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров с использованием веществ сравнения (S) и/или данных литературы (L).

^b Тип УФ спектра: A – 328±2 нм; B – 255±2, 266±2, 352±3.

Таблица 4.6 – Количественное содержание отдельных соединений в листьях *Vaccinium myrtillus* L. (образец №1)

№	Соединение ^a	Содержание, мг/г ± S.D.
1	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	< 0,01
2	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	226,85 ± 5,21
3	Кофейная кислота ^S	< 0,01
4	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	4,69 ± 0,09
5	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	12,02
6	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	1,34 ± 0,02
7	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) ^S	< 0,01
8	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^S	2,77 ± 0,05
9	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота ^S	< 0,01

Как видно из таблицы 4.6, доминирующим соединением среди фенолокислот является 5-*O*-кофеилхинная кислота, флавоноиды представлены монозидами кверцетина, основным по содержанию из которых является кверцетин-3-*O*-галактозид.

Черники кавказской листья

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1 из листьев черники кавказской, центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0.45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения удаляли экстрагент, сухой остаток в количестве 10 мг растворяли в ацетонитриле 70% [382].

В чернике кавказской листьях было идентифицировано 10 соединений фенольной природы: 4-*O*-кофеилхинная кислота, 5-*O*-кофеилхинная кислота, кофейная кислота, кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид и кверцетин-3-*O*-рамнозид и кверцетин-3-*O*-(6''-ацетил)-глюкозид [382].

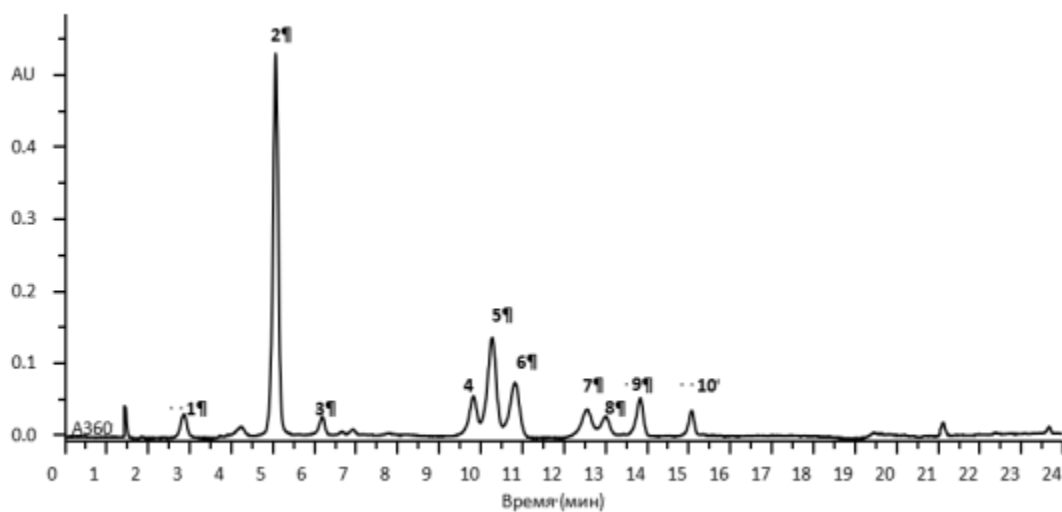
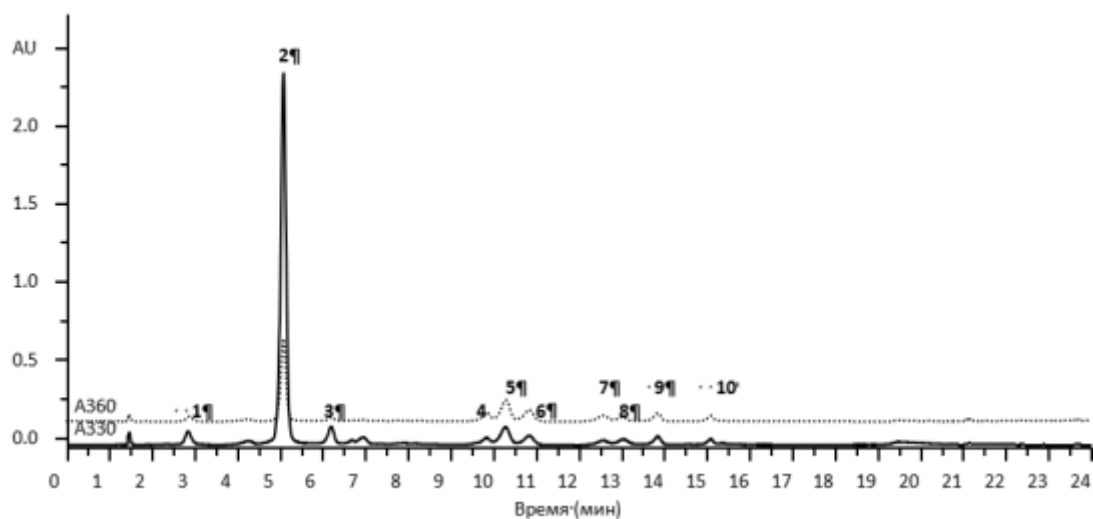


Рисунок 4.7 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) извлечения листьев *Vaccinium arctostaphylos* L. При λ 330 и 360 нм. (Числами обозначено положение соединений 1–10 согласно табл. 4.7).

Таблица 4.7 – Хроматографическая подвижность (t_R), УФ- масс-спектрометрические данные соединений 1–10, обнаруженных в листьях *Vaccinium Arctostaphylos* L.

№ пика	t_R , мин	Соединение ^a	УФ-спектр, тип ^b	Масс спектр, m/z
1	2.69	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	А	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 173, 135
2	5.01	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	А	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 165
3	6.14	Кофейная кислота ^S	А	179 [M-H] ⁻
4	9.80	Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид (рутин) ^S	В	609 [M-H] ⁻ 447 [(M-H)-Rha] ⁻ 301 [(M-H)-Rha-Glc] ⁻

5	10.2 6	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	B	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Gal] ⁻
6	10.8 3	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	B	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Glc] ⁻
7	12.7 2	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
8	13.3 8	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
9	13.9 1	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^S	B	447 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Rha] ⁻
10	15.1 4	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''-ацетил)-глюкозид ^S	B	505 [M-H] ⁻ 463 [(M-H)-ацетил] ⁻ 301 [(M-H)-ацетил-Glc] ⁻

^a Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров с использованием веществ сравнения (S) и/или данных литературы (L).

⁶ Тип УФ спектра: А – 328±2 нм; В – 255±2, 266±2, 352±3.

Таблица 4.8 – Количественное содержание отдельных соединений в листьях *Vaccinium arctostaphylos* L. (образец №1)

№	Соединение ^a	Содержание, мг/г ± S.D.
1	4-О-Кофеилхинная кислота ^S	8,01 ± 0,14
2	5-О-Кофеилхинная кислота ^S	105,32 ± 2,41
3	Кофейная кислота ^S	4,29 ± 0,08
4	Кверцетин-3-О-рутинозид (рутин) ^S	1,46 ± 0,03
5	Кверцетин-3-О-галактозид (гиперозид) ^S	3,99 ± 0,06
6	Кверцетин-3-О-глюкозид (изокверцитрин) ^S	2,38 ± 0,05
7	Кверцетин-3-О-арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	1,29 ± 0,02
8	Кверцетин-3-О-арабинофуранозид (авикулярин) ^S	0,99 ± 0,02
9	Кверцетин-3-О-рамнозид (кверцитрин) ^S	1,23 ± 0,02
10	Кверцетин-3-О-(6''-ацетил)-глюкозид ^S	0,70 ± 0,01

Как видно из таблицы 4.8 основным по содержанию соединением в черники кавказской листьях среди фенолокислот является 5-О-кофеилхинная кислота, флавоноиды представлены монозидами кверцетина, доминирующим из которых является кверцетин-3-О-галактозид.

Голубики обыкновенной листья

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1, из листьев голубики обыкновенной центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0.45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения удаляли экстрагент, сухой остаток в количестве 10 мг растворяли в ацетонитриле 70%.

В голубике обыкновенной листьях было идентифицировано 6 соединений фенольной природы: 4-О-кофеилхинная кислота, 5-О-кофеилхинная кислота, кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-арабинопиранозид и кемпферол-3-О-глюкозид (рис. 4.8 и табл. 4.9).

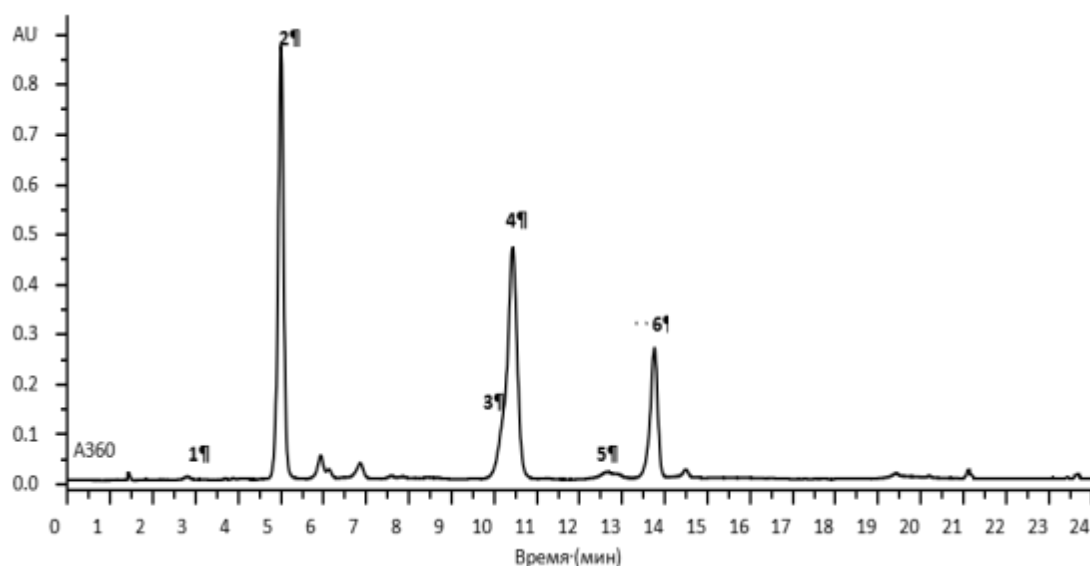
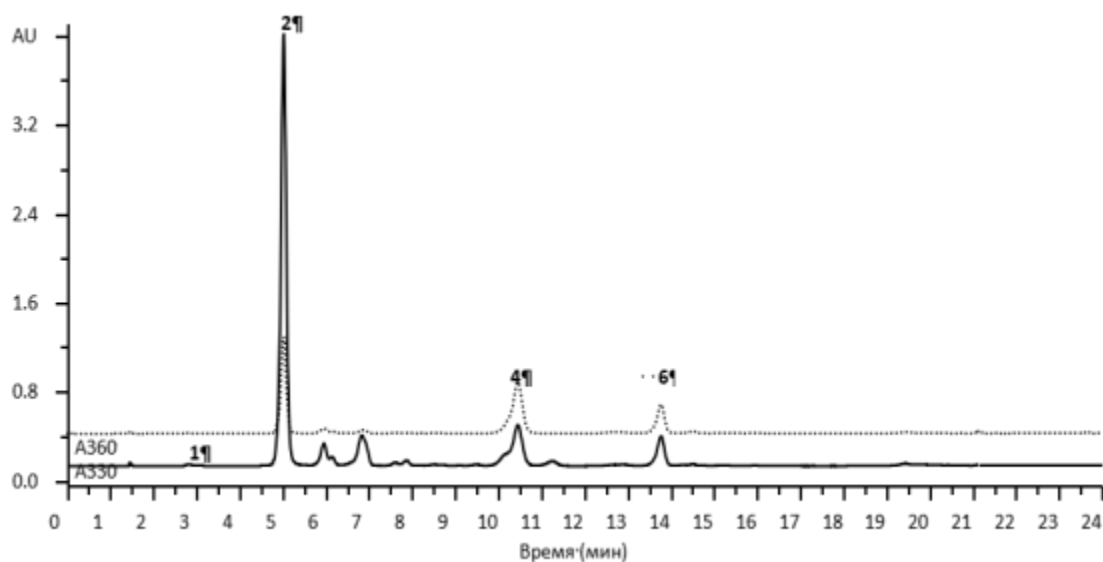


Рисунок 4.8 -Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) извлечения листьев *Vaccinium uliginosum* L. при λ 330 и 360 нм. (Числами обозначено положение соединений 1–6 согласно табл. 4.9)

Таблица 4.9 – Хроматографическая подвижность (t_R), УФ- масс-спектрометрические данные соединений 1–6, обнаруженных в листьях *Vaccinium uliginosum* L.

№ пика	t_R , мин	Соединение ^a	УФ- спектр, тип ^б	Масс спектр, m/z
1	2.69	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	А	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 173, 135
2	5.01	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	А	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 165
3	10.26	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	В	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Gal] ⁻
4	10.83	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	В	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Glc] ⁻
5	12.72	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид	В	433 [M-H] ⁻

		(гвайаверин) ^S		301 [(M-H)-Ara] ⁻
6	13.88	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид (астрагалин) ^S	В	431[M-H] ⁻ , 269 [(M-H)-Glc] ⁻

^a Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров с использованием веществ сравнения (S) и/или данных литературы (L).

^b Тип УФ спектра: А – 328±2 нм; В – 255±2, 266±2, 352±3.

Таблица 4.10 – Количественное содержание отдельных соединений в листьях *Vaccinium uliginosum* L. (образец №1)

№	Соединение ^a	Содержание, мг/г ± S.D.
1	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	< 0.01
2	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	166,98 ± 3,65
3	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	2,07 ± 0,03
4	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	13,17 ± 0,25
5	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	0,45 ± 0,01
6	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид (астрагалин) ^S	6,38 ± 0,12

Как видно из таблицы 4.10 основным по содержанию соединением в голубике обыкновенной листьях среди фенолокислот является 5-*O*-кофеилхинная кислота, флавоноиды представлены монозидами кверцетина и кемпферола, доминирующим из которых является кверцетин-3-*O*-глюкозид.

Клюквы болотной побеги

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1, из побегов клюквы болотной, центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0,45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения удаляли экстрагент, сухой остаток в количестве 10 мг растворяли в ацетонитриле 70%.

В клюкве болотной побегах было идентифицировано 11 соединений фенольной природы: 4-*O*-кофеилхинная кислота, 5-*O*-кофеилхинная кислота, кверцетин ди-*O*-дезоксигексозил-*O*-гексозид и его изомер, кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин-3-*O*-ксилозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид и кверцетин-3-*O*-рамнозид (рис. 4.9 и табл. 4.11).

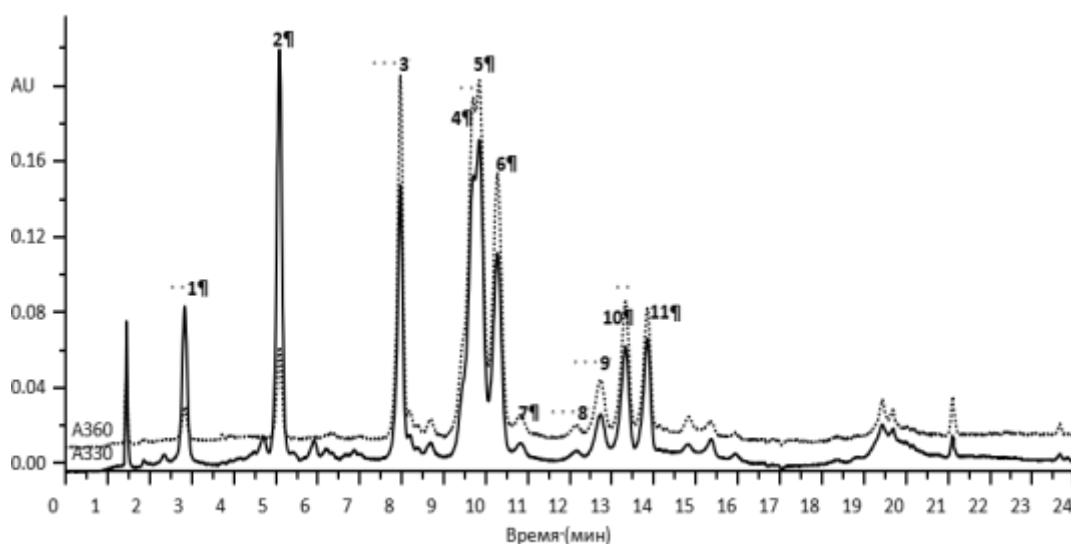


Рисунок 4.9 - Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) извлечения побегов *Vaccinium oxycoccos* L. при λ 330 и 360 нм. (Числами обозначено положение соединений 1–11 согласно табл. 4.11).

Таблица 4.11 – Хроматографическая подвижность (t_R), УФ- масс-спектрометрические данные соединений 1–11, обнаруженных в побегах *Vaccinium oxycoccos* L.

№ пика	t_R , мин	Соединение ^a	УФ-спектр, тип ^б	Масс спектр, m/z
1	2.69	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	A	353 [M-H] ⁻ , 191, 179, 173, 135
2	5.01	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	A	353[M-H] ⁻ , 191, 179, 165
3	7.94	Кверцетин ди- <i>O</i> -дезоксигексозил- <i>O</i> -гексозид ^L	B	755 [M-H] ⁻ - 609 [(M-H)-Rha]- 447 [(M-H)-2×Rha]- 301 [(M-H)-2×Rha-Glc]-
4	9.52	Кверцетин <i>O</i> -дезоксигексозил- <i>O</i> -гексозид ^L (изомер 4)	B	609 [M-H] ⁻ - 447 [(M-H)-Rha]- 301 [(M-H)-Rha-Glc]-
5	9.80	Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид (рутин) ^S	B	609 [M-H] ⁻ 447 [(M-H)-Rha] ⁻ 301 [(M-H)-Rha-Glc] ⁻
6	10.26	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	B	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Gal] ⁻
7	10.83	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	B	463 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Glc] ⁻
8	12.09	Кверцетин-3- <i>O</i> -ксилозид (рейноутрин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
9	12.72	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
10	13.38	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) ^S	B	433 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Ara] ⁻
11	13.91	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^S	B	447 [M-H] ⁻ 301 [(M-H)-Rha] ⁻

^a Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров с использованием веществ сравнения (S) и/или данных литературы (L).

^b Тип УФ спектра: А – 328±2 нм; В – 255±2, 266±2, 352±3.

Таблица 4.12 – Количественное содержание отдельных соединений в листьях *Vaccinium oxycoccos* L. (образец №1)

№	Соединение ^a	Содержание, мг/г ± S.D.
1	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	9,46 ± 0,015
2	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^S	36,61 ± 0,81
3	Кверцетин ди- <i>O</i> -дезоксигексозил- <i>O</i> -гексозид ^L	3,25 ± 0,07 ¹
4	Кверцетин <i>O</i> -дезоксигексозил- <i>O</i> -гексозид ^L (изомер 4)	3,65 ± 0,06 ¹
5	Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид (рутин) ^S	4,33 ± 0,09
6	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) ^S	3,85 ± 0,07
7	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^S	< 0,01
8	Кверцетин-3- <i>O</i> -ксилозид (рейноутрин) ^S	< 0,01
9	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) ^S	0,85 ± 0,02
10	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) ^S	1,81 ± 0,03
11	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^S	1,71 ± 0,03

¹Расчет по рутину.

Как видно из таблицы 4.12 основным по содержанию соединением в клюкве болотной побегах среди фенолокислот является 5-*O*-кофеилхинная кислота, флавоноиды представлены монозидами кверцетина мажорным, из которых является кверцетин-3-*O*-рутинозид.

4.3. Фенольные соединения травы видов рода *Prunella* L.

Спиртовое извлечение (спирт этиловый 70%), полученное в соответствии со схемой, приведённой на рисунке 2.1, из травы видов *Prunella* L. (ч. обыкновенной, ч. крупноцветковой и ч. разрезной), центрифугировали (6000 g, 20 мин), фильтровали извлечение через мембранный фильтр (0,45 мкм). Для анализа ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС из полученного извлечения удаляли экстрагент, сухой остаток в количестве по 10 мг растворяли в ацетонитриле 70%. Исходя из данных рисунка 4.10 и таблицы 4.26 в траве видов чернойголовки содержится от 14 до 15 соединений фенольной природы (рис. 4.10 и табл. 4.13).

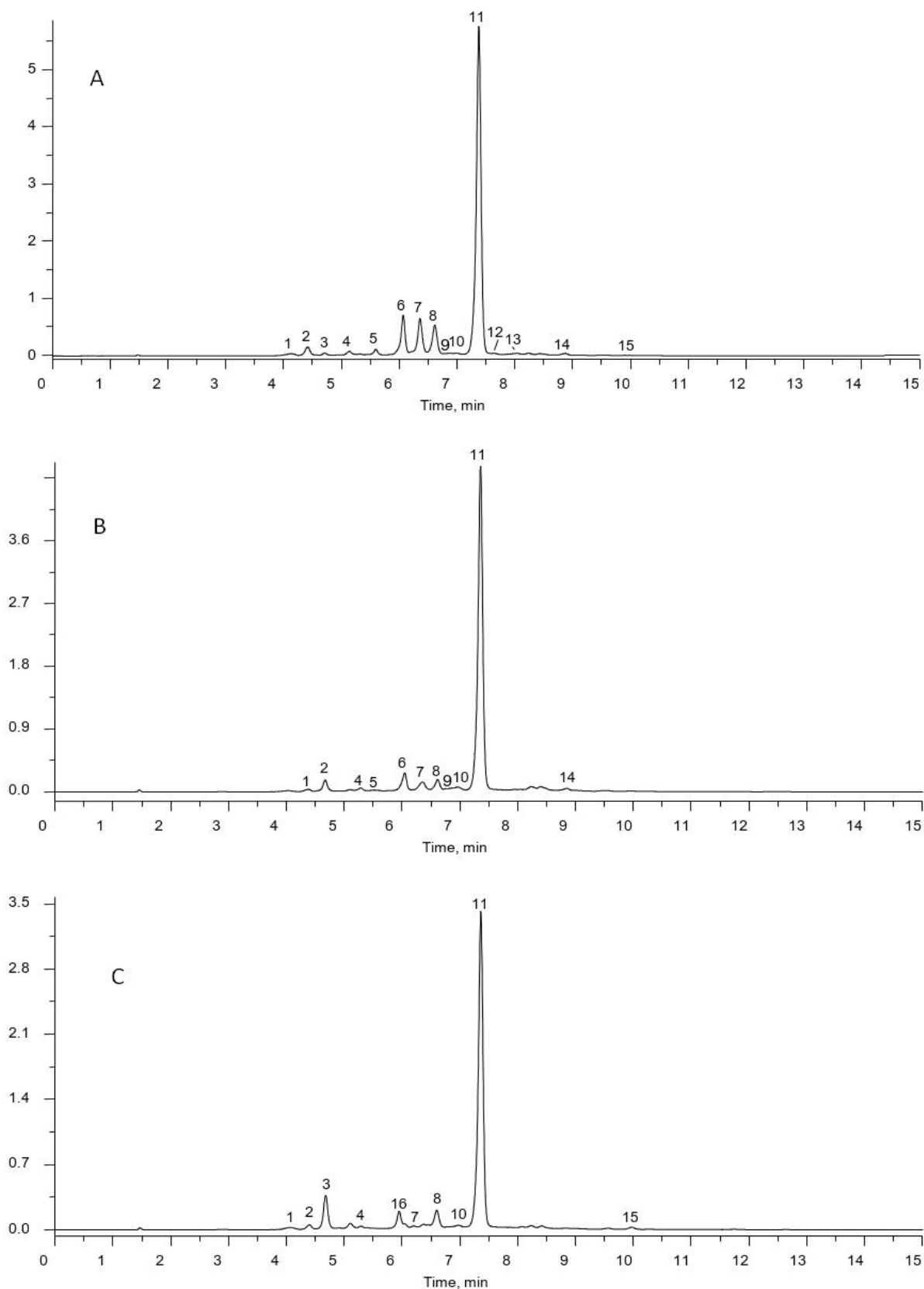


Рисунок 4.10 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) извлечений из травы *Prunella grandiflora* L. (A), *Prunella vulgaris* L. (B) и *Prunella laciniata* L. (C) при $\lambda=330$ нм. (Числами обозначено положение соединений 1–16 согласно табл. 4.13,)

Таблица 4.13– Время удерживания, данные УФ- и масс-спектров соединений 1–16, обнаруженных в траве рода *Prunella* L.

№ пика	t _R , мин	Соединение ^a	УФ-спектр, λ max, нм	Масс спектр, m/z	Уровень идентификации
1	4.24	2- <i>O</i> -Кофеил-треоновая кислота	327	297 [M-H] ⁻ , 179, 161	(1a)
2	4.43	3- <i>O</i> -Кофеил-треоновая кислота	327	297 [M-H] ⁻ , 179, 161	(1a)
3	4.72	5- <i>O</i> -Кофеил-хинная кислота	328	353 [M-H] ⁻ , 191, 179	(1b)
4	5.22	Кофейная кислота	330	179 [M-H] ⁻	(1b)
5	5.67	Кверцетин-3- <i>O</i> -(4"-ксилозил-6"-рамнозил)-глюкозид (Новое соединение)	256, 267, 350	743 [M+H] ⁺ , 611 [(M+H)-Xyl] ⁺ , 597 [(M+H)-Rha] ⁺ , 465 [(M+H)-Xyl-Rha] ⁺ , 303 [(M+H)-Xyl-Rha-Glc] ⁺	(1a)
6	6.09	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6"-рамнозил)-глюкозид	255, 267, 353	649 [M+K] ⁺ , 633 [M+Na] ⁺ , 611 [M+H] ⁺ , 465 [(M+H)-Rha] ⁺ , 303 [(M+H)-Rha-Glc] ⁺	(1a)
7	6.36	Розмариновая кислота-3'- <i>O</i> -глюкозид	329	359 [M-H] ⁻ , 191, 179	(1a)
8	6.64	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6"-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-глюкозид	255, 267, 353	631 [M+Na] ⁺ , 609 [M+H] ⁺ , 465 [(M+H)-HMG] ⁺ , 303 [(M+H)-HMG-Glc] ⁺	(1a)
9	6.78	Литоспермовая кислота	253, 330	537 [M-H] ⁻ , 493, 295	(1b)
10	7.02	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид	270, 338	449 [M+H] ⁺ , 287 [(M+H)-Glc] ⁺	(1b)
11	7.42	Розмариновая кислота	329	359 [M-H] ⁻ , 197, 179, 161	(1b)
12	7.71	Сальвианоловая кислота А	286, 331	493 [M-H] ⁻ , 383, 313, 295	(1b)
13	8.01	Сальвианоловая кислота В	287, 310	717 [M-H] ⁻ , 555, 519, 313, 295	(1b)
14	8.87	Кверцетин	255, 267, 358	303 [M+H] ⁺	(1b)
15	9.93	Кемпферол	270, 340	287 [M+H] ⁺	(1b)
16	5.97	Кверцетин -7- <i>O</i> -дезоксигексозил-гексозид	255, 370	611 [M+H] ⁺ , 303 [(M+H)-dHex-Hex] ⁺	(3)

^a Идентификацию соединений осуществляли после сравнения времени удерживания, УФ- и масс-спектров. Уровни идентификации: (1) идентифицированные соединения после сравнения УФ-, масс-спектральных данных и времени удерживания со стандартным образцом (1a – выделенные, рабочие стандарты, 1b – коммерческие стандарты); (2) предположительно

аннотированные соединения после сравнения УФ- и масс-спектральных данных с литературными данными; (3) предположительно охарактеризованные соединения после сходства УФ- и масс-спектральных данных с известными соединениями химического класса.

Таблица 4.14 – Количественное содержание отдельных соединений, обнаруженных в траве *P. grandiflora* L., *P. vulgaris* L. и *P. laciniata* L. (мг/г $\pm$ S.D).

№	Соединение	<i>P. grandiflora</i> L. (образец №1)	<i>P. vulgaris</i> L. (образец №1)	<i>P. laciniata</i> L. (образец №1)
1	2- <i>O</i> -Кофеил-треоновая кислота	0,82 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,02	следы
2	3- <i>O</i> -Кофеил-треоновая кислота	1,91 $\pm$ 0,04	1,85 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,01
3	5- <i>O</i> -Кофеил-хинную кислоту	0,26 $\pm$ 0,00	-	3,62 $\pm$ 0,07
4	Кофейная кислота	0,11 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,00
5	Кверцетин-3- <i>O</i> -(4"-ксилозил-6"-рамнозил)-глюкозид	2,20 $\pm$ 0,05	следы	-
6	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6"-рамнозил)-глюкозид	10,74 $\pm$ 0,21	5,12 $\pm$ 0,10	-
7	Розмариновая кислота-3'- <i>O</i> -глюкозид	6,39 $\pm$ 0,12	2,07 $\pm$ 0,04	следы
8	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6"-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-глюкозид	9,55 $\pm$ 0,19	3,17 $\pm$ 0,07	3,62 $\pm$ 0,08
9	Литоспермовая кислота	следы	следы	-
10	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид	следы	следы	следы
11	Розмариновая кислота	51,87 $\pm$ 1,04	42,62 $\pm$ 0,84	32,05 $\pm$ 0,61
12	Сальвианоловая кислота А	следы	н.д.	-
13	Сальвианоловая кислота В	следы	н.д.	-
14	Кверцетин	следы	следы	-
15	Кемпферол	следы	н.д.	следы
16	Кверцетин -7- <i>O</i> -дезоксигексозил-гексозид	-	-	3,05 $\pm$ 0,05

* – не обнаружено; следы – содержится в минимальном количестве.

Исходя из результатов таблицы 4.14, видно, что основным компонентом травы рода *Prunella* L. является фенолокислота – розмариновая кислота, флавоноиды представлены биозидами кверцетина, мажорными из которых являлись кверцетин-3-*O*-(6"-рамнозил)-глюкозид и кверцетин-3-*O*-(6"-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-глюкозид.

Выделение веществ фенольной природы из травы видов *Prunella* L.

В результате хроматографического разделения компонентов спиртового извлечения из травы черноголовки крупноцветковой которое проводили с применением КХ на полиамиде, Сефадексе LH-20, нормально- и обращено-фазовом силикагеле и препаративной ВЭЖХ, удалось выделить рутин (2), астрагалин (3), кверцетин (4), кемпферол (5), 2-*O*-кофеил-треоновую кислоту (6), 3-*O*-кофеил-треоновую кислоту (7), 5-*O*-кофеил-хинную кислоту (8), кофейную кислоту (9), розмариновой кислоты 3'-*O*-глюкозид (10) [10], кверцетин-3-*O*-(6"-*O*-

(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-глюкозид (**11**), литоспермовую кислоту (**12**), розмариновую кислоту (**13**), сальвианоловые кислоты А (**14**) и В (**15**) и новый флавоноид **1**.

Соединение **1** с молекулярной формулой $C_{32}H_{38}O_{20}$ содержало в масс-спектре сигнал протонированной частицы (m/z 743), а также каскад ионов, обусловленных удалением фрагментов пентозы (m/z 743→611), дезоксигексозы (m/z 743→597, 465) и гексозы (m/z 465→303). После гидролиза **1** с 2 М ТФУ были идентифицированы кверцетин, D-ксилоза, L-рамноза и D-глюкоза в эквимольном соотношении, а гидролиз с 2% щавелевой кислотой приводил к образованию кверцетин 3-*O*-(6''-*O*-рамнозил)-глюкозида (рутина, **2**) и ксилозы. В результате метилирования **1** метилкарбонатом был получен перметилат, после гидролиза которого образовывались 2,3-ди-*O*-метил-глюкоза, 2,3,4-три-*O*-метил-ксилоза и 2,3,4-три-*O*-метил-рамноза. Эти результаты указывали на строение углеводного фрагмента в виде (4-*O*-ксилозил-6-*O*-рамнозил)-глюкозы, что было подтверждено данными спектроскопии ЯМР, которые были сходны со спектрами **2**, содержащего дополнительный фрагмент ксилозы (δ_H 3.27, 3.35, 3.36, 3.55, 4.01, 4.79; δ_C 65.2, 70.3, 74.2, 76.4, 104.6) (Приложение 4, таблица 4.4). В спектре ЯМР ^{13}C был отмечен сдвиг в слабое поле сигнала C-4'' глюкозы в сравнении с таковым **2** (δ_C 71.2→72.0), обусловленный присутствием фрагмента ксилозы, на что также указывали взаимные корреляции в спектре НМВС между H-1''' ксилозы и C-4'' (δ_H/δ_C 4.79/71.2). Таким образом, соединение **1** представляло собой кверцетин 3-*O*-(4''-*O*- β -D-ксилопиранозил-6''-*O*- α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозид {кверцетин 3-*O*-(4''- β -D-ксилопиранозил-рутинозид)}, изомерами которого являются кверцетин 3-*O*-(2''- β -D-ксилопиранозил-рутинозид) и кверцетин 3-*O*-(3''- β -D-ксилопиранозил-рутинозид) (рисунок 4.11).

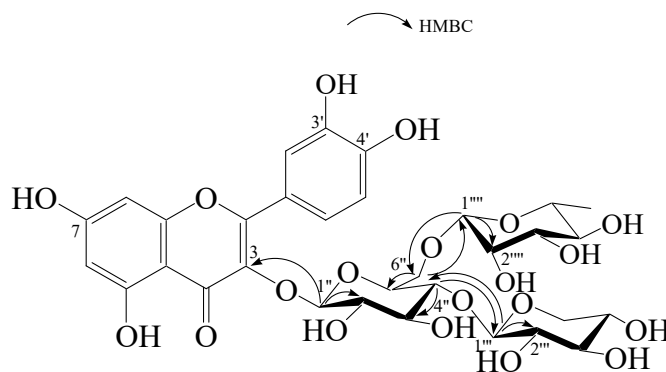


Рисунок 4.11 – Новое соединение (**1**) из травы *Prunella grandiflora*L.

Из травы *P. laciniata* были выделены **1**, **3**, **5**, **7–11**, **13** и кверцетин-7-*O*-рутинозид (**16**); из *P. vulgaris* – **1–4**, **6–15**, никотифлорин (**17**) и рейноутрин (**18**). Ранее в *P. grandiflora* и *P. laciniata* были описаны **2**, **4**, **9** и **13**, в *P. vulgaris* – **2–5**, **8**, **9** и **13**. Впервые показано присутствие **3**, **5–7**, **10–12**, **14**, **15** в *P. grandiflora*, **3**, **5**, **7**, **10**, **11** в *P. laciniata*, **6**, **7**, **10–12**, **14**, **15**, **17**, **18** в *P. vulgaris*.

Проведенные исследования показали, что изученные виды *Prunella* характеризуются сходным составом фенольных соединений и содержат различные флавоноиды и гидроксицинаматы, среди которых гликозиды кверцетина и кемпферола, а также розмариновая кислота, ее 3'-*O*-гликозид и 3-*O*-кофеил-треоновая кислота, обнаруженные во всех видах, что может иметь систематическое значение для рода в целом.

Экстракция и выделение соединений 1–15 из травы *P. grandiflora* L. Измельченное сырье (420 г) экстрагировали 90% метанолом (1:10, 20°C, ×5), концентрировали до водного остатка, который разделяли на полиамиде для КХ (2 кг), промывая его водой, 70% EtOH (фракция В) и 0.5% NH₃ в 90% EtOH (фракция С). Фракция В при концентрировании давала осадок рутина (кверцетин 3-*O*-рутинозид, 2.1 г, **2**), после чего маточный раствор разделяли на Сефадексе LH-20 (EtOH 70%→20%) и SiO₂ (EtOAc–Me₂CO 100:0→60:40), что привело к выделению **1** (110 мг), астрагалина (кемпферол 3-*O*-гликозид, 10 мг, **3**), кверцетина (7 мг, **4**) и кемпферола (2 мг, **5**). Фракцию С хроматографировали на Сефадексе LH-20 (EtOH 90%→50%), ОФ-SiO₂ (H₂O–MeCN 60:40→10:90) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–90 мин 5–50%, 90–180 мин 50–60%), в результате чего были выделены 2-*O*-кофеил-треоновая кислота (105 мг, **6**), 3-*O*-кофеил-треоновая кислота (320 мг, **7**), 5-*O*-кофеил-хинная кислота (35 мг, **8**), кофейная кислота (12 мг, **9**), розмариновой кислоты 3'-*O*-гликозид (0.9 г, **10**), кверцетин-3-*O*-{6''-*O*-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-гликозид (1.2 г, **11**), литоспермовая кислота (25 мг, **12**), розмариновая кислота (5.2 г, **13**), сальвианоловые кислоты А (10 мг, **14**) и В (8 мг, **15**).

Применение вышеописанной схемы позволило выделить из *P. laciniata* (5 г) **1** (2 мг), **3** (1 мг), **5** (0.5 мг), **7** (1.2 мг), **8** (10 мг), **9** (0.5 мг), **10** (1 мг), **11** (9 мг), **13** (110 мг) и кверцетин-7-*O*-рутинозид (10 мг, **16**); из *P. vulgaris* (750 г) – **1** (180 мг), **2** (1.5 г), **3** (8 мг), **4** (5 мг), **6** (25 мг), **7** (0.6 г), **8** (2 мг), **9** (110 мг), **10** (0.7 г), **11** (1.7 г), **12** (5 мг), **13** (15.4 г), **14** (28 мг), **15** (14 мг), никотифлорин (кемпферол 3-*O*-рутинозид, 7 мг, **17**) и рейноутрин (кверцетин 3-*O*-ксилозид, 10 мг, **18**).

Кверцетин 3-*O*-(4''-*O*-β-*D*-ксилопиранозил-6''-*O*-α-*L*-рамнопиранозил)-β-*D*-глюкопиранозид (1). C₃₂H₃₈O₂₀. УФ-спектр (MeOH, λ_{max}, нм): 256, 267, 350. HR-ESI-MS, *m/z*: 743.5211[M+H]⁺ (расч. 743.5914 для C₃₂H₃₉O₂₀ [M+H]⁺). ESI-MS, *m/z* (%): 743 [M+H]⁺ (100), 611 [(M+H)-ксилозил]⁺ (31), 597 [(M+H)-рамнозил]⁺ (2), 465 [(M+H)-ксилозил-рамнозил]⁺ (25), 303 [(M+H)-ксилозил-рамнозил-глюкозил]⁺ (17). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, DMSO-*d*₆, 298 К, δ_H, м.д.). Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, DMSO-*d*₆, 298 К, δ_C, м.д.) (Приложение 4, таблица 4.24).

Гидролиз с 2% щавелевой кислотой. Соединение (5 мг) растворяли в 5 мл 50% EtOH, приливали 5 мл 4% водного раствора щавелевой кислоты и нагревали при 100°C в течение 6 ч. После охлаждения к смеси добавляли 160 мг Ca(OH)₂, центрифугировали, супернатант подкисляли 2 мл AcOH и экстрагировали EtOAc (5 мл, ×5). Органический слой

концентрировали, сухой остаток растворяли в 50% EtOH и хроматографировали на полиамиде (КХ, 25 г, элюент EtOH 0%→70%). В результате гидролиза получено 3 мг рутина, идентифицированный по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. Водный слой после экстракции с EtOAc концентрировали досуха, сухой остаток после реакции с 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном) и восстановительного аминирования с L-триптофаном анализировали на присутствие углеводов. В продуктах распада обнаружена D-ксилоза.

Исследование фенольных соединений трех видов рода *Prunella* L. (черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная и черноголовка обыкновенная) привело к выделению 18 соединений, включая новый флавоноид **1**. С применением данных УФ-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии было установлено, что **1** представляет собой кверцетин 3-*O*-(4''-*O*-β-D-ксилопиранозил-6''-*O*-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид [336].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. В результате исследования фенольных соединений было установлено:

➤ Для видов рода *Arctostaphylos* (L.) Adans. наличие 34 соединений, для толокнянки кавказской впервые - 37 соединений. Основными по содержанию от суммы для двух видов толокнянок являлись фенологликозид - арбутин и галлотанины, флавоноиды представлены монозидами кверцетина, основной из которых кверцетин-3-О-галактозид;

➤ В сырье видов рода *Vaccinium* L. присутствие от 9 до 29 соединений основными компонентами по содержанию: для листьев брусники являлись фенологликозид - арбутин и его конъюгат 2-О-кофеил арбутин, 5-О-кофеилхинная кислота, а также флавоноиды монозиды кверцетина, главным из которых - кверцетин-3-О-галактозид; листьев черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и побегов клюквы болотной являлись 5-О-кофеилхинная кислота; флавоноиды представлены монозидами кверцетина, главным из которых для видов черники являлся кверцетин-3-О-галактозид, голубики обыкновенной - кверцетин-3-О-глюкозид и клюквы болотной - кверцетин-3-О-рутинозид;

➤ В траве видов рода *Prunella* L. - до 16 соединений доминирующим компонентом среди фенолокислот являлась розмариновая кислота, флавоноиды представлены биозидами кверцетина, основным из которых являлись кверцетин-3-О-(6"-рамнозил)-глюкозид и кверцетин-3-О-(6"-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-глюкозид.].

2. С помощью колоночной хроматографии в сочетании с современными инструментальными методами анализа были выделены и идентифицированы индивидуальные фенольные соединения:

➤ Из листьев брусники обыкновенной - 24 компонента, 7 из которых впервые для данного вида (кверцетин-3-О-ксилозид, 4,5-ди-О-кофеилхинная кислота, 6'-О-кофеил-арбутин, кверцетин-3-О-{6"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-глюкозид, кверцетин-3-О-{6"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-галактозид, кверцетин-3-О-(6"-О-ацетил)-глюкозид и кемпферол-3-О-(6"-О-ацетил)-глюкозид) и 3 новых ранее не описанных в литературе (2',6'-ди-О-кофеил-арбутин, кверцетин-3-О-{2"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозида, кверцетин-3-О-{2"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид).

➤ Из стеблей брусники обыкновенной 17 компонентов, 8 из которых впервые для данного вида [(+)-галлокатехин галлат, (-)-эпигаллокатехин галлат, (+)-катехин-3-О-рамнозид, (+)-катехин-3-О-глюкозид, процианидин В2, процианидин В4, (+)-катехин-3-О-глюкозид, процианидин В3-3-О-рамнозид] и 3 новых [(-)-эпикатехин-3-О-α-L-рамнопиранозид, (+)-катехин-3-О-{4"-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)-α-L-рамнопиранозид];

➤ Из травы видов рода *Prunella* L. - до 18 компонентов, 10 из них впервые для данного рода [2-О-кофеил-треоновая кислота, 3-О-кофеил-треоновая кислота, розмариновая кислота 3'-О-глюкозид, кверцетин-3-О-{6''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-глюкозид, литоспермовая кислота, сальвианоловая кислота А и В, кемпферол 3-О-рутинозид, кверцетин 3-О-ксилозид, астрагалин и кемпферол) и 1 новый (кверцетин 3-О-(4''-О-β-D-ксилопиранозил-6''-О-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид).

➤ Для всех новых соединений была установлена и доказана их химическая структура.

3. Исходя из данных, полученных в ходе фитохимического исследования, был определена ведущая группа БАС изучаемых объектов для последующей разработки методик стандартизации ЛРС с целью определения его качества, а также приоритетные направления фармакологических исследований.

ГЛАВА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS., *VACCINIUM* L. И *PRUNELLA* L.

Известно, что растительные полисахариды являются классом соединений с высокой биологической активностью, при этом не вызывают токсических и аллергических эффектов. Полисахариды из растительного сырья экстрагируются горячей водой (ВРПС) и смесью 0,5% растворов щавелевокислого аммония и щавелевой кислоты (ПВ). Данный класс соединений обладает противовоспалительным, иммуномодулирующим, гипохолестеринемическим, противоязвенным, противоопухолевым, дезинтоксикационным, диуретическим и другими видами активности [94, 140]. Стоит отметить, что при приготовлении отваров и водных экстрактов полисахариды являются естественными компонентами данных лекарственных форм.

5.1.1. Полисахаридный комплекс листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Для анализа брали толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской листья из различных мест естественного произрастания. Полисахаридные фракции получали в соответствии с методикой и схемой, приведенной в главе 2.

Таблица 5.1 – Суммарное содержание фракций полисахаридов ($\pm$ SD) из листьев рода *Arctostaphylos* Adans.

Вид	№ обр.	Место произрастания	Фракции, %	
			ВРПС	ПВ
Толокнянка обыкновенная	1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	0,98 $\pm$ 0,04	3,57 $\pm$ 0,15
	2	гора Малый Иремель, Челябинская область	1,20 $\pm$ 0,05	4,17 $\pm$ 0,16
	3	Турочакский район, Республика Алтай	0,87 $\pm$ 0,03	3,04 $\pm$ 0,13
	4	деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область	1,09 $\pm$ 0,04	3,28 $\pm$ 0,15
Толокнянка кавказская	1	плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, КЧР	1,13 $\pm$ 0,04	8,76 $\pm$ 0,38

Из результатов таблицы 5.1 можно сделать заключение, что содержание фракции ВРПС в толокнянки листьях колеблется от 0,9 до 1,2 %, фракции ПВ от 3,0 до 8,8 %. Наибольшим содержанием ПВ характеризовались толокнянки кавказской листья – 8,8 %.

Мономерный состав ВРПС и ПВ из толокнянки листьев

Мономерный состав полученных фракций определяли после гидролиза с использованием метода ВЭЖХ по методике, представленной в главе 2.

Таблица 5.2 – Содержание моносахаридов в процентах ($\pm$ SD) в полисахаридных фракциях, выделенных из растений рода *Arctostaphylos* Adans.

№ п/п	Мономеры	Толокнянка обыкновенная (образец №1)		Толокнянка кавказская (образец №1)	
		Содержание во фракции, %		Содержание во фракции, %	
		ВРПС	ПВ	ВРПС	ПВ
1	Арабиноза	11,63 $\pm$ 0,209	11,26 $\pm$ 0,182	10,34 $\pm$ 0,207	13,63 $\pm$ 0,215
2	Галактоза	5,08 $\pm$ 0,112	3,77 $\pm$ 0,064	3,93 $\pm$ 0,083	4,27 $\pm$ 0,127
3	Глюкоза	2,63 $\pm$ 0,047	0,52 $\pm$ 0,023	1,04 $\pm$ 0,043	0,28 $\pm$ 0,007
4	Рамноза	0,47 $\pm$ 0,014	1,10 $\pm$ 0,026	0,67 $\pm$ 0,028	1,64 $\pm$ 0,041
5	Манноза	0,19 $\pm$ 0,006	-	0,10 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,002
6	Ксилоза	0,93 $\pm$ 0,033	0,18 $\pm$ 0,005	0,48 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,004
7	Галактуроновая кислота	1,17 $\pm$ 0,037	6,44 $\pm$ 0,127	2,20 $\pm$ 0,084	8,30 $\pm$ 0,368
8	Глюкуроновая кислота	0,18 $\pm$ 0,007	0,76 $\pm$ 0,030	0,15 $\pm$ 0,004	0,54 $\pm$ 0,021

Как видно из таблицы 5.2 мономерный состав полученных фракций из листьев видов толокнянки представлен арабинозой, галактозой, глюкозой, рамнозой, маннозой, ксилозой, галактуроновой и глюкуроновыми кислотами. Для фракции ВРПС основными компонентами являлись арабиноза, галактоза и глюкоза (Приложение 5, рис. 5.1 и 5.3), для фракции ПВ – арабиноза, галактуроносовая кислота и галактоза (Приложение 5, рис. 5.2 и 5.4).

Физико-химические константы ВРПС и ПВ из толокнянки листьев

Для двух фракций полисахаридов установлены физико-химические константы, такие как средняя молекулярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, сорбционная способность (раздел 2.5). Результаты представлены в виде таблицы 5.3 (Приложение 5, табл. 5.1 и 5.2, рис. 5.5 и 5.6).

Таблица 5.3 – Физико-химические константы ВРПС и ПВ из толокнянки листьев

Вид	Фракция	Средняя молярная масса, г/моль	ИЭТ, рН	К _{распр}	Степень извлечения, %
Толокнянка кавказская (образец №1)	ВРПС	3516	3,2	0,51	65,9
	ПВ	8150	5,2	3,81	20,8
Толокнянка обыкновенная (образец №1)	ВРПС	7303	3,7	1,41	41,49
	ПВ	10916	4,7	2,40	29,4

При этом не установлено наличие поверхностной активности, то есть ВРПС и ПВ из толокнянки листьев являются поверхностно-неактивными веществами. Наибольшей молекулярной массой обладают ПВ из толокнянки кавказской листьев – 10916 г/моль, наименьшей молекулярной массой – ВРПС из толокнянки обыкновенной листьев (3516 г/моль). Но при этом ВРПС из толокнянки обыкновенной листьев наиболее эффективно экстрагируются

органическим растворителем (наименьший коэффициент распределения и наибольшая степень извлечения) (Приложение 5, рис. 5.7 и 5.8). При этом растворы полисахаридов имеют наименьшую вязкость и наименьшую растворимость при $pH < 5,5$.

Результаты определения сорбционной способности ПВ из толокнянки листьев представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Сорбционная способность ПВ из толокнянки листьев в сравнении с коммерческими энтеросорбентами

Вид	Фракция	Сорбционная способность, мг/г
Толокнянка кавказская	ПВ	443,26±16,97
Толокнянка обыкновенная		446,22±19,71
Препараты сравнения	Сорбционная способность, мг/г	
Полисорб МП	464,60±19,09	
Активированный уголь	474,80±15,44	
Неосмектин®	493,00±8,75	
Альфасорб®	408,89±12,30	

Среди коммерческих образцов наиболее выраженной сорбционной активностью обладал Неосмектин® (493 мг/г сорбента), при этом ПВ из толокнянки листьев имели схожую сорбционную способность.

5.1.2. Белковый и аминокислотный состав листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Ряд растений, содержащих большое количество белка и, как следствие, богатый набор заменимых и незаменимых аминокислот, рассматриваются в настоящее время многими учеными как субстанции, обладающие актопротекторным действием [27]. В связи, с чем актуальным является определение белкового и аминокислотного состава изучаемых образцов сырья.

Анализ аминокислотного состава образца листьев толокнянки кавказской [плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (сентябрь 2020 г.)] и толокнянки обыкновенной [Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)] включал проведение ионнообменной хроматографии с последующей дериватизацией нингидрином кислого извлечения из воздушно-сухого сырья. Рассчитано количественное содержание сырого протеина до проведения гидролиза. Обнаружено 16 аминокислот, что представлено на аминокислотной диаграмме (приложение 5, рис. 5.9 и 5.10) и в таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Содержание протеина и аминокислот в толокнянке листьях

№	Название аминокислоты	Толокнянка обыкновенная (образец №1)	Толокнянка кавказская (образец №1)
		Содержание, %	Содержание, %
1	Глутаминовая кислота (Glu)	0,64	0,70
2	Аспарагиновая кислота (Asp)	0,46	0,53
3	Лейцин (Leu)	0,48	0,48
4	Лизин (Lys)	0,38	0,40
5	Аланин (Ala)	0,36	0,30
6	Валин (Val)	0,32	0,34
7	Аргинин (Arg)	0,31	0,34
8	Глицин (Gly)	0,30	0,34
9	Пролин (Pro)	0,29	0,32
10	Фенилаланин (Phe)	0,28	0,34
11	Тирозин (Tyr)	0,26	0,29
12	Изолейцин (Ile)	0,26	0,27
13	Серин (Ser)	0,24	0,27
14	Треонин (Thr)	0,24	0,26
15	Гистидин (His)	0,13	0,15
16	Метионин (Met)	0,08	0,11
Сумма аминокислот, %		5,03	5,44
Сырой протеин, %		5,51	6,61

Таким образом, в результате исследования в толокнянке кавказской и толокнянке обыкновенной листьях установлено содержание шестнадцати аминокислот. Содержание аминокислот в листьях толокнянки обыкновенной составило 5,03 %, а в листьях толокнянки кавказской – 5,44 %. Они представлены незаменимыми аминокислотами (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, гистидин и лизин). Кроме того, присутствуют заменимые аминокислоты (аспарагиновая кислота, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, тирозин и аргинин). Исследование также показало, что содержание сырого протеина составило 5,51 % в листьях толокнянки обыкновенной и 6,61% в листьях толокнянки кавказской.

5.1.3. Элементный состав листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Наряду с различными биологически активными соединениями, содержащимися в растениях, ценными также являются и минеральные вещества. В ЛРС элементы находятся в связанной форме с органическими веществами. Большая часть работ по изучению элементного состава в растительных объектах посвящена экологическим аспектам, в которых чаще определяют содержание тяжелых металлов. Однако стоит отметить, что элементный состав ЛРС имеет значение с точки зрения медицины, так как микро- и макроэлементы в комплексе с

БАВ могут потенцировать биологическую активность или нивелировать нежелательные эффекты. К примеру, при приеме диуретических средств с мочой выводятся определенные элементы. Возможно, при приеме растительных диуретиков с большим содержанием калия с одновременным выведением элемента с мочой будет наблюдаться его восполнение [143, 144, 145].

Анализ элементного состава образца листьев толокнянки кавказской [плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (сентябрь 2020 г.)] и толокнянки обыкновенной [Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области (август 2019 г.)] проводили в соответствии с методикой, представленной в главе 2.

Таблица 5.6 – Элементный состав рода *Arctostaphylos* Adans.

№	Элемент	Толокнянка кавказская (образец №1)	Толокнянка обыкновенная (образец №1)
		Содержание мг/кг	Содержание мг/кг
1	Кальций	6050	5500
2	Калий	1650	2200
3	Магний	682	771,45
4	Фосфор	660	721,5
5	Кремний	313,5	360,75
6	Железо	110	111
7	Барий	44	44
8	Стронций	33	27,75
9	Цинк	22	16,65
10	Марганец	16,5	16,65
11	Натрий	5,5	5,5
12	Хром	4,95	5,27
13	Никель	1,65	2,48
14	Медь	1,1	1,11
15	Ванадий	0,22	0,28
16	Титан	0,175	1,6
17	Серебро	0,03	0,01
18	Молибден	0,02	0,02
19	Алюминий	-	-
20	Мышьяк	-	-
21	Свинец	-	-
22	Кадмий	-	-

Как видно из таблицы 5.6, основными по содержанию элементами для листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans. (толокнянка обыкновенная и толокнянка кавказская) являются кальций, калий, магний, фосфор, кремний и железо. Содержание тяжелых металлов было ниже предела обнаружения методики.

5.2.1. Полисахаридный комплекс сырья видов рода *Vaccinium* L.

Из образцов ЛРС видов рода *Vaccinium* L. (брусники обыкновенной листья, черники обыкновенной листья, черники кавказской листья, голубики обыкновенной листья и клюквы болотной побеги), представленных в таблице 5.7, были получены полисахаридные фракции в соответствии с методикой и схемой, приведенной в главе 2.

Из данных таблицы 5.7 содержание фракций для брусники обыкновенной листьев колебалось ВРПС от 1,6 до 1,9 %; ПВ от 2,2 до 2,6 %. В чернике обыкновенной листьях содержание фракция ВРПС колебалось от 0,9 до 1,8 %, ПВ от 0,8 до 2,1 %; в чернике кавказской ВРПС от 0,8 до 1,2 %, ПВ от 0,8 до 1,3 %; в голубике болотной листьях ВРПС от 1,2 до 1,9 %, ПВ от 1,1 % до 1,5 %; в клюкве болотной побегах ВРПС от 0,9 до 1,3 %, ПВ от 2,8 до 3,3 %.

Мономерный состав ВРПС и ПВ рода *Vaccinium* L.

Мономерный состав полученных фракций определяли после гидролиза с использованием метода ВЭЖХ по методике, представленной в главе 2.

Как видно из таблицы 5.8 и 5.9 мономерный состав полученных фракций из сырья видов рода *Vaccinium* L. представлен арабинозой, галактозой, глюкозой, рамнозой, маннозой, ксилозой, галактуроновой и глюкуроновыми кислотами. Для фракции ВРПС основными компонентами являлись арабиноза, галактоза и глюкоза, для фракции ПВ – арабиноза, галактоза и галактуроновая кислота, что отчетливо просматривается на ВЭЖХ хроматограммах листьев брусники обыкновенной (Приложение 5, рис. 5.11 и 5.12), черники обыкновенной (Приложение 5, рис. 5.16 и 5.17), черники кавказской (Приложение 5, рисунки 5.18 и 5.19), голубики обыкновенной (Приложение 5, рис. 5.26 и 5.27) и побегов клюквы болотной (Приложение 5, рис. 5.31, 5.32).

Таблица 5.7 – Суммарное содержание фракций полисахаридов ($\pm$ SD) из сырья видов рода *Vaccinium* L.

Вид	№ обр.	Место произрастания	Фракции, %	
			ВРПС	ПВ
Брусника обыкновенная	1	поселок Белая Березка, Трубчевский район. Брянская область	1,63 $\pm$ 0,07	2,21 $\pm$ 0,08
	2	ленточный бор, Павловский район, Алтайский край	1,87 $\pm$ 0,07	2,62 $\pm$ 0,12
	3	Кудымкарский район, Пермский край	1,96 $\pm$ 0,08	2,67 $\pm$ 0,11
	4	берег реки Харбас, Зольский район, КБР	1,72 $\pm$ 0,05	2,48 $\pm$ 0,11
	5	деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область	1,65 $\pm$ 0,07	2,34 $\pm$ 0,10
	6	Учинское водохранилище, Мытищинский район, Московская область	1,54 $\pm$ 0,06	2,18 $\pm$ 0,08
Черника обыкновенная	1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	1,94 $\pm$ 0,08	2,47 $\pm$ 0,11
	2	берег реки Харбас, Зольский район, КБР	1,68 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,08
	3	Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл	1,82 $\pm$ 0,08	1,93 $\pm$ 0,09
	4	окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика	1,76 $\pm$ 0,07	1,91 $\pm$ 0,06
	5	окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан	1,58 $\pm$ 0,07	1,87 $\pm$ 0,08
Черника кавказская	1	Гора Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край	0,89 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,04
	2	Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея	1,08 $\pm$ 0,05	1,19 $\pm$ 0,05
	3	Яворова поляна, окрестности поселка Гузерипль, Майкопский район, Республика Адыгея	0,78 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,03
	4	1 км западнее Партизанской поляны, бассейн реки Белой, окрестности поселка Гузерипль, Майкопский район, Республика Адыгея	1,21 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,05
	5	окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР	1,17 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,05
Голубика болотная	1	окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область	1,76 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,05
	2	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	1,88 $\pm$ 0,07	1,31 $\pm$ 0,05
	3	гора Малый Ирмель, Челябинская область	1,91 $\pm$ 0,08	1,56 $\pm$ 0,07
	4	плато Путорана, Красноярский край	1,55 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,05
	5	Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл	1,68 $\pm$ 0,07	1,25 $\pm$ 0,05
Клюква болотная	1	окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область	1,16 $\pm$ 0,05	3,25 $\pm$ 0,14
	2	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	1,02 $\pm$ 0,03	3,11 $\pm$ 0,15
	3	Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл	1,29 $\pm$ 0,06	3,32 $\pm$ 0,14
	4	Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь	0,97 $\pm$ 0,04	2,92 $\pm$ 0,11
	5	Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь	0,88 $\pm$ 0,04	2,81 $\pm$ 0,12

Таблица 5.8 – Содержание моносахаридов в процентах ($\pm$ SD) в полисахаридных фракциях, выделенных из растений рода *Vaccinium* L. (брусника обыкновенная, голубика болотная, клюква болотная)

№	Мономеры	Брусника обыкновенная (образец №1)		Голубика болотная (образец №1)		Клюква болотная (образец №1)	
		Фракции, %		Фракции, %		Фракции, %	
		ВРПС	ПВ	ВРПС	ПВ	ВРПС	ПВ
1	Арабиноза	5,80 $\pm$ 0,226	4,39 $\pm$ 0,086	4,54 $\pm$ 0,091	5,21 $\pm$ 0,162	5,94 $\pm$ 0,226	5,26 $\pm$ 0,119
2	Галактоза	5,30 $\pm$ 0,186	4,62 $\pm$ 0,079	2,72 $\pm$ 0,125	4,98 $\pm$ 0,081	5,84 $\pm$ 0,187	2,06 $\pm$ 0,049
3	Глюкоза	1,18 $\pm$ 0,047	0,40 $\pm$ 0,021	1,84 $\pm$ 0,074	5,19 $\pm$ 0,119	4,21 $\pm$ 0,173	0,84 $\pm$ 0,018
4	Рамноза	0,51 $\pm$ 0,023	0,65 $\pm$ 0,025	0,39 $\pm$ 0,012	1,08 $\pm$ 0,046	0,77 $\pm$ 0,035	1,01 $\pm$ 0,036
5	Манноза	0,24 $\pm$ 0,012	0,05 $\pm$ 0,002	0,07 $\pm$ 0,004	0,10 $\pm$ 0,003	0,12 $\pm$ 0,006	0,05 $\pm$ 0,003
6	Ксилоза	0,39 $\pm$ 0,020	0,20 $\pm$ 0,006	0,55 $\pm$ 0,024	0,61 $\pm$ 0,017	0,43 $\pm$ 0,014	0,12 $\pm$ 0,004
7	Галактуроновая кислота	0,72 $\pm$ 0,018	5,17 $\pm$ 0,118	-	6,06 $\pm$ 0,123	0,46 $\pm$ 0,018	6,92 $\pm$ 0,165
8	Глюкуроновая кислота	0,28 $\pm$ 0,013	1,05 $\pm$ 0,041	0,26 $\pm$ 0,010	1,14 $\pm$ 0,026	0,32 $\pm$ 0,013	0,97 $\pm$ 0,029

Таблица 5.9 – Содержание моносахаридов в процентах ($\pm$ SD) в полисахаридных фракциях, выделенных из растений рода *Vaccinium* L. (черника обыкновенная, черника кавказская)

№	Мономеры	Черника обыкновенная (образец №1)		Черника кавказская (образец №1)	
		Фракции, %		Фракции, %	
		ВРПС	ПВ	ВРПС	ПВ
1	Арабиноза	8,82 $\pm$ 0,185	7,08 $\pm$ 0,147	3,05 $\pm$ 0,073	3,16 $\pm$ 0,079
2	Галактоза	7,88 $\pm$ 0,110	6,18 $\pm$ 0,114	3,96 $\pm$ 0,083	4,11 $\pm$ 0,159
3	Глюкоза	1,68 $\pm$ 0,032	0,92 $\pm$ 0,030	1,34 $\pm$ 0,058	0,55 $\pm$ 0,027
4	Рамноза	0,27 $\pm$ 0,010	0,74 $\pm$ 0,017	0,28 $\pm$ 0,011	0,74 $\pm$ 0,019
5	Манноза	0,14 $\pm$ 0,004	0,07 $\pm$ 0,004	0,04 $\pm$ 0,002	0,05 $\pm$ 0,003
6	Ксилоза	0,36 $\pm$ 0,016	0,35 $\pm$ 0,014	0,46 $\pm$ 0,015	0,19 $\pm$ 0,005
7	Галактуроновая кислота	0,68 $\pm$ 0,023	2,41 $\pm$ 0,081	0,58 $\pm$ 0,019	8,35 $\pm$ 0,143
8	Глюкуроновая кислота	0,29 $\pm$ 0,009	0,34 $\pm$ 0,016	0,16 $\pm$ 0,004	0,55 $\pm$ 0,025

Физико-химические константы ВРПС и ПВ рода *Vaccinium* L.

Для двух фракций полисахаридов установлены физико-химические константы, такие как средняя молекулярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, сорбционная способность (раздел 2.5). Результаты представлены в виде таблицы 5.10 (Приложение 5, табл. 5.4 - 5.15 и рис. 5.13, 5.14, 5.20, 5.21, 5.28, 5.29, 5.33 и 5.34).

Таблица 5.10 – Физико-химические константы ВРПС и ПВ из сырья *Vaccinium* L.

Вид	Фракция	Средняя молярная масса, г/моль	ИЭТ, рН	К _{распр}	Степень извлечения, %
Брусника обыкновенная (образец №1)	ВРПС	5067	3,2	0,57	63,4
	ПВ	7393	4,7	5,55	15,2
Голубика болотная (образец №1)	ВРПС	2287	3,2	0,80	55,5
	ПВ	7226	4,2	2,11	32,1
Клюква болотная (образец №1)	ВРПС	4581	3,2	1,72	36,6
	ПВ	7486	4,2	2,90	25,6
Черника кавказская (образец №1)	ВРПС	4882	5,7	1,31	43,2
	ПВ	12280	4,2	1,50	40,0
Черника обыкновенная (образец №1)	ВРПС	5341	3,2	0,82	54,7
	ПВ	7899	4,7	2,70	27,0

При этом не установлено наличие поверхностной активности, то есть ВРПС и ПВ из сырья видов рода *Vaccinium* L. являются поверхностно-неактивными веществами. Наибольшей молекулярной массой обладают ПВ из черники кавказской листьев – 12280 г/моль, наименьшей молекулярной массой – ВРПС из голубики обыкновенной листьев (2287 г/моль). При этом ВРПС из брусники обыкновенной листьев наиболее эффективно экстрагируются органическим растворителем (наименьший коэффициент распределения и наибольшая степень извлечения). При этом растворы полисахаридов имеют наименьшую вязкость и наименьшую растворимость при рН<5,5.

Результаты определения сорбционной способности ПВ из сырья *Vaccinium* L. представлены в таблице 5.11.

Таблица 5.11 – Сорбционная способность ПВ из сырья *Vaccinium* L. в сравнении с коммерческими энтеросорбентами

Вид	Фракция	Сорбционная способность, мг/г
Брусника обыкновенная	ПВ	448,01±15,31
Голубика болотная		443,09±11,70
Клюква болотная		452,16±11,30
Черника кавказская		451,78±10,77
Черника обыкновенная		444,03±19,53
Препараты сравнения	Сорбционная способность, мг/г	
Полисорб МП	464,60±19,09	
Активированный уголь	474,80±15,44	
Неосмектин®	493,00±8,75	
Альфасорб®	408,89±12,30	

Среди коммерческих образцов наиболее выраженной сорбционной активностью обладал Неосмектин® (493 мг/г сорбента), при этом ПВ из сырья видов рода *Vaccinium* L. имели схожую сорбционную способность.

5.2.2. Белковый и аминокислотный состав побегов и листьев видов рода *Vaccinium* L.

Анализ аминокислотного состава образцов ЛРС видов *Vaccinium* L. (брусники обыкновенной листья, черники обыкновенной листья, черники кавказской листья, голубики обыкновенной листья и клюквы болотной побеги) включал проведение ионнообменной хроматографии с последующей дериватизацией нингидрином кислого извлечения из воздушно-сухого сырья. Рассчитано количественное содержание сырого протеина до проведения гидролиза. Обнаружено 16 аминокислот, что представлено на аминокраммах (приложение 5, рис. 5.15, 5.24, 5.25, 5.30 и 5.35) и в таблицы 5.13.

Как видно из данных, приведённых в таблице 5.13, основными аминокислотами для сырья видов рода *Vaccinium* L. являются глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, лизин, аланин, валин, аргинин и глицин. Сумма аминокислот для анализируемых видов рода колебалась от 5,5 до 8,4%, содержание сырого протеина от 6,4 до 9,2 %. Наименьшее содержание накапливалось в клюкве болотной побегах, максимальное в чернике обыкновенной листьях.

Таблица 5.13 – Содержание протеина и аминокислот в сырье видов рода *Vaccinium* L.

№	Наименование показателей, единицы измерений	Брусника обыкновенная (образец №1)	Черника обыкновенная (образец №1)	Черника кавказская (образец №1)	Голубика болотная (образец №1)	Клюква болотная (образец №1)
		Содержание, %	Содержание, %	Содержание, %	Содержание, %	Содержание, %
1	Глутаминовая кислота (Glu)	0,76	1,10	1,32	0,94	0,72
2	Аспарагиновая кислота (Asp)	0,56	0,82	0,59	0,68	0,52
3	Лейцин (Leu)	0,55	0,85	0,44	0,71	0,54
4	Лизин (Lys)	0,40	0,60	0,22	0,51	0,40
5	Аланин (Ala)	0,37	0,56	0,30	0,47	0,37
6	Валин (Val)	0,37	0,56	0,31	0,48	0,35
7	Аргинин (Arg)	0,33	0,48	0,61	0,43	0,33
8	Глицин (Gly)	0,34	0,50	0,35	0,42	0,33
9	Пролин (Pro)	0,27	0,43	0,25	0,36	0,29
10	Фенилаланин (Phe)	0,32	0,51	0,28	0,43	0,32
11	Тирозин (Tyr)	0,29	0,37	0,24	0,32	0,26
12	Серин (Ser)	0,28	0,43	0,25	0,35	0,28
13	Изолейцин (Ile)	0,29	0,43	0,22	0,37	0,28
14	Треонин (Thr)	0,28	0,42	0,18	0,35	0,26
15	Гистидин (His)	0,14	0,21	0,15	0,17	0,14
16	Метионин (Met)	0,09	0,14	0,14	0,11	0,08
Сумма аминокислот		5,64	8,41	5,85	7,10	5,47
Сырой протеин, %		5,90	9,21	7,11	7,97	6,39

5.2.3. Элементный состав побегов и листьев видов рода *Vaccinium* L.

Результаты анализа элементного состава видов рода *Vaccinium* L. (брусники обыкновенной листья, черники обыкновенной листья, черники кавказской листья, голубики обыкновенной листья и клюквы болотной побеги) представлены в таблице 5.14. Анализ был проведен в соответствии с методикой, приведенной в главе 2.

В результате анализа для всех анализируемых видов основными по содержанию элементами являлись: калий, кальций, магний, фосфор, кремний и железо. Содержание тяжелых металлов в анализируемых образцах не превышало требованиям ОФС.1.2.2.2.0012.15 в ГФ РФ 14 издания.

5.3.1. Полисахаридный комплекс травы видов рода *Prunella* L.

Из образцов ЛРС видов рода *Prunella* L. (черноголовки обыкновенной трава, черноголовки крупноцветковой трава, черноголовки разрезной трава) представленных в таблице 5.15, были получены полисахаридные фракции в соответствии с методикой и схемой, приведенной в главе 2.

Мономерный состав полученных фракций определяли после гидролиза с использованием метода ТСХ по методике, представленной в главе 2.

Из данных таблицы 5.15 содержание фракций для черноголовки обыкновенной травы колебалось от 9,5 до 13,9 % (ВРПС), от 9,0 до 15,0 % (ПВ); для черноголовки крупноцветковой травы колебалось от 8,5 до 11,4 % (ВРПС), от 11,5 до 15,3 % (ПВ); для черноголовки разрезной травы колебалось от 8,5 до 11,4 % (ВРПС), от 10,5 до 13,6 % (ПВ). Как видно из таблицы 5.16 мономерный состав ВРПС из сырья видов рода *Prunella* L. представлен арабинозой, галактозой, глюкозой, рамнозой, ксилозой и галактуроновой кислотой; ПВ содержат арабинозу, галактозу, рамнозу, ксилозу и галактуроновую кислоту. Для фракции ВРПС основными компонентами являлись ксилоза, галактоза и арабиноза; для фракции ПВ – галактоза, арабиноза и галактуроновая кислота.

Таблица 5.14– Элементный состав сырья видов рода *Vaccinium* L.

п/п	Элемент	Брусника обыкновенная (образец №1)	Черника обыкновенная (образец №1)	Черника кавказская (образец №1)	Голубика болотная (образец №1)	Клюква болотная (образец №1)
		Содержание мг/кг	Содержание мг/кг	Содержание мг/кг	Содержание мг/кг	Содержание мг/кг
1	Кальций	8520	526,8	3421	1703	42,13
2	Калий	1420	1703	933	524	42,13
3	Магний	852	2195	1555	393	5,31
4	Фосфор	852	219,5	404,3	117,9	3,54
5	Кремний	170	403,9	295,4	28,03	938,21
6	Железо	56,8	263,4	202,2	13,1	7,08
7	Барий	42,6	8,79	9,33	2,62	-
8	Стронций	14,2	-	-	2,62	3,54
9	Цинк	8,5	4,39	4,67	6,55	1,06
10	Марганец	1420	17,6	9,33	79,91	-
11	Натрий	284	153,6	15,55	2,62	-
12	Хром	-	0,88	0,62	0,52	2,83
13	Никель	-	-	-	0,26	-
14	Медь	2,8	4,17	2,49	0,65	2,12
15	Ванадий	-	0,13	0,93	1,18	0,14
16	Титан	0,05	-	-	0,79	0,35
17	Бор	-	-	-	2,45	-
18	Серебро	-	2,2	0,015	0,005	0,01
19	Литий	-	-	-	0,13	-
20	Молибден	0,08	1,31	0,01	0,004	0,02
21	Алюминий	-	-	-	0,92	-
22	Мышьяк	2,84	0,44	0,31	0,65	1,42
23	Свинец	0,08	-	-	-	-
24	Кадмий	0,03	-	-	-	-

Таблица 5.15 – Суммарное содержание фракций полисахаридов ($\pm$ SD) из травы рода *Prunella* L.

Вид	№ обр.	Место произрастания	Фракции, %	
			ВРПС	ПВ
Черноголовка обыкновенная	1	Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области	9,51 $\pm$ 0,32	9,05 $\pm$ 0,36
	2	берег реки Харбас, Зольский район, КБР	11,24 $\pm$ 0,55	10,53 $\pm$ 0,39
	3	перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР	12,73 $\pm$ 0,30	11,93 $\pm$ 0,48
	4	окрестности озера Кара-Кель, г. Теберда, Карачаевский район, КЧР	10,57 $\pm$ 0,51	9,79 $\pm$ 0,39
	5	юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край	13,93 $\pm$ 0,58	12,69 $\pm$ 0,51
Черноголовка крупноцветковая	1	перевал Гумбаши, Карачаевский городской округ, КЧР	8,55 $\pm$ 0,17	14,89 $\pm$ 0,47
	2	сосновый лес по дороге на Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край	10,09 $\pm$ 0,45	15,13 $\pm$ 0,73
	3	окрестности горной вершины Красивый Курган, Малокарачаевский район, КЧР	7,95 $\pm$ 0,32	11,50 $\pm$ 0,51
	4	окрестности горы Кабан, городской округ Кисловодск, Ставропольский край	9,32 $\pm$ 0,43	13,70 $\pm$ 0,58
	5	окрестности горы 1-я Джуца, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край	11,40 $\pm$ 0,37	15,33 $\pm$ 0,55
Черноголовка разрезная	1	юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край	8,56 $\pm$ 0,35	10,55 $\pm$ 0,44
	2	окрестности горы Дубровка, городской округ Пятигорск, Ставропольский край	11,45 $\pm$ 0,49	13,65 $\pm$ 0,57
	3	окрестности горы Лысой, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край	9,97 $\pm$ 0,38	11,29 $\pm$ 0,46
	4	окрестности горы 1-я Джуца, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край	10,73 $\pm$ 0,44	12,95 $\pm$ 0,48
	5	юго-восточные окрестности горы Бештау, Ставропольский край	9,55 $\pm$ 0,19	12,55 $\pm$ 0,30

Таблица 5.16– Содержание моносахаридов в процентах (метод ТСХ, %) в полисахаридных фракциях, выделенных из растений рода *Prunella* L.

№	Мономеры	Черноголовка обыкновенная (образец №1)		Черноголовка крупноцветковая (образец №1)		Черноголовка разрезная (образец №1)	
		Фракции, %		Фракции, %		Фракции, %	
		ВРПС	ПВ	ВРПС	ПВ	ВРПС	ПВ
1	Арабиноза	5,35±0,230	2,82±0,136	5,81±0,169	2,43±0,117	5,76±0,273	2,88±0,089
2	Галактоза	6,52±0,282	3,60±0,111	6,24±0,206	4,09±0,198	6,44±0,199	3,91±0,165
3	Глюкоза	0,91±0,037	-	0,30±0,012	-	1,21±0,051	-
4	Ксилоза	9,35±0,395	0,61±0,025	8,76±0,080	0,41±0,019	9,60±0,469	0,30±0,013
5	Рамноза	0,20±0,007	0,11±0,003	0,10±0,003	0,10±0,004	0,20±0,008	0,11±0,004
6	Галактуроновая кислота	3,82±0,112	89,27±1,474	4,16±0,039	90,27±3,617	3,63±0,169	89,42±2,691

Физико-химические константы ВРПС и ПВ из травы видов рода *Prunella* L.

Для двух фракций полисахаридов установлены физико-химические константы, такие как средняя молекулярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, сорбционная способность (раздел 2.5). Результаты представлены в таблице 5.17 (Приложение 5, табл. 5.16 – 5.18, рисунки 5.36– 5.38, 5.39 – 5.41).

Таблица 5.17 – Физико-химические константы ВРПС и ПВ из травы видов рода *Prunella* L.

Вид	Фракция	Средняя молярная масса, г/моль	ИЭТ, рН	К _{распр}	Степень извлечения, %
Черноголовка крупноцветковая (образец №1)	ВРПС	16110	3,7	2,94	25,4
	ПВ	22331	5,2	4,22	19,2
Черноголовка обыкновенная (образец №1)	ВРПС	21200	3,7	2,82	26,3
	ПВ	18371	5,2	1,26	44,5
Черноголовка разрезная (образец №1)	ВРПС	30493	4,2	0,95	51,7
	ПВ	25607	4,7	8,25	10,8

При этом не установлено наличие поверхностной активности, то есть ВРПС и ПВ из травы видов черноголовки являются поверхностно-неактивными веществами. Наибольшей молекулярной массой обладают ВРПС из черноголовки разрезной травы – 30493 г/моль, наименьшей молекулярной массой – ВРПС из черноголовки крупноцветковой травы (16110 г/моль). При этом ВРПС из черноголовки разрезной травы листьев наиболее эффективно экстрагируются органическим растворителем (наименьший коэффициент распределения и наибольшая степень извлечения). При этом растворы полисахаридов имеют наименьшую вязкость и наименьшую растворимость при рН<5,5 [157].

Результаты определения сорбционной способности ПВ из травы видов рода *Prunella* L. представлены в таблице 5.18.

Таблица 5.18 – Сорбционная способность ПВ из травы видов рода *Prunella* L. в сравнении с коммерческими энтеросорбентами

Вид	Фракция	Сорбционная способность, мг/г
Черноголовка крупноцветковая	ПВ	449,15±8,11
Черноголовка обыкновенная		444,16±18,22
Черноголовка разрезная		446,50±9,55
Препараты сравнения	Сорбционная способность, мг/г	
Полисорб МП	464,60±19,09	
Активированный уголь	474,80±15,44	
Неосмектин®	493,00±8,75	
Альфасорб®	408,89±12,30	

Среди коммерческих образцов наиболее выраженной сорбционной активностью обладал Неосмектин® (493 мг/г сорбента), при этом ПВ из травы видов черноголовки имели схожую сорбционную способность.

5.3.2. Белковый и аминокислотный состав травы видов рода *Prunella* L.

Анализ аминокислотного состава образцов сырья видов рода *Prunella* L. включал проведение ионнообменной хроматографии с последующей дериватизацией нингидрином кислого извлечения [143, 144, 145]. Рассчитано количественное содержание сырого протеина до проведения гидролиза. Обнаружено 16 аминокислот, что представлено на аминокраммах (приложение 5, рис. 5.42-5.44) и в таблице 5.19.

Таблица 5.19 – Белковый и аминокислотный состав травы видов рода *Prunella* L.

№	Название аминокислоты	Черноголовка обыкновенная (образец №1)	Черноголовка крупноцветковая (образец №1)	Черноголовка разрезная (образец №1)
		Содержание, %	Содержание, %	Содержание, %
1	Глутаминовая кислота (Glu)	0,80	0,65	0,75
2	Аспарагиновая кислота (Asp)	0,74	0,56	0,84
3	Лейцин (Leu)	0,50	0,41	0,43
4	Пролин (Pro)	0,39	0,37	0,34
4	Аланин (Ala)	0,36	0,31	0,35
5	Глицин (Gly)	0,33	0,29	0,35
6	Серин (Ser)	0,32	0,25	0,32
7	Аргинин (Arg)	0,31	0,28	0,32
8	Лизин (Lys)	0,31	0,25	0,28
9	Треонин (Thr)	0,29	0,22	0,28
10	Валин (Val)	0,28	0,28	0,29
11	Фенилаланин (Phe)	0,27	0,23	0,27
12	Гистидин (His)	0,24	0,19	0,21
13	Изолейцин (Ile)	0,19	0,21	0,23
14	Тирозин (Tyr)	0,17	0,15	0,25
15	Метионин (Met)	0,05	0,04	0,05
Сумма аминокислот, %		5,56	4,70	5,57
Сырой протеин, %		6,90	4,96	6,82

Как видно из данных, приведённых в таблице 5.19 основными аминокислотами для сырья видов рода *Prunella* L. являются глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, пролин, аланин, глицин и серин. Сумма аминокислот для анализируемых видов рода колебалась от 5,5 до 8,4%, содержание сырого протеина - от 6,4 до 9,2%.

5.3.3. Элементный состав травы видов рода *Prunella* L.

Результаты анализа элементного состава видов рода *Prunella* L. (черноголовки обыкновенной трава, черноголовки крупноцветковой трава, черноголовки разрезной трава) представлены в таблице 5.20. Анализ был проведен в соответствии с методикой, приведенной в главе 2.

Таблица 5.20 – Элементный состав травы видов рода *Prunella* L.

№	Элемент	Черноголовка обыкновенная (образец №1)	Черноголовка крупноцветковая (образец №1)	Черноголовка разрезная (образец №1)
		Содержание, мг/кг	Содержание, мг/кг	Содержание, мг/кг
1	Калий	2154	2064	2037
2	Кальций	1436	1376	1358
3	Кремний	215,4	344	203,7
4	Магний	215,4	206,4	203,7
5	Фосфор	143,6	137,6	136
6	Алюминий	71,8	68,8	68
7	Натрий	71,8	68,8	68
8	Железо	21,5	34,4	20
9	Барий	7,2	3,4	1,4
10	Марганец	4,3	6,9	3,4
11	Стронций	3,6	4,1	4,1
12	Титан	2,2	3,44	2,0
13	Цинк	1,1	1,03	1,0
14	Бор	1,1	1,37	1,0
15	Медь	0,43	0,41	0,50
16	Молибден	0,014	0,041	0,020
17	Хром	0,072	0,069	0,068
18	Литий	0,072	0,137	0,068
19	Свинец	0,072	0,206	0,068
20	Никель	0,072	0,069	0,068
21	Цирконий	0,058	0,055	0,068
22	Ванадий	0,036	0,034	0,041
23	Галлий	0,022	0,021	0,014
24	Кобальт	0,014	0,020	0,020
25	Бериллий	0,0036	0,0034	0,0034
26	Серебро	0,00072	0,00069	0,00068
27	Кадмий	-	-	-
28	Олово	-	-	-

В результате анализа установлено, что в траве всех видов черноголовки основными по содержанию элементами являлись: калий, кальций, кремний, магний и фосфор. Анализируемые образцы не превышали допустимые концентрации тяжелых металлов, соответствуя при этом требованиям ОФС.1.2.2.2.0012.15 в ГФ РФ XIV изд.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

В результате комплексного фитохимического исследования были:

1. Выделены полисахариды:

➤ В листьях видов рода *Arctostaphylos* Adans., которые представлены фракциями ВРПС, их содержание колебалось от 0,9 до 1,2 %, и ПВ - от 3,0 до 8,8 %. Во фракции ВРПС основными мономерными компонентами являлись арабиноза, галактоза и глюкоза, во фракции ПВ – арабиноза, галактуроновая кислота и галактоза;

➤ В сырье видов рода *Vaccinium* L. полисахариды представлены фракциями ВРПС и ПВ, содержание ВРПС для брусники обыкновенной листьев колебалось от 1,6 до 1,9 %; ПВ - от 2,2 до 2,6 %. В чернике обыкновенной листьях содержание фракция ВРПС колебалось от 0,9 до 1,8 %, ПВ - от 0,8 до 2,1 %; в чернике кавказской ВРПС от 0,8 до 1,2 %, ПВ - от 0,8 до 1,3 %; в голубике болотной листьях ВРПС от 1,2 до 1,9 %, ПВ - от 1,1 до 1,5 %; в клюкве болотной побегах ВРПС от 0,9 до 1,3 %, ПВ - от 2,8 до 3,3 %. Мономерный состав полученных фракций из сырья видов рода *Vaccinium* L. представлен арабинозой, галактозой, глюкозой, рамнозой, маннозой, ксилозой, галактуроновой и глюкуроновой кислотами. Для фракции ВРПС основными компонентами являлись арабиноза, галактоза и глюкоза, для фракции ПВ – арабиноза, галактоза и галактуроновая кислота;

➤ В траве видов рода *Prunella* L. полисахариды представлены фракциями ВРПС и ПВ, их содержание для черноголовки обыкновенной травы колебалось - от 9,5 до 13,9 % (ВРПС), от 9,0 до 15,0 % (ПВ); для черноголовки крупноцветковой травы колебалось от 8,5 до 11,4 % (ВРПС), от 11,5 до 15,3 % (ПВ); для черноголовки разрезной травы колебалось от 8,5 до 11,4 % (ВРПС), от 10,5 до 13,6 % (ПВ). Мономерный состав ВРПС из сырья видов рода *Prunella* L. представлен арабинозой, галактозой, глюкозой, рамнозой, ксилозой и галактуроновой кислотой; ПВ содержат арабинозу, галактозу, рамнозу, ксилозу и галактуроновою кислоту. Для фракции ВРПС основными компонентами являлись ксилоза, галактоза и арабиноза; для фракции ПВ – галактоза, арабиноза и галактуроновая кислота;

➤ Для фракций полисахаридов видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. установлены физико-химические константы, такие как средняя молекулярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, сорбционная способность. Полученные результаты будут учтены при разработке лекарственной формы.

2. Выделены белки и их компоненты:

➤ В листьях видов рода *Arctostaphylos* Adans. установлено наличие 16 аминокислот. Содержание аминокислот в листьях толокнянки обыкновенной составило 5,03 %, а в листьях толокнянки кавказской – 5,44 %, они представлены незаменимыми аминокислотами (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, гистидин, лизин); и заменимыми

аминокислотами (аспарагиновая кислота, серин, глютаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, тирозин, аргинин). Исследование также показало, что содержание сырого протеина составило 5,51 % в листьях толокнянки обыкновенной и 6,61 % в листьях толокнянки кавказской.

➤ В ЛРС видов рода *Vaccinium* L. установлено наличие 16 аминокислот. Доминирующими по содержанию аминокислотами являлись глютаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, лизин, аланин, валин, аргинин и глицин. Сумма аминокислот для анализируемых видов рода колебалась от 5,5 до 8,4 %, содержание сырого протеина от 6,4 до 9,2 %. Наименьшее содержание накапливалось в клюкве болотной побегах, максимальное - в чернике обыкновенной листьях;

➤ В траве видов рода *Prunella* L. установлено наличие 16 аминокислот. Основными по содержанию аминокислотами являлись глютаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, пролин, аланин, глицин и серин. Сумма аминокислот для анализируемых видов рода колебалась от 5,5 до 8,4 %, содержание сырого протеина - от 6,4 до 9,2 %. Наименьшее содержание накапливалось в траве черноголовки крупноцветковой, максимальное - в траве черноголовки обыкновенной.

3. Изучен элементный состав: Для листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans. доминирующими элементами по содержанию являлись кальций, калий, магний, фосфор, кремний и железо; для видов рода *Vaccinium* L. установлено содержание доминирующих по содержанию элементов: калий, кальций, магний, фосфор, кремний и железо. В траве видов рода *Prunella* L. для всех видов черноголовки основными по содержанию элементами являлись: калий, кальций, кремний, магний и фосфор.

Содержание тяжелых металлов в анализируемых образцах не превышало предельно допустимых концентраций согласно требованиям ОФС.1.2.2.2.0012.15 в ГФ РФ 14 изд.

4. Полученные данные, позволяют прогнозировать приоритетные направления фармакологических исследований.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛЯ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДА *ARCTOSPHYLOS* ADANS., *VACCINIUM* L. И *PRUNELLA* L.

Одним из основных показателей качества ЛРС, в разделе «Испытания», в современной фармакопейной практике является количественное содержание основного класса БАВ, а также его доминирующего компонентов. Именно основной класс БАВ и его представители являются определяющими в терапевтической активности ЛРП. Для рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. основным классом, отвечающим за терапевтическое действие, являются фенольные соединения.

6.1. Выбор стандартного образца

Нами разработан следующий алгоритм стандартизации нового и фармакопейного лекарственного растительного сырья, представленный на рисунке 6.1.



Рисунок 6.1 – Алгоритм при разработке методик количественного определения БАВ в ЛРС

Таким образом, предложен предварительный анализ фенольных соединений растительного сырья для выбора маркерного соединения (для рода или вида, который может быть при этом и доминирующий по количественному содержанию среди остальных фенольных соединений) или доминирующего компонента (основное соединение по количественному содержанию или отвечающее за основной вид фармакологической активности, а также для выбора СО – представителя группы БАВ при разработке методики количественного

определения в ЛРС и ЛРП). Результаты анализа фенольных соединений исследуемых видов представлены в главе 4.

Также предложено использование метода спектрофотометрии для расчета количественного содержания суммы фенольных соединений в пересчете на фенологликозид, простой фенол или фенолокислоту. Кроме того, предложено разрабатывать методику количественного определения суммы флавоноидов, в основе которой – реакция образования окрашенных комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом.

Кроме суммы фенольных соединений или флавоноидов, нами предлагается использовать сепарационные методы анализа – капиллярный электрофорез (КЭ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) – для расчета количественного содержания маркерного и/или доминирующего соединения.

6.2. Стандартизация сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans.

6.2.1. Толокнянки листья

Сырье толокнянки обыкновенной, предлагаемое для стандартизации в Государственной фармакопее СССР XI издания, содержание арбутина данного сырья рекомендовалось определять методом йодометрического титрования, аналогично листьям брусники [32]. В ГФ РФ XIV издания был введен новый метод анализа после очистки водно-спиртового извлечения листьев спиртом этиловым 70%, а именно метод прямой спектрофотометрии, осуществляемый на алюминиевом оксиде для удаления фенольных соединений, которые сопутствуют данному сырью [31]. Кроме того, в данное исследование также был включен образец листьев толокнянки кавказской для представления флоры Северного Кавказа.

Нами разработаны и валидированы методики количественного определения арбутина, как основного фенологликозида, методом капиллярного электрофореза с подтверждением его результатов методом ВЭЖХ [153], суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид методом прямой спектрофотометрии и гиперозида как основного флавоноида методом капиллярного электрофореза [153].

Извлечение из ЛРС получали согласно методике ФС.2.5.0099.18. Проводили анализ количественного содержания арбутина извлечений из образцов сырья (раздел 2.1) после очистки аликвоты этих извлечений на оксиде алюминия согласно фармакопейной методике методом УФ-спектрофотометрии. Спектры извлечений представлены на рисунке 6.2. Спектр СО арбутина представлен на рисунке 6.3.

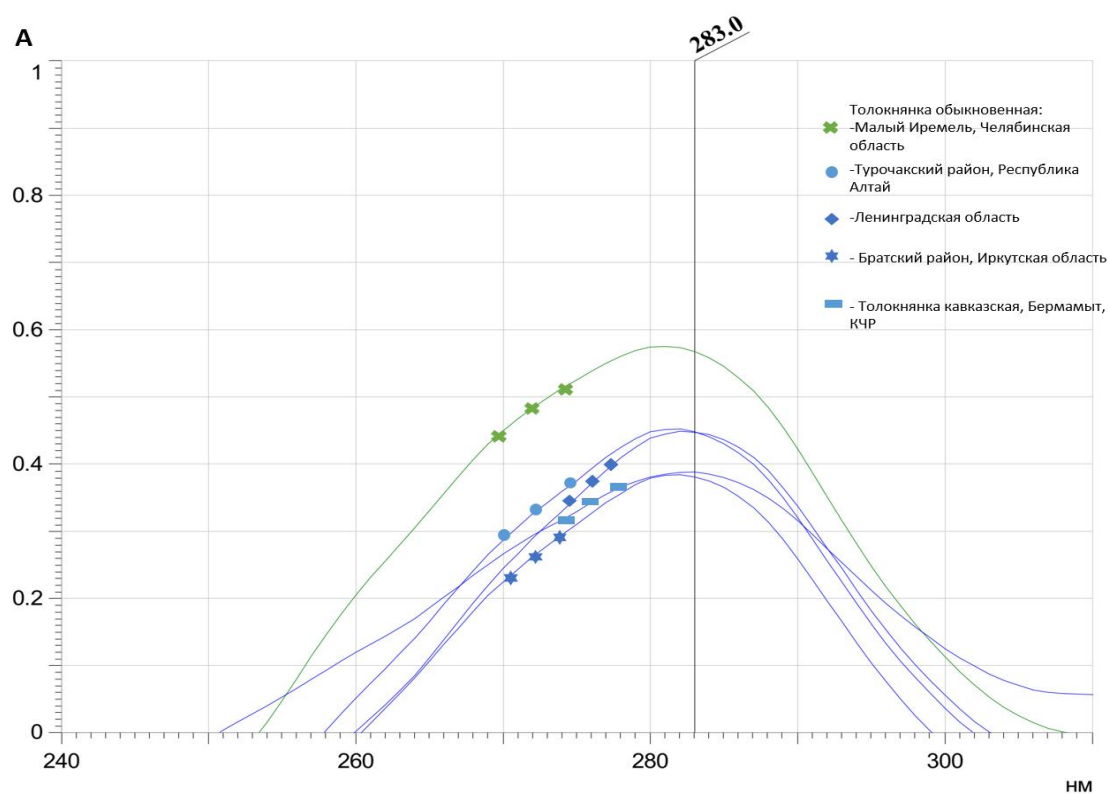


Рисунок 6.2 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из листьев толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской

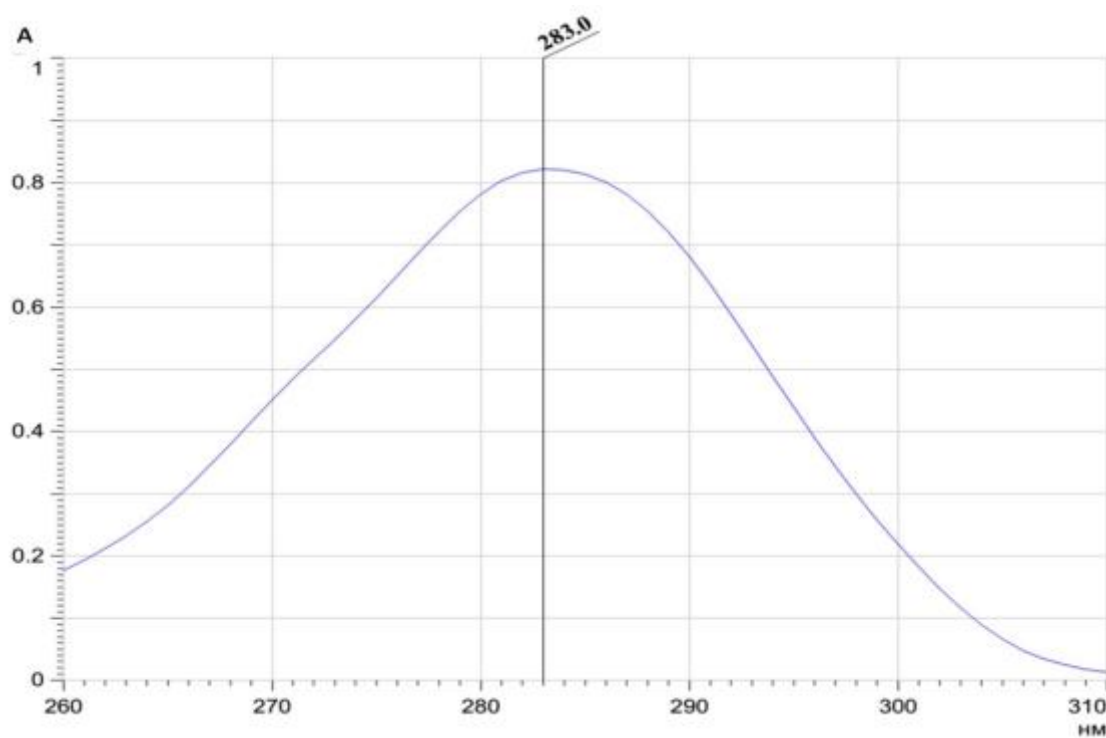


Рисунок 6.3 – УФ-спектр СО арбутина (0,1 мг/мл)

Результаты расчета количественного содержания арбутина в анализируемых образцах представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Количественное содержание арбутина в толокнянки обыкновенной листьях, установленное методом УФ-спектрофотометрии

Регион заготовки	n	f	$\bar{X}$	S_x	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	Δx	$\varepsilon, \%$
<i>Толокнянки обыкновенной листья</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	10,88	0,3116	0,1799	2,57	0,46	4,25
Гора Малый Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	13,60	0,2543	0,1468	2,57	0,38	2,78
Турочакский район, Республика Алтай (сентябрь 2019 г.)	6	5	10,84	0,1800	0,1039	2,57	0,27	2,46
Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	9,44	0,2544	0,1469	2,57	0,38	4,00
<i>Толокнянки кавказской листья</i>								
Плато Бермамыт, КЧР (сентябрь 2020 г.)	6	5	8,43	0,2112	0,1219	2,57	0,31	3,72

Аналогично химическому составу листьев брусники в листьях толокнянки методом спектрофотометрии устанавливается содержание суммы фенологликозидов, так как на алюминия оксиде происходит очистка от прочих фенольных соединений, таких как флавоноиды, фенилпропаноиды. Поэтому наряду со спектрофотометрическим анализом разработана методика анализа содержания арбутина как индивидуального компонента. Ранее Рознятовская А.А. и др. проводили анализ листьев брусники и толокнянки методом КЭ, но в качестве испытуемого раствора было водное извлечение (согласно ГФ СССР XI издания) [88].

Были подобраны условия электрофоретического анализа арбутина: pH буферного раствора (диапазон значений pH обусловлен значением константы ионизации арбутина, равной 10,1), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.2) (Приложение 6, рис. 6.1-6.3). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91].

Таблица 6.2 – Результаты выбора оптимальных условий количественного определения арбутина методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
pH 9,2	355	25 мМ	191	+10 кВ	58,7
pH 9,4	252	50 мМ	-	+15 кВ	37
pH 9,6	342			+25 кВ	33
pH 9,8	146				
pH 10,0	Нет разделения				

Примечание: ТТТ – тысяч теоретических тарелок; мМ – миллимолярный раствор; кВ – киловольт; - – нет разделения

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из толокнянки листьев являются: 10 мМ боратный буферный раствор с рН 9,6, напряжение в капилляре +20 кВ. Отличия в эффективности разделения арбутина в буферном растворе с рН 9,6 и рН 9,2 незначительны, поэтому выбран буферный раствор с рН 9,6 в виду большей степени ионизации арбутина как аниона [3].

Также сравнили профили извлечений без и после очистки на алюминия оксиде (рис. 6.4).

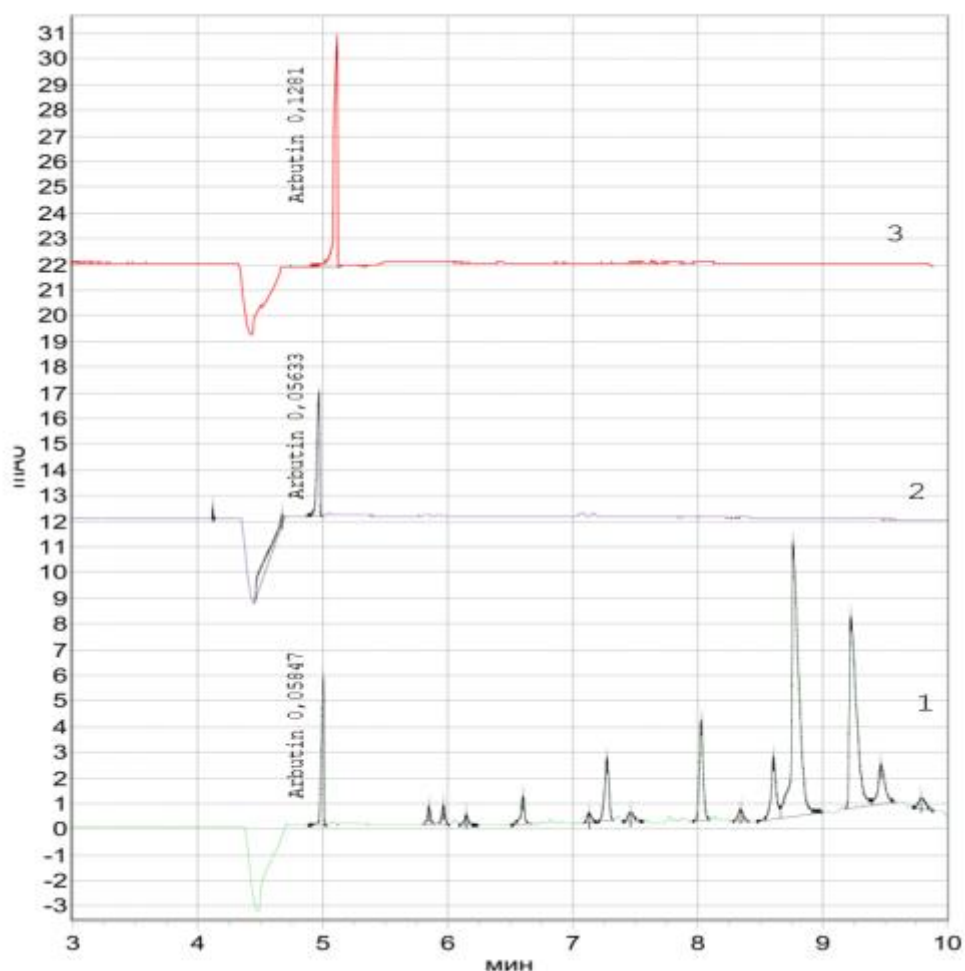


Рисунок 6.4 – Электрофореграммы: 1 – неочищенного водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70 %) из толокнянки обыкновенной листьев (Ленинградская область); 2 – очищенного водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70 %) из толокнянки обыкновенной листьев (Ленинградская область); 3 – раствора СО арбутина.

Концентрация в мг/мл.

В условиях, которые мы подобрали, мы обнаружили, что площадь пика и содержание арбутина в извлечениях оставались неизменными, как до, так и после очистки. Поэтому при проведении анализа с использованием метода капиллярного электрофореза нет необходимости проводить элюирование аликвоты извлечения из листьев толокнянки обыкновенной в колонке, содержащей алюминий оксид.

Таким образом, предлагается следующая методика анализа содержания арбутина в листьях толокнянки: 0,5 г сырья (точная навеска) с размером частиц 1 мм, после чего проводится экстрагирование с использованием 100 мл этилового спирта с содержанием 70 %. Колбу с навеской и экстрагентом взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Затем, полученную смесь помещают на кипящую водяную баню с обратным холодильником и поддерживают ее на протяжении 45 минут. После извлечения смесь охлаждают, затем выполняется взвешивание колбы и, при необходимости, путем добавления 70 % этилового спирта достигается исходная масса. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70 %, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. Затем аликвоту объемом 3 мл полученного фильтрата вносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 70 %, перемешивают. Затем, один миллилитр извлечения подвергается центрифугированию со скоростью 8000 оборотов в минуту в течение пяти минут, после чего производится анализ в соответствии с выбранными условиями.

Содержание арбутина в толокнянки листьях в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывают по уравнению 1:

$$C, \% = \frac{C_{\text{мг/мл}} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)} \quad (1),$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ - концентрация арбутина в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рисунок 6.5);

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Для расчета концентрации арбутина в извлечении нами построен график зависимости концентрации в мг/мл от площади пика арбутина при анализе серии разведений СО арбутина в спирте этиловом 70% (0,083-0,01 мг/мл) (рис. 6.5).

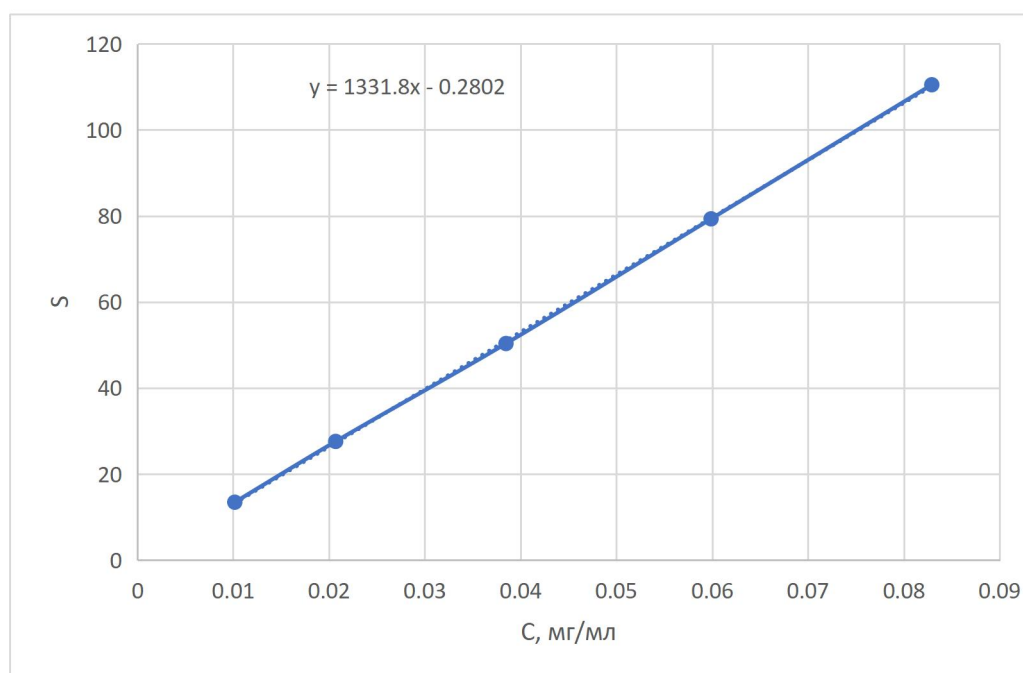


Рисунок 6.5 – Калибровочный график линейной зависимости площади пика СО арбутина от его концентрации в растворе

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрिलाбораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.3).

Специфичность методики подтверждали по совпадению времени миграции и характеру пика арбутина в извлечении из толокнянки обыкновенной листьев и в растворе СО арбутина (рис. 6.4).

Таблица 6.3 – Валидационные параметры методики анализа арбутина в толокнянке обыкновенной листьях

Параметр	Количественное определение арбутина	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 1331,8x - 0,2802$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon (\%) = 4,25$	$\varepsilon (\%) \leq 5\%$
внутрिलाбораторная прецизионность	$RSD(\%) = 2,42 - 3,06$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$1,18 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской листьев (табл. 6.4) (Приложение 6, рис.6.4).

Таблица 6.4 – Содержание арбутина в толокнянке листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом капиллярного электрофореза

Регион заготовки	n	f	$\bar{X}$	S_x	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	Δx	$\varepsilon, \%$
<i>Толокнянки обыкновенной листья</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	8,84	0,2533	0,1462	2,57	0,38	4,25
Гора Малый Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	8,44	0,2261	0,1305	2,57	0,34	3,97
Турочакский район, Республика Алтай (сентябрь 2019 г.)	6	5	8,65	0,2645	0,1527	2,57	0,39	4,54
Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	6,87	0,1659	0,0958	2,57	0,25	3,58
<i>Толокнянки кавказской листья</i>								
Плато Бермамыт, КЧР (сентябрь 2020 г.)	6	5	6,01	0,1787	0,1032	2,57	0,27	4,41

При сравнительном анализе результатов содержания арбутина, полученных методами СФ и КЭ, установлено, что результаты спектрофотометрического анализа выше в среднем на 25 %, что связано с вкладом сопутствующих фенольных соединений в светопоглощение испытуемого раствора. Отличия в соотношении суммарного содержания фенологликозидов и компонента арбутина связано, вероятно, со временем сбора сырья – до цветения и после плодоношения. При этом в образце листьев толокнянки кавказской установлено наименьшее содержание арбутина ($8,43 \pm 0,31$ % методом СФ и $6,01 \pm 0,27$ % методом КЭ), при этом нижний предел содержания арбутина как методом СФ, так и методом КЭ может быть установлен не менее 5,5 % в отличие от текущего предела 6 % в ФС.2.5.0099.18 ГФ РФ XIV изд.

Результаты анализа арбутина методом КЭ подтверждали при анализе толокнянки обыкновенной (Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область, август 2019 г.) и толокнянки кавказской (Бермамыт, КЧР, сентябрь 2020 г.) листьев методом ВЭЖХ. Условия анализа описаны в разделе 2. Типичные хроматограммы извлечений представлены на рисунке 6.6, хроматограмма раствора СО арбутина – на рисунке 6.7.

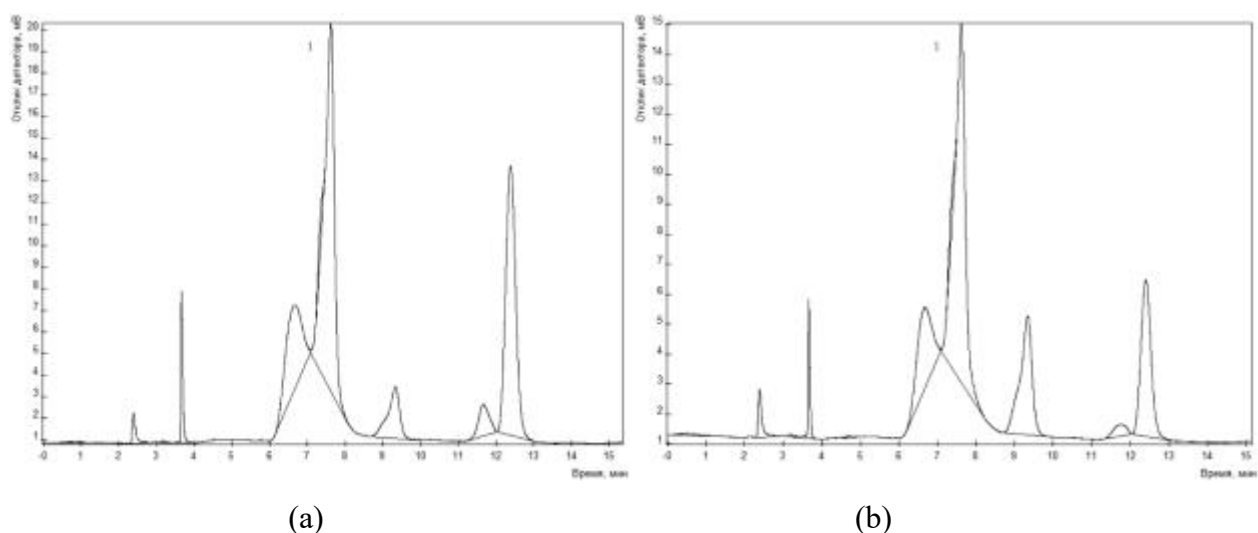


Рисунок 6.6 – Хроматограмма извлечения из: а – толокнянки обыкновенной листьев; б – толокнянки кавказской листьев; 1 - арбутин

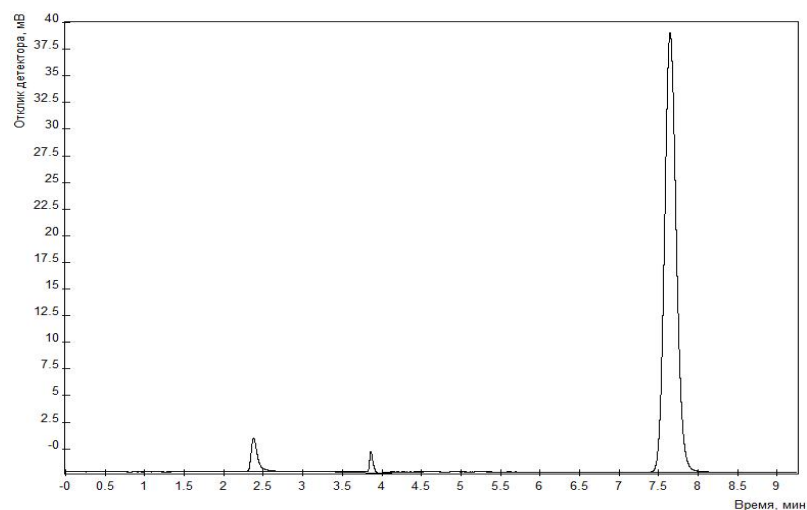


Рисунок 6.7 – Хроматограмма раствора стандартного образца арбутина (0,1032 мг/мл)

Результаты количественного определения арбутина в образцах толокнянки листьев представлены в таблице 6.5.

Таблица 6.5 - Содержание арбутина в толокнянке листьях, установленное методом ВЭЖХ

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Толокнянки обыкновенной листья</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	8,39	0,2033	0,0830	2,57	0,21	2,54
<i>Толокнянки кавказской листья</i>								
Плато Бермамыт, КЧР (сентябрь 2020 г.)	6	5	6,28	0,2738	0,1118	2,57	0,29	4,57

Содержание арбутина в анализируемых образцах сырья составило $8,39 \pm 0,21\%$ (толокнянки обыкновенной листья) и $6,28 \pm 0,29\%$ (толокнянки кавказской листья), что сопоставимо с результатами, полученными методом КЭ.

Также разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид как один из основных флавоноидов (Глава 4). В анализе использовали то же извлечение, приготовленное путем экстракции спиртом этиловым 70 % из толокнянки листьев, из которого отбирали аликвоту для очистки на алюминия оксиде. Для количественного определения флавоноидов отбирают две аликвоты объемом 5 мл, помещают в мерные колбы объемом 25 мл, в обе колбы вносят по 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и в одну колбу вносят 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %. В обеих колбах доводят объем растворов до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 406 нм, при этом раствор без алюминия хлорид является раствором сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 1:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ст} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ст} \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (2),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца;

$a_{ст}$ – навеска стандартного образца гиперозида, г;

a – навеска навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид возможно вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом по формуле 3:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot 330 \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (3)$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

330 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 406 нм;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора СО гиперозида

Около 0,05 г (точная навеска) СО гиперозида, высушенного при температуре 132-135 °С в течение 2-х часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 70 мл спирта этилового 96 %, доводят до метки этим же растворителем (раствор СО гиперозида).

2 мл раствора СО гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 70 %, 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и 2 мл алюминия

хлорида раствора 2 % и доводят объем раствора спиртом этиловым 70 % до метки, перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения, приготовленного по схеме: 2 мл раствора СО гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 70 %, 0,5 мл кислоты уксусной 33 %, доводят объем раствора спиртом этиловым 70 % до метки и перемешивают.

Спектры поглощения извлечений, полученных из толокнянки листьев из различных мест естественного произрастания представлены на рисунке 6.8 и спектр СО гиперозида после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом на рисунке 6.9.

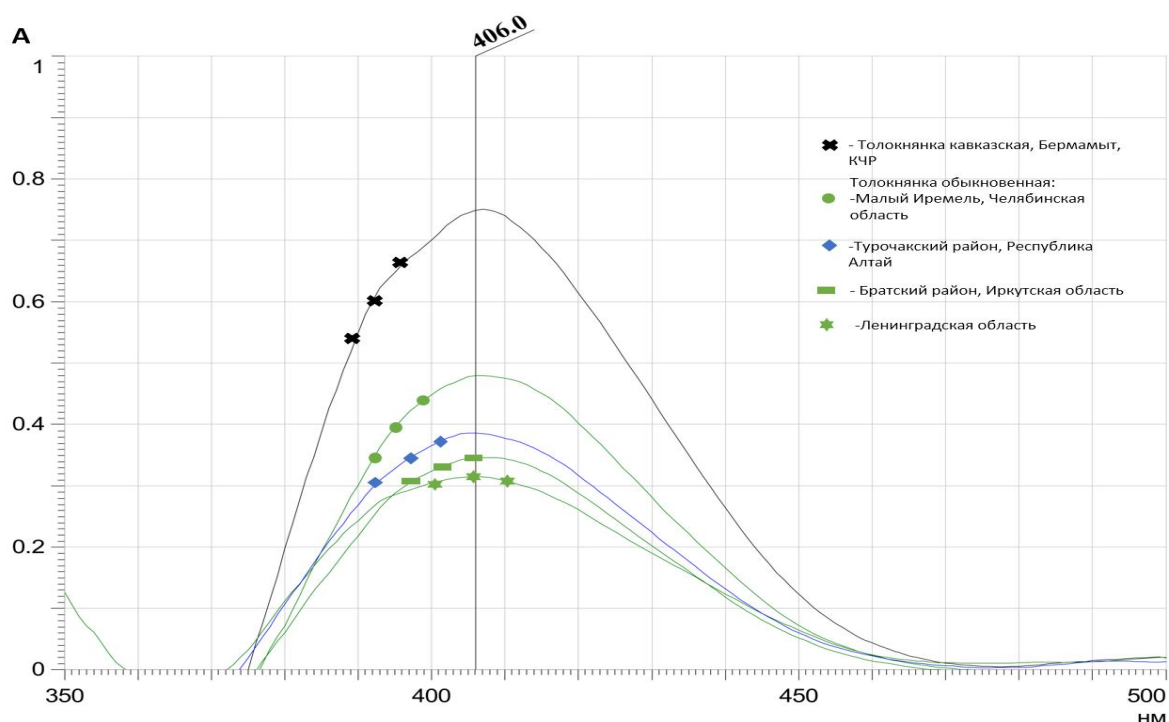


Рисунок 6.8 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из листьев толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

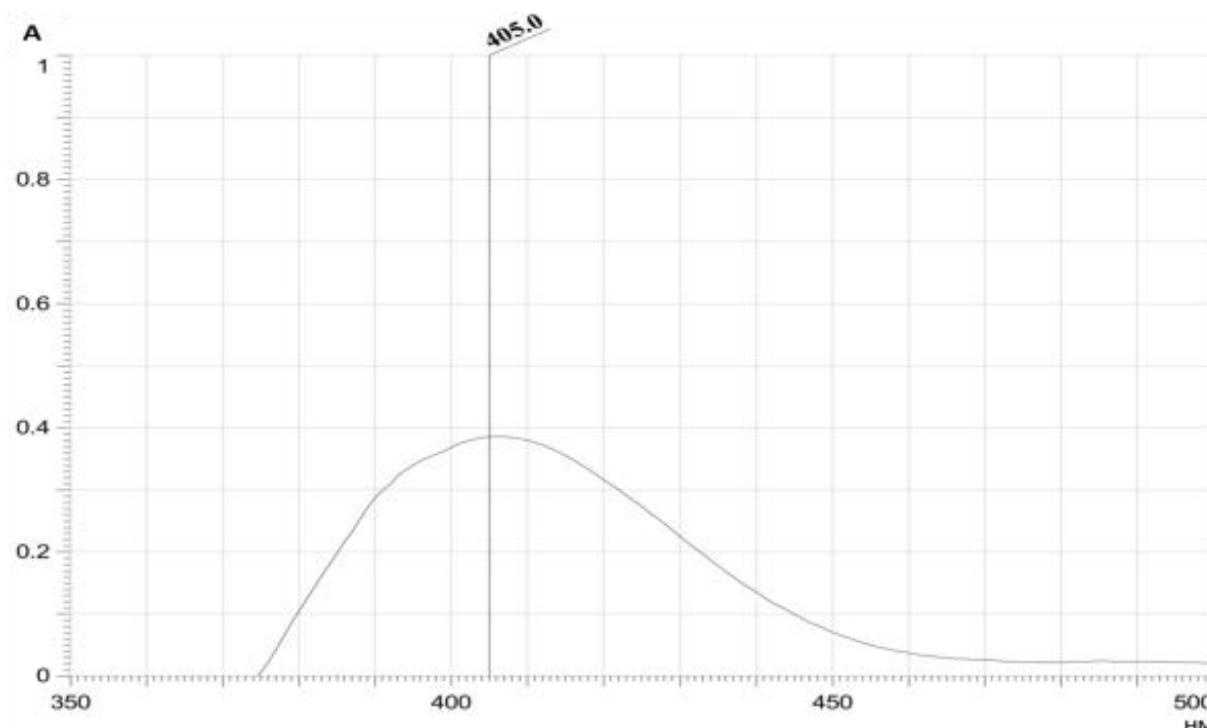


Рисунок 6.9 – УФ-спектр СО гиперозида (0,05 г в 100 мл спирта 96 % - 1 мл в 25 мл до метки спиртом этиловым 70 %) после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрिलाбораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (таблица 6.6).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО гиперозида и извлечений из толокнянки листьев (рис. 6.8 и 6.9).

Таблица 6.6 – Валидационные параметры методики анализа суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в толокнянки листьях

Параметр	Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0312x - 3 \cdot 10^{-6}$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=1,66$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрिलाбораторная прецизионность	$RSD(\%)=1,32 - 3,32$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$0,92 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов толокнянки листьев (табл. 6.7).

Таблица 6.7 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в толокнянки листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Регион заготовки	n	f	$\bar{X}$	S_x	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	Δx	$\varepsilon, \%$
<i>Толокнянки обыкновенной листья</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	1,01	0,0240	0,0138	2,57	0,04	3,53
Гора Малый Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	1,53	0,0202	0,0116	2,57	0,03	1,96
Турочакский район, Республика Алтай (сентябрь 2019 г.)	6	5	1,21	0,0400	0,0231	2,57	0,06	4,92
Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	1,12	0,0186	0,0107	2,57	0,03	2,47
<i>Толокнянки кавказской листья</i>								
Плато Бермамыт, КЧР (сентябрь 2020 г.)	6	5	2,43	0,0385	0,0157	2,57	0,04	1,66

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в толокнянки листьях не менее 0,8 %.

Подобраны условия электрофоретического анализа гиперозида: pH буферного раствора (диапазон значений pH обусловлен значением константы ионизации агликаона гиперозида кверцетина, равной на первой ступени диссоциации 7,19 [231]), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.8) (Приложение 6, рис. 6.5-6.7). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91]. В анализе используется то же извлечение, полученное для определения содержания арбутина методом КЭ.

Таблица 6.8 – Результаты выбора оптимальных условий количественного определения гиперозида методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
pH 9,0	96	25 мМ	143	+10 кВ	145
pH 9,2	150	50 мМ	224	+15 кВ	125
pH 9,4	78			+25 кВ	207
pH 9,6	43				
pH 9,8	42				

Примечание: ТТТ – тысяч теоретических тарелок; мМ – миллимолярный раствор; кВ – киловольт

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из голубики обыкновенной листьев являются: 10 мМ боратный буферный раствор с рН 9,2, напряжение в капилляре +20 кВ. Использование буферного раствора с концентрацией натрия тетрабората 50 мМ и напряжения +25 кВ, несмотря на высокую эффективность разделения, нецелесообразно в виду перегруженности капилляра и уширения пика компонента, а также возможного наложения пиков [91].

Для расчета концентрации гиперозида в извлечении нами построен график зависимости концентрации в мг/мл от площади пика гиперозида при анализе серии разведений СО гиперозида в спирте этиловом 70 % (0,002-0,083 мг/мл) (рис. 6.10).

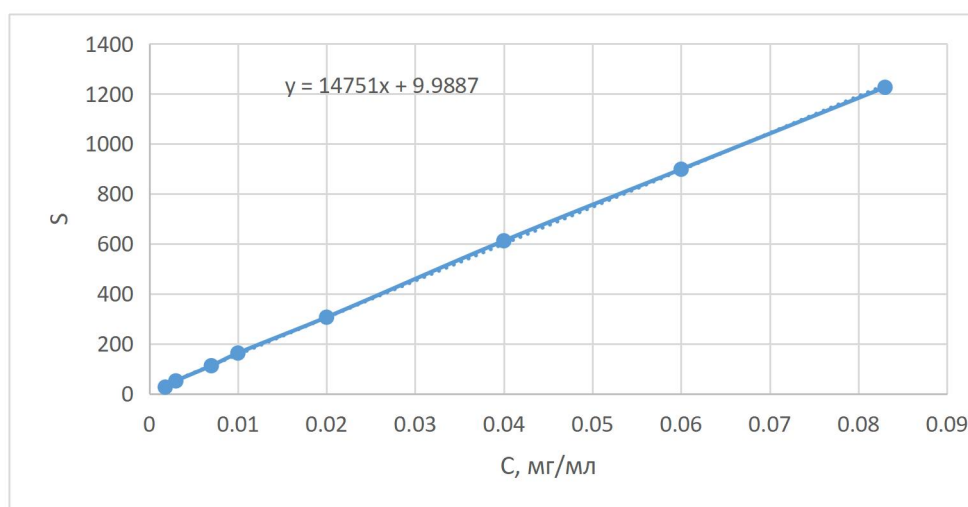


Рисунок 6.10 – Градуировочный график для расчета содержания гиперозида в ЛРС методом КЭ

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрिलाбораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.9).

Специфичность методики подтверждали по совпадению миграции и характеру пика гиперозида в извлечении из толокнянки листьев и в растворе СО гиперозида (Приложение 6, рис. 6.8).

Таблица 6.9 – Валидационные параметры методики анализа гиперозида в толокнянке листьях

Параметр	Количественное определение гиперозида	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 14751x + 7,0339$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=4,85$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрिलाбораторная прецизионность	$RSD(\%)=1,70 - 3,27$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$0,82 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов толокнянки листьев (табл. 6.10) (Приложение 6, рис. 6.8).

Таблица 6.10 – Содержание гиперозида в толокнянке листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом капиллярного электрофореза

Регион заготовки	n	f	$\bar{X}$	S_x	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	Δx	$\epsilon, \%$
<i>Толокнянки обыкновенной листья</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	0,65	0,0199	0,0115	2,57	0,03	4,53
Гора Малый Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	1,35	0,0250	0,0144	2,57	0,04	2,74
Турочакский район, Республика Алтай (сентябрь 2019 г.)	6	5	0,73	0,0123	0,0071	2,57	0,02	2,51
Братский район, Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	0,79	0,0140	0,0081	2,57	0,02	2,63
<i>Толокнянки кавказской листья</i>								
Плато Бермамыт, КЧР (сентябрь 2020 г.)	6	5	1,49	0,0489	0,0282	2,57	0,07	4,85

Результаты исследования позволяют установить нижний предел содержания компонента гиперозида в толокнянке листьях не менее 0,5 %.

6.3. Стандартизация сырья видов рода *Vaccinium* L.

6.3.1. Брусники обыкновенной листья

В Государственной фармакопее СССР XI издания было предложено стандартизировать сырье брусники обыкновенной путем определения содержания арбутина с использованием йодометрического титрования [32]. В ГФ РФ XIV издания был введен метод прямой спектрофотометрии после очистки извлечения, полученного путем экстракции листьев спиртом этиловым 70 %, на алюминия оксиде, с целью удаления сопутствующих фенольных соединений [31].

Нами разработаны и валидированы методики количественного определения арбутина, как основного фенологликозида, методом капиллярного электрофореза с подтверждением его результатов методом ВЭЖХ [153].

Извлечение получали согласно методике ФС.2.5.0063.18. Проводили анализ количественного содержания арбутина согласно фармакопейной методике методом УФ-спектрофотометрии извлечений из образцов сырья (раздел 2.1) после очистки аликвоты этих

извлечений на алюминия оксиде. Спектры извлечений в сравнении со спектром СО арбутина представлены на рисунке 6.11.

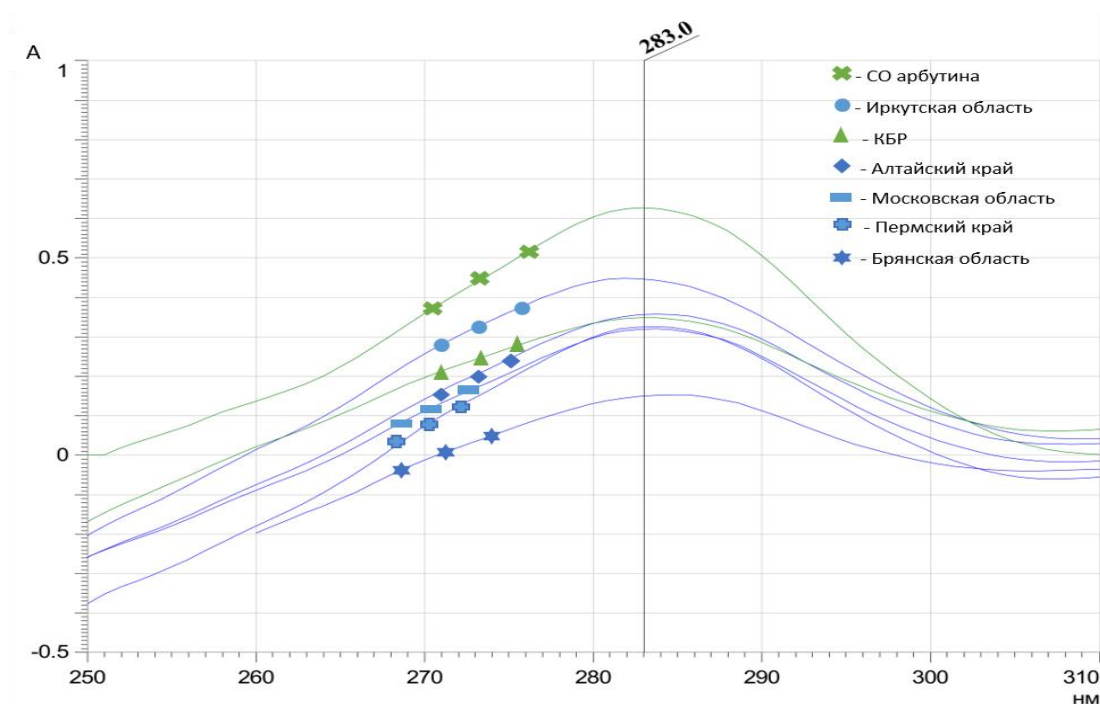


Рисунок 6.11 – Спектры поглощения раствора СО арбутина (0,02 мг/мл) и водно-спиртовых извлечений (экстрагент – спирт этиловый 70%) из брусники обыкновенной листьев, собранных в разных местах произрастания.

Результаты расчета количественного содержания арбутина в анализируемых образцах представлены в таблице 6.11.

Таблица 6.11 – Количественное содержание арбутина в бруснике обыкновенной листьях, установленное методом УФ-спектрофотометрии

Регион заготовки	n	f	$\bar{X}$	S_x	S_x	t(p, f)	Δx	$\varepsilon, \%$
КБР (сентябрь 2019 г.)	6	5	8,47	0,1296	0,0529	2,57	0,14	1,61
Пермский край (апрель 2018 г.)	6	5	8,00	0,3255	0,1329	2,57	0,34	4,27
Брянская область (апрель 2018 г.)	6	5	5,79	0,2551	0,1042	2,57	0,27	4,62
Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	10,86	0,3256	0,1329	2,57	0,34	3,15
Алтайский край (сентябрь 2019 г.)	6	5	9,07	0,3537	0,1444	2,57	0,37	4,09
Московская область (март 2019 г.)	6	5	7,76	0,3020	0,1233	2,57	0,32	4,08

Наряду с арбутином в листьях брусники может обнаруживаться метиларбутин и его агликон гидрохинон, а также конъюгат арбутина с кофейной кислотой [295]. В виду близкой химической природы этих соединений возможен их вклад в светопоглощение анализируемого

раствора, очищенного на алюминия оксиде. Поэтому наряду со спектрофотметрическим анализом нами разработана методика анализа содержания арбутина как индивидуального компонента. Ранее Рознятовская А.А. и др. проводили анализ листьев брусники и толокнянки методом КЭ, но в качестве испытуемого раствора было водное извлечение [88].

Нами подобраны условия электрофоретического анализа арбутина: pH буферного раствора (диапазон значений pH обусловлен значением константы ионизации арбутина, равной 10,1), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.12) (Приложение 6, рис. 6.9 - 6.11). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91].

Таблица 6.12 – Результаты выбора оптимальных условий количественного определения арбутина методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
pH 9,2	414	25 мМ	372	+10 кВ	320
pH 9,4	418	50 мМ	434	+15 кВ	322
pH 9,6	434			+25 кВ	-
pH 9,8	439				
pH 10,0	18				

Примечание: ТТТ – тысяча теоретических тарелок; мМ – миллимолярный раствор; кВ – киловольт; - – нет разделения

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из брусники обыкновенной листьев являются: 10 мМ боратный буферный раствор с pH 9,6, напряжение в капилляре +20 кВ. Использование буферного раствора с концентрацией натрия тетрабората 50 мМ, несмотря на сходную эффективность разделения, нецелесообразно в виду перегруженности капилляра и уширения пика компонента [91]. Отличия в эффективности разделения арбутина в буферном растворе с pH 9,6±0,2 незначительны, поэтому выбран буферный раствор с pH 9,6.

Также мы сравнили профили извлечений без и после очистки на алюминия оксиде (рис. 6.12).

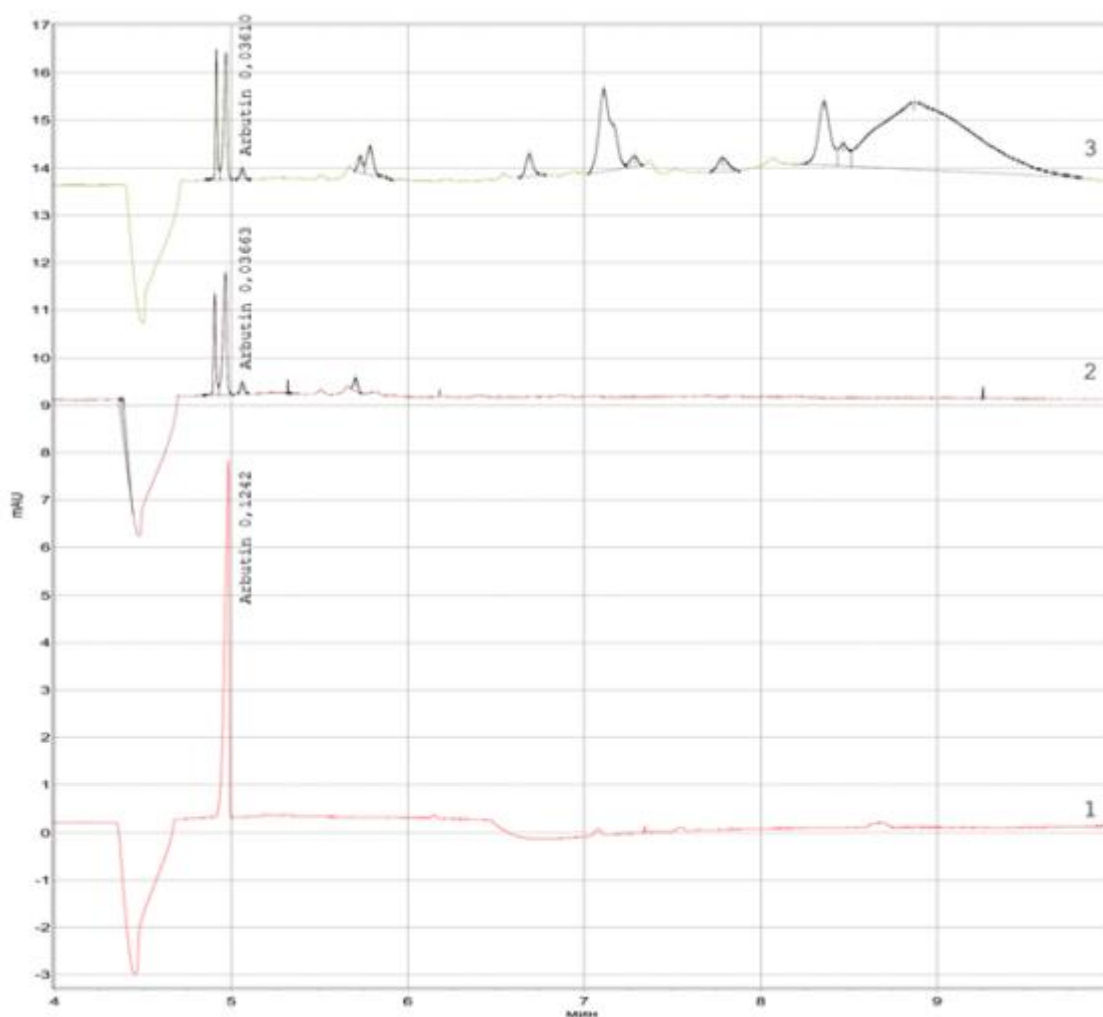


Рисунок 6.12 – Электрофореграммы: 1 - раствора СО арбутина; 2 – очищенного водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70%) из брусники обыкновенной листьев (Кабардино-Балкарская Республика); 3 – неочищенного водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70 %) из брусники обыкновенной листьев (Кабардино-Балкарская Республика). Концентрация арбутина мг/мл.

В условиях, которые мы выбрали, мы обнаружили, что площадь пика и содержание арбутина в извлечениях оставались неизменными, как до, так и после очистки. Поэтому при проведении анализа с использованием метода капиллярного электрофореза нет необходимости проводить элюирование аликвоты извлечения из листьев брусники обыкновенной в колонке, содержащей алюминий оксид [153].

Таким образом, предлагается следующая методика анализа содержания арбутина в листьях брусники: 0,5 г сырья точно взвешивают с размером частиц 1 мм, после чего проводится экстрагирование с использованием 100 мл этилового спирта с содержанием 70 %. Колбу с навеской и экстрагентом взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Затем, полученную смесь помещают на кипящую водяную баню с обратным холодильником и поддерживают ее на

протяжении 45 минут. После извлечения смесь охлаждают, затем выполняется взвешивание колбы и, при необходимости, путем добавления 70% этилового спирта достигается исходная масса. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70 %, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. Затем аликвоту объемом 3 мл полученного фильтрата вносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 70 %, перемешивают. Затем, один миллилитр извлечения подвергается центрифугированию со скоростью 8000 оборотов в минуту в течение пяти минут, после чего производится анализ в соответствии с выбранными условиями [153].

Содержание арбутина в бруснике обыкновенной листьях в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывают по уравнению 4:

$$C, \% = \frac{C_{\text{мг/мл}} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - W)} \quad (4),$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ - концентрация арбутина в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рисунок 6.10);

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Для расчета концентрации арбутина в извлечении нами построен график зависимости концентрации в мг/мл от площади пика арбутина при анализе серии разведений СО арбутина в спирте этиловом 70% (0,083-0,01 мг/мл) (рисунок 6.13).

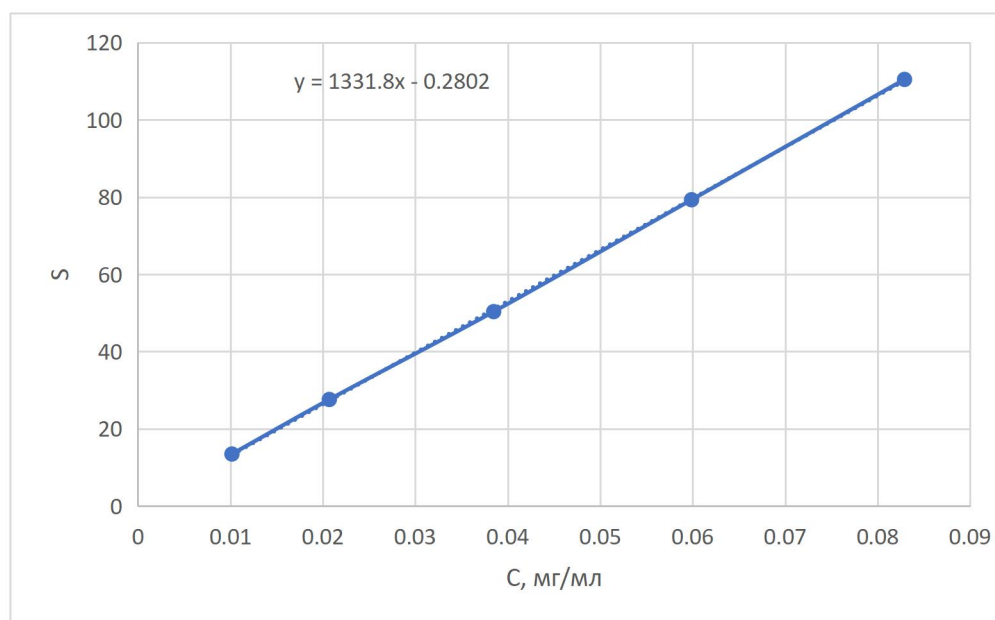


Рисунок 6.13 – Калибровочный график линейной зависимости площади пика СО арбутина от его концентрации в растворе

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность

(шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.13).

Специфичность методики подтверждали по совпадению миграции и характеру пика арбутина в извлечении из брусники обыкновенной листьев и в растворе СО арбутина (рис. 6.12).

Таблица 6.13 – Валидационные параметры методики анализа арбутина в бруснике обыкновенной листьях

Параметр	Количественное определение арбутина	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 1331,8x - 0,2802$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=3,10$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=2,91 - 4,49$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$0,73 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов брусники обыкновенной листьев, что представлено в таблице 6.14 (Приложение 6, рис. 6.12).

Таблица 6.14 – Содержание арбутина в бруснике обыкновенной листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом капиллярного электрофореза

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t (p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
КБР (сентябрь 2019 г.)	6	5	6,75	0,1993	0,0814	2,57	0,21	3,10
Пермский край (апрель 2018 г.)	6	5	6,03	0,2785	0,1137	2,57	0,29	4,85
Брянская область (апрель 2018 г.)	6	5	4,32	0,1981	0,0809	2,57	0,21	4,81
Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	9,70	0,3801	0,1552	2,57	0,40	4,11
Алтайский край (сентябрь 2019 г.)	6	5	6,86	0,2015	0,0823	2,57	0,21	3,08
Московская область (март 2019 г.)	6	5	5,92	0,2260	0,0879	2,57	0,23	3,82

При сравнительном анализе результатов, полученных методами СФ и КЭ, установлено, что результаты спектрофотометрического анализа выше в среднем на 25 % (от 16 до 28 %, вероятна корреляция содержания компонента арбутина в сумме фенологликозидов в зависимости от времени сбора сырья – до цветения и после плодоношения). При спектрофотометрическом анализе вероятен вклад в оптическую плотность испытуемого раствора сопутствующих фенольных соединений, при этом значения количественного

содержания арбутина будут выше, чем при анализе сепарационным методом. В образце листьев брусники из Брянской области ($4,13 \pm 0,18$ %) установлено наименьшее содержание арбутина, при этом нижний предел содержания арбутина как методом СФ, так и методом КЭ может быть установлен не менее 4 % в отличие от нормируемого предела 4,5% в ФС.2.5.0063.18 ГФ РФ XIV издания.

Результаты анализа арбутина методом КЭ подтверждали при анализе того же образца сырья (КБР, сентябрь 2019 г.) методом ВЭЖХ. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 6.14, хроматограмма раствора СО арбутина – на рисунке 6.15.

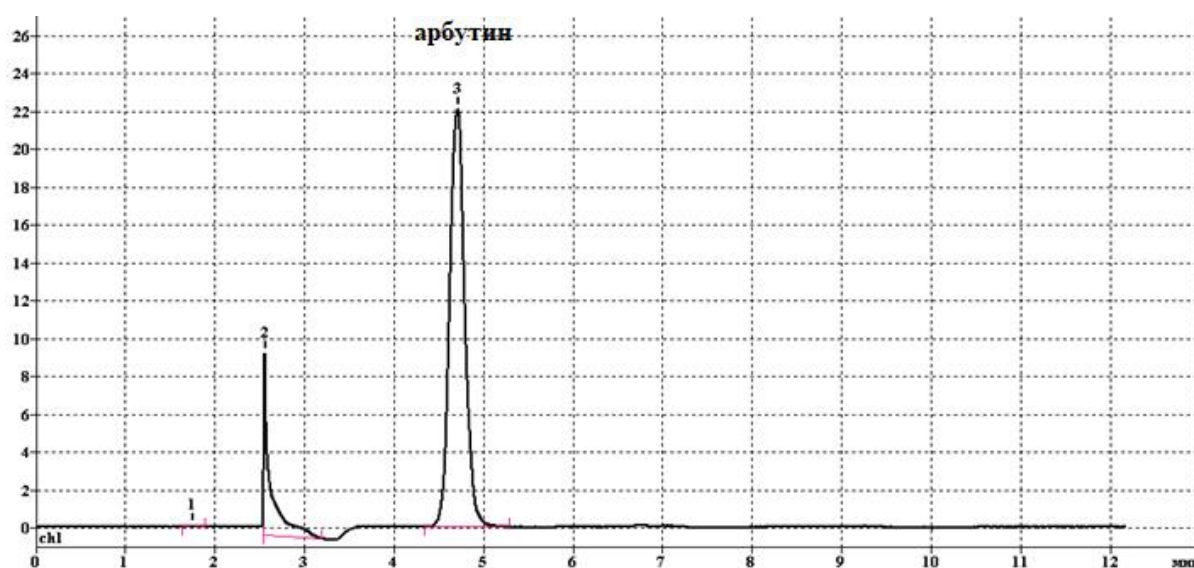


Рисунок 6.14 – Хроматограмма извлечения из брусники обыкновенной листьев

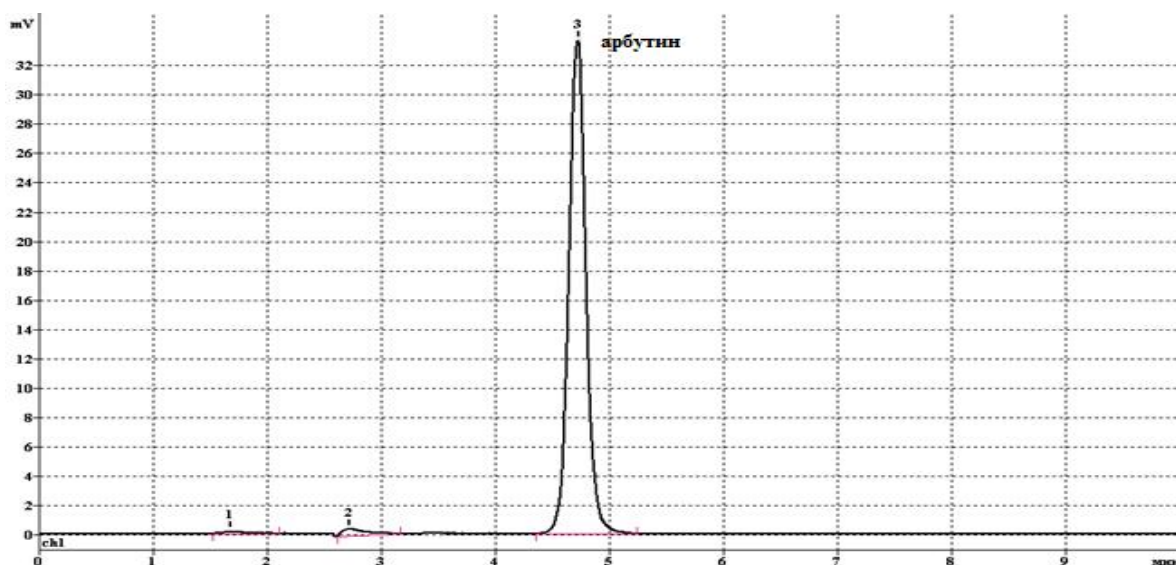


Рисунок 6.15 – Хроматограмма раствора стандартного образца арбутина

Результаты количественного определения арбутина в образце листьев брусники обыкновенной представлены в таблице 6.15.

Таблица 6.15 – Содержание арбутина в брусники обыкновенной листьях, установленное методом ВЭЖХ

№ эксперимента	Навеска, г	Площадь пика арбутина, мВ·сек	Содержание арбутина в брусники обыкновенной листьях, %	Метрологические характеристики
1	0,5020	251,16	6,32	$\bar{x}$ =6,48% S =0,1109 $S_{\bar{x}}$ =0,0453 $\Delta\bar{x}$ =0,12 $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ =6,48±0,12 $\bar{\varepsilon}$ =±1,8%
2	0,5015	253,97	6,39	
3	0,5004	262,63	6,63	
4	0,5034	260,49	6,53	
5	0,5011	259,08	6,53	
6	0,5021	256,88	6,46	
Влажность сырья – 6,26%; площадь пика арбутина (0.003216% раствор СО) 253.97 мВ сек				

Содержание арбутина в анализируемом образце сырья составило $6,48\pm0,12$ %, что сопоставимо с результатами, полученными методом КЭ – $6,75 \pm 0,21$ % [153].

Также разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид как один из основных флавоноидов (Глава 4). В анализе использовали то же водно-спиртовое извлечение из брусники обыкновенной листьев, из которого отбирали аликвоту для очистки на алюминия оксиде. Для количественного определения флавоноидов отбирают две аликвоты объемом 5 мл, помещают в мерные колбы объемом 25 мл, в обе колбы вносят по 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и в одну колбу вносят 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %. В обеих колбах доводят объем растворов до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 406 нм, при этом раствор без алюминия хлорид является раствором сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 5:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ct} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ct} \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (5),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{ct} – оптическая плотность раствора стандартного образца;

a_{ct} – навеска стандартного образца гиперозида, г;

a – навеска навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид возможно вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом по формуле 6:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot 330 \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (6),$$

где: А – оптическая плотность испытуемого раствора;

330 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 406 нм;

а – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора СО гиперозида и спектр поглощения – раздел 6.2.1.

Спектры поглощения извлечений, полученных из брусники обыкновенной листьев из различных мест произрастания, представлены на рисунке 6.16.

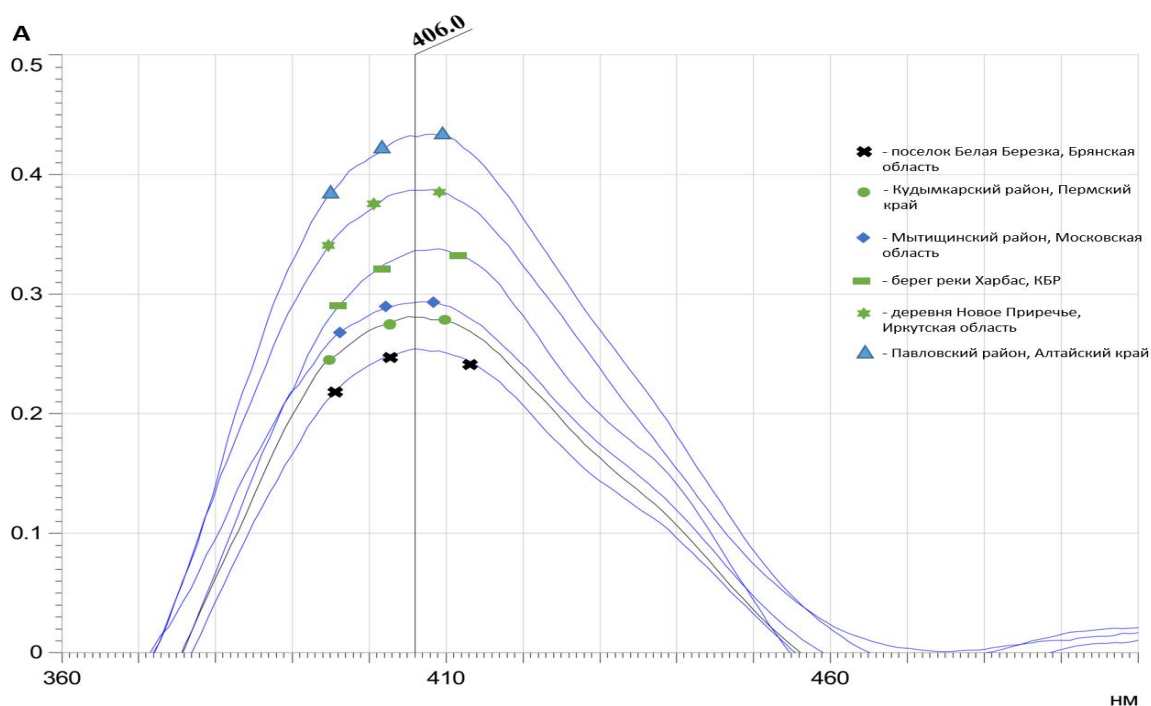


Рисунок 6.16 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из брусники обыкновенной листьев после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (таблица 6.16).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО гиперозида и извлечений из брусники обыкновенной листьев (рис. 6.9 и 6.16).

Таблица 6.16 – Валидационные параметры методики анализа суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в бруснике обыкновенной листьях

Параметр	Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,03112x + 10^{-5}$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=1,55$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=1,49 - 4,31$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$1,86 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов брусники обыкновенной листьев (табл. 6.17).

Таблица 6.17 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в бруснике обыкновенной листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
КБР (сентябрь 2019 г.)	6	5	1,16	0,0171	0,0070	2,57	0,02	1,55
Пермский край (апрель 2018 г.)	6	5	0,96	0,0269	0,0110	2,57	0,03	2,87
Брянская область (апрель 2018 г.)	6	5	0,83	0,0359	0,0146	2,57	0,04	4,52
Иркутская область (август 2019 г.)	6	5	1,21	0,0227	0,0093	2,57	0,02	1,97
Алтайский край (сентябрь 2019 г.)	6	5	1,41	0,0278	0,0113	2,57	0,03	2,06
Московская область (март 2019 г.)	6	5	0,91	0,0304	0,0124	2,57	0,03	3,49

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в бруснике обыкновенной листьях не менее 0,5%.

6.3.2. Черники листья

Ранее нами установлено, что доминирующим компонентом листьев черники обыкновенной и черники кавказской является хлорогеновая кислота (Глава 4) [382]. Стандартизацию предложено проводить по сумме фенольных соединений методом прямой спектрофотометрии, по хлорогеновой кислоте как индивидуальному компоненту методом капиллярного электрофореза с подтверждением результатов методом ВЭЖХ, по сумме флавоноидов в пересчете на гиперозид как основной флавоноид.

Условия получения извлечения с максимальным содержанием фенольных соединений подбирали, измеряя светопоглощение растворов в диапазоне 200-400 нм (табл. 6.18, образец 1 черники кавказской листьев).

Таблица 6.18 – Результаты подбора оптимальных условий получения извлечения для оценки показателя «количественное определение» из черники листьев

Условия экстрагирования	Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в воздушно-сухом сырье, %
Степень измельченности сырья, мм	
1	5,66±0,22
2	5,22±0,12
3	4,55±0,17
Время экстракции, мин	
30	5,48±0,09
60	5,66±0,22
90	5,54±0,07
120	5,55±0,15
Экстрагент	
Вода очищенная	5,20±0,12
Спирт этиловый 40%	5,40±0,13
Спирт этиловый 70%	5,66±0,22
Спирт этиловый 96%	4,98±0,12
Соотношение сырье: экстрагент	
1:25	4,91±0,06
1:50	5,66±0,22
1:100	5,64±0,15

Извлечение из черники листьев предложено получать по следующей схеме: точную навеску сырья с размером частиц в 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл. Далее добавляют 50 мл спирта этилового 70 %, закрывают колбу пробкой и взвешивают. Процесс экстракции начинается после закипания смеси на водяной бане с температурой 80-90 °С и подключенным обратным холодильником. Экстракцию проводят в течение 60 минут. После окончания экстракции и охлаждения до комнатной температуры, восстанавливают потерю спирта этилового 70 % до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, получая раствор А. Далее, 0,5 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят до метки 70 % этиловым спиртом и перемешивают, получая раствор Б. Измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 330 нм.

Содержание суммы фенольных соединений в чернике листьях рассчитывают по представленной ниже формуле 7:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 50 \cdot 0,5 \cdot a_{CO} \cdot 100 \cdot 100}{A_{CO} \cdot a_x \cdot 0,5 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (7),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора (раствор В);

A_{CO} – оптическая плотность раствора СО хлорогеновой кислоты;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО хлорогеновой кислоты;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения хлорогеновой кислоты по формуле 8:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 0,5 \cdot a_x \cdot (100 - W)} \quad (8),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507;

a_x – навеска сырья, г;

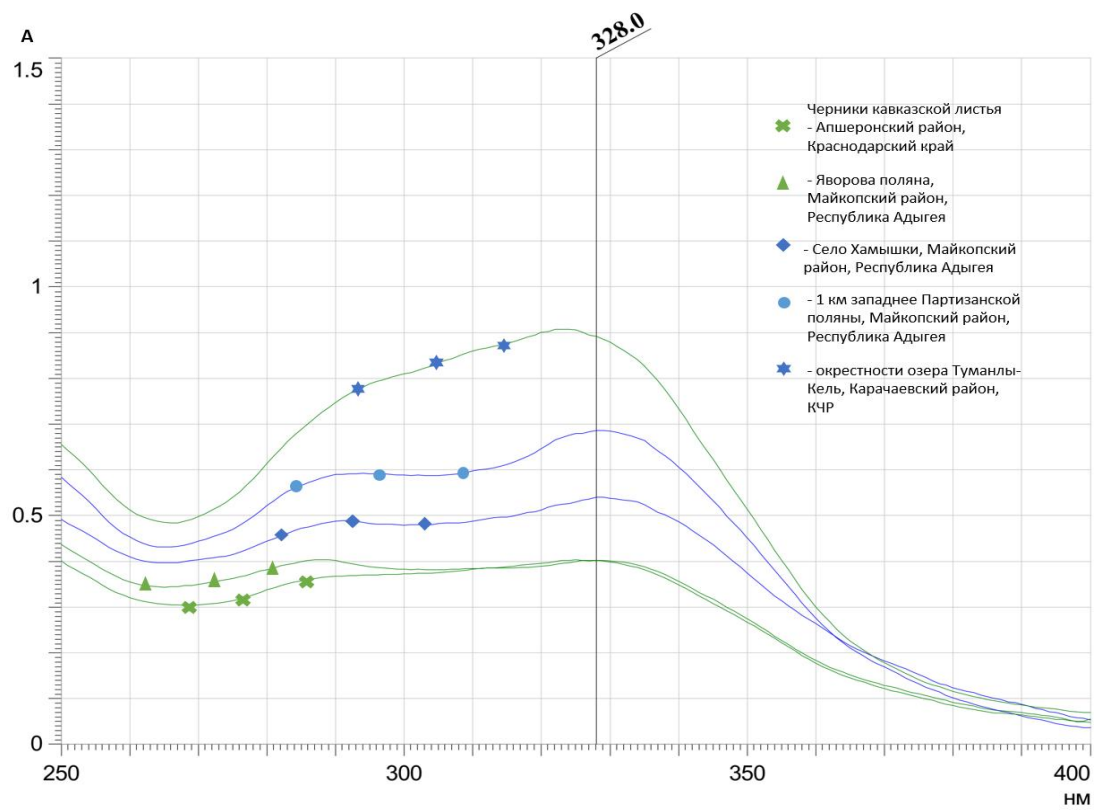
W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора СО хлорогеновой кислоты

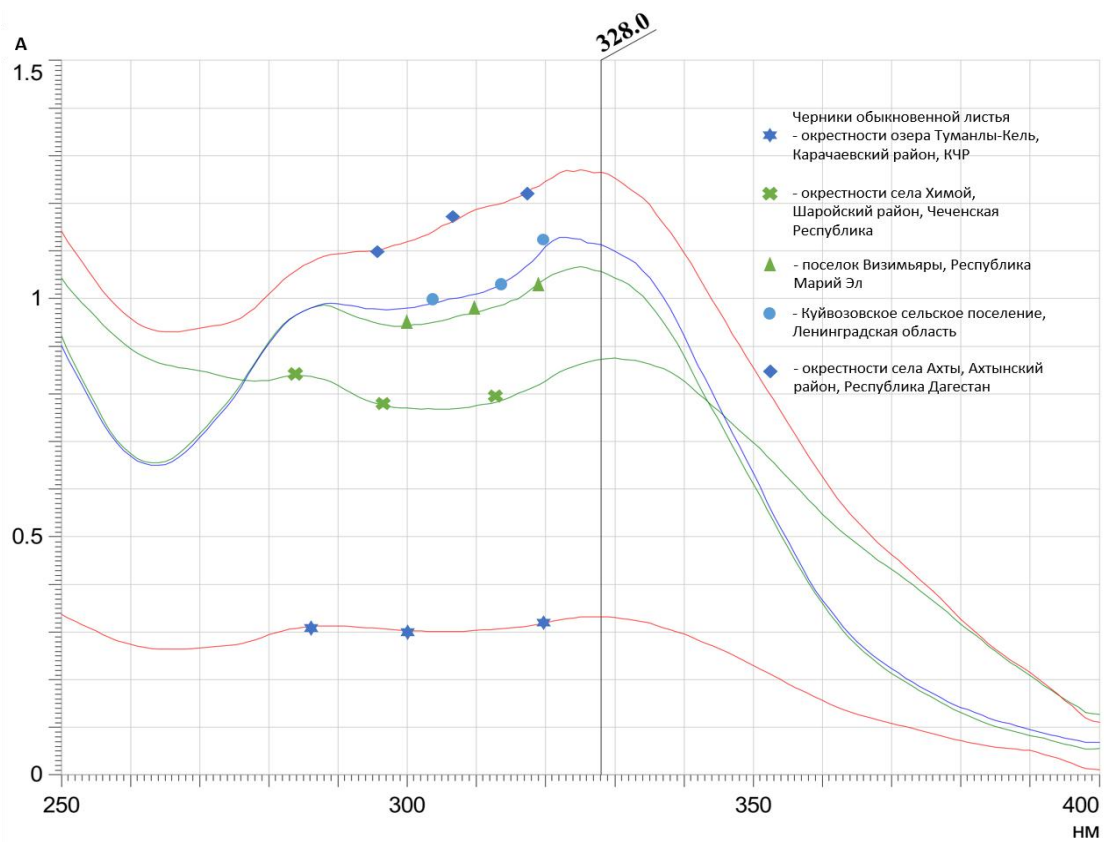
В мерную колбу объемом 100 мл точно отвешивают около 0,05 г хлорогеновой кислоты. Затем в колбу добавляют 80 мл спирта этилового с концентрацией 70 %. После полного растворения СО, раствор доводят до метки с помощью спирта этилового 70 % и тщательно перемешивают (раствор А). Срок годности раствора составляет 3 месяца при хранении в прохладном месте.

0,5 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 25 мл. Затем колбу доводят до метки с помощью спирта этилового 70 % и перемешивают (Раствор Б с СО хлорогеновой кислоты).

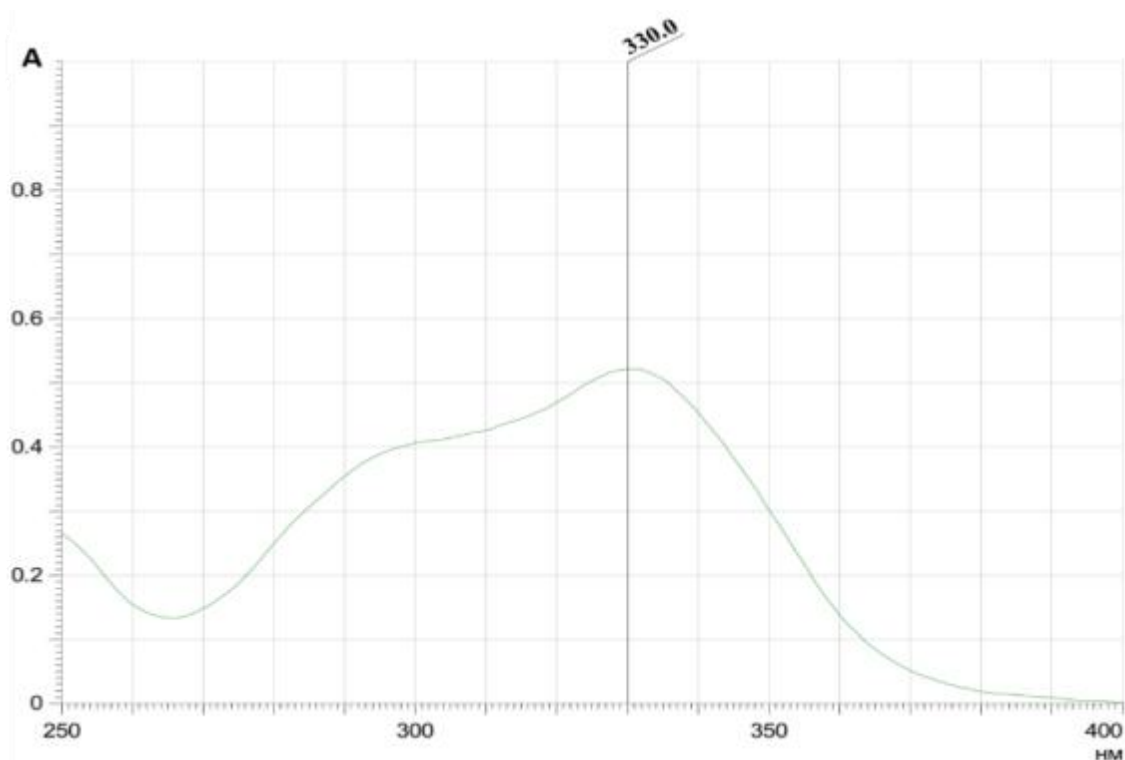
Спектры поглощения извлечений из черники листьев из 5 мест произрастания и СО хлорогеновой кислоты представлены на рисунке 6.17.



(a)



(b)



(с)

Рисунок 6.17 – УФ-спектры: водно-спиртового извлечения из черники листьев: (а) – черники кавказской; (b) – черники обыкновенной; (с) - раствора СО хлорогеновой кислоты (0,01 мг/мл)

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (таблица 6.19).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО хлорогеновой кислоты и извлечений из черники листьев (рис. 6.17).

Таблица 6.19 – Валидационные параметры методики анализа суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в чернике листьях

Параметр	Количественное определение суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0475x + 9 \cdot 10^{-7}$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=3,82$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=1,31 - 3,64$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$1,64 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов черники листьев (табл. 6.20).

Таблица 6.20 – Содержание суммы фенольных соединений в чернике листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черники обыкновенной листья</i>								
берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика (сентябрь 2019 г.)	6	5	11,07	0,1282	0,0523	2,57	0,13	1,13
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	6	5	11,21	0,4594	0,1875	2,57	0,48	4,30
Окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика (сентябрь 2020 г.)	6	5	9,27	0,1908	0,0779	2,57	0,20	2,16
Окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	6	5	3,79	0,1628	0,0665	2,57	0,17	4,51
Окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан (июль 2019 г.)	6	5	13,19	0,3314	0,1353	2,57	0,35	2,64
<i>Черники кавказской листья</i>								
Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	5,66	0,2061	0,0842	2,57	0,22	3,82
Яворова поляна, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	4,21	0,0853	0,0348	2,57	0,09	2,13
1 км западнее Партизанской поляны, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	7,40	0,0970	0,0396	2,57	0,10	1,38
окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край (октябрь 2019 г.)	6	5	4,14	0,1477	0,0603	2,57	0,16	3,74
окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	6	5	9,59	0,1575	0,0643	2,57	0,17	1,72

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в черники листьях не менее 3,0 %.

Нами подобраны условия электрофоретического анализа хлорогеновой кислоты (анализ того же извлечения, раствор А): pH буферного раствора (диапазон значений pH обусловлен

значением константы ионизации хлорогеновой кислоты, равной 10,1), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.21) (Приложение 6, рис. 6.13 - 6.15). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91].

Таблица 6.21 – Результаты выбора оптимальных условий количественного определения хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
pH 8,6	-	25 мМ	123	+10 кВ	71
pH 8,8	-	50 мМ	183	+15 кВ	58
pH 9,0	-			+25 кВ	72
pH 9,2	129				
pH 9,4	85				
pH 9,6	-				

Примечание: ТТТ – тысяч теоретических тарелок; мМ – миллимолярный раствор; кВ – киловольт; - – нет разделения

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из черники листьев являются: 10 мМ боратный буферный раствор с pH 9,2, напряжение в капилляре +20 кВ. Использование буферного раствора с концентрацией натрия тетрабората 50 мМ, несмотря на высокую эффективность разделения, нецелесообразно в виду перегруженности капилляра и уширения пика компонента [91].

Таким образом, предложена следующая методика анализа содержания хлорогеновой кислоты в чернике листьях: 1 г сырья (точная навеска) с размером частиц 1 мм, после чего проводится экстрагирование с использованием 50 мл этилового спирта с содержанием 70 %. Колбу с навеской и экстрагентом взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Затем, полученную смесь помещают на кипящую водяную баню с обратным холодильником и поддерживают ее на протяжении 60 минут. После извлечения смесь охлаждают, затем выполняется взвешивание колбы и, при необходимости, путем добавления 70 % этилового спирта достигается исходная масса. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Затем аликвоту объемом 2 мл полученного фильтрата вносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 70 %, перемешивают. Затем, один миллилитр извлечения подвергается центрифугированию со скоростью 8000 оборотов в минуту в течение пяти минут, после чего производится анализ в соответствии с выбранными условиями.

Содержание хлорогеновой кислоты в черники листьях в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывали по формуле 9:

$$C, \% = \frac{C_{\text{мг/мл}} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} \quad (9),$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ - концентрация хлорогеновой кислоты в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рис. 6.18);

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Для расчета концентрации хлорогеновой кислоты в извлечении нами построен график зависимости концентрации в мг/мл от площади пика хлорогеновой кислоты при анализе серии разведений СО хлорогеновой кислоты в спирте этиловом 70 % (0,005-0,34 мг/мл) (рис. 6.18).

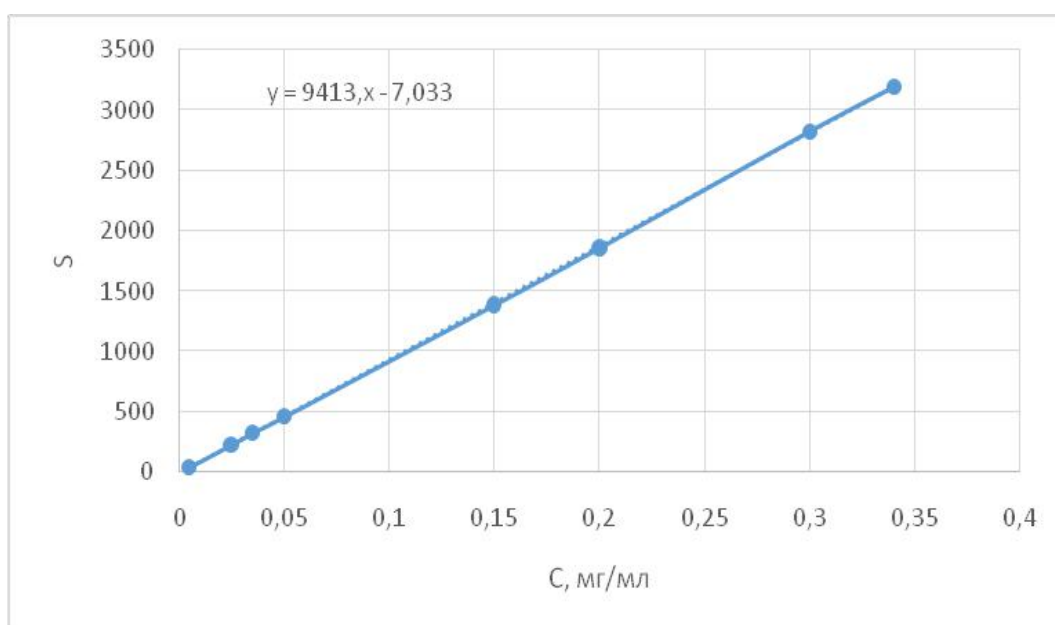


Рисунок 6.18 – График зависимости аналитического сигнала (площади пика СО хлорогеновой кислоты) от концентрации стандартного образца для расчета содержания хлорогеновой кислоты методом КЭ

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрिलाбораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.22).

Специфичность методики подтверждали по совпадению времени миграции и характеру пика хлорогеновой кислоты в извлечении из черники листьев и в растворе СО хлорогеновой кислоты (Приложение 6, рис. 6.16 и 6.17).

Таблица 6.22 – Валидационные параметры методики анализа хлорогеновой кислоты в чернике листьях

Параметр	Количественное определение хлорогеновой кислоты	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 9413,5x + 7,0339$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=4,87$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=2,29 - 4,65$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$2,16 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов черники листьев (табл. 6.23) (Приложение 6, рис. 6.16-6.17).

Таблица 6.23 – Содержание хлорогеновой кислоты в черники листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом капиллярного электрофореза

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черники обыкновенной листья</i>								
берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика (сентябрь 2019 г.)	6	5	8,05	0,3512	0,1434	2,57	0,37	4,58
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	6	5	6,38	0,2523	0,1030	2,57	0,26	4,15
Окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика (сентябрь 2020 г.)	6	5	3,69	0,1524	0,0622	2,57	0,16	4,33
Окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	6	5	1,29	0,0425	0,0173	2,57	0,04	3,44
Окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан (июль 2019 г.)	6	5	5,28	0,2138	0,0873	2,57	0,22	4,25
<i>Черники кавказской листья</i>								
Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	2,78	0,1290	0,0526	2,57	0,14	4,07
Яворова поляна, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	1,77	0,0735	0,0300	2,57	0,08	4,37
1 км западнее Партизанской поляны, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	4,10	0,0894	0,0365	2,57	0,09	2,29
окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край (октябрь 2019 г.)	6	5	1,31	0,0543	0,0222	2,57	0,06	4,35
окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	6	5	3,58	0,1321	0,0539	2,57	0,14	3,87

Результаты исследования позволяют установить нижний предел содержания компонента хлорогеновой кислоты в голубики обыкновенной листьях не менее 1,0 %.

Результаты анализа хлорогеновой кислоты методом КЭ подтверждали при анализе черники обыкновенной (Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область, август 2019 г.) и черники кавказской (село Хамышки, Республика Адыгея, сентябрь 2020 г.) листьев методом ВЭЖХ. Типичные хроматограммы извлечений и хроматограмма раствора СО хлорогеновой кислоты представлены на рисунке 6.19.

Расчет количественного содержания хлорогеновой кислоты проводили по формуле 10 представленной ниже:

$$X, \% = \frac{S_x \cdot a_{CO} \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{S_{CO} \cdot 10 \cdot 10 \cdot a_x \cdot 2 \cdot (100 - W) \cdot 100} \quad (10),$$

где S_x – площадь пика хлорогеновой кислоты в извлечении, мВ;

S_{CO} – площадь пика СО хлорогеновой кислоты, мВ;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО хлорогеновой кислоты, г;

P – содержание хлорогеновой кислоты в субстанции СО, %;

W – влажность сырья, %.

Результаты установления количественного содержания в пересчете на воздушно-сухое сырье представлены в таблице 6.24.

Таблица 6.24 – Содержание хлорогеновой кислоты в черники листьях, установленное методом ВЭЖХ

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черники обыкновенной листья</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	7,79	0,2341	0,0956	2,57	0,25	3,15
<i>Черники кавказской листья</i>								
Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	2,93	0,0698	0,0285	2,57	0,07	2,50

Содержание хлорогеновой кислоты в анализируемых образцах сырья составило $7,79 \pm 0,25$ % (черники обыкновенной листья) и $2,93 \pm 0,07$ % (черники кавказской листья), что сопоставимо с результатами, полученными методом КЭ.

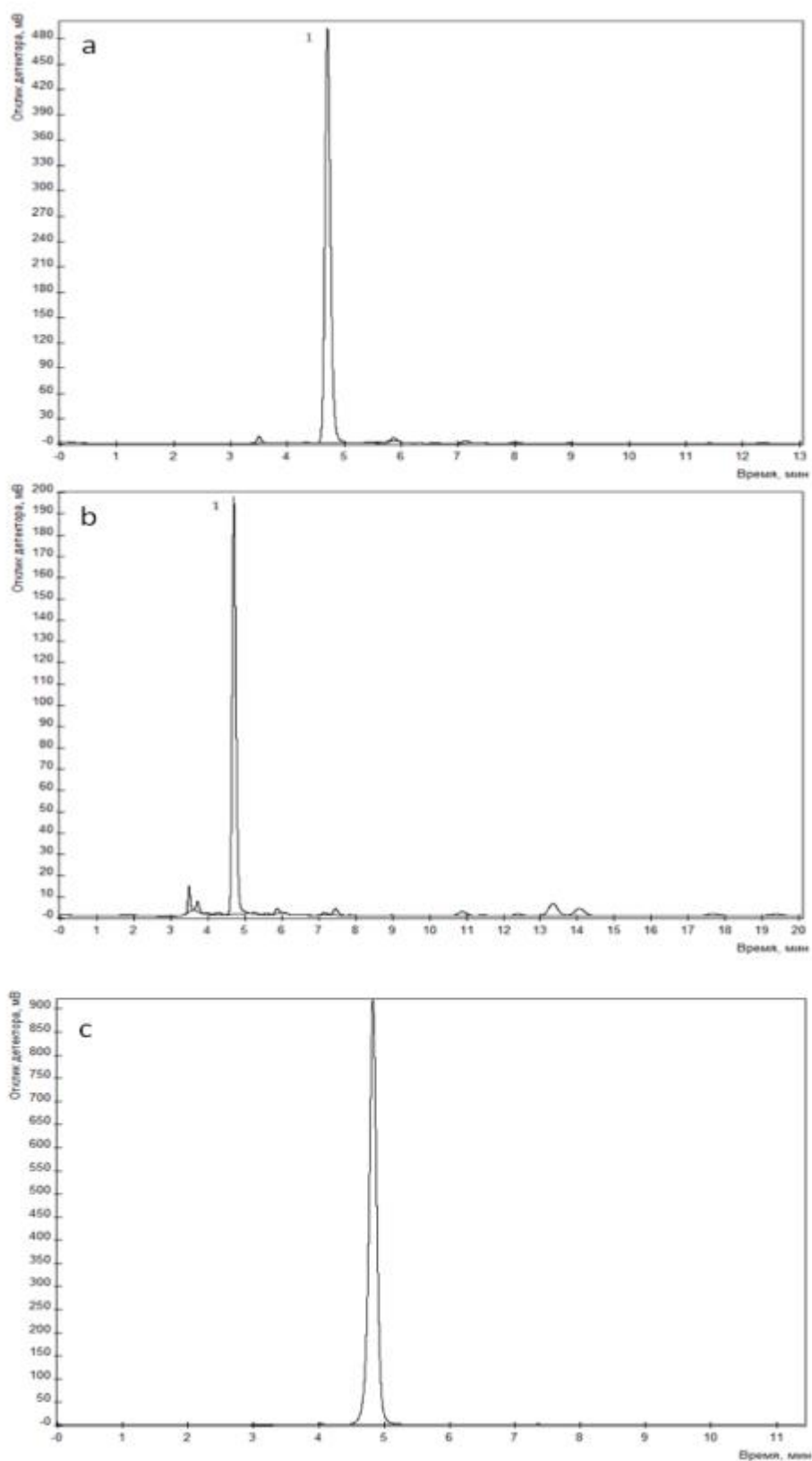


Рисунок 6.19 – Хроматограмма ВЭЖХ извлечения из: а – черники обыкновенной листьев (Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область); б – черники кавказской листьев (село Хамышки, Республика Адыгея); 1 – хлорогеновая кислота; с – хроматограмма раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты (0,253 мг/мл)

Также разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид как один из основных флавоноидов (Глава 4). В анализе использовали то же водно-спиртовое извлечение из черники листьев (раствор А). Для количественного определения флавоноидов отбирают две аликвоты объемом 2 мл, помещают в мерные колбы объемом 25 мл, в обе колбы вносят по 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и в одну колбу вносят 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %. В обеих колбах доводят объем растворов спиртом этиловым 70 % до метки и перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 406 нм, при этом раствор без алюминия хлорид является раствором сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 11:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ct} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ct} \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot (100 - W)} \quad (11),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{ct} – оптическая плотность раствора СО гиперозида;

a_{ct} – навеска СО, г;

a – навеска навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид возможно вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом по формуле 12:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot 330 \cdot 2 \cdot (100 - W)} \quad (12)$$

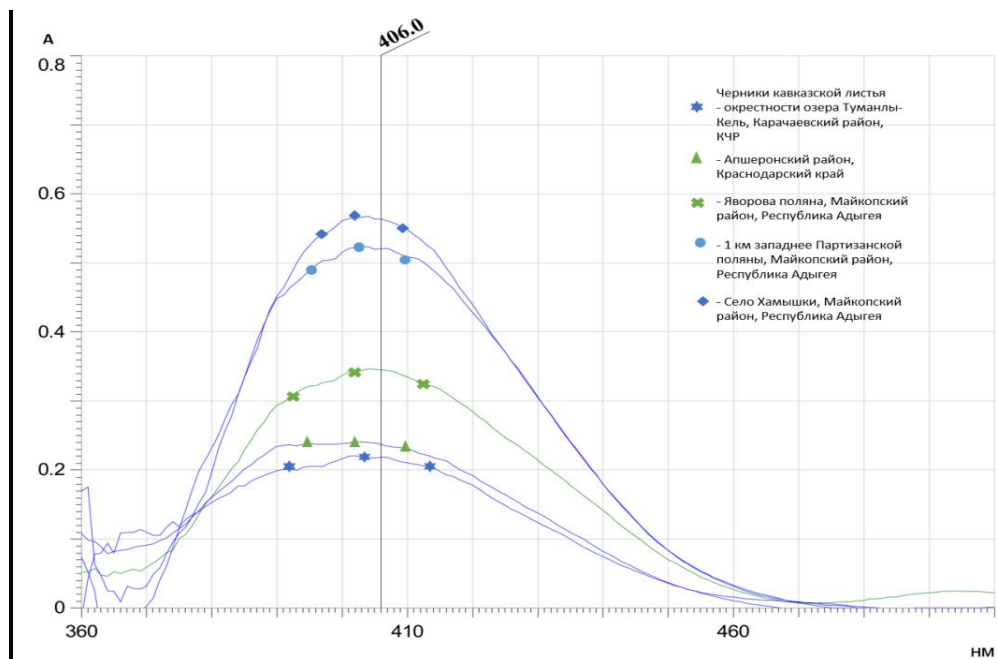
где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

330 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 406 нм;

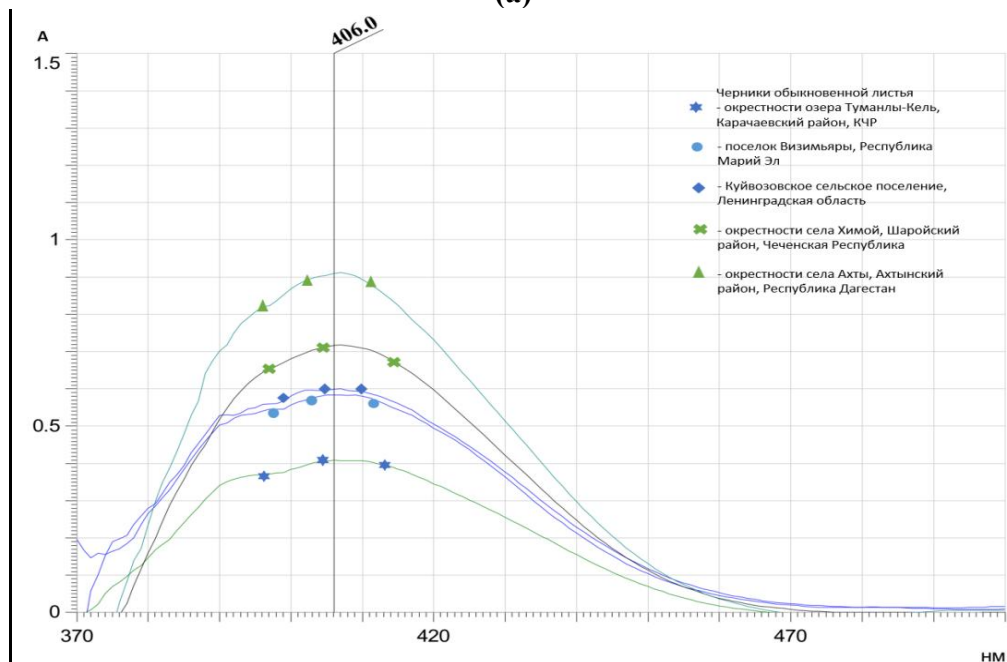
a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Спектры поглощения извлечений, полученных из черники листьев из различных мест произрастания, в сравнении со спектром СО гиперозида (методика приготовления раствора СО и спектр поглощения – см. раздел 6.2.1, рис. 6.9) представлены на рисунке 6.20.



(a)



(b)

Рисунок 6.20 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из черники листьев после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом: а – черники кавказской листьев; б – черники обыкновенной листьев

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрिलाбораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.25).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО гиперозида и извлечений из черники листьев (рис. 6.9 и 6.20).

Таблица 6.25 – Валидационные параметры методики анализа суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в чернике листьях

Параметр	Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0309x - 5 \cdot 10^{-7}$ R=0,99	R≥0,999
Прецизионность повторяемость	ε(%)=1,65	ε(%)≤5%
Внутрилабораторная прецизионность	RSD(%)=1,57 – 3,91	RSD(%)≤10
Правильность	0,10<2,31	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов черники листьев (табл. 6.26).

Таблица 6.26 – Содержание суммы флавоноидов в чернике листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	S_x	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черники обыкновенной листья</i>								
берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика (сентябрь 2019 г.)	6	5	1,23	0,0227	0,0093	2,57	0,02	1,95
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	6	5	1,21	0,0215	0,0088	2,57	0,02	1,85
Окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика (сентябрь 2020 г.)	6	5	1,43	0,0357	0,0146	2,57	0,04	2,63
Окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	6	5	0,84	0,0342	0,0140	2,57	0,04	4,27
Окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан (июль 2019 г.)	6	5	1,82	0,0459	0,0187	2,57	0,05	2,65
<i>Черники кавказской листья</i>								
Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	1,16	0,0182	0,0074	2,57	0,02	1,65
Яворова поляна, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	0,69	0,0187	0,0076	2,57	0,02	2,83
1 км западнее Партизанской поляны, Майкопский район, Республика Адыгея (сентябрь 2020 г.)	6	5	1,06	0,0364	0,0149	2,57	0,04	3,61
окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край (октябрь 2019 г.)	6	5	0,49	0,0193	0,0079	2,57	0,02	4,10
окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, КЧР (июнь 2019 г.)	6	5	0,45	0,0197	0,0080	2,57	0,02	4,55

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в чернике листьях не менее 0,4%.

6.3.3. Голубики обыкновенной листья

Ранее нами установлено, что маркерным компонентом листьев голубики обыкновенной является хлорогеновая кислота (раздел 4.2.1). Стандартизацию предложено проводить по сумме фенольных соединений методом прямой спектрофотометрии, по хлорогеновой кислоте как индивидуальному компоненту методом капиллярного электрофореза с подтверждением результатов методом ВЭЖХ, по сумме флавоноидов в пересчете на гиперозид как основной флавоноид [154].

Условия получения извлечения с максимальным содержанием фенольных соединений подбирали, измеряя светопоглощение растворов в диапазоне 200-400 нм (табл. 6.27).

Таблица 6.27 – Результаты подбора оптимальных условий получения извлечения для оценки показателя «количественное определение» из голубики обыкновенной листьев

Условия экстрагирования	Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в воздушно-сухом сырье, %
Степень измельченности сырья, мм	
1	9,09±0,17
2	8,33±0,16
3	7,39±0,11
Время экстракции, мин	
30	9,09±0,17
60	9,09±0,41
90	8,95±0,11
120	8,33±0,18
Экстрагент	
Вода очищенная	8,42±0,32
Спирт этиловый 40%	8,22±0,17
Спирт этиловый 70%	9,09±0,17
Спирт этиловый 96%	6,72±0,32
Соотношение сырье:экстрагент	
1:25	7,87±0,22
1:50	9,09±0,17
1:100	9,08±0,26

Извлечение из голубики обыкновенной листьев предложено получать по следующей схеме: точную навеску сырья с размером частиц в 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл. Далее добавляют 50 мл спирта этилового 70 %, закрывают колбу пробкой и взвешивают. Процесс экстракции начинается после закипания смеси на водяной бане с температурой 80-90 °С и подключенным обратным холодильником. Экстракцию

проводят в течение 30 минут. После окончания экстракции и охлаждения до комнатной температуры, восстанавливают потерю спирта этилового 70 % до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, получая раствор А. Далее, 2 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 25 мл, доводят до метки 70 % этиловым спиртом и перемешивают, получая раствор Б. 2 мл раствора Б помещают в мерную колбу объемом 25 мл, доводят до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают (раствор В). Измеряют оптическую плотность раствора В при длине волны 330 нм.

Содержание суммы фенольных соединений в голубике обыкновенной листьях рассчитывают по формуле 13 представленной ниже:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 0,5 \cdot a_{CO} \cdot 100 \cdot 100}{A_{CO} \cdot a_x \cdot 2 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (13),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора (раствор В);

A_{CO} – оптическая плотность раствора СО хлорогеновой кислоты;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения хлорогеновой кислоты по формуле 14:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot 2 \cdot 2 \cdot a_x \cdot (100 - W)} \quad (14),$$

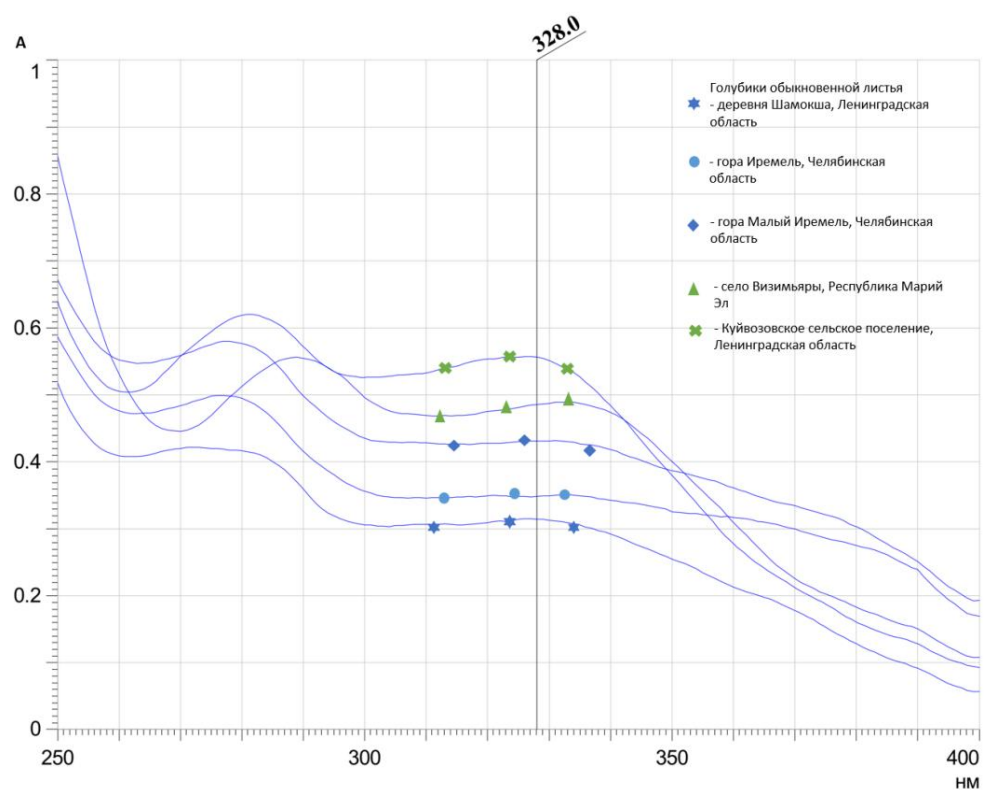
где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора В;

$A_{1cm}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507;

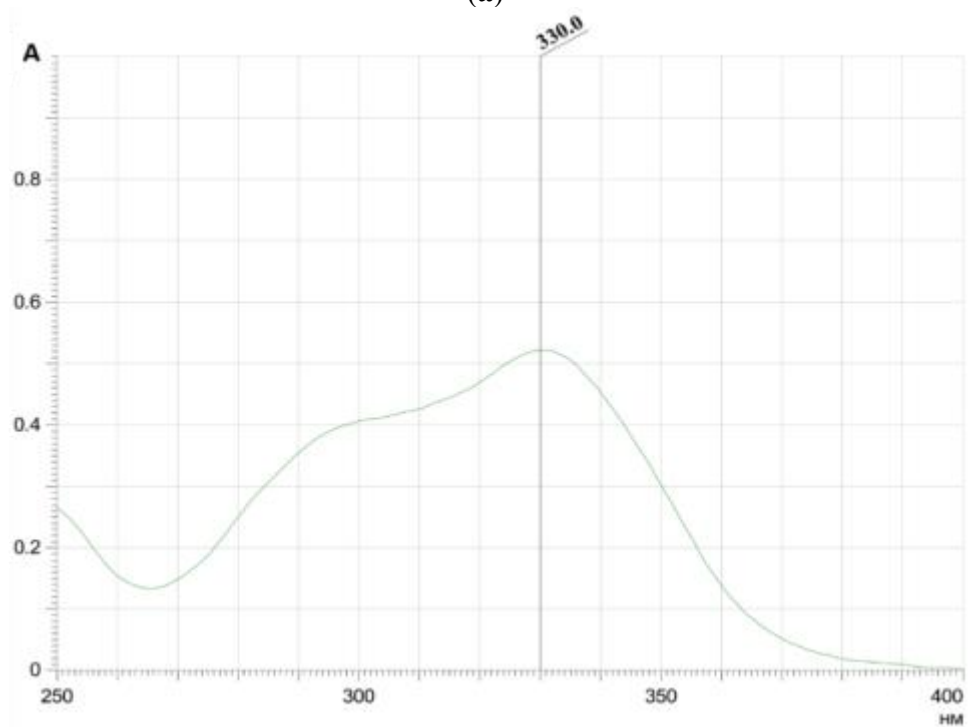
a_x – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Спектры поглощения извлечений из голубики обыкновенной листьев из 5 мест произрастания в сравнении со спектром СО хлорогеновой кислоты представлены на рисунке 6.21.



(a)



(b)

Рисунок 6.21 – УФ-спектры: (а) - водно-спиртового извлечения из листьев голубики обыкновенной: 1 - деревня Шамокша, Ленинградская область; 2 – гора Иремель, Челябинская область; 3 – гора Малый Иремель, Челябинская область; 4 – село Визимьяры, Республика Марий Эл; 5 – Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область; (b)–раствора СО хлорогеновой кислоты (0,01 мг/мл)

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.28).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО хлорогеновой кислоты и извлечений из голубики обыкновенной листьев (рис. 6.21).

Таблица 6.28 – Валидационные параметры методики анализа суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в голубике обыкновенной листьях

Параметр	Количественное определение суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0471x + 3 \cdot 10^{-6}$ R=0,99	R≥0,999
Прецизионность повторяемость	ε(%)=1,90	ε(%)≤5%
Внутрилабораторная прецизионность	RSD(%)=1,81 - 3,00	RSD(%)≤10
Правильность	1,07<2,31	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов голубики обыкновенной листьев (табл. 6.29).

Таблица 6.29 – Содержание суммы фенольных соединений в голубике обыкновенной листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Деревня Шамокша, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	4,94	0,1615	0,0659	2,57	0,17	3,43
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	9,09	0,1646	0,0672	2,57	0,17	1,90
гора Малый Ирмель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	7,03	0,2147	0,0877	2,57	0,23	3,20
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	6	5	7,88	0,2358	0,0963	2,57	0,25	3,14
Ирмель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	5,72	0,1342	0,0548	2,57	0,14	2,46

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в голубики обыкновенной листьях не менее 4,5 %.

Нами подобраны условия электрофоретического анализа хлорогеновой кислоты (анализ того же извлечения, раствор Б): рН буферного раствора (диапазон значений рН обусловлен значением константы ионизации хлорогеновой кислоты, равной 10,1), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.30) (Приложение 6, рис. 6.18-6.20). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91].

Таблица 6.30 – Результаты выбора оптимальных условий количественного определения хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
рН 8,6	67	25 мМ	153	+10 кВ	137
рН 8,8	88	50 мМ	221	+15 кВ	95
рН 9,0	121			+25 кВ	58
рН 9,2	132				
рН 9,4	49,6				
рН 9,6	78				
рН 9,8	37				

Примечание: ТТТ – тысяч теоретических тарелок; мМ – миллимолярный раствор; кВ – киловольт

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из голубики обыкновенной листьев являются: 10 мМ боратный буферный раствор с рН 9,2, напряжение в капилляре +20 кВ. Использование буферного раствора с концентрацией натрия тетрабората 50 мМ, несмотря на высокую эффективность разделения, нецелесообразно в виду перегруженности капилляра и уширения пика компонента [91].

Таким образом, предложена следующая методика анализа содержания хлорогеновой кислоты в голубике обыкновенной листьях: точную навеску сырья с размером частиц в 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл. Далее добавляют 50 мл спирта этилового 70 %, закрывают колбу пробкой и взвешивают. Процесс экстракции начинается после закипания смеси на водяной бане с температурой 80-90 °С и подключенным обратным холодильником. Экстракцию проводят в течение 30 минут. После окончания экстракции и охлаждения до комнатной температуры, восстанавливают потерю спирта этилового 70 % до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Далее, 2 мл помещают в мерную колбу объемом 25 мл, доводят до метки

70% этиловым спиртом и перемешивают. Затем, один миллилитр извлечения подвергается центрифугированию со скоростью 8000 оборотов в минуту в течение пяти минут, после чего производится анализ в соответствии с выбранными условиями [154].

Содержание хлорогеновой кислоты в голубики обыкновенной листьях в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывают по форму 15 представленной ниже:

$$C, \% = \frac{C_{\text{мг/мл}} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} \quad (15),$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ - концентрация хлорогеновой кислоты в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рисунок 6.18, раздел 6.3.2);

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.31).

Специфичность методики подтверждали по совпадению миграции и характеру пика хлорогеновой кислоты в извлечении из голубики обыкновенной листьев и в растворе СО хлорогеновой кислоты (Приложение 6, рис. 6.21).

Таблица 6.31 – Валидационные параметры методики анализа хлорогеновой кислоты в голубике обыкновенной листьях

Параметр	Количественное определение хлорогеновой кислоты	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 9413,5x + 7,0339$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=3,73$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=2,84 - 4,09$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$0,55 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов голубики обыкновенной листьев (табл. 6.32) (Приложение 6, ри. 6.21).

Таблица 6.32 – Содержание хлорогеновой кислоты в голубике обыкновенной листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом капиллярного электрофореза

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Деревня Шамокша, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	1,87	0,0589	0,0240	2,57	0,06	3,31
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	4,34	0,1543	0,0630	2,57	0,16	3,73
гора Малый Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	1,83	0,0836	0,0341	2,57	0,09	4,79
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	6	5	4,01	0,1139	0,0465	2,57	0,12	2,98
Иремель, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	1,75	0,0796	0,0325	2,57	0,08	4,76

Результаты исследования позволяют установить нижний предел содержания компонента хлорогеновой кислоты в голубики обыкновенной листьях методом КЭ - не менее 1,5 %.

Результаты анализа хлорогеновой кислоты методом КЭ подтверждали при анализе того же образца сырья (Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.) методом ВЭЖХ. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 6.22, хроматограмма раствора СО хлорогеновой кислоты – на рисунке 6.23.

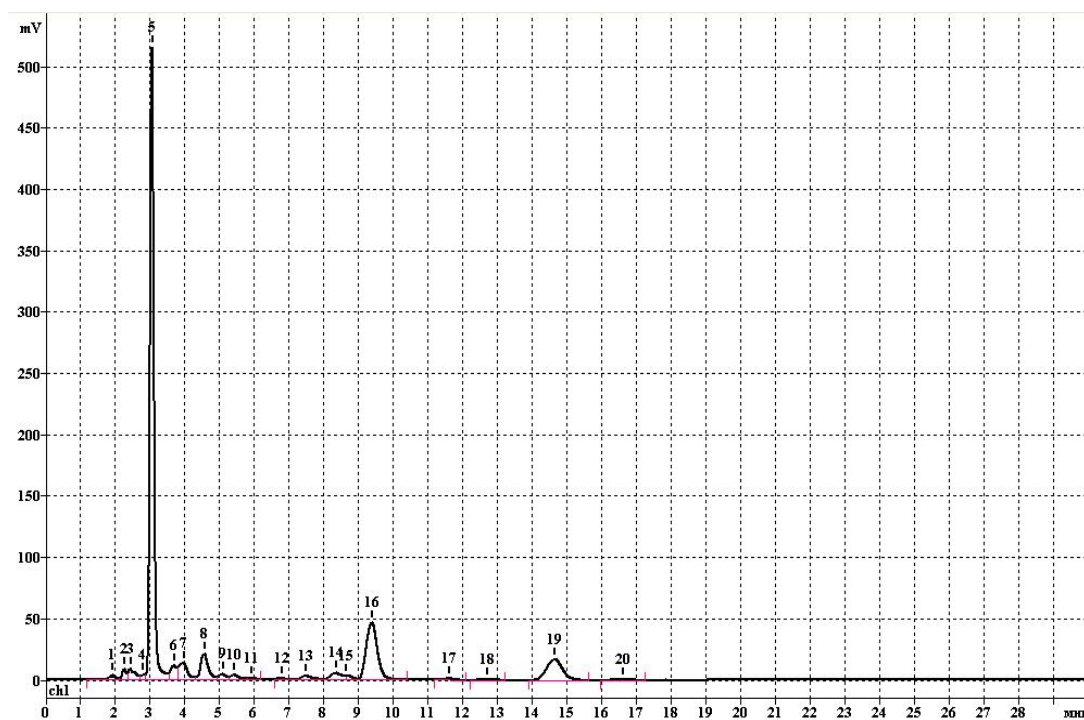


Рисунок 6.22 – Хроматограмма извлечения из голубики обыкновенной листьев

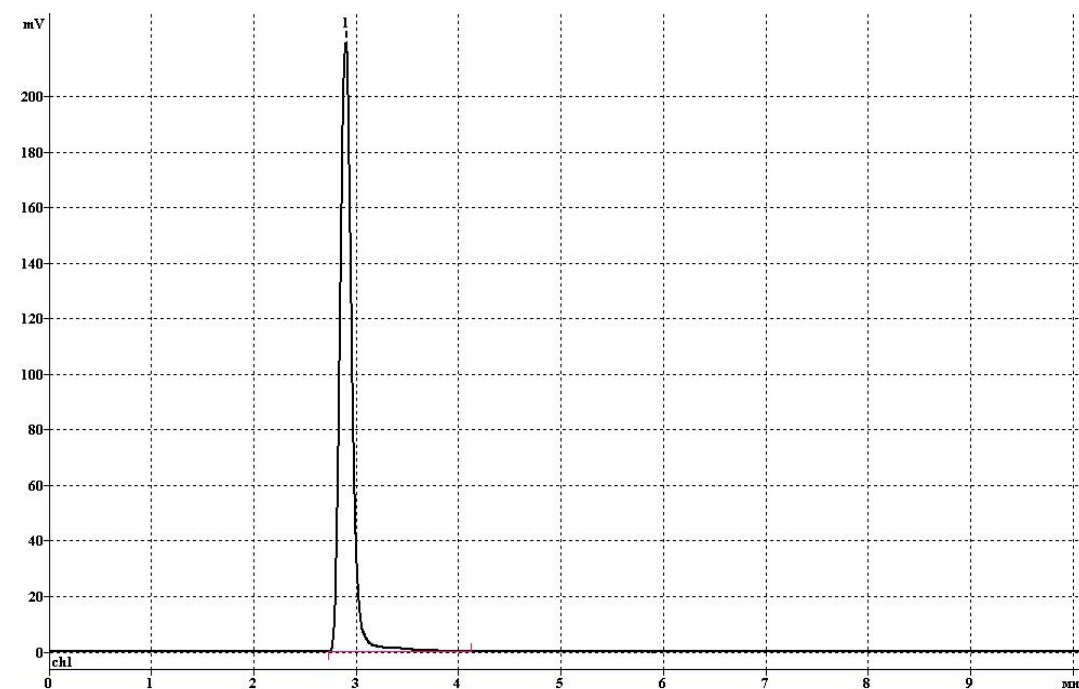


Рисунок 6.23 – Хроматограмма раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты

Как следует из представленных данных, на хроматограмме растительного извлечения присутствует основной пик со временем удерживания 3,06 мин, совпадающий со временем удерживания пика на хроматограмме раствора СО кислоты хлорогеновой. В диапазоне концентраций 0,000796 – 0,009552 % соблюдалась линейная зависимость между концентрацией кислоты хлорогеновой и площадью пика (рис. 6.24).

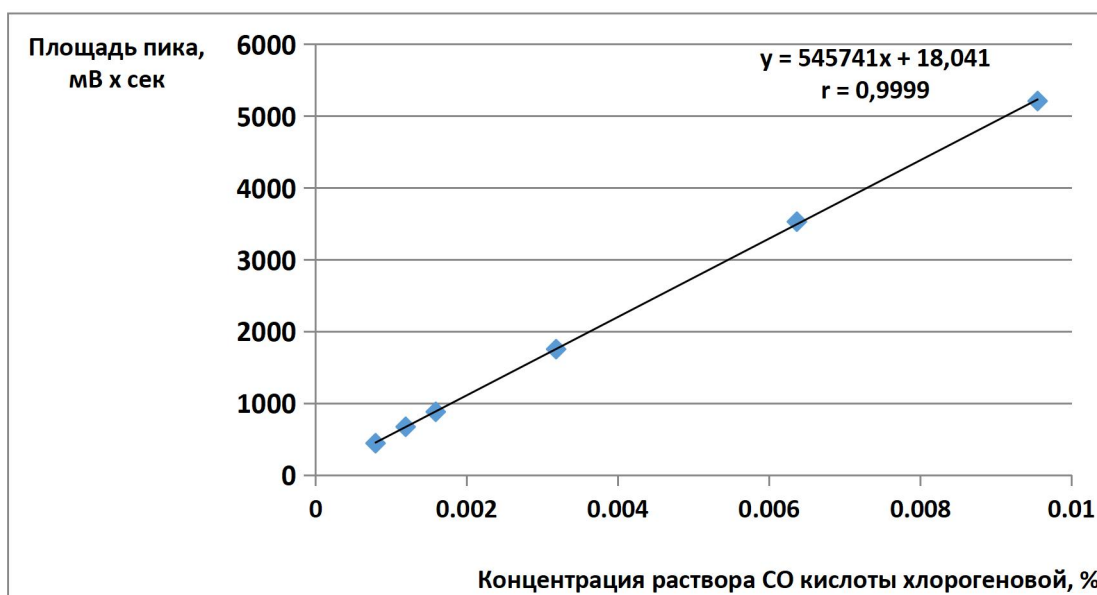


Рисунок 6.24 – График линейной зависимости площади пика от концентрации раствора СО кислоты хлорогеновой

По данным рисунка 6.24 линейная зависимость описывается уравнением вида $y = bx + a$, где $b = 545741$; $a = 18,041$; коэффициент корреляции составляет 0,99. Линейный регрессионный анализ методом наименьших квадратов показывает статистическую незначимость

коэффициента a , что свидетельствует об удовлетворительной правильности методики. Полученный график линейности использовали для расчета количественного содержания хлорогеновой кислоты в голубики обыкновенной листьях

Результаты установления количественного содержания в пересчете на сухое сырье представлены в таблице 6.33.

Таблица 6.33 – Результаты количественного определения хлорогеновой кислоты в голубике болотной листьях методом ВЭЖХ

№	Навеска, г	Площадь пика хлорогеновой кислоты, мВ · сек	Содержание хлорогеновой кислоты в голубике болотной листьях, %	Метрологические характеристики
1.	1,0040	4178,81	4,13	$\bar{X} = 4,12$ $S_x = 0,142267$ $S_{\bar{x}} = 0,05808$ $\Delta x = 0,15$ $\varepsilon = 3,62\%$
2.	1,0028	4243,02	4,19	
3.	1,0098	4415,21	4,36	
4.	1,0017	4101,21	4,05	
5.	1,0022	4086,12	4,03	
6.	1,0016	4012,11	3,96	

Полученные результаты свидетельствуют, что среднее содержание хлорогеновой кислоты в исследуемом образце составляет $4,12 \pm 0,15\%$ (относительная погрешность определения $\pm 3,62\%$), что сопоставимо с результатами КЭ – $4,34 \pm 0,16\%$.

Также разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид как один из основных флавоноидов (ГЛАВА 4). В анализе использовали то же водно-спиртовое извлечение из голубики обыкновенной листьев (раствор А). Для количественного определения флавоноидов отбирают две аликвоты объемом 1 мл, помещают в мерные колбы объемом 25 мл, в обе колбы вносят по 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и в одну колбу вносят 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2%. В обеих колбах доводят объем растворов до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 406 нм, при этом раствор без алюминия хлорид является раствором сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 16:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ct} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ct} \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - W)} \quad (16),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{ct} – оптическая плотность раствора СО гиперозида;

a_{ct} – навеска стандартного образца, г;

a – навеска навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид возможно вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом по формуле 17:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot 330 \cdot 1 \cdot (100 - W)} \quad (17)$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

330 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 406 нм;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Спектры поглощения извлечений, полученных из голубики обыкновенной листьев из различных мест произрастания, в сравнении со спектром СО гиперозида (методика приготовления раствора СО и спектр поглощения – см. раздел 6.2.1, рис. 6.9) представлены на рисунке 6.25.

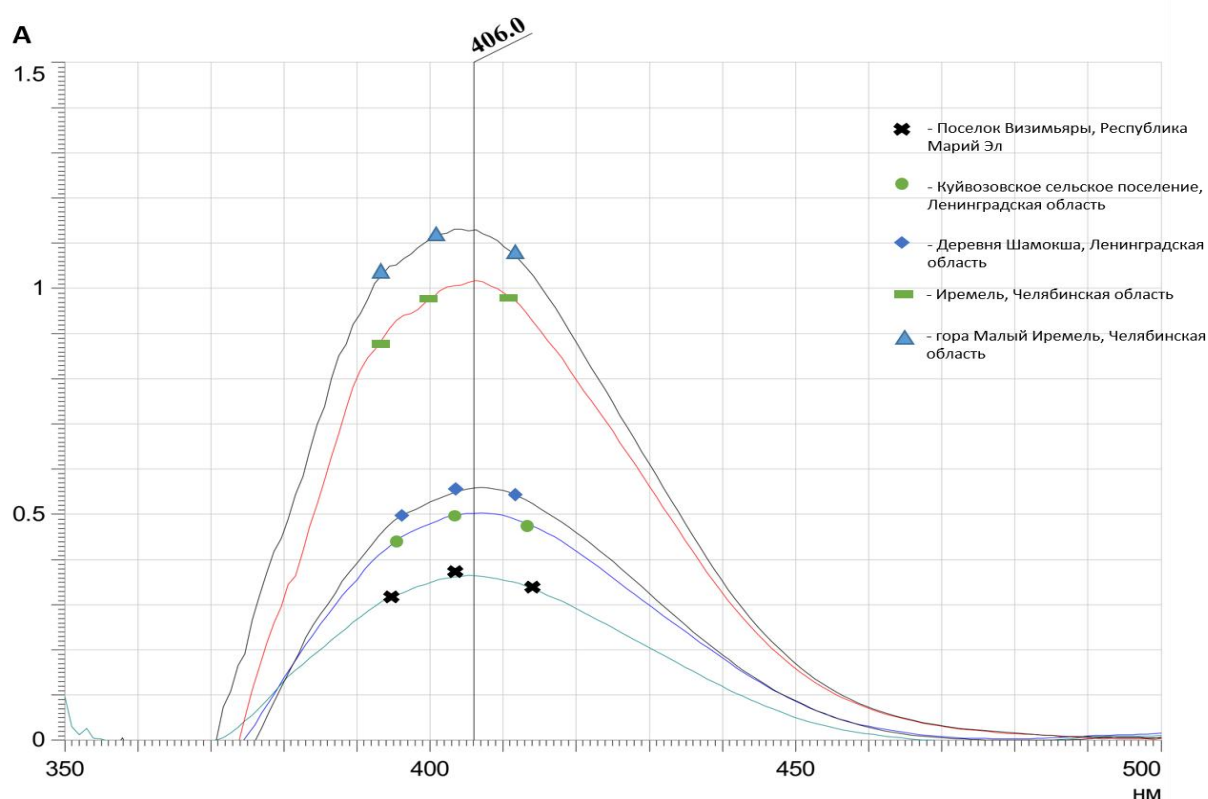


Рисунок 6.25 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из голубики обыкновенной листьев после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность

(шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.34).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО гиперозидов и извлечений из голубики обыкновенной листьев (рис. 6.9 и 6.25).

Таблица 6.34 – Валидационные параметры методики анализа суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в голубики обыкновенной листьях

Параметр	Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0307x - 3 \cdot 10^{-6}$ R=0,99	R≥0,999
Прецизионность повторяемость	ε(%)=1,51	ε(%)≤5%
Внутрилабораторная прецизионность	RSD(%)=1,44 – 3,67	RSD(%)≤10
Правильность	0,32<2,31	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов голубики обыкновенной листьев (табл. 6.35).

Таблица 6.35 – Содержание суммы флавоноидов в голубики обыкновенной листьях, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Деревня Шамокса, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	2,23	0,0410	0,0167	2,57	0,04	1,93
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	2,09	0,0300	0,0123	2,57	0,03	1,51
гора Малый Иремль, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	4,56	0,1181	0,0482	2,57	0,12	2,72
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (август 2019 г.)	6	5	1,46	0,0291	0,0119	2,57	0,03	2,10
Иремль, Челябинская область (июнь 2019 г.)	6	5	4,00	0,1470	0,0600	2,57	0,15	3,85

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в голубики обыкновенной листьях не менее 1,0 %.

6.3.4. Клюквы болотной побеги

Ранее нами установлено, что доминирующим компонентом побегов клюквы болотной является хлорогеновая кислота (Раздел 4.2.1). Стандартизацию предложено проводить по хлорогеновой кислоте как индивидуальному компоненту методом капиллярного электрофореза с подтверждением результатов методом ВЭЖХ, по сумме флавоноидов в пересчете на рутин как основной флавоноид.

При разработке методики определения суммы флавоноидов нами подобраны условия получения извлечения с максимальным содержанием флавоноидов (табл. 6.36).

Таблица 6.36 – Результаты подбора оптимальных условий получения извлечения для оценки показателя «количественное определение» из клюквы болотной побегов

Условия экстрагирования	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в воздушно-сухом сырье, %
Степень измельченности сырья, мм	
1	2,35±0,03
2	1,40±0,07
3	1,47±0,05
Время экстракции, мин	
30	2,17±0,05
45	2,35±0,03
60	1,95±0,05
90	2,26±0,05
120	2,17±0,05
Экстрагент	
Вода очищенная	1,33±0,03
Спирт этиловый 40%	2,25±0,05
Спирт этиловый 70%	2,35±0,03
Спирт этиловый 96%	1,94±0,06
Соотношение сырье:экстрагент	
1:25	2,18±0,05
1:50	2,35±0,03
1:100	2,30±0,11

Извлечение из клюквы болотной побегов предложено получать по следующей схеме: точную навеску сырья с размером частиц 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл, добавляют спирт этиловый 70% объемом 50 мл, колбу закрывают пробкой и взвешивают. Экстракцию ведут в течение 45 минут с момента закипания экстракционной смеси на водяной бане с температурой 80-90 °С и подключенным обратным холодильником. После окончания экстракции и охлаждения полученного извлечения до комнатной температуры потерю спирта этилового 70 % восполняют до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А). По 1 мл раствора А помещают в две мерные колбы объемом 25 мл, добавляют в обе колбы по 0,5 мл уксусной кислоты 33 %, в одну из колб вносят 2 мл алюминия хлорида спиртового

раствора 2%, доводят до метки спиртом этиловым 70 % обе колбы и перемешивают Раствор, не содержащий алюминия хлорид, является раствором сравнения. Измеряют оптическую плотность растворов через 40 минут при длине волны 410 нм.

Содержание суммы флавоноидов в клюкве болотной побегах рассчитывают по формуле 18:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot a_{CO} \cdot 100 \cdot 100}{A_{CO} \cdot a_x \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (18),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{CO} – оптическая плотность раствора СО рутина;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО, г;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения рутина по формуле 19:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 1 \cdot a_x \cdot (100 - W)} \quad (19),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора В;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина при длине волны 410 нм, равный 249;

a_x – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора СО рутина

Около 0,05 г (точная навеска), высушенного при температуре 132-135 °С в течение 2-х часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 70 мл спирта этилового 96%, доводят до метки этим же растворителем (раствор СО рутина).

2 мл раствора СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 70 %, 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки, перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно раствора сравнения, приготовленного по схеме: 2 мл раствора СО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 70 %, 0,5 мл уксусной кислоты 33 %, доводят объем раствора спиртом этиловым 70 % до метки и перемешивают.

Раствор устойчив в течение 30 дней при хранении в темном месте в хорошо закупоренной склянке.

Спектры поглощения извлечений из клюквы болотной побегов из 5 мест произрастания в сравнении со спектром СО рутина представлены на рисунке 6.26 и 6.27.

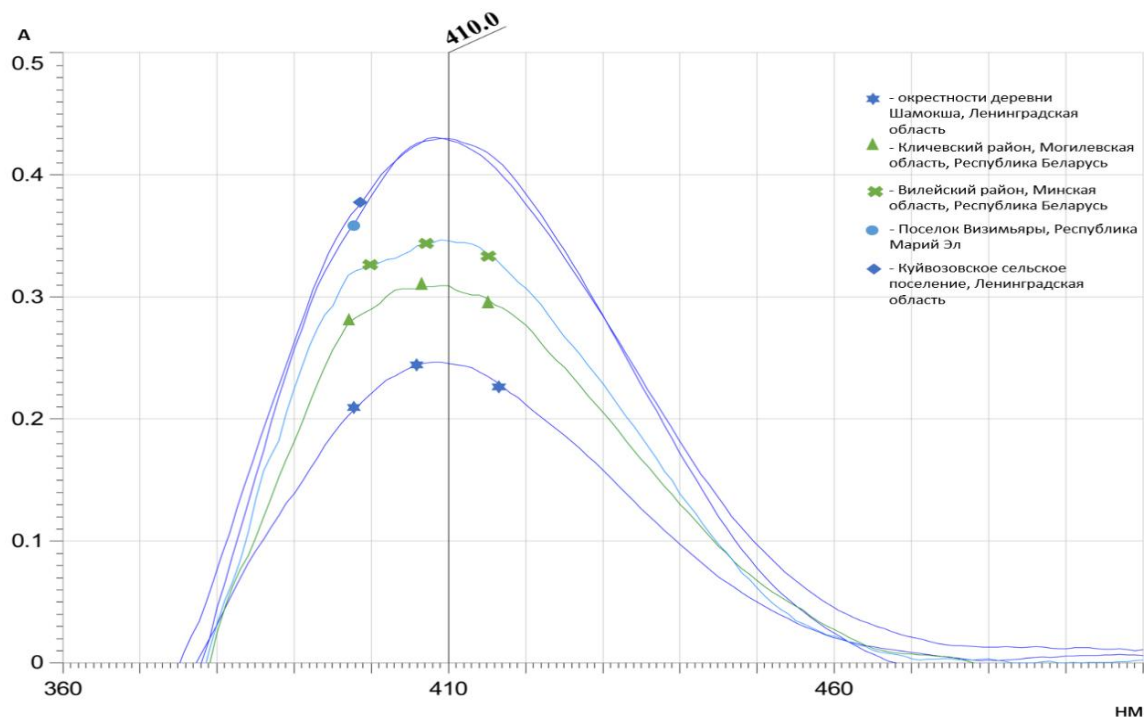


Рисунок 6.26 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из клюквы болотной побегов после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

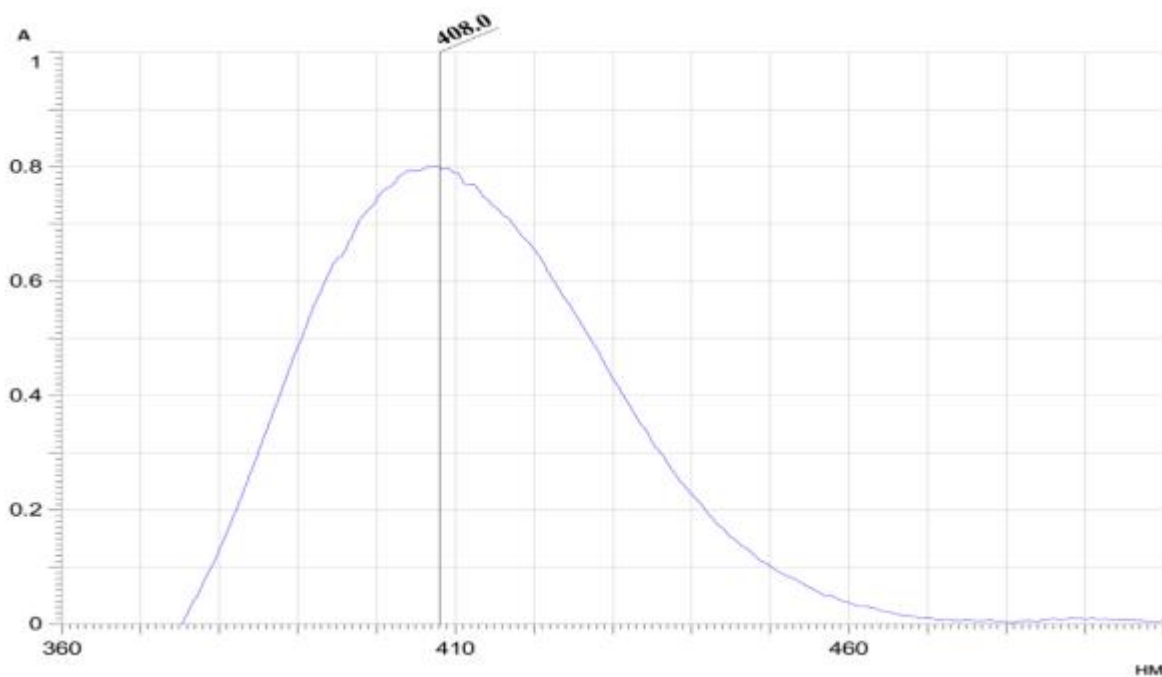


Рисунок 6.27 – УФ-спектр СО рутина (0,05 г в 100 мл спирта этилового 96 % - 2 мл в 25 мл доведенный до метки спиртом этиловым 70%) после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор

анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.37).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО рутина и извлечений из клюквы болотной побегов (рис. 6.26 и 6.27).

Таблица 6.37 – Валидационные параметры методики анализа суммы флавоноидов в пересчете на рутин в клюкве болотной побегах

Параметр	Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0233x - 3 \cdot 10^{-5}$ R=0,99	R $\geq$ 0,999
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=1,32$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	RSD(%)=1,05 - 2,10	RSD(%) $\leq$ 10
Правильность	2,09<2,31	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов клюквы болотной побегов (табл. 6.38).

Таблица 6.38 – Содержание суммы флавоноидов в клюкве болотной побегах, собранных в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Деревня Шамокша, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	1,30	0,0264	0,0108	2,57	0,03	2,13
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	2,35	0,0295	0,0121	2,57	0,03	1,32
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (сентябрь 2019 г.)	6	5	2,33	0,0244	0,0100	2,57	0,03	1,10
Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь (август 2021 г.)	6	5	1,86	0,0282	0,0115	2,57	0,03	1,59
Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь (август 2021 г.)	6	5	1,72	0,0362	0,0148	2,57	0,04	2,20

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в клюкве болотной побегах не менее 1,0 %.

При спектрофотометрическом исследовании из раствора А, отбирали аликвоту 1 мл, помещали в мерную колбу объемом 50 мл, доводили до метки спиртом этиловым 70 % затем перемешивали, установлен максимум светопоглощения при 358 нм. Спектры поглощения извлечений всех образцов клюквы болотной побегов представлены на рисунке 6.28.

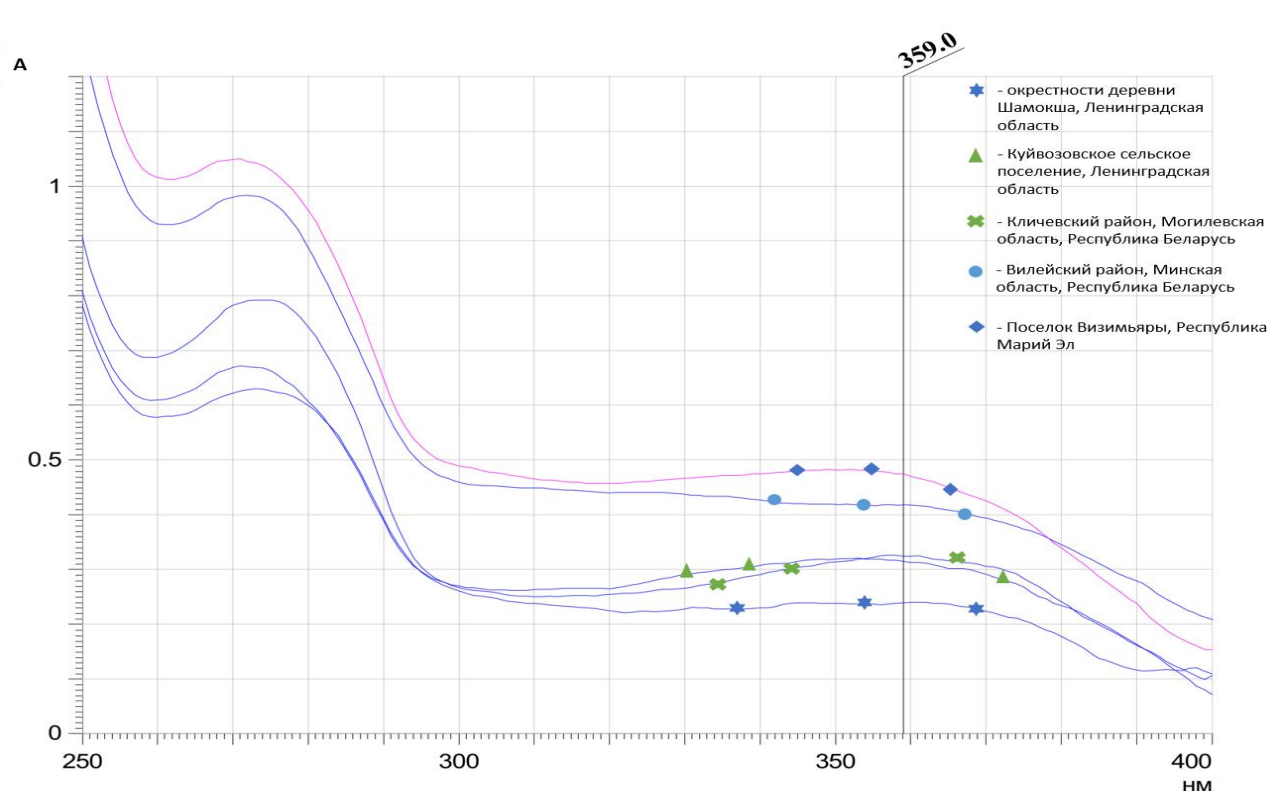


Рисунок 6.28 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из клюквы болотной побегов

Максимум светопоглощения извлечений из побегов клюквы не совпадает с максимумом светопоглощения СО хлорогеновой кислоты (раздел 6.2.2). Вероятно, в суммарное светопоглощение извлечений вносят сопутствующие фенольные соединения, что обуславливает сдвиг максимума.

Нами подобраны условия электрофоретического анализа хлорогеновой кислоты (анализ того же извлечения, раствор А): рН буферного раствора (диапазон значений рН обусловлен значением константы ионизации хлорогеновой кислоты, равной 10,1), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.39) (Приложение 6, рис. 6.22 – 6.24). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91].

Таблица 6.39– Результаты выбора оптимальных условий количественного определения хлорогеновой кислоты методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
рН 8,6	-	25 мМ	-	+10 кВ	20,5
рН 8,8	-	50 мМ	34,5	+15 кВ	-
рН 9,0	-			+25 кВ	4,9

pH 9,2	33,6				
pH 9,4	10,9				
pH 9,6	Ассиметрия пика				
pH 9,8	-				

Примечание: ТТТ – тысяч теоретических тарелок; mM – миллимолярный раствор; кВ – киловольт; - – нет разделения

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из голубики обыкновенной листьев являются: 10 mM боратный буферный раствор с pH 9,2, напряжение в капилляре +20 кВ. Использование буферного раствора с концентрацией натрия тетрабората 50 mM, несмотря на схожую эффективность разделения, нецелесообразно в виду перегруженности капилляра и уширения пика компонента [91].

Таким образом, нами предложена следующая методика анализа содержания хлорогеновой кислоты в клюкве болотной побегах: точную навеску сырья с размером частиц в 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл. Далее добавляют 50 мл спирта этилового 70 %, закрывают колбу пробкой и взвешивают. Процесс экстракции начинается после закипания смеси на водяной бане с температурой 80-90 °C и подключенным обратным холодильником. Экстракцию проводят в течение 45 минут. После окончания экстракции и охлаждения до комнатной температуры, восстанавливают потерю спирта этилового 70 % до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, получая раствор А. Далее, 5 мл извлечения вносят в мерную колбу объемом 25 мл, доводят до метки 70 % этиловым спиртом и перемешивают. Затем, один миллилитр извлечения подвергается центрифугированию со скоростью 8000 оборотов в минуту в течение пяти минут, после чего производится анализ в соответствии с выбранными условиями.

Содержание хлорогеновой кислоты в клюкве болотной побегах в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывают по нижеприведенной формуле 20:

$$C, \% = \frac{C_{\text{мг/мл}} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (20),$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ - концентрация хлорогеновой кислоты в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рисунок 6.18, раздел 6.3.2);

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл.6.40).

Специфичность методики подтверждали по совпадению миграции и характеру пика хлорогеновой кислоты в извлечении из клюквы болотной побегов и в растворе СО хлорогеновой кислоты (Приложение 6, рис. 6.25).

Таблица 6.40 – Валидационные параметры методики анализа хлорогеновой кислоты в клюкве болотной побегов

Параметр	Количественное определение хлорогеновой кислоты	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 9413,5x + 7,0339$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=1,68$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=1,60 - 4,42$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$2,03 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов клюквы болотной побегов (таблица 6.41) (Приложение 6, рис. 6.25).

Таблица 6.41 – Содержание хлорогеновой кислоты образцов клюквы болотной побегов, собранных в различных местах произрастания, установленное методом КЭ

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
Деревня Шамокса, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	0,76	0,0337	0,0138	2,57	0,04	4,64
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	2,10	0,0336	0,0137	2,57	0,04	1,68
Поселок Визимьяры, Республика Марий Эл (сентябрь 2019 г.)	6	5	2,36	0,0426	0,0174	2,57	0,05	1,90
Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь (август 2021 г.)	6	5	0,87	0,0303	0,0124	2,57	0,03	3,63
Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь (август 2021 г.)	6	5	1,19	0,0483	0,0197	2,57	0,05	4,26

Результаты исследования позволяют установить нижний предел содержания компонента хлорогеновой кислоты в клюкве болотной побегов не менее 0,5 %.

Результаты анализа хлорогеновой кислоты методом КЭ подтверждали при анализе того же образца сырья (Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)

методом ВЭЖХ. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 6.29, хроматограмма раствора СО хлорогеновой кислоты – на рисунке 6.30.

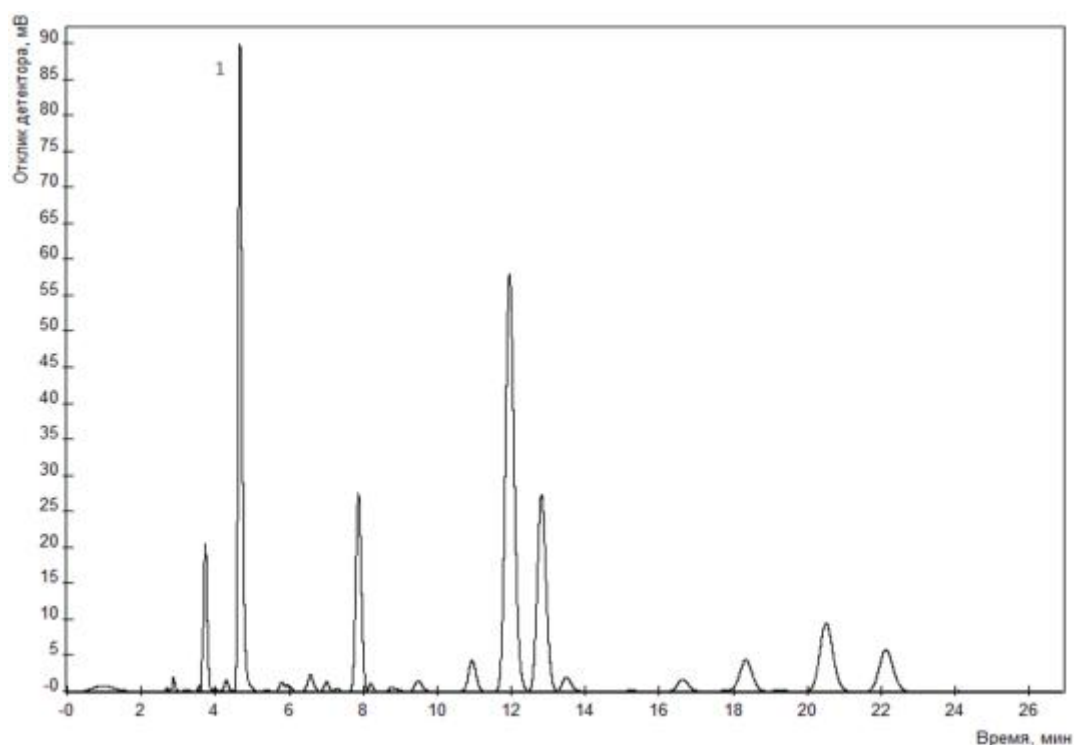


Рисунок 6.29– Хроматограмма извлечения из клюквы болотной побегов: 1 – хлорогеновая кислота

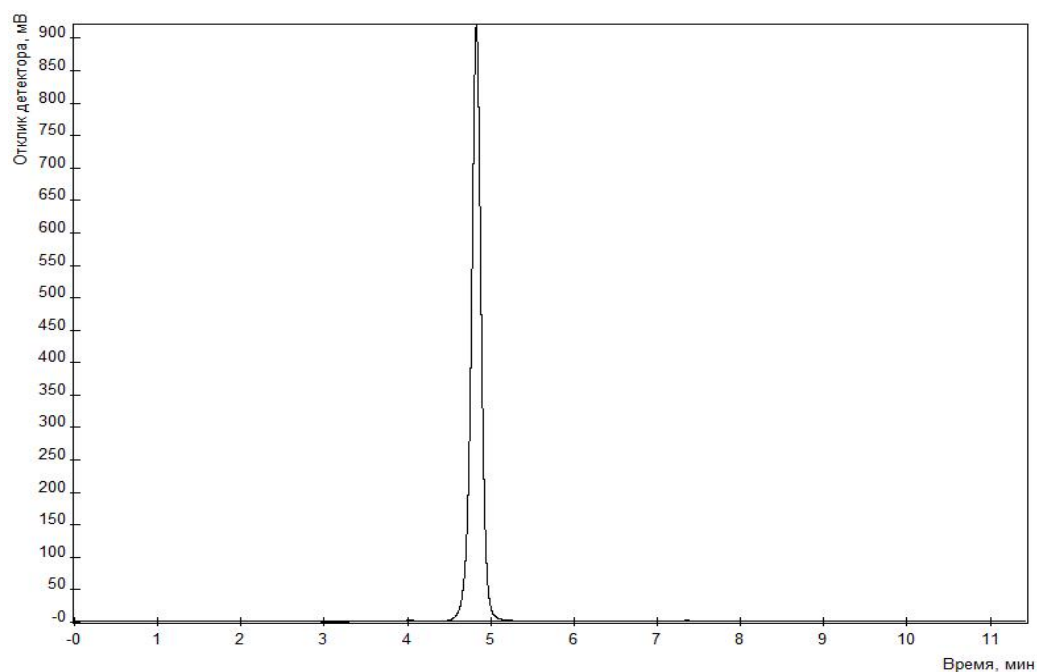


Рисунок 6.30 - Хроматограмма раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты (0,253 мг/мл)

Расчет количественного содержания хлорогеновой кислоты проводили по нижепредставленной формуле 21:

$$X, \% = \frac{S_x \cdot a_{CO} \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{S_{CO} \cdot 10 \cdot 10 \cdot a_x \cdot 1,5 \cdot (100 - W) \cdot 100} \quad (21),$$

где S_x – площадь пика хлорогеновой кислоты в извлечении, мВ;

S_{CO} – площадь пика СО хлорогеновой кислоты, мВ;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО, г;

P – содержание хлорогеновой кислоты в субстанции СО, %;

W – влажность сырья, %.

Результаты количественного содержания в пересчете на воздушно-сухое в сырье клюквы болотной представлены в таблице 6.42.

Таблица 6.42 – Результаты количественного определения хлорогеновой кислоты в клюкве болотной побегах методом ВЭЖХ

№	Навеска, г	Площадь пика хлорогеновой кислоты, мВ · сек	Содержание хлорогеновой кислоты в клюквы болотной побегах, %	Метрологические характеристики
1.	1,0030	11,969	2,12	$\bar{X} = 2,04$ $S_x = 0,0906$ $S_{\bar{x}} = 0,0370$ $\Delta x = 0,10$ $\varepsilon = 4,66\%$
2.	1,0045	11,054	1,96	
3.	1,0015	11,035	1,96	
4.	1,0004	12,034	2,14	
5.	1,0002	11,831	2,10	
6.	1,0014	11,014	1,95	

Полученные результаты методом ВЭЖХ свидетельствуют, что среднее содержание хлорогеновой кислоты в исследуемом образце составляет $2,04 \pm 0,10$ % (относительная погрешность определения $\pm 4,66$ %), что сопоставимо с результатами КЭ – $2,10 \pm 0,04$ %.

6.4. Стандартизация сырья видов рода *Prunella* L.

6.4.1. Черноголовки трава

Ранее нами установлено, что мажорным компонентом травы черноголовок является розмариновая кислота (Глава 4). Стандартизацию предложено проводить по сумме фенольных соединений методом прямой спектрофотометрии, по розмариновой кислоте как индивидуальному компоненту методом капиллярного электрофореза с подтверждением результатов методом ВЭЖХ, по сумме флавоноидов в пересчете на рутин как основной флавоноид.

Условия получения извлечения с максимальным содержанием фенольных соединений подбирали, измеряя светопоглощение растворов в диапазоне 200-400 нм (табл. 6.43, образец 1 чернойголовки обыкновенной трава).

Таблица 6.43 – Результаты подбора оптимальных условий получения извлечения для оценки показателя «количественное определение» из чернойголовки травы

Условия экстрагирования	Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в воздушно-сухом сырье, %
Степень измельченности сырья, мм	
1	5,46±0,09
2	4,87±0,15
3	4,19±0,11
Время экстракции, мин	
30	5,07±0,13
60	5,46±0,09
90	5,33±0,12
120	5,46±0,18
Экстрагент	
Вода очищенная	4,01±0,13
Спирт этиловый 40%	4,62±0,14
Спирт этиловый 70%	5,46±0,09
Спирт этиловый 96%	4,41±0,14
Соотношение сырье:экстрагент	
1:25	5,01±0,06
1:50	5,46±0,09
1:100	5,37±0,20

Извлечение из чернойголовки травы предложено получать по следующей схеме: точную навеску сырья с размером частиц в 1 мм в количестве 1,0 г помещают в коническую колбу объемом 250 мл. Далее добавляют 50 мл спирта этилового 70 %, закрывают колбу пробкой и взвешивают. Процесс экстракции начинается после закипания смеси на водяной бане с температурой 80-90 °С и подключенным обратным холодильником. Экстракцию проводят в течение 60 минут. После окончания экстракции и охлаждения до комнатной температуры, восстанавливают потерю спирта этилового 70 % до первоначальной массы, взвешивая колбу с извлечением. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, получая раствор А. Далее, 0,5 мл извлечения вносят в мерную колбу объемом 50 мл, доводят до метки 70 % этиловым спиртом и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность раствора Б при длине волны 328 нм.

Содержание суммы фенольных соединений в чернойголовке траве рассчитывают по нижепредставленной формуле 22:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 50 \cdot 1 \cdot a_{CO} \cdot 100 \cdot 100}{A_{CO} \cdot a_x \cdot 0,5 \cdot 100 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \quad (22),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора (раствор В);

A_{CO} – оптическая плотность раствора СО розмариновой кислоты;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО, г;

W – влажность сырья, %.

Также можно проводить расчет суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения розмариновой кислоты:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 0,5 \cdot a_x \cdot (100 - W)} \quad (23),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения розмариновой кислоты при длине волны 328 нм, равный 500;

a_x – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Приготовление раствора СО розмариновой кислоты

Около 0,05 г (точная навеска) СО розмариновой кислоты помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 80 мл спирта этилового 70 %, после полного растворения доводят раствор до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают (раствор А СО хлорогеновой кислоты). Срок годности раствора 3 месяца в прохладном месте.

1 мл раствора А СО розмариновой кислоты помещают в мерную колбу объемом 100 мл, доводят до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают (раствор Б СО розмариновой кислоты).

Спектры поглощения извлечений из черноголовки травы из 5 мест произрастания для каждого из трех видов и раствора СО розмариновой кислоты представлены на рисунке 6.31 и 6.32.

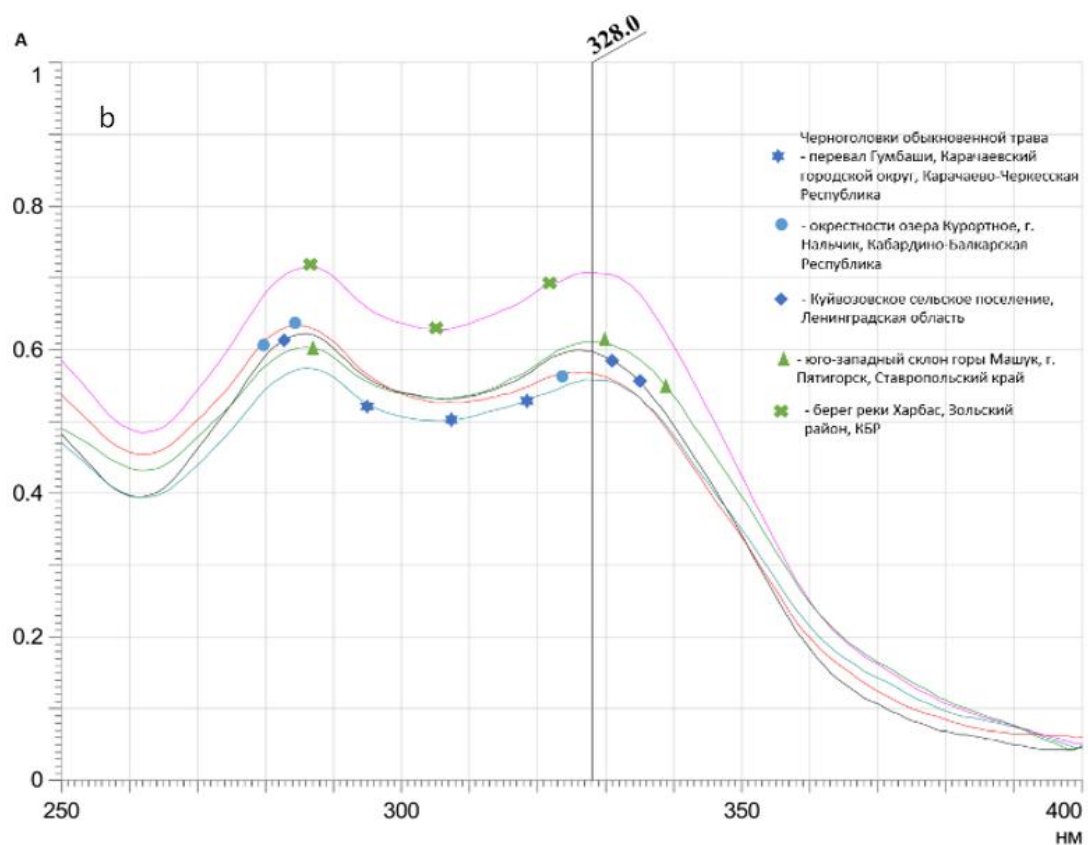
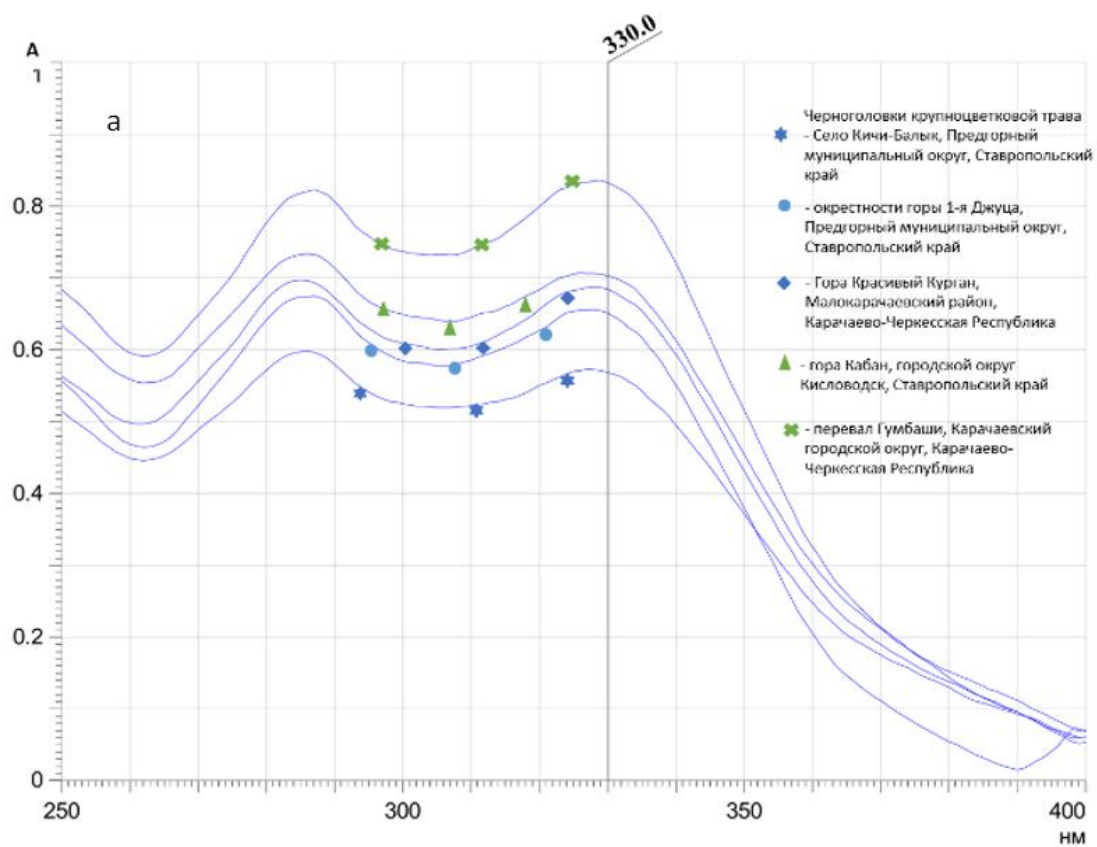
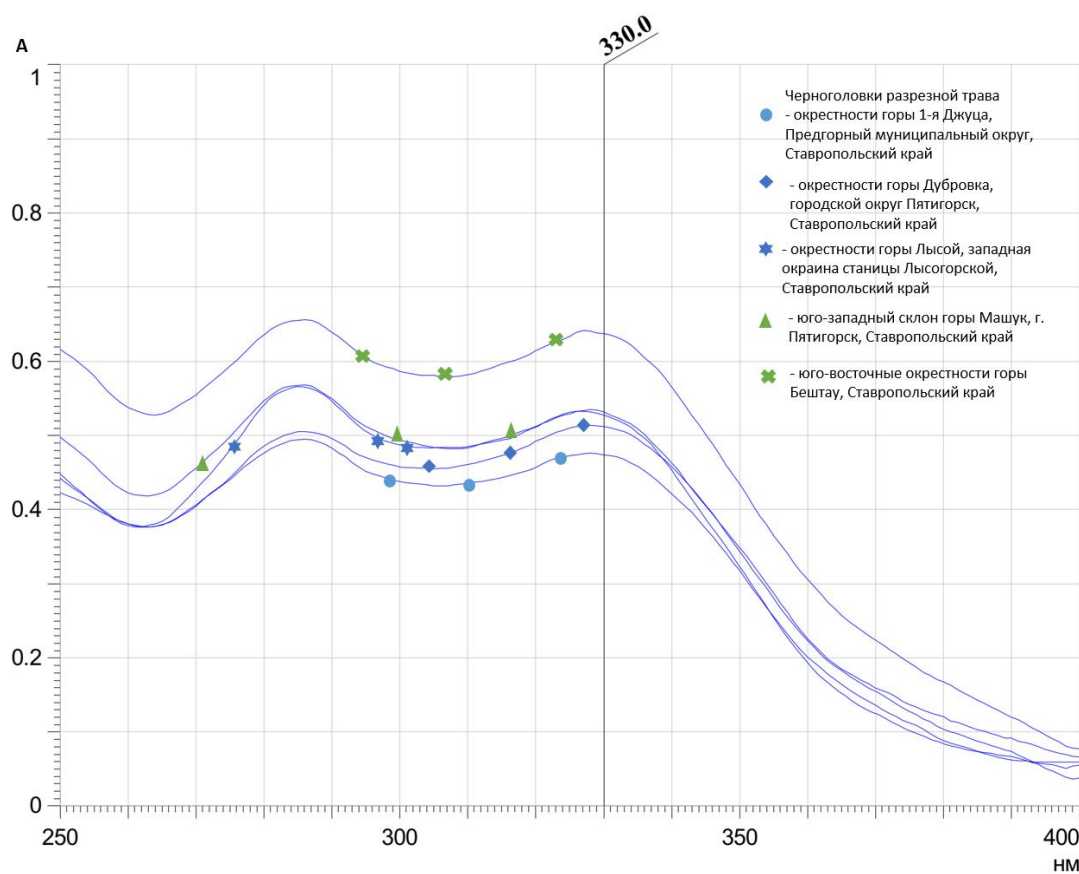
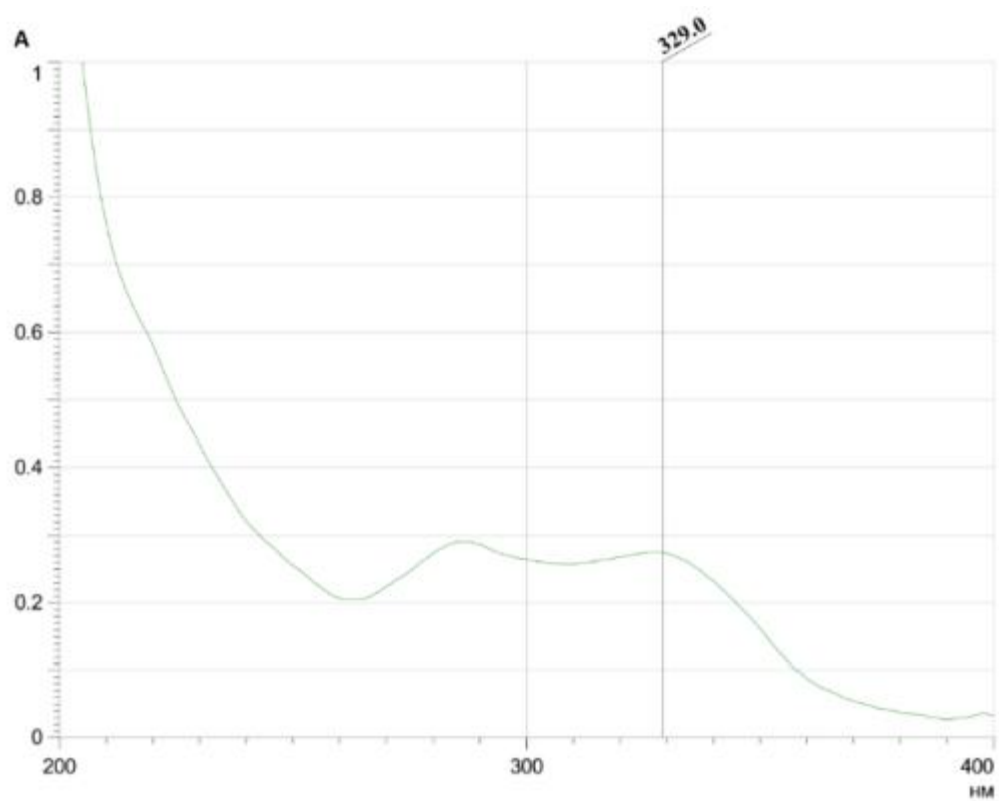


Рисунок 6.31 – УФ-спектры: водно-спиртового извлечения из (а) - черноголовки крупноцветковой травы; (б) – черноголовки обыкновенной травы



(c)



(d)

Рисунок 6.32 – УФ-спектры: водно-спиртового извлечения из (с) – черноголовки разрезной травы; (d)–раствора СО розмариновой кислоты (5,2 мкг/мл)

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.44). Валидацию методик проводили на образце 3 черной головки обыкновенной травы (раздел 2.1).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО розмариновой кислоты и извлечений из черной головки травы (рис. 6.31 и 6.32).

Таблица 6.44 – Валидационные параметры методики анализа суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в черной головке травы

Параметр	Количественное определение суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,0966x + 3 \cdot 10^{-5}$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%)=1,58$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%)=1,51 - 3,97$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$0,28 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов черной головки травы (табл. 6.45).

Таблица 6.45 – Содержание суммы фенольных соединений в черной головке травы, собранной в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черной головки крупноцветковой травы</i>								
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	8,54	0,1755	0,0716	2,57	0,18	2,16
Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	5,82	0,2423	0,0989	2,57	0,25	4,37
Красивый Курган, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (август 2020 г.)	6	5	6,97	0,32228	0,0909	2,57	0,23	3,35
гора Кабан, городской округ Кисловодск, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	7,27	0,2767	0,1130	2,57	0,29	4,00
гора 1-я Джуца, Предгорный	6	5	6,59	0,1865	0,0761	2,57	0,20	2,97

муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)								
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	5,94	0,2358	0,0963	2,57	0,25	4,17
берег реки Харбас, КБР (сентябрь 2019 г.)	6	5	7,22	0,2273	0,0928	2,57	0,24	3,30
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	5,46	0,0825	0,0337	2,57	0,09	1,58
Озеро Курортное, г. Нальчик, КБР (август 2020 г.)	6	5	5,66	0,1799	0,0734	2,57	0,19	3,33
Гора Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июль 2020 г.)	6	5	6,23	0,1017	0,0415	2,57	0,11	1,71
<i>Черноголовки разрезной трава</i>								
Гора Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июль 2020 г.)	6	5	5,54	0,2078	0,0848	2,57	0,22	3,93
Горы Дубровка, городской округ Пятигорск, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	5,10	0,2189	0,0894	2,57	0,23	4,50
Гора Лысая, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	5,45	0,1848	0,0755	2,57	0,19	3,56
Гора 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	4,75	0,1566	0,0639	2,57	0,16	3,46
Гора Бештау, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	6,32	0,1705	0,0696	2,57	0,18	2,83

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в черноголовке траве не менее 4,0%.

Нами подобраны условия электрофоретического анализа розмариновой кислоты (анализ того же извлечения, раствор А): рН буферного раствора (диапазон значений рН обусловлен значением константы ионизации розмариновой кислоты, равной 3,57), концентрация, напряжение в капилляре (табл. 6.46) (Приложение 6, рис. 6.26 - 6.28). В качестве ведущего электролита нами использовался боратный буферный раствор как наиболее эффективный при анализе фенольных соединений [91].

Таблица 6.46 – Результаты выбора оптимальных условий количественного определения розмариновой кислоты методом капиллярного электрофореза

Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ	Условие	Эффективность, ТТТ
pH 8,6	14,8	25 мМ	19,3	+10 кВ	76,1
pH 8,8	12,8	50 мМ	114,1	+15 кВ	86,3
pH 9,0	34,4			+25 кВ	91,2
pH 9,2	99				
pH 9,4	96,1				
pH 9,6	71,7				
pH 9,8	102,8				

Примечание: ТТТ – тысяч теоретических тарелок; мМ – миллимолярный раствор; кВ – киловольт

Согласно полученным данным оптимальными условиями анализа извлечения из черной головки травы являются: 10 мМ боратный буферный раствор с pH 9,2, напряжение в капилляре +20 кВ. Использование буферного раствора с концентрацией натрия тетрабората 50 мМ, несмотря на высокую эффективность разделения, нецелесообразно в виду перегруженности капилляра и уширения пика компонента [91]. Также использование двухкомпонентного буферного раствора с pH 9,8 незначительно повышает эффективность пика розмариновой кислоты, поэтому нами выбран боратный буферный раствор с pH 9,2.

Таким образом, нами предложена следующая методика анализа содержания розмариновой кислоты в черной головке травы: 1,0 г сырья (точная навеска) с размером частиц 1 мм экстрагируют 50 мл спирта этилового 70 %, предварительно взвесив колбу с навеской и экстрагентом с погрешностью $\pm 0,01$ г, на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 60 минут. После экстракции извлечение охлаждают, колбу взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Затем аликвоту объемом 1 мл полученного фильтрата вносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 70 %, перемешивают. Затем, один миллилитр извлечения подвергается центрифугированию со скоростью 8000 оборотов в минуту в течение пяти минут, после чего производится анализ в соответствии с выбранными условиями.

Содержание розмариновой кислоты в черной головке травы в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывали нижепредставленной формуле 24:

$$C, \% = \frac{C_{\text{мг/мл}} \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} \quad (24),$$

где $C_{\text{мг/мл}}$ - концентрация розмариновой кислоты в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рисунок 6.35);

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.47).

Специфичность методики подтверждали по совпадению миграции и характеру пика розмариновой кислоты в извлечении из черноголовки травы и в растворе СО розмариновой кислоты (Приложение 6, рис. 6.29 – 6.31).

Таблица 6.47 – Валидационные параметры методики анализа розмариновой кислоты в черноголовке траве

Параметр	Количественное определение розмариновой кислоты	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 14387x + 14,801$ $R=0,99$	$R \geq 0,999$
Прецизионность повторяемость	$\varepsilon(\%) = 3,66$	$\varepsilon(\%) \leq 5\%$
Внутрилабораторная прецизионность	$RSD(\%) = 2,15 - 3,77$	$RSD(\%) \leq 10$
Правильность	$1,55 < 2,31$	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов черноголовки травы (табл. 6.48) (Приложение 6, рис. 6.29 – 6.31).

Таблица 6.48 – Содержание розмариновой кислоты в черноголовке траве, собранной в различных местах произрастания, установленное методом капиллярного электрофореза

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черноголовки крупноцветковой трава</i>								
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	4,52	0,1261	0,0515	2,57	0,13	2,92
Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	3,65	0,1431	0,0584	2,57	0,15	4,11
Красивый Курган, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (август 2020 г.)	6	5	5,06	0,1944	0,0793	2,57	0,20	4,03
гора Кабан, городской округ	6	5	4,42	0,1403	0,0573	2,57	0,15	3,33

Кисловодск, Ставропольский край (август 2020 г.)								
гора 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	4,55	0,1541	0,0629	2,57	0,16	3,55
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	4,58	0,1968	0,0804	2,57	0,21	4,51
берег реки Харбас, КБР (сентябрь 2019 г.)	6	5	5,51	0,2140	0,0874	2,57	0,22	4,07
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	3,84	0,1336	0,0545	2,57	0,14	3,65
Озеро Курортное, г. Нальчик, КБР (август 2020 г.)	6	5	3,11	0,1012	0,0413	2,57	0,11	3,42
Гора Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июль 2020 г.)	6	5	5,33	0,2011	0,0821	2,57	0,21	3,96
<i>Черноголовки разрезной трава</i>								
Гора Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июль 2020 г.)	6	5	3,98	0,1680	0,0686	2,57	0,18	4,43
Гора Дубровка, городской округ Пятигорск, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	3,20	0,1148	0,0469	2,57	0,12	3,76
Гора Лысая, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	3,20	0,1053	0,0430	2,57	0,11	3,46
Гора 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	3,04	0,1439	0,0588	2,57	0,15	4,97
Гора Бештау, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	4,60	0,1918	0,0783	2,57	0,20	4,38

Результаты исследования позволяют установить нижний предел содержания компонента розмариновой кислоты в черноголовки траве не менее 2,5 %

Результаты анализа розмариновой кислоты методом КЭ подтверждали при анализе трех образцов сырья черноголовки травы (черноголовка обыкновенная – образец 3; черноголовка крупноцветковая – образец 1; черноголовка разрезная – образец 3, см. раздел 2.1) методом ВЭЖХ. Типичные хроматограммы представлены на рисунках 6.33, 6.34 и 6.35, хроматограмма раствора СО розмариновой кислоты – на рисунке 6.36.

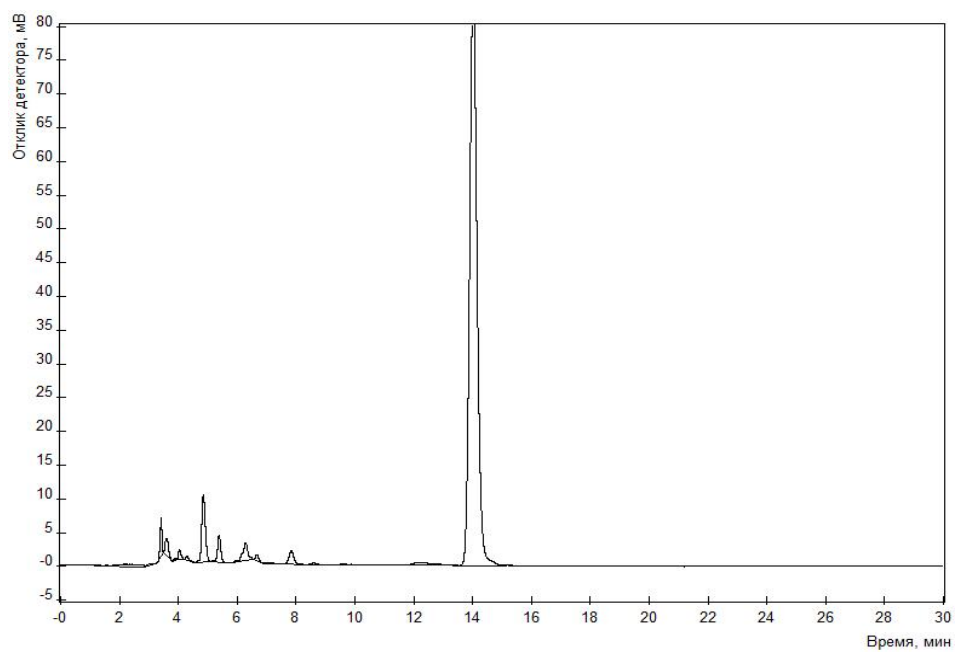


Рисунок 6.33 –Хроматограмма извлечения из чернойловки обыкновенной травы (перевал Гумбаши, КЧР)

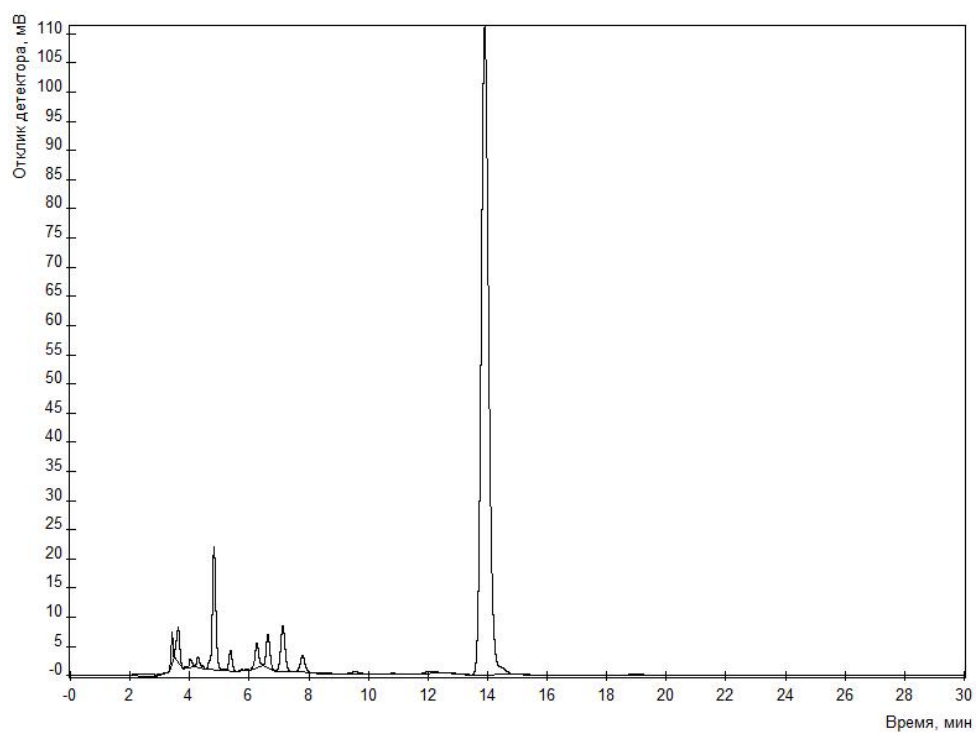


Рисунок 6.34 – Хроматограмма извлечения из чернойловки крупноцветковой травы (перевал Гумбаши, КЧР)

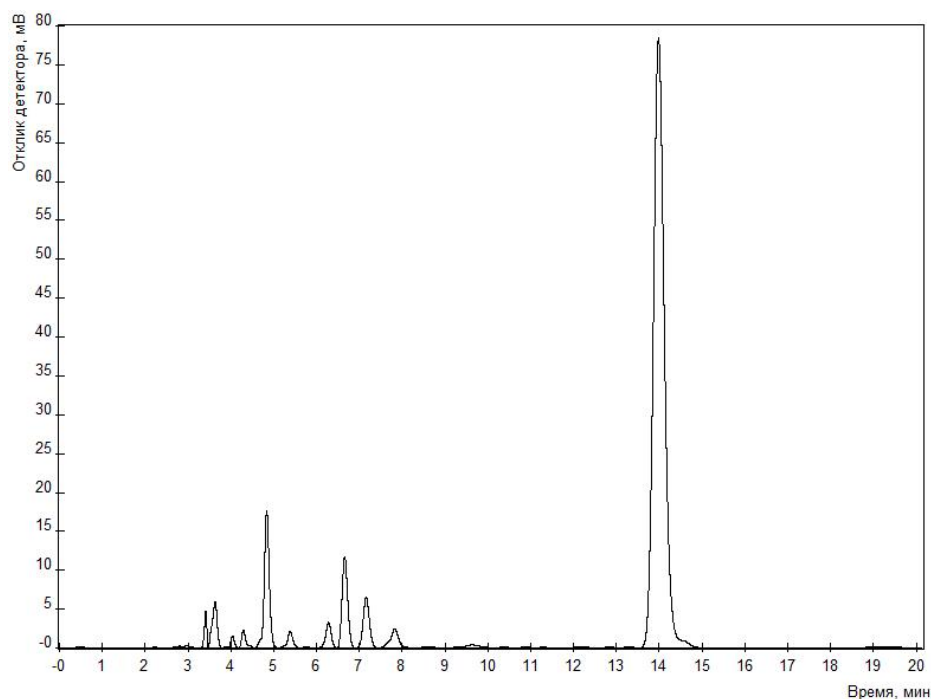


Рисунок 6.35 –Хроматограмма извлечения из черноголовки разрезной травы (станция Лысогогорская, Ставропольский край)

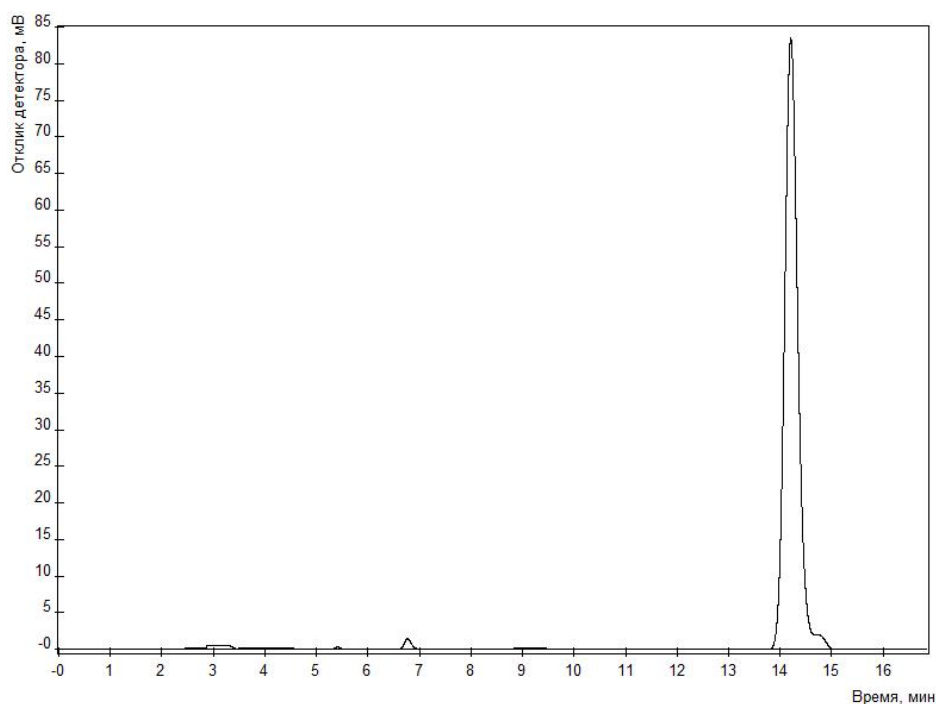


Рисунок 6.36 – Хроматограмма раствора стандартного образца розмариновой кислоты

Как следует из представленных данных, на хроматограмме растительного извлечения присутствует основной пик со временем удерживания 13,9 мин, совпадающий со временем удерживания пика на хроматограмме раствора СО кислоты розмариновой кислоты. В диапазоне концентраций 0,00104 – 0,00936 % соблюдалась линейная зависимость между концентрацией кислоты розмариновой и площадью пика (рис. 6.37).

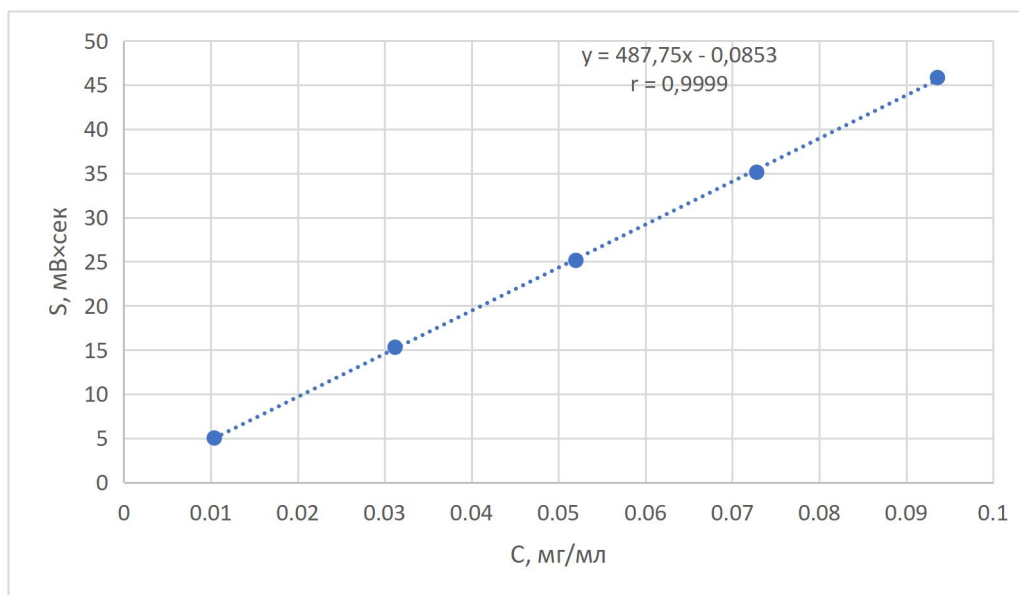


Рисунок 6.37 –График линейной зависимости площади пика от концентрации раствора СО кислоты розмариновой

По данным рисунка 6.37 линейная зависимость описывается уравнением вида $y = bx + a$, где $b = 487,75$; $a = 0,0853$; коэффициент корреляции составляет 0,99. Линейный регрессионный анализ методом наименьших квадратов показывает статистическую незначимость коэффициента a , что свидетельствует об удовлетворительной правильности методики. Полученный график линейности использовали для расчета количественного содержания розмариновой кислоты в черноголовки траве.

Результаты установления количественного содержания в пересчете на сухое сырье представлены в таблице 6.49.

Таблица 6.49 – Результаты количественного определения розмариновой кислоты в черноголовки траве методом ВЭЖХ

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черноголовки крупноцветковой трава</i>								
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	4,40	0,0943	0,0385	2,57	0,10	2,25
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>								
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	3,74	0,1129	0,0461	2,57	0,12	3,16
<i>Черноголовки разрезной трава</i>								
Гора Лысая, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	3,24	0,0998	0,0407	2,57	0,10	3,23

Полученные результаты свидетельствуют, что среднее содержание розмариновой кислоты в исследуемых образцах составляет $4,40 \pm 0,10\%$ (относительная погрешность определения $\pm 2,25\%$) в черноголовки крупноцветковой траве, $3,74 \pm 0,12\%$ (относительная

погрешность определения $\pm 3,16\%$) в черноголовки обыкновенной траве, $3,24 \pm 0,10\%$ (относительная погрешность определения $\pm 3,23\%$) в черноголовки разрезной траве, что сопоставимо с результатами КЭ ($4,52 \pm 0,13\%$; $3,84 \pm 0,14\%$; $3,20 \pm 0,11\%$ соответственно).

Также разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин как один из основных флавоноидов (Глава 4). В анализе использовали то же водно-спиртовое извлечение из черноголовки травы (раствор А). Для количественного определения флавоноидов отбирают две аликвоты объемом 2 мл, помещают в мерные колбы объемом 25 мл, в обе колбы вносят по 0,5 мл уксусной кислоты 33 % и в одну колбу вносят 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %. В обеих колбах доводят объем растворов до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают. Через 40 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 410 нм, при этом раствором сравнения является раствор без алюминия хлорид.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 25:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot a_{CO} \cdot 100 \cdot 100}{A_{CO} \cdot a_x \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (25),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{CO} – оптическая плотность раствора СО рутин;

a_x – навеска сырья, г;

a_{CO} – навеска СО рутин;

W – влажность сырья, %.

Допускается проводить расчет суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье с использованием удельного показателя поглощения рутин:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 2 \cdot a_x \cdot (100 - W)} \quad (26),$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора В;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутин при длине волны 410 нм, равный 249;

a_x – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Спектры поглощения извлечений, полученных из черноголовки травы из различных мест произрастания, в сравнении со спектром СО рутин (методика приготовления раствора СО и спектр поглощения – см. раздел 6.3.4) представлены на рисунке 6.38, 6.39.

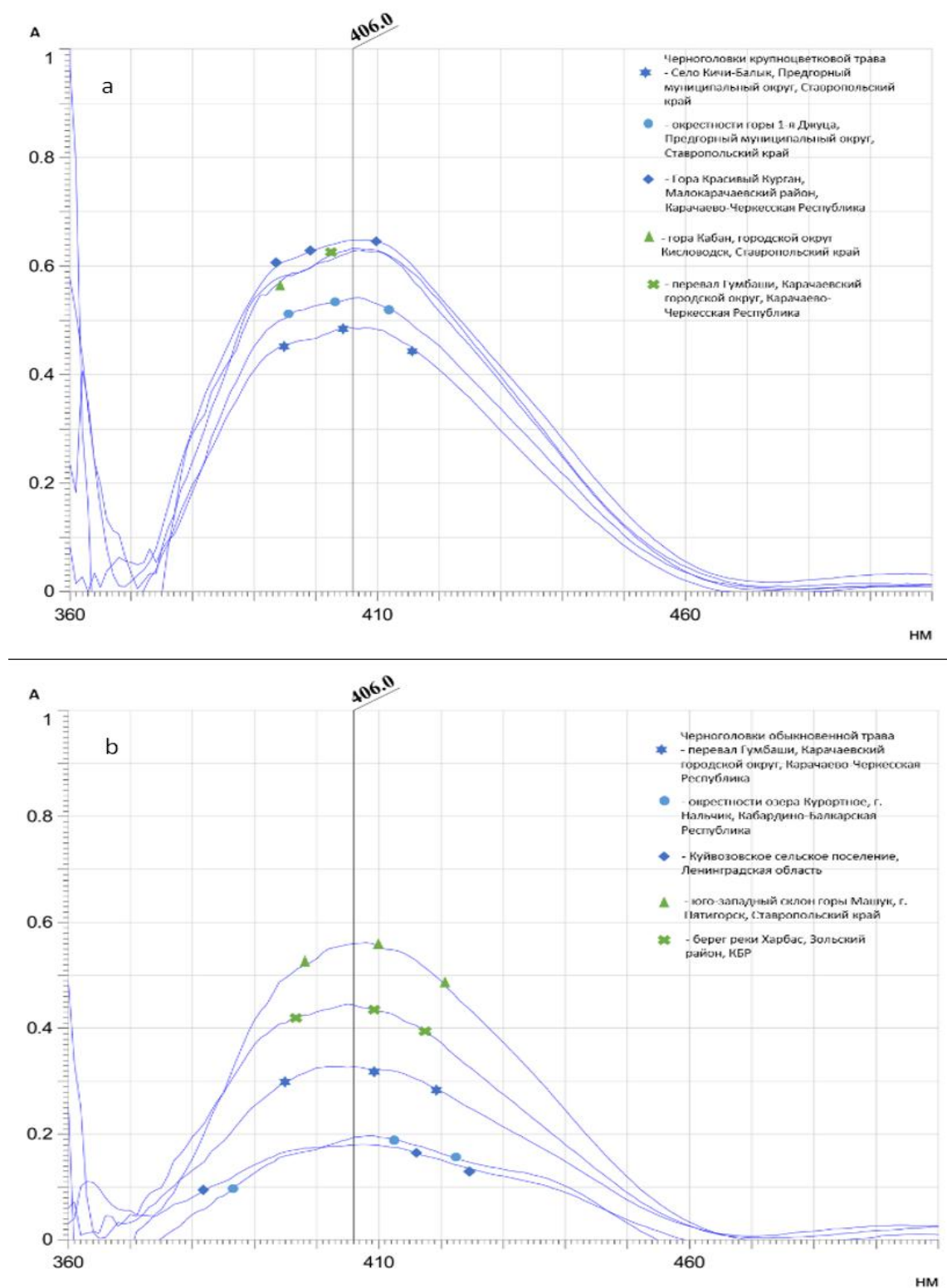


Рисунок 6.38 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из черноголовки травы после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом: а – черноголовки крупноцветковой; б – черноголовки обыкновенной

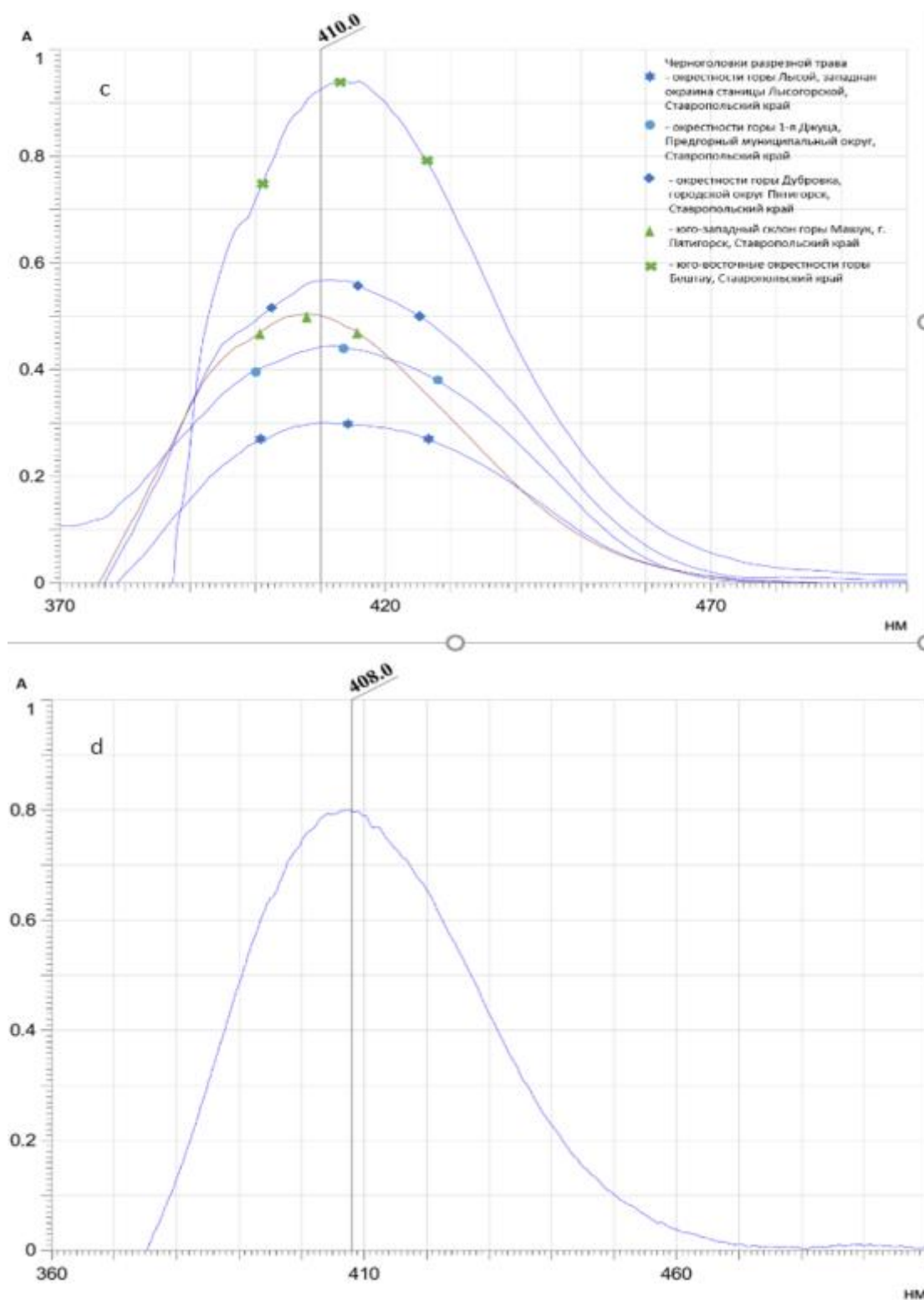


Рисунок 6.39 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из черноголовки травы после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом: с – черноголовки разрезной; d – раствор СО рутина (0,04 мг/мл)

Проводили валидацию разработанной методики по параметрам «специфичность», «линейность», «прецизионность» на двух уровнях: повторяемость (шестикратный повтор

анализа извлечений из одного образца сырья) и внутрилабораторная прецизионность (шестикратный повтор анализа извлечений из сырья из трех мест произрастания), правильность (табл. 6.50).

Специфичность методики подтверждали по совпадению максимума светопоглощения и характеру спектра СО рутина и извлечений из черноголовки травы (рис. 6.38 и 6.39).

Таблица 6.50 – Валидационные параметры методики анализа суммы флавоноидов в пересчете на рутин в черноголовки траве

Параметр	Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин	Параметр, норматив [26, 31, 169]
Линейность	$y = 0,2117x + 8 \cdot 10^{-6}$ R=0,99	R≥0,999
Прецизионность повторяемость	ε(%)=2,84	ε(%)≤5%
Внутрилабораторная прецизионность	RSD(%)=1,32 – 4,33	RSD(%)≤10
Правильность	0,96<2,31	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$

В подобранных условиях мы проанализировали извлечения всех образцов черноголовки травы (табл. 6.51).

Таблица 6.51 – Содержание суммы флавоноидов в черноголовки траве, собранной в различных местах произрастания, установленное методом спектрофотометрии

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черноголовки крупноцветковой травы</i>								
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	2,37	0,0486	0,0199	2,57	0,05	2,15
Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	1,80	0,0591	0,0241	2,57	0,06	3,45
Красивый Курган, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (август 2020 г.)	6	5	2,37	0,0451	0,0184	2,57	0,05	2,00
гора Кабан, городской округ Кисловодск, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	2,38	0,0470	0,0192	2,57	0,05	2,07
гора 1-я Джуца, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	1,98	0,0449	0,0183	2,57	0,05	2,37
<i>Черноголовки обыкновенной травы</i>								
Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область (август 2019 г.)	6	5	1,76	0,0764	0,0312	2,57	0,08	4,54
берег реки Харбас, КБР (сентябрь 2019 г.)	6	5	1,64	0,0441	0,0180	2,57	0,05	2,83
Перевал Гумбаши, КЧР (август 2019 г.)	6	5	1,15	0,0311	0,0127	2,57	0,03	2,84

Озеро Курортное, г. Нальчик, КБР (август 2020 г.)	6	5	0,70	0,0249	0,0102	2,57	0,03	3,75
Гора Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июль 2020 г.)	6	5	2,08	0,0275	0,0112	2,57	0,03	1,39
<i>Черноголовки разрезной трава</i>								
Гора Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край (июль 2020 г.)	6	5	1,94	0,0371	0,0151	2,57	0,04	2,01
Гора Дубровка, городской округ Пятигорск, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	2,14	0,0558	0,0228	2,57	0,06	2,73
Гора Лысая, западная окраина станицы Лысогорской, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	1,13	0,0419	0,0171	2,57	0,04	3,90
Гора 1-я Джуга, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	1,64	0,0437	0,0178	2,57	0,05	2,80
Гора Бештау, Ставропольский край (август 2020 г.)	6	5	3,39	0,0467	0,0191	2,57	0,05	1,45

На основании полученных данных предложено установить нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в черноголовки траве не менее 0,5 %.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

Современными инструментальными методами (электронная спектроскопия, КЭ и ВЭЖХ) в видах рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., и *Prunella* L. подтверждено наличие основного класса соединения – фенольных соединений:

1. Для рода *Arctostaphylos* Adans. определено общее содержание фенологликозидов, пересчитанное на арбутин. Количество арбутина в толокнянке обыкновенной колебалось от 9,4 до 13,6 %, а для толокнянки кавказской составляло $8,4 \pm 0,3$ %; а также содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид количество которого варьировалось для толокнянки обыкновенной от 1,0 до 1,5 %, для толокнянки кавказской – $2,4 \pm 0,04$ %; содержание основного компонента среди фенольных соединений – арбутина для толокнянки обыкновенной от 6,9 до 8,8 %, для толокнянки кавказской – $6,0 \pm 0,27$ %. Обоснована возможность заготовки листьев толокнянки кавказской как дополнительного источника к толокнянке обыкновенной листьям.

2. Для рода *Vaccinium* L. определено суммарное содержание фенолокислот в пересчете на хлорогеновую кислоту количество, которого варьировалось для черники обыкновенной листьев от 3,8 до 13,2 %, черники кавказской листьев от 4,1 до 9,6 %, голубики обыкновенной листьев от 4,9 до 9,1 %; суммарное содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид для брусники обыкновенной листьев от 0,8 до 1,4 %, черники обыкновенной листьев от 0,8 до 1,8 %, черники кавказской листьев от 0,4 до 1,1 %, голубики обыкновенной листьев от 1,5 до 4,6 %, клюквы болотной побегов от 1,3 до 2,3 % в пересчете на рутин; сумму фенологликозидов в пересчете на арбутин для брусники обыкновенной листьев от 5,8 до 10,9 %; содержание основного компонента среди фенольных соединений – хлорогеновая кислота для черники обыкновенной листьев от 1,3 до 8,0 %, черники кавказской листьев от 1,3 до 4,1 %, голубики обыкновенной листьев от 1,8 до 4,3 %, клюквы болотной побегов от 0,8 до 2,4 %, арбутина как основного компонента в брусники обыкновенной листьях от 4,3 до 9,7 %

3. Для рода *Prunella* L. определено суммарное содержание фенолокислот в пересчете на розмариновую кислоту, количество которого варьировалось для черноголовки обыкновенной травы от 5,5 до 7,2 %, черноголовки крупноцветковой травы от 5,8 до 8,5 %, черноголовки разрезной травы от 4,8 до 6,3 %; суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин количество, которого варьировалось для черноголовки обыкновенной травы от 0,7 до 2,1 %, черноголовки крупноцветковой травы от 1,8 до 2,4 %, черноголовки разрезной травы от 1,1 до 3,4 %; содержание основного компонента среди фенольных соединений – розмариновой кислоты количество, которого варьировалось для черноголовки обыкновенной травы от 3,1 до 5,5 %, черноголовки крупноцветковой травы от 3,7 % до 5,1 %, черноголовки разрезной травы от 3,2 до 4,6 %.

4. Разработанные методики валидированы по основным показателям (специфичность, линейность, правильность и прецизионность) согласно современным требованиям ГФ РФ XIV издания. Методики определения арбутина спектрофотометрическим методом в толокнянке обыкновенной листьях и бруснике обыкновенной листьях вошли в ФС в ГФ XIV издания (взамен титриметрической методики в ГФ СССР XI издания). Методики определения хлорогеновой кислоты, розмариновой кислоты, суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов предложены для внесения в проекты ФС на исследуемые сырьевые источники.

ГЛАВА 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЖИМОВ СУШКИ, НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И СРОКОВ ХРАНЕНИЯ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS., *VACCINIUM* L. И *PRUNELLA* L.

ЛРС чаще используется в высушенном, реже применяется в свежем виде. Сохранность той или иной группы БАВ достигается путем подбора различных видов сушки. В данной главе нами были рассмотрены различные виду сушки, такие как естественная (воздушно-тенивая) и искусственная: конвективная сушка при температурах 40 °С, 50°С, 60 °С и 70 °С, инфракрасная сушка при температурах 40 °С, 50°С, 60 °С и 70 °С. Для каждого образца сырья проводился контроль количественного содержания БАВ.

Согласно ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья», ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая», ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» и ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» для всех изучаемых объектов были установлены числовые показатели, которые в последствии были внесены в ФС и проекты ФС на динные виды ЛРС.

Были установлены сроки годности на все изучаемые виды ЛРС. Через каждые 6 месяцев проводился контроль качества, который подтверждался фактическими данными определения стабильности ЛРС.

7.1.1. Определение режимов сушки сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Собранные листья толокнянки обыкновенной (образец №1) после сбора делили на порции и каждую из них подвергали соответствующему режиму сушки: естественной (воздушно-тенивой) и искусственной (конвективной и инфракрасной при четырех температурных режимах). Далее согласно разработанным методикам (глава 6) определяли количественное содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов, а также влияние режима сушки на сохранность доминирующих компонентов.

Как видно из представленной в приложении 7 таблицы 7.1 оптимальным режимом сушки для листьев толокнянки является воздушно тенивой способ, при котором наблюдается наилучшая консервация основных групп БАВ. При использовании искусственных режимов сушки и увеличении температуры от 40 до 70 °С наблюдается температурозависимое снижение количественного содержания суммы фенологликозидов, флавоноидов и компонентов — арбутина и гиперозида.

7.1.2. Определение некоторых показателей качества сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans.

В воздушно-сухих листьях толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской была определена гигроскопичная влага согласно ОФС.1.5.3.0007.15 ГФ РФ XIV издания.

После сжигания и последующего прокаливания в муфельной печи при температуре 550-600 °С в воздушно сухих листьях толокнянки был определен показатель – зола общая (ОФС.1.2.2.2.0013.15). Полученную общую золу согласно ОФС.1.5.3.0006.15 растворяли в растворе хлористоводородной кислоты 10%, остаток прокаливали в муфельной печи при температуре 550-600 °С. Полученные результаты представлены в таблице 7.1.

Таблица – 7.1 Результат определения влажности и золы листьев видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Вид	№ обр.	Показатель (n=6)		
		Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в HCl, %
Толокнянка обыкновенная	1	5,55±0,021	2,37±0,060	0,95±0,0317
	2	6,75±0,170	2,83±0,117	1,17±0,052
	3	10,16±0,476	3,29±0,025	1,38±0,039
	4	8,56±0,274	3,06±0,060	1,26±0,055
Толокнянка кавказская	1	5,19±0,217	3,12±0,026	0,94±0,0343

Согласно полученным данным показатель влажности в толокнянке листьях варьировал от 5,2 до 10,2 %; золы общей от 2,4 до 3,3 %; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте от 0,9 до 1,4 %. Таким образом, для внесения в ФС нами был установлен верхний предел для показателя влажность – не более 12,0 %; зола общая – не более 4,0 %; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте – не более 2,0 %.

Экстрагирующую способность различных экстрагентов из толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской листьев определяли согласно ОФС.1.5.3.0006.15 метод 1. Результаты представлены в таблице 7.2.

Таблица – 7.2 Результаты определения содержания экстрактивных веществ в листьях видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Вид	№ обр.	Экстрагент (n=6)			
		Вода очищенная	Спирт этиловый 40%	Спирт этиловый 70%	Спирт этиловый 96%
Толокнянка обыкновенная	1	23,71±1,146	25,04±1,084	30,55±0,982	29,32±1,401
	2	26,70±0,617	28,29±0,622	32,72±1,424	30,61±1,449
	3	24,40±0,855	27,64±1,010	31,35±1,381	29,69±1,182
	4	22,58±1,067	24,61±0,910	27,92±1,206	25,51±1,009
Толокнянка кавказская	1	31,62±1,356	32,80±0,258	35,63±0,538	30,75±0,954

Как следует из таблицы 7.2, наибольшее количество извлекаемых веществ достигается при применении спирта этилового 70 % в качестве экстрагента, содержание экстрактивных веществ в толокнянке листьях колебалось от 27,9 до 35,6 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70%) – не менее 25,0 %

Определение измельченности толокнянки листьев проводили согласно ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

50,0 г аналитической пробы толокнянки листьев помещали на сито для цельного сырья диаметром 3 мм, для порошка сито с отверстиями 2 мм и сито с отверстиями размером 0,18 мм. Результаты представлены в приложении 7 таблице 7.2.

Исходя из данных в приложении 7 таблицы 7.2. для внесения в ФС на толокнянку листья установлены пределы для показателя «измельченность»:

- для цельного сырья - содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 0,8 до 1,7 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 2 %;
- для измельченного сырья – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 1,90 до 2,6 %. Содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм от 1,9 до 2,6 %. Соответственно оба показателя не должны превышать 5 %.
- для порошка – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм от 2,6 до 3,8 %, и содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм от 2,9 до 4,4 %. В связи, с чем оба показателя не должны превышать 5 %.

Определение посторонних примесей для толокнянки листьев проводили в аналитической пробе, отобранной в количестве 50,0 г в соответствии с ФС ОФС.1.5.3.0004.15. Результаты представлены в приложении 7 таблице 7.3.

Исходя из данных приложения 7 таблицы 7.3 для внесения в ФС на толокнянку листья установлены пределы для показателей:

- содержание листьев, почерневших и побуревших с обеих сторон в исследуемых образцах цельного и порошкового сырья варьировались от 0,97 до 2,11 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 3,0 %.
- содержание других частей растений в исследуемых образцах цельного сырья находилось в пределах 1,92-3,18 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 4 %.
- органическая примесь. Данные товароведческого и химического анализов (Приложение 7 табл. 7.3) свидетельствуют, что этот показатель колеблется для цельного и

измельченного сырья от 0,24 до 0,41 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 0,5 %.

- минеральная примесь. Как показали результаты анализов (табл. 7.1), этот показатель колеблется в цельном и измельченном сырье от 0,14 до 0,25 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 0,5 %.

7.1.3. Определение сроков годности сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans.

Исследования по проведению долгосрочных испытаний стабильности для видов рода *Arctostaphylos* (L.) Spreng. проводили на 3-х образцах. Хранили образцы при температуре 25°C/отн. влажн. 60%. В первый год образцы анализировали каждые 3 месяца, со второго года – 1 раз в 6 месяцев, с третьего года - 1 раз в год. В исследовании использовали выбор крайних вариантов (брекетинг). Анализ проводился валидированными методиками в течение предлагаемого срока годности до момента изменения количественного содержания $\pm 10\%$ от начальной величины [121].

Исходя из данных таблицы 7.3 толокнянки листья рекомендуется хранить не более 36 месяцев, так как в этот период количественное содержание основных групп соединений остаются в стабильном состоянии и их снижение не превышает 10% от начальной величины.

Таблица 7.3 – Результаты определения сроков годности толокнянки листьев

Образец	Периодичность контроля, месяцы							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Количественное содержание суммы фенологликозидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	10,88±0,46	10,63±0,24		10,38±0,48	9,80±0,36		9,69±0,27	9,37±0,34
2	13,60±0,38	13,45±0,50		13,02±0,42	13,02±0,35	12,55±0,53		12,07±0,52
3*	8,43±0,31		8,80±0,41		8,36±0,36	7,69±0,32		7,01±0,31
Количественное содержание арбутина, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	8,84±0,38	8,79±0,22		8,65±0,35	8,50±0,18		8,28±0,20	7,82±0,36
2	8,44±0,34	8,26±0,24		8,10±0,36	7,85±0,21	7,62±0,36		7,45±0,27
3*	6,01±0,27		6,07±0,23		6,01±0,25	5,94±0,18		4,84±0,22
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	1,01±0,04	0,97±0,04		0,96±0,03	0,92±0,04		0,90±0,03	0,88±0,03
2	1,53±0,03	1,51±0,02		1,49±0,03	1,46±0,03	1,42±0,03		1,35±0,04
3*	2,43±0,04		2,39±0,08		2,38±0,05	2,29±0,09		2,19±0,08
Количественное содержание гиперозида, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	0,65±0,03	0,66±0,03		0,63±0,03	0,60±0,03		0,58±0,03	0,57±0,03
2	1,35±0,04	1,36±0,04		1,33±0,04	1,28±0,03	1,26±0,05		1,18±0,05
3*	1,49±0,07		1,51±0,04		1,44±0,06	1,38±0,06		1,31±0,05

Примечание: * - толокнянки кавказской листья

7.2.1. Определение режимов сушки сырья видов рода *Vaccinium* L.

Собранное сырье видов рода *Vaccinium* L. после сбора делили на порции и каждую из них подвергали соответствующему режиму сушки: естественной (воздушно-теновой) и искусственной (конвективной и инфракрасной при четырех температурных режимах). Далее, согласно разработанным методикам (глава 6), определяли количественное содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов, а также влияние режима сушки на сохранность доминирующих компонентов.

Как видно из представленной в приложении 7 таблице 7.4 данных оптимальным режимом сушки:

Для брусники обыкновенной листьев является воздушно теновой способ при определении суммы фенологликозидов и флавоноидов, а также компонента арбутина. В тоже время при использовании искусственного способа сушки при увеличении температуры наблюдается температурозависимое понижение содержания основных компонентов брусники обыкновенной листьев, что весьма заметно прослеживается для фенологликозидов и компонента арбутина;

Для черники обыкновенной листьев, черники кавказской листьев, голубики обыкновенной листьев и клюквы болотной побегов оптимальным режимом консервации основных соединений является воздушно теновой способ как для определения суммы фенолокислот и флавоноидов, так и при определении доминирующего компонента – хлорогеновой кислоты.

7.2.2. Определение некоторых показателей качества сырья видов рода *Vaccinium* L.

В воздушно-сухих листьях брусники обыкновенной, черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и побегах клюквы болотной была определена гигроскопичная влага согласно ОФС.1.5.3.0007.15 ГФ РФ XIV издания.

После сжигания и последующего прокаливания в муфельной печи при температуре 550-600 °С в воздушно сухом сырье перечисленных видов был определен показатель – зола общая (ОФС.1.2.2.2.0013.15). Полученную общую золу согласно ОФС.1.5.3.0006.15 растворяли в растворе хлористоводородной кислоты 10%, остаток прокаливали в муфельной печи при температуре 550-600 °С. Полученные результаты представлены в таблице 7.4.

Таблица 7.4 – Результат определения влажности листьев видов рода *Vaccinium* L.

Вид	№ обр.	Показатель (n=6)		
		Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в HCl, %
Брусника обыкновенная	1	9,19±0,332	6,35±0,267	0,39±0,016
	2	11,91±0,541	5,83±0,233	0,32±0,015
	3	7,10±0,289	4,71±0,201	0,37±0,011
	4	6,20±0,05	2,84±0,08	0,36±0,015
	5	5,90±0,183	3,37±0,155	0,30±0,012
Черника обыкновенная	1	7,53±0,227	4,39±0,198	0,37±0,010
	2	6,70±0,257	3,84±0,145	0,30±0,013
	3	5,80±0,274	3,99±0,190	0,41±0,016
	4	8,06±0,322	3,44±0,128	0,32±0,011
	5	6,13±0,298	4,24±0,203	0,43±0,017
Черника кавказская	1	6,45±0,298	4,06±0,129	0,41±0,014
	2	4,98±0,201	3,57±0,133	0,32±0,014
	3	7,42±0,334	3,32±0,159	0,27±0,012
	4	5,52±0,209	3,93±0,177	0,38±0,017
	5	6,09±0,268	4,31±0,149	0,42±0,019
Голубика болотная	1	7,92±0,332	3,94±0,158	0,54±0,019
	2	7,62±0,073	3,69±0,048	0,19±0,008
	3	6,35±0,309	3,09±0,150	0,38±0,014
	4	8,63±0,371	3,98±0,183	0,45±0,020
	5	8,20±0,339	4,10±0,130	0,58±0,024
Клюква болотная	1	7,61±0,340	4,07±0,191	0,40±0,017
	2	8,10±0,351	3,65±0,166	0,36±0,016
	3	7,30±0,259	3,84±0,185	0,34±0,013
	4	6,75±0,287	3,18±0,141	0,28±0,006
	5	6,18±0,291	4,12±0,170	0,37±0,012

Согласно полученным данным:

- В бруснике обыкновенной листьях наблюдалось изменение показателя влажности от 6,2 до 11,9 %; общая зола составляла от 2,8 до 6,3 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,3 до 0,4 %. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 13,0 %; общая зола – не более 7,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 0,5 %.

- В чернике обыкновенной листьях наблюдалось изменение показателя влажности от 5,8 до 8,1 %; общая зола составляла от 3,4 до 4,4%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,3 до 0,4%. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0%; общая зола – не более 6,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.

■ В чернике кавказской листьях наблюдалось изменение показателя влажности от 5,0 до 7,5 %; общая зола составляла от 3,3 до 4,4%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,3 до 0,4%. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0 %; общая зола – не более 6,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.

■ В голубике обыкновенной листьях наблюдалось изменение показателя влажности от 6,3 до 8,6 %; общая зола составляла от 3,1 до 4,1 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,2 до 0,6 %. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0 %; общая зола – не более 6,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.

■ В клюкве болотной побегах наблюдалось изменение показателя влажности от 6,2 до 8,1 %; общая зола составляла от 3,2 до 4,1%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,3 до 0,4%. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0 %; общая зола – не более 6,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.

Экстрагирующую способность различных экстрагентов в листьях брусники обыкновенной, черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и побегах клюквы болотной определяли согласно ОФС.1.5.3.0006.15 метод 1. Результаты представлены в таблице 7.5.

Таблица 7.5 – Результаты определения содержания экстрактивных веществ в листьях видов рода *Vaccinium* L.

Вид	№ обр.	Экстрагент (n=6)			
		Вода очищенная	Спирт этиловый 40%	Спирт этиловый 70%	Спирт этиловый 96%
Брусника обыкновенная	1	26,63±0,731	28,59±0,625	30,32±0,885	23,51±0,917
	2	29,24±0,846	30,75±0,784	33,27±0,711	25,39±0,651
	3	27,37±1,016	29,48±0,904	31,45±1,173	24,52±0,941
	4	28,16±0,322	29,14±0,481	32,57±0,825	24,44±0,663
	5	24,88±0,576	27,10±0,627	29,24±0,509	22,57±0,607
Черника обыкновенная	1	19,34±0,736	20,47±0,689	23,87±1,085	22,58±0,828
	2	21,87±1,036	24,69±0,764	27,45±1,246	26,26±1,053
	3	23,42±0,846	25,18±0,898	28,81±1,010	27,78±1,185
	4	25,16±1,099	27,59±1,164	30,93±1,513	29,41±1,397
	5	20,46±0,682	21,37±0,812	24,64±0,979	23,0±1,033
Черника кавказская	1	21,70±1,040	23,44±0,768	26,37±0,858	24,56±0,985
	2	22,94±0,743	25,66±0,818	29,48±1,065	27,03±1,078

	3	18,79±0,894	20,59±0,915	24,32±0,868	22,96±0,712
	4	24,59±0,959	27,24±0,979	31,38±1,088	29,16±0,956
	5	22,44±1,055	25,27±1,022	30,32±0,977	28,04±1,084
Голубика болотная	1	28,32±0,714	31,76±0,792	33,60±1,457	28,44±0,697
	2	31,61±1,352	34,40±1,361	36,29±1,623	31,16±1,211
	3	32,99±0,988	35,71±0,882	37,13±1,010	32,57±1,216
	4	27,57±1,039	30,60±1,450	31,76±1,484	27,69±0,741
	5	29,94±1,363	32,58±0,845	33,31±1,267	28,56±1,369
Клюква болотная	1	32,63±0,686	32,74±0,479	36,13±0,320	30,79±0,601
	2	27,05±0,908	27,67±0,959	30,49±1,163	26,25±0,709
	3	26,06±1,039	26,81±1,160	29,79±1,177	24,74±0,959
	4	29,45±0,932	30,29±1,271	33,30±1,026	27,39±1,351
	5	28,82±1,402	29,13±0,995	31,79±1,155	26,49±0,844

Как следует из таблицы 7.5 наибольшее количество извлекаемых веществ достигается при применении спирта этилового 70 % в качестве экстрагента, содержание экстрактивных веществ:

- В бруснике обыкновенной листьях колебалось от 29,4 до 33,3 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 25,0 %;
- В чернике обыкновенной листьях колебалось от 23,9 до 30,9 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 20,0 %;
- В чернике кавказской листьях колебалось от 23,9 до 31,4 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 20,0 %;
- В голубике обыкновенную листьях колебалось от 31,7 до 36,9 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 25,0 %;
- В клюкве болотной побегах колебалось от 29,8 до 36,1 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 25,0 %.

Определение измельченность толокнянки листьев проводили согласно ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

50,0 г аналитической пробы листьев брусники и по 100 г листьев черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и побегов клюквы болотной помещали на сито для цельного сырья диаметром 3 мм, для измельченного сито диаметром 3 мм и 0,5 мм, для

порошка сито с отверстиями 2 мм и сито с отверстиями размером 0,18 мм. Результаты представлены в приложении 7 таблице 7.5.

Исходя из данных представленных в приложении 7 таблице 7.5 для внесения в ФС установлены следующие пределы показателя «измельченность»:

- на бруснику обыкновенную листья - для цельного сырья – содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 0,7 до 1,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 2 %. Для измельченного сырья – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 1,6 до 2,6 %; содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм от 1,6 до 2,4 %. Соответственно оба показателя не должны превышать 5 %. Для порошка – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм от 3,2 до 4,2 %, и частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм от 1,8 до 3,2 %. В связи, с чем оба показателя не должны превышать 5 %.

- на чернику листья - для цельного сырья – содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 0,9 до 3,2 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5 %. Для измельченного сырья – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 1,6 до 3,5 %; содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм от 1,9 до 3,1 %. Соответственно оба показателя не должны превышать 5 %. Для порошка – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм от 1,9 до 3,2 %, и содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм от 1,9 до 3,3 %. В связи, с чем оба показателя не должны превышать 5 %.

- на голубику обыкновенную листья - содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 0,9 до 2,0 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 3 %. Для измельченного сырья – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 1,5 до 2,4 %; содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм от 1,6 до 2,4 %. Соответственно оба показателя не должны превышать 5 %. Для порошка – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм от 1,0 до 2,5 %, и содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм от 1,8 до 3,4 %. В связи, с чем оба показателя не должны превышать 5 %.

- на клюквы болотную побеги - содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 0,9 до 2,1 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 3 %. Для измельченного сырья – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 1,4 до 2,4 %; содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм от 1,6 до 2,6 %. Соответственно оба показателя не должны превышать 5 %. Для порошка – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм от 1,5 до 3,0 %, и содержание частиц, проходящих

сквозь сито диаметром 0,18 мм от 1,7 до 2,8 %. В связи, с чем оба показателя не должны превышать 5 %.

Исходя из данных приложения 7 таблицы 7.6 для внесения в ФС установлен показатель «посторонние примеси»:

- на бруснику обыкновенную листья – для цельного и измельченного сырья содержание листьев, почерневших и побуревших с обеих сторон варьировалось от 3,2 до 6,2 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 7,0 %. Для цельного и измельченного сырья содержание других частей растений находилось в пределах 0,5 - 0,9 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 1 %. Для цельного и измельченного сырья содержание органической примеси колебалось от 0,6 до 0,9 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 1 %. Для цельного, измельченного и порошка содержание минеральной примеси колебалось от 0,3 до 0,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 0,5 %.
- на чернику листья – для цельного и измельченного сырья содержание листьев побуревших, почерневших и выпцветших варьировалось от 2,2 до 4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5,0 %. Для цельного и измельченного сырья содержание других частей растений / веточек, плодов в исследуемых образцах находилось в пределах 2,2 - 4,1 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5 %. Для цельного и измельченного сырья содержание органической примеси колебалось от 0,6 до 1,3 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 2 %. Для цельного, измельченного и порошка содержание минеральной примеси колебалось от 0,2 до 0,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 1,0 %.
- на голубику обыкновенную листья – для цельного и измельченного сырья содержание листьев побуревших, почерневших и выпцветших варьировалось от 2 до 4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5,0 %. Для цельного и измельченного сырья содержание других частей растений / веточек, плодов в исследуемых образцах находилось в пределах 2,2 – 3,9 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5 %. Для цельного и измельченного сырья содержание органической примеси колебалось от 0,7 до 1,2 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 2 %. Для цельного, измельченного и порошка содержание минеральной примеси колебалось от 0,3 до 0,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 1,0 %.
- на клюкву болотную побеги – для цельного и измельченного сырья содержание листьев побуревших, почерневших и выпцветших варьировалось от 2,3 до 4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5,0 %. Для цельного и измельченного сырья содержание других частей растений / цветков, корней в исследуемых образцах находилось в пределах 2,3 – 3,9 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5 %. Для цельного и

измельченного сырья содержание органической примеси колебалось от 0,7 до 1,2 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 2 %. Для цельного, измельченного и порошка содержание минеральной примеси колебалось от 0,2 до 0,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 1,0 %.

7.2.3. Определение сроков годности сырья видов рода *Vaccinium* L.

Исследования по проведению долгосрочных испытаний стабильности для видов рода *Vaccinium* L. проводили на 3-х образцах для каждого вида. Хранили образцы при температуре 25°C/отн. влажн. 60%. В первый год образцы анализировали каждые 3 месяца, со второго года – 1 раз в 6 месяцев, с третьего года - 1 раз в год. В исследовании использовали выбор крайних вариантов (брекетинг). Анализ проводился валидированными методиками в течение предлагаемого срока годности до момента изменения количественного содержания $\pm 10\%$ от начальной величины [121].

Исходя из данных таблицы 7.6 для брусники обыкновенной листьев, черники листьев, голубики обыкновенной листья и клюквы болотной побеги даны рекомендации о хранении их сырья до 36 месяцев, так как в этот период количественное содержание основных групп соединений остаются в стабильном состоянии и их снижение не превышает 10 % от начальной величины.

Таблица 7.6 – Результаты определения сроков годности видов рода *Vaccinium* L.

Образец	Периодичность контроля, месяцы							
	0	3	6	9	12	18	24	36
Брусники обыкновенной листья								
Количественное содержание суммы фенологликозидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	8,47±0,14	8,58±0,28		8,36±0,28	8,35±0,35		7,55±0,36	7,00±0,28
3	9,07±0,37	8,92±0,38		8,94±0,33	8,60±0,42	8,50±0,23		8,04±0,37
4	8,00±0,34		7,69±0,33		7,38±0,26	7,24±0,36		6,89±0,20
Количественное содержание арбутина, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	6,75±0,21	7,10±0,28		7,05±0,35	6,45±0,30		6,13±0,24	5,72±0,24
3	6,86±0,21	7,17±0,30		6,76±0,26	6,59±0,23	6,37±0,10		6,06±0,24
4	6,03±0,29		6,15±0,24		6,03±0,24	5,57±0,19		5,15±0,23
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	1,16±0,02	1,13±0,05		1,10±0,03	1,10±0,04		1,06±0,02	1,01±0,05
3	1,41±0,03	1,40±0,03		1,37±0,04	1,37±0,04	1,33±0,06		1,35±0,04
4	0,96±0,03		0,97±0,04		0,93±0,04	0,90±0,04		0,84±0,04
Черники обыкновенной листья								
Количественное содержание суммы фенольных соединений, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	11,07±0,13	11,20±0,36		11,04±0,24	10,92±0,31		10,84±0,30	10,00±0,48
2	11,21±0,48	11,21±0,45		11,07±0,30	10,82±0,31	10,74±0,22		9,95±0,34
3	9,27±0,20		9,21±0,14		8,90±0,27	8,72±0,27		8,20±0,34
Количественное содержание хлорогеновой кислоты, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	8,05±0,37	8,02±0,21		8,02±0,22	7,48±0,37		7,38±0,32	6,88±0,28
2	6,38±0,26	6,49±0,25		6,32±0,22	6,12±0,18	5,91±0,12		5,69±0,27
3	3,69±0,16		3,70±0,08		3,58±0,18	3,34±0,16		3,10±0,07
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	1,23±0,02	1,23±0,03		1,20±0,02	1,21±0,03		1,20±0,05	1,10±0,05
2	1,21±0,02	1,40±0,03		1,37±0,04	1,37±0,04	1,33±0,06		1,35±0,04
3	1,43±0,04		0,97±0,04		0,93±0,04	0,90±0,04		0,84±0,04
Черники кавказской листья								
Количественное содержание суммы фенольных соединений, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	5,66±0,22	5,65±0,12		5,62±0,23	5,63±0,18		5,49±0,17	4,77±0,17
2	4,21±0,09	4,19±0,20		4,15±0,12	4,05±0,17	3,89±0,13		3,68±0,12
5	9,59±0,17		9,59±0,15		9,27±0,25	8,97±0,31		8,31±0,30
Количественное содержание хлорогеновой кислоты, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								

1	2,78±0,14	2,89±0,13		2,79±0,11	2,55±0,12		2,44±0,11	2,25±0,10
2	1,77±0,08	1,80±0,08		1,76±0,08	1,72±0,04	1,68±0,03		1,58±0,06
5	3,58±0,14		3,47±0,14		3,31±0,11	3,24±0,05		3,15±0,08
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	1,16±0,02	1,18±0,03		1,14±0,03	1,12±0,05		1,12±0,05	1,04±0,05
2	0,69±0,02	0,70±0,03		0,67±0,02	0,66±0,02	0,63±0,02		0,58±0,02
5	0,45±0,02		0,45±0,02		0,42±0,02	0,40±0,02		0,36±0,02
<i>Голубики обыкновенной листвы</i>								
Количественное содержание суммы фенольных соединений, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	9,09±0,17	9,10±0,44		8,90±0,32	8,89±0,23		8,41±0,38	7,95±0,23
3	7,03±0,23	7,07±0,29		6,94±0,25	6,89±0,20	6,69±0,15		6,26±0,28
5	7,88±0,25		7,80±0,30		7,64±0,36	7,28±0,28		6,90±0,21
Количественное содержание хлорогеновой кислоты, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	4,34±0,16	4,24±0,20		4,16±0,16	4,09±0,14		4,02±0,17	3,78±0,15
3	1,83±0,09	1,74±0,08		1,70±0,08	1,66±0,03	1,65±0,03		1,62±0,06
5	4,01±0,12		3,82±0,13		3,77±0,13	3,73±0,08		3,56±0,15
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	2,09±0,03	2,07±0,05		2,07±0,05	2,00±0,09		1,95±0,09	1,82±0,07
3	4,56±0,12	4,42±0,11		4,37±0,09	4,33±0,10	4,22±0,11		4,03±0,11
5	1,46±0,03		1,43±0,06		1,39±0,06	1,31±0,02		1,20±0,05
<i>Клюквы болотной победы</i>								
Количественное содержание хлорогеновой кислоты, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	2,10±0,04	2,01±0,08		2,02±0,05	1,93±0,07		1,90±0,09	1,81±0,06
3	2,36±0,05	2,34±0,03		2,30±0,09	2,20±0,10	2,14±0,06		2,10±0,04
5	1,19±0,05		1,19±0,06		1,16±0,05	1,09±0,05		1,03±0,05
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	2,35±0,03	2,34±0,09		2,33±0,10	2,31±0,11		2,19±0,09	2,05±0,10
3	2,33±0,03	4,42±0,11		4,37±0,09	4,33±0,10	4,22±0,11		4,03±0,11
5	1,72±0,04		1,43±0,06		1,39±0,06	1,31±0,02		1,20±0,05

7.3.1. Определение режимов сушки сырья видов рода *Prunella* L.

Собранную траву черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной после сбора делили на порции и каждую из них подвергали соответствующему режиму сушки: естественной (воздушно-теновой) и искусственной (конвективной и инфракрасной при четырех температурных режимах).. Далее согласно разработанным методикам (глава 6) определяли количественное содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов, а также влияние режима сушки на сохранность розмариновой кислоты.

Исходя из приложения 7 таблицы 7.7 оптимальными режимами сушки для черноголовки травы является использование искусственного режима консервации – конвективная сушка при температуре 40 °С. При использовании воздушно тенового способа сушки наблюдается незначительное снижение основных соединений черноголовки травы.

7.3.2. Определение некоторых показателей качества сырья видов рода *Prunella* L.

В воздушно сухой траве черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовке разрезной была определена гигроскопичная влага согласно ОФС.1.5.3.0007.15 ГФ XIV издания.

После сжигания и последующего прокаливания в муфельной печи при температуре 550-600 °С в воздушно сухом сырье перечисленных видов был определен показатель – зола общая (ОФС.1.2.2.2.0013.15). Полученную общую золу согласно ОФС.1.5.3.0006.15 растворяли в растворе хлористоводородной кислоты 10%, остаток прокаливали в муфельной печи при температуре 550-600 °С. Полученные результаты представлены в таблице 7.7.

Таблица 7.7 – Результат определения влажности листьев видов рода *Prunella* L.

Вид	№ обр.	Показатель (n=6)		
		Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в HCl, %
Черноголовка обыкновенная	1	5,94±0,253	7,43±0,351	0,73±0,030
	2	8,08±0,340	6,26±0,284	0,82±0,033
	3	8,59±0,418	8,13±0,369	0,72±0,027
	4	6,24±0,273	8,24±0,367	0,81±0,034
	5	7,67±0,046	7,18±0,075	0,82±0,005
Черноголовка крупноцветковая	1	7,82±0,140	6,88±0,256	0,53±0,024
	2	6,99±0,319	7,19±0,296	0,50±0,020
	3	7,12±0,320	7,85±0,292	0,78±0,031
	4	8,07±0,250	6,70±0,306	0,37±0,015
	5	5,79±0,245	8,19±0,367	0,69±0,027

Черноголовка разрезная	1	7,90±0,373	7,05±0,330	0,81±0,030
	2	7,43±0,064	6,79±0,142	0,46±0,015
	3	8,22±0,339	7,87±0,358	0,74±0,033
	4	6,77±0,317	6,09±0,287	0,60±0,027
	5	5,97±0,287	7,76±0,357	0,57±0,024

Согласно полученным данным:

- В черноголовке обыкновенной траве наблюдалось изменение показателя влажности от 5,9 до 8,6 %; общая зола составляла от 6,2 до 8,2 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,7 до 0,8%. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0 %; общая зола – не более 9,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.
- В черноголовке крупноцветковой траве наблюдалось изменение показателя влажности от 5,8 до 8,1 %; общая зола составляла от 6,7 до 8,2 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,4 до 0,8%. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0 %; общая зола – не более 9,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.
- В черноголовке крупноцветковой траве наблюдалось изменение показателя влажности от 5,8 до 8,2 %; общая зола составляла от 6,1 до 7,9 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, колебалась от 0,4 до 0,6 %. Таким образом, для включения в проект ФС мы установили максимальные значения для следующих показателей: влажность – не превышающую 10,0 %; общая зола – не более 9,0 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1,0 %.

Экстрагирующую способность различных экстрагентов из травы черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной определяли согласно ОФС.1.5.3.0006.15 метод 1. Результаты представлены в таблице 7.8.

Таблица 7.8 – Результаты определения содержания экстрактивных веществ в траве видов рода *Prunella* L.

Вид	№ обр.	Экстрагент (n=6)			
		Вода очищенная	Спирт этиловый 40%	Спирт этиловый 70%	Спирт этиловый 96%
Черноголовка обыкновенная	1	24,11±0,666	25,97±0,829	26,98±0,913	23,40±1,004
	2	27,30±0,820	29,14±0,725	31,22±0,689	26,53±0,208
	3	26,58±0,806	27,97±0,861	29,27±0,949	25,12±0,443
	4	23,44±0,717	24,77±1,000	27,54±1,317	21,86±0,655

	5	25,32±0,777	26,59±1,148	29,39±0,834	23,89±0,535
Черноголовка крупноцветковая	1	27,44±0,832	28,76±1,244	29,79±0,898	25,41±0,738
	2	25,17±0,893	26,56±0,844	28,67±0,873	24,31±0,693
	3	28,37±1,159	30,27±1,258	31,86±1,341	26,42±0,643
	4	24,77±1,013	25,73±1,013	27,57±0,783	22,62±0,950
	5	26,56±0,798	27,85±1,213	29,14±1,064	24,57±0,840
Черноголовка разрезная	1	27,20±0,831	28,51±0,779	30,58±1,021	23,88±0,861
	2	26,26±1,104	27,47±0,844	28,58±1,237	23,18±0,586
	3	27,90±0,876	29,25±0,855	31,19±1,510	25,08±0,860
	4	25,34±0,822	26,76±0,820	28,83±0,960	24,23±0,844
	5	28,33±1,151	29,39±0,980	31,37±0,930	25,74±0,988

Как следует из таблицы 7.8 наибольшее количество извлекаемых веществ достигается при применении спирта этилового 70 % в качестве экстрагента, содержание экстрактивных веществ:

- В черноголовке обыкновенной траве колебалось от 27,0 до 31,2 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 25,0 %;
- В черноголовке крупноцветковой траве колебалось от 27,6 % до 31,9 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 25,0 %;
- В черноголовке разрезной траве колебалось от 28,6 % до 31,4 %. Для внесения в ФС нами был установлен нижний предел для показателя экстрактивные вещества (извлекаемые спиртом этиловым 70 %) – не менее 25,0 %;

Определение измельченность травы черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной проводили согласно ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

300 г аналитической пробы помещали на сито для цельного сырья диаметром 3мм, для измельченного сито диаметром 7 мм и 0,18 мм, для порошка сито с отверстиями 2 мм и сито с отверстиями размером 0,18 мм. Результаты представлены в таблице...

Исходя из данных приложения 7 таблицы 7.8 для внесения в ФС на черноголовку траву установлены следующие пределы показателя «измельченность»:

- для цельного сырья – содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 3 мм от 2,5 до 3,9 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5 %.

- для измельченного сырья – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 7 мм от 2,0 до 4,0 %; содержание частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм от 2,3 до 3,9 %. Соответственно оба показателя не должны превышать 5 %.

- для порошка – содержание частиц, не проходящих сквозь сито диаметром 2 мм от 2,2 до 4,0 %, и частиц, проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм от 2,0 до 4,0 %. В связи, с чем оба показателя не должны превышать 5 %.

Исходя из данных приложения 7 таблицы 7.7 для внесения в ФС на черноголовку траву установлен показатель «посторонние примеси»:

- для цельного и измельченного сырья содержание в сырье, пожелтевших листьев и стеблей, выцветших цветков/кусочков листьев, стеблей и цветков варьировалось от 1,4 до 4,0 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 5,0 %.

- для цельного и измельченного сырья содержание в сырье других частей растений, плодов и корней находилось в пределах 1,4 – 2,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 3,0 %.

- для цельного и измельченного сырья содержание органической примеси колебалось от 1,4 до 2,4 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 3,0 %.

- для цельного, измельченного и порошка содержание минеральной примеси колебалось от 0,4 до 0,8 %. В связи, с чем данный показатель не должен превышать 1,0 %.

7.3.3. Определение сроков годности сырья видов рода *Prunella* L.

Исследования по проведению долгосрочных испытаний стабильности для видов рода *Prunella* L. проводили на 3-х образцах для каждого вида. Хранили образцы при температуре 25°C/отн. влажн. 60%. В первый год образцы анализировали каждые 3 месяца, со второго года – 1 раз в 6 месяцев, с третьего года - 1 раз в год. В исследовании использовали выбор крайних вариантов (брекетинг). Анализ проводился валидированными методиками в течение предлагаемого срока годности до момента изменения количественного содержания ± 10 % от начальной величины [121].

Исходя из данных таблицы 7.9 для черноголовки травы даны рекомендации о хранении их сырья до 36 месяцев, так как в этот период количественное содержание основных групп соединений остаются в стабильном состоянии и их снижение не превышает 10 % от начальной величины.

Таблица 7.9 – Результаты определения сроков годности видов рода *Prunella* L.

Образец	Периодичность контроля, месяцы							
	0	3	6	9	12	18	24	36
<i>Черноголовки обыкновенной трава</i>								
Количественное содержание суммы фенольных соединений, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	5,46±0,09	5,42±0,18		5,35±0,15	5,34±0,25		5,10±0,24	4,75±0,21
2	5,94±0,25	5,83±0,16		5,75±0,18	5,68±0,14	5,49±0,14		5,26±0,17
3	7,22±0,24		7,04±0,29		7,01±0,18	6,83±0,23		6,41±0,19
Количественное содержание розмариновой кислоты, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	3,84±0,14	3,62±0,17		3,60±0,16	3,51±0,13		3,40±0,16	3,13±0,13
2	5,77±0,22	5,63±0,12		5,59±0,07	5,57±0,17	5,54±0,11		5,10±0,23
3	6,93±0,35		6,76±0,22		6,75±0,18	6,58±0,12		6,14±0,15
Количественное содержание суммы флавоноидов, $\bar{X} \pm \Delta x$, %								
1	1,15±0,03	1,21±0,05		1,19±0,05	1,18±0,03		1,04±0,04	0,92±0,04
2	1,76±0,08	1,65±0,08		1,64±0,07	1,60±0,04	1,60±0,02		1,52±0,05
3	1,64±0,05		1,64±0,04		1,62±0,02	1,61±0,05		1,49±0,06

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 7

1. Полученные результаты в ходе исследования, подтвердили, что для сохранения ведущей группы БАС (фенольных соединений) в ЛРС были использованы различные методы сушки. Было проведено сравнение естественного (воздушно-теневого) и искусственного (конвективного и инфракрасного) способов сушки при различных температурах. Основные результаты исследования показали, что при использовании искусственных методов сушки наблюдается снижение содержания фенольных соединений в сырье видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. В связи с этим рекомендуется использовать только воздушно-теновой способ сушки для сохранения максимального количества фенольных соединений. Однако, для сырьевых источников рода *Prunella* L. допускается использование конвективной сушки при температуре 40 °С. Это позволяет сохранить необходимый уровень фенольных соединений при подготовке материала. Таким образом, для сохранения фенольных соединений в ЛРС рекомендуется использовать воздушно-теновой способ сушки, за исключением сырьевых источников рода *Prunella* L., где допускается использование конвективной сушки при 40 °С

2. С целью переработки ФС на официальные виды сырья и разработки проектов ФС на источники, не вошедшие в ГФ РФ XIV издания для некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. были установлены следующие нормы качества: влажность; зола общая; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте; пределы для показателя «измельченность» и посторонних примесей.

3. Установлены сроки хранения сырьевых источников *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Для всех анализируемых объектов наблюдалось до 12 % снижения основных соединений в течение 3-х лет. Таким образом, все анализируемые объекты остаются стабильными в течение 3-х лет.

ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЫРЬЯ ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS., *VACCINIUM* L., *PRUNELLA* L.

Полученные экспериментальные данные фитохимического исследования позволили спрогнозировать предполагаемый вид активности с последующим проведением фармакологических исследований. Из каждого объекта были получены по 4 извлечения путем экстракции ЛРС различными экстрагентами (вода очищенная, спирт этиловый 40%, 70 и 95%) (Глава 2, раздел 2.7). Для различных извлечений была определена антиоксидантная, нейропротекторная, антитиразная, диуретическая и актопротекторная виды активности.

Глава выполнена на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России под руководством кандидата фармацевтических наук, доцента Дмитрия Игоревича Позднякова, за что ему выражается благодарность.

8.1. Фармакологические исследования сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans.

8.1.1. Оценка острой токсичности

Класс токсичности сухих остатков из толокнянки листьев проводили по методу «Up and Down» (раздел 2.6). Не установлена гибель животных при определении предельной допустимой дозы, а также не фиксировали отклонений в поведении и общем состоянии животных, их сенсорном восприятии. Согласно рекомендациям протокола OECD №425 к основному эксперименту не приступали без определения острой токсичности и в качестве LD₅₀ установили дозу 2000 мг/кг сухого экстракта. На основании таких результатов сухие экстракты из толокнянки листьев были отнесены к 5 классу токсичности по GSH классификации.

8.1.2. Оценка антиоксидантной активности

Проводили оценку прямой (тесты по ингибированию продукции радикалов) и непрямой (определение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) антиоксидантной активности сухих остатков.

При определении влияния на активность эндогенных антиоксидантных агентов установлено повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении животным сухих экстрактов, полученных экстракцией толокнянки листьев спиртом этиловым 40 % и 70 % (толокнянка обыкновенная – на 14,9 % и 13,9 % соответственно; толокнянка кавказская – на 21,9 % и 19 % соответственно, $p < 0,05$). Активность глутатион-редуктазы повышалась под действием тех же сухих остатков на 43,6 % и 31 % (толокнянки обыкновенной листья, экстракция спиртом этиловым 40% и 70% соответственно), на 235 % и 228 % (толокнянки кавказской листья, экстракция спиртом этиловым 40 % и 70 % соответственно). Активность супероксиддисмутазы увеличивалась при введении сухого экстракта, полученного экстракцией

толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской листьев спиртом 70%, на 29,1 % и 32,3 % соответственно. Активность глутатионпероксидазы увеличивалась при введении животным сухих экстрактов из толокнянки обыкновенной листьев, полученных экстракцией спиртом 40 % и 70 %, на 14,5 % и 15,5 % соответственно. Влияние на активность каталазы наблюдалось при введении сухих экстрактов из толокнянки обыкновенной листьев (экстрагент – спирт 95 %) и из толокнянки кавказской листьев (экстрагент – вода очищенная), а именно активность увеличилась на 8,6 % и 10,5 % соответственно. При этом содержание прооксиданта малонового диальдегида уменьшалось на 35,7 % (введение сухого экстракта из толокнянки обыкновенной листьев при экстракции их спиртом 70%) и 53,7 % (введение сухого экстракта из толокнянки кавказской листьев при экстракции их спиртом 70 %). Концентрация диеновых диальдегидов уменьшалась на 25,2 % при введении животным сухих экстрактов из толокнянки листьев, полученных их экстракцией спиртом 40 % (табл. 8.1).

Таблица 8.1 – Влияние сухих экстрактов из толокнянки листьев на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание прооксидантов

Фермент	ГБФ-ДГ, Ед/Л	ГР, Ед/Л	СОД, Ед/Л	ГП, Ед/Л	Каталаза, мкат/Л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л
ТО 95	3998,58± 86,664	31,83± 4,161	317,45± 9,989	598,73± 6,561	0,937± 0,037*	4,52± 0,695	9,697± 0,156
ТО 70	4563,15± 81,457*	39,56± 3,913*	387,8± 6,441*	696,27± 8,304*	0,889± 0,065	3,47± 0,65*	7,9± 0,319
ТО 40	4603,95± 83,066*	43,39± 3,631*	380,27± 9,294	690,18± 6,851*	0,911± 0,084	3,52± 0,444	7,33± 0,733*
ТО вода	3912,67± 84,081	28,95± 4,972	307,69± 6,556	621,12± 6,488	0,801± 0,032	5,26± 0,345	10,62± 0,437
ТК 95	4044,7± 189,96	41,3± 7,06	257,5± 10,9	309,2± 12,78	0,947± 0,11	5,5± 1,04	11,1± 1,35
ТК 70	4769,1± 175,01*	99,1± 6,25*	397,6± 13,38*	405,9± 17,41	0,945± 0,13	2,5± 0,99*	7,7± 0,83
ТК 40	4888,6± 148,3*	101,2± 7,5*	392,1± 17,95	424,3± 15,86	0,849± 0,18	2,9± 0,75	7,3± 1,34*
ТК вода	4116,8± 172,78	40,9± 8,82	257,6± 19,05	312,7± 17,69	0,954± 0,19*	5,7± 1,08	10± 1,07
Интакт	4007,53± 85,231	30,21± 2,562	300,5± 7,129	602,6± 5,946	0,863± 0,0145	5,4± 0,524	9,8± 0,696

Примечание: сухие экстракты из толокнянки обыкновенной (ТО) и толокнянки кавказской (ТК) листьев, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % (ТО 95, ТК 95), спиртом этиловым 70 % (ТО 70, ТК 70), спиртом этиловым 40 % (ТО 40, ТК 40), водой очищенной (ТО вода, ТК вода); ГБФ-ДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГР – глутатионредуктаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты; * - статистически значимо относительно интакта.

В результате оценки антиоксидантной активности (в эксперименте *in vitro*) установлено минимальное значение IC_{50} при испытании сухих экстрактов из толокнянки кавказской листьев полученных при экстракции сырья спиртом 70 %. При этом показатель IC_{50} , был минимальным при испытании сухих экстрактов из толокнянки обыкновенной листьев (опыт с DPPH – $23,2 \pm 0,74$ мкг/мл; с нитрозил-радикалом – $29,9 \pm 0,39$ мкг/мл), а также при испытании сухого экстракта из спиртового извлечения толокнянки обыкновенной листьев (супероксид-радикал – $22,8 \pm 0,97$ мкг/мл) и сухого экстракта из водно-спиртового извлечения (экстрагент - спирт этиловый 40 %) из толокнянки обыкновенной листьев (гидроксил-радикал – $21,7 \pm 0,34$ мкг/мл) (табл. 8.2) [383].

Таблица 8.2 – Значения концентраций полуингибирования сухих экстрактов из толокнянки листьев в испытаниях с радикалами

Радикал	IC_{50} , мкг/мл			
	DPPH	Супероксид	Гидроксил	Нитрозил
ТО 95	$52,9 \pm 0,15$	$22,8 \pm 0,97$	$68,2 \pm 0,28$	$62,6 \pm 0,15$
ТО 70	$30,6 \pm 0,77$	$41,5 \pm 0,33$	$41,3 \pm 0,7$	$46,5 \pm 0,06$
ТО 40	$57,7 \pm 0,08$	$30,9 \pm 0,24$	$21,7 \pm 0,34$	$69,3 \pm 0,52$
ТО вода	$23,2 \pm 0,74$	$60,3 \pm 0,32$	$67 \pm 0,52$	$29,9 \pm 0,39$
ТК 95	$45,7 \pm 0,35$	$49 \pm 0,48$	$45,6 \pm 0,14$	$56,6 \pm 0,9$
ТК 70	$31,5 \pm 0,93$	$30 \pm 0,51$	$21,7 \pm 0,28$	$31,6 \pm 0,04$
ТК 40	$53,1 \pm 0,81$	$48 \pm 0,43$	$26,4 \pm 0,05$	$53,7 \pm 0,36$
ТК вода	$40,6 \pm 0,21$	$34,8 \pm 0,28$	$46,6 \pm 0,83$	$38,7 \pm 0,82$
Тролокс	$3,2 \pm 0,72$	$4,1 \pm 0,82$	$3,7 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,47$

8.1.3. Оценка диуретической активности

Увеличение объема мочи наблюдали при введении животным сухих экстрактов водных извлечений из толокнянки листьев, при этом результаты сопоставимы с действием фуросемида (табл. 8.3).

Таблица 8.3 – Влияние сухих экстрактов из толокнянки листьев на объем диуреза и концентрацию ионов в сыворотке крови

Показатель	Объем мочи, мл	Конц. кальция, ммоль/л	Конц. калия, ммоль/л	Конц. магния, ммоль/л	Конц. натрия, ммоль/л
ТО 95	$1,25 \pm 0,174$	$2,42 \pm 0,114$	$3,57 \pm 0,025$	$1,14 \pm 0,016$	$149,14 \pm 8,235$
ТО 70	$1,24 \pm 0,174$	$2,36 \pm 0,081$	$4,11 \pm 0,108$	$0,77 \pm 0,023$	$139,92 \pm 6,545$
ТО 40	$1,88 \pm 0,077$	$2,06 \pm 0,021$	$4,06 \pm 0,11$	$0,99 \pm 0,032$	$142,6 \pm 7,699$
ТО вода	$5,41 \pm 0,198^*$	$1,35 \pm 0,027^*$	$5,41 \pm 0,147^*$	$1,4 \pm 0,019^*$	$121,77 \pm 7,997^*$
ТК 95	$2,4 \pm 0,985$	$2,01 \pm 0,277$	$4,2 \pm 0,962$	$1,1 \pm 0,766$	$147,8 \pm 9,404$
ТК 70	$1,9 \pm 0,344$	$1,95 \pm 0,575$	$4,1 \pm 0,307$	$0,8 \pm 0,321$	$135,9 \pm 5,721$
ТК 40	$3,4 \pm 0,133$	$2,6 \pm 0,366$	$5,4 \pm 0,894$	$1,1 \pm 0,032$	$142,5 \pm 3,07$
ТК вода	$6,9 \pm 0,565^*$	$2,9 \pm 0,514$	$6,7 \pm 0,93^*$	$1,2 \pm 0,247$	$124,5 \pm 1,612^*$
Спиринолактон, 25 мг/кг	$3,68 \pm 0,081^*$	$1,4 \pm 0,164^*$	$6,11 \pm 0,018^*$	$1,52 \pm 0,032^*$	$115,63 \pm 5,588^*$

Фуросемид, 10 мг/кг	7,41±0,523*	0,9±0,127*	1,59±0,214*	0,65±0,019*	95,58±9,562*
Интакт	1,45±0,012	2,15±0,24	3,6±0,362	0,9±0,011	156±7,631

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

Установлено влияние на концентрацию ионов в сыворотке крови, а именно снижение концентрации кальция на 37,2 % в сравнении с содержанием кальция в сыворотке крови интактных животных ($p<0,05$) на фоне приема сухого экстракта из водного извлечения из толокнянки обыкновенной листьев. При этом при введении фуросемида концентрация кальция снижалась на 58,1 %, спиронолактона – на 34,9 %. При этом увеличивалась концентрация калия на 50,3 % при введении сухого экстракта из водного извлечения из толокнянки обыкновенной листьев и на 86,1% - при введении сухого экстракта из водного извлечения из толокнянки кавказской листьев. В группе на фоне приема спиронолактона концентрация калия увеличивалась на 69,7 %, в группе фуросемида – уменьшалась на 55,8 %. Влияние на обмен магния при введении сухого экстракта из водного извлечения толокнянки обыкновенной листьев было сопоставимо с действием спиронолактона (увеличение концентрации на 55,6 % и 68,9 % соответственно). Влияние на содержание натрия в сыворотке крови наблюдалось также при введении сухих экстрактов из водных извлечений из толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской (снижение концентрации на 21,9 % и 20,5 % соответственно). В группе с приемом спиронолактона концентрация натрия снизилась на 25,9 %, в группе фуросемида - на 38,7 %.

8.1.4. Оценка нейропротекторной активности

Наиболее выраженный эффект на интенсивность мозгового кровотока оказывали сухие экстракты из водно-спиртовых извлечений (спирт этиловый 40 % и 70 %) толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской листьев. Так, сухой остаток ТО 40 увеличивал скорость кровотока на 91,4 % в сравнении с группой негативного контроля, сухой остаток ТО 70 – на 70,7 %. Эффект сухих экстрактов из толокнянки кавказской листьев менее выражен, в наибольшей степени скорость мозгового кровотока увеличивает сухой остаток ТК 40 – на 71,4 % (рис. 8.1). Кроме того, уровень лактата в сыворотке крови составлял в группе НК 8,9 ммоль/л, в то время как после введения референта EGB671 наблюдалось снижение уровня лактата на 61,2 %, а у животных, получавших сухой экстракт ТО 70 – на 40,7 %, наиболее интенсивно уровень лактата снизился у животных, получавших сухой экстракт ТК 70 – на 75,3 % (рис. 8.2). Оценка степени некроза полушарий мозга показала, что статистически значимо степень некроза уменьшали сухие экстракты ТО 70 и ТО 40 (на 35,8 % и 20,7 % соответственно). При этом стандартизированный экстракт гинкго билоба снижал степень

некроза мозга у животных на 34,3%. В схожей степени степень некроза также снижал сухой экстракт ТК 70 – на 30,3% (рис. 8.3).

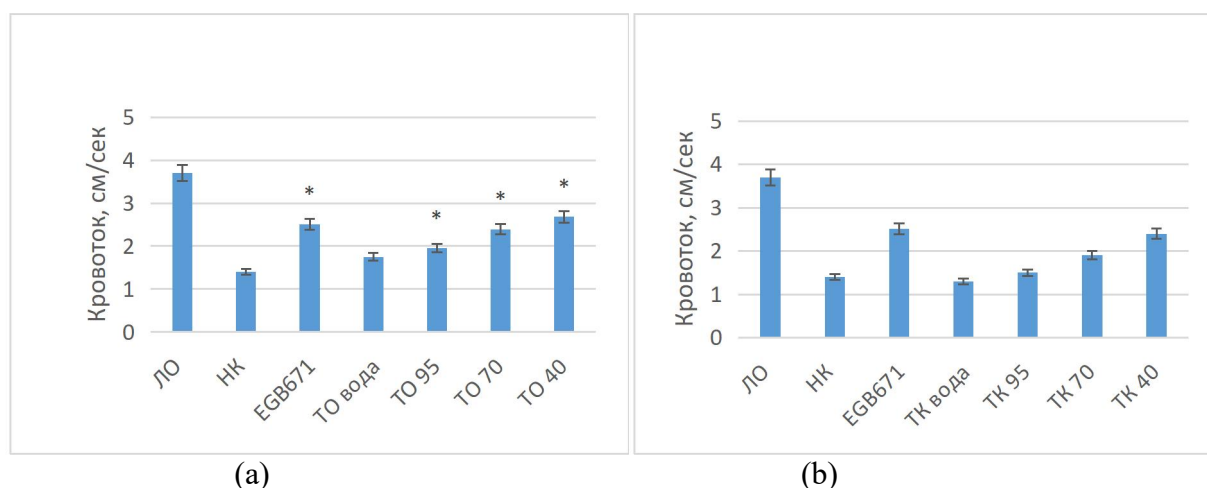


Рисунок 8.1 – Влияние на скорость кровотока головного мозга сухих экстрактов из толокнянки листьев: а – толокнянки обыкновенной; б – толокнянки кавказской

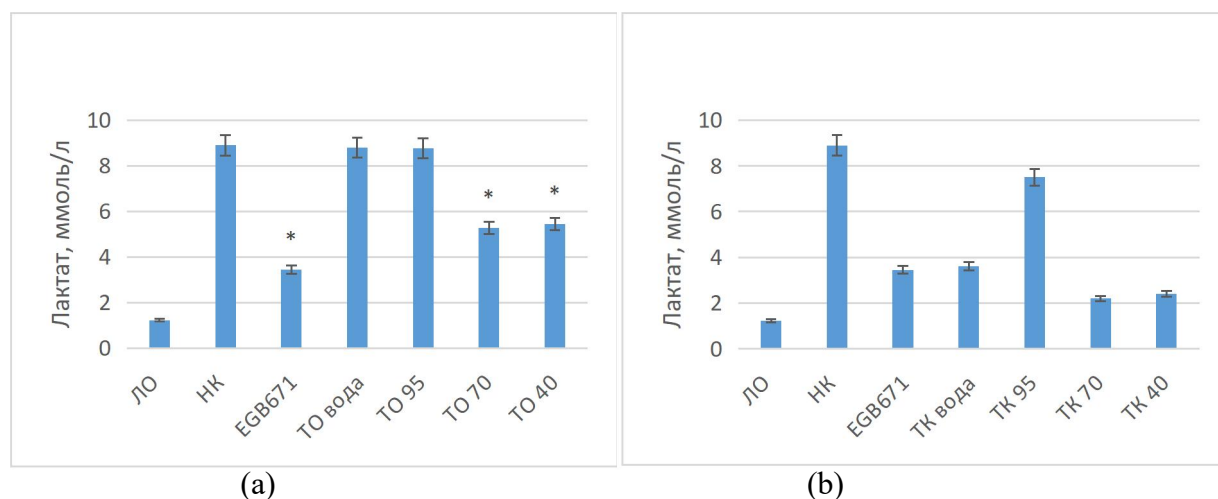


Рисунок 8.2 – Влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови сухих экстрактов из толокнянки листьев: а – толокнянки обыкновенной; б – толокнянки кавказской

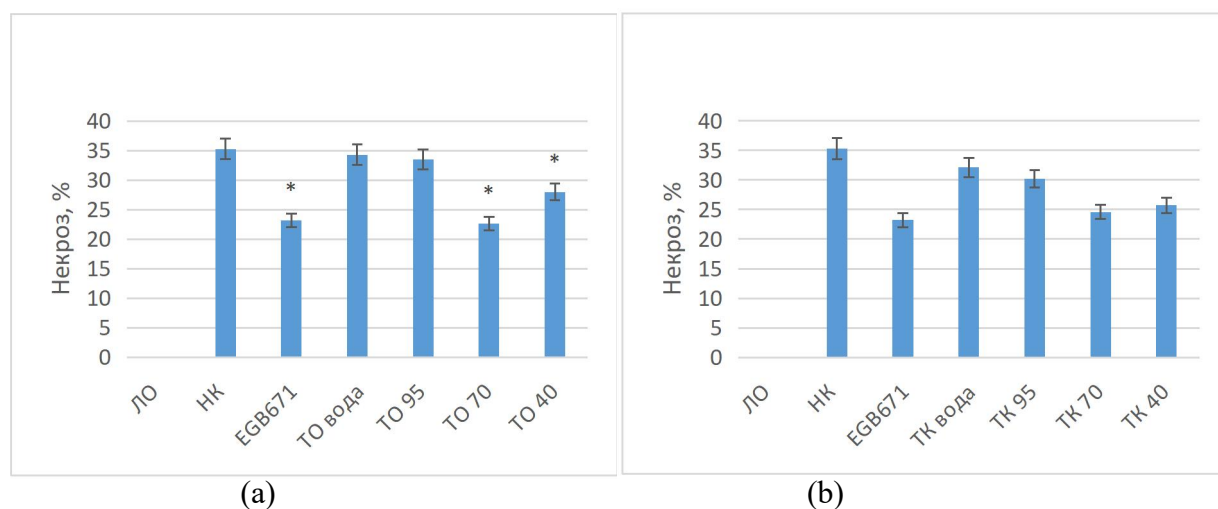


Рисунок 8.3 – Влияние на зону некроза головного мозга сухих экстрактов из толокнянки листьев: а – толокнянки обыкновенной; б – толокнянки кавказской

8.1.5. Оценка антитирозиновой активности

Оценка антитирозиновых свойств анализируемых образцов позволила установить, что сухие экстракты из *Arctostaphylos caucasica* Lipsch и *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng, полученные экстракцией водой, демонстрируют наиболее выраженные тирокиназные ингибирующие свойства, аналогичные койевой кислоте (табл. 8.4). В тоже время экстракты из водно-спиртовых извлечений не обладали антитирозиновой активностью [383].

Таблица 8.4 – Влияние сухих экстрактов из толокнянки листьев на активность тирокиназы

Испытуемая субстанция	IC ₅₀ , мкг/мл (M±SEM)
ТО 95	84,4±1,6
ТО 70	91,5±1,5
ТО 40	86,5±1,2
ТО вода	63,3±1,2
ТК 95	42,5±2
ТК 70	80,3±1,1
ТК 40	99,4±1,7
ТК вода	96,9±1,6
Койевая кислота	33±1,9

8.1.6. Оценка актопротекторной активности

Значимое влияние на длительность плавания оказывало введение животным сухого экстракта ТК 95 (увеличение длительности плавания на 6,2%), ТО 40 (5,7 %), ТК 70 (3,2 %) и ТО 70 (2,2 %). На 10 день приема сухих экстрактов профиль поменялся: наибольший эффект оказывали сухие остатки ТК 40 и ТО вода, при приеме которых длительность плавания животных увеличилась на 230,1% и 220,9 % по сравнению с группой НК. При этом в группе референта работоспособность увеличилась на 123,8 %. Сухие экстракты ТК 70 и ТК 95 также увеличивали работоспособность – на 49,3 % и 40,4 % соответственно. Из сухих экстрактов из толокнянки обыкновенной листьев наибольший эффект наблюдался в группе приема ТО 40 – увеличение длительности плавания на 156,9 % (табл. 8.5).

Таблица 8.5 – Влияние сухих экстрактов из толокнянки листьев на физическую работоспособность животных

Испытуемая субстанция	Время плавания, сек	
	1 день	10 день
ТО 95	132±8,4	157,6±19,8
ТО 70	132,7±7,7	155,2±16,3
ТО 40	137,2±5,4	167,5±15
ТО вода	124,9±6,3	146,7±16,8
ТК 95	137,9±26,77	182,3±29,23*
ТК 70	134±22,21	193,8±26,89*
ТК 40	125,5±21,78	215,2±25,55*
ТК вода	122,3±23,01	209,2±28,6*
НК	129,8±9,1	65,2±5,6
Женьшень, 1 мл/кг	126,3±8,1	145,9±10,7*

Примечание: * - статистически значимо относительно НК

8.2. Фармакологические исследования сырья видов рода *Vaccinium* L.

8.2.1.1. Оценка острой токсичности *Vaccinium vitis-idaea* L.

Класс токсичности сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев проводили по методу «Up and Down» (раздел 2.6). Не установлена гибель животных при определении предельной допустимой дозы, а также не фиксировали отклонений в поведении и общем состоянии животных, их сенсорном восприятии. Согласно рекомендациям протокола OECD №425 к основному эксперименту не приступали без определения острой токсичности и в качестве LD₅₀ установили дозу 2000 мг/кг сухого экстракта. На основании таких результатов сухие экстракты из брусники обыкновенной листьев были отнесены к 5 классу токсичности по GSH классификации.

8.2.1.2. Оценка антиоксидантной активности *Vaccinium vitis-idaea* L.

Проводили оценку прямой (тесты по ингибированию продукции радикалов) и непрямой (определение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) антиоксидантной активности сухих экстрактов.

При определении влияния на активность эндогенных антиоксидантных агентов установлено повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении животным сухих остатков, полученных экстракцией брусники обыкновенной листьев спиртом этиловым 40 % и 70 % на 14,7 % и 11,6 % соответственно ($p < 0,05$). Активность глутатион-редуктазы повышалась под действием тех же сухих экстрактов на 30,2% и 37,2 % (брусники обыкновенной листья, экстракция спиртом этиловым 40 % и 70 % соответственно). Активность супероксиддисмутазы увеличивалась на 21,7 % при введении сухого экстракта, полученного экстракцией брусники обыкновенной листьев спиртом 70 %, и на 23,5 % при введении сухого экстракта, полученного экстракцией спиртом 40%. Активность глутатионпероксидазы увеличивалась при введении животным сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев, полученных экстракцией спиртом 40 % и 70 %, на 14,2 % и 11,8 % соответственно. Влияние на активность каталазы наблюдалось при введении сухого экстракта из брусники обыкновенной листьев (экстрагент – спирт этиловый 40 %), а именно активность увеличилась на 11,4 %. При этом содержание прооксиданта малонового диальдегида уменьшалось на 18,5 % (введение сухого экстракта из брусники обыкновенной листьев при экстракции их спиртом 40%). Концентрация диеновых диальдегидов уменьшалась на 26% при введении животным сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев, полученных их экстракцией спиртом 40 % (табл. 8.6).

Таблица 8.6 – Влияние сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание прооксидантов

Фермент	ГБФ-ДГ, Ед/Л	ГР, Ед/Л	СОД, Ед/Л	ГП, Ед/Л	Каталаза, мкат/Л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л
БО 95	3941,11± 89,352	30,55± 2,006	312,44± 8,882	626± 8,167	0,868± 0,047	4,540± 0,459	9,509± 0,337
БО 70	4472,85± 86,739*	41,45± 3,414*	365,61± 9,095*	673,56± 9,437*	0,854± 0,059*	4,63± 0,451*	7,37± 0,534*
БО 40	4596± 80,969*	39,32± 3,462*	371,15± 6,499*	688,2± 6,124*	0,961± 0,067*	4,4± 0,536*	7,25± 0,402*
БО вода	3990,53± 82,835	29,69± 4,201	307,53± 8,835	615,95± 7,625	0,838± 0,036	5,19± 0,242	8,99± 0,534
Интакт	4007,53± 85,231	30,21± 2,562	300,5± 7,129	602,6± 5,946	0,863± 0,0145	5,4± 0,524	9,8± 0,696

Примечание: сухие экстракты из брусники обыкновенной (БО) листьев, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % (БО 95), спиртом этиловым 70 % (БО 70), спиртом этиловым 40 % (БО 40), водой очищенной (БО вода); ГБФ-ДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГР – глутатионредуктаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты; * – статистически значимо относительно интакта.

В результате оценки антиоксидантной активности (в эксперименте *in vitro*) установлено минимальное значение IC₅₀ при испытании сухих экстрактов водно-спиртовых извлечений из брусники обыкновенной листьев. Так, в опыте DPPH-радикалом минимальная концентрация полуингибирования установлена для сухого экстракта, полученного экстракцией сырья спиртом 70 % (44,2±0,98 мкг/мл), в наименьшей концентрации (23,9±0,24 мкг/мл) супероксид-радикал ингибировал сухой экстракт, полученной экстракцией листьев брусники спиртом 40 %; гидроксил-радикал ингибировал сухой экстракт, полученный экстракцией листьев спиртом 70 %, в концентрации 27±0,17 мкг/мл. Нитрозил-радикал в наименьшем количестве - 33,3±0,11 мкг/мл - ингибировал сухой остаток, полученный экстракцией листьев брусники спиртом 40 % (табл. 8.7).

Таблица 8.7 – Значения концентраций полуингибирования сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев в испытаниях с радикалами

Радикал	IC ₅₀ , мкг/мл			
	DPPH	Супероксид	Гидроксил	Нитрозил
БО 95	44,5±0,81	34,9±0,03	38,1±0,6	62,5±0,99
БО 70	44,2±0,98	45,3±0,77	27±0,17	58,1±0,54
БО 40	59,8±0,39	23,9±0,24	51,5±0,25	33,3±0,11
БО вода	64±0,83	52,9±0,24	63±0,93	38,4±0,94
Тролокс	3,2±0,72	4,1±0,82	3,7±0,6	5,2±0,47

8.2.1.3. Оценка диуретической активности *Vaccinium vitis-idaea* L.

Увеличение объема мочи наблюдали при введении животным сухого экстракта водного извлечения из брусники обыкновенной листьев, при этом результаты сопоставимы с действием спиронолактона (табл. 8.8).

Таблица 8.8 – Влияние сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев на объем диуреза и концентрацию ионов в сыворотке крови

Показатель	Объем мочи, мл	Конц. кальция, ммоль/л	Конц. калия, ммоль/л	Конц. магния, ммоль/л	Конц. натрия, ммоль/л
БО 95	1,96±0,085	2,68±0,066	3,06±0,095	1,04±0,015	157,26±1,05
БО 70	1,58±0,127	2,68±0,166	3,61±0,081	0,73±0,028	143,01±7,971
БО 40	2,07±0,166	2,08±0,139	2,91±0,081	0,85±0,032	147,78±7,747
БО вода	3,56±0,035*	1,72±0,011*	4,43±0,034	1,21±0,019*	127,06±9,259*
Спиронолактон, 25 мг/кг	3,68±0,081*	1,4±0,164*	6,11±0,018*	1,52±0,032*	115,63±5,588*
Фуросемид, 10 мг/кг	7,41±0,523*	0,9±0,127*	1,59±0,214*	0,65±0,019*	95,58±9,562*
Интакт	1,45±0,012	2,15±0,24	3,6±0,362	0,9±0,011	156±7,631

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

Установлено влияние на концентрацию ионов в сыворотке крови, а именно снижение концентрации кальция на 20 % в сравнении с содержанием кальция в сыворотке крови интактных животных ($p<0,05$) на фоне приема сухого экстракта из водного извлечения из брусники обыкновенной листьев. При этом при введении фуросемида концентрация кальция снижалась на 58,1 %, спиронолактона – на 34,9 %. При этом увеличивалась концентрация калия на 23,1 % при введении сухого экстракта из водного извлечения из брусники обыкновенной листьев. В группе на фоне приема спиронолактона концентрация калия увеличивалась на 69,7 %, в группе фуросемида – уменьшалась на 55,8 %. Влияние на обмен магния при введении сухого экстракта из водного извлечения брусники обыкновенной листьев было схоже с действием спиронолактона (увеличение концентрации на 34,4 % и 68,9 % соответственно). Влияние на содержание натрия в сыворотке крови наблюдалось также при введении сухого экстракта из водного извлечения из брусники обыкновенной (снижение концентрации на 15,6 %). В группе с приемом спиронолактона концентрация натрия снизилась на 25,9 %, в группе фуросемида - на 38,7 %.

8.2.1.4. Оценка нейропротекторной активности *Vaccinium vitis-idaea* L.

Наиболее выраженный эффект на интенсивность мозгового кровотока оказывали сухие экстракты из водно-спиртовых извлечений (спирт этиловый 40% и 70%) брусники обыкновенной листьев. Так, сухой остаток БО 40 увеличивал скорость кровотока на 96,4 % в

сравнении с группой негативного контроля, сухой остаток БО 70 – на 72,9 %. (рис. 8.4). Кроме того, уровень лактата в сыворотке крови составлял в группе НК 8,9 ммоль/л, в то время как после введения референта EGB671 наблюдалось снижение уровня лактата на 61,2%, а у животных, получавших сухой экстракт БО 70 – на 45,3 %; в группе при приеме БО 40 концентрация лактата снижалась на 33,8 % (рис. 8.5). Оценка степени некроза полушарий мозга показала, что статистически значимо степень некроза уменьшали сухие остатки БО 70 и БО 40 (на 32,9 % и 27 % соответственно). При этом стандартизированный экстракт гинкго билоба снижал степень некроза мозга у животных на 34,3 % (рис. 8.6).

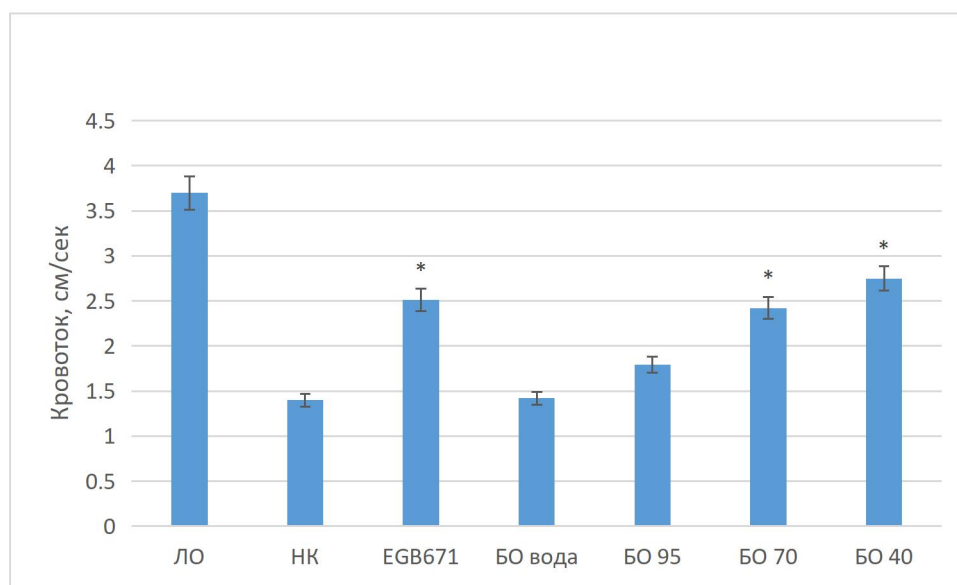


Рисунок 8.4 – Влияние на скорость кровотока головного мозга сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев

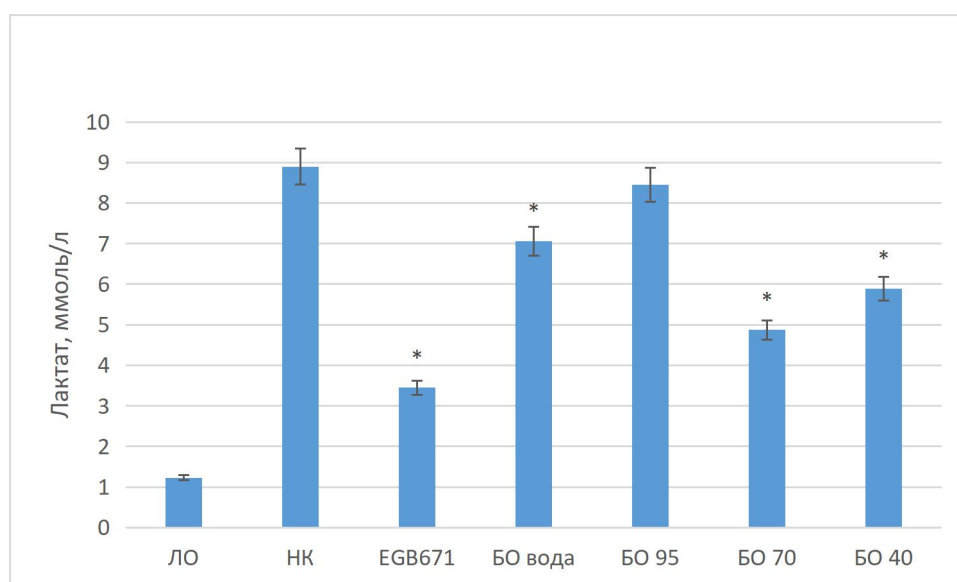


Рисунок 8.5 – Влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев

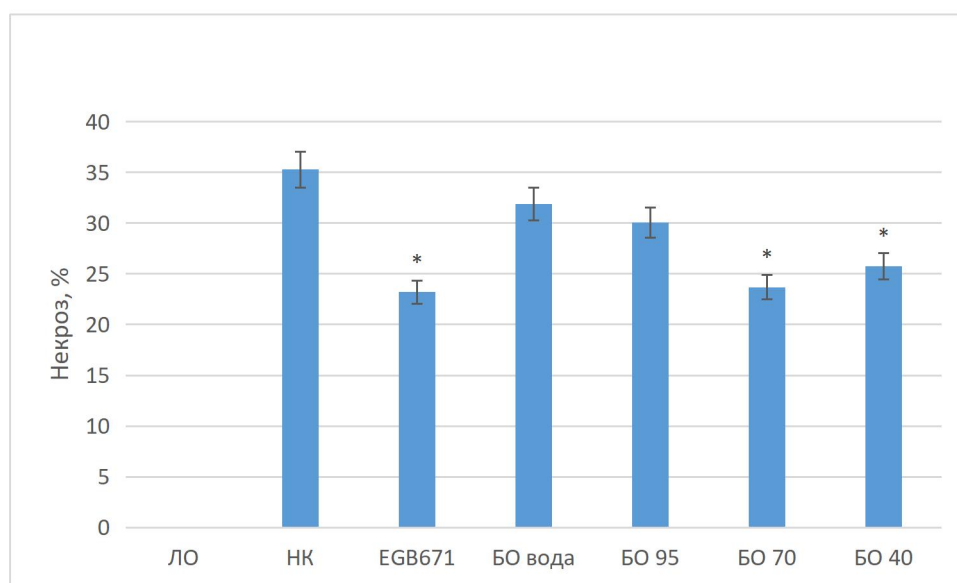


Рисунок 8.6 – Влияние на зону некроза головного мозга сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев

8.2.1.5. Оценка антитирозиновой активности *Vaccinium vitis-idaea* L.

Оценка антитирозиновых свойств анализируемых образцов позволила установить, что сухие экстракты из брусники, полученные экстракцией спиртом 95%, демонстрируют наиболее выраженные тирозиназа-ингибирующие свойства, близкие к койевой кислоте (табл. 8.9). Так, сухой остаток БО 95 ингибировал тирозиназу в минимальной концентрации $46,7 \pm 2,08$ мкг/мл, в то время как койевая кислота – в концентрации $33 \pm 1,9$ мкг/мл. В тоже время остатки БО 40, БО 70 и БО вода не обладали антитирозиновой активностью.

Таблица 8.9 – Влияние сухих экстрактов из брусники обыкновенной листьев на активность тирозиназы

Испытуемая субстанция	IC ₅₀ , мкг/мл (M±SEM)
БО 95	46,7±2,08
БО 70	93,6±3
БО 40	56,5±1,82
БО вода	53,1±1,51
Койевая кислота	33±1,9

8.2.1.6. Оценка актопротекторной активности *Vaccinium vitis-idaea* L.

Значимое влияние на длительность плавания оказывало введение животным сухого экстракта БО вода (увеличение длительности плавания на 6 %). На 10 день приема сухих остатков профиль оказался следующий: наибольший эффект оказывали сухие экстракты БО 40 и БО вода, при приеме которых длительность плавания животных увеличилась на 201,7 % и 193,6 % по сравнению с группой НК. При этом в группе референта работоспособность увеличилась на 123,8 % (табл. 8.10).

Таблица 8.10 – Влияние сухих экстрактов из толокнянки листьев на физическую работоспособность животных

Испытуемая субстанция	Время плавания, сек	
	1 день	10 день
БО 95	131,9±9,4	189,5±15,9*
БО 70	133,6±6,7	143,7±17,3
БО 40	128,2±5,3	196,7±19,6*
БО вода	137,6±9,2	191,4±19*
НК	129,8±9,1	65,2±5,6
Женьшень, 1 мл/кг	126,3±8,1	145,9±10,7*

Примечание: * - статистически значимо относительно НК

8.2.2.1. Оценка острой токсичности *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L.

Класс токсичности сухих экстрактов из черники листьев проводили по методу «Up and Down» (раздел 2.6). Не установлена гибель животных при определении предельной допустимой дозы, а также не фиксировали отклонений в поведении и общем состоянии животных, их сенсорном восприятии. Согласно рекомендациям протокола OECD №425 к основному эксперименту не приступали без определения острой токсичности и в качестве LD₅₀ установили дозу 2000 мг/кг сухого экстракта. На основании таких результатов сухие экстракты из черники листьев были отнесены к 5 классу токсичности по GSH классификации.

8.2.2.2. Оценка антиоксидантной активности *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L.

Проводили оценку прямой (тесты по ингибированию продукции радикалов) и непрямой (определение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) антиоксидантной активности сухих экстрактов.

При определении влияния на активность эндогенных антиоксидантных агентов установлено повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении животным сухих экстрактов, полученных экстракцией черники листьев спиртом этиловым 70% (черника обыкновенная – на 11,7 %; черника кавказская – на 5,3 %, $p<0,05$). Активность глутатион-редуктазы повышалась под действием тех же сухих экстрактов ЧО 70 и ЧК 70 на 41,8 % и 73,5 % соответственно. Активность супероксиддисмутазы увеличивалась при введении сухого экстракта, полученного экстракцией черники обыкновенной и черники кавказской листьев спиртом 70 %, на 16,8 % и 28,3 % соответственно. Активность глутатионпероксидазы увеличивалась при введении животным сухих экстрактов из черники обыкновенной и черники кавказской листьев, полученных экстракцией спиртом 70 %, на 13 % и 23,1 % соответственно.

Влияние на активность каталазы наблюдалось при введении тех же сухих экстрактов, а именно активность увеличилась на 43,1 % (ЧО 70) и 67,1 % (ЧК 70) соответственно. При этом содержание прооксиданта малонового диальдегида уменьшалось на 37 % (введение сухого экстракта из черники обыкновенной листьев при экстракции их спиртом этиловым 70 %) и 40,7 % (введение сухого экстракта из черники кавказской листьев при экстракции их спиртом 70 %). Концентрация диеновых диальдегидов уменьшалась на 16,3 % и 25,5 % при введении животным сухих экстрактов из черники обыкновенной и черники кавказской листьев, полученных их экстракцией спиртом 70 %, соответственно (табл. 8.11).

Таблица 8.11 – Влияние сухих экстрактов из черники листьев на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание прооксидантов

Фермент	ГБФ-ДГ, Ед/Л	ГР, Ед/Л	СОД, Ед/Л	ГП, Ед/Л	Каталаза, мкат/Л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л
ЧО 95	4042,56± 124,197	29,25± 2,961	296,45± 10,924	610,35± 29,171	0,884± 0,0141	5,9± 0,227	9,07± 0,993
ЧО 70	4475,21± 155,239*	42,84± 1,951*	351± 10,937*	681± 15,898*	1,235± 0,026*	3,4± 0,364*	8,2± 0,148*
ЧО 40	3924,59± 149,225	32,39± 1,478	309,78± 14,597	610,35± 42,941	0,972± 0,0267	5,8± 0,556	9,52± 1,953
ЧО вода	3994,25± 151,952	29,14± 2,947	308,04± 12,914	601,47± 25,981	0,968± 0,0267	5,2± 0,229	10,07± 0,146
ЧК 95	4061,5± 18,959	32,1± 1,885	305,8± 10,756	641,8± 10,5	1,01± 0,02	5± 2,151	9,4± 1,188
ЧК 70	4220,4± 19,526*	52,4± 2,118*	385,4± 16,696*	741,9± 16,855*	1,442± 0,021*	3,2± 1,601*	8± 1,711*
ЧК 40	4059,3± 23,194	30,8± 1,733	342,1± 11,15	700,3± 10,846	1,021± 0,014	3,7± 1,478	7,3± 1,417
ЧК вода	4096± 16,048	31± 1,732	300,5± 14,91	620,9± 11,602	0,912± 0,017	4,9± 1,604	9,8± 1,664
Интакт	4007,53± 85,231	30,21± 2,562	300,5± 7,129	602,6± 5,946	0,863± 0,0145	5,4± 0,524	9,8± 0,696

Примечание: сухие экстракты из черники обыкновенной (ЧО) и черники кавказской (ЧК) листьев, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % (ЧО 95, ЧК 95), спиртом этиловым 70 % (ЧО 70, ЧК 70), спиртом этиловым 40 % (ЧО 40, ЧК 40), водой очищенной (ЧО вода, ЧК вода); ГБФ-ДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГР – глутатионредуктаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты; * - статистически значимо относительно интакта.

В результате оценки антиоксидантной активности (в эксперименте *in vitro*) установлено минимальное значение IC₅₀ при испытании сухих экстрактов из черники листьев. При этом показатель IC₅₀ был минимальным при испытании сухих экстрактов из водно-спиртовых извлечений из черники обыкновенной и черники кавказской листьев, полученных экстракцией спиртом 40 % (опыт с DPPH – 48,9±0,95 мкг/мл и 35,6±0,421 мкг/мл; с супероксид-радикалом –

24,1±0,94 мкг/мл и 17,8±0,262 мкг/мл соответственно), а также при испытании сухих экстрактов из водно-спиртовых извлечений черники обыкновенной и черники кавказской листьев, полученных экстракцией спиртом 70 % (гидроксил-радикал – 28,1±0,88 мкг/мл и 20,9±0,374 мкг/мл соответственно). В опыте с нитрозил-радикалом наименьшее значение IC₅₀ установлено для сухих экстрактов ЧО 95 - 51,7±0,45 мкг/мл – и для ЧК 95 - 50,1±0,609 мкг/мл (табл. 8.12) [382].

Таблица 8.12 – Значения концентраций полуингибирования сухих экстрактов из черники листьев в испытаниях с радикалами

Радикал	IC ₅₀ , мкг/мл			
	DPPH	Супероксид	Гидроксил	Нитрозил
ЧО 95	55,5±0,74	26,1±0,5	42,1±0,28	51,7±0,45
ЧО 70	60,2±0,55	25,1±0,18	28,1±0,88	64,4±0,89
ЧО 40	48,9±0,95	24,1±0,94	65,1±0,81	65,8±0,28
ЧО вода	61,6±0,64	62,6±0,74	57,8±0,25	65,5±0,92
ЧК 95	56,9±0,096	24,5±0,756	41,3±0,861	50,1±0,609
ЧК 70	61,7±0,163	26,9±0,969	20,9±0,374	65,4±0,356
ЧК 40	35,6±0,421	17,8±0,262	60,6±0,069	66,6±0,022
ЧК вода	60,2±0,563	61,9±0,779	55,4±0,904	58,2±0,995
Тролокс	3,2±0,72	4,1±0,82	3,7±0,6	5,2±0,47

8.2.2.3. Оценка диуретической активности *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L.

Увеличение объема мочи наблюдали при введении животным сухих экстрактов (экстрагент – вода) из черники листьев, при этом результаты сопоставимы с действием фуросемида - для сухого экстракта ЧК вода, и с действием спиронолактона – для сухого экстракта ЧО вода (табл. 8.13).

Таблица 8.13 – Влияние сухих экстрактов из черники листьев на объем диуреза и концентрацию ионов в сыворотке крови

Показатель	Объем мочи, мл	Конц. кальция, ммоль/л	Конц. калия, ммоль/л	Конц. магния, ммоль/л	Конц. натрия, ммоль/л
ЧО 95	1,34±0,05	2,22±0,114	3,62±0,079	1,06±0,021	139,32±4,619
ЧО 70	1,56±0,143	2,68±0,166	2,82±0,073	1,15±0,012	137,26±1,672
ЧО 40	1,65±0,151	2,16±0,027	2,72±0,148	0,95±0,025	144,7±9,431
ЧО вода	3,72±0,083*	1,75±0,179*	4,95±0,166*	1,25±0,024*	127,31±4,693
ЧК 95	2,1±0,96	2,1±0,58	4,45±0,65	0,85±0,42	154,4±11,84
ЧК 70	2,3±0,9	2,08±0,2	3,9±0,67	0,74±0,9	136,9±10,37
ЧК 40	2,7±0,98	1,92±0,49	4,1±0,52	0,96±0	142,8±13,07
ЧК вода	5,2±0,63*	3,1±0,87*	5,3±0,22*	0,9±0,64	152,1±14,19
Спиронолактон, 25 мг/кг	3,68±0,081*	1,4±0,164*	6,11±0,018*	1,52±0,032*	115,63±5,588*
Фуросемид, 10 мг/кг	7,41±0,523*	0,9±0,127*	1,59±0,214*	0,65±0,019*	95,58±9,562*

Интакт	1,45±0,012	2,15±0,24	3,6±0,362	0,9±0,011	156±7,631

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

Установлено влияние на концентрацию ионов в сыворотке крови, а именно снижение концентрации кальция на 18,6 % в сравнении с содержанием кальция в сыворотке крови интактных животных ($p<0,05$) на фоне приема сухого экстракта из водного извлечения черники обыкновенной листьев, и повышение концентрации кальция на фоне приема животными сухого экстракта ЧК вода – на 44,2 %. При этом при введении фуросемида концентрация кальция снижалась на 58,1 %, спиронолактона – на 34,9 %. При этом увеличивалась концентрация калия на 37,5 % при введении сухого экстракта из черники обыкновенной листьев (экстрагент – вода очищенная) и на 47,2 % - при введении сухого экстракта из черники кавказской листьев (экстрагент – вода очищенная). В группе на фоне приема спиронолактона концентрация калия увеличивалась на 69,7 %, в группе фуросемида – уменьшалась на 55,8 %. Влияние на обмен магния при введении сухого экстракта полученного путем экстракции водой очищенной из черники обыкновенной листьев было сопоставимо с действием спиронолактона (увеличение концентрации на 38,9 % и 68,9 % соответственно). При этом сухой экстракт ЧК вода не влиял на концентрацию магния в сыворотке крови. Влияние на содержание натрия в сыворотке крови наблюдалось также при введении сухого экстракта из водного извлечения из черники обыкновенной листьев (снижение концентрации на 18,4 %). Сухие экстракты из черники кавказской листьев снижали концентрацию натрия в меньшей степени, наибольший эффект наблюдали в группе приема ЧК 70 – снижение на 12,2 %. В группе с приемом спиронолактона концентрация натрия снизилась на 25,9 %, в группе фуросемида - на 38,7 %.

8.2.2.4. Оценка нейропротекторной активности *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L.

Наиболее выраженный эффект на интенсивность мозгового кровотока оказывали сухие экстракты из водно-спиртовых извлечений черники обыкновенной и черники кавказской листьев. Так, сухой экстракт ЧО 70 увеличивал скорость кровотока на 99,3 % в сравнении с группой негативного контроля. Эффект сухих экстрактов из черники кавказской листьев менее выражен, в наибольшей степени скорость мозгового кровотока увеличивает сухой экстракт ЧК 40 – на 47,1 % (рис. 8.7). Кроме того, уровень лактата в сыворотке крови составлял в группе НК 8,9 ммоль/л, в то время как после введения референта EGB671 наблюдалось снижение уровня лактата на 61,2%, а у животных, получавших сухой экстракт ЧО 40 – на 42,8 % и ЧК 70 – на 30,3 % (рис. 8.8). Оценка степени некроза полушарий мозга показала, что статистически значимо степень некроза уменьшали сухие экстракты ЧО 70 и ЧО 40 (на 28,2 % и 29,7 % соответственно). При этом стандартизированный экстракт гинкго билоба снижал степень

некроза мозга у животных на 34,3%. В схожей степени степень некроза также снижал сухой экстракт ЧК 40 – на 31,7% (рис. 8.9) [382].

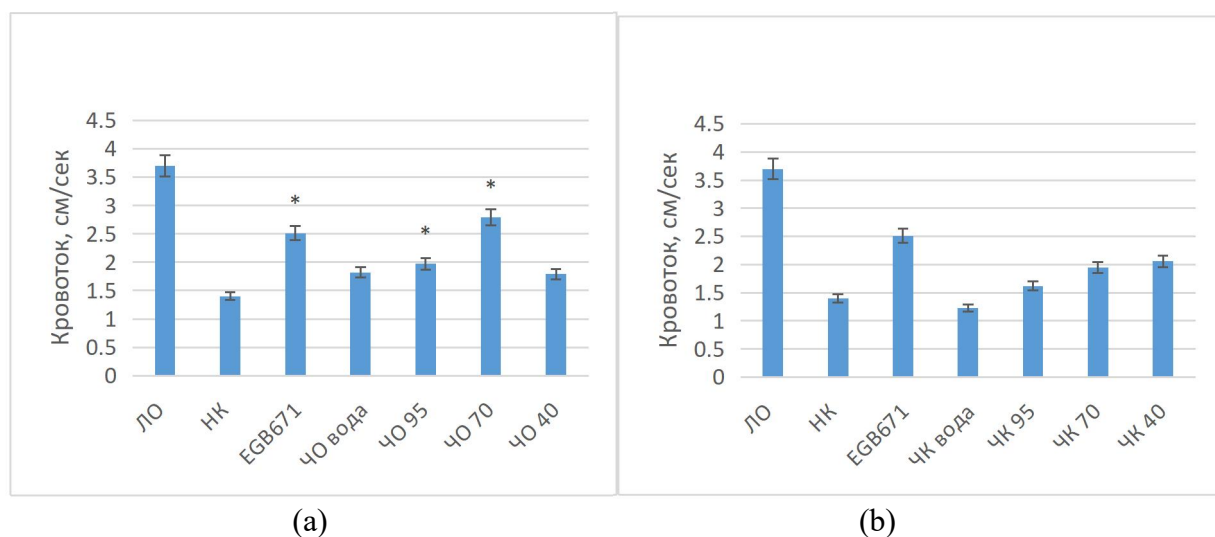


Рисунок 8.7 – Влияние на скорость кровотока головного мозга сухих экстрактов из черники листьев: а – черники обыкновенной; б – черники кавказской

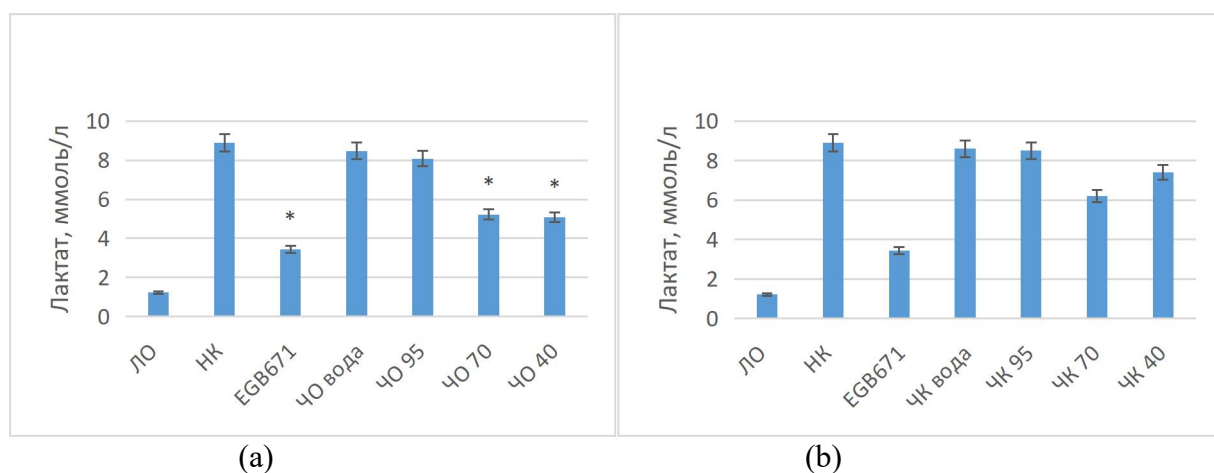


Рисунок 8.8 – Влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови сухих экстрактов из черники листьев: а – черники обыкновенной; б – черники кавказской

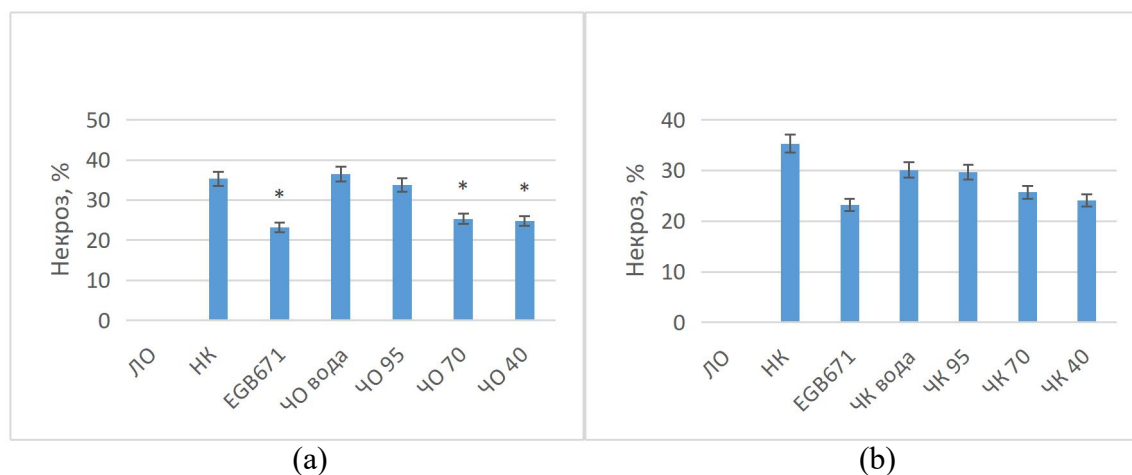


Рисунок 8.9 – Влияние на зону некроза головного мозга сухих экстрактов из черники листьев: а – черники обыкновенной; б – черники кавказской

8.2.2.5. Оценка антитирозиновой активности *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L.

Оценка антитирозиновых свойств анализируемых образцов позволила установить, что сухие экстракты из *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L. полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % и 70 % соответственно, демонстрируют наиболее выраженные тирозиназа-ингибирующие свойства (табл. 8.14).

Таблица 8.14 – Влияние сухих экстрактов из черники листьев на активность тирозиназы

Испытуемая субстанция	IC ₅₀ , мкг/мл (M±SEM)
ЧО 95	49,9±2,88
ЧО 70	74,8±1,09
ЧО 40	72,7±2,02
ЧО вода	91,1±1,28
ЧК 95	84,6±0,67
ЧК 70	77,5±0,53
ЧК 40	82,1±0,55
ЧК вода	95,7±0,47
Койевая кислота	33±1,9

8.2.2.6. Оценка актопротекторной активности *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L.

Значимое влияние на длительность плавания оказывало введение животным сухого экстракта ЧО 95 (увеличение длительности плавания на 4,4%), ЧО 70 (4,2 %). На 10 день приема сухих остатков профиль поменялся: наибольший эффект оказывали сухие экстракты ЧК 70 и ЧО вода, при приеме которых длительность плавания животных увеличилась на 224,1 % и 183,9 % по сравнению с группой НК. При этом в группе референта работоспособность увеличилась на 12,4%. Также длительность плавания увеличивалась в группе приема сухого экстракта ЧК 95 – на 183 % - и в группе ЧО 70 – на 159,4 % (табл. 8.15).

Таблица 8.15 – Влияние сухих экстрактов из черники листьев на физическую работоспособность животных

Испытуемая субстанция	Время плавания, сек	
	1 день	10 день
ЧО 95	135,5±9,3	152,4±18
ЧО 70	135,2±9,4	169,1±15,9*
ЧО 40	129,8±10	143,9±18,7
ЧО вода	134,8±9,1	185,1±16**
ЧК 95	122,1±15,17	184,5±19,8*
ЧК 70	119,6±16,07	211,3±13,45*
ЧК 40	120,3±12,15	174,6±18,37*
ЧК вода	118,7±13,49	156,9±17,57
НК	129,8±9,1	65,2±5,6
Женьшень, 1 мл/кг	126,3±8,1	145,9±10,7

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

8.2.3.1. Оценка острой токсичности *Vaccinium uliginosum* L.

Класс токсичности сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев проводили по методу «Up and Down» (раздел 2.6). Не установлена гибель животных при определении предельной допустимой дозы, а также не фиксировали отклонений в поведении и общем состоянии животных, их сенсорном восприятии. Согласно рекомендациям протокола OECD №425 к основному эксперименту не приступали без определения острой токсичности и в качестве LD₅₀ установили дозу 2000 мг/кг сухого экстракта. На основании таких результатов сухие экстракты из голубики обыкновенной листьев были отнесены к 5 классу токсичности по GSH классификации.

8.2.3.2. Оценка антиоксидантной активности *Vaccinium uliginosum* L.

Проводили оценку прямой (тесты по ингибированию продукции радикалов) и непрямой (определение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) антиоксидантной активности сухих экстрактов.

При определении влияния на активность эндогенных антиоксидантных агентов установлено повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении животным сухих остатков, полученных экстракцией голубики обыкновенной листьев спиртом этиловым 40 % и 70 % на 7,5 % и 9,1 % соответственно ($p < 0,05$). Активность глутатион-редуктазы повышалась под действием тех же сухих остатков на 40,4% и 33,5 % (голубики обыкновенной листья, экстракция спиртом этиловым 40% и 70% соответственно). Активность супероксиддисмутазы увеличивалась на 24,8 % при введении сухого экстракта, полученного экстракцией голубики обыкновенной листьев спиртом 70%, и на 20,5 % при введении сухого экстракта, полученного экстракцией спиртом 40%. Активность глутатионпероксидазы увеличивалась при введении животным сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев, полученных экстракцией спиртом 40 % и 70 %, на 7,5 % и 8,7 % соответственно. Увеличения активности каталазы не наблюдали при введении сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев. При этом содержание прооксиданта малонового диальдегида уменьшалось на 41,4% и 39,4 % (введение сухого экстракта из голубики обыкновенной листьев при экстракции их спиртом 40 % и спиртом 70 % соответственно). Концентрация диеновых диальдегидов уменьшалась на 24,6 % при введении животным сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев, полученных их экстракцией спиртом 70 % (табл. 8.16).

Таблица 8.16 – Влияние сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание прооксидантов

Фермент	ГБФ-ДГ, Ед/Л	ГР, Ед/Л	СОД, Ед/Л	ГП, Ед/Л	Каталаза, мкат/Л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л
ГБ 95	4075,408± 84,872	31,86± 2,791	319,86± 7,496	622,26± 11,642	0,847± 0,025	3,71± 0,293	8,63± 0,625
ГБ 70	4370,518± 81,030*	40,34± 3,067*	374,9± 6,748*	654,87± 11,074*	0,825± 0,058*	3,27± 0,462*	7,39± 0,613*
ГБ 40	4306,905± 85,961*	42,41± 4,211*	362,03± 8,38*	647,62± 8,889*	0,776± 0,057*	3,11± 0,586*	7,49± 0,514*
ГБ вода	4047,932± 84,258	32,78± 4,754	320,45± 6,797	611,04± 11,806	0,741± 0,029	4,26± 0,553	9,35± 0,425
Интакт	4007,53± 85,231	30,21± 2,562	300,5± 7,129	602,6± 5,946	0,863± 0,0145	5,4± 0,524	9,8± 0,696

Примечание: сухие экстракты из голубики обыкновенной (ГБ) листьев, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % (ГБ 95), спиртом этиловым 70 % (ГБ 70), спиртом этиловым 40 % (ГБ 40), водой очищенной (ГБ вода); ГБФ-ДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГР – глутатионредуктаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты; * - статистически значимо относительно интакта.

В результате оценки антиоксидантной активности (в эксперименте *in vitro*) установлено минимальное значение IC₅₀ при испытании сухих экстрактов водно-спиртовых извлечений из голубики обыкновенной листьев. Так, в опыте DPPH-радикалом минимальная концентрация полуингибирования установлена для сухого экстракта, полученного экстракцией сырья спиртом 70 % (22,3±0,48 мкг/мл), в наименьшей концентрации (26,3±0,14 мкг/мл) супероксид-радикал ингибировал сухой экстракт, полученной экстракцией листьев голубики обыкновенной спиртом 40%; гидроксил-радикал ингибировал сухой экстракт, полученный экстракцией листьев спиртом 40 %, в концентрации 21,8±0,37 мкг/мл. Нитрозил-радикал в наименьшем количестве - 65,5±0,35 мкг/мл - ингибировал сухой экстракт, полученный экстракцией листьев голубики обыкновенной спиртом 70 % (табл. 8.17).

Таблица 8.17 – Значения концентраций полуингибирования сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев в испытаниях с радикалами

Радикал	IC ₅₀ , мкг/мл			
	DPPH	Супероксид	Гидроксил	Нитрозил
ГБ 95	42,3±0,56	61,3±0,35	33,1±0,46	68,3±0,83
ГБ 70	22,3±0,48	58,5±0	33,2±0,86	65,5±0,35
ГБ 40	58,4±0,25	26,3±0,14	21,8±0,37	69,7±0,98
ГБ вода	42,9±0,64	59,8±0,03	39±0,36	69,5±0,67
Тролокс	3,2±0,72	4,1±0,82	3,7±0,6	5,2±0,47

8.2.3.3. Оценка диуретической активности *Vaccinium uliginosum* L.

Увеличение объема мочи наблюдали при введении животным сухого экстракта водного извлечения из голубики обыкновенной листьев, при этом результаты сопоставимы с действием спиронолактона (табл. 8.18).

Таблица 8.18 – Влияние сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев на объем диуреза и концентрацию ионов в сыворотке крови

Показатель	Объем мочи, мл	Конц. кальция, ммоль/л	Конц. калия, ммоль/л	Конц. магния, ммоль/л	Конц. натрия, ммоль/л
ГБ 95	1,27±0,17	2,21±0,119	3,52±0,027	0,7±0,0217	154,14±9,860
ГБ 70	1,49±0,038	2,49±0,182	3,98±0,089	1,04±0,022	141,99±6,613
ГБ 40	1,79±0,147	2,44±0,122	3,1±0,017	0,77±0,018	148,62±3,186
ГБ вода	2,4±0,051*	1,42±0,056	4,54±0,076*	1,23±0,015*	134,82±4,895
Спиронолактон, 25 мг/кг	3,68±0,081*	1,4±0,164*	6,11±0,018*	1,52±0,032*	115,63±5,588*
Фуросемид, 10 мг/кг	7,41±0,523*	0,9±0,127*	1,59±0,214*	0,65±0,019*	95,58±9,562*
Интакт	1,45±0,012	2,15±0,24	3,6±0,362	0,9±0,011	156±7,631

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

Установлено влияние на концентрацию ионов в сыворотке крови, а именно снижение концентрации кальция на 34 % в сравнении с содержанием кальция в сыворотке крови интактных животных ($p<0,05$) на фоне приема сухого экстракта (экстрагент – вода) из голубики обыкновенной листьев. При этом при введении фуросемида концентрация кальция снижалась на 58,1 %, спиронолактона – на 34,9 %. При этом увеличивалась концентрация калия на 26,1 % при введении сухого экстракта (экстрагент – вода) из голубики обыкновенной листьев. В группе на фоне приема спиронолактона концентрация калия увеличивалась на 69,7 %, в группе фуросемида – уменьшалась на 55,8 %. Влияние на обмен магния при введении сухого экстракта из голубики обыкновенной листьев было схоже с действием спиронолактона (увеличение концентрации на 36,7 % и 68,9 % соответственно). Влияние на содержание натрия в сыворотке крови наблюдалось также при введении сухого экстракта из голубики обыкновенной (снижение концентрации на 13,6 %). В группе с приемом спиронолактона концентрация натрия снизилась на 25,9 %, в группе фуросемида - на 38,7 %.

8.2.3.4. Оценка нейропротекторной активности *Vaccinium uliginosum* L.

Наиболее выраженный эффект на интенсивность мозгового кровотока оказывали сухие экстракты из водно-спиртовых извлечений (спирт этиловый 40 % и 70 %) голубики обыкновенной листьев. Так, сухой экстракт ГБ 40 увеличивал скорость кровотока на 91,4 % в сравнении с группой негативного контроля, сухой экстракт ГБ 70 – на 97,1 %. (рис. 8.10). Кроме

того, уровень лактата в сыворотке крови составлял в группе НК 8,9 ммоль/л, в то время как после введения референта EGB671 наблюдалось снижение уровня лактата на 61,2 %, а у животных, получавших сухой экстракт ГБ 70 – на 45,1 %; в группе при приеме ГБ 40 концентрация лактата снижалась на 47,6 % (рис. 8.11). Оценка степени некроза полушарий мозга показала, что статистически значимо степень некроза уменьшали сухие экстракты ГБ 70 и ГБ 40 (на 32 % и 27,4 % соответственно). При этом стандартизированный экстракт гинкго билоба снижал степень некроза мозга у животных на 34,3 % (рис. 8.12).

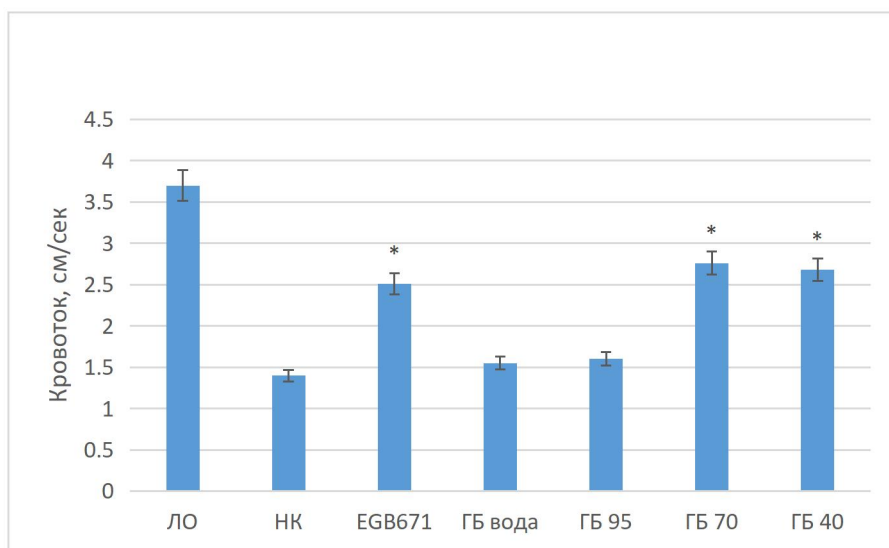


Рисунок 8.10 – Влияние на скорость кровотока головного мозга сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев

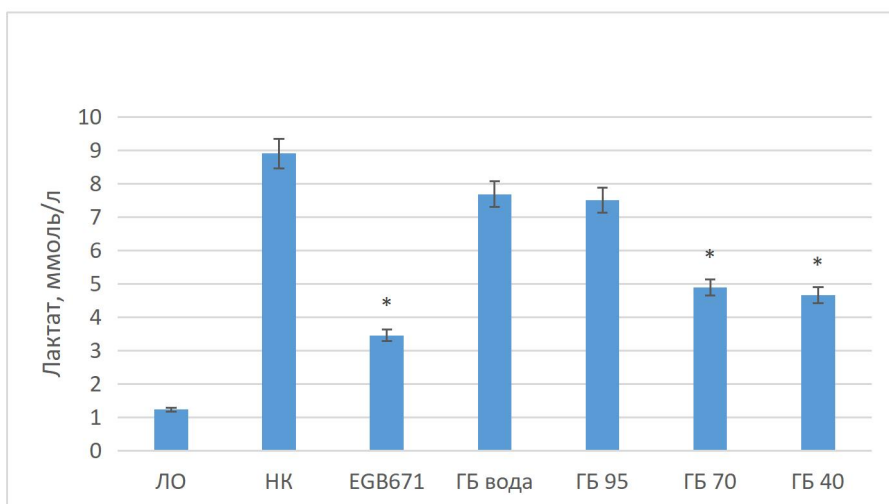


Рисунок 8.11 – Влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев

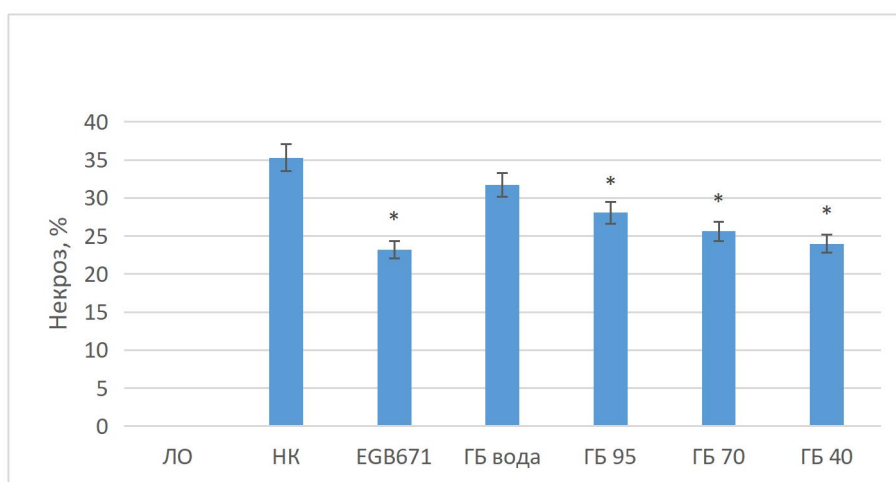


Рисунок 8.12 – Влияние на зону некроза головного мозга сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев

8.2.3.5. Оценка антитирозиновой активности *Vaccinium uliginosum* L.

Оценка антитирозиновых свойств анализируемых экстрактов позволила установить, что сухие экстракты из голубики обыкновенной листьев, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % и водой очищенной, демонстрируют наиболее выраженные тирозиназа-ингибирующие свойства, близкие к койевой кислоте (табл. 8.19). Так, сухой остаток ГБ 95 ингибировал тирозиназу в минимальной концентрации $43,9 \pm 2,43$ мкг/мл, ГБ вода - $44,7 \pm 2,79$ мкг/мл, в то время как койевая кислота – в концентрации $33 \pm 1,9$ мкг/мл. В тоже время остатки ГБ 40 и ГБ 70 не обладали антитирозиновой активностью.

Таблица 8.19 – Влияние сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев на активность тирозиназы

Испытуемая субстанция	IC ₅₀ , мкг/мл (M±SEM)
ГБ 95	43,9±2,43
ГБ 70	81,1±2,38
ГБ 40	68,9±2,44
ГБ вода	44,7±2,79
Койевая кислота	33±1,9

8.2.3.6. Оценка актопротекторной активности *Vaccinium uliginosum* L.

Значимое влияние на длительность плавания оказывало введение животным сухого экстракта ГБ 70 (увеличение длительности плавания на 3,2 %). На 10 день приема сухих экстрактов профиль оказался следующий: наибольший эффект оказывали сухие экстракты ГБ 40 и ГБ вода, при приеме которых длительность плавания животных увеличилась на 160,1 % и 173,9 % по сравнению с группой НК. При этом в группе референта работоспособность увеличилась на 123,8 % (табл. 8.20).

Таблица 8.20 – Влияние сухих экстрактов из голубики обыкновенной листьев на физическую работоспособность животных

Испытуемая субстанция	Время плавания, сек	
	1 день	10 день
ГБ 95	130,4±8,4	160,5±15,1*
ГБ 70	133,9±8,9	160,3±18,2*
ГБ 40	132,1±5,5	169,6±17,7*
ГБ вода	121,6±6,9	178,6±19,4*
НК	129,8±9,1	65,2±5,6
Женьшень, 1 мл/кг	126,3±8,1	145,9±10,7

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

8.2.4.1. Оценка острой токсичности *Vaccinium oxycoccos* L.

Класс токсичности сухих экстрактов из клюквы болотной побегов проводили по методу «Up and Down» (раздел 2.6). Не установлена гибель животных при определении предельной допустимой дозы, а также не фиксировали отклонений в поведении и общем состоянии животных, их сенсорном восприятии. Согласно рекомендациям протокола OECD №425 к основному эксперименту не приступали без определения острой токсичности и в качестве LD₅₀ установили дозу 2000 мг/кг сухого экстракта. На основании таких результатов сухие экстракты из клюквы болотной побегов были отнесены к 5 классу токсичности по GSH классификации.

8.2.4.2. Оценка антиоксидантной активности *Vaccinium oxycoccos* L.

Проводили оценку прямой (тесты по ингибированию продукции радикалов) и непрямой (определение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) антиоксидантной активности сухих экстрактов.

При определении влияния на активность эндогенных антиоксидантных агентов установлено наибольшее повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении животным сухого экстракта, полученного экстракцией клюквы болотной побегов спиртом этиловым 70 % на 10,8 % ($p < 0,05$). Активность глутатион-редуктазы повышалась под действием того же сухого экстракта на 52,1 %. Активность супероксиддисмутазы увеличивалась на 11,2 % при введении сухого экстракта, полученного экстракцией клюквы болотной побегов спиртом 70 %, а также активность глутатионпероксидазы увеличивалась на 11,9 у той же группы животных. Увеличение активности каталазы наблюдали только при введении сухого экстракта КБ 70 – на 27,5 %. При этом содержание прооксиданта малонового диальдегида уменьшалось на 22,2 %. Концентрация диеновых диальдегидов уменьшалась на 5,1 % и на 2,1 % при введении животным сухих экстрактов из клюквы болотной побегов, полученных их экстракцией спиртом 70 % и 40 % соответственно (8.21).

Таблица 8.21 – Влияние сухих экстрактов из клюквы болотной побегов на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание прооксидантов

Фермент	ГБФ-ДГ, Ед/Л	ГР, Ед/Л	СОД, Ед/Л	ГП, Ед/Л	Каталаза, мкат/Л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/ л
КБ 95	4056,34± 155,941	33,87± 7,561	316,34± 23,551	611,25± 58,741	0,804± 0,066	5,7± 0,227	10,54± 1,524
КБ 70	4441,24± 156,357*	45,96± 2,517*	334,14± 21,921*	674,20± 33,451*	1,1± 0,210*	4,2± 0,445*	9,3± 0,856*
КБ 40	3970,88± 145,335*	33,4± 1,561*	300,25± 23,624*	592,18± 24,187*	0,809± 0,012*	5,6± 0,898*	9,59± 0,951*
КБ вода	4075,22± 148,591	29,56± 2,691	311,25± 15,911	611,94± 24,332	0,703± 0,0162	5,5± 0,651	10,55± 1,261
Интакт	4007,53± 85,231	30,21± 2,562	300,5± 7,129	602,6± 5,946	0,863± 0,0145	5,4± 0,524	9,8± 0,696

Примечание: сухие экстракты из клюквы болотной (КБ) побегов, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % (КБ 95), спиртом этиловым 70 % (КБ 70), спиртом этиловым 40% (КБ 40), водой очищенной (КБ вода); ГБФ-ДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГР – глутатионредуктаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты; * – статистически значимо относительно интакта.

В результате оценки антиоксидантной активности (в эксперименте *in vitro*) установлено минимальное значение IC₅₀ при испытании сухих экстрактов водно-спиртовых извлечений из клюквы болотной побегов. Так, в опыте DPPH-, супероксид- и гидроксил-радикалом минимальная концентрация полуингибирования установлена для сухого экстракта, полученного экстракцией сырья водой очищенной (49,6±0,54, 24,2±0,15 и 26,8±0,55 мкг/мл соответственно). Нитрозил-радикал в наименьшем количестве - 26,9±0,4 мкг/мл - ингибировал сухой экстракт, полученный экстракцией побегов клюквы болотной спиртом этиловым 40% (табл. 8.22).

Таблица 8.22 – Значения концентраций полуингибирования сухих экстрактов из клюквы болотной побегов в испытаниях с радикалами

Радикал	IC ₅₀ , мкг/мл			
	DPPH	Супероксид	Гидроксил	Нитрозил
КБ 95	69,9±0,61	46,6±0,81	39,9±0,26	48,8±0,67
КБ 70	56,2±0,79	44,8±0,22	48,2±0,88	37,4±0,77
КБ 40	65,7±0,89	30,6±0,48	69,6±0,46	26,9±0,4
КБ вода	49,6±0,54	24,2±0,15	26,8±0,55	46,6±0,75
Тролокс	3,2±0,72	4,1±0,82	3,7±0,6	5,2±0,47

8.2.4.3. Оценка диуретической активности *Vaccinium oxycoccos* L.

Увеличение объема мочи наблюдали при введении животным сухого экстракта (экстрагент – вода) из клюквы болотной побегов, при этом результаты сопоставимы с действием спиронолактона (табл. 8.23).

Таблица 8.23 – Влияние сухих экстрактов из клюквы болотной побегов на объем диуреза и концентрацию ионов в сыворотке крови

Показатель	Объем мочи, мл	Конц. кальция, ммоль/л	Конц. калия, ммоль/л	Конц. магния, ммоль/л	Конц. натрия, ммоль/л
КБ 95	2,13±0,182	2,28±0,141	3,05±0,194	0,98±0,019	143,41±8,816
КБ 70	1,56±0,025	2,18±0,152	3,81±0,046	0,58±0,028	160,99±9,649
КБ 40	1,68±0,041	2,4±0,061	3,81±0,174	0,65±0,029	158,46±3,778
КБ вода	4,11±0,194*	1,87±0,051	4,73±0,131	1,42±0,034*	120,86±8,472*
Спиронолактон, 25 мг/кг	3,68±0,081*	1,4±0,164*	6,11±0,018*	1,52±0,032*	115,63±5,588*
Фуросемид, 10 мг/кг	7,41±0,523*	0,9±0,127*	1,59±0,214*	0,65±0,019*	95,58±9,562*
Интакт	1,45±0,012	2,15±0,24	3,6±0,362	0,9±0,011	156±7,631

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

Установлено влияние на концентрацию ионов в сыворотке крови, а именно снижение концентрации кальция на 13 % в сравнении с содержанием кальция в сыворотке крови интактных животных ($p<0,05$) на фоне приема сухого экстракта из водного извлечения из клюквы болотной побегов. При этом при введении фуросемида концентрация кальция снижалась на 58,1 %, спиронолактона – на 34,9 %. При этом увеличивалась концентрация калия на 31,4 % при введении сухого экстракта (экстрагент – вода) из клюквы болотной побегов. В группе на фоне приема спиронолактона концентрация калия увеличивалась на 69,7 %, в группе фуросемида – уменьшалась на 55,8 %. Влияние на обмен магния при введении сухого экстракта из голубики обыкновенной листьев было схоже с действием спиронолактона (увеличение концентрации на 57,8 % и 68,9 % соответственно). Влияние на содержание натрия в сыворотке крови наблюдалось также при введении сухого экстракта (экстрагент – вода) из клюквы болотной побегов (снижение концентрации на 22,5 %). В группе с приемом спиронолактона концентрация натрия снизилась на 25,9 %, в группе фуросемида - на 38,7 %.

8.2.4.4. Оценка нейропротекторной активности *Vaccinium oxycoccos* L.

Наиболее выраженный эффект на интенсивность мозгового кровотока оказывали сухие экстракты из водно-спиртовых извлечений (спирт этиловый 40 % и 70 %) клюквы болотной побегов. Так, сухой экстракт КБ 40 увеличивал скорость кровотока на 105,7% в сравнении с группой негативного контроля, сухой остаток КБ 70 – на 68,6 %. (рис. 8.13). Кроме того, уровень лактата в сыворотке крови составлял в группе НК 8,9 ммоль/л, в то время как после

введения референта EGB671 наблюдалось снижение уровня лактата на 61,2 %, а у животных, получавших сухой остаток КБ 70 – на 43,5 %; в группе при приеме КБ 40 концентрация лактата снижалась на 42% (рисунок 8.14). Оценка степени некроза полушарий мозга показала, что статистически значимо степень некроза уменьшали сухие экстракты КБ 70 и КБ 40 (на 27,1% и 35,3 % соответственно). При этом стандартизированный экстракт гинкго билоба снижал степень некроза мозга у животных на 34,3 % (рис. 8.15).

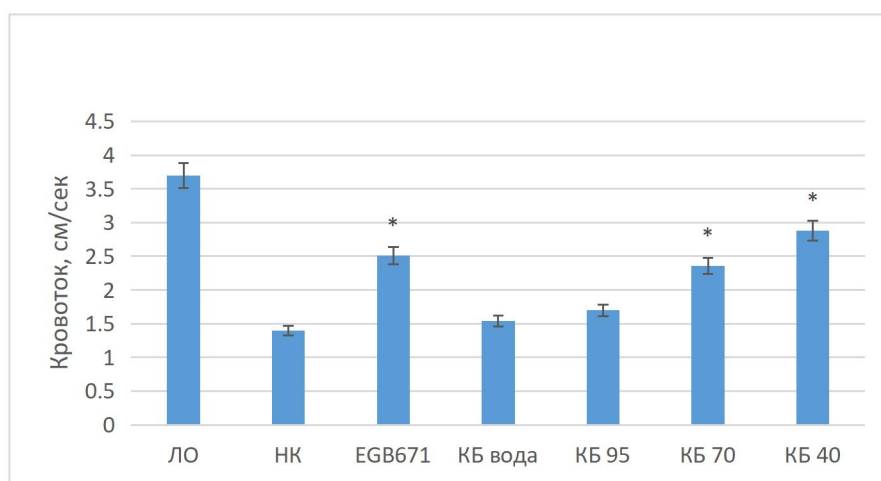


Рисунок 8.13 – Влияние на скорость кровотока головного мозга сухих экстрактов из клюквы болотной побегов

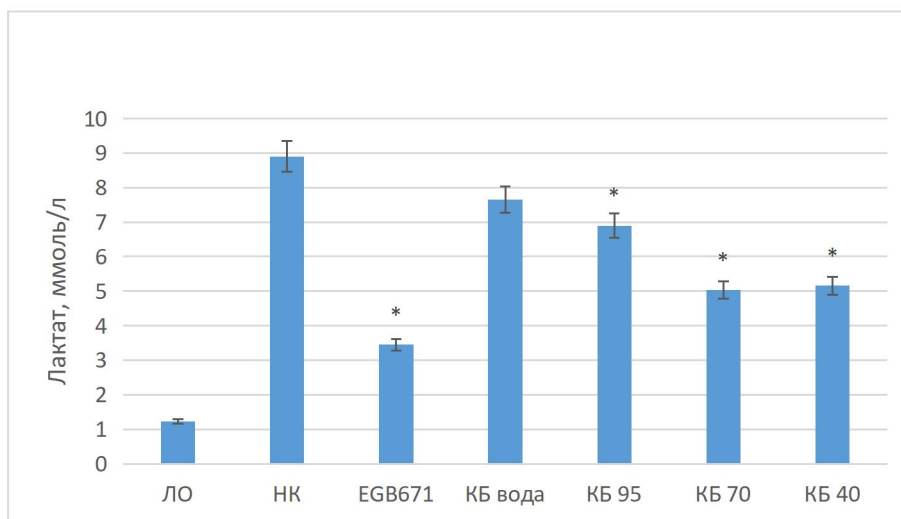


Рисунок 8.14 – Влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови сухих экстрактов из клюквы болотной побегов

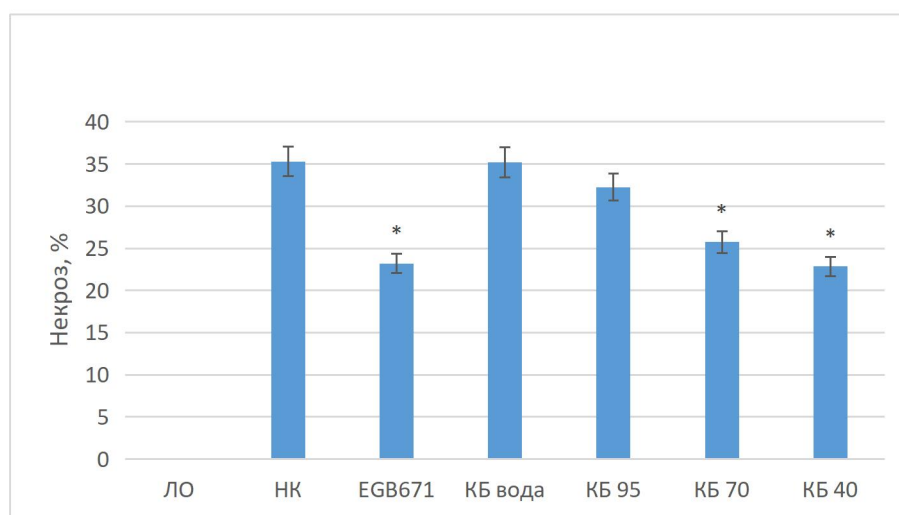


Рисунок 8.15 – Влияние на зону некроза головного мозга сухих экстрактов из клюквы болотной побегов

8.2.4.5. Оценка антитирозиновой активности *Vaccinium oxycoccos* L.

Оценка антитирозиновых свойств анализируемых образцов позволила установить, что сухой экстракт из клюквы болотной побегов, полученный экстракцией спиртом этиловым 40 %, демонстрируют наиболее выраженные тирозиназа-ингибирующие свойства, близкие к койевой кислоте (табл. 8.24). Так, сухой остаток КБ 40 ингибировал тирозиназу в минимальной концентрации $41,9 \pm 2,85$ мкг/мл, в то время как койевая кислота – в концентрации $33 \pm 1,9$ мкг/мл. В тоже время остатки КБ 95, КБ 70 и КБ вода не обладали антитирозиновой активностью.

Таблица 8.24 – Влияние сухих остатков из клюквы болотной побегов на активность тирозиназы

Испытуемая субстанция	IC ₅₀ , мкг/мл (M±SEM)
КБ 95	76,7±1,52
КБ 70	74,6±2,77
КБ 40	41,9±2,85
КБ вода	95,4±2,67
Койевая кислота	33±1,9

8.2.4.6. Оценка актопротекторной активности *Vaccinium oxycoccos* L.

Значимое влияние на длительность плавания оказывало введение животным сухого экстракта КБ 40 (увеличение длительности плавания на 4,5 %). На 10 день приема сухих экстрактов профиль оказался следующий: наибольший эффект оказывали сухие экстракты КБ 95 и КБ вода, при приеме которых длительность плавания животных увеличилась на 203,2 % и 172,7 % по сравнению с группой НК. При этом в группе референта работоспособность увеличилась на 123,8 % (табл. 8.25).

Таблица 8.25 – Влияние сухих экстрактов из клюквы болотной побегов на физическую работоспособность животных

Испытуемая субстанция	Время плавания, сек	
	1 день	10 день
КБ 95	124,6±6,4	177,8±15,3*
КБ 70	125±5,2	175±17,7*
КБ 40	135,6±9,2	161,4±17,6*
КБ вода	127,2±5	197,7±15,8*
НК	129,8±9,1	65,2±5,6
Женьшень, 1 мл/кг	126,3±8,1	145,9±10,7

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

8.3. Фармакологические исследования сырья видов рода *Prunella* L.

8.3.1. Оценка острой токсичности

Класс токсичности сухих экстрактов из черноголовки травы проводили по методу «Up and Down» (раздел 2.6). Не установлена гибель животных при определении предельной допустимой дозы, а также не фиксировали отклонений в поведении и общем состоянии животных, их сенсорном восприятии. Согласно рекомендациям протокола OECD №425 к основному эксперименту не приступали без определения острой токсичности и в качестве LD₅₀ устанавливали дозу 2000 мг/кг сухого экстракта. На основании таких результатов сухие экстракты из черноголовки травы были отнесены к 5 классу токсичности по GSH классификации.

8.3.2. Оценка антиоксидантной активности

Проводили оценку прямой (тесты по ингибированию продукции радикалов) и непрямой (определение активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) антиоксидантной активности сухих экстрактов.

При определении влияния на активность эндогенных антиоксидантных агентов установлено повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при введении животным сухих экстрактов, полученных экстракцией травы видов черноголовок спиртом этиловым 70% (черноголовка разрезная – на 16,4%; черноголовка крупноцветковая – 10,3 %; черноголовка обыкновенная – на 8,7 %; $p < 0,05$). Активность глутатион-редуктазы повышалась под действием тех же сухих экстрактов ЧК 70 - на 63,5 %; ЧР 70 – на 49,7 %; ЧО 70 – 46,4 %. Активность супероксиддисмутазы увеличивалась на 100,2% при введении сухого экстракта, полученного экстракцией чернойголовки крупноцветковой травы спиртом 70 %; при экстракции травы чернойголовки обыкновенной и чернойголовки разрезной тем же растворителем установлено увеличение активности СОД под действием сухих экстрактов из этих извлечений на 31,8 % и на 21,5 % соответственно. Активность глутатионпероксидазы увеличивалась при введении животным сухих экстрактов из чернойголовки разрезной и чернойголовки обыкновенной травы, полученных экстракцией спиртом 70%, на 8,3 % и 7,1 % соответственно. Сухие экстракты из

черноголовки крупноцветковой травы не повышали активность ГП. Влияние на активность каталазы наблюдалось при введении сухих экстрактов из черноголовки травы (экстрагент – спирт этиловый 70 %), а именно активность увеличилась на 43 % (ЧР 70), на 40,2 % (ЧК 70) и на 15,8 % (ЧО 70). При этом содержание прооксиданта малонового диальдегида уменьшалось на 25,1 % (введение сухого экстракта из черноголовки крупноцветковой травы при экстракции ее спиртом 70 %), 22,2 % (введение сухого экстракта из черноголовки разрезной травы при экстракции ее спиртом 70 %), 16,7 % (введение сухого экстракта из черноголовки обыкновенной травы при экстракции ее спиртом этиловым 70%). Концентрация диеновых диальдегидов уменьшалась при введении животным сухих остатков ЧР 70 на 17,3 %, ЧО 70 – на 16,3 %; ЧК 70 – на 13,8 % (табл. 8.26).

Таблица 8.26 – Влияние сухих экстрактов из черноголовки травы на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание прооксидантов

Фермент	ГБФ-ДГ, Ед/Л	ГР, Ед/Л	СОД, Ед/Л	ГП, Ед/Л	Каталаза, мкат/Л	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л
ЧО 95	4061,35± 47,261	34,38± 5,917	317,24± 29,651	599,6± 14,581	0,941± 0,015	5,9± 0,745	9,38± 1,218
ЧО 70	4356± 101,264*	44,23± 4,562*	396,14± 23,542*	645,2± 45,853*	0,999± 0,024*	4,5± 0,053*	8,2± 1,214*
ЧО 40	3916,21± 154,239	30,14± 7,562	302,71± 89,521	603,02± 51,695	0,72± 0,045	5,8± 0,124	10,34± 0,941
ЧО вода	4061,79± 54,954	30,07± 2,637	293,58± 14,571	615,58± 21,591	0,955± 0,017	5± 0,247	10,2± 2,652
ЧК 95	3993,13± 25,621	31,32± 4,264	312,33± 54,652	588,55± 23,697	0,774± 0,047	5,74± 2,941	10,33± 1,532
ЧК 70	4422,17± 187,561*	49,38± 5,911*	393,54± 21,981*	601,73± 25,854*	1,21± 0,013*	4,04± 0,179*	8,45± 1,261*
ЧК 40	3695,64± 78,654	28,03± 1,202	307,25± 20,391	586,25± 85,627	0,825± 0,085	5,92± 0,251	9,28± 0,963
ЧК вода	4065,09± 158,189	32,52± 2,521	315,91± 15,914	593,28± 41,217	0,738± 0,011	5,2± 0,562	9,1± 1,214
ЧР 95	3996,17± 251,562	28,9± 4,521	305,77± 33,694	584,78± 20,557	0,895± 0,014	5,84± 0,985	10,13± 1,256
ЧР 70	4665,21± 41,251*	45,23± 8,954*	365,2± 41,364*	652,32± 85,621*	1,234± 0,052*	4,2± 0,014*	8,1± 1,235*
ЧР 40	4008,07± 187,251	30,99± 6,325	306,54± 74,652	590,84± 41,951	0,821± 0,017	5,23± 0,987	10,79± 2,874
ЧР вода	4065,09± 158,189	32,52± 2,521	315,91± 15,914	593,28± 41,217	0,738± 0,011	5,2± 0,562	9,1± 1,214
Интакт	4007,53± 85,231	30,21± 2,562	300,5± 7,129	602,6± 5,946	0,863± 0,0145	5,4± 0,524	9,8± 0,696

Примечание: сухие экстракты из черноголовки обыкновенной (ЧО), черноголовки крупноцветковой (ЧК) и черноголовки разрезной (ЧР) травы, полученные экстракцией спиртом этиловым 95 % (ЧО 95, ЧК 95, ЧР 95), спиртом этиловым 70 % (ЧО 70, ЧК 70, ЧР 70), спиртом этиловым 40 % (ЧО 40, ЧК 40, ЧР 40), водой очищенной (ЧО вода, ЧК вода, ЧР вода); ГБФ-ДГ

– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГР – глутатионредуктаза, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты; * – статистически значимо относительно интакта.

В результате оценки антиоксидантной активности (в эксперименте *in vitro*) установлено минимальное значение IC_{50} при испытании сухих экстрактов водно-спиртовых извлечений из черноголовки травы. При этом показатель IC_{50} , был минимальным при испытании сухого экстракта (экстрагент – вода) из черноголовки разрезной травы в опыт с DPPH – $20,5 \pm 0,61$ мкг/мл. В минимальной концентрации ингибировал супероксид- и гидроксил-радикал сухой экстракт из черноголовки крупноцветковой травы (спирт этиловый 70) – $21,1 \pm 0,56$ мкг/мл и $35,8 \pm 0,15$ мкг/мл. При этом нитрозил-радикал в наименьшей концентрации ингибировал сухой экстракт ЧО вода - $21 \pm 0,2$ мкг/мл (табл. 8.27) [146].

Таблица 8.27 – Значения концентраций полуингибирования сухих экстрактов из черноголовки травы в испытаниях с радикалами

Радикал	IC_{50} , мкг/мл			
	DPPH	Супероксид	Гидроксил	Нитрозил
ЧО 95	$22,4 \pm 0,54$	$60,4 \pm 0,07$	$58,3 \pm 0,34$	$22,5 \pm 0,72$
ЧО 70	$56,7 \pm 0,68$	$21,7 \pm 0,82$	$63,9 \pm 0,14$	$60,4 \pm 0,62$
ЧО 40	$51,8 \pm 0,1$	$28,9 \pm 0,45$	$44,4 \pm 0,5$	$53 \pm 0,74$
ЧО вода	$51 \pm 0,26$	$54,6 \pm 0,45$	$49 \pm 0,24$	$21 \pm 0,2$
ЧК 95	$39,9 \pm 0,87$	$34,6 \pm 0,72$	$68,6 \pm 0,04$	$69,1 \pm 0,71$
ЧК 70	$53,7 \pm 0,53$	$21,1 \pm 0,56$	$35,8 \pm 0,15$	$45 \pm 0,47$
ЧК 40	$36,7 \pm 0,61$	$25,4 \pm 0,24$	$45,2 \pm 0,13$	$21,4 \pm 0,92$
ЧК вода	$20,8 \pm 0,33$	$51,3 \pm 0,31$	$43,3 \pm 0,45$	$43,5 \pm 0,87$
ЧР 95	$27,1 \pm 0,75$	$43,8 \pm 0,19$	$38 \pm 0,06$	$62,2 \pm 0,54$
ЧР 70	$66,1 \pm 0,43$	$63,8 \pm 0,93$	$58,4 \pm 0,9$	$61,7 \pm 0,04$
ЧР 40	$27,4 \pm 0,45$	$40,2 \pm 0,02$	$41,3 \pm 0,3$	$62,2 \pm 0,6$
ЧР вода	$20,5 \pm 0,61$	$32,2 \pm 0,23$	$67,9 \pm 0,03$	$37,7 \pm 0,31$
Тролокс	$3,2 \pm 0,72$	$4,1 \pm 0,82$	$3,7 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,47$

8.3.3. Оценка диуретической активности

Увеличение объема мочи наблюдали при введении животным сухих экстрактов водных извлечений из черноголовки травы, при этом результаты сопоставимы с действием фуросемида (табл. 8.28) [148].

Таблица 8.28 – Влияние сухих экстрактов из черноголовки травы на объем диуреза и концентрацию ионов в сыворотке крови

Показатель	Объем	Конц.	Конц.	Конц.	Конц. натрия,

	мочи, мл	кальция, ммоль/л	калия, ммоль/л	магния, ммоль/л	ммоль/л
ЧО 95	1,52±0,162	2,27±0,019	4,12±0,021	1,17±0,012	141,34±5,6
ЧО 70	1,6±0,192	2,76±0,018	3±0,171	1,15±0,025	147,35±7,585
ЧО 40	1,54±0,072	2,73±0,035	3,11±0,021	0,93±0,012	157,94±6,703
ЧО вода	5,7±0,178*	1,66±0,04*	5,17±0,058*	1,37±0,021	130,39±9,243*
ЧК 95	1,5±0,17	2,61±0,116	2,65±0,02	0,74±0,014	147,73±3,834
ЧК 70	1,46±0,101	2,1±0,086	3,84±0,11	1,13±0,027	150,87±2,881
ЧК 40	1,28±0,033	2,26±0,165	3,3±0,193	0,81±0,021	160,41±8,672
ЧК вода	5,4±0,074*	1,5±0,014*	4,72±0,153*	1,47±0,029	122,85±8,758*
ЧР 95	2,05±0,018	2,49±0,118	3,79±0,17	1,13±0,034	155,05±4,084
ЧР 70	1,43±0,05	2,05±0,19	2,96±0,194	1,14±0,035	141,86±3,079
ЧР 40	1,38±0,156	2,8±0,152	3,05±0,022	1,08±0,028	151,31±4,239
ЧР вода	5,91±0,021*	1,58±0,037*	5,67±0,02*2	1,1±0,023	124,11±4,175*
Спиринолактон, 25 мг/кг	3,68±0,081*	1,4±0,164*	6,11±0,018*	1,52±0,032*	115,63±5,588*
Фуросемид, 10 мг/кг	7,41±0,523*	0,9±0,127*	1,59±0,214*	0,65±0,019*	95,58±9,562*
Интакт	1,45±0,012	2,15±0,24	3,6±0,362	0,9±0,011	156±7,631

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

Установлено влияние на концентрацию ионов в сыворотке крови, а именно снижение концентрации кальция на 30,2 %, 26,5 % и 22,8 % в сравнении с содержанием кальция в сыворотке крови интактных животных ($p < 0,05$) на фоне приема сухих экстрактов (экстрагент - вода) из черноголовки крупноцветковой, ч. разрезной и ч. обыкновенной травы соответственно. При введении фуросемида концентрация кальция снижалась на 58,1 %, спинонолактона – на 34,9 %. При этом увеличивалась концентрация калия на 50,3 % при введении сухих экстрактов ЧР вода на 57,5 %, ЧО вода – на 43,6 %, ЧК вода – на 31,1%. В группе на фоне приема спинонолактона концентрация калия увеличивалась на 69,7 %, в группе фуросемида – уменьшалась на 55,8 %. Влияние на обмен магния при введении сухих экстрактов (экстрагент – вода) из черноголовки крупноцветковой и черноголовки обыкновенной было сопоставимо с действием спинонолактона (увеличение концентрации на 63,3 % и 52,2 % соответственно). При этом наибольшее увеличение содержания магния в сыворотке крови наблюдалось при введении сухого экстракта ЧР 70 – на 26,7 %. Влияние на содержание натрия в сыворотке крови наблюдалось также при введении сухих экстрактов из водных извлечений из черноголовки крупноцветковой, ч. разрезной и ч. обыкновенной (снижение концентрации на 21,3 %, 20,4 % и 16,4 % соответственно). В группе с приемом спинонолактона концентрация натрия снизилась на 25,9 %, в группе фуросемида - на 38,7 %.

8.3.4. Оценка нейропротекторной активности

Наиболее выраженный эффект на интенсивность мозгового кровотока оказывали сухие экстракты из водно-спиртовых извлечений черноголовки травы [150]. Так, сухой экстракт ЧО

70 увеличивал скорость кровотока на 2,1 % в сравнении с группой негативного контроля, сухой экстракт ЧК 95 – на 2,16%, ЧР 95 – на 2,1 %. (рис. 8.16). Кроме того, уровень лактата в сыворотке крови составлял в группе НК 8,9 ммоль/л, в то время как после введения референта EGB 671 наблюдалось снижение уровня лактата на 61,2 %, а у животных, получавших сухой экстракт ЧО 70 – на 46,3 %, наиболее интенсивно уровень лактата снизился у животных, получавших сухой экстракт ЧР 70 – на 54,7 %, далее по интенсивности влияния был сухой экстракт ЧК 70 – снижение концентрации лактата на 52 % (рис. 8.17). Оценка степени некроза полушарий мозга показала, что степень некроза уменьшали сухие экстракты ЧО 70, ЧК 70 и ЧР 70 (на 20,7 %, 35,1 %, 27,8 % соответственно). При этом стандартизированный экстракт гинкго билоба снижал степень некроза мозга у животных на 34,3 %. В схожей степени степень некроза также снижал сухой экстракт ТК 70 – на 30,3 % (рис. 8.18).

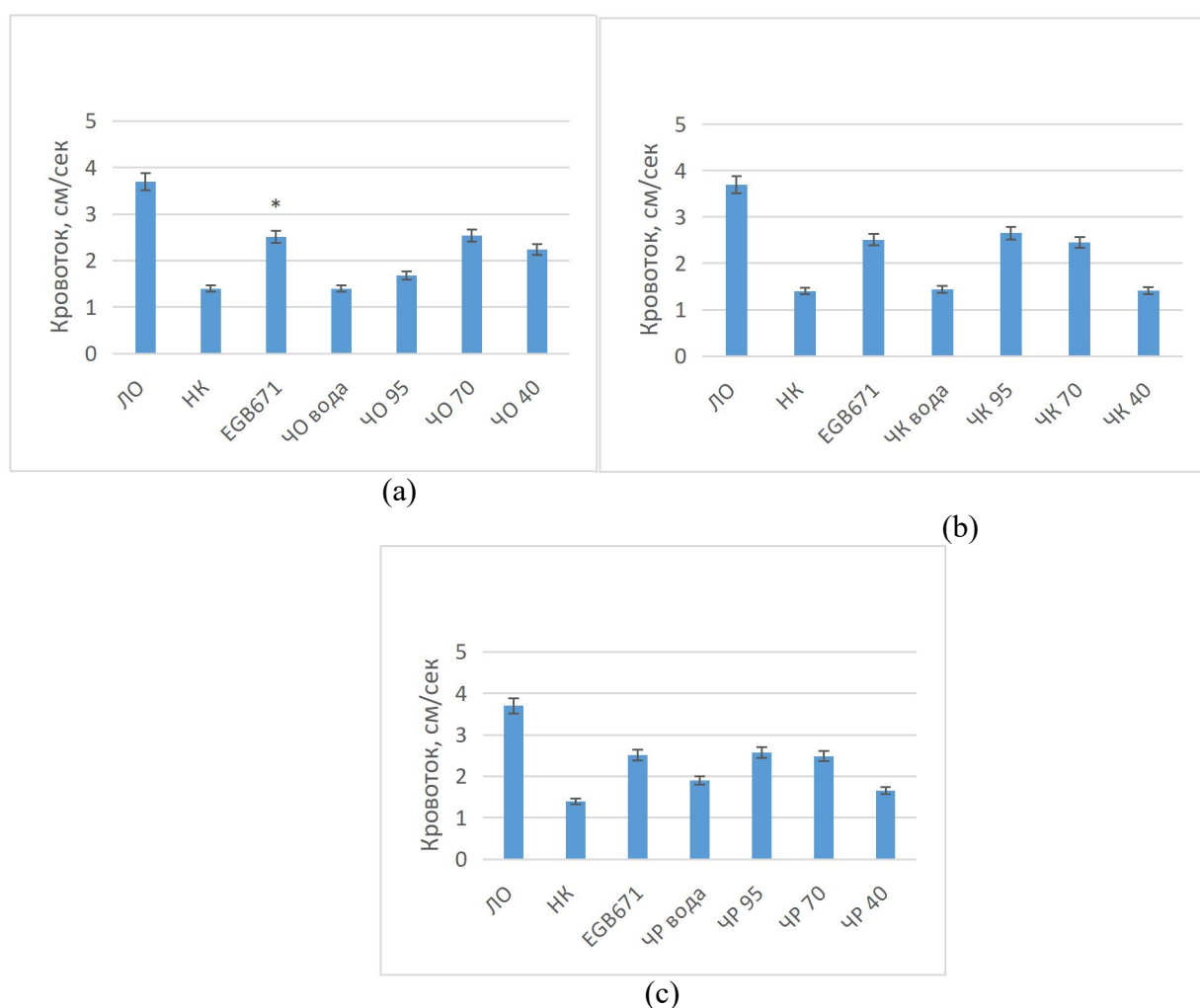
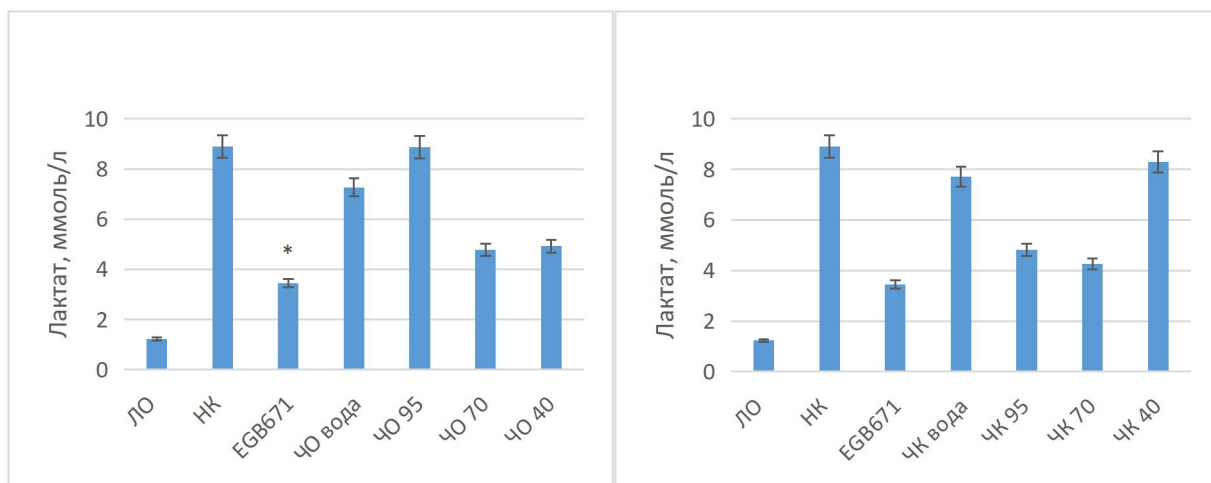
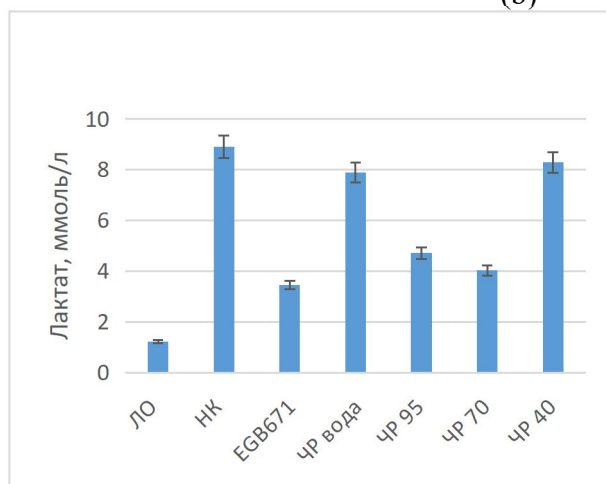


Рисунок 8.16 – Влияние на скорость кровотока головного мозга сухих экстрактов из черноголовки травы: а – черноголовки обыкновенной; б – черноголовки крупноцветковой; с – черноголовки разрезной



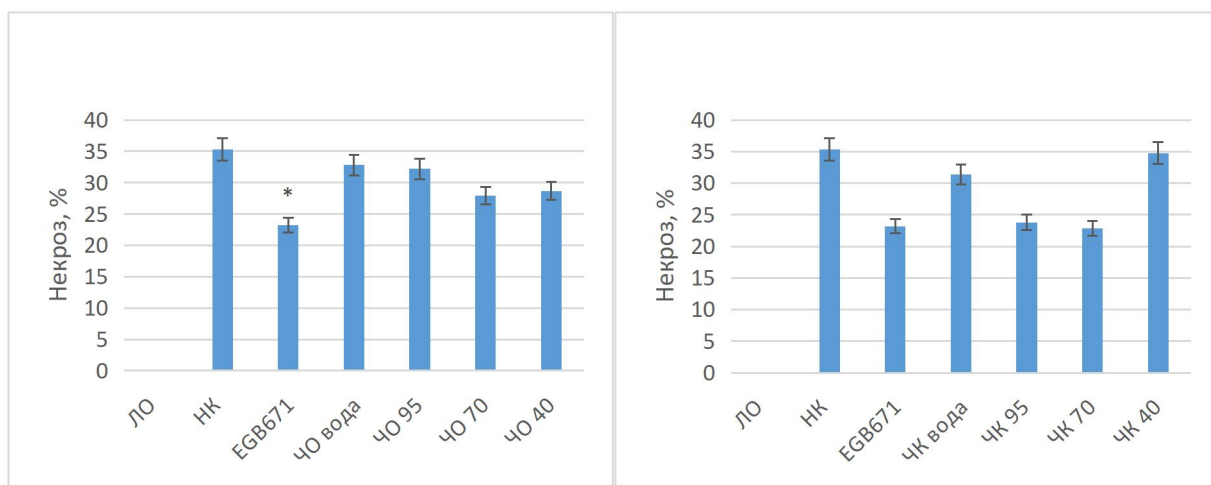
(a)

(b)



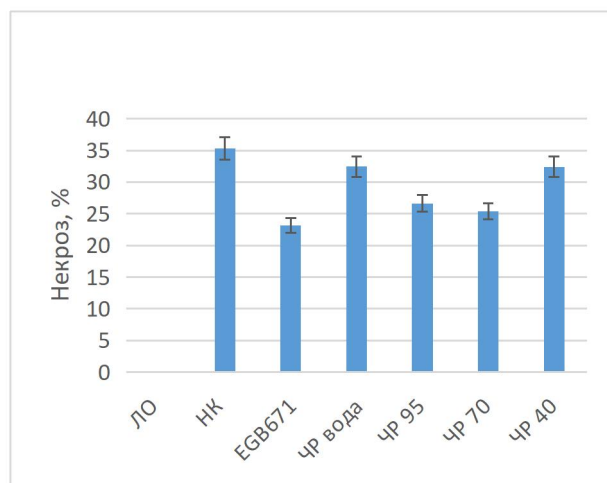
(c)

Рисунок 8.17 – Влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови сухих экстрактов из черноголовки травы: а – черноголовки обыкновенной; б – черноголовки крупноцветковой; с – черноголовки разрезной



(a)

(b)



(с)

Рисунок 8.18 – Влияние на зону некроза головного мозга сухих экстрактов из чернойголовки травы: а – чернойголовки обыкновенной; б – чернойголовки крупноцветковой; с – чернойголовки разрезной

8.3.5. Оценка антигистаминажной активности

Оценка антигистаминажных свойств анализируемых экстрактов позволила установить, что наиболее выраженные гистаминаза-ингибирующие свойства проявили сухие экстракты из чернойголовки травы: ЧО вода, ЧК 70 и ЧР 70 (табл. 8.29).

Таблица 8.29 – Влияние сухих остатков из чернойголовки травы на активность гистаминазы

Испытуемая субстанция	IC ₅₀ , мкг/мл (M±SEM)
ЧО 95	85±2,18
ЧО 70	68,5±2,83
ЧО 40	89,3±2,75
ЧО вода	67,7±1,13
ЧК 95	99,1±2,34
ЧК 70	56,1±2,54
ЧК 40	86,3±2,1
ЧК вода	74±1,11
ЧР 95	78,6±1,97
ЧР 70	50,8±2,01
ЧР 40	64,9±1,76
ЧР вода	77,8±2,91
Койевая кислота	33±1,9

8.3.6. Оценка актопротекторной активности

Увеличение длительности плавания на 6,9 % наблюдали в первый день при введении животным сухого экстракта ЧО 40. На 10 день приема сухих экстрактов наибольший эффект оказывали сухие экстракты из (экстрагент – вода) чернойголовки травы: ЧО вода увеличивал работоспособность на 196,2 %, ЧК вода – на 198,3 %, ЧР вода – на 202,3 % по сравнению с

группой НК. При этом в группе референта работоспособность увеличилась на 123,8 % (табл. 8.30).

Таблица 8.30 – Влияние сухих экстрактов из черноголовки травы на физическую работоспособность животных

Испытуемая субстанция	Время плавания, сек	
	1 день	10 день
ЧО 95	127,7±6,8	173,6±19,4*
ЧО 70	129,4±8,2	148,8±19,8*
ЧО 40	138,8±5,7	190±19,9*
ЧО вода	120,5±6,9	193,1±16,9*
ЧК 95	136,9±6,7	163±16,2*
ЧК 70	136,3±9,5	155,6±15,5*
ЧК 40	120,5±9,7	174,5±16,4*
ЧК вода	135,9±7,2	194,5±18,3*
ЧР 95	133,4±7,1	143,6±17,9*
ЧР 70	125,8±9,5	170,6±19,3*
ЧР 40	135,6±9,3	186,7±17,3*
ЧР вода	120,1±9,5	197,1±19,6*
НК	129,8±9,1	65,2±5,6
Женьшень, 1 мл/кг	126,3±8,1	145,9±10,7

Примечание: * - статистически значимо относительно интакта

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 8

1. В ходе оценки фармакологической активности и безопасности применения сухих экстрактов, полученных из представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. были установлены низкотоксичные свойства анализируемых экстрактов. Так все исследуемые объекты выдержали испытание предельной дозы в процедуре определения «острой токсичности» по процедуре «Вверх-вниз».

2. Показано, что изучаемые сухих экстрактов (экстрагент – спирт этиловый 70 % и 40 %) обладают выраженной антиоксидантной активностью, которая носила как прямой (скэвенджинг свободных радикалов кислорода), так и непрямой (активация ферментов эндогенной антиоксидантной защиты) характер.

3. Установлено, что применение сухих экстрактов полученных путем экстракции спиртом этиловым 40 % и 70 %, и в меньшей степени спиртом этиловым 95 % оказывает нейропротекторное действия, выражаемое в виде уменьшение зоны некроза головного мозга у животных с окклюзией средней мозговой артерии, а также восстановлении уровня кровотока и метаболических реакций мозговой ткани.

4. Применение анализируемых сухих экстрактов полученных путем экстракции спиртом этиловым 40 % и 70 % способствовало повышению физической работоспособности животных в условиях истощающих физических нагрузок.

5. Введение животным сухих экстрактов полученных путем экстракции водой сопровождалось развитием мягкого диуретического действия, сопровождаемое относительной стабильностью (в сравнении с фуросемидом) электролитного состава сыворотки крови. При этом, на основании анализа ионного состава крови можно предполагать калийсберегающий характер действия изучаемых сухих экстрактов (экстрагент – вода).

6. По результатам проведенного фармакологического изучения сухих экстрактов, полученных из представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L., предполагается поливалентный профиль активности анализируемых объектов, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

ГЛАВА 9. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ЛРС, СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS* ADANS., *VACCINIUM* L., *PRUNELLA* L.

В результате комплексного исследования сырьевых источников, содержащих в качестве ведущей группы БАС - фенольные соединения, был разработан методологический подход исследования ЛРС. Воспроизводимость методологии была опробована на растениях из различных семейств и родов, включавшая фармакопейные и нефармакопейные виды ЛРС.

1. На первом этапе исследования лекарственного растения определяют места его естественного произрастания, ресурсы, возможность введения в культуру (на основании литературных или собственных исследований);

2. Экспериментально определяют время сбора ЛРС и условия его сушки (при использовании естественной сушки (воздушно-теновой) и искусственной (конвективной и инфракрасной сушки при температурах от 40 до 70 °С, с шагом в 10 °С).

3. Устанавливают подлинность производящего растения и его сырья по внешним и анатомическим признакам. Для растений, имеющих близкородственные виды или способных образовывать гибридные формы, допустимо применения ДНК-штрихкодирования.

4. Фитохимический анализ проводят с использованием современных инструментальных методов анализа и на основе полученных данных вносят изменения в существующие методики стандартизации ЛРС. Фитохимический скрининг нефармакопейных видов сырья так же проводят с учетом современных аналитических приборов и методик с последующей разработкой норм качества для внесения их в проект ФС.

5. Для внесения в проект ФС на ЛРС устанавливают показатель «Определение основных групп биологически активных веществ» с помощью качественных реакций или метода ТСХ по характеру и наличию пятен на хроматографической пластинке.

6. Разрабатывают методики качественного и количественного содержания БАС с последующим определением фармакологической активности для сырья с профилем фенольных соединений. Для сырья с неизвестным химическим составом устанавливают качественный и количественный состав с использованием методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДАД и масс-спектрометрии. На основе полученных данных разрабатываем методики качественного, количественного содержания фенольных соединений для внесения в проект ФС и проводим мониторинг фармакологической активности.

7. При обнаружении веществ в смеси фенольных соединений, ранее не описанных в литературе, их:

➤ выделяют и устанавливают структуру при использовании колоночной хроматографии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии;

➤ подвергают стандартизации и рекомендуют при необходимости в качестве фармакопейных образцов;

➤ подвергают исследованию фармакологической активности.

8. Стандартизацию сырья следует проводить:

➤ по суммарному содержанию фенологликозидов, фенолокислот или флавоноидов по предварительно разработанной и валидированной методике количественного определения с использованием спектрофотометрии в УФ- и видимой области, в пересчете на доминирующий в смеси компонент;

➤ по индивидуальному компоненту с использованием ранее разработанной и валидированной методике с использованием сепарационных методов анализа – ВЭЖХ и КЭ.

9. Фармакопейную статью на сырье с установленными нормами качества (влажность, зола, экстрактивные вещества, сроки годности, условия сушки и заготовки) в плановом порядке подвергают пересмотру с учетом современных инструментальных методов и вносят соответствующие изменения. Для проектов ФС, вводимых впервые на новые виды сырья, нормы качества устанавливают на сериях ЛРС, заготовленных из 5 и более мест естественного произрастания или от культивируемых растений.

10. Определяют содержание биополимеров: полисахаридов и белков как основных компонентов экстракционных лекарственных форм, которые в том числе являются фармакологически активными группами БАС (в зависимости от количественного содержания).

А. Для полисахаридов, содержащихся в сырье:

➤ после выделения фенольной фракции из шрота получают ВРПС и ПВ, определяют количественное содержание;

➤ устанавливают физико-химические константы полисахаридных фракций (среднюю молекулярную массу, поверхностную активность, изоэлектрическую точку, коэффициент распределения и для ПВ сорбционную способность);

➤ после гидролиза устанавливают качественный и количественный мономерный состав фракций методами ТСХ и ВЭЖХ.

Б. Для белков, содержащихся в сырье:

➤ после гидролиза выделенного белка определяют качественный и количественный состав аминокислот.

11. Определяют качественный и количественный состав других классов БАС, содержащихся в исследуемом образце, с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ, СФ, и КЭ.

А. При обнаружении в смеси новых соединений, ранее не описанных в литературе, их:

- выделяют и устанавливают структуру при использовании колоночной хроматографии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии;
- подвергают стандартизации и при необходимости рекомендуют в качестве фармакопейных образцов;
- подвергают исследованию фармакологической активности.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 9

1. Использование разработанного методологического подхода (представленного в виде алгоритма) позволяет избежать ошибки при разработке показателей подлинности производящего растения и его сырья. Кроме того, такой подход позволяет рационально и обоснованно подходить к выбору критериев для методов качественного и количественного анализа ЛРС, содержащего преимущественно фенольные соединения, а также прогнозировать виды фармакологической активности.

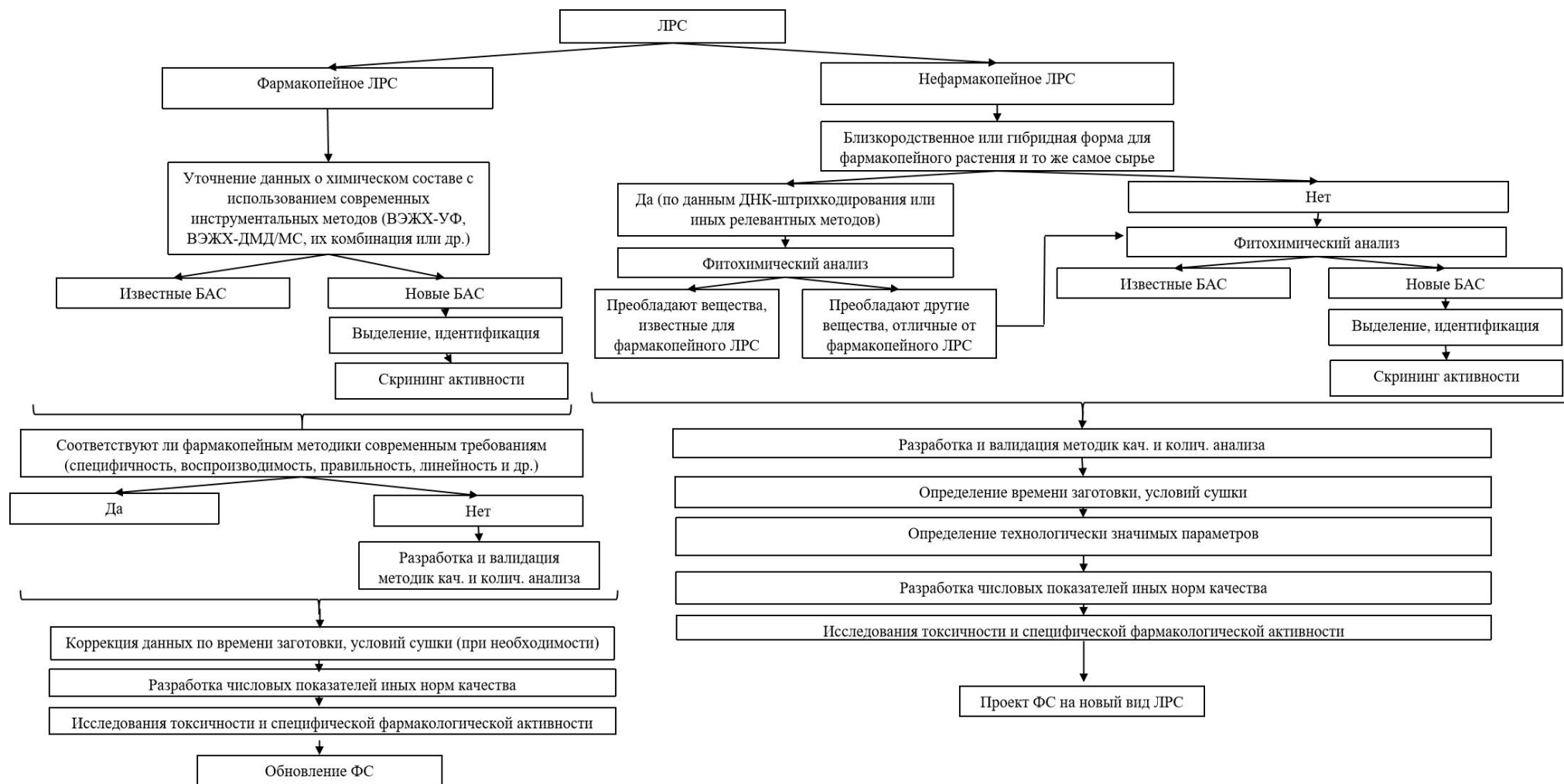


Рисунок 9.1 – Алгоритм выбора критериев определения подлинности и установления качества ЛРС, нормируемых преимущественно по содержанию фенольных соединений

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных экспериментальных данных разработан методологический подход к исследованию лекарственного растительного сырья, содержащего в качестве ведущей группы БАС фенольные соединения. Представленный алгоритм позволяет рационально и обоснованно подходить к выбору критериев определения подлинности ЛРС с использованием современных методов установления совокупности диагностических признаков.

На этапе детального фитохимического исследования использование сепарационных методов анализа (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД) в сочетании с передовыми методами позволит выделять химические вещества и устанавливать структуру новых соединений (методом масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии) и идентифицировать доминирующие или диагностически значимые соединения. Расшифрованный химический профиль позволит объективно подойти к выбору методов анализа на этапе определения основных групп биологических активных веществ (методом ТСХ), суммарного содержания фенолокислот, фенологликозидов, флавоноидов, фенилпропаноидов (методом СФ), а также доминирующих компонентов (методом ВЭЖХ или КЭ).

При фитохимическом исследовании установлена необходимость определения биополимеров (полисахаридов и белков), их монокомпонентов; физико-химических констант, а также элементного состава обязательных компонентов экстракционных лекарственных форм.

На этапе фармакологического скрининга рекомендуется учитывать количественный и качественный состав ведущей группы БАС, биополимеров, макро- и микроэлементов, что позволит рационально и обоснованно подходить к определению видов биологической активности планируемых лекарственных форм.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Критический анализ литературных данных показал, что сведения о химическом составе и фармакологической активности изучаемых объектов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. имеют фрагментарный и в ряде случаев противоречивый характер. В связи с этим была выявлена необходимость совершенствования НД на официальные виды сырья и разработки проектов ФС на растительные источники, не вошедшие в ГФ РФ. Кроме того, зафиксировано, что при совместном произрастании видов одного рода они образуют гибридные формы и, как следствие, это приводит к изменению химического профиля и фармакологической активности. Данный факт свидетельствует о необходимости использования современных методов анализа для объективного определения подлинности ЛРС.

2. В результате анатомо-морфологического изучения объектов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. с использованием современных методов анализа были установлены диагностические признаки их сырья, заключающиеся в комплексе диагностических признаков: для родов *Arctostaphylos* Adans., и *Vaccinium* L. *Prunella* L. по наличию и характеру люминисценции на листовой пластинке трихом, млечников, сети жилок, черешка и кутикулы, а также анатомо-диагностических признаков дополнительно черешка листа для всех исследуемых видов ЛРС, для клюквы болотной – побегов и плодов и для видов черноголовки – стеблей, цветков и семян. Также для внесения в проект ФС в раздел «Определение основных групп биологически активных веществ» были разработаны методики ТСХ, в основе которых лежит использование в качестве СО диагностических и доминирующих компонентов. Данные, полученные в результате использования молекулярно-генетических исследований, позволили провести штрихкодирование исследуемых образцов. Полученный комплекс результатов с помощью вышеперечисленных методов позволяет объективно определять подлинность исследуемых объектов.

3. Впервые предложена схема выделения фенольного комплекса из листьев и побегов *Vaccinium vitis-idaea* L., а также из травы *Prunella vulgaris* L., *Prunella grandiflora* L. и *Prunella laciniata* L. Для видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. установлен фенольный состав и его доминирующие компоненты:

➤ Для видов рода *Arctostaphylos* Adans. из 37 соединений в сумме фенологликозидов преобладающими были арбутин и гиперозид - в сумме флавоноидов; 1,4,6-три-О-галлоил глюкоза - в сумме галлотанинов. Флавоноиды рода *Arctostaphylos* Adans. представлены монозидами кверцетина. Фенольный профиль листьев толокнянки кавказской был изучен впервые. В результате сравнительного фитохимического анализа двух видов рода *Arctostaphylos* Adans. выявлена их общность по содержанию БАВ.

➤ В сырье видов рода *Vaccinium* L. доминировали хлорогеновая кислота в сумме фенолокислот (исключение составили брусники обыкновенной листья в сумме фенологликозидов компонент арбутин), гиперозид - в сумме флавоноидов (исключение *Vaccinium oxycoccus* L. в сумме флавоноидов основной компонент рутин и *Vaccinium uliginosum* L. – компонент изокверцитрин). Флавоноиды рода *Vaccinium* L. представлены монозидами, агликоном которых является кверцетин (исключение – *Vaccinium uliginosum* L., монозиды которой имеют агликон кверцетина и кемпферола). Из листьев *Vaccinium vitis-idaea* L. выделено и идентифицировано 27 соединений, для 3 из которых установлена структура, так как они являются новыми – 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (вакцинизид А), кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид В) и кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид. Из побегов *Vaccinium vitis-idaea* L. выделено и идентифицировано 17 соединений, для 3 из которых установлена структура, так как они являются новыми: катехин-О-гликозидами, - (-)-эпикатехин-3-О-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид D), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид Е) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид F).

➤ для видов рода *Prunella* L. из 18 выделенных и идентифицированных соединений основной является розмариновая кислота в сумме фенолокислот, в сумме флавоноидов - кверцетин-3-О-(6''-рамнозил)-глюкозид и кверцетин-3-О-(6''-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-глюкозид. Флавоноиды рода *Prunella* L. представлены биозидами кверцетина. Из травы *Prunella grandiflora* L. выделено новое соединение и установлена его структура - кверцетин-3-О-(4''-ксилозил-6''-рамнозил)-глюкозид.

Фенольные соединения из сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., заготовленного на территории Северного Кавказа, были исследованы впервые.

4. Впервые предложена схема выделения полисахаридного комплекса для некоторых образцов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Исследован полисахаридный комплекс (ВРПС, ПВ) некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. В сырье видов рода *Arctostaphylos* Adans. основным компонентом ВРПС и ПВ является арабиноза; для видов рода *Vaccinium* L. в ВРПС преобладает арабиноза (исключение – *Vaccinium arctostaphylos* L., в которой преобладает галактоза), в ПВ – галактуроновая кислота (исключение – *Vaccinium myrtillus* L., преобладает арабиноза); для видов рода *Prunella* L. в ВРПС преобладает галактоза, в ПВ – галактуроновая кислота. Для всех выделенных полисахаридов впервые установлены физико-химические показатели: средняя молекулярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения и для ПВ сорбционная способность. Полисахаридный комплекс сырья видов рода *Arctostaphylos*

Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., заготовленного на территории Северного Кавказа, был исследован впервые.

5. Определено содержание белка и его компонентного состава - аминокислот, а также наличие и количество минеральных веществ некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Во всех исследуемых образцах основными по содержанию аминокислотами являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты, среди элементов - кальций и калий. Содержание белка, аминокислот и элементов в сырье видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., заготовленного на территории Северного Кавказа, было исследовано впервые.

6. Впервые научно обосновано на примере некоторых образцов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. возможность использования метода капиллярного электрофореза для анализа сырья, содержащего хлорогеновую и розмариновую кислоту, а также флавоноида – гиперозида. Исходя из полученных фитохимических исследований, разработаны и валидированы методики количественного определения: суммы фенологликозидов методом спектрофотометрии (взамен титриметрического определения арбутина в ГФ СССР XI издания) для *Arctostaphylos uvae-ursi folia* и *Vaccinii vitis-idaeae folia*, а также методом капиллярного электрофореза основного компонента – арбутина; суммы фенолокислот методом спектроскопии для *Vaccinii folia*, *Vaccinii uliginosi folia* и *Prunellae herba*, а также методом капиллярного электрофореза основного компонента – хлорогеновой кислоты для рода *Vaccinium* L. (в том числе для *Vaccinii oxycocci cormus*) и розмариновой кислоты как доминирующего компонента для рода *Prunella* L.

7. В соответствии с требованиями ГФ 14 изд. для всех исследуемых образцов были установлены показатели качества, которые рекомендованы для внесения в ФС и проекты ФС в раздел «Испытания» такие, как влажность, зола общая, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание экстрактивных веществ, измельченность сырья и посторонние примеси. Также были определены режимы сушки и установлены сроки годности видов сырья.

8. Методики определения суммы флавоноидов были разработаны и валидированы для всех образцов. Они вошли в ФС ГФ РФ XIV издания (*Arctostaphylos uvae-ursi folia* ФС.2.5.0099.18; *Vaccinii vitis-idaeae folia* ФС.2.5.0063.18), а также впервые были разработаны и валидированы методики количественного определения для нефармакопейных видов сырья, которые вошли в проекты ФС впервые (*Vaccinii folia*, *Vaccinii uliginosi folia*, *Vaccinii oxycocci cormus* и *Prunellae herba*).

9. Экспериментально было доказано, что все сухие экстракты, полученные из сырья представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L., проявляли

низкотоксичные свойства (V класс токсичности). Экстракты, полученные путем экстракции спиртом этиловым 70% и 40%, обладали выраженной антиоксидантной активностью, оказывали нейропротекторное действие, а также способствовали повышению физической работоспособности животных в условиях истощающих физических нагрузок. Сухие экстракты, полученные путем экстракции водой, обладали мягким диуретическим действием, сопровождаемым относительной стабильностью электролитного состава сыворотки крови. Данный факт дает возможность предполагать калийсберегающий характер действия изучаемых водных извлечений. В результате фармакологических исследований полученных сухих экстрактов из сырья представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. предполагается поливалентный профиль активности анализируемых объектов, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

10. На основании результатов, полученных при выполнении комплексного исследования, предложен методологический подход (в виде алгоритма) к стандартизации ЛРС, содержащего в качестве основной группы БАС фенольные соединения. В основе методологии лежит научное обоснование критериев подлинности и качества ЛРС, а также сочетание современных методов исследования, используемых в фармацевтическом анализе, которые позволяют определить химический и спектральный профиль исследуемых видов сырья.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Предложен методологический подход, включающий в себя ряд методов и методик, позволяющих избежать ошибки при заготовке и установлении подлинности производящего растения и его сырья, а также рационально, и обосновано подходить к выбору критериев методов качественного и количественного анализа при разработке стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения. Методология, представленная в виде алгоритма, позволяет определять подлинность как близкородственных, так и гибридных форм растений с возможностью привлечения в качестве дополнительного метода ДНК-штрихкодирование. Результаты фитохимического исследования, определения основного состава и установления доминирующего компонента в смеси фенольных соединений позволяют совершенствовать существующие фармакопейные методики, а также разрабатывать новые методики для впервые введенных проектов ФС на новый вид сырья. При этом в одной пробоподготовке определять методом ТСХ фармакопейный показатель «Определение основных групп биологически активных веществ», «Количественное определение» по сумме веществ (УФ спектроскопия) и доминирующему компоненту с привлечением сепарационного метода анализа (ВЭЖХ и КЭ). Результаты научных исследований, направленных на изучение и определение химической структуры отдельных веществ, являются ключевыми основами для формирования методологии их получения. Это, в свою очередь, открывает эффективные перспективы для фармакологических исследований и расширения ассортимента отечественных стандартных образцов. Продемонстрирован поливалентный профиль активности ЛРС, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ. Учтено наличие в суммарном извлечении содержание других БАС – биополимеров и макро- и микроэлементов, что позволяет не только прогнозировать фармакологические виды активности, но и впоследствии рационально подходить к разработке лекарственной формы.

Один из перспективных аспектов представленного методологического подхода, описанного в данном диссертационном исследовании, заключается в установлении критериев и разработке алгоритмов выбора методов для определения подлинности, установления химического профиля и оценки качества ЛРС, а также для прогнозирования фармакологической активности полученных извлечений на основе расшифрованного химического профиля, используя модель, описанную в аналитических алгоритмах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Л. И. Динамика содержания розмариновой кислоты *Prunella vulgaris* L. и *Prunella grandiflora* L. / Л. И. Алексеева, Е. В. Болотник // Химия и технология растительных веществ: материалы VIII Всероссийской научной конференции. 7-10 октября 2013 г. – Сыктывкар-Калининград: Изд-во Балтийского федерального университета им. И. Канта, 2013. – С. 25.
2. Алексеева, Л. И. Розмариновая кислота и антиоксидантная активность *Prunella grandiflora* и *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) / Л. И. Алексеева, Е. В. Болотник // Растительный мир Азиатской России. – 2013. – № 1 (11). – С. 121-125.
3. Альберт, А. Константы ионизации кислот и оснований / А. Альберт, Е. Сергент; под общ.ред. Б.А. Порай-Кошица. – М.: Химия, 1964. – 180 с.
4. Афанасьева, Л. В. Накопление и распределение микроэлементов в растениях *Arctostaphylos uva-ursi* / Л. В. Афанасьева, Т. А. Аюшина // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 123-128.
5. Бабешина, Л. Г. Сорбционная активность и механизм сорбции сфагновых мхов / Л. Г. Бабешина, Н. В., Келус, А. А., Кузнецов // Фармация. – 2017. – Т. 66, № 2. – С. 33-38.
6. Бандюкова, В. А., Распространение флавоноидов в некоторых семействах высших растений: Ericaceae / В. А. Бандюкова, Э. Т. Оганесян // Растит. ресурсы. – 1973. – Т.9, Вып. №2. – С.297-303.
7. Баранов, И. И. К состоянию изученности пищевой и лекарственной ценности некоторых дикорастущих растений Карелии / И. И. Баранов // Комплексные исследования растительных болот Карелии. – 1982. – С. 156-166.
8. Белоусов, М. В. Свободные фенолкарбоновые кислоты видов сем. Ericaceae флоры Сибири и Дальнего Востока России / М. В. Белоусов [и др.] // Растительные ресурсы. – 1999. – Т. 35, № 3. – С. 74-81.
9. Беркаль, И. В. Особенности голубики обыкновенной (*Vaccinium uliginosum*) и ее практическая значимость в условиях Амурской области / И. В. Беркаль, А. Н. Васюкова // Евразийское Научное Объединение. – 2019. – № 11(3). – С. 157-159.
10. Бобкова, Н. В. Возможности микроскопического анализа в контроле качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов / Н. В. Бобкова // Ароматические и лекарственные растения: интродукция, селекция, агротехника, биологически активные вещества, влияние на человека: тезисы международной научно-практической конференции. – Симферополь: Никитский ботанический сад - Национальный научный центр РАН, 2021. – С.35.

11. Болотник, Е. В. Динамика содержания розмариновой кислоты в *Prunella vulgaris* и *Prunella grandiflora* (Lamiaceae) на Среднем и Южном Урале / Е. В. Болотник, Л. И. Алексеева // Растительные ресурсы. – 2021. – Т. 57, № 2. – С. 168-175.
12. Болотник, Е. В. Морфологическая изменчивость и содержание фенольных соединений *Prunella vulgaris* и *Prunella grandiflora* (Lamiaceae) на Среднем Урале/ Е. В. Болотник, Л. И. Алексеева, С. И. Неуймин // Растительные ресурсы. – 2013. – Вып. 2. – С. 153-163.
13. Болотник, Е. В. Разработка фитокомпозиции с ранозаживляющей активностью на основе экстрактов рода *Prunella* L. / Е. В. Болотник // Актуальные проблемы биологии и экологии: материалы докладов XXII Всероссийской молодежной научной конференции (Коми НЦ УрО РАН). – Сыктывкар, 2015. – С. 204-208.
14. Болотник, Е. В. Ранозаживляющая активность фитокомпозиций на основе экстракта *Prunella* L. при лечении термических ожогов / Е. В. Болотник, Л. И. Алексеева, Л. П. Ларионов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VI Всероссийской конференции с международным участием. 22-24 апреля 2014 г. – Барнаул: Изд-во Алт. Ун-та, 2014. – С. 184-186.
15. Болотник, Е. В. Ранозаживляющая активность экстракта *Prunella grandiflora* L. / Е. В. Болотник, Л. И. Алексеева, Л. П. Ларионов // Биомедицина. – 2021. – Т. 17. № 4. – С. 50-56.
16. Болотник, Е. В. Содержание веществ фенольной природы рода *Prunella* L. и рода *Silybum* L. в условиях интродукции на Среднем Урале / Е. В. Болотник, Е. А. Кошелева, А. А. Ермошин // Аграрный вестник Урала. – 2012 – № 7 – С. 22-24.
17. Болотник, Е. В. Эколого-ценотическая характеристика сообществ с участием видов рода *Prunella* L. / Е. В. Болотник // Современная биология: актуальные вопросы: материалы XIII Международной научно-практической конференции. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 23-25.
18. Бондаренко, О. М. Фенольные соединения черноголовки / О. М. Бондаренко, В. И. Литвиненко, П. П. Баланда // Современные проблемы фармацевтической науки и практики. – Киев, 1972. – С. 730-731.
19. Бубенчиков, Р. А. Полисахариды травы латука компасного (*Lactuca serriola* L.) флоры Центрального Черноземья / Р. А. Бубенчиков, Т. В., Кораблева, О. Ю. Скрипкина // Традиционная медицина. – 2020. – № 1 (60). – С. 57-62.
20. Бубенчикова, В. Н. Аминокислотный, жирнокислотный и полисахаридный состав травы тимьяна палласа (*Thymus pallasianus* L.) / В. Н. Бубенчикова В.Н., Ю. А. Старчак Ю.А. // Химия растительного сырья. – 2014. – № 3. – С. 191-194.

21. Бубенчикова, В. Н. Пектиновые вещества *Fragaria vesca* L. / В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова // VII Междунар. Съезд Фитофарм 2003 «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» (г. С.Петербург – Пушкин; 3-5 июля 2003 г.) – СПб.: ВВМ, 2003. – С. 24-27.
22. Бубенчикова, В. Н. Разработка методики количественного определения полисахаридов в траве горюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, И. В. Степнова, М. С. Шкабунова // Фармация. – 2018. – Т. 67, № 5. – С. 19-23.
23. Бубенчикова, В. Н. Совершенствование методов стандартизации лекарственного растительного сырья / В. Н. Бубенчикова [и др.] // Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета – Курск: КГМУ, 2016. – С. 438-444.
24. Бузина, Г. В. Титрометрический метод количественной и качественной характеристики пектиновых веществ / Г. В. Бузина, О. Ф. Иванова, Л. Б. Сосновский // Хлебопек. и кондитер. пром-сть. – 1965. – №4. – С.15-18.
25. Буренкова, Ю. П. Анализ антиоксидантной активности экстракта голубики обыкновенной листьев / Ю. П. Буренкова // Студенты и молодые учёные Белорусского государственного медицинского университета - медицинской науке и здравоохранению Республики Беларусь: сборник научных трудов студентов и молодых ученых. – Минск, 2016. – С.121-123.
26. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
27. Воронков, А. В. Влияние новых перспективных актопротекторов на развитие когнитивного дефицита у крыс на фоне истощающих физических нагрузок / А.В. Воронков [и др.] , М.П. Ефремова, А.Д. Геращенко, М.П. Воронкова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 2(66). – С. 107-111.
28. Воронков, А. В. Влияние природных соединений полифенольной структуры на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга крыс в условиях его фокальной ишемии / А. В. Воронков, И. Н. Дьякова, Д. И. Поздняков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79. – № 5. – С. 7-9.
29. Воронков, А. В. Сравнение антиоксидантной активности мексидола при повреждениях головного мозга различного генеза в эксперименте / А. В. Воронков [и др.], Д.И. Поздняков, Е.И. Хури, А.Е. Рыбалко // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – Т. 6. – С.12.

30. Государственная фармакопея Республики Беларусь" Том 2 (ГФ РБ II). Общие и частные фармакопейные статьи. - 1-е издание. – Минск, 2007 – 471 с.
31. Государственная фармакопея Российской Федерации: [Электронный ресурс]. – 14 изд. - Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 16.01.2023).
32. Государственная фармакопея СССР - XI изд.; Вып. 2 - М.: Медицина, 1990 -398 с.
33. Дикорастущие полезные растения России / Под. ред. А. Л. Буданцева, Е. Е. Лесиовской. – СПб.: Издательство СПХФА, 2001. – 663 с.
34. Дмитрук, С. И. Антипирическое действие сухого экстракта черноголовки // С. И. Дмитрук, Т. П. Прищеп // Решение актуальных задач фармации на современном этапе.: Тез. докл. науч. конф., посвящ. 50-летию НИИ фармации. – 1994. – С.240.
35. Дмитрук, С. И. Действие экстракта черноголовки на экспериментальный тонзиллит / С. И. Дмитрук, С. Е. Дмитрук // Природные ресурсы Сибири (Сибресурс -4-98): Тез. докл. 4-й Межд. науч. практ. конф. Томск. – 1998. – С. 210.
36. Дмитрук, С. И. Кумарины *Prunella vulgaris* / С. И. Дмитрук // Химия природ. соединений. – 1986. – № 4. – С. 510-511.
37. Дмитрук, С. И. Противовоспалительные свойства, антибактериальная и антифунгальная активности экстракта из надземной части *Prunella vulgaris* L. / С. И. Дмитрук // Растит. ресурсы. – 2001. – Вып. 4. – С. 92-96.
38. Дмитрук, С. И. Фармакогностическое исследование *Prunella vulgaris* L. / С.И. Дмитрук [и др.] // Растит. Ресурсы. – 1985. –Т. 21, вып. 4. – С. 463-469.
39. Дмитрук, С. И. Флавоноиды *Prunella vulgaris* / С. И. Дмитрук [и др.] // Химия природ. соединений. – 1987. – № 3. – С. 449-450.
40. Дурмишидзе, С. В. Флавоноиды и оксикоричные кислоты некоторых представителей флоры Грузии. / С. В. Дурмишидзе, А. Г. Шалашвили, В. В. Мжаванадзе, Г. Ч. Циклаури. – Тбилиси: Мецниереба, 1981 (вып. дан. 1982). – 1981. – 197 с.
41. Жаворонкова, М. Е. Поиск арбутинсодержащих видов семейства вересковые, перспективных для применения в урологии / М. Е. Жаворонкова [и др.] // Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты / Сб. мат-лов Всерос. научно - практ. конф., посвящ. 40 - летию фармац. фак-та. Самар. гос. мед. ун-та. - Самара, 2011. - С. 117 - 119.
42. Жохова, Е. В. Современное состояние и перспективы использования ДНК-штрихкодирования и ДНК-фингерпринтинга для анализа качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов / Е. В. Жохова [и др.] // Успехи современ. биологии. – 2019. – Т. 139, №1. – С. 25-40.

43. Закамская, Е. С. Характеристика ценопопуляций *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) / Е. С. Закамская, Е. А. Скончилова // Растит. ресурсы. – 2010. – Вып. 4. – С. 55-62.
44. Зяблицева, Н. С. Изучение полисахаридов клубней топинамбура и создание на их основе лечебно-профилактических средств: дис. ... канд. фармацевт. наук: (15.00.02) / Н.С. Зяблицева Надежда Сергеевна. – Пятигорск, 1998. – 158 с.
45. Козлов, Л. П., Отходы пилотной наработки урсоловой кислоты из ягодных шротов как источник БАВ /Л. П. Козлов, Т. П. Кукина // Химия растительного сырья. - 2006. – № 1. – С. 314-317.
46. Криштанова, Н. А. Изучение химического состава и фармакологической активности полисахаридов листьев липы сердцевидной / Н. А. Криштанова, Е.Д. Павлова, В.Ц. Болотова [и др.] // «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения»: материалы 7 Междунар. Съезда Фитофарм 2003 . (г.С.-Петербург-Пушкин, 3-5 июля 2003 г.) – СПб., 2003. – С.59-61.
47. Куркин, В. А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, содержащих фенольные соединения / В. А. Куркин // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума. – М.: PRESS-BOOK.RU, 2018. – С. 461-465.
48. Куркин, В. А. Актуальные аспекты стандартизации листьев толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // Роль метаболомики в Совершенствовании биотехнологических средств производства: материалы II Международной научной конференции «Роль метаболомики в Совершенствовании биотехнологических средств производства». – 2019. – С. 494-500.
49. Куркин, В. А. Антимикробная активность веществ листьев толокнянки обыкновенной / В. А. Куркин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 53-60.
50. Куркин, В. А. Влияние индивидуальных соединений листьев толокнянки обыкновенной на выделительную функцию почек крыс / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, Т.К. Рязанова, А.В. Дубищев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 1. – С. 11-15.
51. Куркин, В. А. Влияние экспериментальных извлечений плодов и побегов черники обыкновенной на выделительную функцию почек. / В. А. Куркин [и др.], Е.Н. Зайцева, Т.К. Рязанова, А.В. Дубищев // Химико-фармацевтический журнал. 2016. – Т. 50, № 4. – С. 27- 31.
52. Куркин, В. А. Идентификация и биологическая активность фенольных соединений листьев толокнянки обыкновенной [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.] / В. А. Куркин [и др.] // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сб. науч. статей по материалам X Международного симпозиума. – 2018. – С. 315-319.

53. Куркин, В. А. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной / В. А. Куркин [и др.], Т.К. Рязанова, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // Химия растительного сырья. – 2015. – № 1. – С. 95-100.
54. Куркин, В. А. Метабономика растений как методологическая основа стандартизации лекарственных растительных препаратов / В. А. Куркин // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов Международной научно-практической конференции. – М.: РУДН, 2018. – С. 107-109.
55. Куркин, В. А. Методологические аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья / В. А. Куркин // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: материалы XI Международной научно-практической конференции молодых ученых. – М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2023. – С. 253-255.
56. Куркин, В. А. Научные основы методологических подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов / В. А. Куркин, И. А. Самылина, Г. П. Яковлев // Человек и лекарство: сборник материалов XXIII Российского национального конгресса: тезисы докладов. – М.: ООО "Видокс", 2016. – С.243.
57. Куркин, В. А. Новые подходы к комплексному использованию плодов и побегов черники обыкновенной / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // Известия Самарского научного центра Российской Академии наук. – 2012. – Т. 14, № 5 (3). — С. 757-761.
58. Куркин, В. А. Определение антоцианов в плодах черники обыкновенной // В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // Фармация. – 2012. – № 2. – С. 10-12.
59. Куркин, В. А. Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной / В. А. Куркин [и др.], Т.К. Рязанова, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 4. – С. 34-37.
60. Куркин, В. А. Создание и стандартизация импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В. А. Куркин [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: материалы 7-й Международной научно-методической конференции "Фармобразование-2018". – Воронеж: ВГУ, 2018. – С. 487-490.
61. Куркин, В. А. Сравнительное исследование диуретической активности водно-спиртовых извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды / В. А. Куркин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, . – №. 3. – С. 348-352.
62. Куркин, В. А. Сравнительное хроматографическое исследование лекарственного растительного сырья толокнянки, брусники и черники / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // Вестник фармации. – 2014. – № 2 (64). – С. 32-36.

63. Куркин, В. А. Фундаментальные и прикладные аспекты исследований биологически активных соединений лекарственного растительного сырья / В. А. Куркин // Современные достижения фармацевтической науки и практики: материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет". – Витебск: ВГМУ, 2019. – С. 88-91.
64. Лютикова, М. Н. Химический состав и практическое применение ягод брусники и клюквы. / М. Н. Лютикова, Э. Х. Ботиров // Химия растительного сырья. – 2015. – № 2. – С. 5-27.
65. Макаревич, А. М. Антиоксидантная активность плодов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium uliginosum* L. / А. М. Макаревич, В. Н. Решетников // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 5. – С. 76-80.
66. Мжаванадзе, В. В. Антоцианы черники кавказской / В. В. Мжаванадзе // Биохимия растений. Тбилиси. – 1973. – С.251-254.
67. Мжаванадзе, В. В. Выделение цианидин- и пеонидин-3-арабинозидов из плодов черники кавказской / В. В. Мжаванадзе // Тез. 2-го Всесоюз. симпоз. по фенольным соединениям. - Алма-Ата, . –1970. – С.40.
68. Мжаванадзе, В. В. Гликозиды кемпферола листьев черники кавказской – *Vaccinium arctostaphylos* L. / В. В. Мжаванадзе // Сообщ. АН ГССР. - 1971. – Т. 62, № 2. – С. 445-447.
69. Мжаванадзе, В. В. Полифенолы из листьев *Vaccinium arctostaphylos* L. / В. В. Мжаванадзе, И. Л. Таргамадзе, Л. И. Драник // Химия природных соединений. – 1971. – № 4. – С. 546.
70. Мжаванадзе, В. В. Фенольные соединения листьев *Vaccinium arctostaphylos* L. / В. В. Мжаванадзе, И. Л. Таргамадзе, Л. И. Драник // Химия природных соединений. –1972. - № 1. – С. 124.
71. Мжаванадзе, В. В. Фенольные соединения черники кавказской – *Vaccinium arctostaphylos* L.: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / В.В. Мжаванадзе Виктория Васильевна. – Ереван, 1973. – 28 с.
72. Мжаванадзе, В. В. Флавоноловые гликозиды листьев черники кавказской – *Vaccinium arctostaphylos* L. / В. В. Мжаванадзе // Биохимия растений. Тбилиси. –1973. – С.247-250.
73. Мжаванадзе, В. В. Хлорогеновая кислота из листьев черники кавказской – *Vaccinium arctostaphylos* L. / В. В. Мжаванадзе // Сообщ. АН ГССР. –1971. – Т. 62, № 1. – С. 189-191.

74. Моисеев, Д. В. Определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной методом ВЭЖХ / Д. В. Моисеев // Вестник фармации. – 2011. – №1 (51). – С. 40-45.
75. Морозова, В. Е. Изучение гипогликемической и глюкозурической активности настоев черники пазушной, черники волосистой и голубики / В. Е. Морозова [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2005. – № 1. – С. 67-70.
76. Оленников, Д. Н. Полисахариды из *Arctostaphylos uva-ursi* / Д. Н. Оленников, А. Н. Назарова // Химия природных соединений. – 2009. – № 45(5). – С. 702-704.
77. Оленников, Д. Н. Структурно-функциональное исследование биополимеров растительного и грибного происхождения и совершенствование методов их анализа: автореф. дис. ... д-ра фармацевт. наук: 14.04.02 / Оленников Даниил Николаевич Д.Н.; – Улан-Удэ, 2012. – 40 с.
78. Оленников, Д. Н., 6"-галлоилпицеин и другие фенольные соединения из *Arctostaphylos uva-ursi* / Д. Н. Оленников, Г. В. Чехирова // Химия природных соединений. – 2013. – № 49(1). – Р. 1-7.
79. Охрименко, Л. П. Исследование фенольных соединений листьев голубики, брусники, толокнянки, черники и зимолюбки произрастающих в Республике Саха (Якутия) / Л. П. Охрименко [и др.] , Г.П. Калинина, Е. Лукша // Химия растительного сырья. - 2009. – № 3. – С. 109-115.
80. Пат. 2794752, Российская Федерация, МПК: А61К 36/536, А61К 127/00, А61К 133/00, А61К 135/00. Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью / А.А. Шамилов, В.Н. Бубенчикова, Д.И. Поздняков, Е.Р. Гарсия; патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. - №2022110045; заявл. 14.04.22 ; опубл. 24.04.23, Бюл. № 12. – 6 с.
81. Плугатарь, Ю. В. Содержание фенольных соединений в надземной массе *Prunella vulgaris* L. по градиенту высоты над уровнем моря. / Ю. В. Плугатарь [и др.] // Бюллетень ГНБС. - 2017. – Вып. 125. – С. 42-45.
82. Повыдыш, М. Н. Молекулярно-генетические методы в фармакогнозии / М. Н. Повыдыш, М.Ю. Гончаров, Г.П. Яковлев, А.В. Родионов [и др.] // Фармация. –2007. - № 5. – С. 61-71.
83. Попа, Д. П. Высшие терпеноиды растений сем. губоцветных / Д. П. Попа. – Кишинев, 1976. – 148 с.
84. Попов, А. И. Химические элементы минеральных веществ листьев голубики (*Vaccinium uliginosum* L.) из семейства Вересковые (Ericaceae Juss.) / А. И. Попов, Ю. Н.

Дементьев // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – №. 10 (120). – С. 69-73.

85. Попова, Н.В. Лекарственные растения мировой флоры / Н. В. Попова, В. И. Литвиненко. – Харьков: СПДФЛ, 2008. – 510 с.

86. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность; Т. 2. Семейство Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae - Haloragaceae / отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – Т. 2. - С. 50-56. - 513 с.

87. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность; Семейство Carpfoliaceae – Lobeliaceae. / отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК– СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – Т. 4. – 630 с.

88. Рознятовская, А. А. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в брусники листьях и толокнянки листьях методом капиллярного электрофореза / А. А. Рознятовская, С. П. Сенченко, А. А. Харахашян // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. - URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=16982> (дата обращения: 26.01.2024).

89. Рязанова, Т. К. Обзор подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего биологически активные вещества фенольной и терпеноидной природы / Т. К. Рязанова, В. А. Куркин // Медицинский вестник Башкортостана. – 2022. – Т. 17, № 6 (102). – С.90-95.

90. Рязанова, Т. К. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование надземных органов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной / Т. К. Рязанова [и др.], В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Известия Самарского научного центра Российской Академии наук. – 2015. – Т. 17, № 5 (3). – С. 964-971.

91. Сенченко, С. П. Прогноз электрофоретического поведения фенольных соединений в условиях капиллярного зонного электрофореза / С. П. Сенченко // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 7. – С. 3-9.

92. Смирнова, Н. И. Галактоманнаны некоторых видов сем. Fabaceae / Н. И. Смирнова, И. Е. Лобанова, О. В. Анулов // Раст. ресурсы. – 1998. – Т.34, вып. 4. – С.68-71.

93. Степаненко, Б. Н. Химия и биохимия углеводов. Моносахариды / Б. Н. Степаненко. – М.: Высш. шк., 1977. – 222 с.

94. Степаненко, Б. Н. Химия и биохимия углеводов. Полисахариды / Б. Н. Степаненко. – М.: Высш. шк., 1978. – 256 с.

95. Стремоухов, А. А. Сравнительное исследование карбоновых кислот надземной части голубики обыкновенной / А. А. Стремоухов [и др.], О.Н. Кошевой, Н.В. Бородина, Е.В. Криворучко // Украинский биофармацевтический журнал. – 2018. – № 1 (54). – С. 46-50.
96. Таланов, А. А. Анализ накопления дубильных веществ в листьях и плодах голубики из различных мест произрастания / А. А. Таланов // Актуальные вопросы медицинской науки: сб. науч. работ студентов и мол. ученых Всерос. научно-практ. конф. С междун. участием, посвящ. 65-летию студен, науч. об-ва Ярослав, гос. мед. академии. – Ярославль, 2011. – С. 283-284.
97. Таланов, А. А. Анализ свободных и связанных углеводов в подземных и надземных органах голубики / А. А. Таланов, Н. С. Фурса // Рос. медико - биолог, вестник имени академика И. П. Павлова. – 2010. – Вып. № 2. – С 130-134.
98. Таланов, А. А. Атомно-абсорбционный спектральный анализ техногенных элементов листьев и плодов голубики / А. А. Таланов // Сборник научных работ студентов и молодых ученых ЯГМА. – Ярославль: ЯГТУ, 2008. – С. 155-156.
99. Таланов, А. А. Выявление микродиагностических признаков листьев голубики обыкновенной и голубики узколистной / А. А. Таланов // Вестник Перм. гос. фармацев. академии (научно-практич. журнал). – Пермь: ПГФА. – 2012. – № 9. – С. 213-221.
100. Таланов, А. А. Изучение некоторых веществ первичного обмена голубики / А. А. Таланов // Актуальные вопросы медицинской науки1: Сб. науч. работ студентов и молодых ученых Всерос. научно-практ. конф. с междун. участием, посвящ. 1000-летию г. Ярославля. – Ярославль: ЯГТУ, 2010. – С. 374-375.
101. Таланов, А. А. Изучение элементного состава листьев голубики / А. А. Таланов, Д. С. Круглов, Н. С. Фурса // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. научн. тр. - Вып. 63. - Пятигорск: ЗАО «Невинномыская город., типография», 2008. – С. 96-98.
102. Таланов, А. А. Определение аминокислотного состава различных органов голубики / А. А. Таланов, Е. А. Тяпова, Н. С. Фурса // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Вып. 65. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2010. – С. 128-129.
103. Таланов, А. А. Сравнительная характеристика аминокислотного состава подземных и надземных органов голубики / А. А. Таланов, Н. С. Фурса, Н. А. Кузьмичева // Вестник Фармации (Беларусь). – 2010. – №1. – С. 9-17.
104. Таланов, А. А. Виды рода вакциниум: химия, фармакология, клиника / А. А. Таланов [и др.] // Инновационные процессы в лекарствоведении: сб. мат-лов Всерос. научно-

практ. конф. с междун. участием, посвящ. 30-летию фармац. факультета ЯГМА (18-19 декабря 2012 года) / Под ред. Н.С. Фурсы. - Ярославль: Аверс-Плюс, 2012. – С. 315-326.

105. Таланов, А. А. Голубика - *Vaccinium uliginosum* L. Перманганатометрическое определение дубильных веществ в плодах / А. А. Таланов [и др.] // Бъдещите изследвания – 2013: Матернали за IX международна научна практична конференция (17-25 февруари 2013 г.). - Т.23. – София: «Бял ГРАД-БГ» ООД, 2013.–С. 10-12.

106. Таланов, А. А. Голубика - *Vaccinium uliginosum* L. Хроматоспектрофотометрическое определение арбутина в плодах / А. А. Таланов, П. Ю. Шкроботько, Н. С. Фурса // Wykształcenie i nauka bez granic – 2012: Materiały VII międzynarodowej naukowipraktycznej konferencji (07 - 15 gmdnia 2012 г.). - Vol. 31. – Premysl: Nauka i studia, 2012. – С. 27-28.

107. Таланов, А. А. Голубика и черника - потенциальные источники противодиабетических средств / А. А. Таланов [и др.] // Вестник Перм. гос. фармац. академии (научно-практ. журнал). – Пермь: ПГФА. – 2010. - №7. – С. 196-198.

108. Таланов, А. А. Изучение аминокислотного состава листьев и плодов голубики / А.А. Таланов, Р.Я. Лайпанова, Е.А. Менькова // Изыскание и создание природных лекарственных средств: Межвуз. сб. научн. тр. с междуп. участием, поев. 25-летию кафедры фармакогнозни и ботаники / Под ред. Н.С. Фурсы. - Ярославль: ЯГТУ 2009. – С 269-271.

109. Таланов, А. А. Изучение аминокислотного состава подземных и надземных органов голубики / А. А. Таланов // Актуальные вопросы медицинской науки, посвящ. 65-летию ЯГМА: сб. науч. работ студентов и мол. ученых Всерос. конф. с междун. участием. – Ярославль: ЯГТУ, 2009. – С. 284-285.

110. Таланов, А. А. Изучение влияния настойки голубики на поведенческие реакции крыс / А. А. Таланов, Н. В. Пунегова // Актуальные вопросы медицинской науки: Сб. научн. работ студентов и мол. ученых Всерос. научно-практ. конф. с междун. участием, посвящ. 70-летию профессора А. А. Чумакова. – Ярославль; ЯГМА, 2012. – С. 56-57.

111. Таланов, А. А. Изучение элементного состава и фенольных соединений голубики / А. А. Таланов [и др.] // Современные вопросы теории и практики лекарствоведения: Сб. мат-лов научно-нракт. конф. с междунар. участием, посвящ. 25-летию фармац. факультета ЯГМА / Под ред. Н.С. Фурсы. – Ярославль: Найс, 2007. – С. 318-321.

112. Таланов, А. А. Определение содержания флавонондов в листьях голубики обыкновенной из различных мест произрастания европейской части России / А. А., Талпаиов // Вестник Перм. гос. фармац. академии (научно-практический журнал). – Пермь: ПГФА. – 2012. – № 9. – С. 215-217.

113. Таланов, А. А. Спектрофотометрические варианты количественного определения антоцианов в плодах голубики / А. А. Таланов [и др.] // Мат-лы Рос. научно - практ. конф. с междуна. участием (28 сентября - 3 октября 2009 г.). – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА Росздрава, 2009. – С. 171-173.
114. Таланов, А. А. Спектрофотометрическое определение гидроксикоричных кислот в плодах и листьях голубики обыкновенной из различных мест произрастания / А. А. Таланов, В. Г. Корниевская, Н. С. Фурса // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Вып. 67. - Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2012. – С. 122-123.
115. Таланов, А. А. Углеводы листьев п плодов голубики / А. А. Таланов, Н. С. Фурса // Фармация. – 2009. – № 3. – С. 27-28.
116. Таланов, А. А. Фармакогностическое изучение голубики обыкновенной (*Vaccinium uliginosum* L.): автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук : 14.04.02. / А.А. Таланов Андрей Александрович. – Пермь, 2013. – 24 с.
117. Таланов, А. А. Хроматоспектрометрическое определение арбутина в плодах голубики из разных мест произрастания / А. А. Таланов [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. – Вып. 66. -Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2011. – С. 196-197.
118. Талашова, С. В. Масс-спектрометрический анализ элементного состава лекарственного растительного сырья различных морфологических групп / С. В. Талашова [и др.] // Изыскание и создание природных лекарственных средств: Межвуз. сб. науч. тр. с междуна. участием, посвящ. 25-летию кафедры фармакогнозии и ботаники /Под ред. Н.С. Фурсы.– Ярославль: ЯГТУ, 2009. – С. 271 -274.
119. Талашова, С. В. Изучение аминокислотного состава различных морфологических групп растительного сырья / С. В. Талашова [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. – Вып. 64. – Пятигорск: ПГФА, 2009 г. – С. 112-113.
120. Тарабанко, В. Е. Радиопротекторное действие черемши (*Allium ursinum* L.) и голубики обыкновенной (*Vaccinium uliginosum* L.) / В. Е. Тарабанко [и др.] // Химия растительного сырья. – 2015. – № 2. – С. 253-256.
121. Требования к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций (в ред. решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 30.06.2020 N 86) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.alt.ru/tamdoc/18kr0069/> (дата обращения: 26.01.2024).

122. Тринеева, О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ / О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10, № 2. – С. 69-79.
123. Туниев, Б. С. Ландшафтно-ценотическая характеристика мест произрастания толокнянки кавказской – *Arctostaphylos caucasica* LIPSCHITZ на Большом Кавказе / Б. С. Туниев, Х. У. Алиев, И. Н. Тимухин // Ботанический вестник Северного Кавказа. Махачкала. – 2015. - № 1. – С. 81-92.
124. Тяпова, Е. А. Антоцианы черники и голубики - основа средств для профилактики и лечения болезней глаз / Е. А. Тяпова [и др.] // Вестник Перм. гос. фармацев. академии (научно-практ. журнал). – Пермь: ПГФА. – 2010. – №7. – С. 203-204.
125. Тяпова, Е. А. Сравнительное изучение аминокислотного состава плодов черники и голубики / Е. А. Тяпова, А. А. Таланов / Вестник урал. мед. акад. науки: тематический выпуск по фармации. – 2011. -№ 3/1 (37). – С. 74-75.
126. Федорова, Ю. В., Морфолого-анатомическое изучение листьев голубики обыкновенной / Ю. В. Федорова, А. С. Горькова, А. А. Таланов // Актуальные вопросы медицинской науки: Сб. научн. работ студентов и мол. ученых Всерос. научно-практ. конф. с междун. участием, посвящ. 70-летию профессора А. А. Чумакова. – Ярославль: ЯГМА, 2012. – С.337-338.
127. Филиппов, М. П. Колориметрическое определение уронидной части в пектиновых веществах / М. П. Филиппов // Изв. АН МССР: Сер. биол. и хим. наук. – 1973. – № 3. – С. 76-79.
128. Флора СССР: в 30 т. Т. 18. Сем. СХХIII. Вересковые – Ericaceae DC. / под ред. В. Л. Комарова. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – С. 22. - 802 с.
129. Флора СССР: в 30 т. Т. 20. Род 1261. Черноголовка – *Prunella* L. / под ред. В. Л. Комарова. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. – С. 494-498. – 555 с.
130. Фокина, Г. А. Тритерпеноиды и стероиды некоторых видов порядка *Ericales* / Г. А. Фокина, Н. Е. Зайцева, Н. Е. Фокина // Химия природных соединений. – 1988. – № 4. – С. 602-603.
131. Фурса, Н. С. Анализ аминокислотного состава отдельных видов семейств бурачниковых, валериановых, вересковых, гвоздичных, грушанковых и яснотковых / Н.С. Фурса [и др.] // Фармация. – 2010. – № 4. – С. 22-24.
132. Фурса, Н. С. Неофициальные виды семейства вересковых как перспективные акваретики и уроантисептики / Н. С. Фурса [и др.] // Вестник фармации. – 2016. – №. 3. – С. 59-66.
133. Халецкий, А. М. Исследования листьев черники *Vaccinium myrtillus* / А. М. Халецкий, Е. К. Киселев // Аптечное дело. – 1952. – Т.3, № 1. – С. 42-52.

134. Химия и биохимия бобовых растений / под ред. Н. М. Запрометова. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 21-22.
135. Цуркан, А. А. Исследование минерального состава колосьев черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) // А. А. Цуркан, Е. И. Голембиовская // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник науч. трудов – 2012. – Вып. 67. – С. 136-137.
136. Цуркан, А. А. Исследование флавоноидов черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) // А. А. Цуркан, Е. И. Голембиовская // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник науч. трудов – 2011. – Вып. 66. – С. 213-214.
137. Червонная, Н. М. Определение некоторых физико-химических свойств пектиновых веществ из шрота соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / Н. М. Червонная [и др.] // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 267-282.
138. Черепанов, С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С. К. Черепанов. – СПб.: Мир и семья, 1995. – С. 427.
139. Черкасов, А. Ф. Клюква. // А. Ф. Черкасов, В. Ф. Буткус, А. Б. Горбунов. – М.: Лесная промышленность, 1981. – 214 с.
140. Чушенко, В. Н. Исследование в области полисахаридных препаратов: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: (15.00.02) / В.Н. Чушенко Валентина Николаевна; Харьков. ХНИХФИ. – Харьков, 1980. – 24 с.
141. Шабуня, П. С. Определение состава ацильных производных антоцианов голубики методом хроматомасс-спектрометрии / П. С. Шабуня [и др.]// Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2012. – С. 210-213.
142. Шабуня, П. С. Состав антоцианового комплекса *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium uliginosum* L. / П. С. Шабуня [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 128-135.
143. Шамилов, А. А. Аминокислотный и минеральный состав травы черноголовки крупноцветковой (*Prunella grandiflora* L.), произрастающей на Северном Кавказе / А. А. Шамилов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 574-574.
144. Шамилов, А. А. Анализ аминокислотного и элементного состава травы черноголовки разрезной (*Prunella laciniata* L.), произрастающей на Северном Кавказе / А. А. Шамилов, В. Н. Бубенчикова, Е. Р. Гарсия // Вестн. ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 2. – С. 114-119.

145. Шамилов, А. А. Анализ полисахаридного, аминокислотного и элементного состава травы чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.), произрастающей на Северном Кавказе / А. А. Шамилов // Вестн. ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 3. – С. 271-277.
146. Шамилов, А. А. Антиоксидантная активность извлечений из травы некоторых представителей рода чернойголовка (*Prunella* L.): *in vitro* и *in vivo* исследование / А. А. Шамилов [и др.] // Традиционная медицина. – 2020. – № 2 (61). – С. 40-46.
147. Шамилов, А. А. Внешние и микроскопические признаки травы чернойголовки обыкновенной / А. А. Шамилов [и др.] // Фармация. – 2023. – Т. 72, № 4. – С. 30-36.
148. Шамилов, А. А. Диуретическая активность представителей рода *Prunella* (Lamiaceae) / А. А. Шамилов [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 201-207.
149. Шамилов, А. А. Изучение антиоксидантной активности сырья видов рода чернойголовка (*Prunella*) / А. А. Шамилов [и др.], М.И. Кодониди, В.А. Челомбитько, О.С. Евсеева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – 2012. – С. 140-143.
150. Шамилов, А. А. Некоторые аспекты церебропротективного действия извлечений из травы представителей рода чернойголовка / А. А. Шамилов [и др.] // Фармация. – 2020. – Т. 69, № 5. – С. 51-56.
151. Шамилов, А. А. Поиск источников розмариновой кислоты во флоре Северного Кавказа / А. А. Шамилов, Н. В. Попова, М. Н. Ивашев // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14138>.
152. Шамилов, А. А. Полисахаридный состав травы чернойголовки разрезной (*Prunella laciniata* L.), произрастающей на Северном Кавказе / Шамилов А. А. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. № 2-2.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22809>.
153. Шамилов, А. А. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в брусники обыкновенной листьях / А. А. Шамилов [и др.] // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2021. – № 1 (31). – С. 4-15.
154. Шамилов, А. А. Разработка и валидация методики количественного определения фенольных соединений и хлорогеновой кислоты в голубики болотной листьях / А. А. Шамилов [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 14-23.
155. Шамилов, А. А. Разработка методики определения подлинности голубики болотной листьев методом тонкослойной хроматографии / А. А. Шамилов [и др.] // Вопросы биол. хим. и фармац. химии. – 2022. – № 11. – С. 10-15.

156. Шамилов, А. А. Растения рода *Prunella*: химический состав, виды фармакологического действия / А. А. Шамилов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. –2017. –№ 4. –С. 152-160.
157. Шамилов, А. А. Сравнительная характеристика физико-химических свойств полисахаридов, выделенных из видов рода черноголовка / А. А. Шамилов [и др.], В.Н. Бубенчикова, Н.Н. Степанова, Е.Р. Гарсия // Химия растительного сырья. – 2023. – №4. – С. 89-98.
158. Шнякина, Г. П. Компоненты листьев *Arctostaphylos uva-ursi* и *Vaccinium vitis-idaea* / Г. П. Шнякина, Н. Б. Цыганова // Химия природных соединений. – 1981. – №5. – С.675-676.
159. Шретер, А. И. Лекарственные растения советского Дальнего Востока // А. И. Шретер. – М. 1975. – 328 с.
160. Aboonabi, A. Anthocyanins in berries exhibited anti-atherogenicity and antiplatelet activities in a metabolic syndrome population / A. Aboonabi [et al.] , R.R. Meyer, A. Gaiz, I. Singh // Nutrition Research. – 2020. – № 76. – P. 82-93.
161. Afshar, K. Reducing antibiotic use for uncomplicated urinary tract infection in general practice by treatment with uva-ursi (REGATTA)–a double-blind, randomized, controlled comparative effectiveness trial / K. Afshar [et al.] // BMC Complement. Altern. Med. – 2018. - № 18(1). – P. 1-8.
162. Ahn, S. C. Inhibitory effects of rosmarinic acid on Lck SH2 domain binding to a synthetic phosphopeptide / S. C. Ahn [et al.] // Planta Med. - 2003. – Vol. 69, № 7 – P. 642-646.
163. Akagić, A. Geographic variability of sugars and organic acids in selected wild fruit species / A. Akagić [et al.] // Foods. – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 462-475.
164. Alam, P. HPTLC densitometric analysis of arbutin in bulk drug and methanolic extracts of *Arctostaphylos uva-ursi* / P. Alam [et al.] , S.I. Alqasoumi, F. Shakeel, M.S. Abdel-Kader // Natural Product Research. – 2010. - № 25(17). – P. 1671-1675.
165. Alhosin, M. Bilberry extract (Antho 50) selectively induces redox-sensitive caspase 3-related apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the Bcl-2/Bad pathway / M. Alhosin [et al.] // Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-10.
166. Amarowicz, R. Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines by phenolic compounds from a bearberry-leaf crude extract and its fractions / R. Amarowicz, R. B. Pegg // J. Funct. Foods. – 2013. - № 5. – P. 660–667.
167. Angiosperm phylogeny website, version 14 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html> (дата обращения: 03.03.2024).
168. Annuk, H. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts / H. Annuk [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1999. - № 172(1). – P. 41-45. -

169. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf (дата обращения: 26.01.2024)
170. Au, T. K. A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs / T. K. Au [et al.] // Life Sci. – 2001. – Vol. 68, № 14 – P. 1687-1694.
171. Ayaz, F. A. Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS / F. A. Ayaz [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53. – №. 21. – P. 8116-8122.
172. Bae, J. Y. Bog blueberry anthocyanins alleviate photoaging in ultraviolet-B irradiation-induced human dermal fibroblasts / J. Y. Bae [et al.] // Molecular nutrition & food research. – 2009. – Vol. 53, № 6. – P. 726-738.
173. Baek, M. W. Protective and therapeutic effects of an extract mixture of alder tree, labiate herb, milk thistle green bean-rice bran fermentation, and turnip against ethanol-induced toxicity in the rat / M. W. Baek [et al.] // J. Vet. Sci. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 31-37.
174. Bao, L. Bilberry extract protect restraint stress-induced liver damage through attenuating mitochondrial dysfunction / L. Bao [et al.] // Fitoterapia. – 2010. – Vol. 81. – № 8. – P. 1094-1101.
175. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 21.01.2023).
176. Bayrami, A. A facile ultrasonic-aided biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Vaccinium arctostaphylos* L. leaf extract and its antidiabetic, antibacterial, and oxidative activity evaluation / A. Bayrami [et al.] // Ultrasonics sonochemistry. – 2019. – Vol. 55. – P. 57-66.
177. Beaux, D. Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. in rats. / D. Beaux, J. Fleurentin, F. Mortier // Phytotherapy Research. – 1999. - № 13(3). – P. 222-225.
178. Bljajić, K. Chemical composition, antioxidant and α -glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of *Vaccinium myrtillus* leaves / K. Bljajić [et al.] // Molecules. – 2017. – Vol. 22. – №. 5. – P. 703-716.
179. Blumberg, J. B. Cranberries and its Bioactive Constituents in Human Health / J. B. Blumberg [et al.] // American Society for Nutrition. Adv. Nutr. – 2013.- № 4. – P. 618– 632.
180. Bodet, C. Anti-inflammatory activity of a highmolecular- weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens / C. Bodet, F. Chandad, D. Grenier // J Dent. Res. – 2006. - № 85. – P. 235–239.

181. Bodet, C. Inhibition of host extracellular matrix destructive enzyme production and activity by a high-molecular-weight cranberry fraction / C Bodet, F. Chandad, D. Grenier // J Periodontal Res. – 2007. - № 42(2). – P. 159-168.
182. British Pharmacopoeia: [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.pharmacopoeia.com/> (дата обращения: 16.01.2023).
183. Brown, E. M. Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health / E. M. Brown [et al.] // Biofactors. – 2014. - № 40(6). – P. 611-623.
184. Caligiani, A. A simple GC–MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients / A. Caligiani [et al.] // Food chemistry. – 2013. – Vol. 136. – № 2. – P. 735-741.
185. Cebin, A. V. Development and Validation of HPLC-DAD Method with Pre-Column PMP Derivatization for Monomeric Profile Analysis of Polysaccharides from AgroIndustrial Wastes / A. V. Cebin, D. Komes, M.-C. Ralet // Polymers. – 2022. - Vol. 14, № 3. – 14 p.
186. Chandler, D. Effects of plant-derived polyphenols on TNF- α and nitric oxide production induced by advanced glycation endproducts / D. Chandler Chandler [et al.] // Mol. Nutr. Food Res. – 2010. - № 54(2). – P. 141-150.
187. Chauhan, B. *In vitro* activity of uva-ursi against cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein / B. Chauhan [et al.] // Canadian journal of physiology and pharmacology. – 2007. - № 85(11). – P. 1099-1107.
188. Chen, G. Melatonin in Chinese medicinal herb / G. Chen [et al.] // Life Sci. – 2003. – Vol. 73, № 1. – P. 19-26.
189. Chiu, L. C. A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells. / L. C. Chiu, W. Zhu, V. E. Ooi // J. Ethnopharmacol. - 2004. – Vol. 93, № 1. – P. 63-68.
190. Chkhikvishvili, I. D. Chicoric and chlorogenic acids in plant species from Georgia / I. D. Chkhikvishvili, G. I. Kharebava // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2001. – Vol. 37. – №. 2. – P. 188-191.
191. Choi, J. I. Polyphenol-enriched fraction of *Vaccinium uliginosum* L. protects selenite-induced cataract formation in the lens of Sprague-Dawley rat pups / J. I. Choi, J. Kim, S. Y. Choung // Molecular vision. – 2019. – Vol. 25. – P. 118-128.
192. Cioch, M. Characterisation Antimicrobial Properties Extracts Selected Medicinal Plants / M. Cioch [et al.] // Pol J Microbiol. – 2017. - № 66(4). – P. 463-472.

193. Collins, N. H. Characterization of antiestrogenic activity of the Chinese herb, *Prunella vulgaris*, using *in vitro* and *in vivo* (Mouse Xenograft) models / N. H. Collins [et al.] // Biol Reprod. - 2009. – Vol. 80, № 2. – P. 375-383.
194. Côté, J. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties / // J. Côté [et al.] // Crit Rev Food Sci Nutr. – 2010. - № 50(7). – P. 666-679.
195. Cybulska, P. Extracts of Canadian first nations medicinal plants, used as natural products, inhibit *Neisseria gonorrhoeae* isolates with different antibiotic resistance profiles / P. Cybulska [et al.] // Sexually transmitted diseases. – 2011. - № 38(7). – P. 667-671.
196. Davarmanesh, M. Protective effect of bilberry extract as a pretreatment on induced oral mucositis in hamsters / M. Davarmanesh [et al.] // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology. – 2013. – Vol. 116. – № 6. – P. 702-708.
197. Domitrović, R. Effects of standardized bilberry fruit extract (Mirtoselect®) on resolution of CCl₄-induced liver fibrosis in mice / R. Domitrović, H. Jakovac // Food and chemical toxicology. – 2011. – Vol. 49. – № 4. – P. 848-854.
198. Drózd, P. Evaluation of Bioactive Compounds, Minerals and Antioxidant Activity of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Fruits / P. Drózd [et al.], V. Šežienė, J. Wójcik, K. Pyrżyńska // Molecules. – 2018. - № 23(1). – P. 53-61.
199. Drózd, P. Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries / P. Drózd, V. Šežienė, K. Pyrżyńska // Plant Foods for Human Nutrition. – 2017. - № 72(4). – P. 360–364.
200. Du, Q. Hydroquinone analog 4-[(Tetrahydro-2H-pyran-2 yl) oxy] phenol induces C26 colon cancer cell apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo* / Q. Du [et al.] , G. Xin, H. Niu, W. Huang // Molecular Medicine Reports. – 2015. - № 11(6). -P. 4671-4677.
201. Duarte, S. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms / S. Duarte [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2006. - № 257(1). – P. 50-56.
202. Dudonné, S. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. / S. Dudonné [et al.] , X. Vitrac, P. Coutière, M. Woillez, J.M. Mérillon // J. Agric. Food Chem. – 2009. - № 57(5). – P. 1768–1774.
203. Ehala, S. Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity / S. Ehala, M. Vaher, M. Kaljurand // J. Agric. Food Chem. – 2005. - № 53(16). – P. 6484-6490.

204. Eid, H. M. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Exhibits Antidiabetic Activities in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity / H. M. Eid [et al.] // Evid Based Complement Alternat Med. – 2014. – 11 p. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/645812/>.
205. Eid, H. M. Stimulation of AMP activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea* / H. M. Eid [et al.] // Mol. Nutr. Food Res. – 2010. - № 54(7). – P. 991-1003.
206. Ek, S. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) / S. Ek [et al.] , H. Kartimo, S. Mattila, A. Tolonen // J. Agric. Food Chem. – 2006. - № 54(26). – P. 9834-9842.
207. Elberry, A. A. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats / A. A. Elberry [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2010. – Vol. 48. – P. 1178–1184.
208. European Pharmacopoeia onlineю 10th ed. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pheur.edqm.eu/home> (дата обращения: 15.01.2023).
209. Fan, Z.-L. Protective effect of anthocyanins from lingonberry on radiation-induced damages / Z.-L. Fan [et al.] , Z.-Y. Wang, L.-L. Zuo, S.-Q. Tian // Int J Environ Res Public Health. – 2012. - № 9(12). – P. 4732–4743.
210. Fang, X. Immune modulatory effects of *Prunella vulgaris* L / X. Fang [et al.] // Int J Mol Med. - 2005. – Vol. 15, № 3. - P.491-496.
211. Faria, A. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts / A. Faria [et al.] / Journal of Agricultural and Food chemistry. – 2005. – Vol. 53. – № 17. – P. 6896-6902.
212. Feng, L. Oleanolic acid from *Prunella vulgaris* L. induces SPC-A-1 cell line apoptosis via regulation of Bax, Bad and Bcl-2 expression. / L. Feng [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. – 2011. – Vol. 12, № 2. – P.403-408.
213. Feshani, A. M. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats / A. M. Feshani, S. M. Kouhsari, S. Mohammadi // Journal of ethnopharmacology. – 2011. – Vol. 133. – №. 1. – P. 67-74.
214. Friedrich, H. Hydroxyflavans from leaves and fruits of *Vaccinium myrtillus* / H. Friedrich, I. Schonert // Arch. Pharm. - 1973. - № 306(8). – P. 611-618.
215. Friedrich, H. Phytochemical investigation of leaves and fruits of *Vaccinium myrtillus* (author's transl) / H. Friedrich, J. Schönert // Planta medica. – 1973. - № 24(1). - P. 90-100.
216. Friedrich, H. Untersuchungen uber einige Inhaltsstoffe der Blatter und Fruchte von *Vaccinium myrtillus* / H. Friedrich, I. Schonert // Planta Med. 1973. – Vol. 24. - № 1. – P. 90-100.

217. Gao, Q. Prospective study group. consumption of flavonoid-rich fruits, flavonoids from fruits and stroke risk: a prospective cohort study / Q. Gao [et al] // Br. J. Nutr. – 2021. – Vol. 126. – P. 1717–1724.
218. Gharbavi, M. Biogenic and facile synthesis of selenium nanoparticles using *Vaccinium arctostaphylos* L. fruit extract and anticancer activity against in vitro model of breast cancer / M. Gharbavi [et al.] // Cell Biology International. – 2022. – Vol. 46. – №. 10. – P. 1612-1624.
219. Glisan, S. L. Cranberry extract attenuates hepatic inflammation in high fat-fed obese mice / S. L. Glisan [et al.], C. Ryan, A.P. Neilson, J.D. Lambert // J. Nutr. Biochem. – 2016. – Vol. 37. – P. 60–66.
220. Govindaraghavan, S. Pharmacopeial HPLC identification methods are not sufficient to detect adulterations in commercial bilberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. Anthocyanin profile provides additional clues / S. Govindaraghavan // Fitoterapia. – 2014. – Vol. 99. – P. 124-138.
221. Grases, F. Urolithiasis and phytotherapy / F. Grases [et al.] // International Urology and Nephrology. – 1994. - № 26(5). – P. 507-511.
222. Gu, X. J. A new phenolic glycoside from *Prunella vulgaris* / X. J. Gu [et al.] // Yao Xue Xue Bao. - 2011. – Vol. 46, № 5. – P. 561-563.
223. Gu, X. J. Studies on chemical constituents of *Prunella vulgaris* / X. J. Gu [et al.] // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2007. – Vol. 32, № 10. – P. 923-926.
224. Gu, X. J. Triterpenoid saponins from the spikes of *Prunella vulgaris* / X. J. Gu [et al.] // Helv. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 90, № 1. – P. 72-78.
225. Guo, J. Clinical observation on ziyin tongbi decoction in treating benign prostatic hyperplasia / J. Guo, C. S. Song, Q. Han Q. // Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. - 2008. - Vol. 28, № 12. - P. 1082-1085.
226. Guo, M. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects / M. Guo [et al.] // Dalton Trans.- 2007. – P. 4951–4961.
227. Harbilas, D. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II. / D. Harbilas Harbilas [et al.] // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2009. - № 87(6). – P. 479-492.
228. Harput, U. S. Effects of two *Prunella* species on lymphocyte proliferation and nitric oxide production / U. S. Harput, I. Saracoglu, Y. Ogihara // Phytother Res. -2006. – Vol. 20, № 2.- P. 157-159.
229. He, X. Cranberry Phytochemicals: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities / X. He, R. H. Liu // J Agric Food Chem. – 2006. - № 54(19). – P. 7069-7074.

230. Hegnauer, R. Chemotaxonomie der Pflanzen / R. Hegnauer. – Bazel; Stuttgart, 1966. – 551 ps.
231. Herrero-Martínez, J. M. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis / J. M. Herrero-Martínez [et al.] // Electrophoresis. – 2005. – Vol. 26(10). – P. 1886–1895.
232. Ho, K. Y. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. / K. Y. Ho, [et al.] // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2001. - № 53(2). – P. 187-191.
233. Ho, K. Y. Antioxidant Activity of Tannin Components from *Vaccinium vitis-idaea* L. / K. Y. Ho [et al.] // J. Pharm. Pharmacol. – 1999. - № 51(9). – P. 1075-1078.
234. Hoggard, N. A single supplement of a standardised bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract (36% wet weight anthocyanins) modifies glycaemic response in individuals with type 2 diabetes controlled by diet and lifestyle / N. Hoggard [et al.] // Journal of nutritional science. – 2013. – Vol. 2. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4153034/>.
235. Hokkanen, J. Identification of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves / J. Hokkanen [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2009. - № 57(20). – P. 9437–9447.
236. Holopainen, M. Antimicrobial activity of some Finnish Ericaceous plants / M. Holopainen [et al.] // Acta Pharmaceutica Fennica. – 1988. - № 97(4). – P. 197-202.
237. Horikawa, K. Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs / K. Horikawa [et al.] // Mutagenesis. - 1994. – Vol. 9, № 6. - P. 523-526.
238. Horn, K. Zum Vorkommender Bastard-Heidelbeere (*Vacciniumxintermedium* RUTHE) in Niedersachsen / K. Horn K., E. Garve E. // Floristische Notizenausder Lüneburger Heide. – 2006. - № 14. – P. 23-35.
239. Huang, J. C. *Prunella* stica inhibits the proliferation but not the prostaglandin production of Ishikawa cells / J. C. Huang [et al.] // Life Sci. - 2006. – Vol. 79, № 5. - P. 436-441.
240. Huang, N. Rosmarinic Acid in *Prunella vulgaris* Ethanol Extract Inhibits LPS-induced Prostaglandin E2 and Nitric Oxide in RAW264.7 Mouse Macrophages / N. Huang [et al.] // J Agric Food Chem. - 2009. – Vol. 57, № 22 – P.10579–10589.
241. Huang, Y. Effects of cranberry extracts and ursolic acid derivatives on P-fimbriated *Escherichia coli*, COX-2 activity, pro-inflammatory cytokine release and the NF-kappa beta transcriptional response *in vitro* / Y. Huang [et al.] // Pharm. Biol. – 2009. - № 47. – P. 18–25.
242. Ichianagi, T. Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract in rats / T. Ichianagi Ichianagi [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – № 54. – №. 18. – P. 6578-6587.

243. Ichiyanagi, T. Complete assignment of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins separated by capillary zone electrophoresis / T. Ichiyanagi [et al.] // Chemical and pharmaceutical bulletin. – 2004. – Vol. 52. – № 2. – P. 226-229.
244. Ichiyanagi, T. Large-Scale Isolation of Three O-Methyl Anthocyanins from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract / T. Ichiyanagi, Y. Kashiwada, M. Nashimoto // Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). – 2020. – № 68 (11). – P. 1113-1116.
245. Ieri, F. Phenolic Distribution in Liquid Preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. / F. Ieri Ieri, [et al.] S. Martini, M. Innocenti, N. Mulinacci // Phytochem. Anal. – 2013. - № 24(5). – P. 467–475.
246. Isaak, C. K. Lingonberry anthocyanins protect cardiac cells from oxidative-stress-induced apoptosis / C. K. Isaak [et al.] // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2017. - № 95(8). – P. 904-910.
247. Jaakola, L. Bilberry *in vitro* protocols and analyses of phenolic compounds / L. Jaakola [et al.] , K. Riihinen, H. Häggman, A. Hohtola // Methods Mol. Biol. - 2009. – Vol. 547. - P. 71-80.
248. Jahodar, L. Investigation of iridoid substances in *Arctostaphylos uva-ursi* / L. Jahodar, I. Leifertova, M. Lisa // Die Pharmazie. – 1978. - № 33(8). -P. 536-537.
249. Jahodár, L. The evaluation of p-methoxyphenol in the leaves of *Arctostaphylos uva-ursi* / L. Jahodár, I. Leifertova // Die Pharmazie. – 1979. - № 34. – P. 188-189.
250. Jeevan, K. Metabolism and growth inhibitory activity of cranberry derived flavonoids in bladder cancer cells / K. Jeevan Jeevan [et al.] // Food Funct. -2016. - № 7(9). – P. 4012-4019.
251. Jepson, R. G. Cranberries for preventing urinary tract infections / R. G. Jepson, G. Williams, J. C. Craig // Cochrane Database Syst Rev. – 2012. – Vol. 10(10). – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001321.pub5/full>.
252. Jin, Y. Efficient homogenization-ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and flavonols from bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) Marc with carnosic acid as an antioxidant additive / Y. Jin [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 14. – P. 2537-2551.
253. Jooyandeh, H. Modeling of ultrasound-assisted extraction, characterization and in vitro pharmacological potential of polysaccharides from *Vaccinium arctostaphylos* L. / H. Jooyandeh, M. Noshad, R. A. Khamirian // International journal of biological macromolecules. – 2018. – Vol. 107. – P. 938-948.
254. Jun, M. S. Ethanol extract of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* inhibits HMGB1 release by induction of heme oxygenase-1 in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice / M. S. Jun [et al.] // Phytother Res. - 2012. – Vol. 26, № 4. – Vol. 605-612.
255. Jurikova, T. Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Biological Effects of European Cranberry (*Vaccinium oxycoccos*) / T. Jurikova [et al.] // Molecules. – 2019. - № 24(1). – P. 24-44.

256. Kallio, H. Cutin composition of five finnish berries / H. Kallio [et al.], R. Nieminen, S. Tuomasjukka, M. Hakala // J Agric Food Chem. – 2006. - № 54(2). – P. 457-462.
257. Kalt, W. Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins / W. Kalt [et al.] // Adv. Nutr. – 2020. – Vol. 11. – P. 224–236.
258. Karikas, G. A. Isolation of piceoside from *Arctostaphylos uva-ursi* / G. A. Karikas, M. R. Euerby, R. D. Waigh // Planta medica. – 1987. - № 53(03). – P. 307-308.
259. Karlsen, A. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-κB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD / A. Karlsen [et al.] // European journal of nutrition. – 2010. – Vol. 49. – № 6. – P. 345-355.
260. Karppinen, K. Carotenoid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development under different light conditions is regulated by biosynthesis and degradation / K. Karppinen [et al.] // BMC plant biology. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-16.
261. Keller, E. Beiträge zur maßanalytischen Bestimmung von Arbutin in Bärentraubenblättern / E. Keller // Archiv der Pharmazie. – 1960. -№ 293 (12). – P. 1079-1084.
262. Keller, E. Eine cerimetrische Arbutinbestimmung / E. Keller // Archiv der Pharmazie. – 1959. - № 292 (8-9). – P. 477-479.
263. Kelly, E. Biochemical Properties and Neuroprotective Effects of Compounds in Various Species of Berries / E. Kelly, P. Vyas, J. T. Weber // Molecules. – 2017. - № 23(1). – 26 p.
264. Khalili, A. The effects of aqueous extract of *Vaccinium arctostaphylos* leaves on blood pressure in renal hypertensive rats / A. Khalili, M. B. Khosravi, A. A. Nekooeian // Iranian red Crescent Medical Journal. – 2011. – Vol. 13. – №. 2. – P. 123.
265. Kianbakht, S. Anti-hyperglycemic effect of *Vaccinium arctostaphylos* in type 2 diabetic patients: a randomized controlled trial / S. Kianbakht, B. Abasi, F. H. Dabaghian // Complementary Medicine Research. – 2013. – Vol. 20. – №. 1. – P. 17-22.
266. Kianbakht, S. Antihypertensive efficacy and safety of *Vaccinium arctostaphylos* berry extract in overweight/obese hypertensive patients: A randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial // S. Kianbakht, F. Hashem-Dabaghian // Complementary Therapies in Medicine. – 2019. – № 44. – P. 296-300.
267. Kianbakht, S. Improved lipid profile in hyperlipidemic patients taking *Vaccinium arctostaphylos* fruit hydroalcoholic extract: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial / S. Kianbakht, B. Abasi, F. Hashem Dabaghian // Phytotherapy Research. – 2014. – Vol. 28. – №. 3. – P. 432-436.
268. Kim, M. J. Effects of cranberry powder on biomarkers of oxidative stress and glucose control in db/db mice / M. J. Kim [et al.] , J.Y. Chung, J.H. Kim, H.K. Kwak // Nutr. Res. Pract. – 2013. - № 7(6). – P. 430-438.

269. Kim, S. H. The Aqueous Extract of *Prunella vulgaris* Suppresses Cell Invasion and Migration in Human Liver Cancer Cells by Attenuating Matrix Metalloproteinases / S. H. Kim [et al.] // Am J Chin Med. – 2012. – Vol. 40, № 3. – P. 643-656.
270. Koponen, J. Plant sterols in Finish blueberry (*Vaccinium myrtillis* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) seed oils / J. Koponen, [et al.] H. Kallio, B. Yang, R. Tahvonen / Spec. Publ-Royal. Soc. Chem. - 2001. - № 269. – P. 233-236.
271. Kubo, M. Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. I. Combined effect of 50% methanolic extract from *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. (bearberry leaf) and prednisolone on immuno-inflammation. / M. Kubo [et al.] , M. Ito, H. Nakata, H. Matsuda // Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. – 1990. - № 110(1). - P. 59-67.
272. Kurkin, V. A. Constituents of *Arctostaphylos uva-ursi* leaves / V.A. Kurkin [et al.], T.K. Ryazanova, E.D. Daeva, V.I. Kadentsev / Chemistry of Natural Compounds. – 2018. – Vol. 54, No. 2. – P. 278-280.
273. Kurkin, V. A. Quantitative determination of total flavonoids in bilberry shoots / V. A. Kurkin, T. K. Ryazanova // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2013. - Vol. 47, No. 4. – P. 213.
274. Lam, T. L. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs / T. L. Lam [et al.] // Life Sci. - 2000. – Vol. 67, № 23. – P. 2889-2896.
275. Lamien-Meda, A. Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts / A. Lamien-Meda [et al.] // Phytochemical Analysis. – 2008. - № 20(5). - P. 416-420.
276. Larsson, B. Prophylactic effect of UVA-E in women with recurrent cystitis: a preliminary report / B. Larsson, A. Jonasson, S. Fianu // Current therapeutic research. – 1993. - № 53(4). – P. 441-443.
277. Lätti, A. K. Anthocyanin and flavonol variation in bog bilberries (*Vaccinium uliginosum* L.) in Finland / A. K. Lätti [et al.] , L. Jaakola, K.R. Riihinen, P.S. Kainulainen // J Agric Food Chem. – 2009. – Vol. 58. – P. 427-33.
278. Lätti, A. K. Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland / A. K. Lätti, K. R. Riihinen, P. S. Kainulainen // Journal of agricultural and food chemistry. – 2008. – Vol. 56. – № 1. – P. 190-196.
279. Lätti, A. K. Characterization of anthocyanins in Caucasian blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) native to Turkey / A. K. Lätti [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2009. – Vol. 57. – №. 12. – P. 5244-5249.

280. Lätti, A. K. Phenolic compounds in berries and flowers of a natural hybrid between bilberry and lingonberry (*Vaccinium*×*intermedium* Ruthe) / A. K. Lätti, K. R. Riihinen, L. Jaakola // Phytochemistry. – 2011. - № 72(8). P. 810–815.
281. Lee, B. L. Polyphenol-enriched *Vaccinium uliginosum* L. fractions reduce retinal damage induced by blue light in A2E-laden ARPE19 cell cultures and mice / B. L. Lee [et al] // Nutrition Research. – 2016. – Vol. 36, № 12. – P. 1402-1414.
282. Lee, H. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine // H. Lee, J. Y. Lin // Mutat Res. - 1988. – Vol. 204, № 2. - P.229-234.
283. Lee, I. K. Triterpenoic acids of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* and their cytotoxic activities *in vitro* / I. K Lee [et al.] // Arch Pharm Res. - 2008 Dec. – Vol. 31, № 12. - P. 1578-1583.
284. Lee, J. Anthocyanin analyses of *Vaccinium* fruit dietary supplements / J. Lee // Food Sci. Nutr. – 2016. - № 4(5). – P. 742–752.
285. Lee, M. K. Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae Spica*: determination of triterpenic acids. / M. K. Lee [et al.] // Anal Chim Acta. - 2009. – Vol. 633, № 2. – P. 271-277.
286. Lee, S. W. *Clematis mandshurica* protected to apoptosis of rat chondrocytes / S. W. Lee [et al.] / J. Ethnopharmacol. - 2005. – Vol. 101, № 1-3. – P. 294-298.
287. Leitão, D. P. S. Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice / D. P. S. Leitão, A.C. Polizello, I.Y. Ito, A.C. Spadaro [et al.] // J Med Food. Spring. – 2005. - № 8(1). – P. 36-40.
288. Li, J. Bilberry anthocyanins improve neuroinflammation and cognitive dysfunction in APP/PSEN1 mice via the CD33/TREM2/TYROBP signaling pathway in microglia / J. Li [et al.] // Food & function. – 2020. – Vol. 11. – № 2. – P. 1572-1584.
289. Li, Y. An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria / Y. Li [et al.] // J Biol Chem. – 2007. – Vol. 282(24). – P. 17557-62.
290. Liao, L. Study of flavonoids distribution in various populations of *Prunella vulgaris* / L. Liao [et al.] // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. - 2008. – Vol. 33, № 6. – P. 651-653.
291. Linderborg, K. M. The fiber and/or polyphenols present in lingonberries null the glycemic effect of the sugars present in the berries when consumed together with added glucose in healthy human volunteers / K. M. Linderborg [et al.] // Nutrition Research. – 2012. - № 32(7). – P. 471-478., <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.06.004>
292. Linnenbrink, N. *In Vitro*-Cultures of *Arctostaphylos*-Species. III: Phytochemical Comparison of *in Vitro*-Cultures and Outdoor Plants / N. Linnenbrink, L. Kraus // Planta medica. – 1986. - № 52(06). - P. 511.

293. Liu, H. Profiling the metabolome changes caused by cranberry procyanidins in plasma of female rats using (1) H NMR and UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS global metabolomics approaches / H. Liu [et al.] , T.J. Garrett, F. Tayyari, L. Gu // *Mol Nutr Food Res.* - 2015 - № 59(11). – P. 2107-2118.
294. Liu, J. Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability / J. Liu [et al.] , W. Zhang, H. Jing, D.G. Popovich // *Journal of food science.* – 2010. – Vol. 75, № 3. – P. 103-107.
295. Liu, P. Characterization of Metabolite Profiles of Leaves of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) / P. Liu [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2014. - № 62(49). – P. 12015–12026.
296. Ma, L. Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings / L. Ma [et al] // *Int. J. Mol.Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 2785-2803.
297. Määttä-Riihinen, K. R. Catechins and Procyanidins in Berries of *Vaccinium* Species and Their Antioxidant Activity / K. R. Määttä-Riihinen [et al.] , M.P. Kähkönen, A.R. Törrönen, I.M. Heinonen // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. - № 53(22). – P. 8485-8491.
298. Madić, V. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes / V. Madić [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2021. – Vol. 265. – 113210.
299. Madrigal-Santillán, E. Investigation on the Protective Effects of Cranberry Against the DNA Damage Induced by Benzo[a]pyrene / E. Madrigal-Santillán, E. [et al.] // *Molecules.* – 2012. - № 17. – P. 4435-4451.
300. Magombe, N. Testing the antigenotoxicity and anticytotoxicity properties of *Prunella grandiflora* L. extract using the example of drosophila melanogaster / N. Magombe [et al.] , V.V. Kostenko, O.N. Antosyuk, E.V. Bolotnik // *Chimica Techno Acta.* - 2022. - Vol. 9. № S. - P. 202292S14.
301. Makhijani, V. H. The mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone reduces alcohol self-administration in female and male rats / V. H. Makhijani, K. Van Voorhies, J. Besheer // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2018. - Vol.175. - P.10–18.
302. Matsuda, H. Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. III. Combined effect of arbutin and indomethacin on immuno-inflammation / H. Matsuda, T. Tanaka, M. Kubo // *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.* – 1991. - № 111(4-5). – P. 253-258.
303. Matsuda, H. Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. IV. Effect of 50% methanolic extract from *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. (bearberry leaf) on

melanin synthesis / H. Matsuda [et al.] // Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. -1992. - № 112(4). – P. 276-282.

304. Matsuda, H. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effect of some *Arctostaphylos* plants on melanin biosynthesis / H. Matsuda [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 1996. - № 19 (1). – P. 153-156.

305. Matsunaga, N. *Vaccinium myrtillus* (bilberry) extracts reduce angiogenesis *in vitro* and *in vivo* / N. Matsunaga [et al.] //Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2010. – Vol. 7. – № 1. – P. 47-56.

306. Matsuo, K. Anti-tyrosinase activity constituents of *Arctostaphylos uva-ursi* / K. Matsuo [et al.] // Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. – 1997. -№ 117(12). – P. 1028-1032.

307. Mauramo, M. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Powder Has Anticarcinogenic Effects on Oral Carcinoma *In Vitro* and *In Vivo* / M. Mauramo [et al.] // Antioxidants. – 2021. – Vol. 10. – № 8. – P. 1319-1332.

308. McDougall, G. J. Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown *in Vitro* / G. J. McDougall [et al.] , H.A. Ross, M. Ikeji, D. Stewart // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. - № 56(9). – P. 3016-3023.

309. Mehrzadi, S. Efficacy and safety of a traditional herbal combination in patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled trial / S. Mehrzadi [et al.] // Journal of Dietary Supplements. – 2021. – Vol. 18. – №. 1. – P. 31-43.

310. Metodiewa, D. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product / D. Metodiewa [et al.] // Free Radic Biol Med. – 1999. - №1(2). – P. 107-116.

311. Mikulic-Petkovsek, M. Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species / M. Mikulic-Petkovsek [et al.] // J Food Sci. – 2012. - № 77(10). – P. 1064-1070.

312. Misikangas, M. Three Nordic Berries Inhibit Intestinal Tumorigenesis in Multiple Intestinal Neoplasia/+ Mice by Modulating β -Catenin Signaling in the Tumor and Transcription in the Mucosa. / M. Misikangas [et al.] // The Journal of Nutrition. – 2007. - № 137(10). – P. 2285–2290.

313. Miwako, K. Ursolic acid and its esters: occurrence in cranberries and other *Vaccinium* fruit and effects on matrix metalloproteinase activity in DU145 prostate tumor cells / K. Miwako [et al.] // J Sci Food Agric. – 2011. - № 91(5). – P. 789-796.

314. Mohammadi-Aloucheh, R. Enhanced anti-bacterial activities of ZnO nanoparticles and ZnO/CuO nanocomposites synthesized using *Vaccinium arctostaphylos* L. fruit extract / R.

Mohammadi-Aloucheh [et al.] // Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2018. – Vol. 46. – № 1. – P. 1200-1209.

315. Mohd Azman, N. A. Study of the Properties of Bearberry Leaf Extract as a Natural Antioxidant in Model Foods / N. A. Mohd Azman [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2016. - № 5(2). – P. 11-21 p.

316. Mohtashami, R. Effects of standardized hydro-alcoholic extract of *Vaccinium arctostaphylos* leaf on hypertension and biochemical parameters in hypertensive hyperlipidemic type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial / R. Mohtashami [et al.] // Avicenna Journal of Phytomedicine. – 2019. – Vol. 9. – №. 1. – P. 44-53.

317. Molecular Evolutionary Genetics Analysis [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.megasoftware.net/> (дата обращения: 21.01.2023).

318. Moore, M. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments for uncomplicated urinary tract infection in women (ATAFUTI): a factorial randomized trial / M. Moore [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2019. - № 25(8). – P. 973-980.

319. Mora, S. Statins for the primary prevention of cardiovascular events in women with elevated high-sensitivity C-reactive protein or dyslipidemia: results from the Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) and metaanalysis of women from primary prevention trials / S. Mora [et al.] // Circulation. – 2010. - № 121. – P. 1069–1077.

320. Morteza-Stmnani, K. The essential oil composition of *Prunella vulgaris* L. // K. Morteza-Stmnani, M. Saeedi. // Oil Bear. Plants. – 2006. – Vol. 9, № 9. – P. 257-260.

321. Moze, S. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L / F. Ieri, S. Martini, M. Innocenti, N. Mulinacci // Phytochemical Analysis. – 2013. – Vol. 24. – № 5. – P. 467-475.

322. Murphy, B. T. Identification of triterpene hydroxycinnamates with in vitro antitumor activity from whole cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*) / B. T Murphy [et al.] // J Agric Food Chem. – 2003. -№ 51(12). – P. 3541-3545.

323. Naczek, M. Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics / M. Naczek, R. B. Pegg, R. Amarowicz // Food chemistry. – 2011. - № 124(4). – P. 1507-1513.

324. Natherova, L. Pharmacognostic studies of 3 species of the genus *Prunella* L. / L. Natherova, A. Rezacova. // Acta Fac. Pharm. Univ. Comen. – 1972. - Vol. 21, № 1. – P. 33-61.

325. National Center for Biotechnology Information. PubChemPatentSummaryforUS-5980904-A [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-5980904-A> (дата обращения: 26.01.2024).

326. Nees, H. Zur chemotaxonomie der Ericaceae: Isolierung und Identifizierung von Triterpenen und Sterinen aus *Vaccinium uliginosum* / H. Nees, P. Pachaly, F. Zymalkowski // Plant Med. – 1973. – Vol. 24 (08). – P. 320-328.
327. Neto, C. C. Cranberry and its phytochemicals: A review of *in vitro* anticancer studies / C. C. Neto // J. Nutr. – 2007. - №137(1). - P. 186–193.
328. Nguyen, M. P. Host species shape the community structure of culturable endophytes in fruits of wild berry species (*Vaccinium myrtillus* L., *Empetrum nigrum* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L.) / M. P. Nguyen Nguyen [et al.] // FEMS microbiology ecology. – 2021. – Vol. 97, № 8. – URL: <https://academic.oup.com/femsec/article/97/8/fiab097/6319499?login=true>.
329. Nickavar, B. Anthocyanins from *Vaccinium arctostaphylos* berries / B. Nickavar, G. Amin // Pharmaceutical Biology. - 2004. - Vol. 42, - № 4-5 – P. 289-291.
330. Nikolaeva-Glomb, L. *In vitro* antiviral activity of a series fruit against representatives Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae / L. Nikolaeva-Glomb [et al.] // Nat. Prod. Commun. – 2014. - № 9(1). – P. 51-54.
331. Nurmi, T. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans / T. Nurmi [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2009. – Vol. 57. – №. 6. – P. 2274-2281.
332. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948378.pdf> (дата обращения: 21.01.2023).
333. O'Leary, K. A. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase / K. A. O'Leary [et al.] // FEBS Lett. – 2001. - № 503(1). – P. 103-106.
334. Olennikov, D. N. Catechin-O-Rhamnosides from *Vaccinium vitis-idaea* Stems / D. N. Olennikov, A. A. Shamilov // Chemistry of Natural Compounds. – 2022. – Vol. 58, №2. – P. 269-273.
335. Olennikov, D. N. New compounds from *Vaccinium vitis-idaea* / D. N. Olennikov, A. A. Shamilov // Chemistry of Natural Compounds. – 2022. – Vol. 58, №2. – P. 240-244.
336. Olennikov, D. N. New Glycoside of Quercetin from the Genus *Prunella* / D. N. Olennikov, A. A. Shamilov, N. I. Kashchenko // Chemistry of Natural Compounds. – 2023. – Vol. 59. – P. 647-650.
337. Olennikov, D. N. Polymeric Compounds of Lingonberry Waste: Characterization of Antioxidant and Hypolipidemic Polysaccharides and PolyphenolPolysaccharide Conjugates from *Vaccinium vitis-idaea* Press Cake / D. N. Olennikov, V. V. Chemposov, N. K. Chirikova // Foods. – 2022. - Vol. 11, № 18. – P. 2801-282525 p.
338. Oszmiański, J. Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS / J. Oszmiański, A. Wojdyło, J. Gorzelany, I.

Kapusta [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – Vol. 59. – № 24. – P. 12830-12835.

339. Panusa, A. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*. A comparative study of phenolic compounds from leaf methanolic extracts. / A. Panusa [et al.] // Phytochemistry. – 2015. - № 115. – P. 79-88.

340. Parejo, I. A. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography / I. A. Parejo [et al.] , F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina // Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques. – 2001. – № 12(5). – P. 336-339.

341. Park, J. B. Identification and characterization of *in vitro* inhibitors against UDP-glucuronosyltransferase 1A1 in uva-ursi extracts and evaluation of *in vivo* uva-ursi-drug interactions / J. B. Park [et al.] // Food and Chemical Toxicology. – 2018. - № 120. – P. 651-661.

342. Pathirage, K. P. Functional herbal food ingredients used in type 2 diabetes mellitus // K. P. Pathirage, H. Li // Pharmacogn Rev. - 2012. – Vol. 6, № 11. - P. 37–45.

343. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Volume 1 – Beijing: People's Medical Publishing House, 2005 – 975 p.

344. Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) / S. Moze [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – Vol. 59. – № 13. – P. 6998-7004.

345. Phillips, M. M. Determination of organic acids in *Vaccinium* berry standard reference materials / M. M. Phillips [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2010. – Vol. 398. – № 1. – P. 425-434.

346. Piberger, H. Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis / H. Piberger [et al.] // Molecular nutrition & food research. – 2011. – Vol. 55. – № 11. – P. 1724-1729.

347. Pinto, M. da S. Potential of Cranberry Powder for Management of Hyperglycemia Using *in Vitro* Models / M. da S. Pinto [et al.] , R. Ghaedian, R. Shinde, K. Shetty // J. Med. Food. – 2010. – Vol. 13 (5). – P. 1036–1044.

348. Pires, T. C. S. P. Development of new bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) based snacks: Nutritional, chemical and bioactive features / T. C. S. P. Pires [et al.] // Food Chemistry. – 2021. – № 334. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030881462031373X?via%3Dihub>

349. Pires, T. C. S. P. Extracts from *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a source of natural colorants: chemical characterization and incorporation in yogurts / T. C. S. P. Pires [et al.] // Food & function. – 2020. – Vol. 11. – №. 4. – P. 3227-3234.

350. Porter, M. L. Cranberry proanthocyanidins associate with low-density lipoprotein and inhibit *in vitro* Cu²⁺-induced oxidation / M. L. Porter [et al.] // J. Sci. Food Agr. – 2001. - № 81. – P. 1306–1313.
351. Pozdnyakov, D. I. 4-Hydroxy-3,5-di-tert-butyl cinnamic acid restores the activity of the hippocampal mitochondria in rats under permanent focal cerebral ischemia / D.I. Pozdnyakov // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2021. – Vol. 24. – No 11. – P. 1590-1601.
352. Pozdnyakov, D. I. Antihypoxic and anti-ischemic properties of the North Caucasus flora plant extracts / D. I. Pozdnyakov [et al.] // Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. - 2019. - Vol. 18(5). - P. 504-517.
353. Pozdnyakov, D. I. Antioxidant activity of *Juglans nigra* L. bark extract in the experiment / D. I. Pozdnyakov [et al.] // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2019. – Vol. 6. – №. 1. – P. 20-30.
354. Psotova, J. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes / J. Psotova [et al.] // J. Photochem Photobiol B. - 2006. – Vol. 84, № 3. – P. 167-174.
355. Psotova, J. Cytoprotectivity of *Prunella vulgaris* on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes / J. Psotova [et al.] // Fitoterapia. - 2005. – Vol. 76, № 6. - P. 556-561.
356. Puupponen-Pimiä, R. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens / R. Puupponen-Pimiä [et al.] // Journal of applied microbiology. – 2005. – Vol. 98. – №. 4 – P. 991-1000.
357. Pyka, A. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*Vaccinium vitis idaeae*) / A. Pyka, K. Bober, K. Stolarczyk // Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. – 2007. - № 63(5). – P. 395-400.
358. Qiang, Z. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers / Z. Qiang [et al.] // J Ethnopharmacol. - 2011. – Vol. 137, № 3. – P.1107-1112.
359. Radulović, N. Comparative Study of the Leaf Volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae) / N. Radulović, P. Blagojević, R. Palić, // Molecules. – 2010. - № 15(9). – P. 6168-6185.
360. Rahimah, A. Freeze drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA / A. Rahimah, S. Cheah, S. Rajinder // J. Oil Palm. Res. – 2006. – Vol. 18. – P. 296-304.
361. Rai, S. K. Chemo-informatics guided study of natural inhibitors targeting rho GTPase: a lead for treatment of glaucoma / S. K. Rai [et al.] // In Silico Pharmacology. – 2021. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-11.

362. Raudone, L. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within Cultivars and Their Phenolic Compounds / L. Raudone [et al.] // *Molecules*. – 2019. - № 24(5). – P. 844-853.
363. Ravan, A. P. Hepatoprotective effects of *Vaccinium arctostaphylos* against CCl₄-induced acute liver injury in rats / A. P. Ravan [et al.] // *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. – 2017. – Vol. 28. – № 5. – P. 463-471.
364. Reichert, K. P. Lingonberry extract provides neuroprotection by regulating the purinergic system and reducing oxidative stress in diabetic rats / K. P. Reichert [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2018. - № 62(16). – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201800050P.e1800050>.
365. Reichling, J. Impact of ethanolic lamiaceae extracts on herpesvirus infectivity in cell culture / J. Reichling Reichling [et al.] // *Forsch Komplementmed.* - 2008. – Vol. 15, № 6. – P. 313-320.
366. Ridgway, K. P. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron / K. P. Ridgway, J. M. Duck, J. P. Young // *BMC Ecol.* – 2003. – Vol. 3. – URL: <https://bmcecol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6785-3-8.6> p.
367. Riihinen, K. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*) / K. Riihinen [et al.] , L. Jaakola, S. Kärenlampi, A. Hohtola // *Food chemistry*. – 2008. – Vol. 110. – № 1. – P. 156-160.
368. Riihinen, K. R. ¹H-NMR Fingerprinting of *Vaccinium vitis-idaea* Flavonol Glycosides / K. R. Riihinen [et al.] // *Phytochem. Anal.* – 2013. - № 24(5). – P. 476-483.
369. Riihinen, K. R. Purification of berry flavonol glycosides by long-bed gel permeation chromatography / K. R. Riihinen, T. Gödecke, G. F. Pauli // *Journal of Chromatography A*. – 2012. - № 1244. – P. 20-27.
370. Riihinen, K. R. The antibiofilm activity of lingonberry flavonoids against oral pathogens is a case connected to residual complexity / K. R. Riihinen [et al.] // *Fitoterapia*. – 2014. - № 97. – P. 78–86.
371. Rimando, A. M. Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries / A. M. Rimando [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. - № 52(15). – P. 4713-4719.
372. Ruel, G. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption / G. Ruel [et al.] // *Metabolism*. – 2005. - № 54. – P. 856–861.
373. Ruel, G. Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men / G. Ruel [et al.] // *Br J Nutr.* – 2008. - № 99. – P. 352–359.

374. Saeed, F. *In vivo* evaluation & safety profile evaluation of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. extract in rabbits / F. Saeed [et al.] , Mehjabeen, N. Jahan, M. Ahmad // Pakistan journal of pharmaceutical sciences. – 2014. - № 27(6). – P. 2197-2205.
375. Salasoo, I. Alkane distribution in epicuticular wax of some health plants in Norway / I. Salasoo // Syst. Ecol. 1987. – Vol. 15, № 6. – P. 663-665.
376. Salasoo, I. Epicuticular wax hydrocarbons of Ericaceae in Germany / I. Salasoo // Z. Naturforsch., C: Biosci. - 1987. – Vol. 42. - № 5. – P. 499-501.
377. Schink, A. Screening of herbal extracts for TLR2- and TLR4-dependent anti-inflammatory effects / A. Schink [et al.]// PLoS One. – 2018. - № 13(10). – P. e0203907. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203907> (data accessed: 26.01.2024).
378. Sedaghatthoor, S. Essential Oils of Qare-Qat (*Vaccinium arctostaphylos*) Shoots and Chemical Composition of Berries / S. Sedaghatthoor [et al.] , A.K. Kashi, A.R. Talaei, A. Khalighi // JInt. J. of Agric. and biology. - 2006. – Vol. 8 - №1. – P. 45-46.
379. Seeram, N. P. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines / N. P. Seeram, L.S. Adams, M.L. Hardy, D. Heber // J. Agr. Food Chem. - 2004. - № 52. – P. 2512–2517.
380. Shaikh, R. U. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system *in vitro* as well as *in vivo* / R. U. Shaikh, M. M. Pund, R. N. Gacche // J Tradit. Complement. Med. – 2015. - № 6(4). – P. 355–361.
381. Shamilov, A. A. Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.): chemical content and pharmacological activity / A. A. Shamilov [et al.] // Journal of Excipients and Food Chemicals. - 2021. - Vol. 12, № 3. - P. 49-66.
382. Shamilov, A. A. Caucasian Blueberry: Comparative Study of Phenolic Compounds and Neuroprotective and Antioxidant Potential of *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium arctostaphylos* Leaves / A. A. Shamilov [et al.] // Life. – 2022. – Vol. 12, № 12. – 15 p.
383. Shamilov, A. A. Investigation of phenolic compounds at the leaves and shoots *Arctostaphylos* spp. and their antioxidant and antityrosinase activities / A. A. Shamilov [et al.] // Natural Product Research. – 2022. – Vol. 36, № 24. – P. 6312-6317.
384. Shamilov, A. A. *Vaccinium vitis-idaea* L.: chemical contents, pharmacological activities / A. A. Shamilov // Pharmaceutical Sciences. - 2020. - Vol. 26, № 4. - P. 344-362.
385. Shimizu, M. Marked potentiation of Activity of - Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Corilagin. antimicrob Agents Chemother / M. Shimizu [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2001. - № 45(11). – P. 3198-201.

386. Shin, T. Y. Inhibition of immediate-type allergic reactions by *Prunella vulgaris* in a murine model // T. Y. Shin, Y. K. Kim, H. M. Kim // Immunopharmacol Immunotoxicol. – 2001. – Vol. 23, № 3. – P. 423-435.
387. Simmler, C. Integrated analytical assets aid botanical authenticity and adulteration management / C. Simmler // Fitoterapia. - 2017. - V. 129. - P. 401– 414.
388. Singh, A. P. Cranberry Proanthocyanidins are Cytotoxic to Human Cancer Cells and Sensitize Platinum- Resistant Ovarian Cancer Cells to Paraplatin / A. P. Singh [et al.] // Phytother. Res. - 2009. - № 23. – P. 1066–1074.
389. Skottová, N. Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. / N. Skottová [et al.] // Pharmacol Res. - 2004. – Vol.50, № 2. - P.123-130.
390. Soltani, R. Evaluation of the effects of *Vaccinium arctostaphylos* L. Fruit extract on serum lipids and hs-CRP levels and oxidative stress in adult patients with hyperlipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / R. Soltani R. [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2014. – Vol. 2014. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/217451/:217451>.
391. Song, Y. W. Assessment of comparative pain relief and tolerability of SKI306X compared with celecoxib in patients with rheumatoid arthritis: a 6-week, multicenter, randomized, double-blind, double-dummy, phase III, noninferiority clinical trial / Y. W. Song [et al.] // Clin Ther. - 2007. – Vol. 29, № 5. - P. 862-873.
392. Stalnaya, I. D. Method for determination of malondialdehyde using TBA / I. D. Stalnaya, T. G. Garishvili // Modern methods in biochemistry under. Medicine. – 1977. – P. 44-46. (in Russian).
393. Ștefănescu, B. E. Chemical composition and biological activities of the nord-west romanian wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaves / B. E. Ștefănescu [et al.] // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 495.
394. Sticher, O. Hochleistungsflussigchromatographische Trennung und quantitative Bestimmung von Arbutin, Methylarbutin, Hydrochinon und Hydrochinonmonomethyläther in *Arctostaphylos*–, *Bergenia*–, *Calluna*–und *Vaccinium* / O. Sticher, F. Soldati, D. Lehmann // Arten. Planta Medica. – 1979. - № 35(03). – P. 253-261.
395. Stremoukhov, O. O. The study of fatty and organic acids of *Vaccinium uliginosum* leaves / O. O. Stremoukhov, O. M. Koshovyi, O. I. Zalyubovs'ka // Вісник фармації. – 2016. – №. 4. – P. 31-33.

396. Sun, J. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* / J. Sun [et al.] // J Funct Foods. – 2015. - № 17. – P. 235-242.
397. Sun, X. Fingerprint analysis of polysaccharides from different *Ganoderma* by HPLC combined with chemometrics methods / X. Sun [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2014. - Vol. 114, - P. 432–439.
398. Susana, G. de A. Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi* folium herbal preparations / G. de A. Susana, N. B. Naser, K. U. Nolte // International journal of toxicology. – 2013. - № 32(6). – P. 442-453.
399. Suvanto, J. Changes in the proanthocyanidin composition and related gene expression in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) tissues / J. Suvanto [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2020. – Vol. 68. – № 28. – P. 7378-7386.
400. Swanston-Flatt, S. K. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice / S. K. Swanston-Flatt [et al.] , C. Day, C.J. Bailey, P.R. Flatt // Acta diabetologia Latina. – 1989. - № 26(1). – P. 51-55.
401. Szakiel, A. Comparison of the Triterpenoid Content of Berries and Leaves of Lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland / A. Szakiel [et al.] , C. Pączkowski, H. Koivuniemi, S. Huttunen // J Agric Food Chem. – 2012. - № 60(19). – P. 4994-5002.
402. Szakiel, A. Distribution of triterpene acids and their derivatives in organs of cowberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) plant / A. Szakiel, A. Mroczek // Acta Biochim Pol. – 2007. - № 54(4). – P. 733-740.
403. Szakiel, A. Triterpenoid content of berries and leaves of bilberry *Vaccinium myrtillus* from Finland and Poland / A. Szakiel, C. Paczkowski, S. Huttunen // Journal of agricultural and food chemistry. – 2012. – Vol. 60. – № 48. – P. 11839-11849.
404. Tabb, H. D. Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris* / H. D. Tabb, R. S. Chang, K. M. Smith // Antiviral Res. - 1989. – Vol. 11, № 5-6. – P. 263-273.
405. Tadić, V. M. Old plant, new possibilities: Wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) in topical skin preparation / V. M. Tadić [et al.] // Antioxidants. – 2021. – Vol. 10. – № 3. – P. 465-481.
406. Takács, I. Wild strawberry, blackberry, and blueberry leaf extracts alleviate starch-induced hyperglycemia in prediabetic and diabetic mice / I. Takács [et al.] //Planta Medica. – 2020. – Vol. 86. – № 11. – P. 790-799.

407. Takada, K. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF- α -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells / K. Takada [et al.], T. Nakane, K. Masuda, H. Ishii // *Phytomedicine*. - 2010. - № 17(14). – P. 1114-1119.
408. Takhtadjan, A. L. Flowering Plants. 2nd ed. / A. L. Takhtadjan. – SPB: Springer Science & Business Media, 2009. – P. 192.
409. Tang, T. Y. A Nonimmunosuppressant Approach on Asia Psoriasis Subjects:5-Year Followup and 11-Year Data Analysis / T. Y. Tang // Hindawi publishing corporation dDermatology research and practice. – 2012. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/drj/2012/304172/>.
410. The German pharmacopoeia (Pharmacopoea germanica). – Philadelphia: D.D. Elder, 1873 – 410 p.
411. Titan, J. Structure identification of new compounds vulgarsaponin A from *Prunella vulgaris* / J. Titan [et al.] // *Yaoxue Xuebao*. – 2000. – Vol. 35, № 1. – P. 29-31.
412. Toivanen, M. Binding of *Neisseria meningitidis* Pili to Berry Polyphenolic Fractions / M. Toivanen [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* - 2009. - № 57(8). -P. 3120-3127.
413. Tolmacheva, A. A. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants / A. A. Tolmacheva, E. A. Rogozhin, D. G. Deryabin // *Acta Pharmaceutica*. – 2014. - № 64(2). -P. 173-186.
414. Tu, X. Chinese Herbal Medicine for Dysfunctional Uterine Bleeding: a Meta-analysis / T. Xiang, G. Huang, S. Tan // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 99–105.
415. Uleberg, E. Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) / E. Uleberg [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – № 60. – № 42. – P. 10406-10414.
416. Valentová, K. J. Induction of glucokinase mRNA by dietary phenolic compounds in rat liver cells *in vitro* / K. J. Valentová [et al.] // *Agric Food Chem.* - 2007. – Vol. 55, № 19. - P. 7726-7731.
417. Viljanen, K. J. Anthocyanin Antioxidant Activity and Partition Behavior in Whey Protein Emulsion / K. J. Viljanen [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. - № 53(6). – P. 2022-2027.
418. Viskelis, P. Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their press cakes / P. Viskelis [et al.] // *J Food Sci.* - 2009 - № 74(2). – P.157-161.
419. Voronkov, A. V. Effects of various aversive environments on oxygen consumption of muscle and blood in mice under conditions of the “forced swimming” test / A.V. Voronkov [et al.] , A.D. Gerashchenko, D.I. Pozdnyakov, D.V. Khusainov // *Pharmacy & Pharmacology*. – 2019. – Vol. 7(3). – P. 148-157. (InRuss.)

420. Vranješ, M. Effects of bearberry, parsley and corn silk extracts on diuresis, electrolytes composition, antioxidant capacity and histopathological features in mice kidneys / M. Vranješ [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2016. - № 21. – P. 272-282.
421. Waksmundzka-Hajnos, M. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry / M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska. – London; New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. – 874 p.
422. Wallace, T. C. Wallace. Extraction and Normal Phase HPLC-Fluorescence-Electrospray MS Characterization and Quantification Procyanidins in Cranberry Extracts / T. C. Wallace, M. M. Giusti // Journal Food Science. -2010 - Vol. -75, Nr. 8. – P.690-696.
423. Wang, E. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques / E. Wang [et al.], Y. Yin, C. Xu, J. Liu // Journal of Chromatography A. – 2014. – Vol. 1327. – P. 39-48.
424. Wang, H. Synthesis and Antineoplastic Evaluation of Mitochondrial Complex II (Succinate Dehydrogenase) Inhibitors Derived from Atpenin A5 / H. Wang [et al.] // ChemMedChem. – 2017. – Vol. 12(13). – P. 1033-1044.
425. Wang, L.-J. Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity / L.-J. Wang [et al.] // Food Chem. – 2014. – Vol. 160. – P. 357-64.
426. Wang, N. *Ginkgo biloba* leaf extract improves the cognitive abilities of rats with D-galactose induced dementia / N. Wang [et al.] // Journal of Biomedical Research. – 2013. - № 27(1). – P. 29-36.
427. Wang, W. Optimization of Synthesis of Carbohydrates and 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) by Response Surface Methodology (RSM) for Improved Carbohydrate Detection / W. Wang [et al.] , F. Chen, F. Zheng, B.T. Russell // Food Chemistry. – 2020. - Vol. 309. – P. 125686. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619318138?via%3Dihub>.
428. Wang, X. Analysis and Bioactive Evaluation of the Compounds Absorbed into Blood after Oral Administration of the Extracts of *Vaccinium vitis-idaea* in Rat. / X. Wang [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2005. - № 28(6). – P. 1106-1108.
429. Wang, X., Extraction, separation and structure identification of chemical constituents from stem and leaves of *Vaccinium vitis-idaea* L. // X. Wang, Y. Fan, X. Yan // Zhongcaoyay. – 2002ГГГГГГ- № 33(7). – P. 595-596.
430. Wang, Y. Chemopreventive effect of a mixture of Chinese Herbs (antitumor B) on chemically induced oral carcinogenesis. / Y. Wang [et al.] // Mol Carcinog. – 2013, - Vol. 52, № 1. – P. 49-56.

431. Wang, Y. Retinoprotective effects of bilberry anthocyanins via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms in a visible light-induced retinal degeneration model in pigmented rabbits / Y. Wang [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – № 12. – P. 22395-22410.
432. Wang, Y. The cranberry flavonoids PAC DP-9 and quercetin aglycone induce cytotoxicity and cell cycle arrest and increase cisplatin sensitivity in ovarian cancer cells / Y. Wang [et al.] // *Int J Oncol*. – 2015. - № 46(5). – P. 1924-1934.
433. Wang, Z. A new phenylpropanoids and triterpenoids from *Prunella vulgaris* / Z. Wang [et al.] / *J. Chin. Pharm. Sci*. – 2000. – Vol. 9, №3. – P. 128-130.
434. Waszczuk, M. Development and validation of a specific-stability indicating liquid chromatography method for quantitative analysis of pterostilbene: application in food and pharmaceutical products / M. Waszczuk [et al.] // *Analytical Methods*. – 2020. – Vol. 12. – № 35. – P. 4310-4318.
435. WFO PlantList [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://wfoplantlist.org/plant-list> (дата обращения: 26.01.2024).
436. White, T. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* / T. L. White, T. Bruns, S. Lee, J. W. Taylor / M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White eds. – NY: Academic Press. – 1990. – pp. 315-322.
437. Widlansky, M. E. The clinical implications of endothelial dysfunction. / M. E. Widlansky, N. Gokce, J.F.Jr. Keaney, J.A. Vita // *J Am Coll Cardiol*. – 2003. - № 42(7). – P. 1149–1160.
438. Wojnicz, D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli* / D. Wojnicz [et al.] // *Urol Res*. – 2012. - № 40(6). - P. 683–697.
439. Wojnicz, D. Study on the influence of cranberry extract Zuravit S·O·S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties / D. Wojnicz [et al.] / *Phytomedicine*. – 2012. - № 19(6). – P. 506-514.
440. Woolliams, J. A. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep / J. A. Woolliams [et al.] , G. Wiener, P.H. Anderson, C.H. McMurray // *Res Vet Sci*. – 1983.... - Vol. 34(3). – P. 253-256.
441. Wähner, C. Zur kenntnis des gerbstoffs der bärentraubenblätter (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) / C. Wähner, J. Schönert, H. Friedrich // *Pharmazie. Jahrg*. – 1974. № 29(9). – P. 616-617.
442. Yamasaki, K. Screening test of crude drug extract on anti-HIV activity / K. Yamasaki [et al.] // *Yakugaku Zasshi*. - 1993. - Vol. 113, № 11. – P. 818-824.

443. Yamaura, K. Anthocyanins, but not anthocyanidins, from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) alleviate pruritus via inhibition of mast cell degranulation / K. Yamaura [et al.] // Journal of food science. – 2012. – Vol. 77. – № 12. – P. 262-267.
444. Yan, H. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in spica *Prunellae* by derivative GC method / H. Yan [et al.] // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 1999. - Vol. 24, № 12. – P. 744 - 745, 764.
445. Yao, Y. Protective activities of *Vaccinium* antioxidants with potential relevance to mitochondrial dysfunction and neurotoxicity / Y. Yao, A. Vieira // Neurotoxicology. – 2007. – Vol. 28. – № 1. – P. 93-100.
446. Yarnell, E. Botanical medicines for the urinary tract / E. Yarnell // World journal of urology. – 2002. - № 20(5). – P. 285-293.
447. Yoon, M. Y. Effect of polyacetylenic acid from *Prunella vulgaris* on various plant pathogens / M. Y. Yoon [et al.] // Lett. Appl. Microbial. – 2010. – Vol. 51, № 5. – P. 511-517.
448. Youdim, K. A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults / K. A. Youdim [et al.], J. McDonald, W. Kalt, J.A. Joseph // J Nutr Biochem. – 2002. - № 13. – P. 282–288.
449. Zdarilová, A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts / A. Zdarilová [et al.] // Toxicol. In Vitro. - 2009. – Vol. 23, № 3. – P. 386-392.
450. Zhang, L. Z. A novel triterpenoid saponin from *Prunella vulgaris* / L. Z. Zhang [et al.] // Yao Xue Xue Bao. – 2008. – Vol. 43, № 2. – P. 169-172.
451. Zhang, Y. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris* / Y. Zhang [et al.] // Antiviral Res. - 2007. – Vol. 75, № 3. – P. 242-249.
452. Zhang, Y.--J. Two new ursane glycosides from *Prunella vulgaris* / J.-Y. Zhang, C.-R. Yang // Yunnan Zhiwu Yanjiu. - 1995. – Vol. 17, №4. – P. 448-472.
453. Zheng, J. Antihyperglycemic activity of *Prunella vulgaris* L. in streptozotocin-induced diabetic mice / J. Zheng [et al.] // Asia Pac J Clin Nutr. – 2007. - Vol. 16, № 1. - P. 427-431.
454. Zheng, M. S. Anti-HBsAg herbs employing ELISA technique / M. S. Zheng, Y. Z. Zhang // Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. - 1990. - Vol. 10, № 9. - P.560-562.
455. Zheng, W. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries / W. Zheng, S. Y. Wang // J. Agric. Food Chem. – 2003. - № 51(2). – P. 502-509.

456. Zhou, T. The effect of Chinese wild blueberry fractions on the growth and membrane integrity of various foodborne pathogens / T. Zhou [et al] // Journal of food science. – 2020. – Vol. 85, № 5. – P. 1513-1522.

457. Zhu, Y. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial / Y. Zhu, [et al.] // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. – 2013. - № 23(9). – P. 843-849.

458. Zhu, Y. Effects of *Vaccinium* Berries on Serum Lipids: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials / Y. Zhu [et al.], Y. Miao, Z. Meng, Y. Zhong // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2015. – Vol. 2015. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/790329/>.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 4.1 – Характеристика видов рода *Arctostaphylos* Adans. произрастающих на территории России

Виды <i>Vaccinium</i> L.	Жизненная форма; побеги	Листья	Цветки	Плоды	Ареал произрастания	Ист. лит
Толокнянка обыкновенная <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	Вечнозеленый кустарничек. Молодые стебли обладают зеленовато-буроватым оттенком, в то время как двулетние стебли имеют ярко-желто-бурю окраску. Трехлетние стебли отличаются оливковым цветом, а многолетние покрываются многослойной коркой, которая имеет темно-бурый или темно-коричневый оттенок и окаменевшую структуру.	Листья очередные, толстые, кожистые, голые, цельнокрайние, продолговато-обратнояйцевидные, суженные в короткий черешок, темно-зеленые, снизу более светлые, блестящие, с сетью хорошо заметных вдавленных жилок; молодые листья бледнее, нежнее и тоньше старых, опушены по краю.	Цветки овально-кувшинчатые, бледно-розовые, с пятизубчатым сросшимся венчиком, собраны в поникающие, верхушечные кистевидные соцветия по 3-5 цветков в каждом.	Плод - ягода с яркой красной окраской, слегка сплюснутое и обладающее мучнистой текстурой, содержит пять косточек внутри себя.	Европейская часть РФ; Восточная и западная Сибирь; Дальний Восток.	[128, 86]
Толокнянка кавказская <i>Arctostaphylos caucasica</i> Lipsch.	Вечнозеленый кустарник	Листья обратно-яйцевидно-продолговатые, крупные, очередные, кожистые, цельнокрайние, на верхушке неясно заостренные, по краю слегка утолщенные		Плод - шаровидная красная костянка с 1-5 косточками	Северный Кавказ	[123]

Таблица 4.2 – Характеристика некоторых видов рода *Vaccinium* L. произрастающих на территории России

Виды <i>Vaccinium</i> L.	Жизненная форма; побеги	Листья	Цветки	Плоды	Ареал произрастания	Ист. лит
Черника обыкновенная <i>V. myrtillus</i> L.	Листопадный кустарник от 10 до 40 см высотой; побеги светло-	Тонкие, яйцевидной или эллиптической формы от 0,9 до 4 см длиной и 0,2-2 см шириной со слегка	Розоватые, одиночные, поникающие, в пазухах при основании молодых побегов; венчик 5-зубчатый, зеленовато-	Шаровидная, почти черная ягода с сизым налетом, с темно-пурпурной мякотью, 5-10 мм	Восточная и западная Сибирь; Кавказ; Европейская	[86, 128]

	бурые угловато ребристые, острогранистые, молодые и двулетние голые, зеленые,	сердцевидным или закругленным основанием, мелкопильчато-зубчатым краем, зеленые, снизу светлее, черешковые	розовый, от шаровидной до кувшинчатой или колокольчиковой формы, с короткозубчатым отгибом; тычинок 8-10, с волосистыми или голыми нитями; пыльники с 2 шиловидными придатками; столбик длиннее венчика.	диаметром	часть РФ Дальний Восток Хабаровский край; Еврейская автономная область (хребет Даур) Республика Бурятия Амурская область (Верхнезейск); Приморский край (Уссурийск)	
Черника кавказская <i>V. arctostaphylos</i> L.	Высокий кустарник или небольшое деревцо до 2-3 м высотой; побеги без граней	Листья имеют длину от 6 до 8 см и имеют продолговатую или яйцевидно-продолговатую форму, со сужением к обоим сторонам и заостренными концами, а также мелкозубчатые края.	Мелкооколоцветочные кисти содержат чашечку с округлыми зубцами, состоящую из пяти лопастей. Венчик также имеет пять лепестков, окрашенных в бледно-красноватый оттенок. Форма венчика напоминает колокольчик, но с цилиндрическими контурами. Тычинки имеют гладкие нити и лишены каких-либо придатков.	Ягода шаровидная, черная	Кавказ	[86, 128]
Брусника обыкновенная <i>V. vitis-idaea</i> L.	Вечнозеленый кустарник имеет высоту от 5 до 25 см. Его побеги прямостоячие, имеют округлую или бороздчатую форму. Молодые побеги покрыты мягким опушением и имеют слабое	Листья: их форма яйцевидная или эллиптическая, кожистые, длиной от 10 до 20 мм, ширина – до 13 мм. Они характеризуются тупым или выемчатым концом, а также цельнокрайними или слегка зубчатыми краями. Верхняя	Верхушечная кисть, образованная побегами возрастом 2 года, плотно наполнена. Цветonoжки кратковременные. Цвет венчика - от белого до красного, его форма может быть колокольчатой или бокальчатой, с 4-5 зубцами. Количество тычинок - 8, они покрыты волосистыми нитями. Пыльники лишены каких-либо придатков.	Плоды шаровидной формы с ярко-красные окраской, диаметром 4-8 мм	Кавказ; Вся Сибирь; Все районы северного; Дальнего Востока; Восточная и Западная; Европа; Республика Башкирия; Чукотка.	[86, 128]

	коричневое окрашивание.	сторона листьев имеет тёмно-зеленый цвет, в то время как на их нижней стороне обнаруживаются темно-бурые железки. Листья короткочерешковые.	Чашечка имеет три зубца. Из венчика вытягивается столбик. Завязь образует 4 гнезда.			
Голубика, гонобобель <i>V. uliginosum</i> L.	Листопадный кустарник или кустарничек высотой от 15 до 40 см; побеги цилиндрической формы с бороздчатой поверхностью, покрытой корой, которая может быть коричнево-бурой или тёмно-серой.	Листья кожистые, обратнойцевидные или эллиптические от их размер от 0,5 до 4 см длиной и 0,4-2,5 см шириной, на конце округлые, реже островатые, цельнокрайние, с несколько загнутыми книзу краями, голые, сверху светло-зеленые, снизу сизоватые, с выдающимися жилками, черешковые	В 1-3 цветковых зонтиках, по 1-4 на верхушках 2-летних побегов, на коротких цветоножках, поникающие; венчик кувшинчатый, беловатый или слабо розоватый; чашечка с 4-5-зубчатым отгибом; тычинок 8-10, голые; пыльники с двумя придатками; столбик выдается из венчика.	Ягоды округлые или овальные, синеватые, с сизым налетом, внутри с зеленой мякотью, 9-15 мм длиной и 5-10 мм шириной.	Кавказ (Абхазия, Грузия) колх, адж, Пер.: сомх западная часть Республика Башкирия Западная и восточная Сибирь Все районы северного Дальнего Востока; Европейская часть РФ	[86, 128]
Клюкваболотная <i>O. palustris</i> Pers.	Вечнозеленый, стелющийся полукустарник или кустарничек; побегинитевидные, стелющиеся, укореняющиеся, красновато-коричневые, до 0,15 до 1 м длиной, опушённые	Очередные, простые, короткочерешковые, цельные, кожистые, почти голые, сильно заостренные, яйцевидные или продолговато-яйцевидные 5-16 мм длиной, 2-8 мм шириной с завороченными цельными краями, сверху блестящие, темно- или ярко-зеленые, снизу голубовато-сизые от воскового налета.	Одиночные, или с зонтиковидным соцветием, чаще на концах прошлогодних побегов; венчик глубоко 4 раздельный розово-красный, с отогнутыми долями; тычинок 8, волосистые; цветоножки обычно парные, поникающие, с двумя прицветниками сидячие в середине или выше цветоножки, коротко опушённые; зубцы чашечки на конце реснитчатые; пыльники без придатков; завязь нижняя, 4-гранная.	Красные, темно-красные, кислые, шаровидные около 10-20 мм в диаметре, сверху с остатками чашечки или со следом от него.	Европейская часть РФ; Республика Башкирия; Якутия; Западная Сибирь; Дальний Восток; Алтайский край.	[86, 128]

Таблица 1.3 – Характеристика некоторых видов рода *Prunella* L. произрастающих на территории России

Виды <i>Vaccinium</i> L.	Жизненная форма; побеги	Листья	Цветки	Плоды	Ареал произрастания	Ист. лит
Черноголовка обыкновенная <i>Prunella vulgaris</i> L.	Многолетнее травянистое растение с ползучим эпигеогенным корневищем. Стебель прямостоячий или приподнимающийся.	Листья за исключением верхней пары, на черешках, яйцевидные или продолговатые, цельно-крайние. Стеблевые листья супротивные.	Цветки в ложных мутовках, скученных в головчатые или колосовидные соцветия. При основании соцветия имеется пара сидячих листьев. Прицветные листья широкояйцевидные с сердцевидным основанием. Нижние прицветные листья длиннозаостренные, остальные 0,8-1,2 см длиной. Чашечка почти сидячая, двугубая. Венчик двугубый, фиолетовый, 8-12 мм длиной, в полтора-два раза длиннее чашечки.	Орешки яйцевидные или эллиптические, трехгранные, блестящие.	Европейская часть РФ; Кавказ; Восточная и западная Сибирь; Дальний Восток; Средняя Азия.	[87, 129]
Черноголовка крупноцветковая <i>Prunella grandiflora</i> L.	Многолетнее травянистое растение с ползучим корневищем. Стебли приподнимающиеся. Растение голое или скудно опушенное, 15-60 см высотой.	Листья на длинных черешках, продолговатые или яйцевидно продолговатые, цельнокрайние или реже у основания, по краю расставленно зубчатые.	Прицветники перепончатые, округлые, с сердцевидным основанием, по краю реснитчатые, остроконечные. Соцветия яйцевидные или продолговатые, без парных листьев при основании, реже с придвинутой к соцветию парой листьев. Венчик, в два-четыре раза длиннее чашечки, сине-фиолетовый или красноватый.	Орешки округлые или округло яйцевидные.	Европейская часть РФ; Кавказ.	[86, 129]
Черноголовка разрезная <i>Prunella lacciniata</i> L.	Травянистый многолетник, достигающий до 40 см высотой. Стебли приподнимающиеся. Растение, шероховато опушенное с ползучим корневищем.	Листья яйцевидные или продолговатые, зубчатые, верхние обычно перистораздельные с линейными долями.	Соцветие густое, яйцевидно-продолговатое, прицветники перепончатые, почти округлые. Нижняя губа чашечки глубже середины двураздельная, с ланцетно-шиловидными, по краям перепончато-реснитчатыми зубцами. Зубец более длинной тычинки шиловидный и вперед согнутый. Венчик желтоватый	Орешки округлые.	Европейская часть РФ; Кавказ.	[87, 129]

ПРИЛОЖЕНИЕ 2



Рисунок 2.1 – Гербарный экземпляр *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. (PALE 004930)

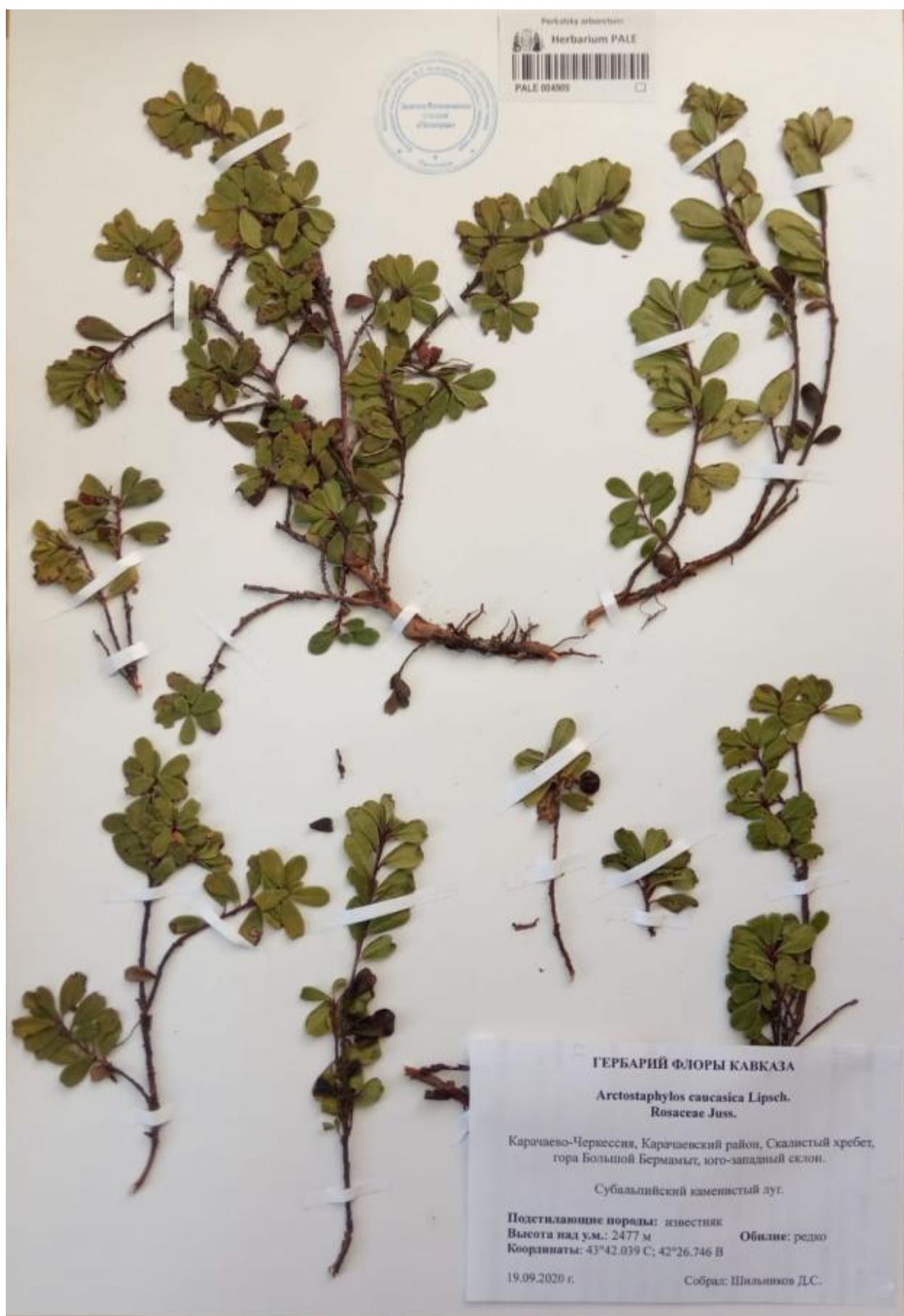


Рисунок 2.2 – Гербарный экземпляр *Arctostaphylos caucasica* Lipsch. (PALE 004909)

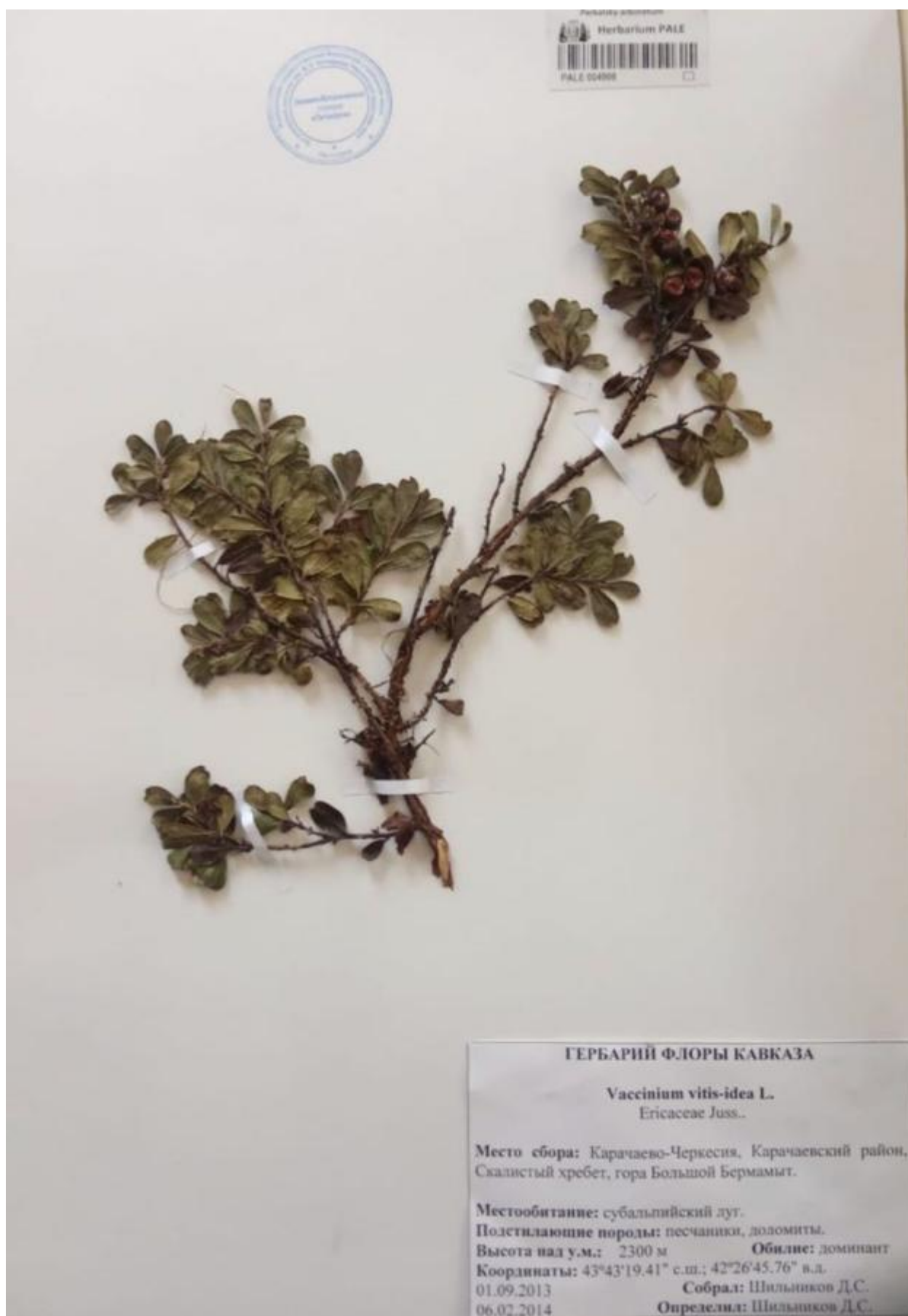


Рисунок 2.3 – Гербарный экземпляр *Vaccinium vitis-idaea* L. (PALE 004908)

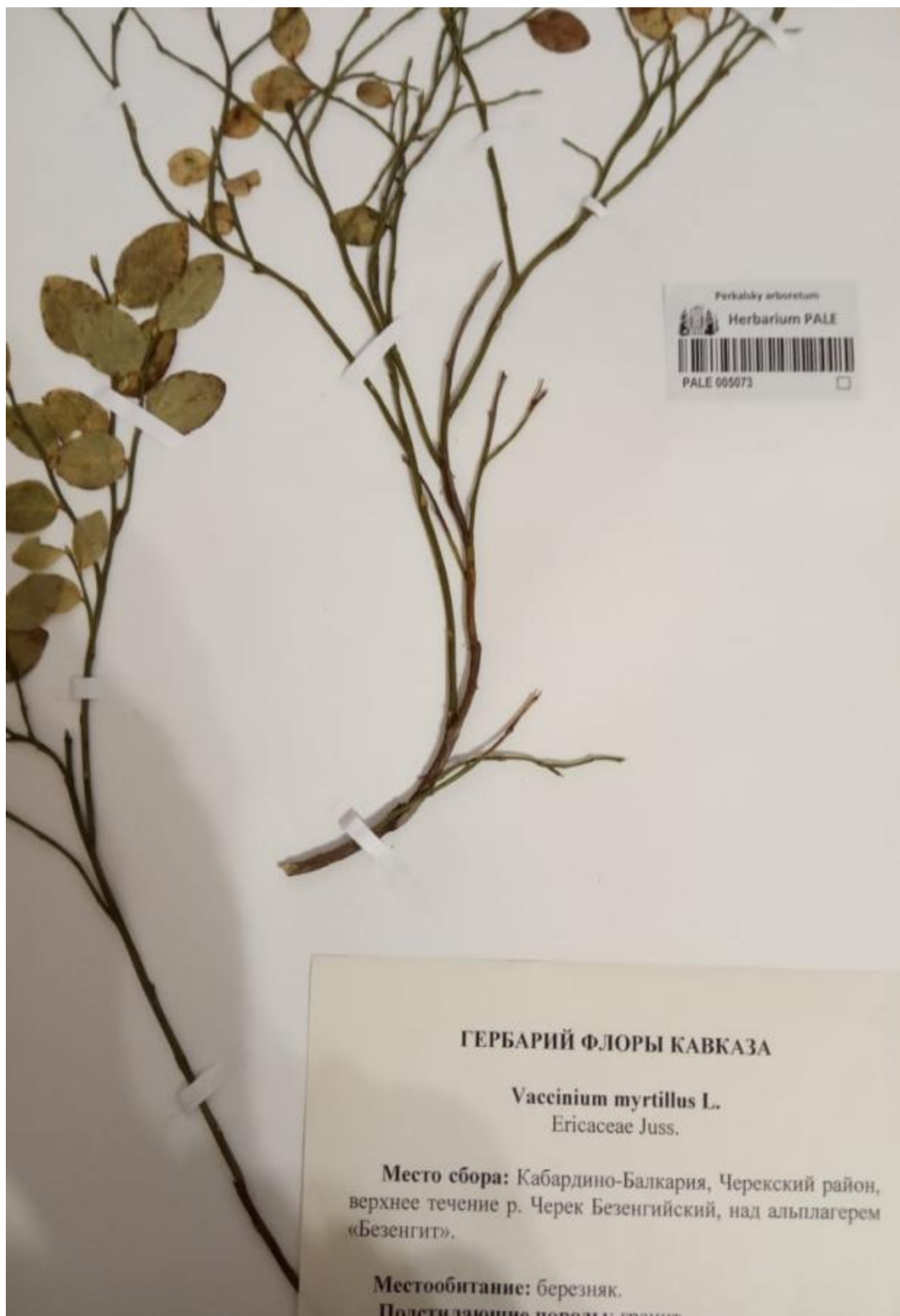


Рисунок 2.4 – Гербарный экземпляр *Vaccinium myrtillus* L. (PALE 005073)

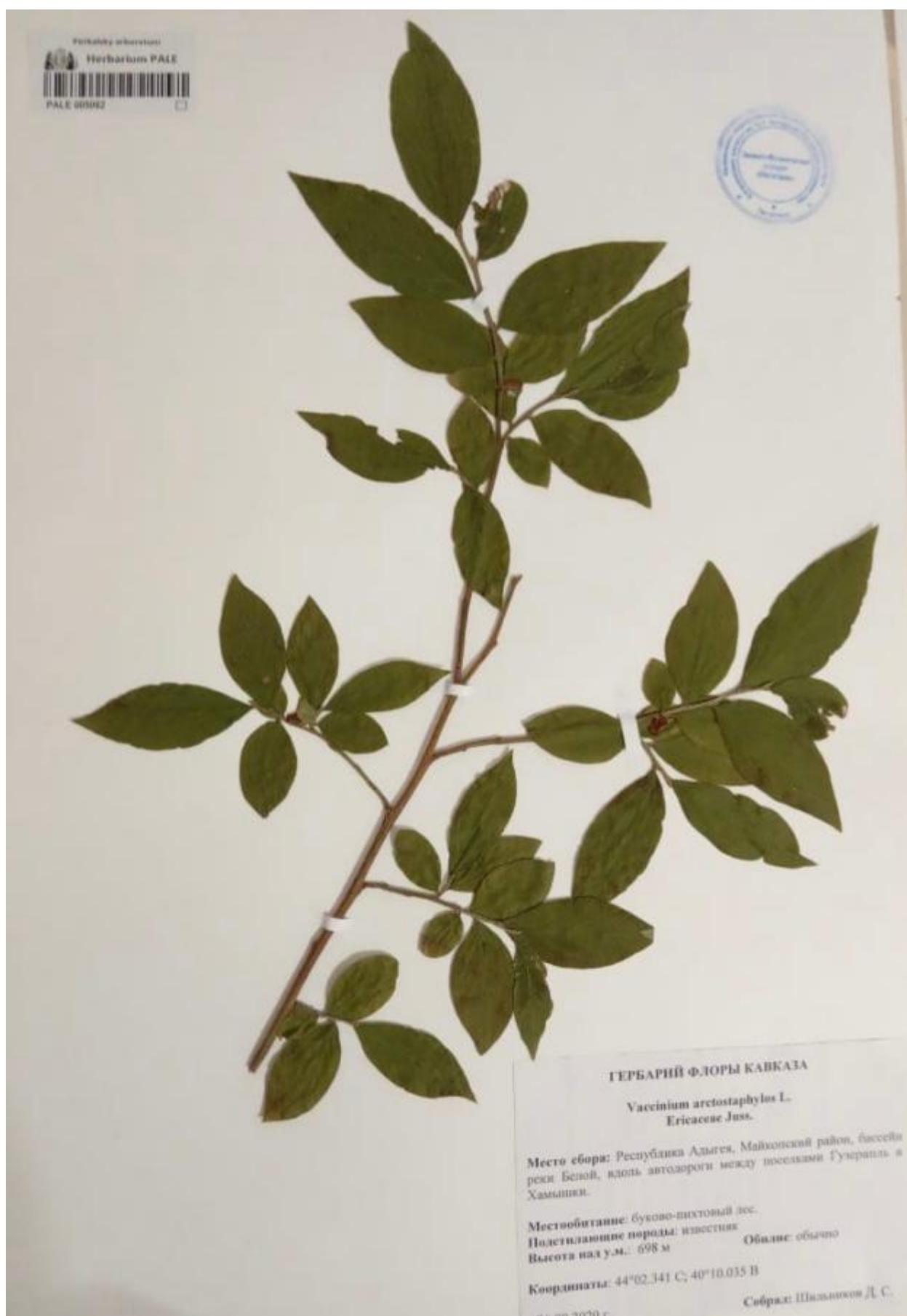


Рисунок 2.5 – Гербарный экземпляр *Vaccinium arctostaphylos* L. (PALE 005082)

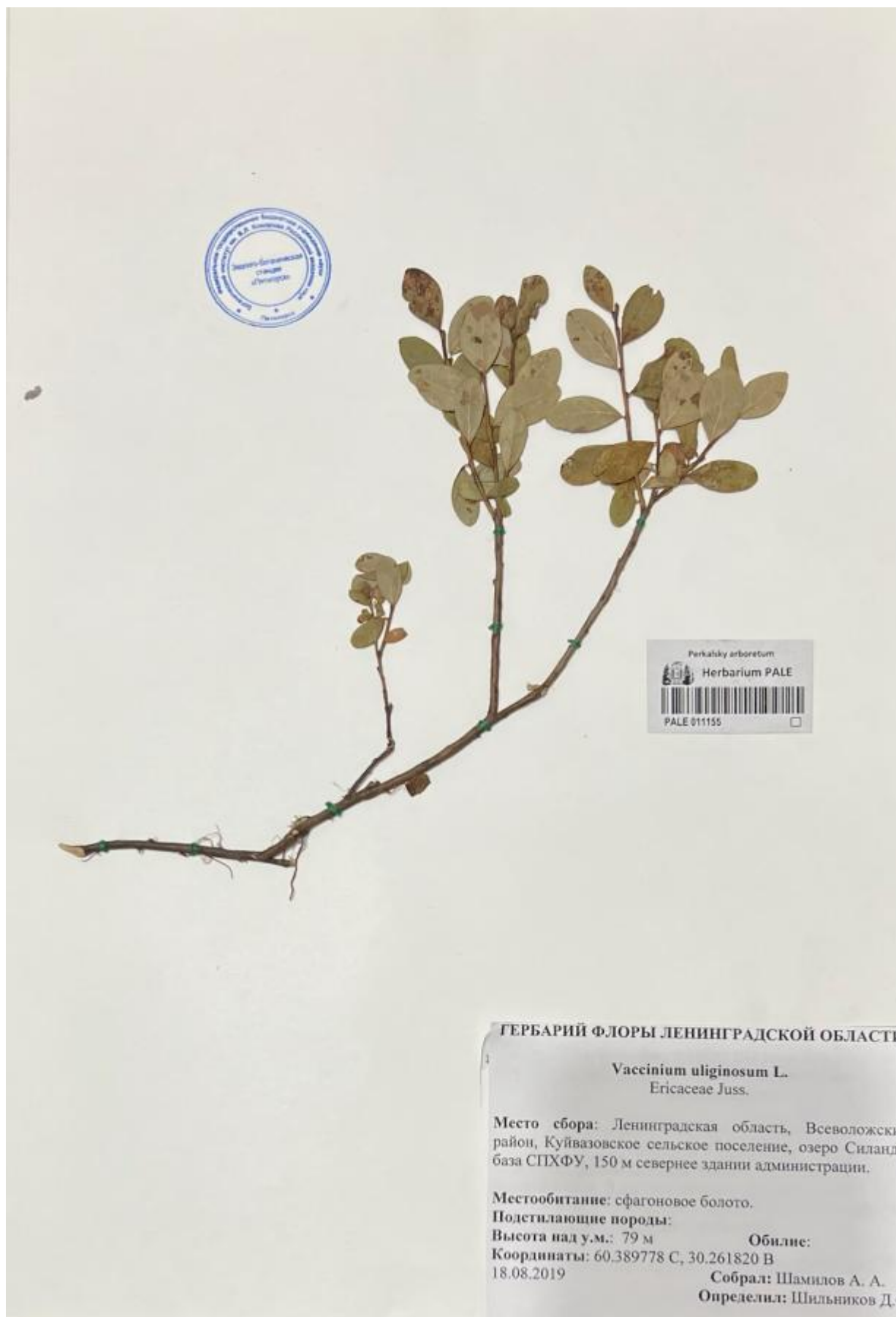


Рисунок 2.6 – Гербарный экземпляр *Vaccinium uliginosum* L. (PALE 011155)

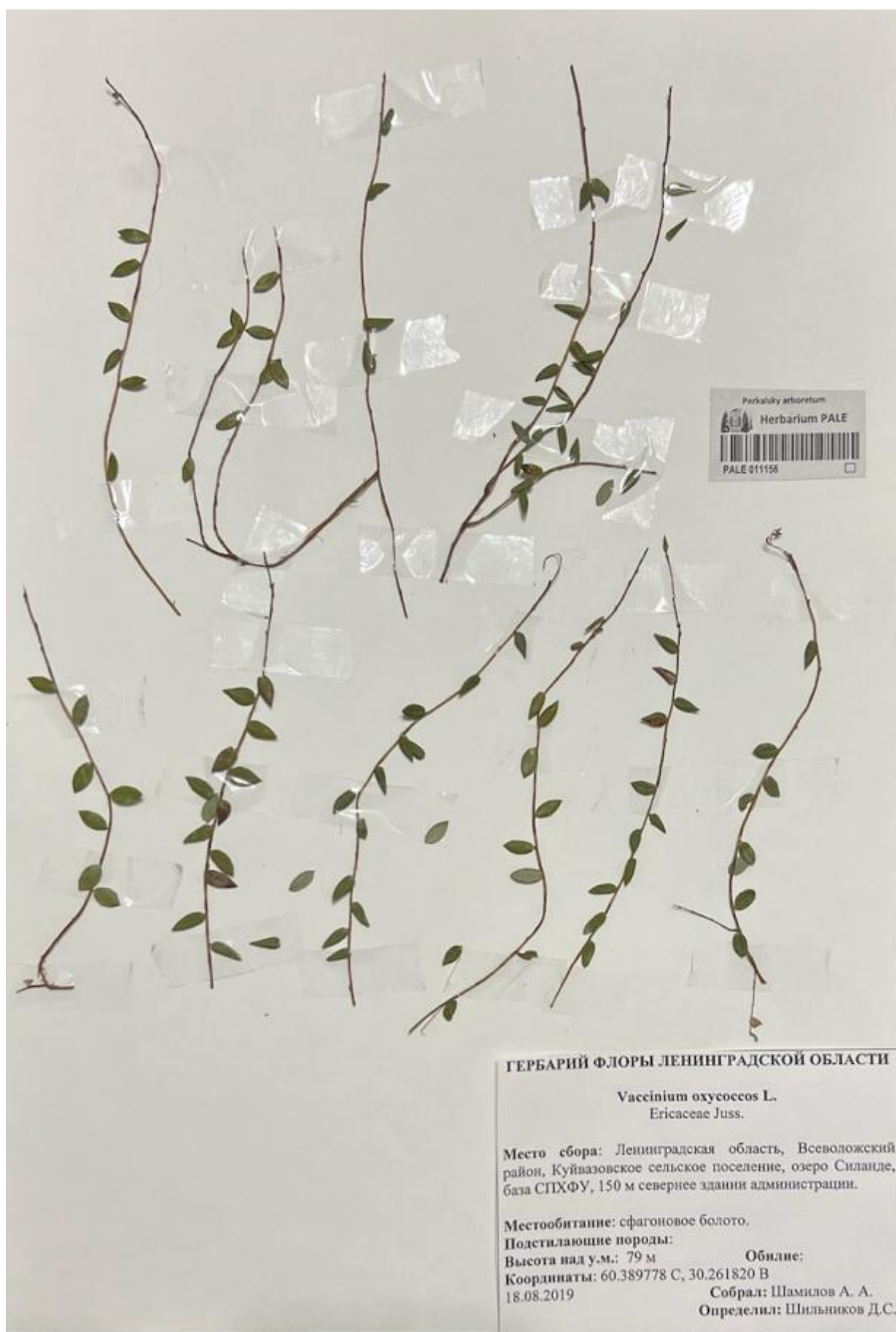


Рисунок 2.7 – Гербарный экземпляр *Vaccinium oxycoccos* L. (PALE 011156)

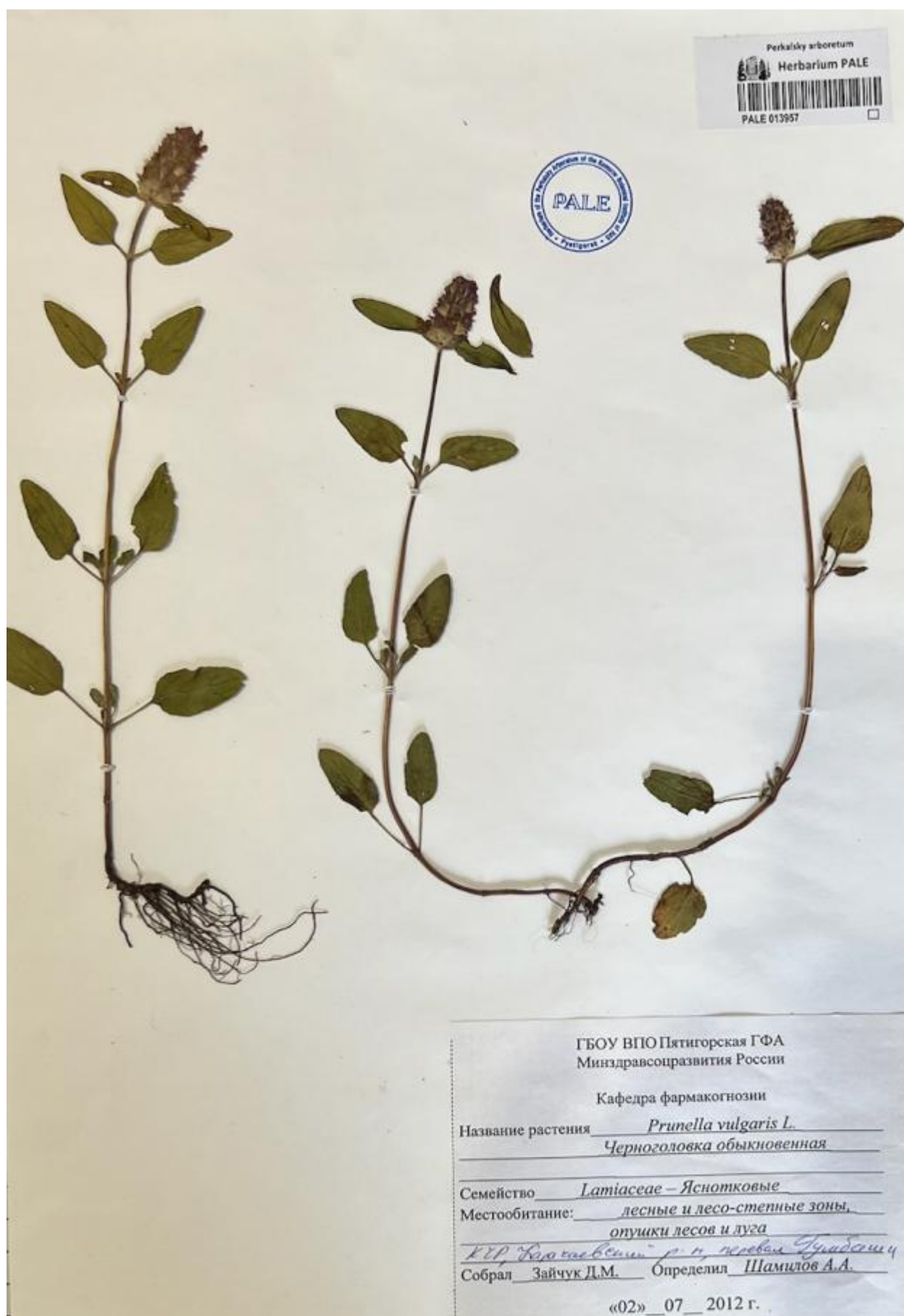


Рисунок 2.8 – Гербарный экземпляр *Prunella vulgaris* L. (PALE 013957)



Рисунок 2.9 – Гербарный экземпляр *Prunella grandiflora* L. (PALE 013959)

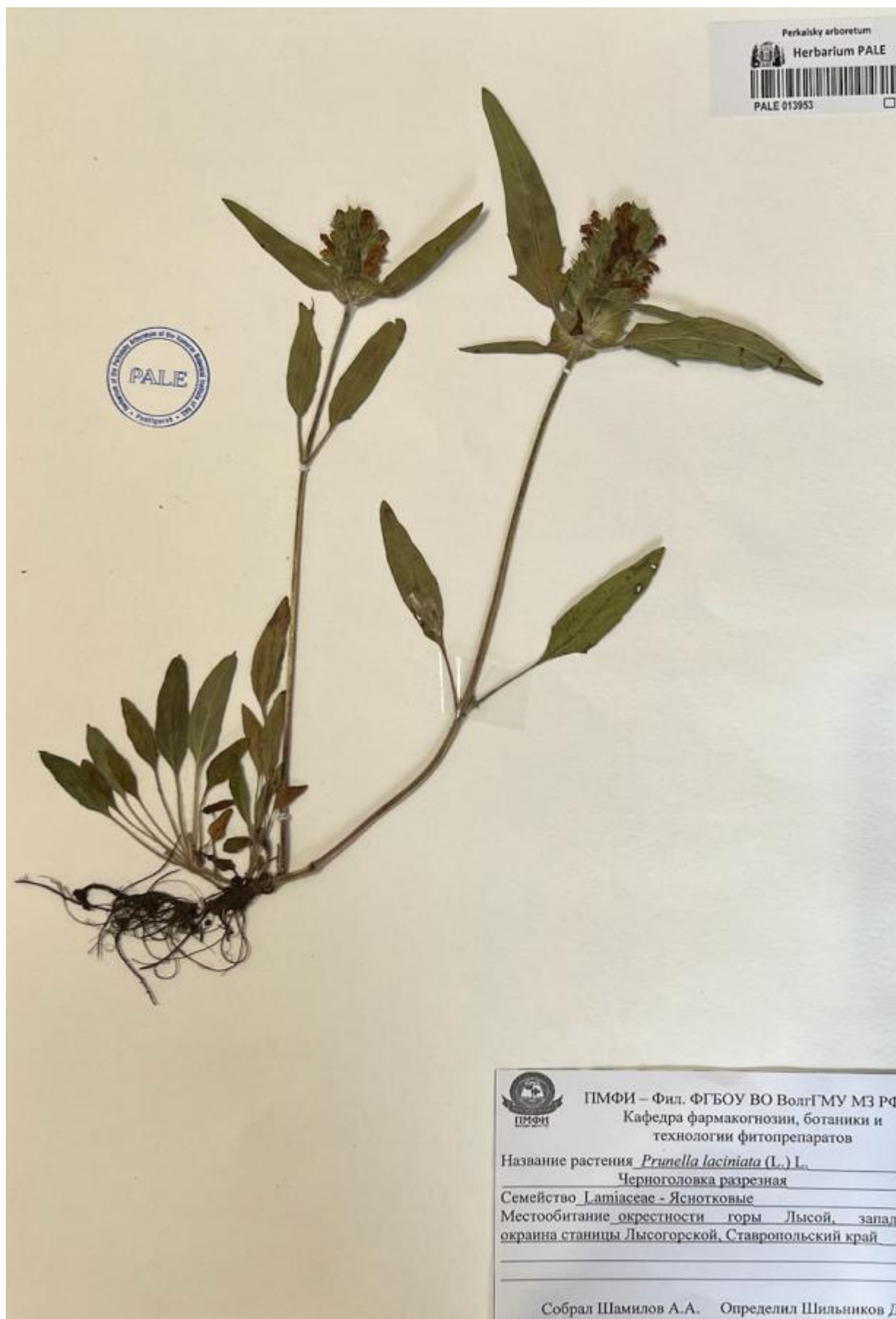


Рисунок 2.10 – Гербарный экземпляр *Prunella laciniata* L. (PALE 013953)

ПРИЛОЖЕНИЕ 3



Рисунок 3.1 – Внешний вид цельных и измельченных листьев толокнянки обыкновенной (1); и толокнянки кавказской (2)



Рисунок 3.2 – Внешний вид цельных и измельченных листьев брусники обыкновенной



Рисунок 3.3 – Внешний вид цельных и измельченных листьев черники обыкновенной (1); черники кавказской (2)



Рисунок 3.4 – Внешний вид цельных и измельченных листьев голубики обыкновенной



Рисунок 3.5 – Внешний вид цельных и измельченных побегов клюквы болотной



Рисунок 3.6 – Внешний вид цельной и измельченной травы черноголовки обыкновенной (1); черноголовки крупноцветковой (2); черноголовки разрезной (3)

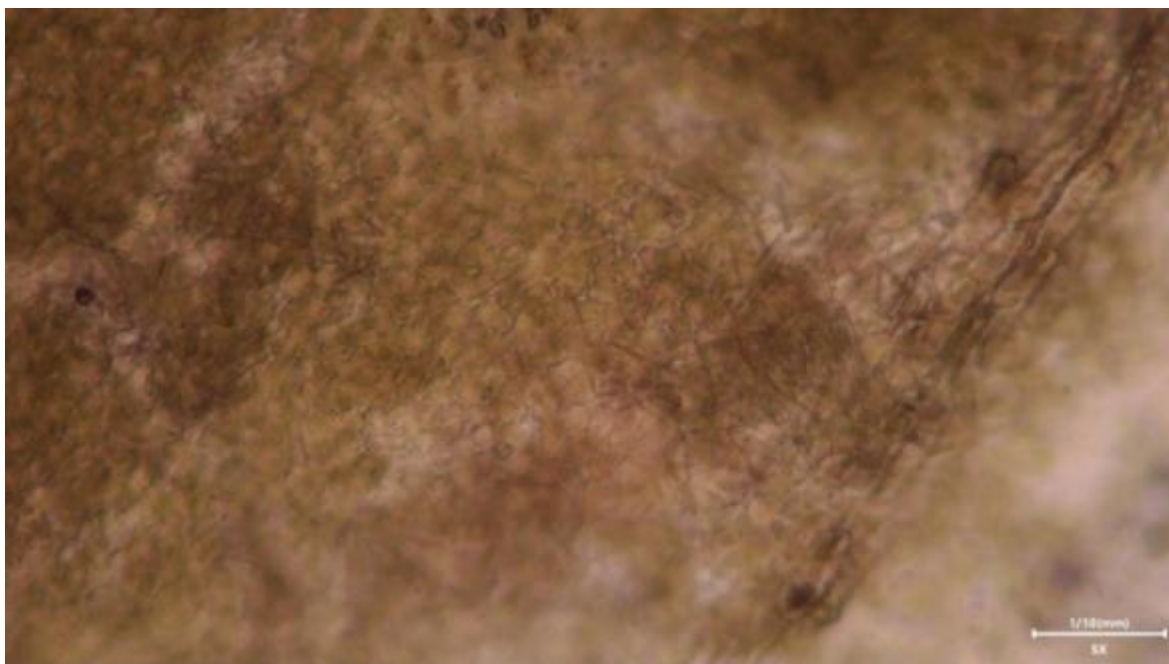


Рисунок 3.7 – Верхний эпидермис листа толокнянки обыкновенной (ув.×100)

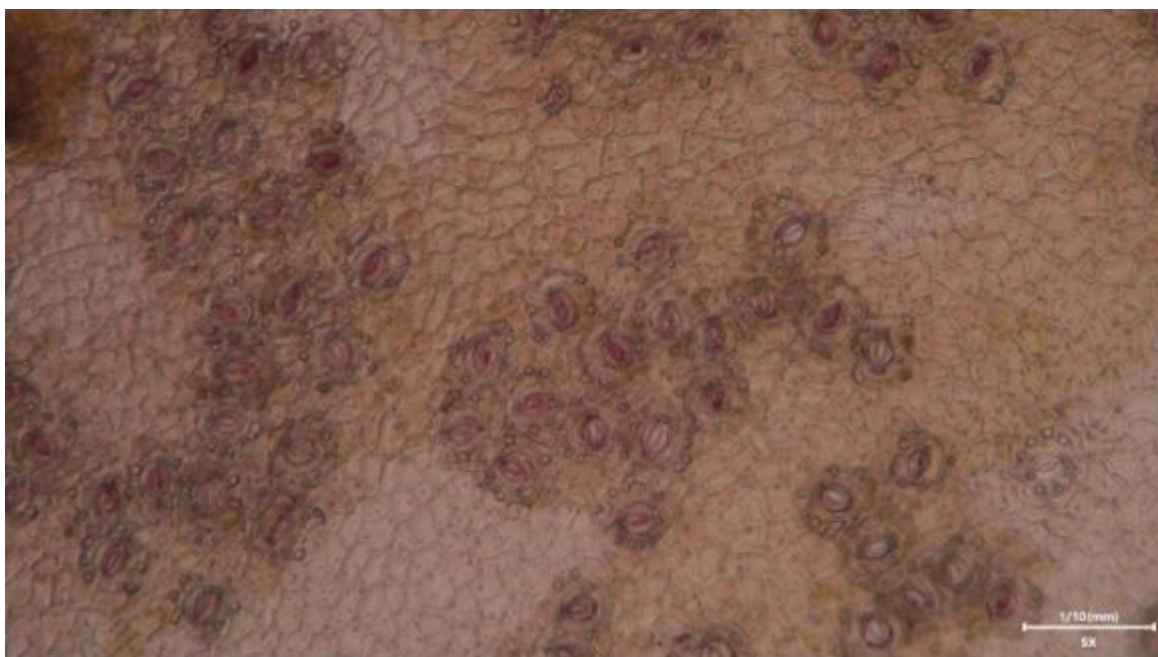


Рисунок 3.8 – Нижний эпидермис листа толокнянки обыкновенной (ув.×100)

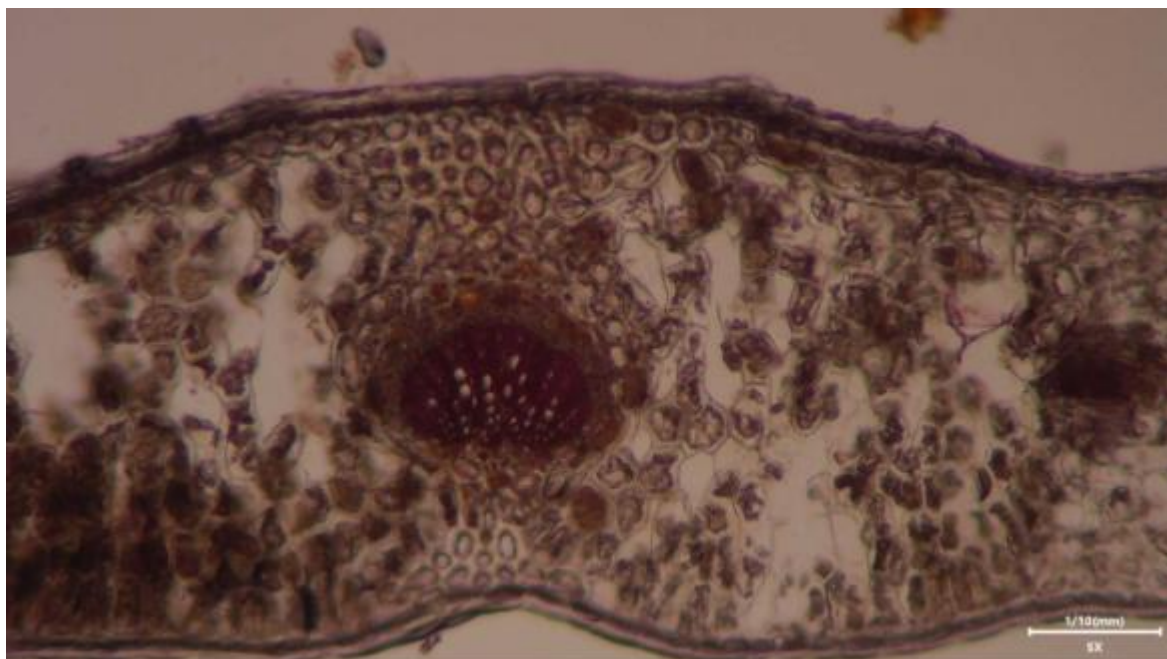


Рисунок 3.9 – Поперечный срез листа толокнянки обыкновенной в области центральной жилки
(ув.×100)



Рисунок 3.10 – Поперечный срез листа толокнянки обыкновенной (ув.×40)



Рисунок 3.11 – Поперечный срез края листа толокнянки обыкновенной (ув.×100)

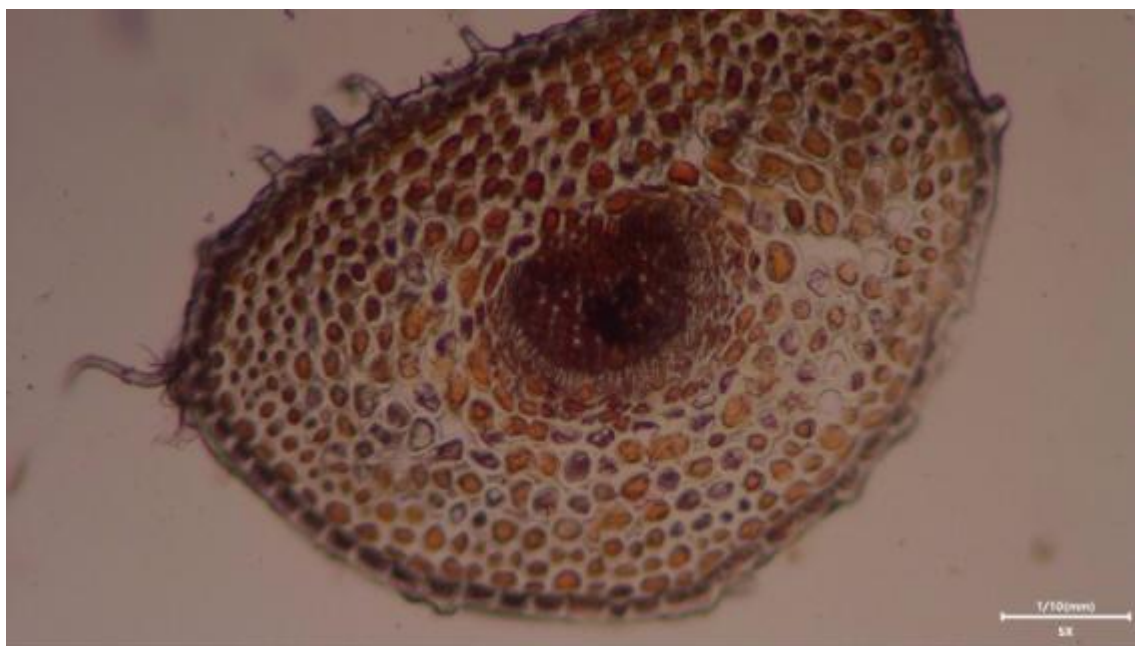


Рисунок 3.12 – Поперечный срез черешка листа толокнянки обыкновенной (ув.×100)



Рисунок 3.13 – Фрагмент эпидермиса черешка листа толокнянки обыкновенной (ув.×100)



Рисунок 3.14 – Фрагмент эпидермиса черешка листа толокнянки обыкновенной (ув.×100)

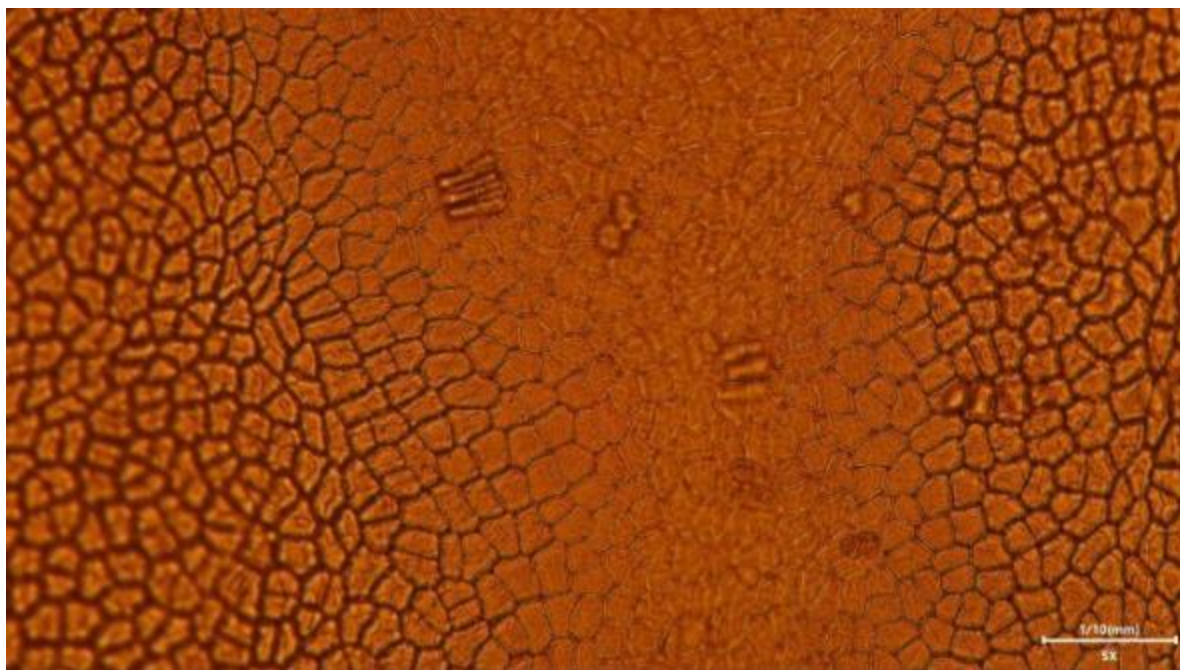


Рисунок 3.15 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа толокнянки кавказской (ув.×400)



Рисунок 3.16 – Край листа толокнянки кавказской - препарат с поверхности (ув.×400)

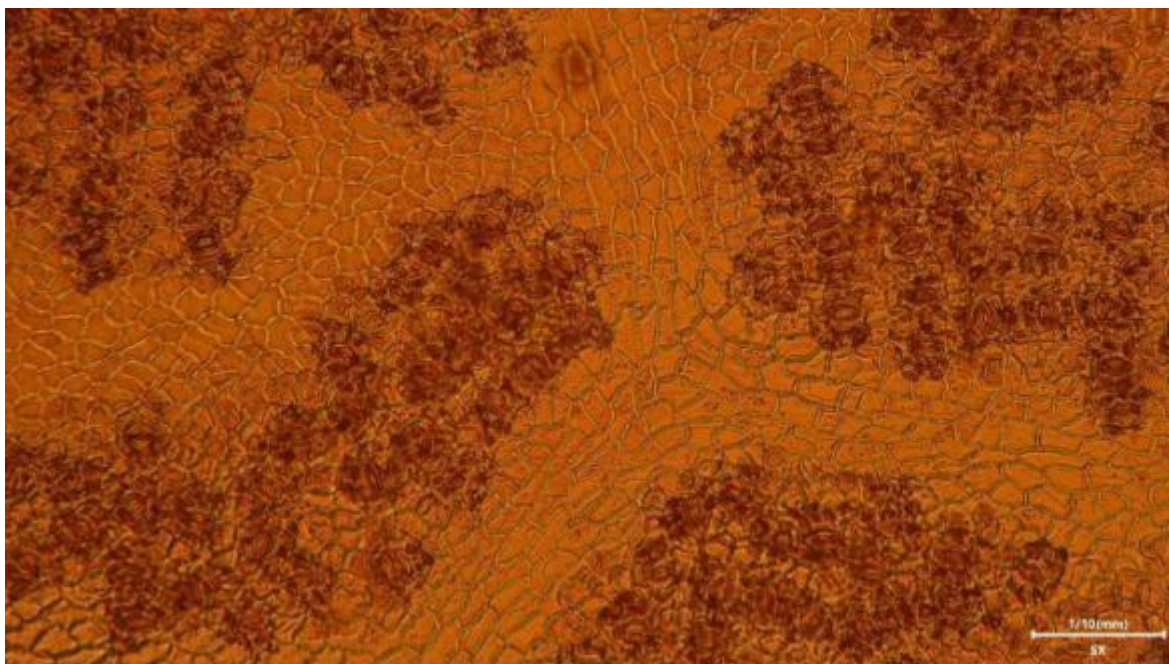


Рисунок 3.17 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской (ув.×100)

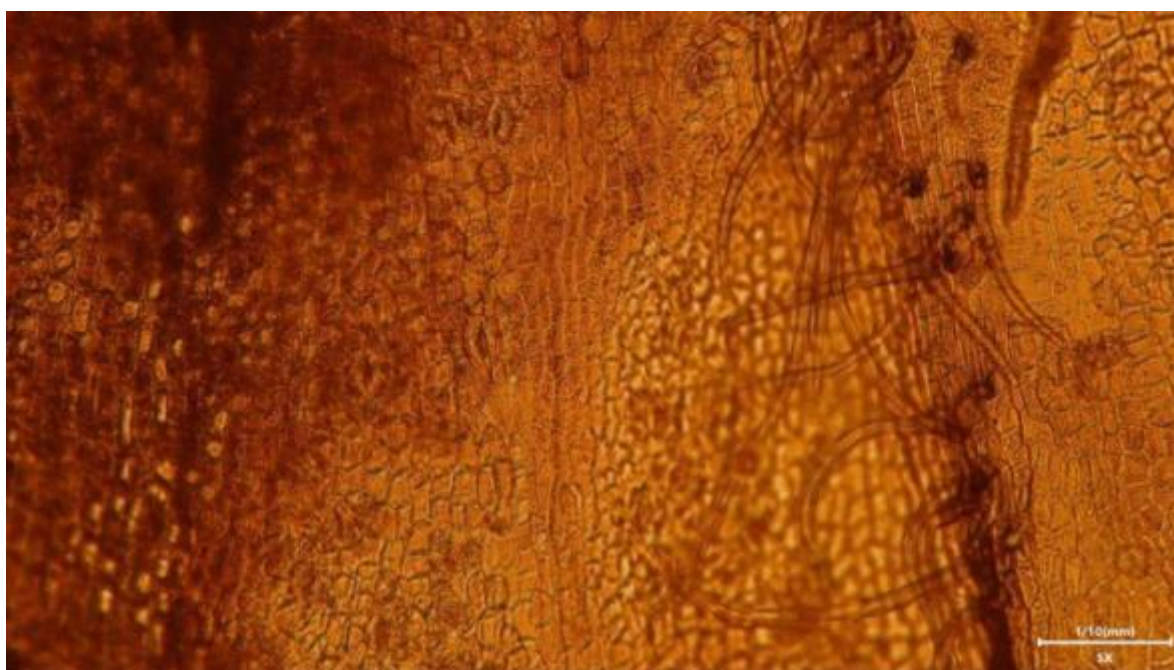


Рисунок 3.18 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской в области жилки (ув.×100)

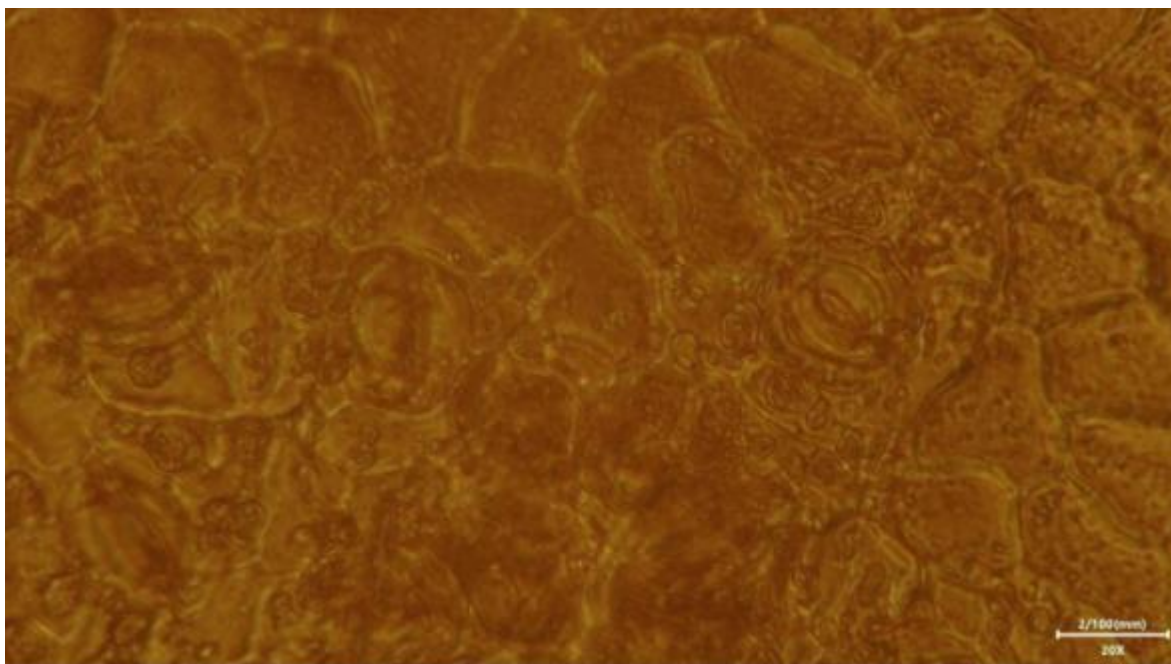


Рисунок 3.19 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской с устьицами
(ув.×400)

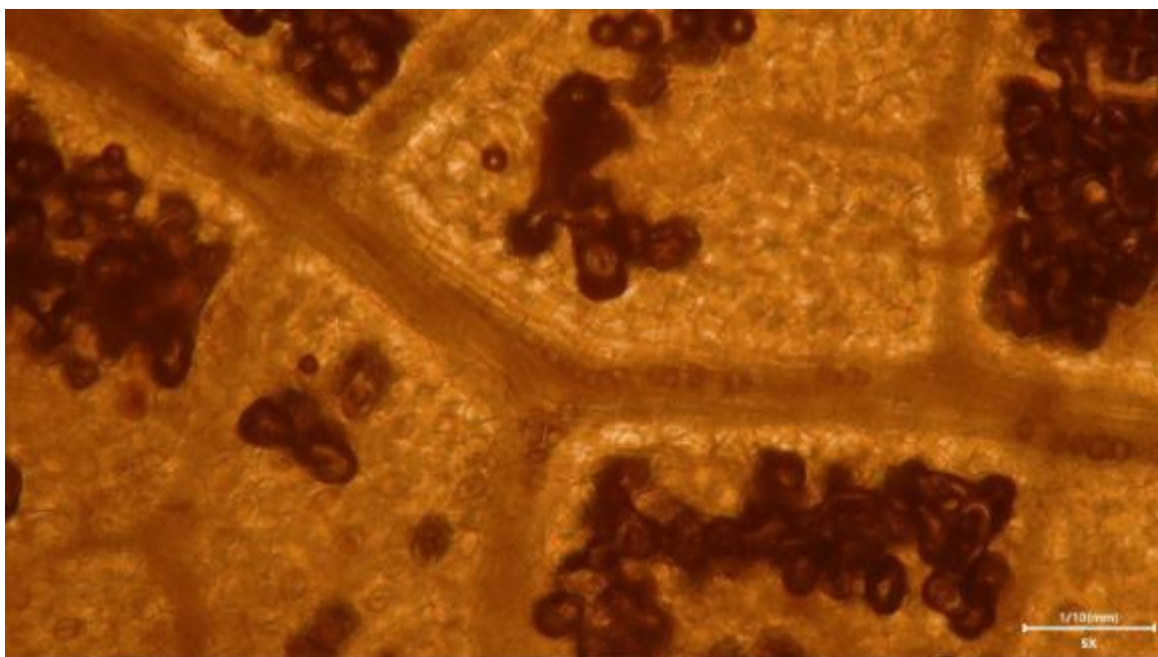


Рисунок 3.20 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа толокнянки кавказской в области жилки
(ув.×400)

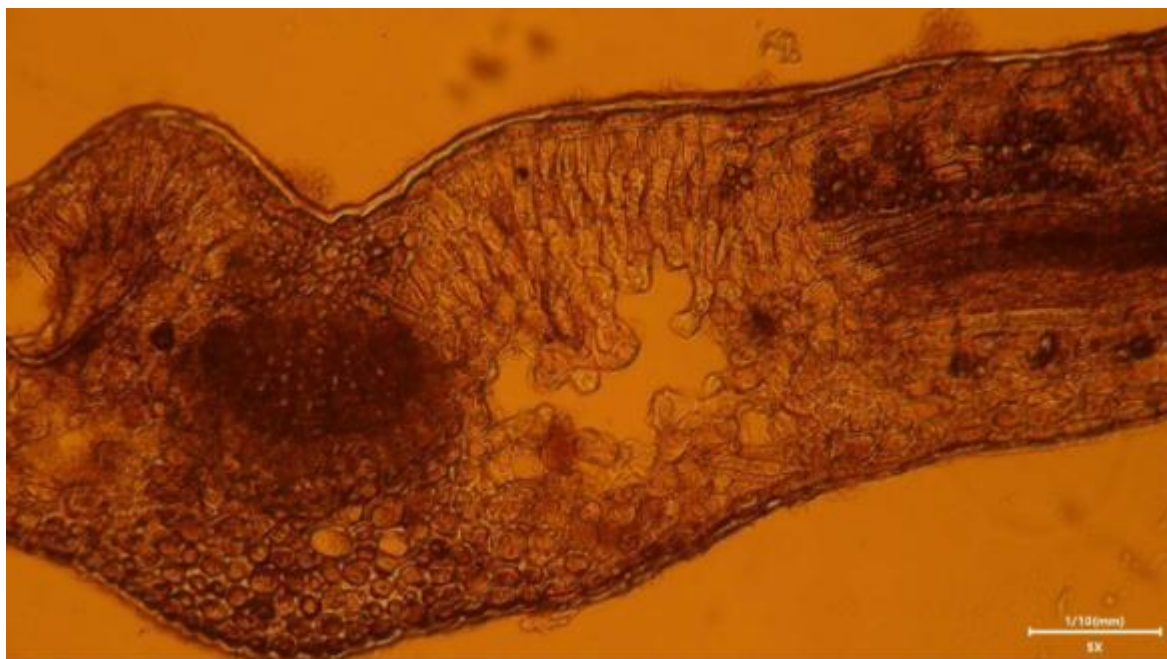


Рисунок 3.21 – Поперечный срез листа толокнянки кавказской в области центральной жилки
(ув.×100)

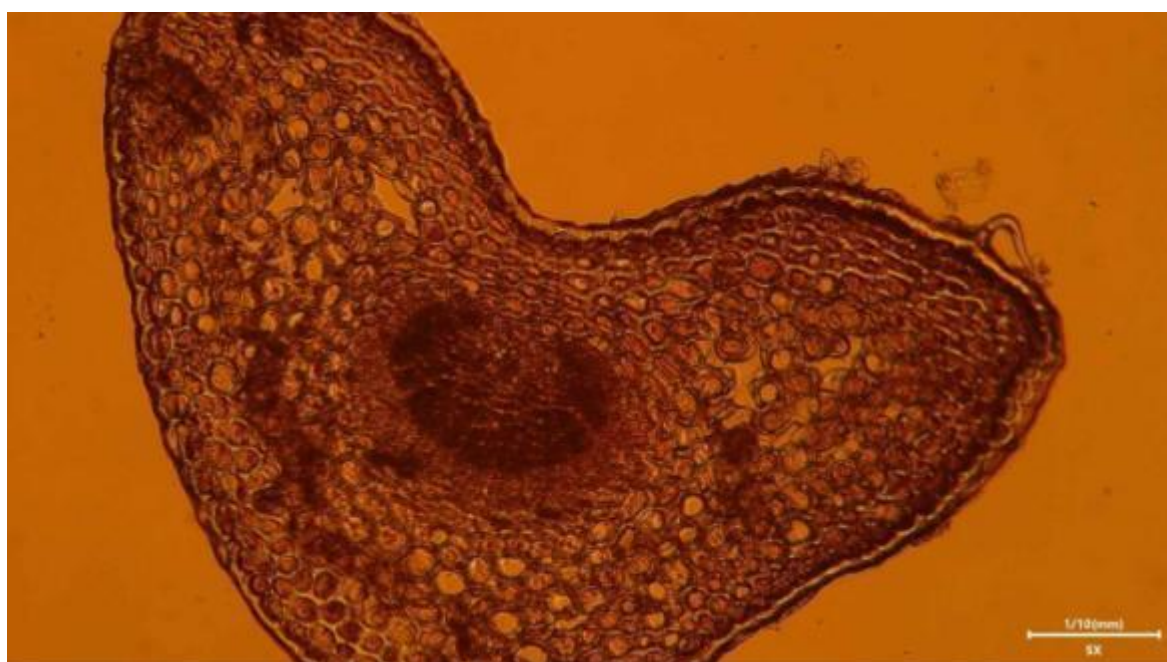


Рисунок 3.22 – Поперечный срез черешка листа толокнянки кавказской (ув.×100)

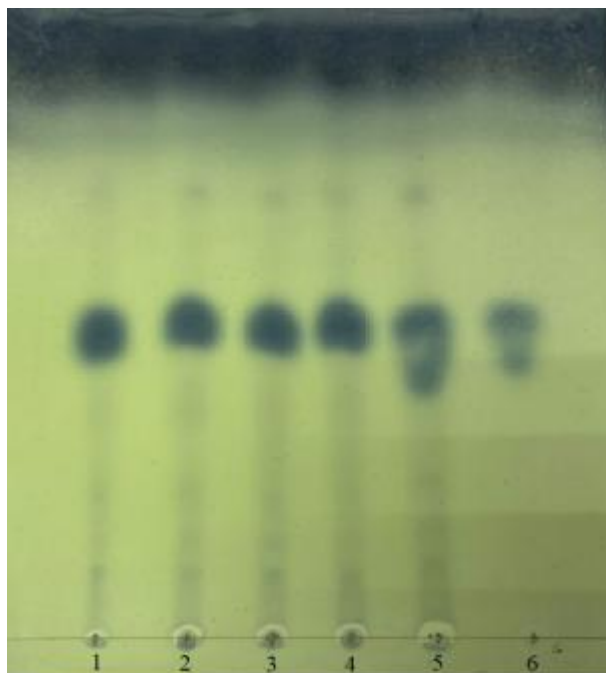


Рисунок 3.23 – Хроматограмма извлечений из толокнянки листьев
(С 1 по 4 толокнянка обыкновенная) 1 – Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области; 2 – гора Малый Иремель, Челябинская область; 3 – Турочакский район, Республика Алта; 4 – деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область; 5 – плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (толокнянка кавказская); 6 – стандартный образец арбутина.

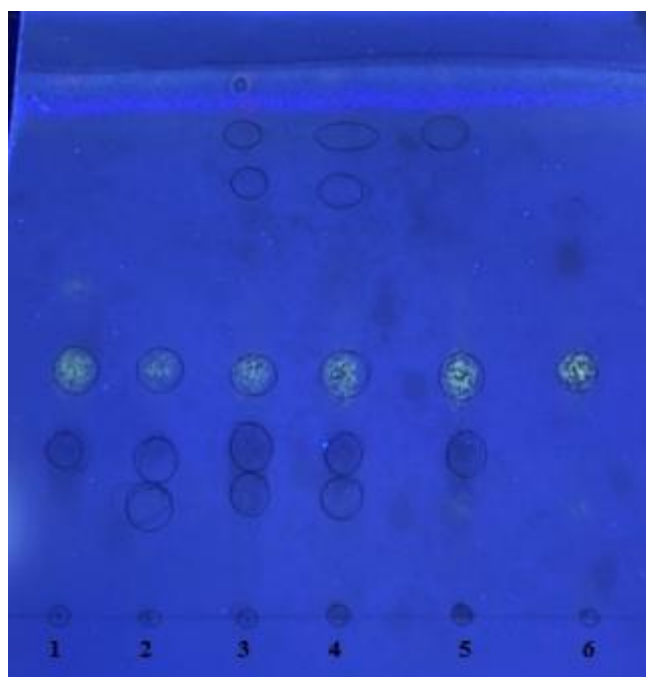


Рисунок 3.24 – Хроматограмма извлечений из толокнянки листьев
(С 1 по 4 толокнянка обыкновенная) 1 – Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области; 2 – гора Малый Иремель, Челябинская область; 3 – Турочакский район, Республика Алта; 4 – деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область; 5 – плато Большой Бермамыт, Малокарачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика (толокнянка кавказская); 6 – стандартный образец гиперозида.

Таблица 3.1 – Нуклеотидные последовательности образцов *Arctostaphylos* Adans.

Последовательность	Образец
TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAATCAAGGTAACATTTGTATGTTACTT TTGGGTCAAAGGAGCAACAACCCACAACAACATGGCATAACAACATTACGGAACAGTTAAACAACCACCACT AGTTGTGATGTCCGTCGTCGGGGACTGCGTTTTTAGACCAACCAAGCACGAACGTGCACGGGAGGCCAATATCCA CCCACACATTCATGTGCCCATGGAAGGACAAGGCTGGTGGGTGACGGGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCC TTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAG TATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTAGTTTTACGAAAT ATGCGAGCGCCACAGCCACGAATGGGTGTAGGCGTGCAATTTTTTTCCAAGATTTTCCTTGGCGCGGTTTGCGCCG GGTTTCGTTATTTGACAAGTGAATGAACAAGTTTCCAAAAGGACCTTGACCCCACTTGAGAAGGAACAAATAGTA GGCGACAACCTAGGTCCACCGCTCAATTTTTTCCAGAAGTATACATAACATGTTTCGCGGGTCTTTCTGCTTGGCATT CGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA	<i>A. caucasica</i> (1)
TNGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGT AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTGTGCAATGCCATGCAGAAAGACCCGCGAACATGTTATGTATACTTCTGGAA AAAATTGAGCGGTGGACCTAGTTGTGCGCCTTCTATTTGTTCTTCTCAAGTGGGTGCAAGGTCCTTCTGGAACTT GTTCAATCACTTGTCAAATAACGAAACCCGGCGCAAACCGCGGCCAAGGAAAATCTTGGAATAAATGCATGCCTA CACCCATTCGTGGGCTGTGGCGCTCGCATATTTTCGTAAACTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTG CATCNATGAANAACGCAGCCTGTCTCTTATACACNTCTCCNA	<i>A. uva-ursi</i> (1)
TTCTCCGNTTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAATCAAGGTAACATTTGT ATGTTACTTTTGGGTCAAAGGAGCAACAACCCACAACAACATGGCATAACAACATTACGCAACAGTTAAACAA CCACCACTAGTTGTGATGTCCGTCGTCGGGGACTGCGTTTTTAGACCAACCAAGCACGAACGTGCACGGGAGGC CAATATCCACCCACGCATTCATGTGCCCATGGAAGGACAAGGCTGGTGGGTGACGGGATGCGTGACGCCCAGGCA GACGTGCCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTC ACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTAGTT TTACGAAATATGCGAGCGCCACAGCCACGAATGGGTGTAGGCATGCATTTTTTTCCAAGATTTTCCTTGGCGCGG TTTGCGCCGGGTTTCGTTATTTGACAAGTGAATGAACAAGTTTCCAGAAGGACCTTGACCCCACTTGAGAAGGAA CAAATAGAAGGCGACAACCTAGGTCCACCGCTCAATTTTTTCCAGAAGTATACATAACATGTTTCGCGGGTCTTTCTG CATGGCATTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGT	<i>A. uva-ursi</i> (2)
ATTGTCGAATGCCATGCAGAAAGACCCGCGAACATGTTATGTATACTTCTGGAAAAAATTGAGCGGTGGACCTAGT TGTCGCCTTCTATTTGTTCTTCTCAAGTGGGTGCAAGGTCCTTCTGGAACTTGTTCAATCACTTGTCAAATAACG AAACCCGGCGCAAACCGCGGCCAAGGAAAATCTTGGAATAAATGCATGCCTACACCCATTCGTGGGCTGTGGCG CTCGCATATTTTCGTAAACTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGAA ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAAGCCATTA	<i>A. uva-ursi</i> (3)

GGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCCCGTCACCCACCAGCCTTGTCTTCCATGGGCACATGAATG CGTGGGTGGATATTGGCCTCCCGTGCACGTTTCGTGCTTGGTTGGTCTAAAAACGCAGTCCCCGACGACGGACATC ACAACTAGTGGTGGTTGTTTAACTGTTGCGTAATGTTGTGTATGCCATTGTTGTTGTGGGGTTGTTGCTCCTTTGAC CCAAAAGTAACATACAAATGTTACCTTGATTGCGACCCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTT	
GANCAATTGTCGANGCCATGCAGAAAGACCCGCGAACATGTTATGTATACTTCTGGAAAAAATTGAGCGGTGGACC TAGTTGTCGCCTTCTATTTGTTTCCTTCTCAAGTGGGTGCAAGGTCCTTCTGGAAACTTGTTCACTTGTCAAAT AACGAAACCCGGCGCAAACCGCGCCAAGGAAAATCTTGGAATAAATGCATGCCTACACCCATTTCGTGGGCTGT GGCGCTCGCATATTTTCGTAAACTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAN CGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAAGC CATAGGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCCCGTCACCCACCAGCCTTGTCTTCCATGGGCACAT GAATGCGTGGGTGGATATTGGCCTCCCGTGCACGTTTCGTGCTTGGTTGGTCTAAAAACGCANTCCCCGACGACGG ACATCACAACCTAGTGGTGGTTGTTTAACTGTTGCGTAATGTTGTGTATGCCATTGTTGTTGTGGGTGTTGCTCCTT TGACCCAAAAGTAACATACAAATGTTACCTTGATTGCGACCCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGC ATATCAATAAGCGNAGGAA	<i>A. uva-ursi</i> (4)



Рисунок 3.25 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа брусники (ув.×100)



Рисунок 3.26 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа брусники (ув.×100)

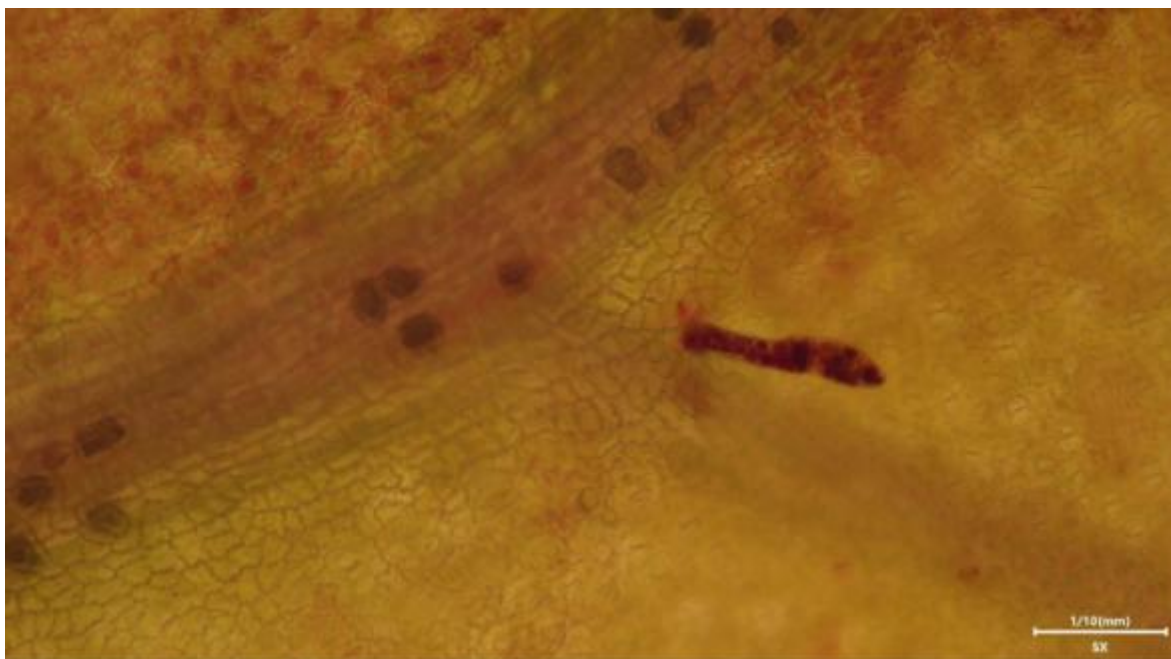


Рисунок 3.27 – Нижний эпидермис листа брусники обыкновенной в области жилки (ув.×100)

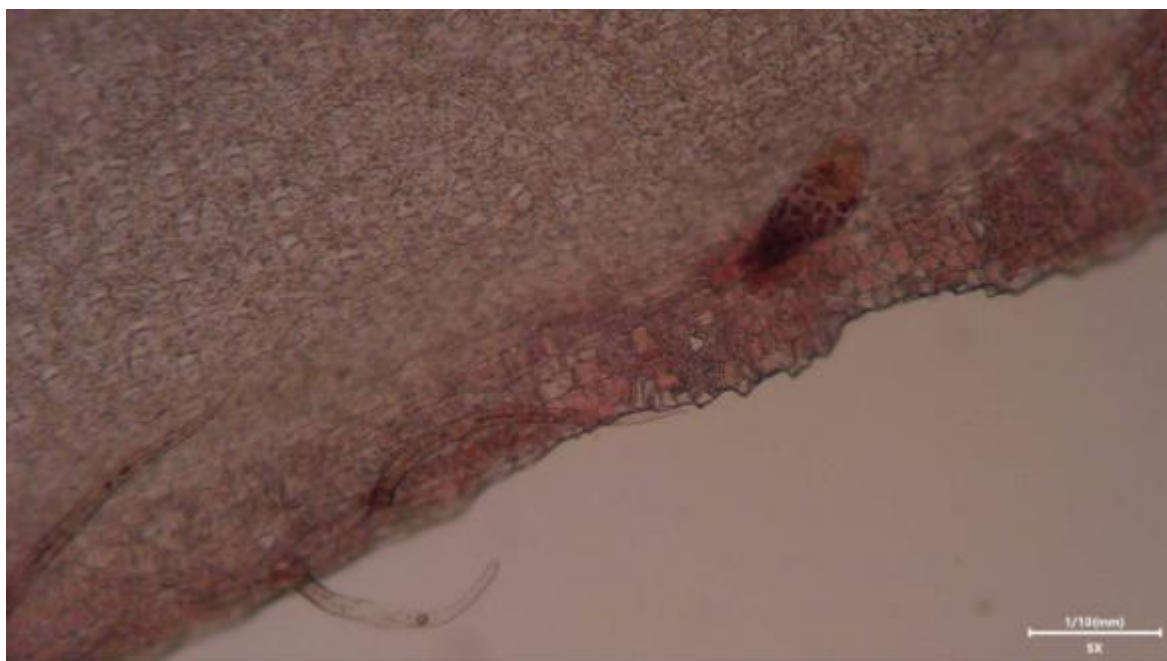


Рисунок 3.28 – Загнутый край листа брусники обыкновенной с верхней стороны (ув.×100)

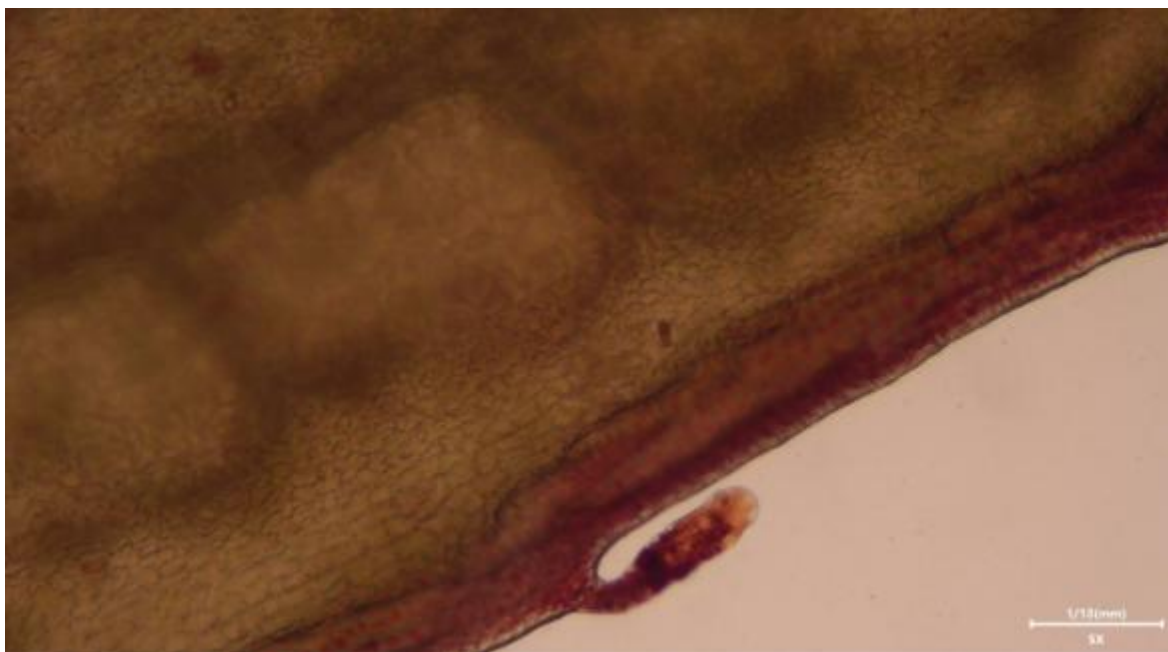


Рисунок 3.29 – Загнутый край листа брусники обыкновенной с нижней стороны (ув.×100)



Рисунок 3.30 – Поперечный срез загнутого края листа брусники обыкновенной (ув.×100)



Рисунок 3.31 – Поперечный срез листа брусники обыкновенной в области центральной жилки
(ув.×100)

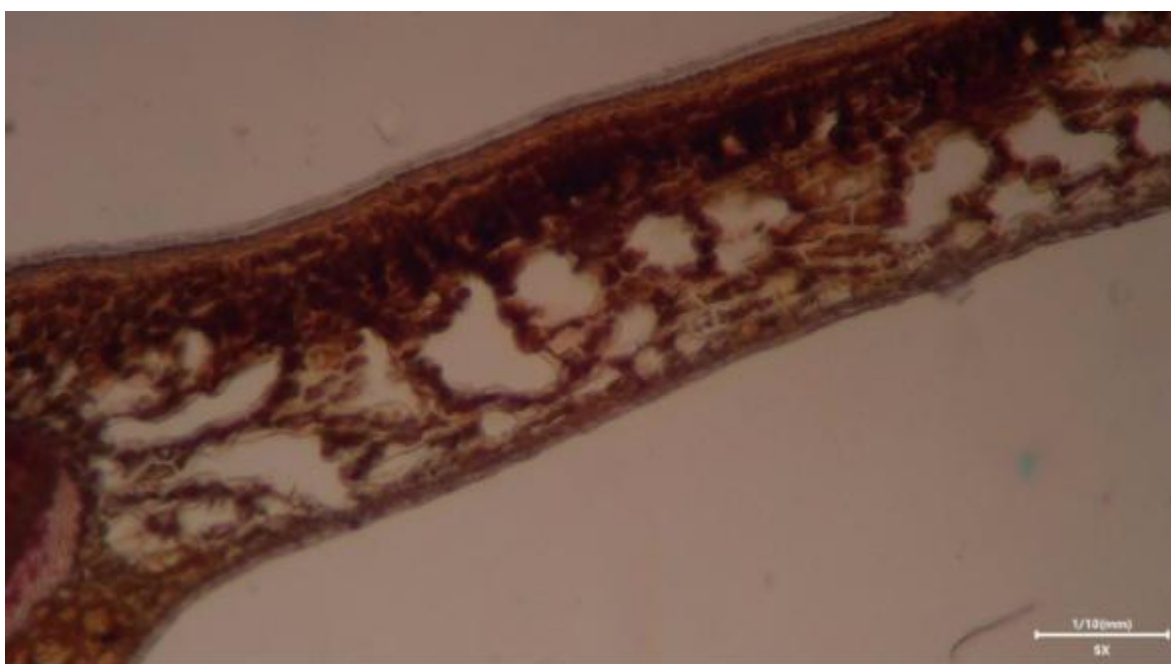


Рисунок 3.32 – Поперечный срез листа брусники обыкновенной в области между жилками
(ув.×100)

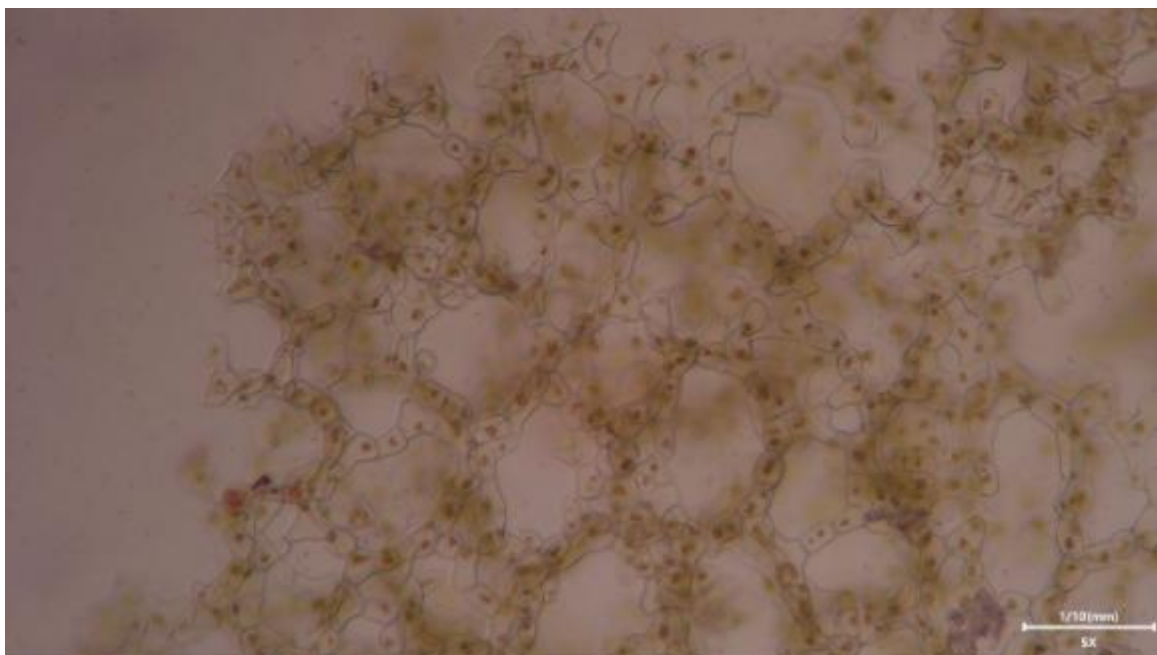


Рисунок 3.33 – Фрагмент мезофилла листа брусники обыкновенной с нижней стороны (ув.×400)



Рисунок 3.34 – Препарат с поверхности черешка листа брусники обыкновенной (ув.×100)



Рисунок 3.35 – Поперечный срез черешка листа брусники обыкновенной (ув.×100)

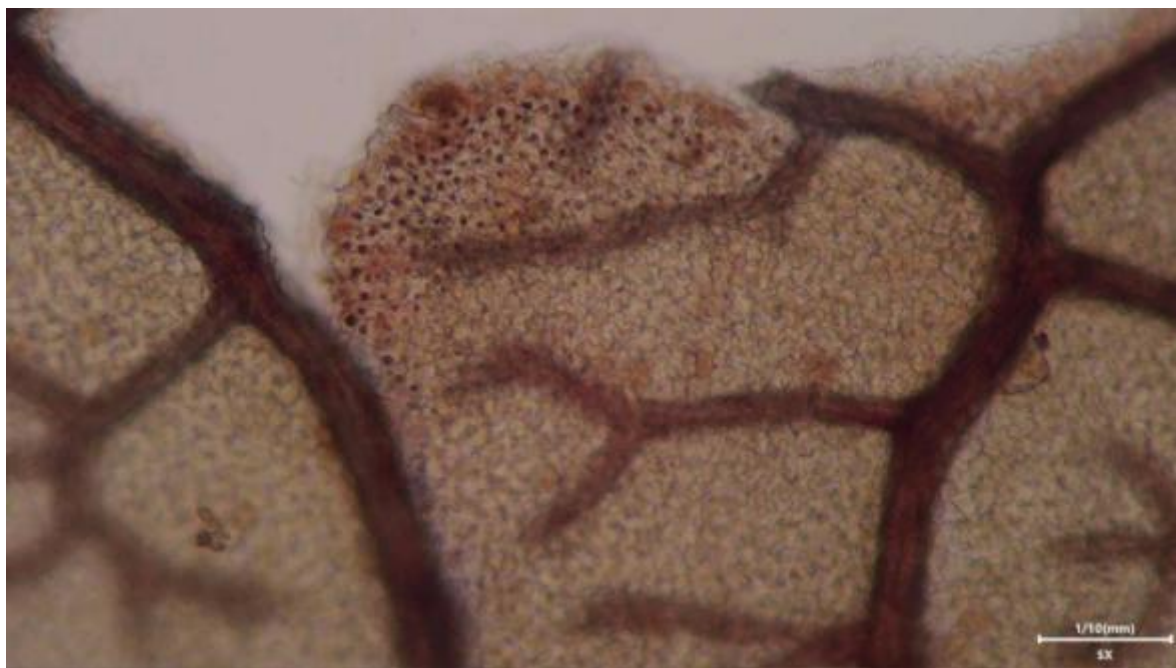


Рисунок 3.36 – Верхний эпидермис листа черники обыкновенной (ув.×40)



Рисунок 3.37 – Верхний эпидермис листа черники обыкновенной в области крупной жилки
(ув.×40)

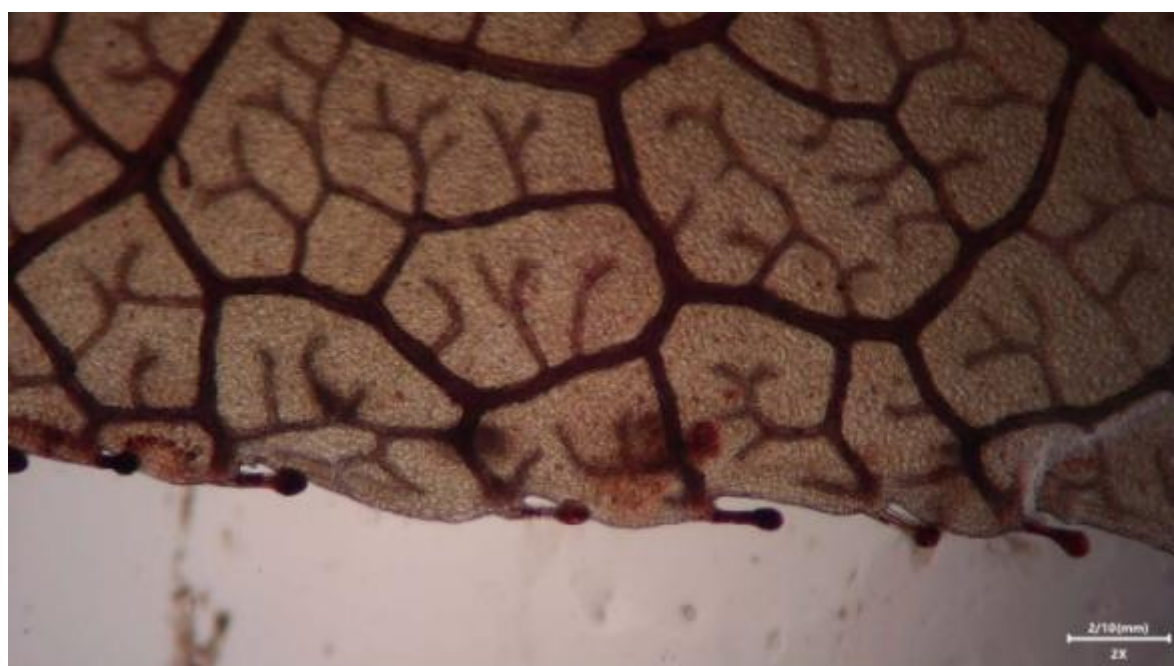


Рисунок 3.38 – Препарат с поверхности листа черники обыкновенной (ув.×40)

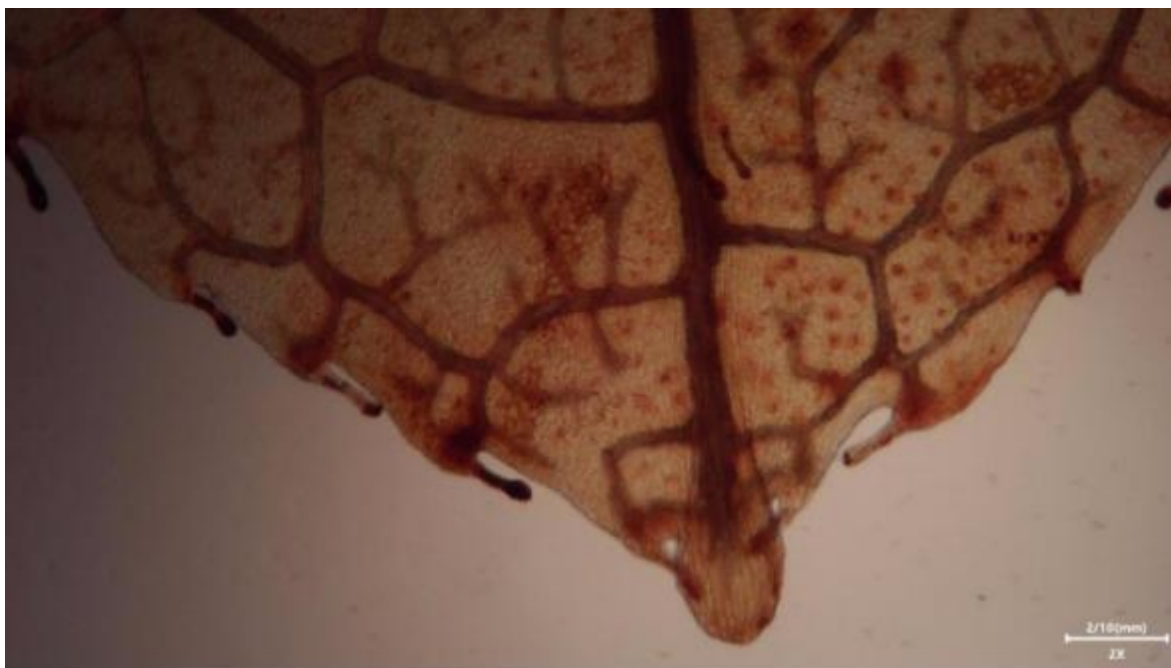


Рисунок 3.39 – Препарат с поверхности листа черники обыкновенной в области вершины листа
(ув.×100)

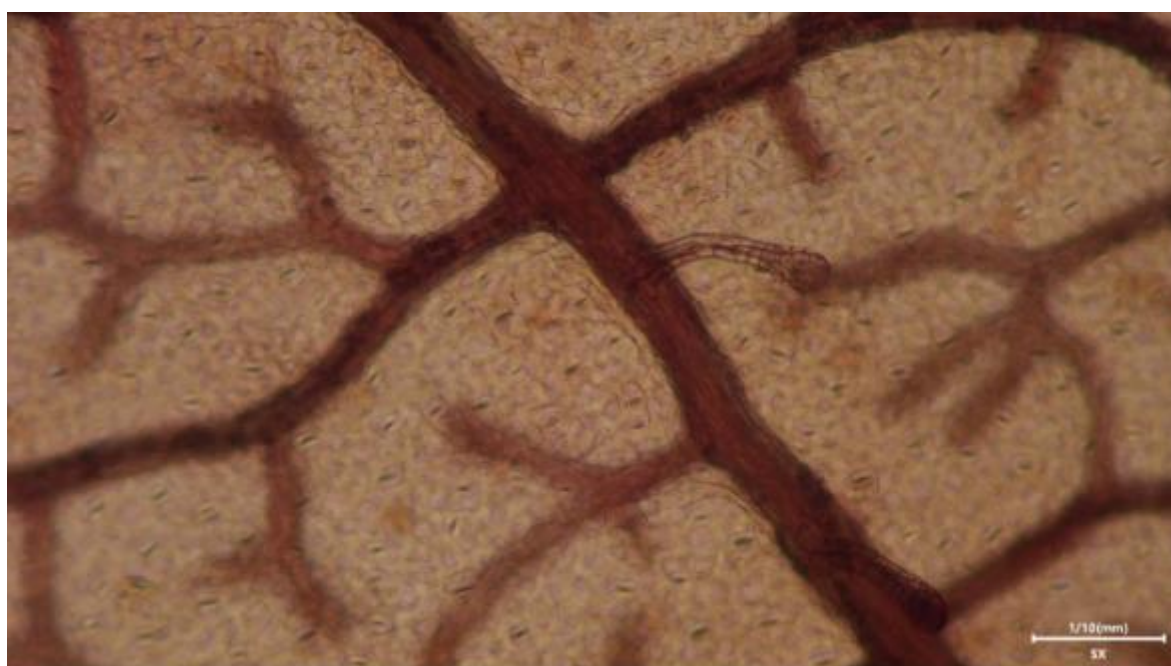


Рисунок 3.40 – Нижний эпидермис листа черники обыкновенной (ув.×100)

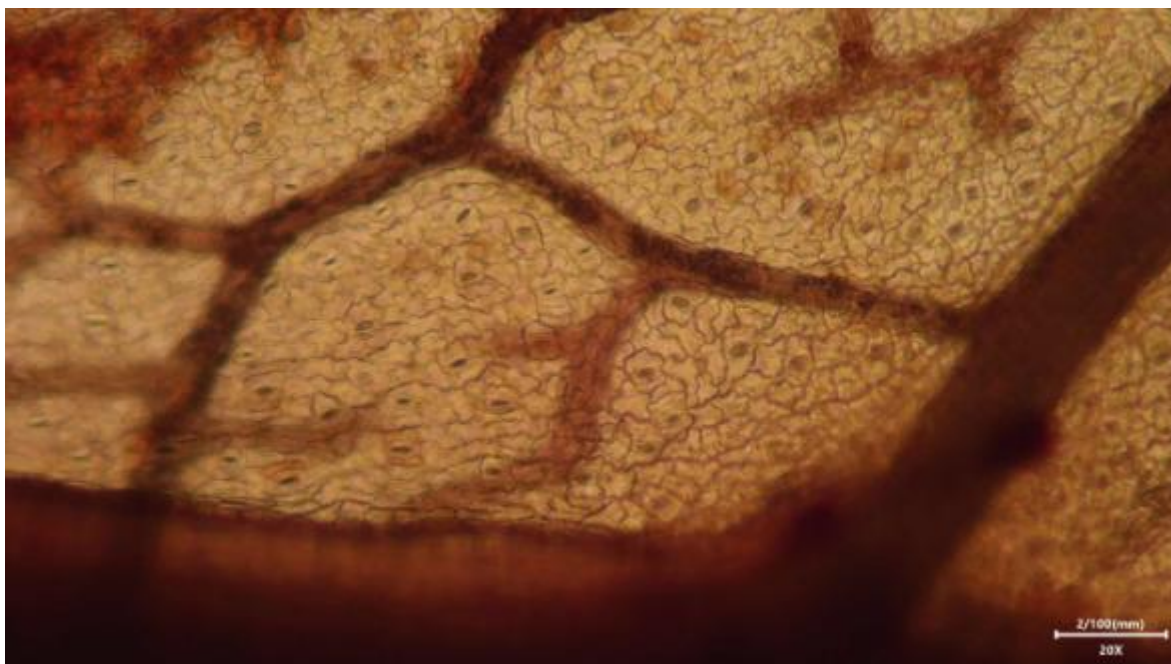


Рисунок 3.41 –Фрагмент нижнего эпидермиса листа черники обыкновенной (ув.×100)

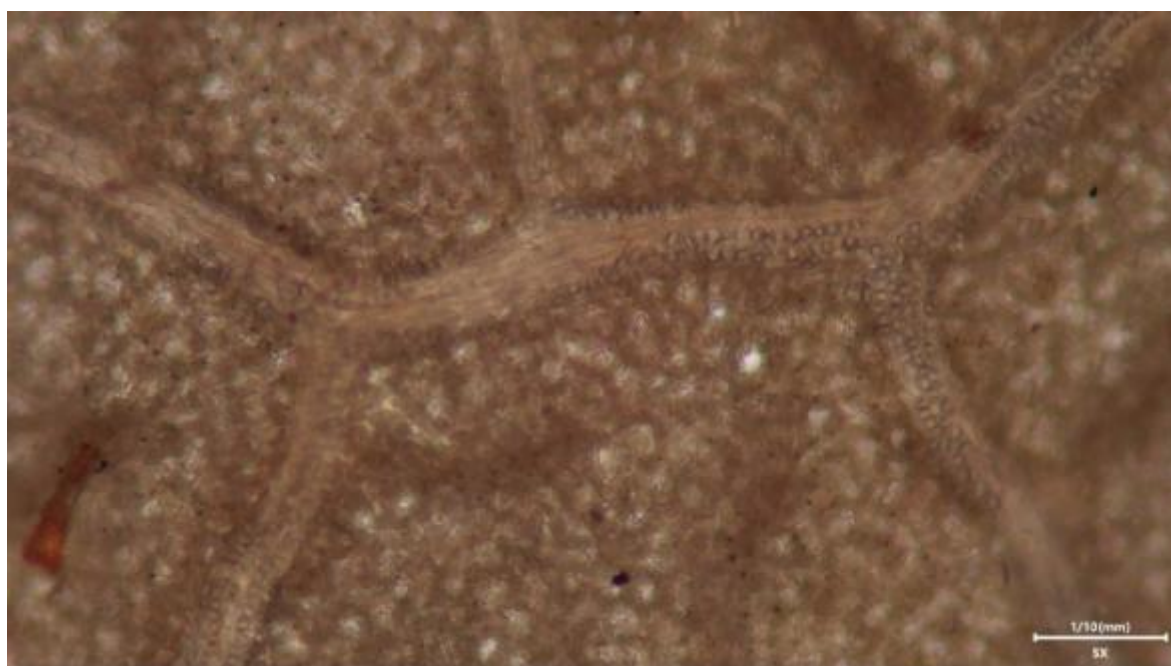


Рисунок 3.42 – Нижний эпидермис листа черники обыкновенной (ув.×40)



Рисунок 3.43 – Поперечный срез листа черники обыкновенной (ув.×100)

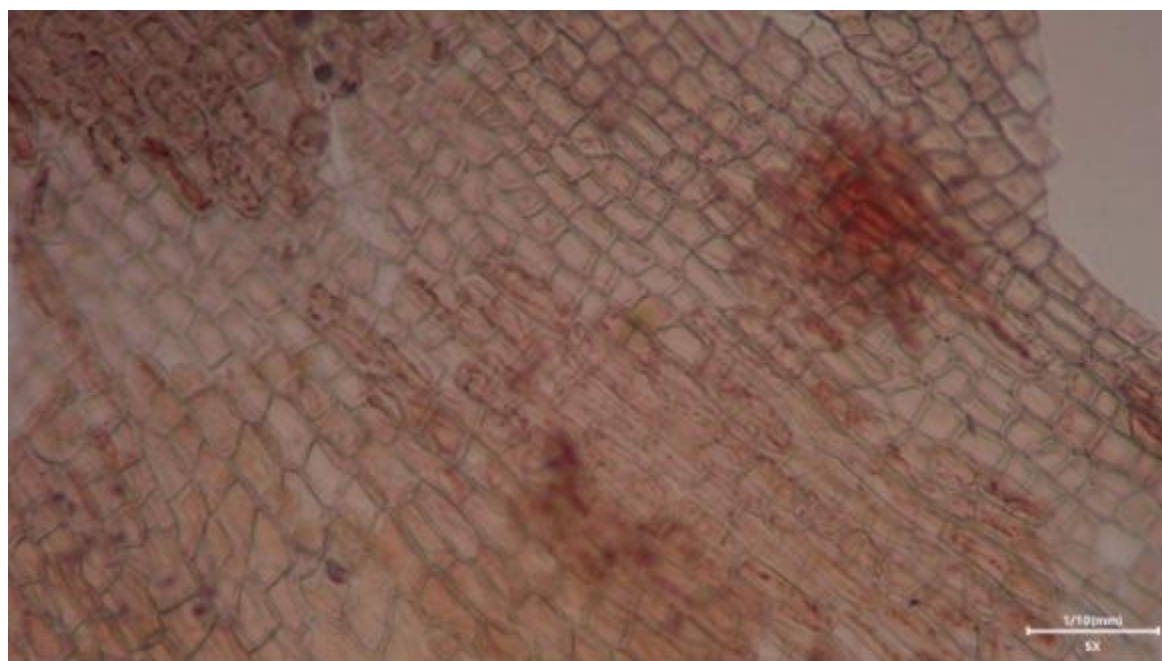


Рисунок 3.44 – Эпидермис черешка листа черники обыкновенной (ув.×400)



Рисунок 3.45 – Поперечный срез черешка листа черники обыкновенной (ув.×100)

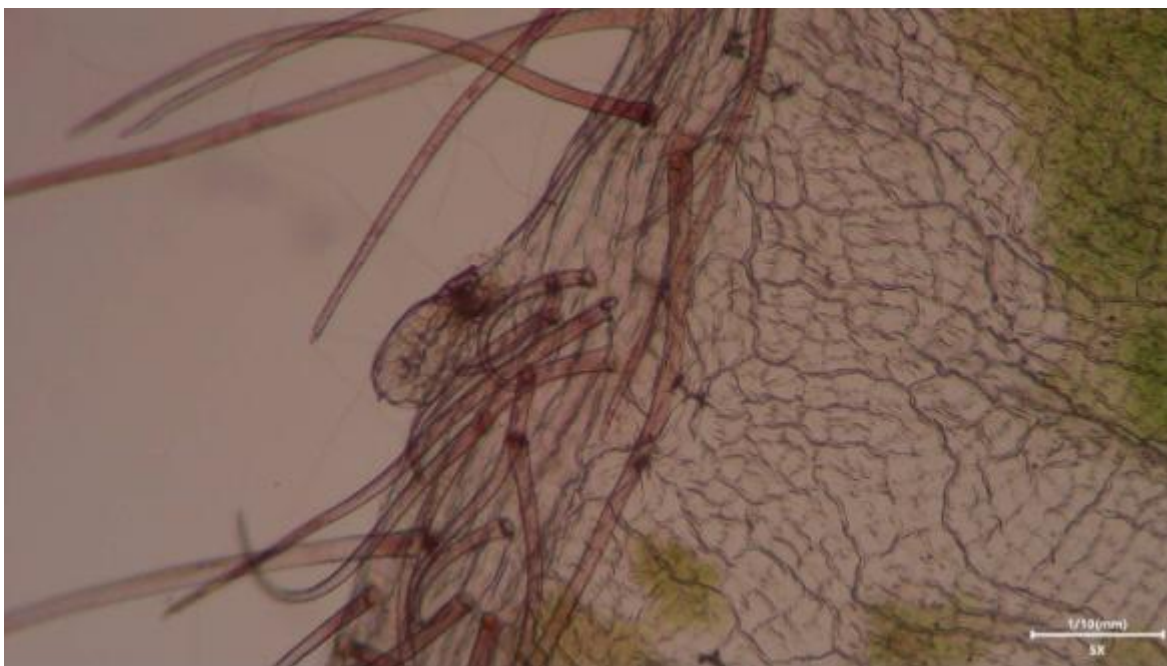


Рисунок 3.46 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа черники кавказской (ув.×400)

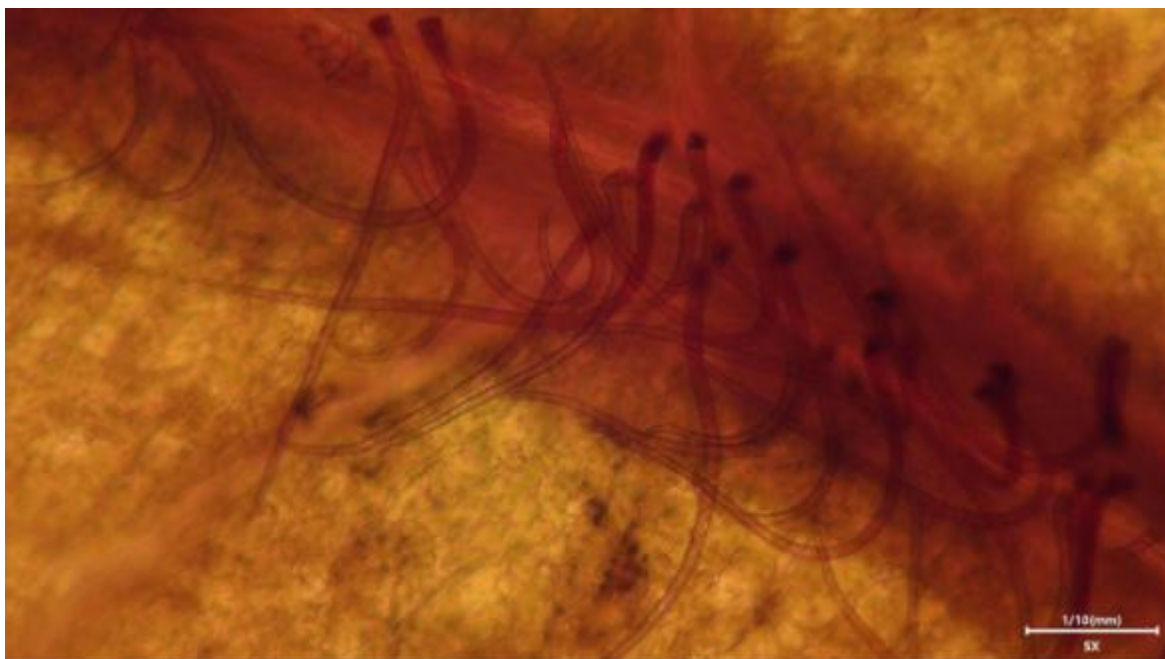


Рисунок 3.47 – Лист черники кавказской с верхней поверхности в области жилки (ув.×100)

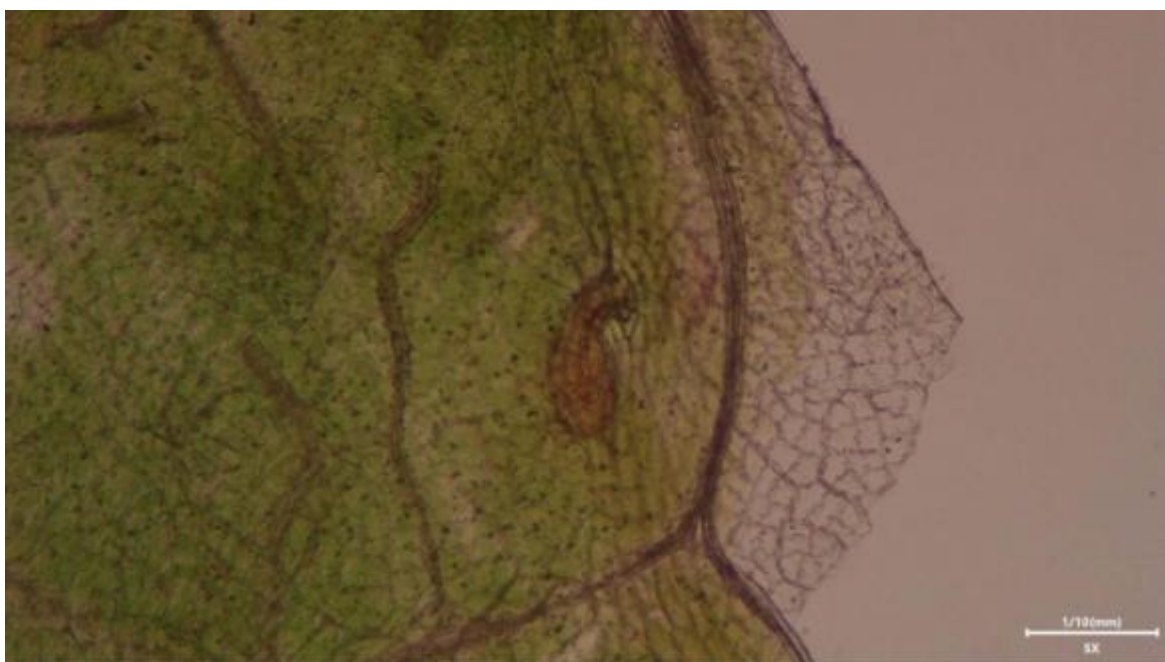


Рисунок 3.48 – Препарат с поверхности листа черники кавказской (ув.×100)



Рисунок 3.49 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа черники кавказской (ув.×100)



Рисунок 3.50 – Поперечный срез листа черники кавказской (ув.×400)



Рисунок 3.51 – Фрагмент эпидермиса черешка листа черники кавказской (ув.×100)

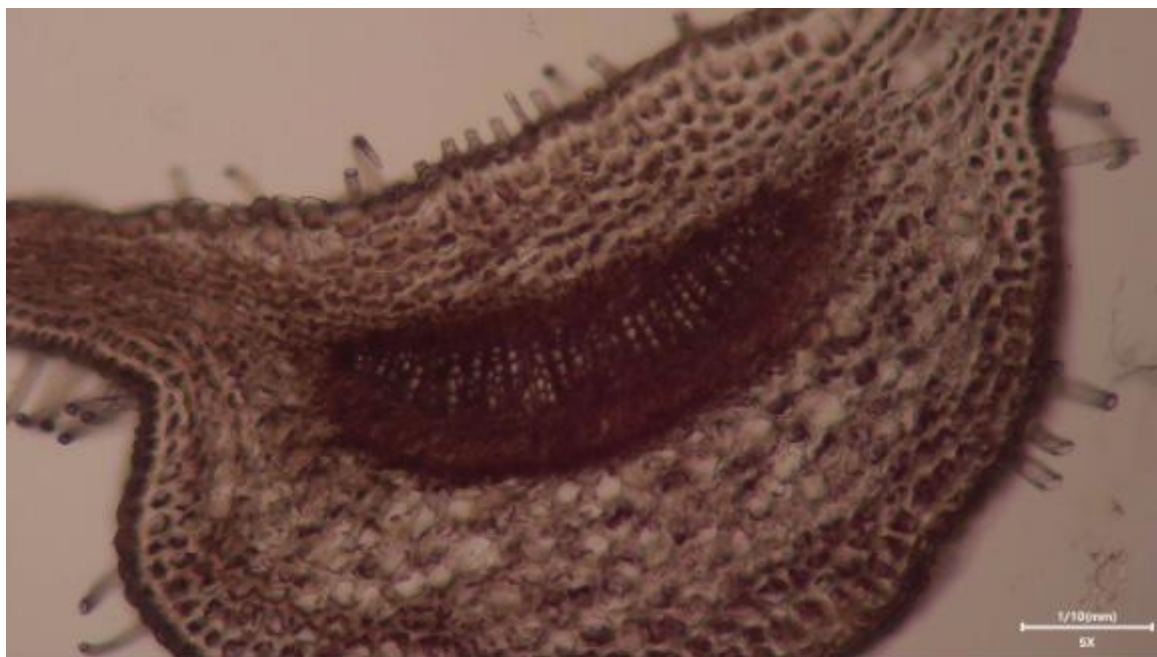


Рисунок 3.52 – Поперечный срез черешка листа черники кавказской (ув.×400)

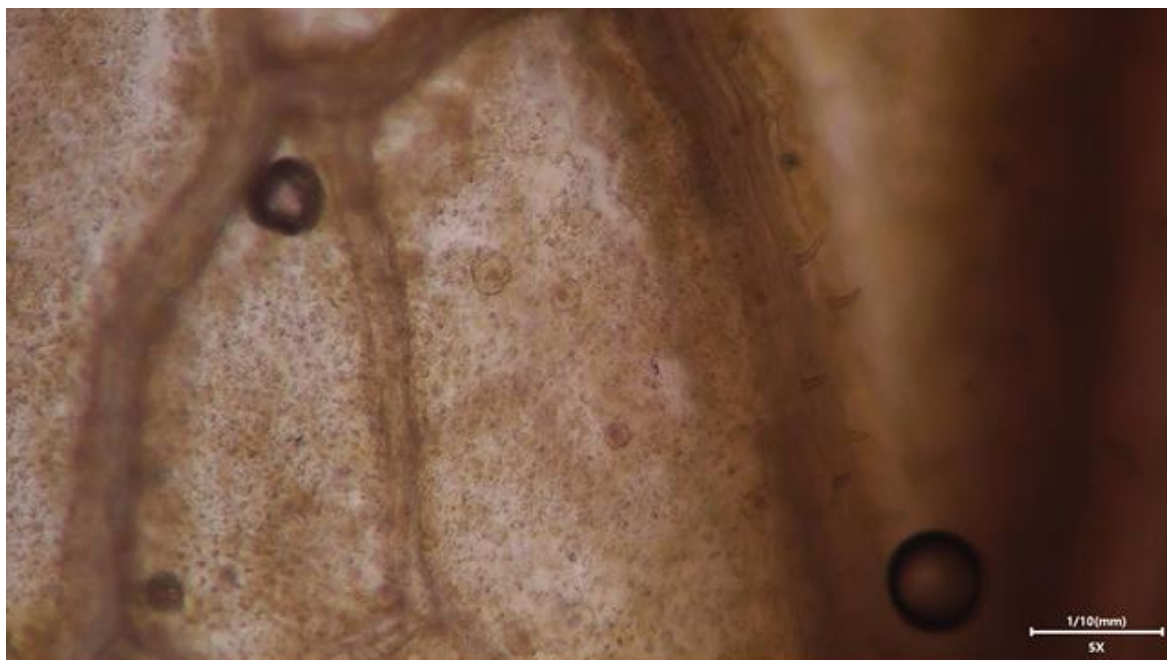


Рисунок 3.53 – Препарат с верхней поверхности листа голубики обыкновенной (ув.×40)

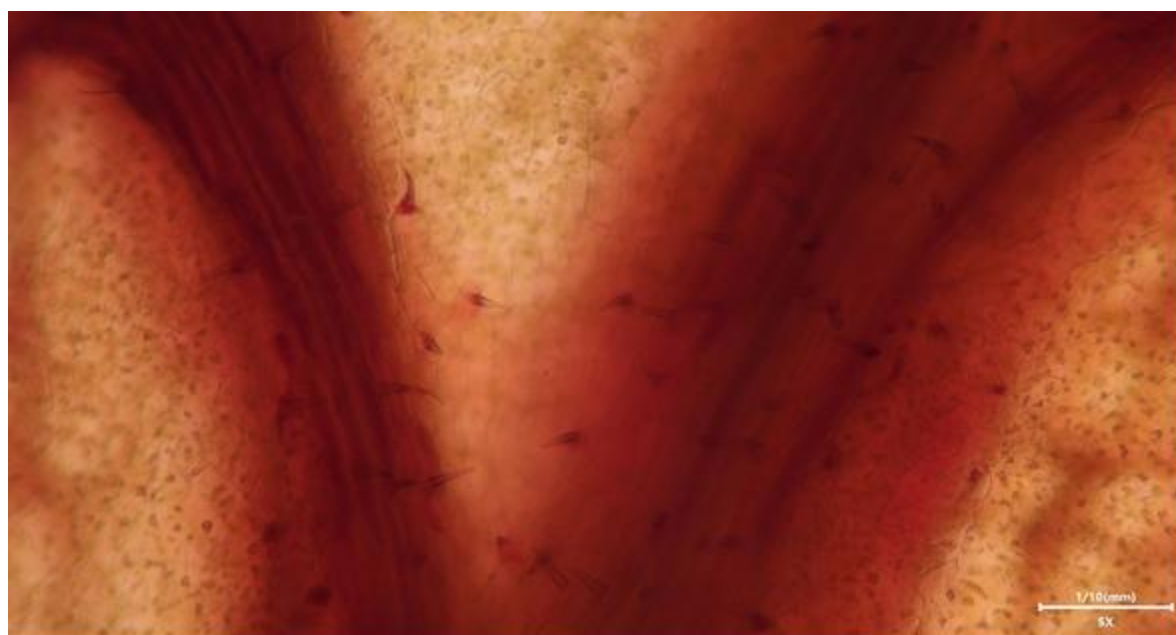


Рисунок 3.54 – Особенности опушения адаксиальной поверхности листа голубики обыкновенной (ув.×40)

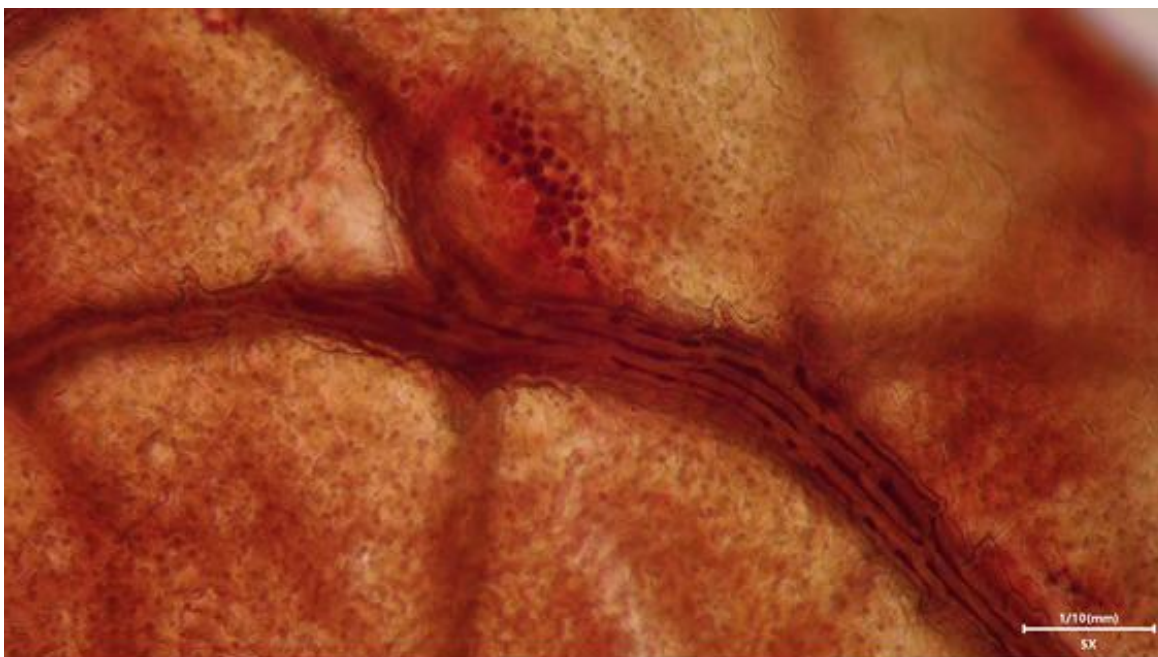


Рисунок 3.55 – Верхний эпидермис листа голубики обыкновенной (ув.×40)

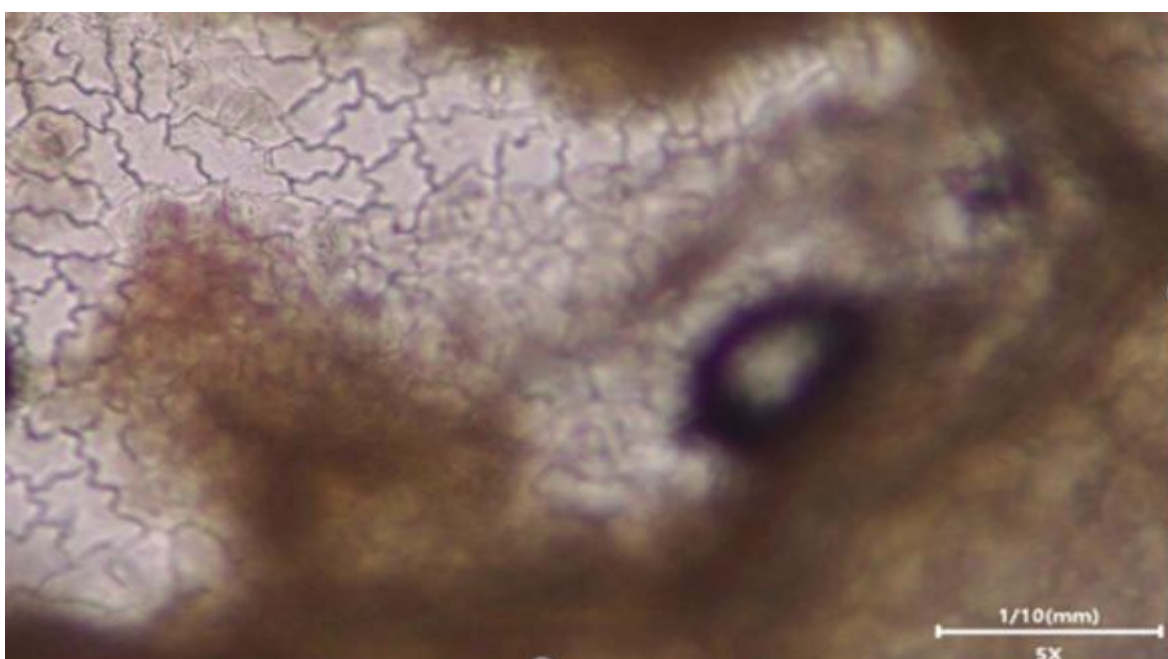


Рисунок 3.56 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа голубики обыкновенной (ув.×100)



Рисунок 3.57 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа голубики обыкновенной (ув.×400)

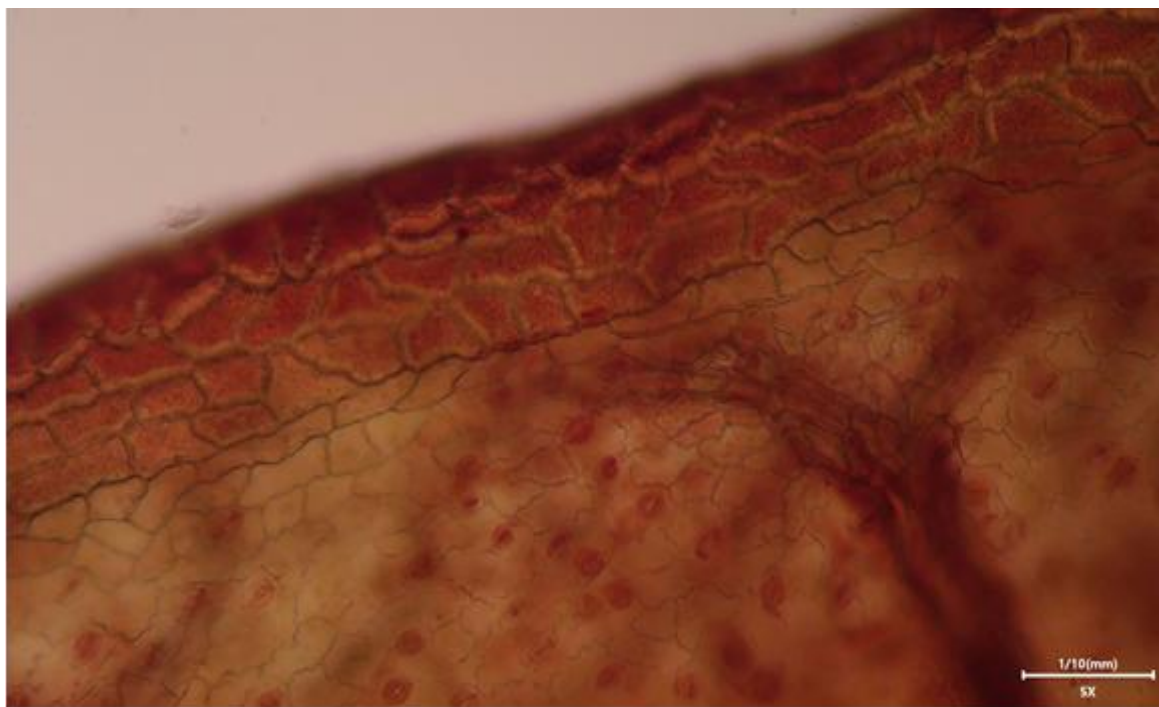


Рисунок 3.58 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа голубики обыкновенной в области края листовой пластинки (ув.×100)

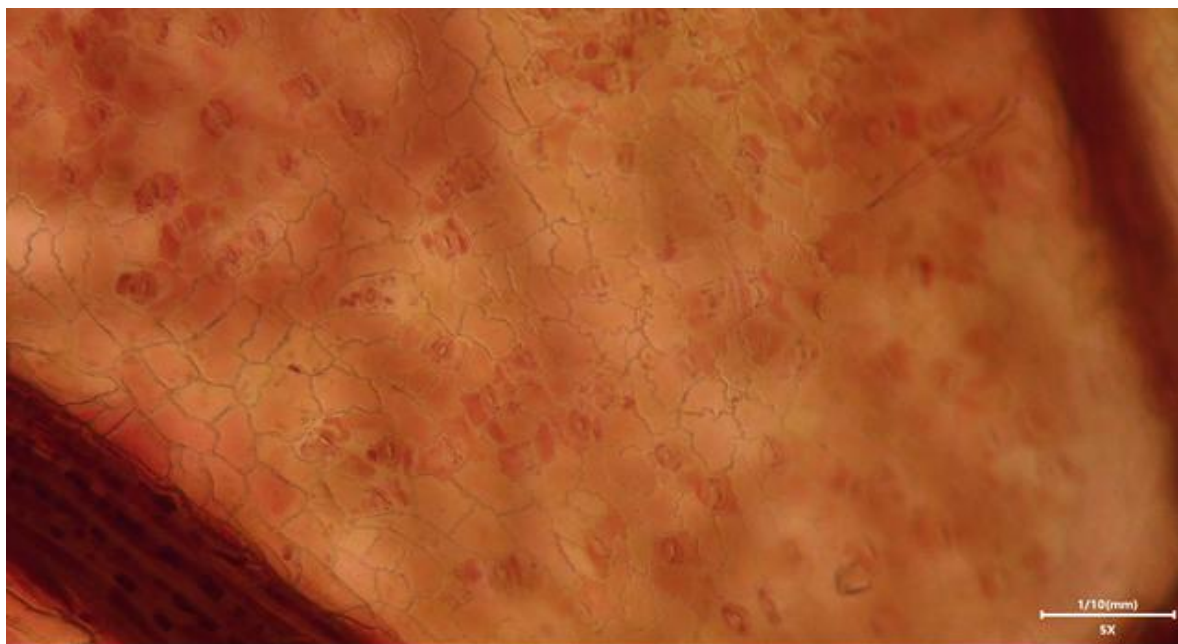


Рисунок 3.59 – Фрагмент нижнего эпидермис листа голубики обыкновенной (ув.×100)



Рисунок 3.60 – Фрагмент нижнего эпидермис листа голубики обыкновенной (ув.×100)

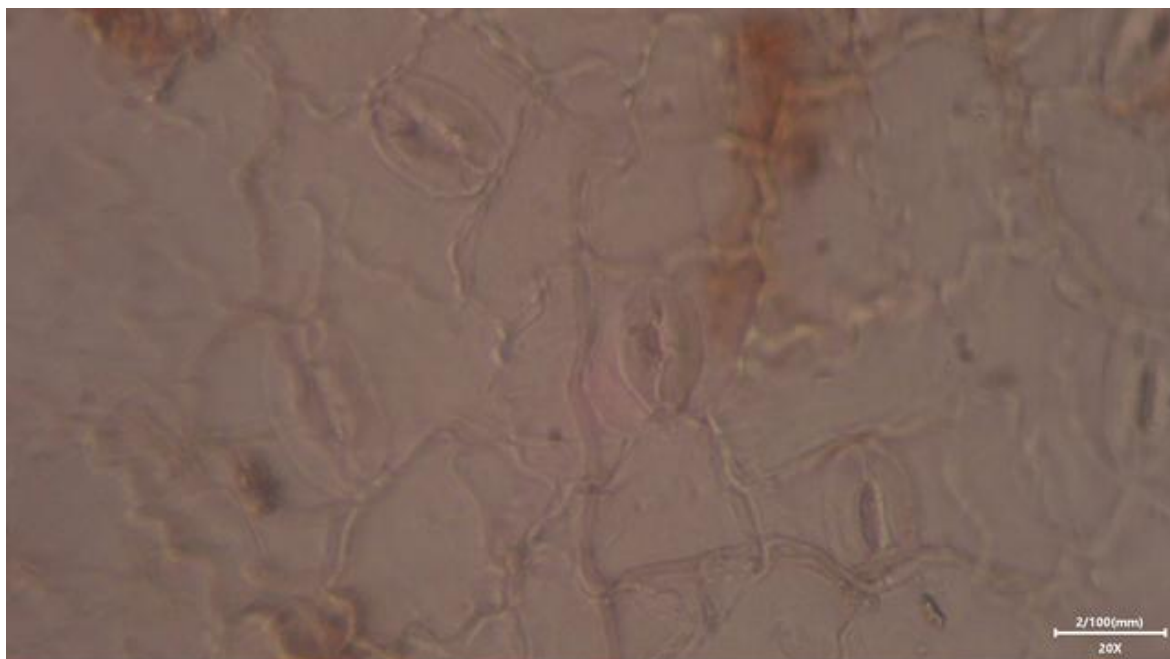


Рисунок 3.61 – Фрагмент нижнего эпидермис листа голубики обыкновенной (ув.×400)



Рисунок 3.62 – Поперечный срез листа голубики обыкновенной в области центральной жилки (ув.×100)



Рисунок 3.63 – Поперечный срез листа голубики обыкновенной в области края листовой пластинки (ув.×100)

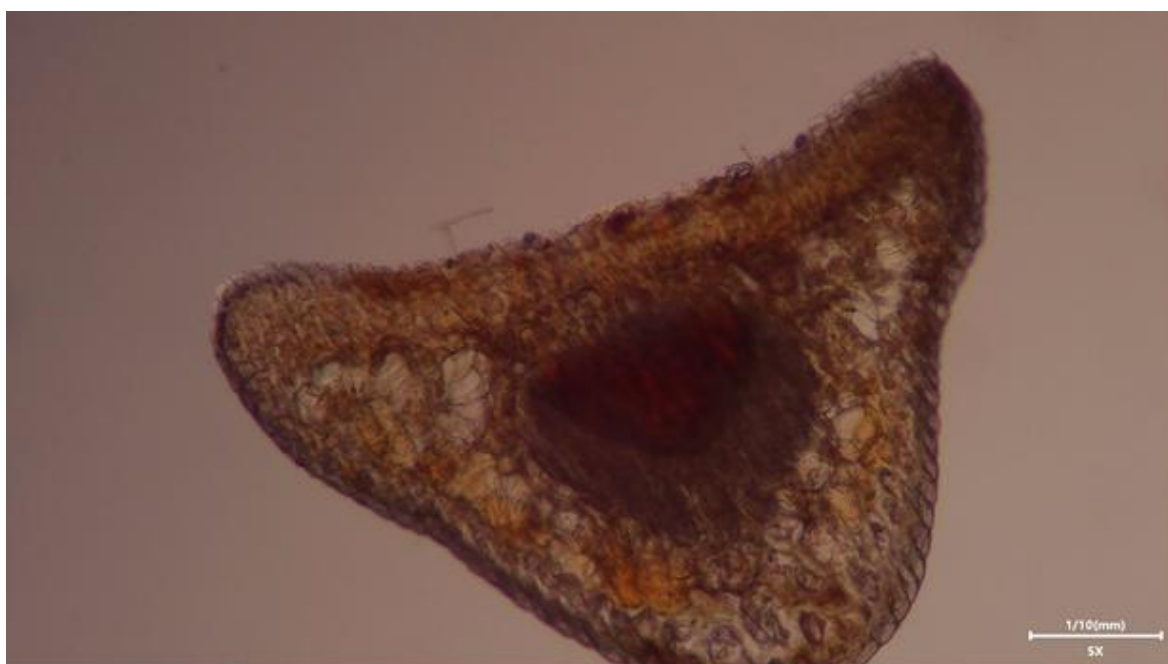


Рисунок 3.64 – Поперечный срез черешка листа голубики обыкновенной (ув.×100)

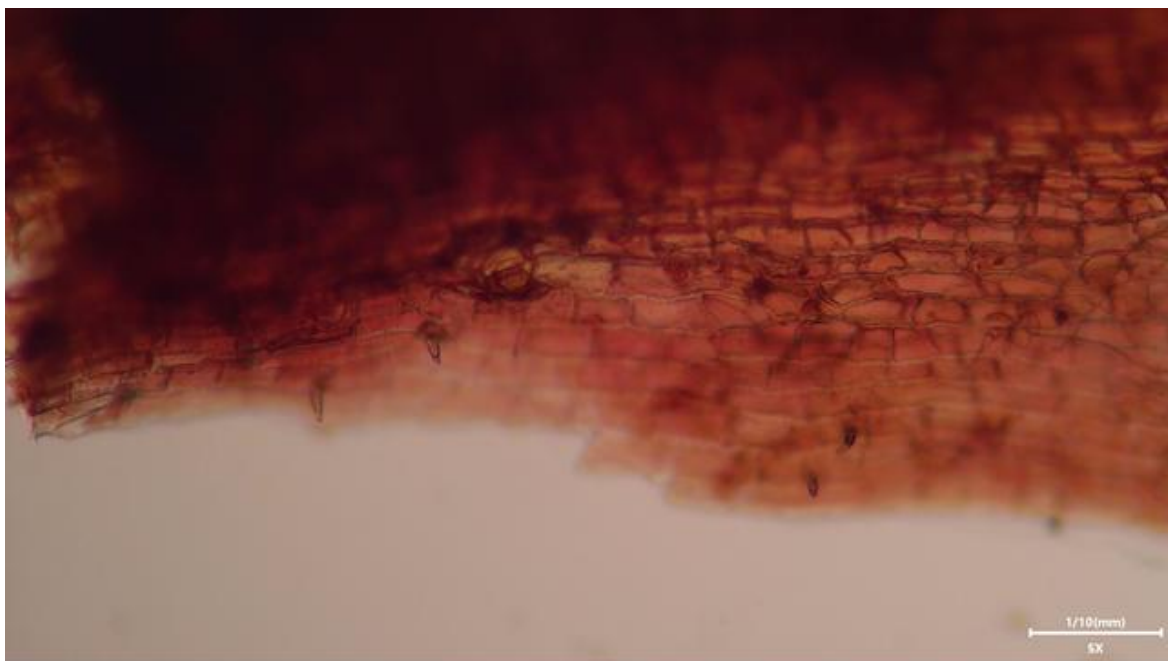


Рисунок 3.65 – Препарат с поверхности черешка листа голубики обыкновенной (ув.×100)

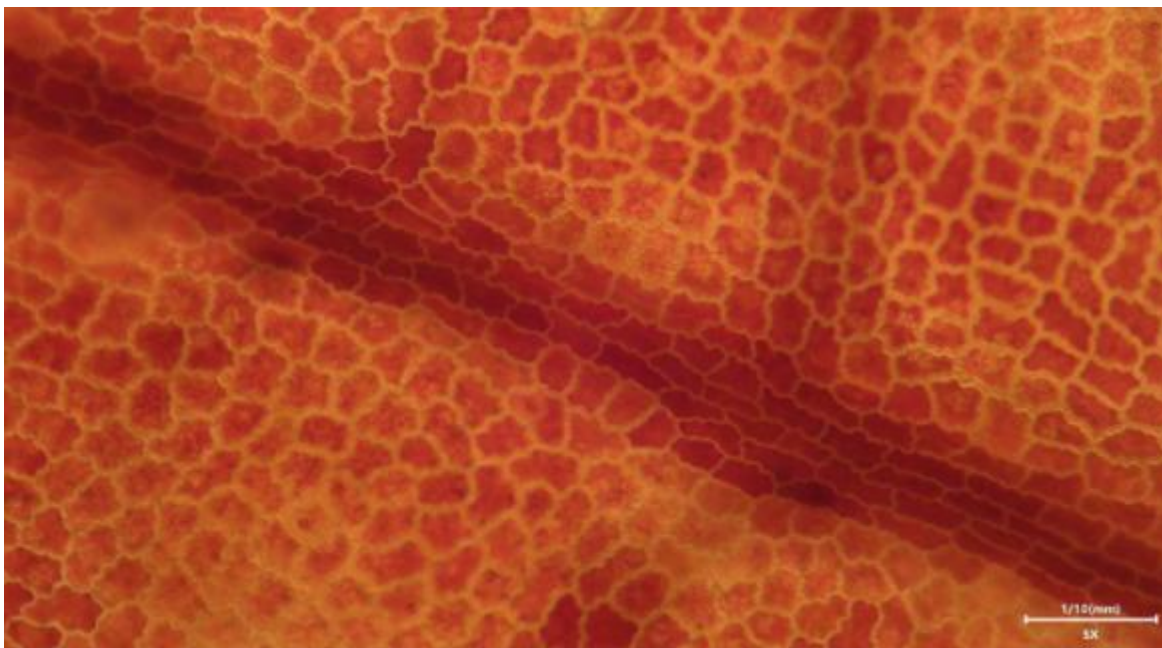


Рисунок 3.66 – Эпидермис верхней стороны листа клюквы болотной в центральной части листовой пластинки (ув.×400)



Рисунок 3.67 – Эпидермис верхней стороны листа клюквы болотной у края листовой пластинки
(ув.×100)

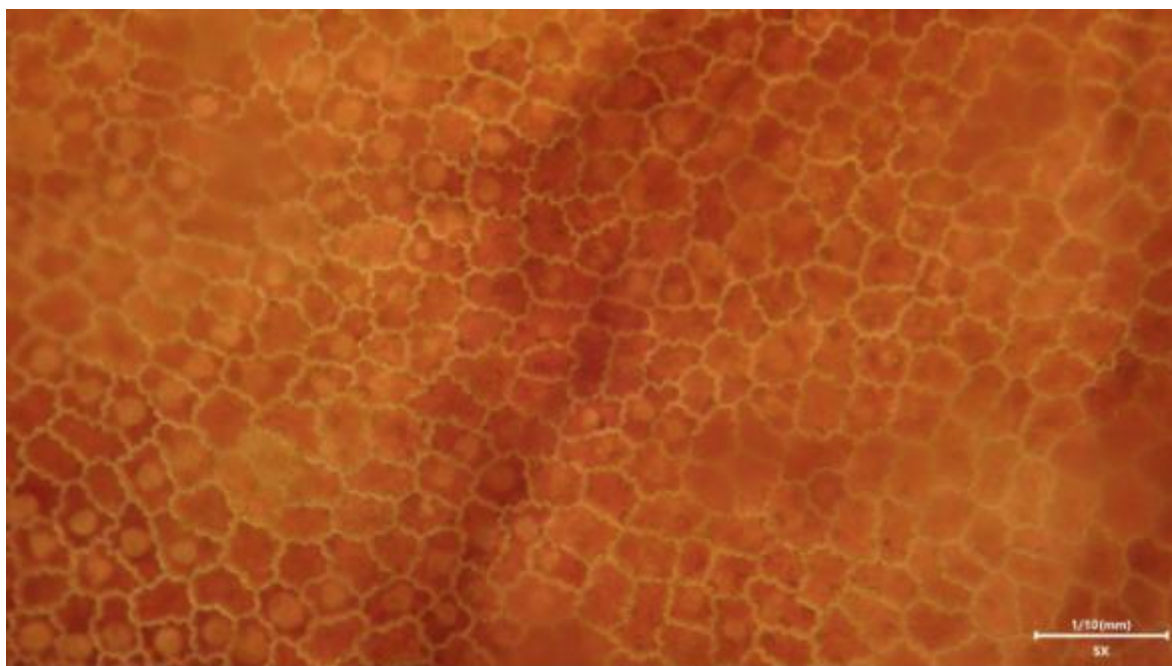


Рисунок 3.68 – Фрагменты эпидермиса верхней стороны листа клюквы болотной с
неравномерно окрашенным содержимым (ув.×100)

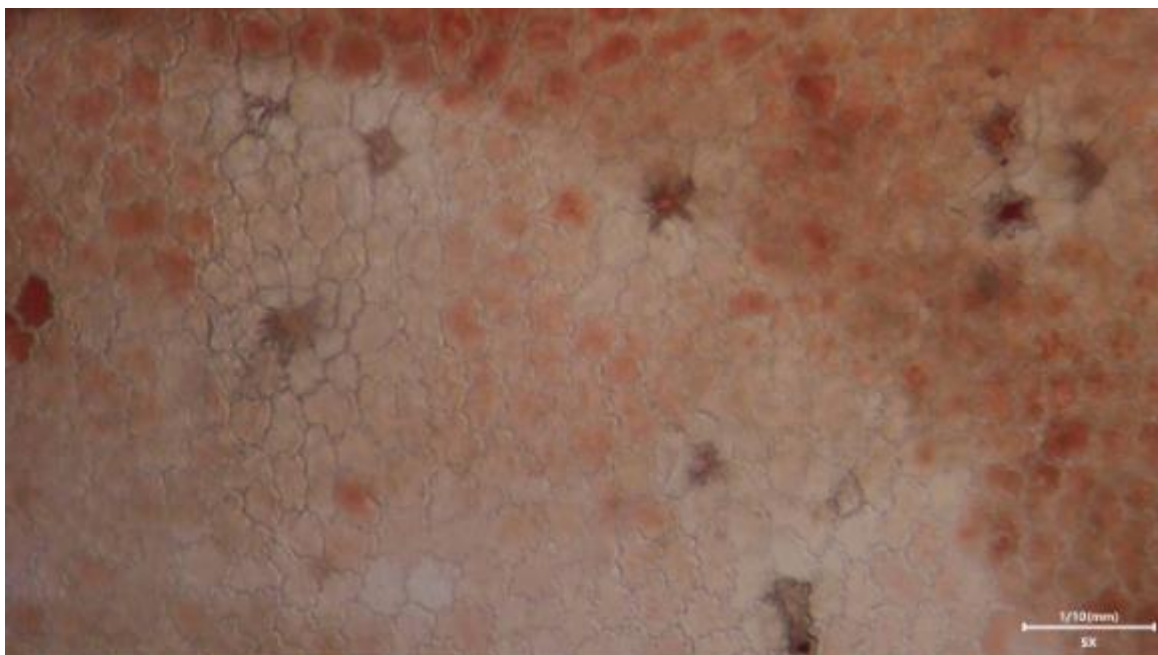


Рисунок 3.69 – Фрагменты эпидермиса верхней стороны листа клюквы болотной со склереидами(ув.×100)

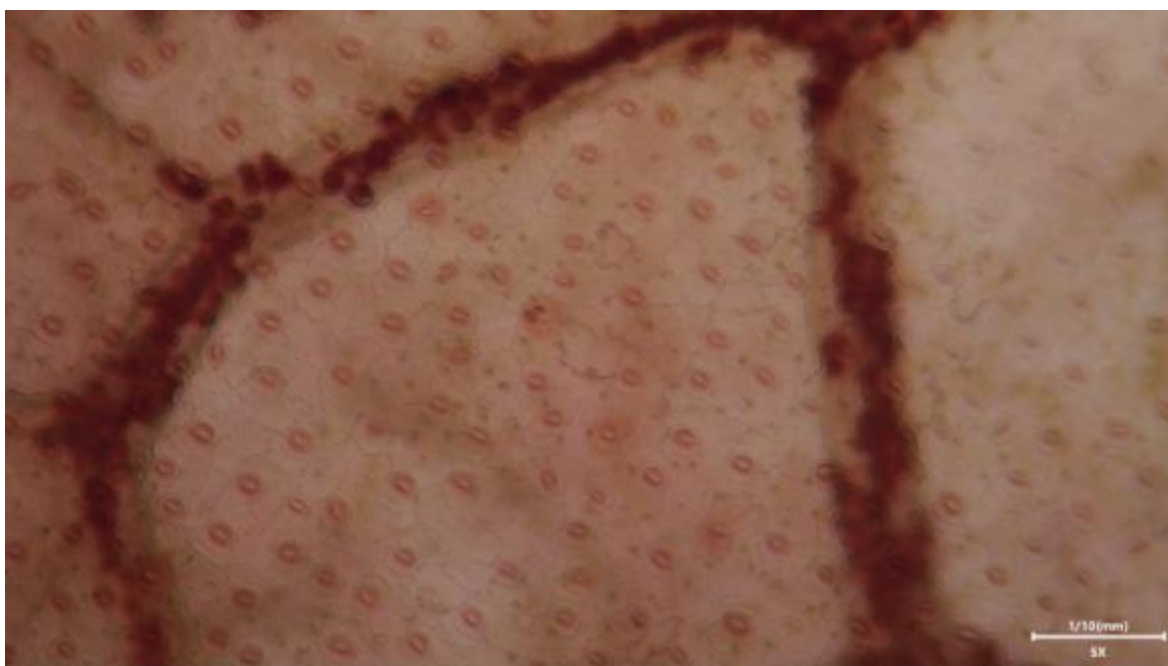


Рисунок 3.70 – Эпидермис нижней стороны листа клюквы болотной в центральной части листовой пластинки (ув.×100)

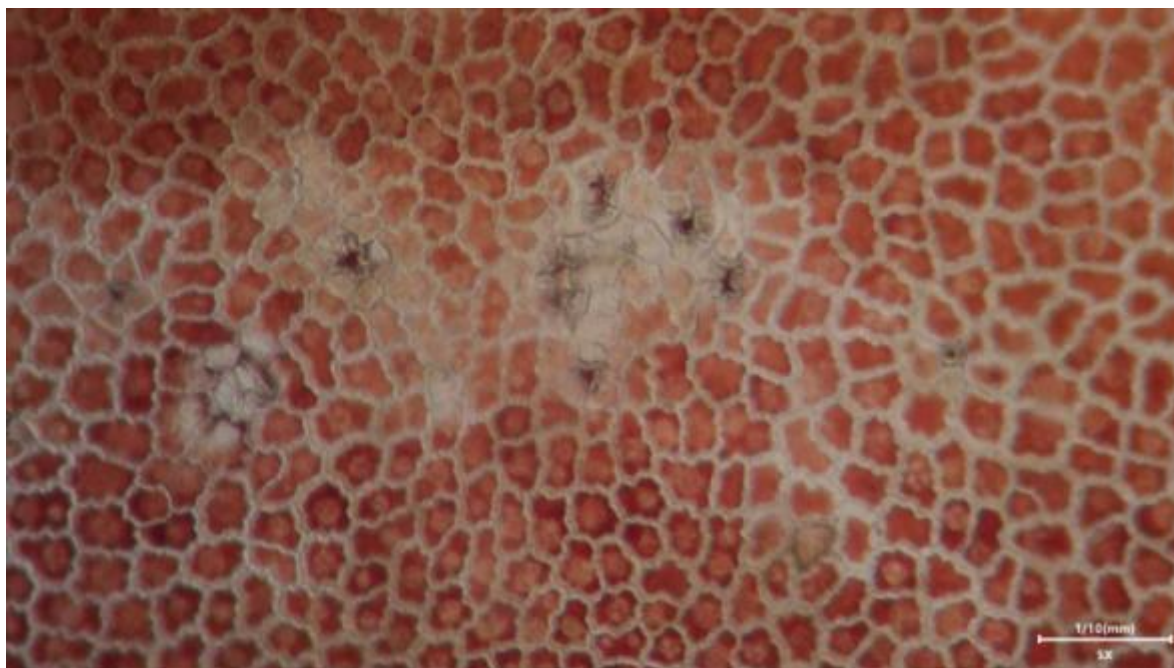


Рисунок 3.71 – Фрагменты эпидермиса нижней стороны листа клюквы болотной со склереидами (ув.×100)



Рисунок 3.72 – Нижний эпидермис листа клюквы болотной (ув.×100)

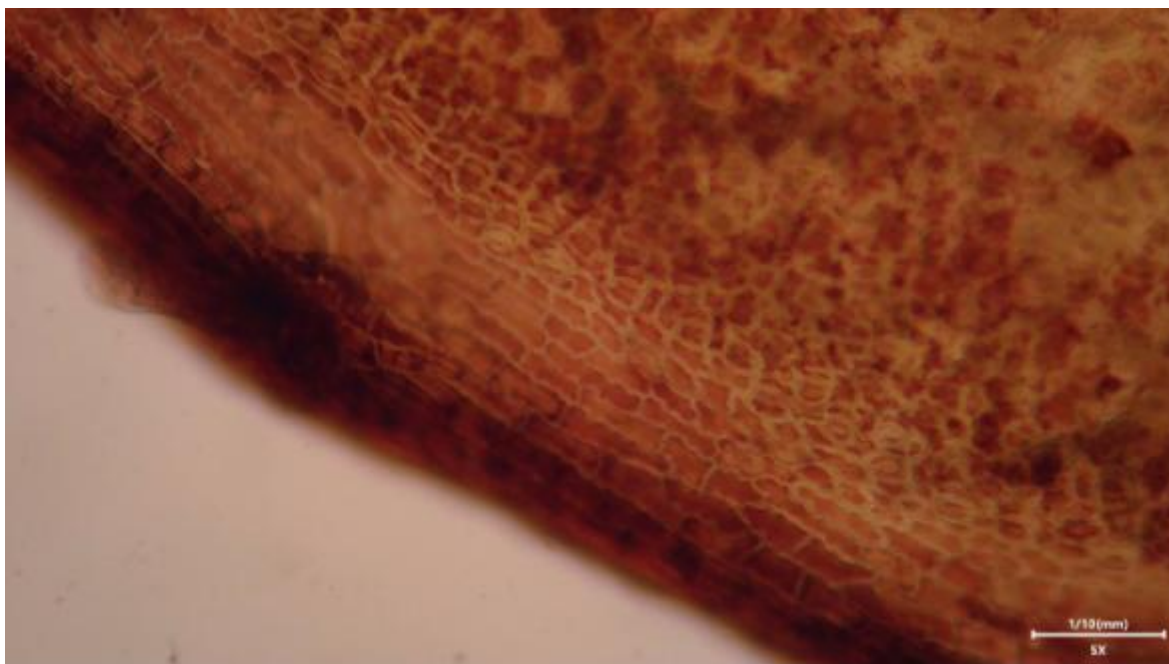


Рисунок 3.73 – Эпидермис нижней стороны листа клюквы болотной у края листовой пластинки (ув.×100)

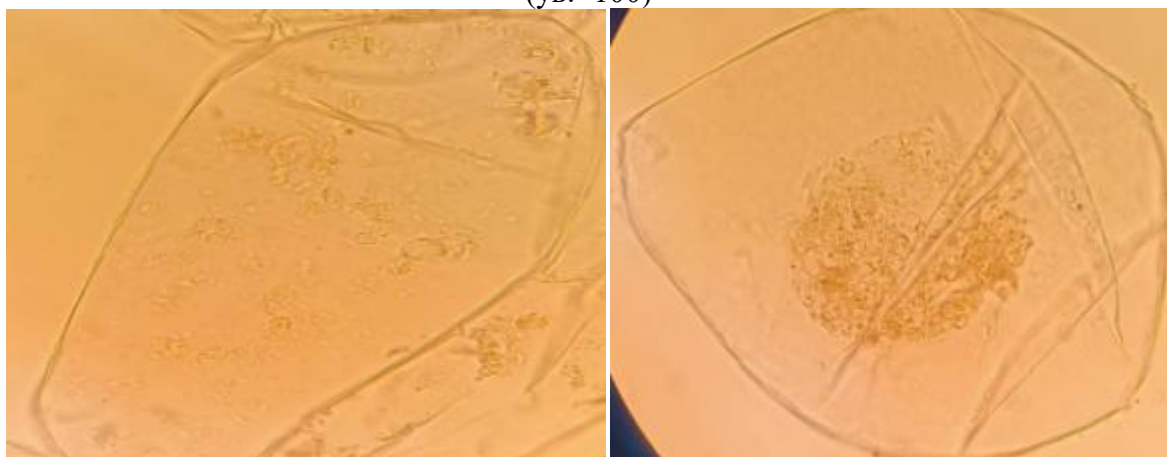


Рисунок 3.74 – Крупные клетки паренхима плодов клюквы болотной (ув.×1000)

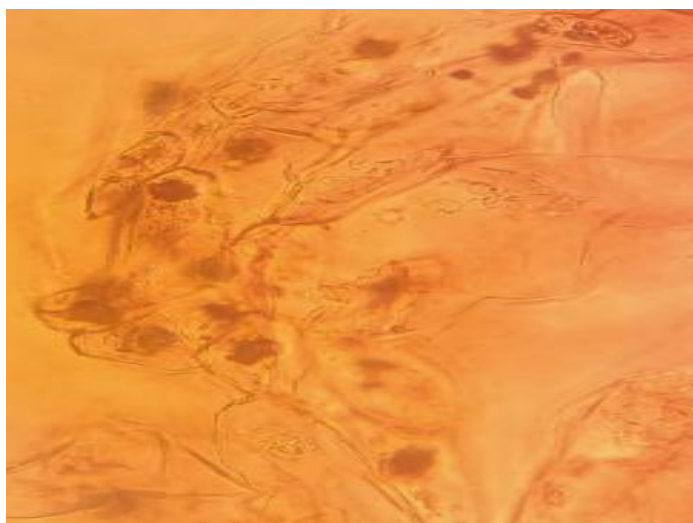


Рисунок 3.75 – Мелкие клетки паренхима плодов клюквы болотной (ув.×400)



Рисунок 3.76 – Фрагмент семенной кожуры клюквы болотной (ув.×100)

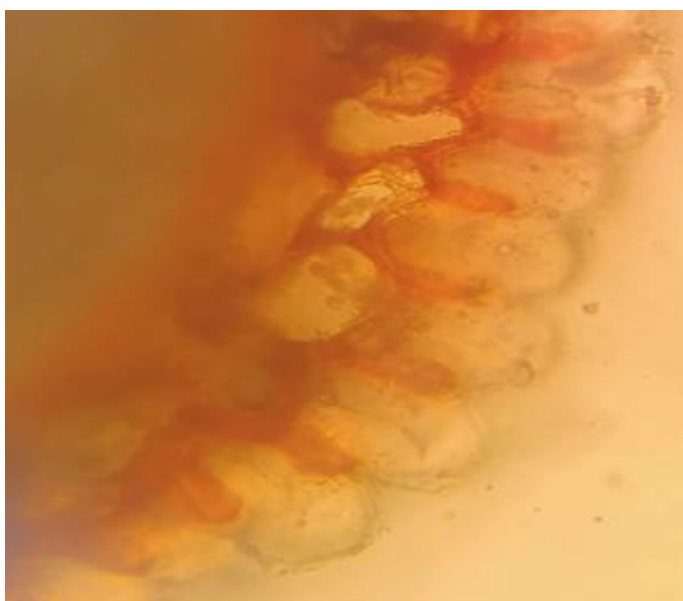


Рисунок 3.77 – Эпидермис семенной кожуры клюквы болотной (ув.×400)

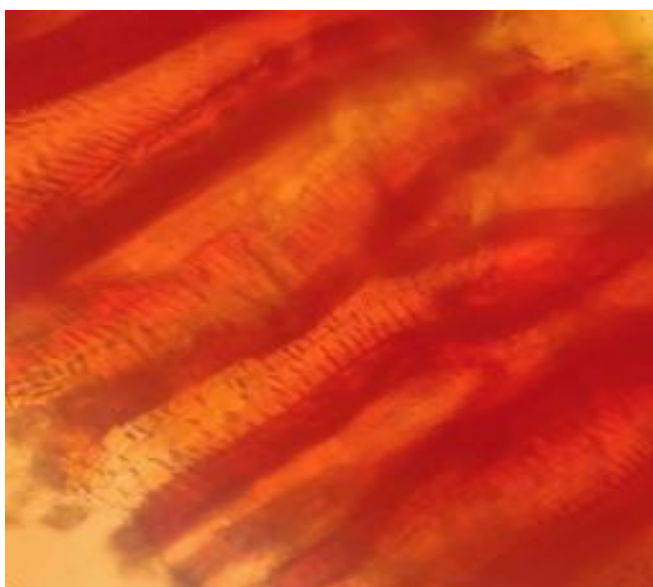


Рисунок 3.78 – Субэпидермальный слой семенной кожуры клюквы болотной (ув.×100)

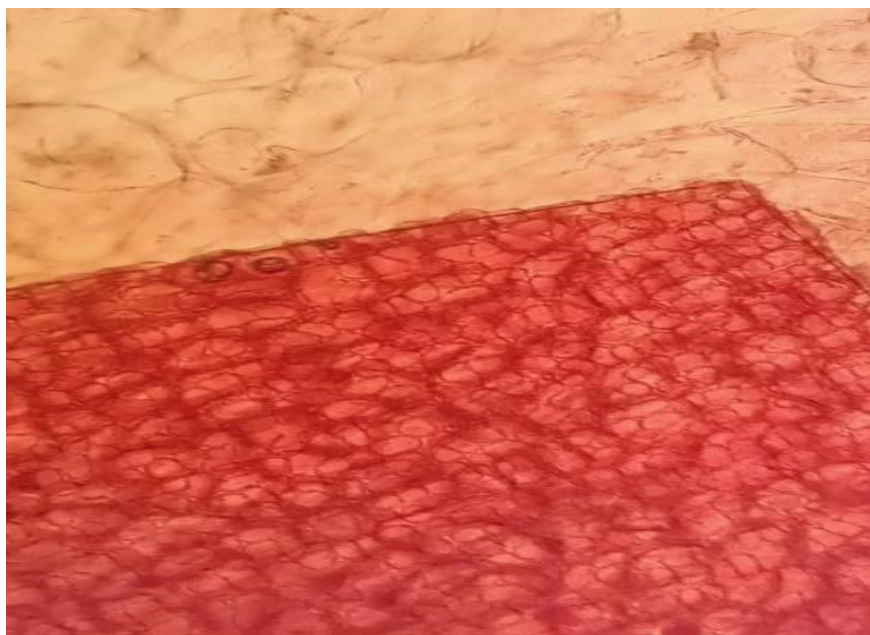


Рисунок 3.79 – Фрагменты кожуры плодов клюквы болотной (ув.×100)

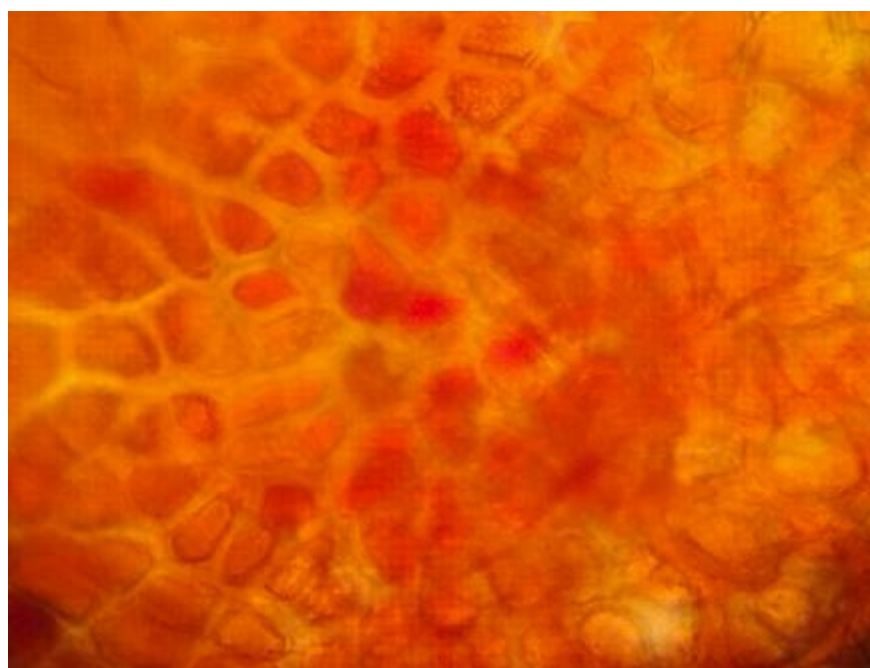


Рисунок 3.80 – Фрагмент кожуры плодов клюквы болотной (ув.×400)



Рисунок 3.81 – Поперечный срез верхней части стебля клюквы болотной (ув.×100)

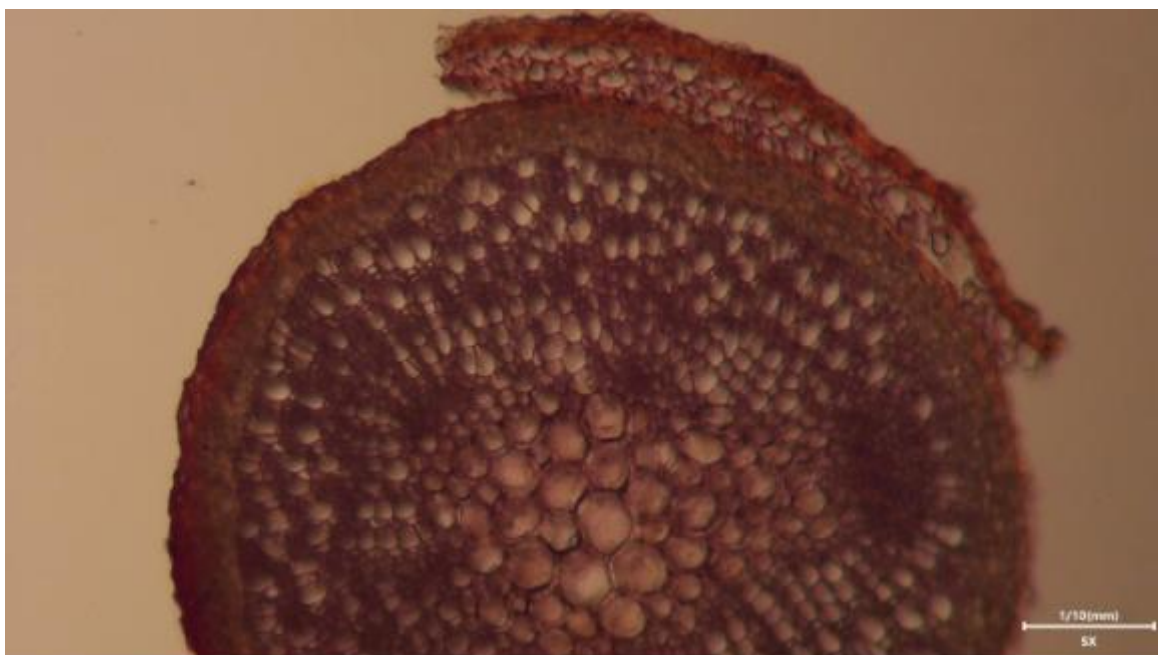


Рисунок 3.82 – Поперечный срез средней части стебля клюквы болотной (ув.×400)

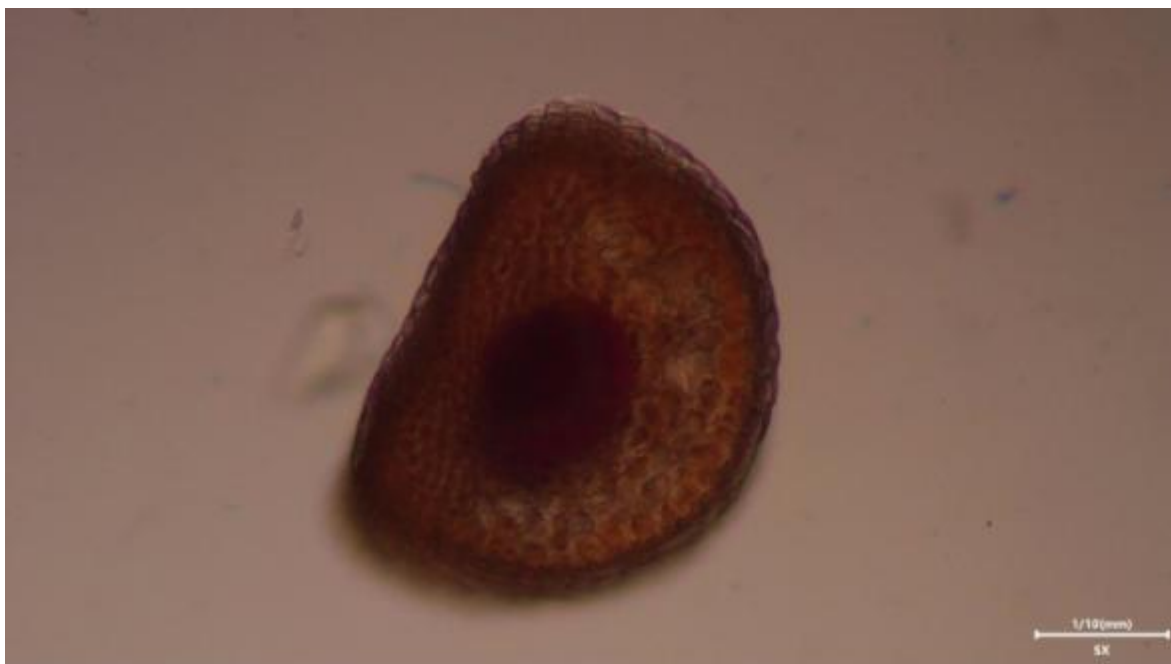


Рисунок 3.83 – Поперечный срез черешка листа клюквы болотной (ув.×100)

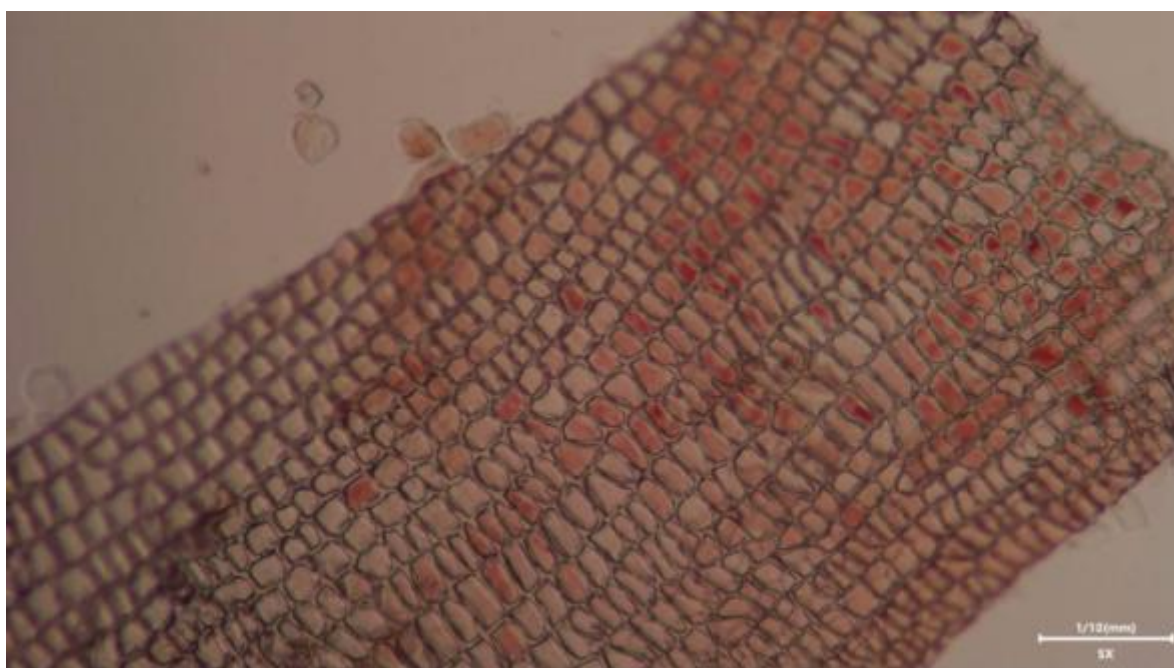


Рисунок 3.84 – Фрагмент эпидермис черешка листа клюквы болотной (ув.×400)

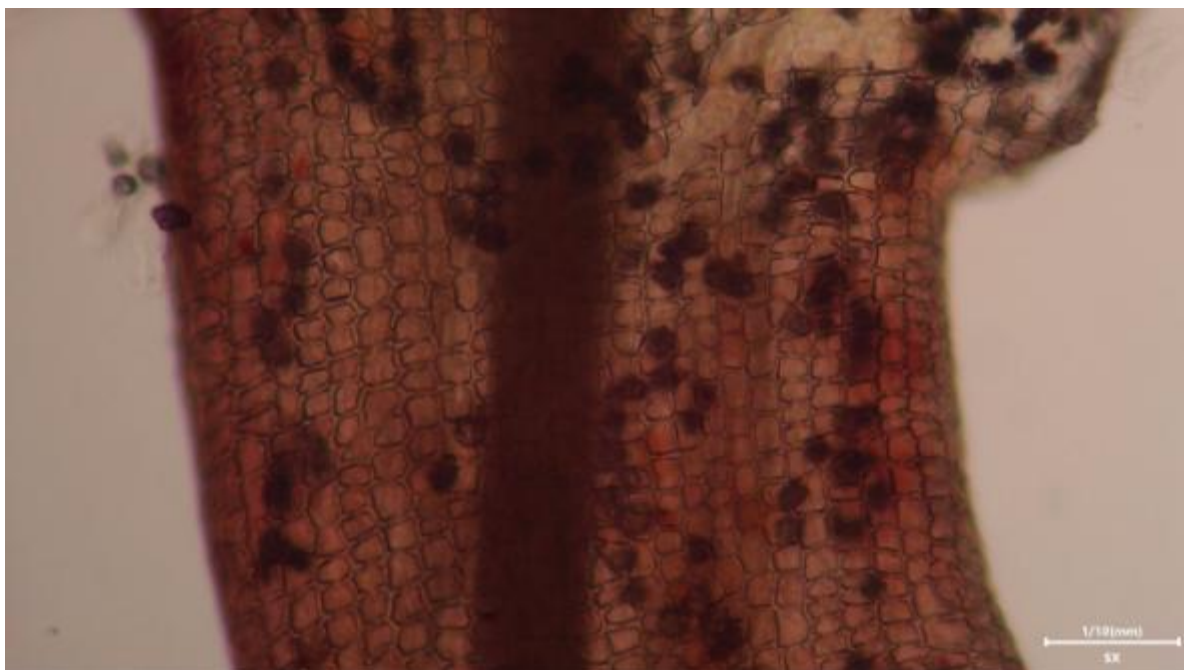


Рисунок 3.85 – Препарат с поверхности черешка листа клюквы болотной (ув.×100)



Рисунок 3.86 – Поперечный срез листа клюквы болотной в области центральной жилки (ув.×100)

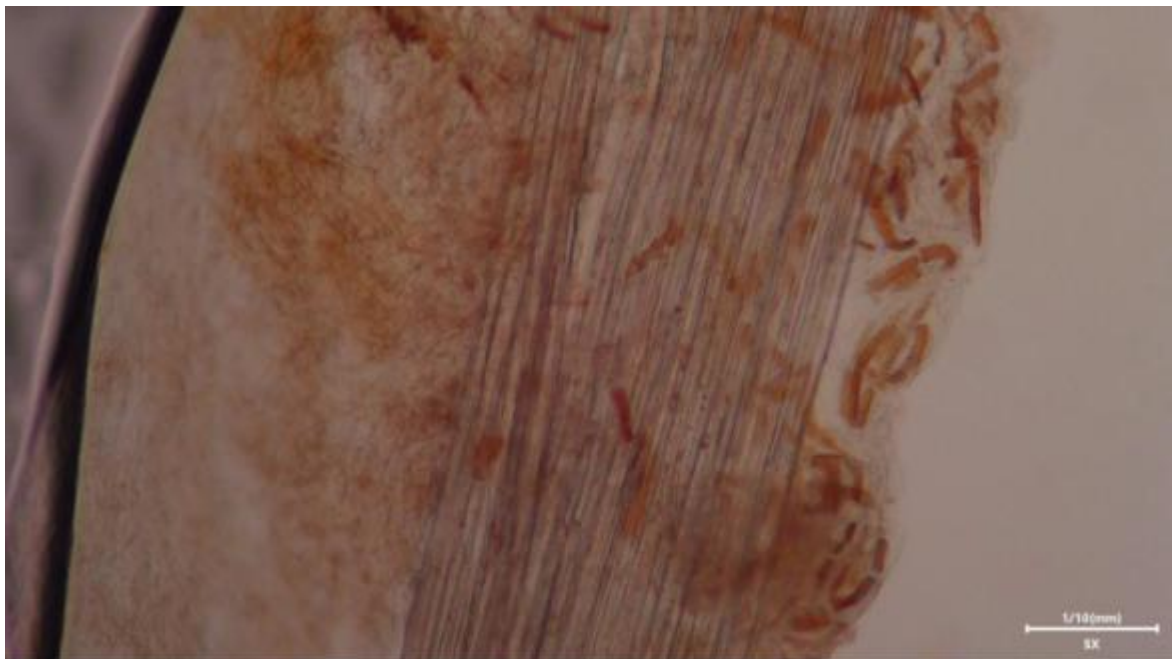


Рисунок 3.87 – Препарат с поверхности стебля клюквы болотной (ув.×40)



Рисунок 3.88 – Эпидермис стебля клюквы болотной (ув.×100)

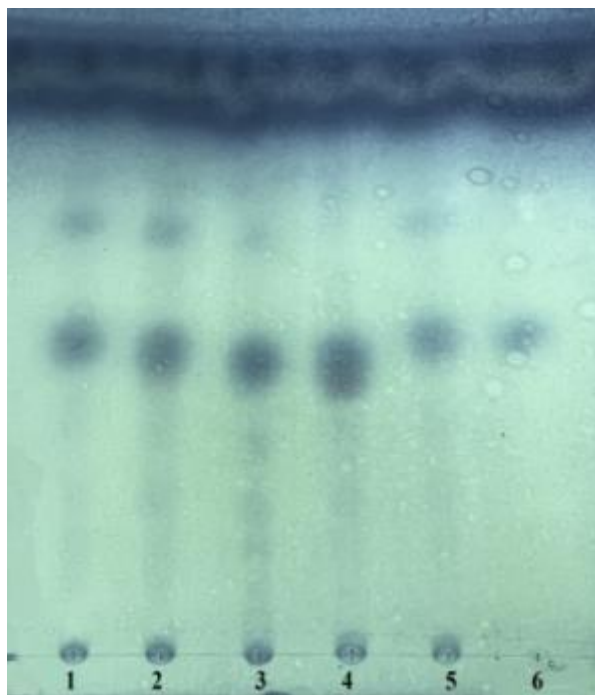


Рисунок 3.89 – Хроматограмма извлечений из брусники обыкновенной листьев
1 – Берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика; 2 – Кудымкарский район, Пермский край; 3 – поселок Белая Березка, Трубчевский район, Брянская область; 4 – деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область; 5 – ленточный бор, Павловский район, Алтайский край; 6 – стандартный образец арбутина.

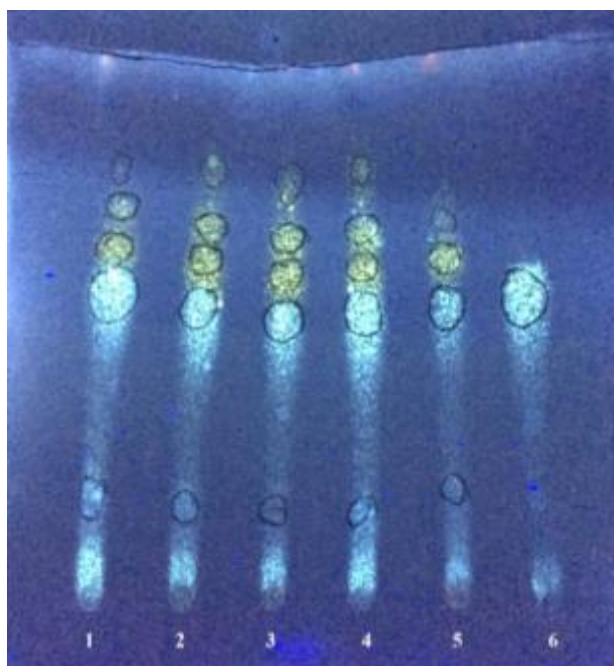


Рисунок 3.90 – Хроматограмма с извлечениями из черники обыкновенной листьев, собранных в разных местах естественного произрастания
1 – берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика; 2 – Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл; 3 – окрестности села Химой, Шаройский район, Чеченская Республика 4 – окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика; 5 – окрестности села Ахты, Ахтынский район, Республика Дагестан; 6 – стандартный образец хлорогеновой кислоты.

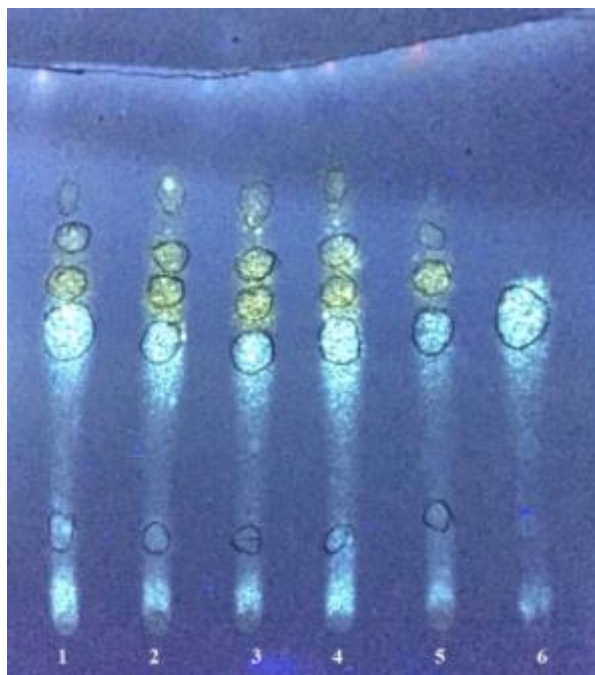


Рисунок 3.91 – Хроматограмма с извлечениями из черники кавказской листьев, собранных в разных местах естественного произрастания

1 – Село Хамышки, Майкопский район, Республика Адыгея; 2 – Яворова поляна, окрестности поселка Гузерибль, Майкопский район, Республика Адыгея; 3 – 1 км западнее Партизанской поляны, бассейн реки Белой, окрестности поселка Гузерибль, Майкопский район, Республика Адыгея; 4 – окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край; 5 – окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика; 6 – стандартный образец хлорогеновой кислоты.

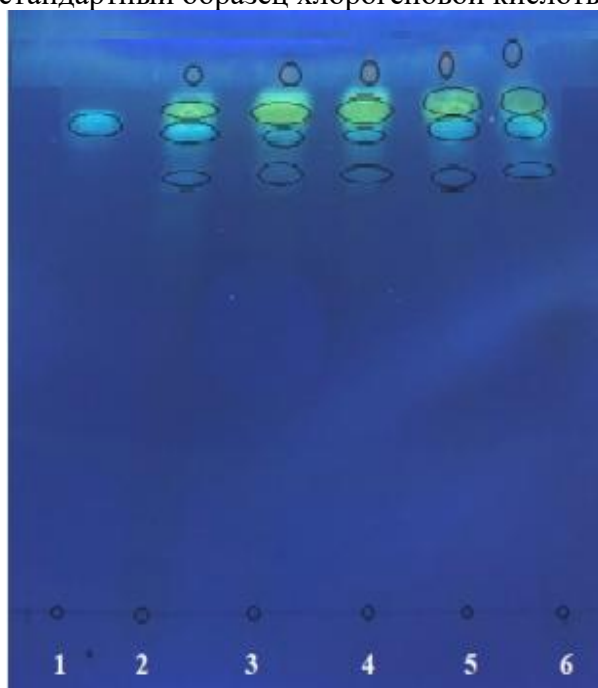


Рисунок 3.92 – Хроматограмма с извлечениями из голубики обыкновенной листьев, собранных в разных местах естественного произрастания

1 – стандартный образец хлорогеновой кислоты; 2 – Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области; 3 – окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область; 4 – гора Малый Ирмель, Челябинская область; 5 – Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл; 6 – Ирмель, Челябинская область.

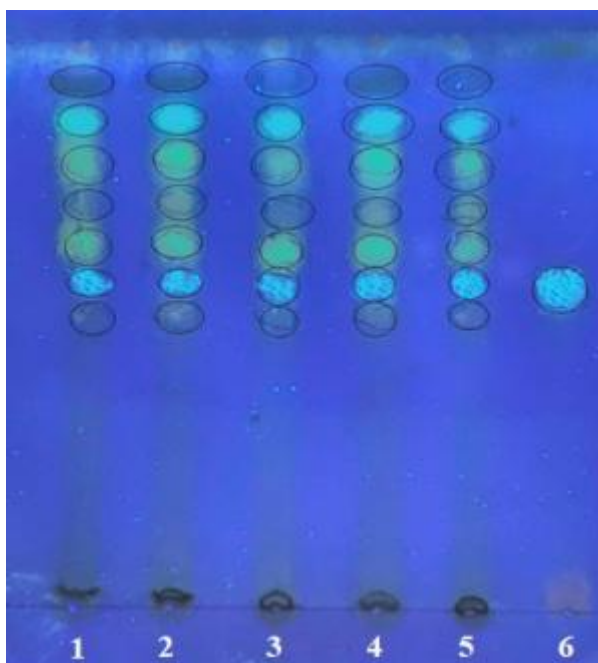


Рисунок 3.93 – Хроматограмма с извлечениями из клюквы болотной побегов, собранных в разных местах естественного произрастания

1 – Куйвозовское сельское поселение Всеволожского района Ленинградской области; 2 – окрестности деревни Шамокша, Лодейнопольский район, Ленинградская область; 3 – Поселок Визимьяры, Килемарский район, Республика Марий Эл; 4 – Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь; 5 – Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь; 6 – стандартный образец хлорогеновой кислоты.

Таблица 3.2 – Нуклеотидные последовательности образцов сырья видов *Vaccinium* L.

Последовательность	Образец
TGGGGTCGCAGTTGANGCGCCGCACTTAAACGGCACTCCAGGGTCAAATGGGGCAACCCGCAACAAACGATGG CACGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCACTCGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAG GCCGACCGCGCGCGGATGCGAACGGGGGGGCAATATCCGCCACGCACCGACGTGCCCGCTTGGGGCGCGGGG GAGGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCTTCAGCCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTT CAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAA GAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCACTTACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCGAGAACG GGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTCCTTGGCGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACG AACACGTGCCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGAAGACGGGAGGCGAGGCAACTGGGCCACGA CCCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTTGGCAGGTTTTTCGACAATGATCCTTC CGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACNTTTTACT	<i>V. vitis-idaea</i> (1)
ATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTTCGCAGTTGAGGCGCCGCACTTAAACGGCACTCCAG GGTCAAATGGGGCAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCACTCGT CGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCGCGGATGCGAACGGGGGGGCAATATCCGCC CACGCACCGACGTGCCCGCTTGGGGCGCGGGGGAGGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCC TTCAGCCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAA GTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCACTTACAAGA AAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTCCTTGGCGCGT TTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTGCCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGG GGAAGACGGGAGGCGAGGCAACTGGGCCACGACCCCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGCGGGT TTTCTGCTTGGCAGGTTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA	<i>V. vitis-idaea</i> (2)
GGGGTCGCAGTTGAGGCGCCGCACTTAAACGGCACTCCAGGGTCAAATGGGGCAACCCGCAACAAACGATGGC ATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCACTCGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGC CGACCGCGCGCGGATGCGAACGGGGGGGCAATATCCGCCACGCACCGACGTGCCCGCTTGGGGCGCGGGGGA GGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCTTCAGCCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCA AAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGA GCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCACTTACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCGAGAACGGG CAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTCCTTGGCGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAA CACGTGCCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGAAGACGGGAGGCGAGGCAACTGGGCCACGACC CCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTTGGCAGGTTTTTCGACAATGATCCTTCCG CAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGAC	<i>V. vitis-idaea</i> (3)
CCNTTNCCGAGAGTCGTTCAAGTACAANAAANANTGCAGACGCCNACACCGCCCGAGAACGGGCAGGGACGCG	<i>V. vitis-idaea</i> (4)

CGCTCTTTGTTTCGATTTTCCTTGGNGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACNAACACGTCGCCC GGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGAAGACGGGAGGCGAGGCAACTGGGGCCACGACCCCCACATCGT TCCCCGANAGTATAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTTGGCAGGTTTTCNACAATGATCCTTCCGCAGGTTACC TACNGAAACCTTGTTACNACTTCTCCTTCCTCTAAATGANNANGNTCTGTCTTTATACACATCTGACGCTGCCG A	
GGGGTCGCAGTTGAGGCGCCGCACTTAAACGGCACTCCAGGGTCAAATGGGCCAACCCGCAACAAACGATGGC ACGCACGACGTGACGCGACGTTTTAGCAACCACCACTCGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGG CCGACCGCGCGCGGATGCGAACGGGGGGCCAATATCCGCCCACGCACCGACGTGCCCGCTTGGGGCGCGGGGG AGGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCTTCAGCCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTC AAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAG AGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTCAGTTACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGG GCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTCCTTGGCGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACNA ACACGTCGCCCCGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGAAGACGGGAGGCGAGGCAACTGG	<i>V. vitis-idaea</i> (5)
TAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAGTTGAGGCGCCGCAATTAAACGGCACTCCAGGGTCA AATGGGCAAACCCGCAACAAACGATGGCACGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCACTTGTCGTGA TGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACGGATGCGAACGGGGGGCCAATATCCGCCCACGC ACCGACGTGCCCGCTTGGGGCGCGGGGGTGGTGGGTGACACAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCTTCAA CCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATC GCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTCAGTTACAAGAAAGA TTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTCAATTTTTCTTGGCGCGTTTTGC GCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGA GAAAATGGAAGGCGAGGCAACTGGGCCACGACCCCCACATCATTCCCCGAGAGTATAGACAAGTTCGCGGGTT TTCTGCTTGGCAGG	<i>V. uliginosum</i> (1)
TTGCCGAGAGTCGTTTCAGTTACAAGAAAGANTGCAGACGCCNACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGC TCTTTGTTTCGATTTTTTCCTTGGCGCGTTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCGG AGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGAAGAAAATGGAAGGCGAGGCAACTAGGCCACGACTCCCACATCG TTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTTTGCAGGTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTAC CTACGGAAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTCTGTCTCTTATACACATCTGAC	<i>V. uliginosum</i> (2)
GGGTGCGAGTTGAGGCGCCGCACTTAAACGGCACTTCAGGGTCAAATGGGCTAACCCGCAACAAACGATGGCA TGCACGACGTGACGCGACGTTTTAGCAACCACCACTTGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCC GACCGAGCACGGATGCACACGGGGGGCCAATATCCGCCCACACACCGACGTGCCCACTTGGGGCGCGGGGGAG GTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAA AGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAG CCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTCAGTTACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGG	<i>V. uliginosum</i> (3)

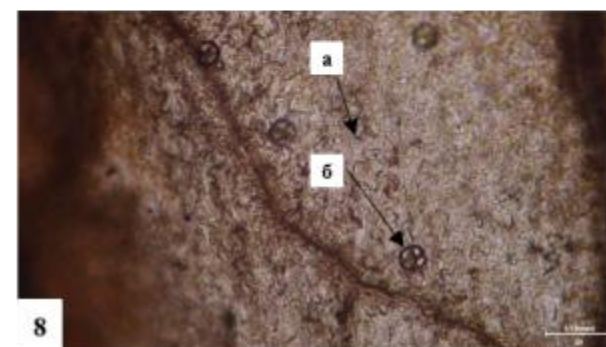
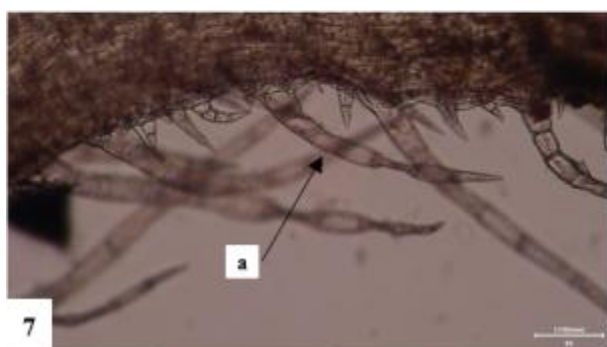
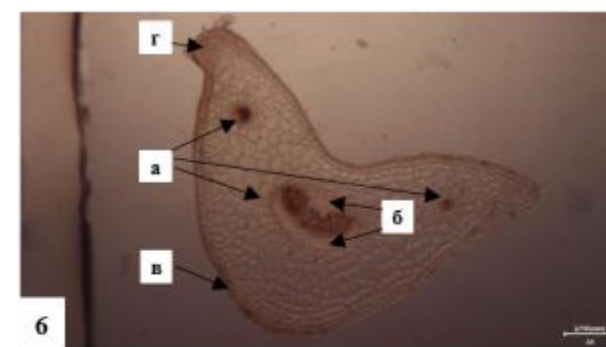
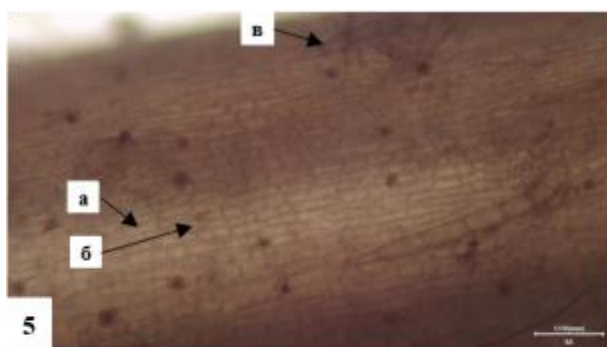
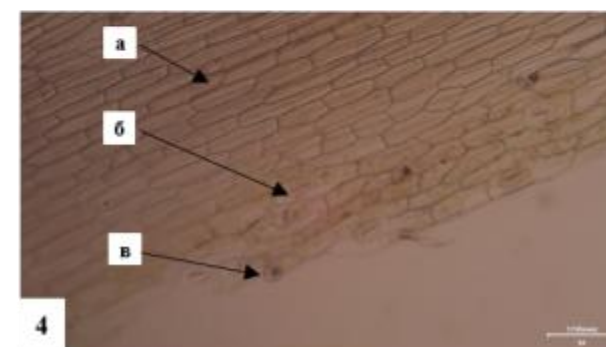
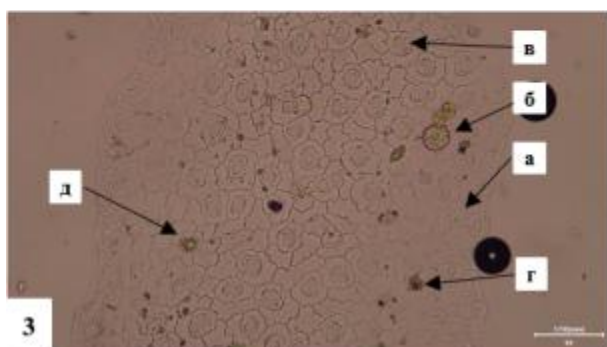
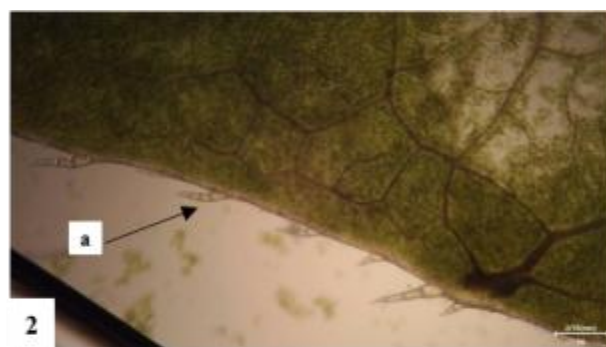
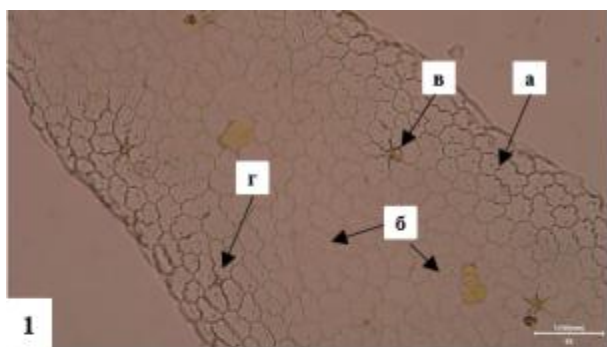
TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAGTTGAGGCGCCGCAGTTAAACGG CACTTCAGGGTCAAATGGGCTAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCA CCACTTGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGAGCACGGATGCACACGGGGGGCCAA TATCCGCCCACACACCGACGTGCCCACTTGGGGCGCGGGGGAGGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCA GACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTC ACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCACT TACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTTCTT GGCGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGC TCGCAAGGGGAAGAAAATGGAAGGCGAGGCAACTAGGCCACGACTCCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACG AGTTCGCGGGTTTTCTGCTTTGCA	<i>V. uliginosum</i> (4)
TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAGTTGAGGCGCCGCAGTTAAACGG CACTTCAGGGTCAAATGGGCTAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCA CCACTTGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGAGCACGGATGCACACGGGGGGCCAA TATCCGCCCACACACCGACGTGCCCACTTGGGGCGCGGGGGAGGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCA GACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTC ACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCACT TACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTTCTT GGCGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGC TCGCAAGGGGAAGAAAATGGAAGGCGAGGCAACTAGGCCACGACTCCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACG AGTTCGCGGGTTTTCTGCTTTGCAGGT	<i>V. uliginosum</i> (5)
TGCCAAGCAGAAAACCCGCGAACTCGTCTATACTCTCGGGGAACGATGCGGGGGTTCGTGGCCCGGTTGCCTCGC CTTCCATTTTTTTCCCCTTGCGAGCAGATGCGCACGGAACCTTCGGGCAACGTGTTTCGTCTGCTTGTCAAACAACG AACCCCGGCGCAAAACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAAGAGCGCGGTCCCTGCCCGTTCTCGGGCGGTGTT GGCGTCTGCAATCTTTCTTGTAACCTGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGT AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGA AGCCATTAGGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATTGCGTCACCCACTCCCCCGTGCCCCAAGCGGG CACGTCGGAGCGTGGGCGGATATTGGCCCCCGTTTCGCATCCGTGCGCGGTTCGGCCTAAAAAACGGGTCCCCAA TGACGGACATCACGACAAGTGGTGGTTGCTAAACCGTCGCGTCACGTCGTGCATGCCATCGTTTGTTGCGGGTT GGCCC	<i>V. myrtillus</i> (1)
GCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAGTTGAGGCGCCGCAGTTAAACGGCACTTCAGGG TCAAATGGGCCAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCACTTGTCGT GATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACGGATGCGAACGGGGGGCCAATATCCGCCCAC GCTCCGACGTGCCCGCTTGGGGCACGGGGGGAGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCTTC AACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTA	<i>V. myrtillus</i> (2)

TCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTCAGTTACAAGAAA GATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTTCTTGGCGCGTTTT GCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCCGAAAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGG GAAAAAATGGAAGGCGAGGCAACCGGGCCACGACCCCCGCATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGCGGG TTTTCTGCTTGGCAGGT	
TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTTCGCAGTTGAGGCGCCGCAGTTAAACGG CACTTCAGGGTCAAATGGGCCAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCA CCACTTGTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACGGATGCGAACGGGGGGGCCAA TATCCGCCACGCTCCGACGTGCCCCGCTTGGGGCACGGGGGGAGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCA GACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTC ACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTCAGT TACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTTCTT GGCGCGTTTTTTCGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCCGAAAGGTTCCGTGCGCATCTGC TCGCAAGGGGAAAAAATGGAAGGCGAGGCAACCGGGCCACGACCCCCGCATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGA GTTCGCGGGTTTTCTGCTTGGCAGGT	<i>V. myrtillus</i> (3)
ATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTTCGCAGTTGAGGCGCCGCAGTTAAACGGCACTTC AGGGTCAAATGGGCCAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCACTT GTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACGGATGCGAACGGGGGGGCCAATATCCG CCCACGCTCCGACGTGCCCCGCTTGGGGCACGGGGGGAGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTG CCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCA AGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTCAGTTACAAG AAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTTCTTGGCGCG TTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACAAGCAGACGAACACGTTGCCCCGAAAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAA GGGGAAAAAATGGAAGGCGAGGCAACCGGGCCACGACCCCCGCATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGC GGGTTTTCTGCTTGGCAGGT	<i>V. myrtillus</i> (4)
CCTGCCAAGCAGAAAACCCGCGAACTCNTCTATACTCTCGGGGAACGATGCGGGGGTTCGTGGCCCGGTTGCCTC GCCTTCCATTTTTTCCCCTTGCGAGCAGATGCGCACGGAACCTTCGGGCAACGTGTTTCGTCTGCTTGTCAAACAA CGAACCCCGGCGCAAAACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAAGAGCGCGCGTCCCTGCCCGTTCTCGGGCGGTG TTGGCGTCTGCAATCTTTCTTGTAACTGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAAC GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCANAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCT GAAGCCATTAGGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATTGCGTCACCCACTCCCCCGTGCCCCAAGCG GGCAC	<i>V. myrtillus</i> (5)

AGCAGAAAACCCGCGAACTCGTCTATACTCTCGGGGAACGATGTGGGGGTCGTGGCCCAGTTGCCTCGCCTTCC ATTTTCTTCCCCTTGCGAGCAGATGCGCACGGAACCTCCGGGCAACGTGTTCTGCTCGTCAAACAACGAACC CCGGCGCAAAACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAGAGCGCGCGTCCCTGCCCGTTCTCGGGCGGTGTTGGCG TCTGCAATCTTTCTTGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCG AAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCTGAAGCC ATTAGGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATTGCGTCACCCACTCCCCCGTGCCCCAAGTGGGCACG TCGGTTCGTGGGCGGATATTGGCCCCCGTGTGCATCCGTGCTCGGTTCGGCCTAAAAAACGGGTCCCCAATGAC GGACATCACGACAAGTGGTGGTTGCTAAACCG	<i>V. arctostaphylos</i> (1)
AGATGTGTATAAGAGACAGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT GCGGAAGGATCATTGTGCGAAAACCTGCCAAGCAGAAAACCCGCGAACTCGTCTATACTCTCGGGGAACGATGT GGGGGTCGTGGCCCAGTTGCCTCGCCTTCCATTTTCTTCCCCTTGCGAGCAGATGCGCACGGAACCTCCGGGCAA CGTGTTCTGCTCGTCAAACAACGAACCCCGGCGCAAAACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAGAGCGCG CGTCCCTGCCCGTTCTCGGGCGGTGTTGGCGTCTGCAATCTTTCTTGTAACGACTCTCGGCAACGGATAT CTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGCCTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCC	<i>V. arctostaphylos</i> (2)
GGGGTTCGCANTTGAGGCGCCGACGTTAAACGGCACTTCAGGGTCAAATGGGCAAACCCGCAACAAACGATGGC ATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCCTTGTCTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGC CGACCGAGCACGGATGCACACGGGGGGCCAATATCCGCCCACGCACCGACGTGCCCACTTGGGGCACGGGGGG AGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCA AAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGA GCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTACGTTACAAGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCGAGAACGGG CAGGGACGCGCGCTCTTTGTTTCGATTTTTCCTTGGCGCGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACGAGCAGACGA ACACGTTGCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCAAGGGGAAGAAAAATGGAAGGCGAGGCAACTGGGCCAC GACCCCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTTGGCAGGTTTTTCGACAATGATCCT TCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGA	<i>V. arctostaphylos</i> (3)
GCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG AACCTGCGGAAGGATCATTTGTCGAAAACCTGCCAAGCAGAAAACCCGCGAACTCGTCTATACTCTCGGGGAA CGATGTGGGGGTCGTGGCCCAGTTGCCTCGCCTTCCATTTTCTTCCCCTTGCGAGCAGATGCGCACGGAACCTCC GGGCAACGTGTTCTGCTCGTCAAACAACGAACCCCGGCGCAAAACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAGAG GCGCGCGTCCCTGCCCGTTCTCGGGCGGTGTTGGCGTCTGCAATCTTTCTTGTAACGACTCTCGGCAACG GATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAANAACGCAGCCTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCC	<i>V. arctostaphylos</i> (4)
TGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAATTGAGGCGCCGACGTTAAACGGCACT TCAGGGTCAAATGGGCAAACCCGCAACAAACGATGGCATGCACGACGTGACGCGACGGTTTAGCAACCACCAC TTGTTCGTGATGTCCGTCATTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGAGCACGGATGCACACGGGGGGCCAATATC CGCCACGCACCGACGTGCCCACTTGGGGCACGGGGGGAGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCAGGCAGACG	<i>V. arctostaphylos</i> (5)

TGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACAC CAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCAAGTTACA AGAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGAACGGGCAGGGACGCGCGCTCTTTGTTCGATTTTTTCCTTGGCG CGTTTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACGAGCAGACGAACACGTTGCCCCGAGGTTCCGTGCGCATCTGCTCGCA AGGGGAAGAAAATGGAAGGCGAGGCAACTGGGCCACGACCCCCACATCGTTCCCCGAGAGTATAGACGAGTTC GCGGGTTTTCTGCTTGGCAGG	
ACTTGCCGAGCAGAAAACCCGCGAACTCGTCTCTACTCTGGGGGAACGATGCGGGGGTTCGTGGCCCAGCTGCCT CGCCTTCCATTTTTTCCCCTTGCGAGCGGATGCGCACGGAACCTCCGGGCGACGTGCTCGTCCCGCTCGTCAAAC AACGAACCCCGGCGCAAGACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAAGAGAGCGCGTCCCTGCCCGTCCTCGGGCGG TGTTGGCGTCTGCAATCTTTTCTTGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAG AACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG CCTGAAGCCATTAGGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTACGCAATTGCGTCACCCACTCCCCCGCGCCCCAA GCGGGCGCGTTCGGTGCCTGGGCGGATATTGGCCCCCGTCCGCATCCGTGCTCGGTTCGGCCTAAAAAACGGGTC CCCAACGACGGACATCACGACAAGTGGTGGTTGCTAAAACCGTCGCGTCGCGTCGTGCCTGCCATCGTCTGTTG CGGGTTGGCCCATTTGACCCTGGAGTGTGCCGTTTAACCGCGGCGCCTCAACTGCGACCCC	<i>V. oxycoccus</i> (1)
GGTTAAACGGCACACTCCAGGGTCAAATGGGCCAACCCGCAACAGACGATGGCAGGCACGACGCGACGCGACG GTTTTAGCAACCACCACTTGTCGTGATGTCCGTGCTTGGGGACCCGTTTTTTAGGCCGACCGAGCACGGATGCGG ACGGGGGGCCAATATCCGCCCACGCACCGACGCGCCCGCTTGGGGCGCGGGGGGAGTGGGTGACGCAATGCGT GACGCCCAGGCAGACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGG GATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCG AGAGTCGTTCAAGTACAAGAAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCCGAGGACGGGCAGGGACGCGCTCTCTTT GTTCGATTTTTTCTTGGCGCGTCTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACGAGCGGGACGAGCACGTCGCCCCGAGGT TCCGTGCGCATCCGCTCGCAAGGGGAAAAANTGGAAGGCGAGGACGCTGGGCCACGACNCCCCGCATCGTTCC CCCAGAGTAGAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTCGGCAAGTTTTTC	<i>V. oxycoccus</i> (2)
TGCCGAGCAGAAAACCCGCGAACTCGTCTCTACTCTGGGGGAACGATGCGGGGGTTCGTGGCCCAGCTGCCTCGC CTTCCATTTTTTCCCCTTGCGAGCGGATGCGCACGGAACCTCCGGGCGACGTGCTCGTCCCGCTCGTCAAACAAC GAACCCCGGCGCAAGACGCGCCAAGGAAAAATCGAACAAAGAGAGCGCGTCCCTGCCCGTCCTCGGGCGGTGT TGGCGTCTGCAATCTTTTCTTGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAAC GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCT GAAGCCATTAGGTTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTACGCAATTGCGTCACCCACTCCCCCGCGCCCCAAGCG GGCGCGTTCGGTGCCTGGGCGGATATTGGCCCCCGTCCGCATCCGTGCTCGGTTCGGCCTAAAAAACGGGTCCCC AACGACGGACATCACGACAAGTGGTGGTTGCTAAAACCGTCGCGTCGCGTCGTGCCTGCCATCGTCTGTTGCGG GTTGGCCCATTTGACCCTGGAGTGTGCCGTTTAACCGCGGCGCCTCAACTGCGACCCC	<i>V. oxycoccus</i> (3)
GGTCGCANTTGANGNGCCGCGGTTAAACGGCACACTCCAGGGTCAAATGGGCCAACCCGCAACAGACGATGGC	<i>V. oxycoccus</i> (4)

AGGCACGACGCGACGCGACGGTTTTAGCAACCACCACTTGTCGTGATGTCCGTCGTTGGGGACCCGTTTTTTAG GCCGACCGAGCACGGATGCGGACGGGGGGCCAATATCCGCCCACGCACCGACGCGCCCGCTTGGGGCGCGGGG GGAGTGGGTGACGCAATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCTTCAACCTAATGGCTTCAGGCGCAACTTGCGTT CAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCAA GAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTCAAGTACAAGAAAAGATTGCAGACGCCAACACCGCCCGAGGAC GGGCAGGGACGCGCTCTCTTTGTTTCGATTTTTCTTGGCGCGTCTTGCGCCGGGGTTCGTTGTTTGACGAGCGGG ACGAGCACNNNNCCCGGAGGTTCCGTGCGCATCCGCTCGCAAGGGGAAAAAATGGAAGGCGAGGCAGCTGGGC CACGACCCCGCATCGTTCCCCCAGAGTAGAGACGAGTTCGCGGGTTTTCTGCTCGGCAAGTTTTTCGACAATGAT CCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA	



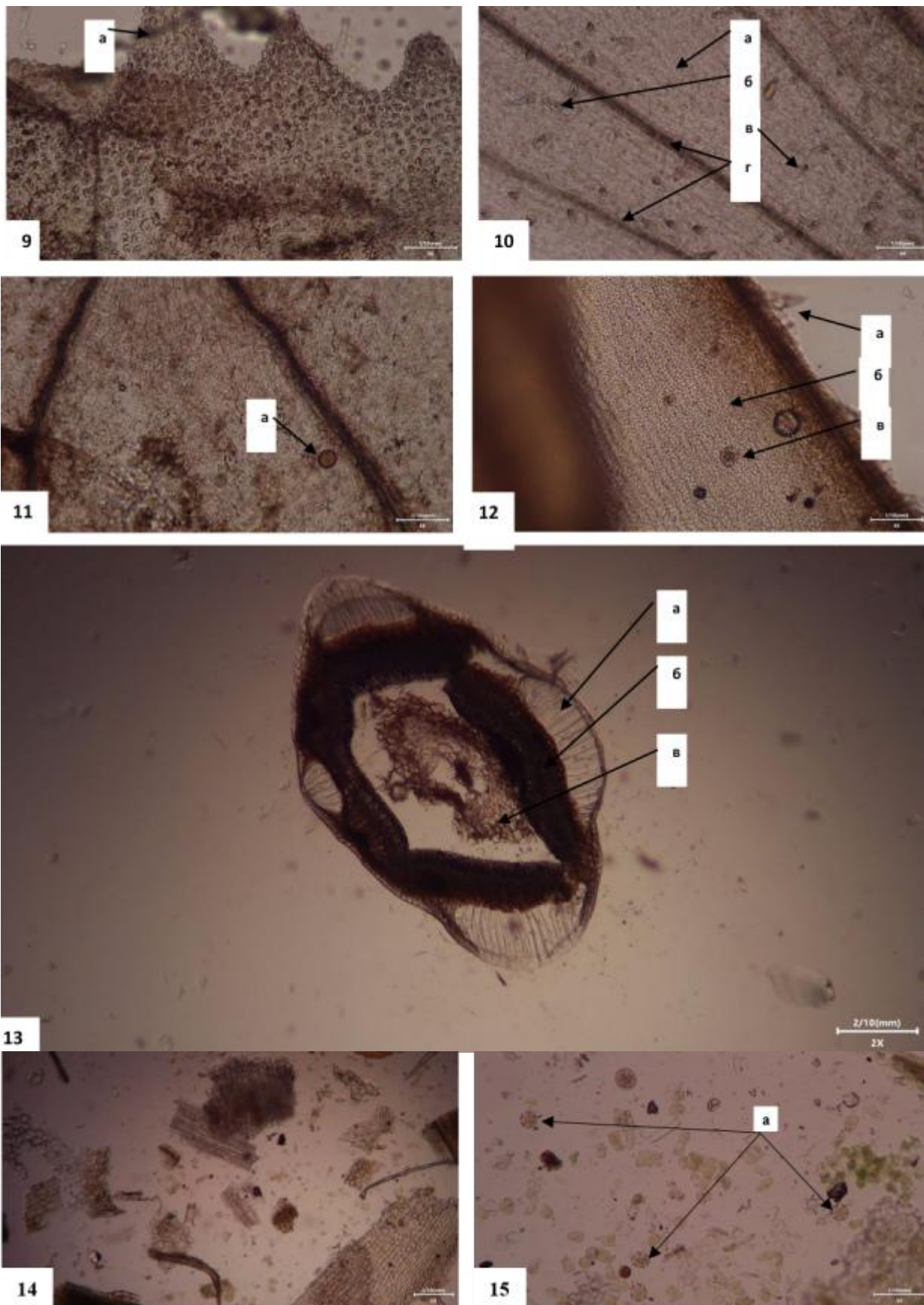
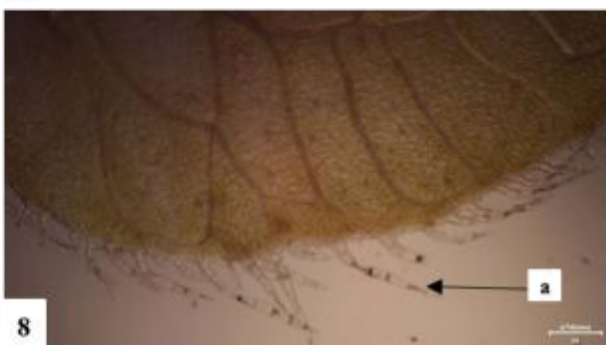
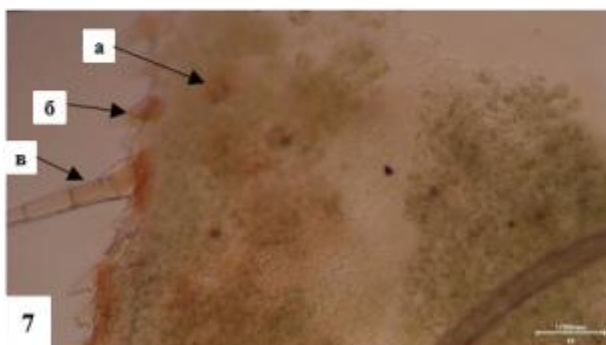
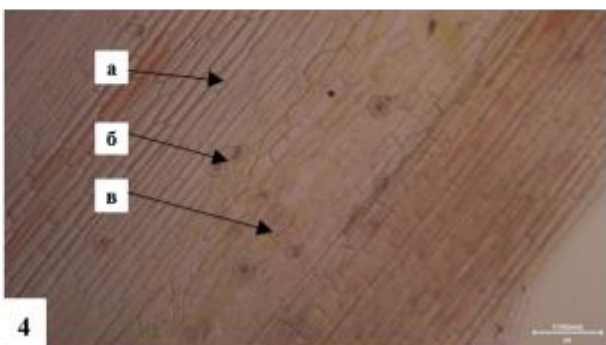
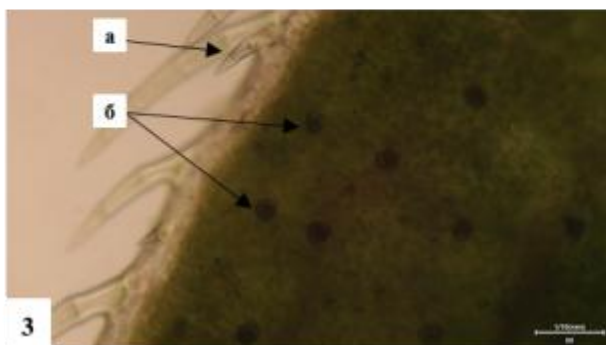
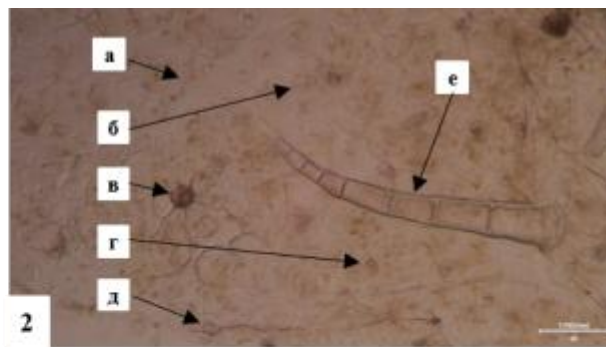
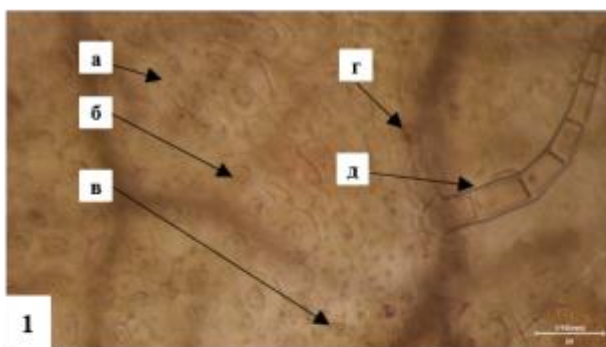


Рисунок 3.94 – Черноголовки обыкновенной трава

1 – верхний эпидермис листа (100×): а – клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – пузыревидные волоски; г – головчатые волоски;
2 – край листа (40×): простые многоклеточные волоски;

- 3 – нижний эпидермис листа (100×): а – клетки эпидермиса; б – эфирно-масличные железки; в – устьица (диацитный тип); г – головчатые волоски; д – гидатоды
- 4 – эпидермис стебля (100×): а – прозенхимные клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – головчатые волоски
- 5 – эпидермис черешка листа (100×): а – прозенхимные клетки эпидермиса; б – головчатые волоски; в – простые многоклеточные волоски;
- 6 – поперечный срез черешка листа (40×): а – закрытые моноколлатеральные проводящие пучки; б – склеренхима; в – хлоренхима; г – колленхима;
- 7 – прицветник (100×): а – простые многоклеточные волоски по краю;
- 8 – эпидермис прицветника (100×): а – извилисто стенные клетки эпидермиса; б – эфирно-масличные железки;
- 9 – верхняя поверхность лепестка (100×): а – сосочковидные выросты;
- 10 – нижняя поверхность лепестка (100×): а – извилисто стенные прозенхимные стенки эпидермиса; б – простые 1-2-клеточные волоски; в – пузыревидные волоски; г – сетчато-спиральное утолщение ксилемы;
- 11 – нижняя поверхность лепестков (100×): а – эфирно-масличные железки
- 12 – поверхность чашелистика (100×): а – простые многоклеточные волоски по краю; б – извилисто стенные прозенхимные клетки эпидермиса; в – эфирно-масличные железки;
- 13 – поперечный срез семени (40×): а – слой палисадообразных клеток эпидермы; б – семенная кожура; в – эндосперм с зародышем
- 14 – элементы порошка (40×)
- 15 – элементы порошка (100×): а – пыльцевые зерна



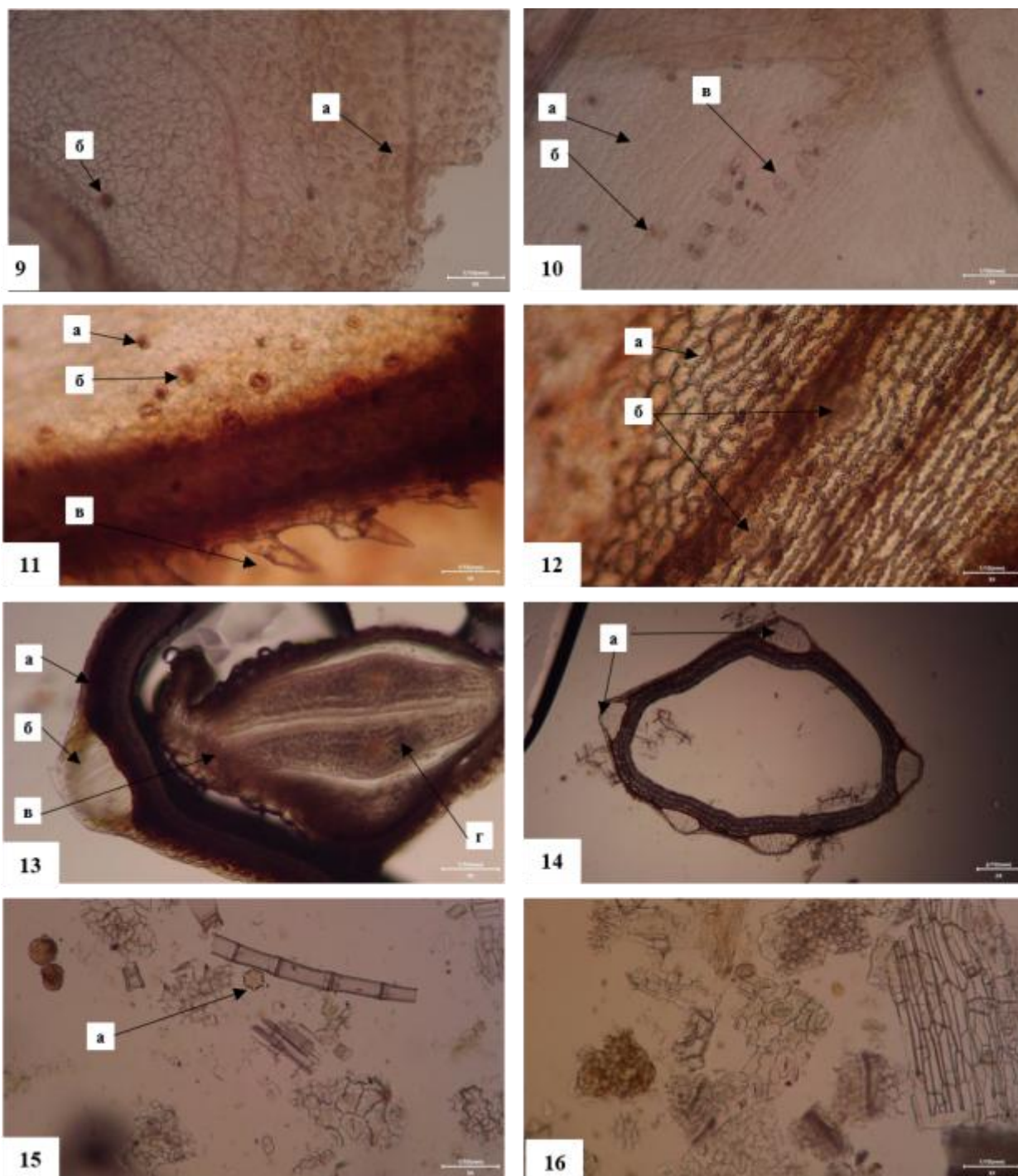
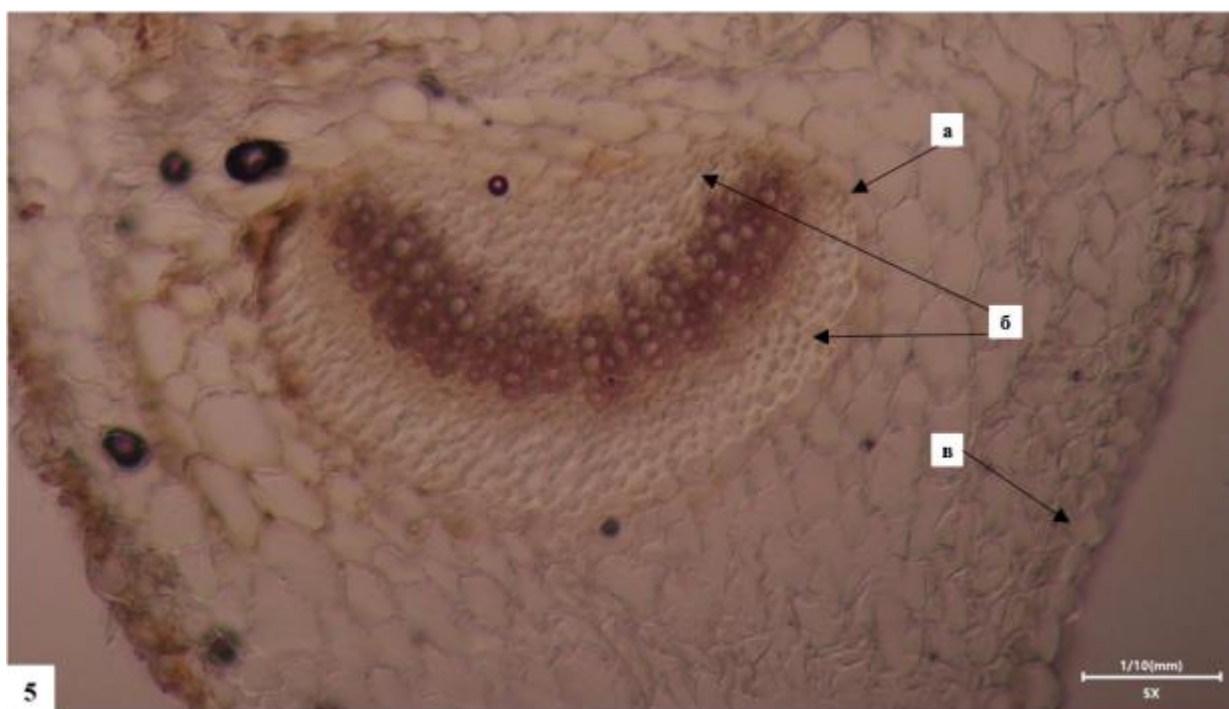
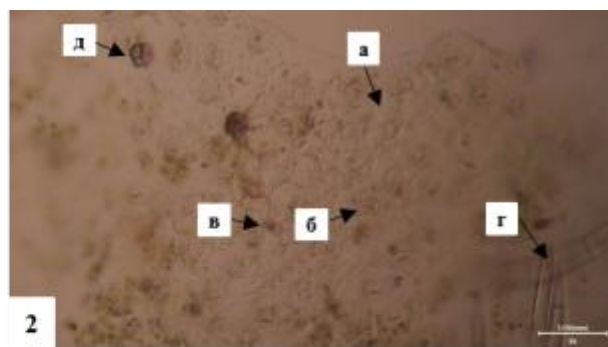
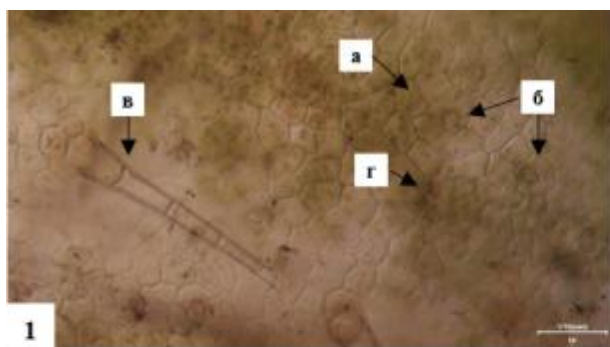
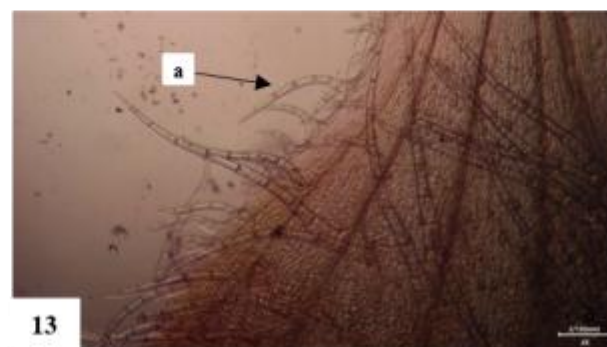
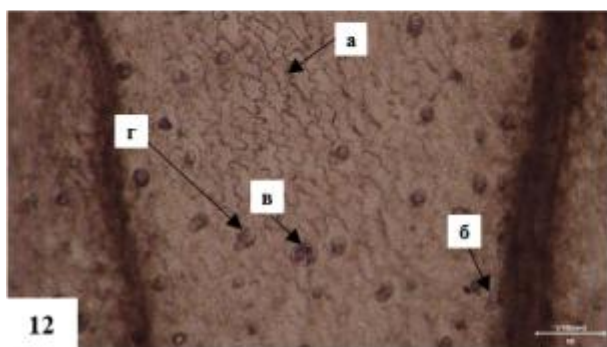
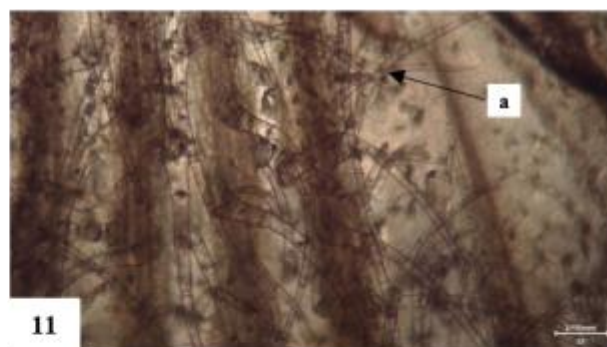
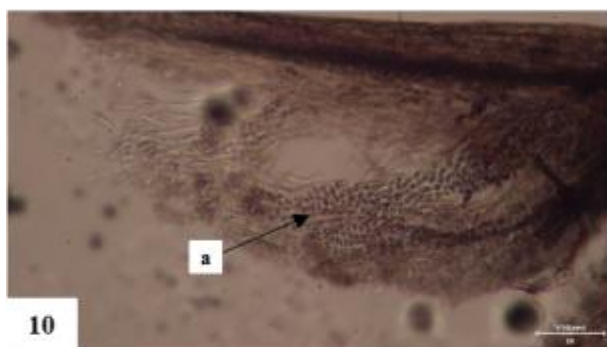
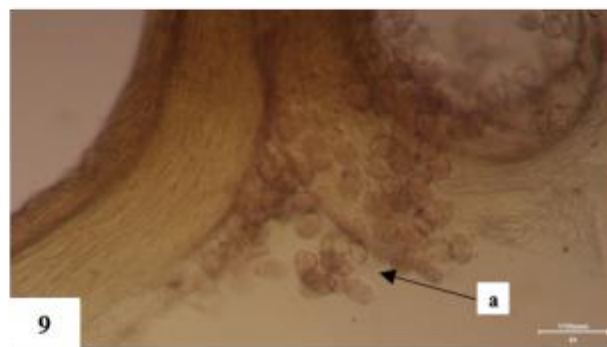
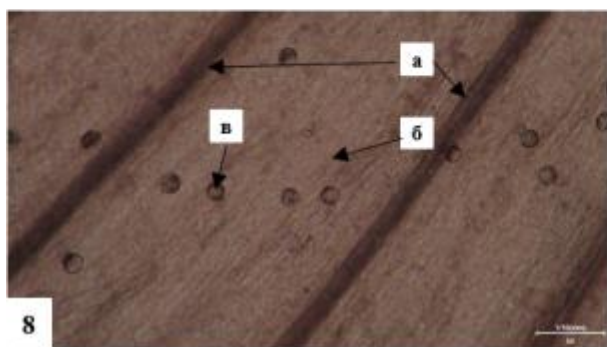
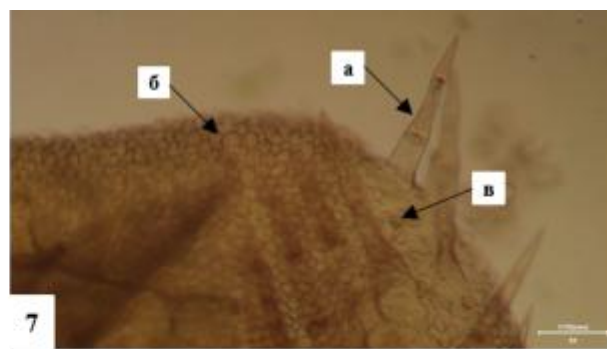
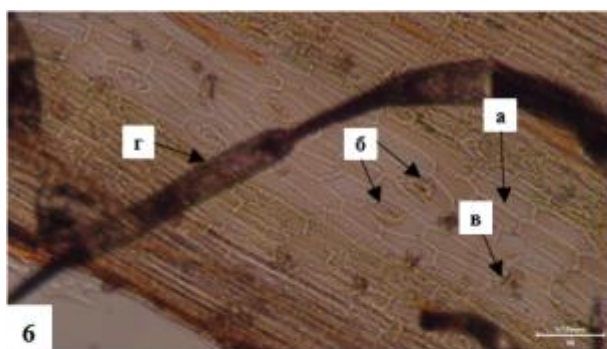


Рисунок 3.95 – Черноголовки крупноцветковой трава

- 1 – верхний эпидермис листа (100×): а – клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – головчатые волоски; г – пузыревидные головчатые волоски; д – простые многоклеточные волоски
- 2 – нижний эпидермис листа (100×): а – клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – эфирно-масличные железы; г – головчатые волоски; д – пузыревидные волоски; е – простые многоклеточные волоски
- 3 – край листа (100×): а – простые многоклеточные волоски; б – эфирно-масличные железы;
- 4 – эпидермис стебля (100×): а – прозенхимные клетки эпидермиса; б – головчатые волоски; в – устьица диацитного типа;
- 5 – эпидермис черешка листа (100×): а – прозенхимные клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – головчатые волоски; г – простые многоклеточные волоски

- 6 – поперечный срез черешка листа (40×): а – закрытые моноколлатеральные проводящие пучки; б – склеренхима; в – колленхима
- 7 – эпидермис прицветника (100×): – а – головчатые волоски; б - простые одноклеточные широко конусовидные волоски; в – простые многоклеточные волоски
- 8 – край прицветника (40×): а – простые многоклеточные волоски
- 9 – верхняя поверхность лепестка (100×): а – полусферические выросты; б – эфирно-масличные железы
- 10 – нижняя поверхность лепестка (100×): а – извилисто стенные клетки эпидермиса; б – пузыревидные волоски; в - 2-клеточные простые волоски
- 11 – нижний (наружный) эпидермис чашелистика (100×): а – головчатые волоски; б – эфирно-масличные железы; в – конусовидные волоски
- 12 – эпидермис чашелистика (100×): а – клетки, имеющие утолщенные стенки; б – устьица диацитного типа
- 13 – поперечный срез семени (100×): а – семенная кожура; б – палисадообразные зоны эпидермы; в – эндосперм; г – зародыш из двух семядолей
- 14 – поперечный срез семени (40×): а – палисадообразные зоны эпидермы
- 15 – элементы порошка (100×): а – пыльцевые зерна
- 16 – элементы порошка (100×)





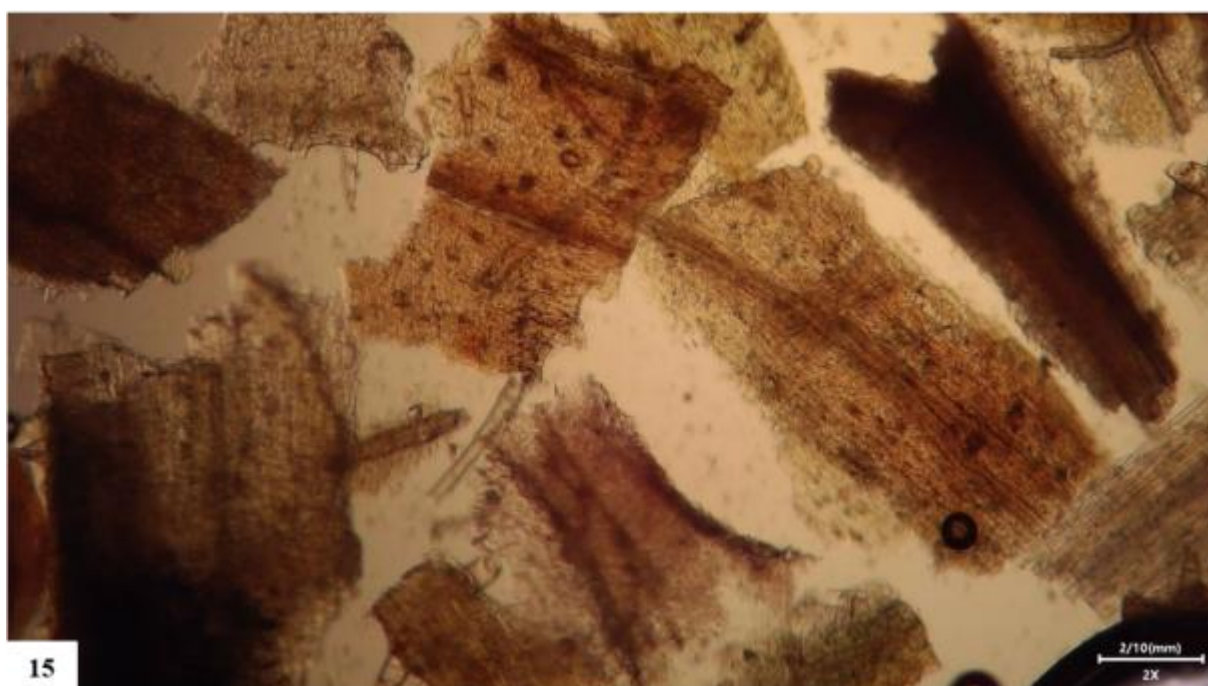
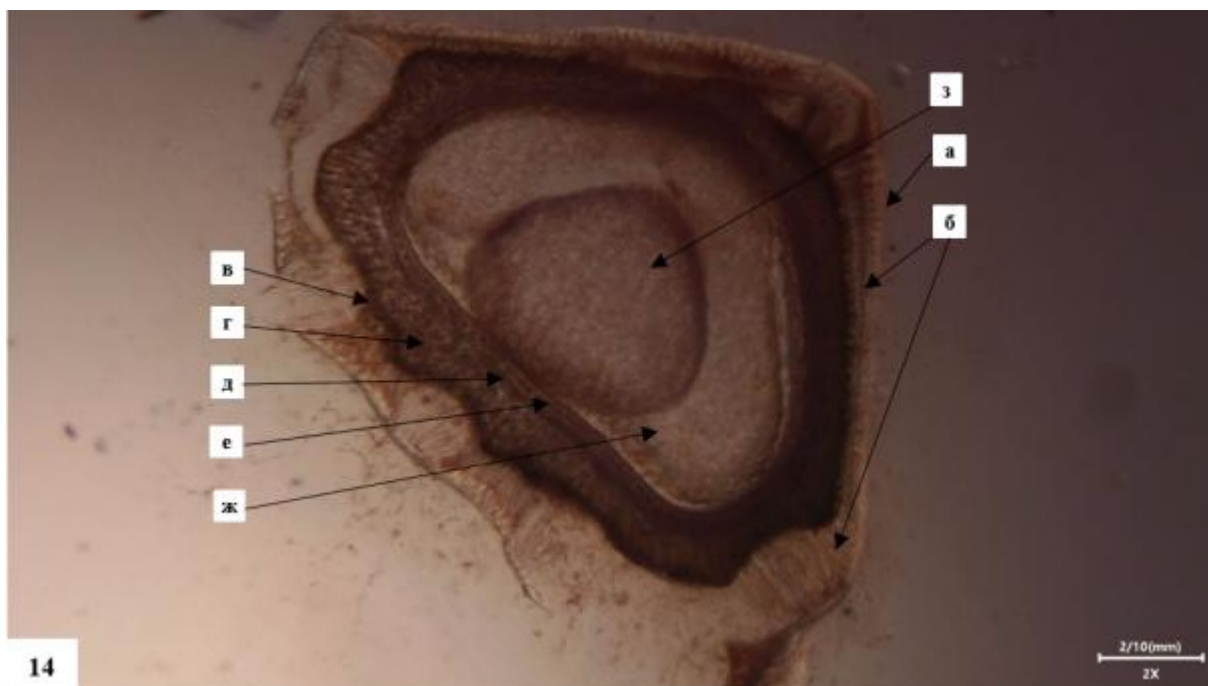


Рисунок 3.96 – Черноголовки разрезной трава

- 1 – верхний эпидермис листа (100×): а – клетки эпидермиса; б – устьица диацитного и аномоцитного типа; в – простые многоклеточные волоски; г – головчатые волоски;
- 2 – нижний эпидермис листа ((100×): а – клетки эпидермиса; б – устьица аномоцитного типа; в – головчатые волоски; г – простые многоклеточные волоски; д – эфирно-масличные железы;
- 3 – эпидермис черешка листа (40×): а – простые многоклеточные волоски;
- 4 – эпидермис черешка листа (100×): а – прозенхимные клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – головчатые волоски;
- 5 – поперечный срез черешка листа (100×): а - закрытый моноколлатеральный проводящий пучок; б – склеренхима; в – колленхима;
- 6 – эпидермис стебля (100×): а – прозенхимные клетки эпидермиса; б – устьица диацитного типа; в – головчатые волоски; г – простые многоклеточные волоски;
- 7 – верхняя поверхность лепестка (100×): а – простые многоклеточные волоски; б – сосочковидные выросты; в – головчатые волоски;

- 8 – нижняя поверхность лепестка (100×): сетчато-спиральные утолщения ксилемы; б – извилисто стенные клетки эпидермиса; в – пузыревидные волоски;
- 9 – рыльце пестика с пылью (100×): а – пыльца;
- 10 – столбик пестика (100×): а – нектарник;
- 11 – нижний эпидермис чашелистика (40×): простые многоклеточные волоски;
- 12 – верхний эпидермис чашелистика (100×): а – извилисто стенные клетки эпидермиса; б – одноклеточные конусовидные волоски; в – эфирно-масличные железы; г – головчатые волоски
- 13 – прицветники (40×): простые одноклеточные волоски
- 14 – поперечный срез семени (40×): а – кутикула; б – клетки эпидермы; в – паренхимный слой; г – колленхима; д – поперечный слой клеток; е – пигментный слой клеток; ж- эндосперм; з – зародыш
- 15 – элементы порошка (40×)

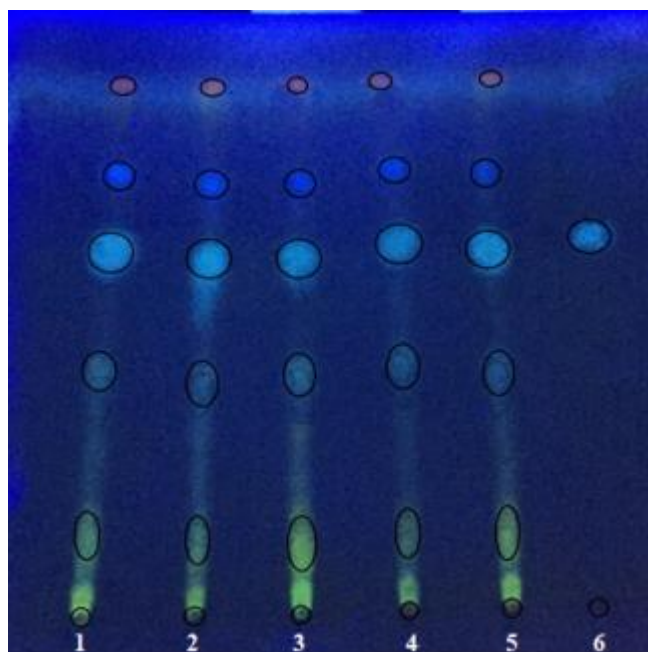


Рисунок 3.97 – Хроматограмма с извлечениями из травы черноголовки обыкновенной, собранной в разных местах естественного произрастания
1– г. Теберда (Республика Карачаево-Черкессия); 2 – г. Нальчик (Республика Кабардино-Балкария); 3 – гора Машук (Ставропольский край); 4 – Лемболово (Ленинградская область); 5 – гора Харбас (Республика Кабардино-Балкария); 6 – стандартный образец розмариновой кислоты.

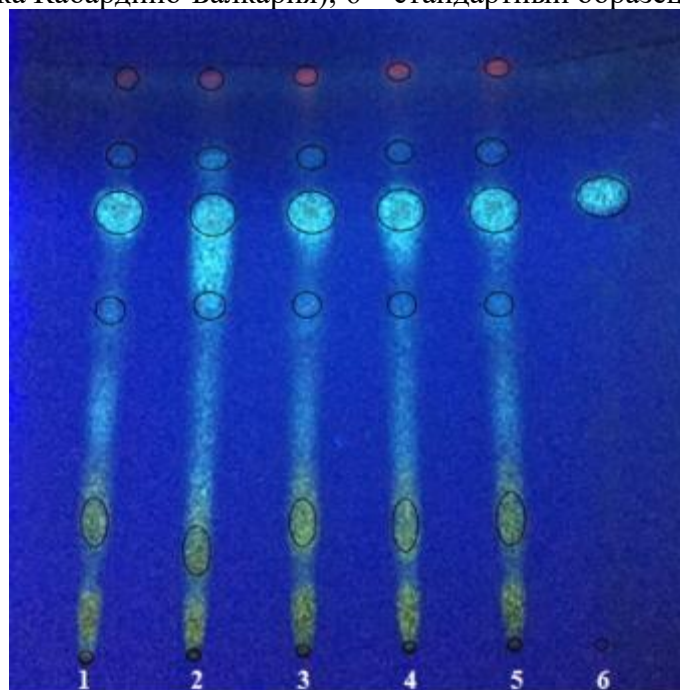


Рисунок 3.98 – Хроматограмма с извлечениями из травы черноголовки крупноцветковой, собранной в разных местах естественного произрастания
1 – село Кичи-Балык (Республика Карачаево-Черкессия); 2 – перевал Гум-Баши (Республика Карачаево-Черкессия); 3 – гора Кабан (Ставропольский край); 4 – гора Юца (Ставропольский край); 5 – село Красный Курган (Республика Карачаево-Черкессия); 6 – стандартный образец розмариновой кислоты.

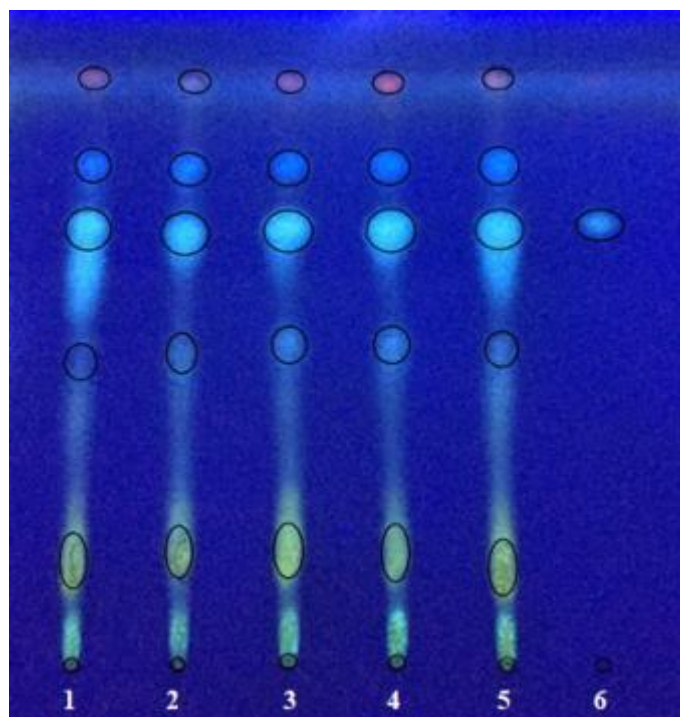


Рисунок 3.99 – Хроматограмма с извлечениями из травы черноголовки разрезной, собранной в разных местах естественного произрастания

1 – гора Юца (Ставропольский край); 2–гора Лысая (Ставропольский край); 3– микрорайон Дубрава, Пятигорск (Ставропольский край); 4 – гора Машук (Ставропольский край); 5 – гора Бештау (Ставропольский край); 6 – стандартный образец розмариновой кислоты.

Таблица 3.3 – Нуклеотидные последовательности образцов сырья видов *Prunella* L.

Последовательность	Образец
GATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGGTGGGGCGCCGTGCGGCACCG ACACCGTTGGGTCGTTTCATTGATGCCCTTGCAGACGACGCGGGAGCACGACAATTGAGAGATTGAGGTTCAACCA CCACTAGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCACGGGGGGCCAAT ATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTG CCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCA AGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTATG ATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTTTTCTTGGC GCATTCCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCAGCACACGA CGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTAGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGT	<i>P. vulgaris</i> (1)
CGCGAACACGTGCTTAACTACACGGCGCGCGGGCGCGGGGGACGCGAGTCTCCCCGTGCGCGCGCTGAATCCCCGCC GGCGCGCTCCNTCGGGTCGCGTCGTTTCGGGCTAACGAACCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAAACCTTAACGAA GCGTCCGCATCCCCGCAGCCCGTCCGCGGAACCTGCGGGGGGACCGGTCTGCTATCATAATGTCAAAACNNCTCT CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTANCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCANAATC CCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA CGCATCGCGTCGCCCCACCTACCGCGCACGAACGTGCCGGCGAGTGGGGCGGATATTGGCCCCCGTGCGCCTC GGCGTGCGGTGCGCCCAAATGCGATCCCTCGGCGACTCGTGTCNCGACTAGTGGTGGTTGAACCTCAATCTCTCA ATCGTCGTGCTCCCGCGTCNTCTGCAAGGGCATCAATGAACGACCCANCGGTGTCGGTGCCGCACGGCGCCCCAC CTTCNACCGCGACCCCAAGTTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATNNNNNNNNNAAGGAAA	<i>P. vulgaris</i> (2)
TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGGTGGGGCGCCGTGCGGC ACCGACACCGTTGGGTCGTTTCATTGATGCCCTTGCAGACGACGCGGGAGCACGACAATTGAGAGATTGAGGTTCA ACCACCACTAGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCACGGGGGGC CAATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGA CGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCAC ACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACAT TATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTTTTCTT TGGCGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCAGCAC ACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTAGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGT TTCGACAATGATCCTTCCGCANGTTCACCTACGGAA	<i>P. vulgaris</i> (3)
ATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGGTGGGGCGCCGTGCGGCACCGAC ACCGTTGGGTCGTTTCATTGATGCCCTTGCAGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAACCACC ACTAGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCACGGGGGGCCAATAT	<i>P. vulgaris</i> (4)

CCGCCCCACTAGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCC CTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAG TATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTATGAT AGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTTAAGTTTTCTTGGCGC ATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCAGCGCGCGACG GGGAGACTCGCGTCCCCCNCGCCGCGCGCCGTGTAGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTTCGAC AATGATCCTTCCGCAGGTTTCACCTACGGAAACCTTGTT	
TGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGCGCCGTGCGGCACCGACACC GTTGGGTTCGTTTCATTGATGCCCTTGCAGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAACCACCACT AGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCACGGGGGGCCAATATCCG CCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTC GGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTAT CGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTATGATAGA CGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTTAAGTTTTCTTGGCGCATT CCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCAGCGCACGACGGGG AGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTAGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTTCGACAATG ATCCTTCCGCAGGTTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGAC	<i>P. vulgaris</i> (5)
TTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGCGCCGTGCGGCACC GACACCGTTGGGTTCGTTTCATTGATGCCCTTGCAGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAACC ACCACTTGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCACGGGGGGCCAA TATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGT GCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACC AAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTAT GATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTTAAGTTTTCTTGG CGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCAGCGCACG ACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTTCG ACAATGATCCTTCCGCAGGTTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACT	<i>P. grandiflora</i> (1)
TTCNTCCNGNNTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGC GCCGTGCGGCACCGACACCGTTGGGTTCGTTTCATTGATGCCCTTGCAGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAG ATTGAGGTTCAACCACCACTTGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCG CACGGGGGGCCAATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACG CCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTTC TGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTC GTTTTGACATTATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTT	<i>P. grandiflora</i> (2)

AAGTTTTCTTGGCGCATTCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGG ATTCAGCGCACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCT TTTGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCANGTTCACCTACGGAAACCTTGNT	
TATTGATATGNTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCNTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGCGCCGTGCGGCA CCGACACCGTTGGGTCTTCATTGATGCCCTTGCGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAA CCACCACTTGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCACGGGGGGCC AATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGAC GTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACA CCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATT ATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTTAAGTTTTCTT GGCGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCAGCGCA CGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTT CGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGT	<i>P. grandiflora (3)</i>
TTCCTCCNNTTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGC GCCGTGCGGCACCGACACCGTTGGGTNGTTCATTGATGCCCTTGCGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAG ATTGAGGTTCAACCACCACTTGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCG CACGGGGGGCCAATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACG CCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCT TGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTC GTTTTGACATTATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTT AAGTTTTCTTGGCGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGG ATTCAGCGCACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTNTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGC TTTTGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA	<i>P. grandiflora (4)</i>
TCCTCCNNTTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGCGC CGTGCGGCACCGACACCGTTGGGTGTTTCATTGATGCCCTTGCGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATT GAGGTTCAACCACCACTTGTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCACGCCGAGGCGCA CGGGGGGCCAATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTTCGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCC CAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTG CAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGT TTTGACATTATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTTAA GTTTTCTTGGCGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGAT TCAGCGCACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTT TGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA	<i>P. grandiflora(5)</i>
TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTTCGAAGGTGGGGTGCCGTGNGGC	<i>P. laciniata (1)</i>

ACCGACACCGTTGGGTCGTTTCATTGATGCCCTTACGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCA ACCACCACTTGTGCGGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCGCGCCGAGGCGCACGGGGGGC CAATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTGGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGA CGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCAC ACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACAT TATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCNNGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTTTTCTT TGGCGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCGTGCG ACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGT TTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTT	
TAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGGTGGGGTGCCGTGCGGCACCGACACCGTTG GGTCGTTTCATTGATGCCCTTACGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAACCACCACTTGTG GCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCGCACCGAGGCGCACGGGGGGCCAATATCCGCCCC ACTCGCCGGCACGTTGGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCC TAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCA TTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTATGATAGACGAC CGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCGGGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTTTTCTTGGCGCATTCGCG GCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCGTGCGACGACGGGGAGAC TCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTTCGACAATGATCC TTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTT	<i>P. laciniata</i> (2)
GGCACCGACACCGTTGGGTCGTTTCATTGATGCCCTTACGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGT TCAACCACCACTTGTGCGGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCGCGCCGAGGCGCACGGGG GGCCAATATCCGCCNCCACTCGCCGGCACGTTGGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGG CAGACGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAAT TCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTG ACATTATGATAGACGACCGGTCCCCCNGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCAGGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTT TTCCTTGGCGCATTCGCGCGCCGGGGTTCGTTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTTCG TCGACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGC AGGTTTCGACNATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCT	<i>P. laciniata</i> (3)
ATGCTTAAACTCAGCGNNTAATCCCGCNTGACCTGGGGTCGCGGTCTGAAGGTGGGGTGCCGTGCGGCACCGACA CCGTTGGGTCGTTTCATTGATGCCCTTACGGACGACGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAACCACCA CTTGTGCGGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCATTTGGGCCGACCGCGCGCCGAGGCGCACGGGGGGCCAATATC CGCCCCACTCGCCGGCACGTTGGTGCGCGGTGAGGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCAGGCAGACGTGCCC TCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGT ATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTATGATA	<i>P. laciniata</i> (4)

GACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGGGCTGCNNGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTTTTCTTGGCGCA TTCCGCGCCGGGGTTCGTAGCCCGAACGACGCGACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTCGTTCGCACGACGG GGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGTTGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTTCGACAA TGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA	
TGGGGTCGCGGTCTGAAGGNGGGGTGCCGTGTGGCACCGACACCGTTGGGTCGTTCAATTGATGCCCTTACGGACGA CGCGGGAGCACGACGATTGAGAGATTGAGGTTCAACCACCACTTGTTCGCGACACGAGTCGCCGAGGGATCGCAT TTGGGCCGACCGCGCGCCGAGGCGCACGGGGGGCCAATATCCGCCCCACTCGCCGGCACGTTGGTTCGCGCGGTGA GGTGGGGCGACGCGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAAAGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTC AAAGACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGA GCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACATTATGATAGACGACCGGTCCCCCGCAGGTTCCGCGGACGG GCTGCNNGGATGCGGACGCTTCGTAAAGTTTTCTTGGCGCATTCCGCGCCGGGGTTCGTAGCCCGAACGACGC GACCCGAGGGAGCGCGCCGGCGGGGATTCGTTCGCACGACGGGGAGACTCGCGTCCCCCGCGCCGCGCGCCGTGT TGTTAAGCACGTGTTTCGCGGTCTGCTTTTGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTT GTTANNNNNNTTNACT	<i>P. laciniata (5)</i>

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Таблица 4.1 – Спектры ЯМР¹H (500 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_H, м.д., J/Гц) и ¹³C (125 Гц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_C, м.д.) соединения 1 и арбутина (*Брусники обыкновенной* *листья*)

С-атом	δ _H	δ _C	Арбутин, δ _C
1	-	153.5	153.4
2, 6	6.90 (2H, д, J = 8.9)	119.2	118.9
3, 5	6.67 (2H, д, J = 8.9)	116.0	116.2
4	-	152.9	152.7
1'	4.97 (1H, д, J = 7.5)	102.3	103.5
2'	5.11 (1H, дд, J = 7.5, 9.2)	75.0	74.8
3'	3.70 (1H, м)	76.1	78.2
4'	3.47 (1H, м)	71.9	71.2
5'	3.62 (1H, м)	75.2	78.3
6'	4.50 (1H, дд, J = 2.0, 12.0), 4.25 (1H, дд, J = 5.8, 12.0)	65.1	62.2
1''	-	127.4 ^Г	
2''	7.07 ^а (1H, д, J = 2.1)	115.4 ^Д	
3''	-	148.6 ^Е	
4''	-	146.2 ^Ж	
5''	6.70 ^Б (1H, д, J = 8.0)	116.9 ^З	
6''	6.87 ^В (1H, дд, J = 2.0, 8.0)	123.5 ^И	
7''	7.51 (1H, д, J = 15.9)	147.4	
8''	6.29 (1H, д, J = 15.9)	115.1	
9''	-	168.3	
1'''	-	127.9 ^Г	
2'''	7.11 ^а (1H, д, J = 2.0)	116.3 ^Д	
3'''	-	149.2 ^Е	
4'''	-	146.8 ^Ж	
5'''	6.75 ^Б (1H, д, J = 8.0)	117.3 ^З	
6'''	6.92 ^В (1H, дд, J = 2.1, 8.0)	123.9 ^И	
7'''	7.59 (1H, д, J = 16.0)	147.5	
8'''	6.31 (1H, д, J = 16.0)	115.8	
9'''	-	168.7	

^{а-и} Сигналы могут быть взаимно заменены

Таблица 4.2 – Спектры ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{MeOH-}d_4$, 298 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 Гц, $\text{MeOH-}d_4$, 298 К, δ_{C} , м.д.) соединений 2, 3 и кверцитрина (*Брусники обыкновенной листья*)

С-атом	2		3		Кверцитрин	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		157.3		157.9		158.0
3		134.7		135.2		134.8
4		178.3		179.0		179.2
5		162.4		161.9		162.3
6	6.20 (1H, д, J = 2.1)	99.3	6.18 (1H, д, J = 2.0)	98.7	6.21 (1H, д, J = 1.9)	99.0
7		165.3		165.0		165.4
8	6.42 (1H, д, J = 2.1)	94.1	6.41 (1H, д, J = 2.0)	94.0	6.38 (1H, д, J = 1.9)	94.5
9		156.4		157.2		157.0
10		104.6		104.9		105.1
1'		120.7		121.2		120.5
2'	7.28 (1H, д, J = 2.0)	116.9	7.31 (1H, д, J = 2.0)	117.3	7.30 (1H, д, J = 2.2)	116.8
3'		145.7		146.0		146.2
4'		148.5		148.2		148.2
5'	6.89 (1H, д, J = 8.0)	116.0	6.92 (1H, д, J = 8.0)	116.7	6.86 (1H, д, J = 8.1)	116.3
6'	7.25 (1H, дд, J = 2.0, 8.0)	122.5	7.21 (1H, дд, J = 2.0, 8.0)	123.0	7.29 (1H, дд, J = 2.0, 8.1)	122.7
1''	5.47 (1H, д, J = 1.5)	100.2	5.49 (1H, д, J = 1.7)	100.5	5.40 (1H, д, J = 1.7)	102.0
2''	5.31 (1H, м)	72.4	5.35 (1H, м)	72.6	4.18 (1H, м)	70.6
3''	4.02 (1H, м)	69.9	4.07 (1H, м)	69.5	3.98 (1H, м)	71.2
4''	3.37 (1H, м)	72.1	4.79 (1H, м)	73.0	3.42 (1H, м)	71.9
5''	3.57 (1H, м)	70.6	3.69 (1H, м)	67.5	3.62 (1H, м)	70.5
6''	0.95 (1H, д, J = 6.1)	17.6	0.86 (1H, д, J = 6.1)	17.0	0.91 (1H, д, J = 6.0)	17.5
1'''		171.3		171.2		
2'''	2.43 (1H, д, J = 15.0), 2.37 (1H, д, J = 15.0)	45.9	2.42 (1H, д, J = 14.9), 2.39 (1H, д, J = 14.9)	45.7		
3'''		70.5		69.9		
4'''	2.65 (1H, д, J = 14.0), 2.58 (1H, д, J = 14.0)	45.4	2.69 (1H, д, J = 14.0), 2.61 (1H, д, J = 14.0)	45.3		

5'''	1.05 (3H, c)	176.5	1.09 (3H, c)	175.9	
6'''		27.3		27.3	
1'''				171.7	
2'''				46.3	
3'''				70.4	
4'''				46.0	
5'''				176.3	
6'''				27.6	

Таблица 4.3 – Спектры ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{MeOH-}d_4$, 298 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 Гц, $\text{MeOH-}d_4$, 298 К, δ_{C} , м.д.) соединений 1–3
(Брусники обыкновенной победы)

С-атом	1		2		С-атом	3	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}
	(-)-Эпикатехин		(+) -Катехин			(+) -Катехин	
2	4.89 (1H, д, J = 2.0)	76.3	4.50 (1H, д, J = 8.0)	80.1	2	4.57(1H, д, J = 8.0)	80.6
3	4.25 (1H, м)	73.0	3.92 (1H, м)	74.8	3	3.89(1H, м)	74.6
4	2.69 (1H, дд, J = 4.0, 17.0)	28.3	2.48 (1H, дд, J = 8.5, 16.1)	27.4	4	2.45(1H, дд, J = 8.4, 16.0)	28.3
	2.89 (1H, дд, J = 4.0, 17.0)		2.87 (1H, дд, J = 5.4, 16.1)			2.89(1H, дд, J = 5.5, 16.0)	
5		156.7		156.8	5		157.5
6	6.00 (1H, д, J = 2.1)	95.7	6.02 (1H, д, J = 2.0)	95.2	6	6.04(1H, д, J = 2.1)	95.0
7		158.6		158.1	7		158.3
8	5.99 (1H, д, J = 2.1)	96.3	5.93 (1H, д, J = 2.0)	96.1	8	5.97(1H, д, J = 2.1)	96.4
9		156.1		156.4	9		156.2
10		100.4		100.3	10		100.7
1'		132.0		132.1	1'		131.8
2'	7.06 (1H, д, J = 2.0)	115.9	6.99 (1H, д, J = 1.9)	115.6	2'	7.02 (1H, д, J = 2.0)	115.7
3'		145.9		145.8	3'		145.9
4'		145.6		145.6	4'		145.7
5'	6.85 (1H, д, J = 8.1)	115.2	6.77 (1H, д, J = 8.2)	115.3	5'	6.79 (1H, д, J = 8.0)	115.2
6'	6.74 (1H, дд, J = 2.0, 8.1)	120.4	6.71 (1H, дд, J = 1.9, 8.2)	120.3	6'	6.68 (1H, дд, J = 2.0, 8.0)	120.4
	3-O- α -L-Рамнопираноза		3-O- α -L-Рамнопираноза			3-O- α -L-Рамнопираноза	
1''	5.40 (1H, д, J = 1.7)	102.5	5.45 (1H, д, J = 1.6)	101.6	1''	5.52 (1H, д, J = 1.5)	100.7
2''	4.21 (1H, м)	70.7	4.10 (1H, м)	69.9	2''	5.39 (1H, м)	73.2
3''	3.94 (1H, м)	71.1	3.92 (1H, м)	67.9	3''	4.11 (1H, м)	69.2
4''	3.40 (1H, м)	71.7	4.80 (1H, м)	73.3	4''	4.85 (1H, м)	73.5
5''	3.69 (1H, м)	70.6	3.65 (1H, м)	67.3	5''	3.62 (1H, м)	67.2
6''	0.87 (1H, д, J = 5.9)	17.9	0.89 (1H, д, J = 6.0)	17.2	6''	0.91 (1H, д, J = 6.1)	17.0
			4''-O-(3'''-Гидрокси-3'''-метилглутароил)			2''-O-Галлоил	
1'''				171.8	1'''		121.9 ^б
2'''			2.38 (1H, д, J = 15.0), 2.25 (1H, д, J	45.5	2''', 6'''	7.03 (2H, с) ^а	109.7 ^в

	= 15.0)				
3'''		68.4	3''', 5'''		146.3 ^г
4'''	2.71 (1H, д, J = 14.2), 2.57 (1H, д, J = 14.2)	45.0	4'''		138.4 ^д
5'''		175.5	7'''		167.5
6'''	1.11 (3H, с)	27.1		4''-O-Галлоил	
			1''''		122.2 ^б
			2''', 6'''	7.05 (2H, с) ^а	110.3 ^в
			3''', 5'''		146.7 ^г
			4''''		138.7 ^д
			7''''		167.9

^{а-д} Сигналы могут быть взаимно заменены.

Таблица 4.4 – Спектры ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 298 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 298 К, δ_{C} , м.д.) соединения 1 (черноголовка крупноцветковая)

С-атом	δ_{H}	δ_{C}
2		157.2
3		134.6
4		177.6
5		160.8
6	6.10 (1H, д, J = 1.9)	99.1
7		163.6
8	6.41 (1H, д, J = 1.9)	94.8
9		155.8
10		103.6
1'		120.2
2'	7.70 (1H, д, J = 2.0)	116.7
3'		145.0
4'		148.4
5'	6.92 (1H, д, J = 8.1)	116.0
6'	7.52 (1H, дд, J = 2.0, 8.1)	124.1
	3-O- β -D-Glcp	
1''	5.12 (1H, д, J = 7.2)	100.5
2''	3.47 (1H, м)	75.6
3''	3.45 (1H, м)	77.0
4''	3.57 (1H, м)	72.0
5''	3.38 (1H, м)	76.5
6''	3.52 (1H, дд, J = 12.0, 5.0)	67.5
	3.81 (1H, дд, J = 12.0, 1.2)	
	4''-O- β -D-Xylp	
1'''	4.79 (1H, д, J = 7.1)	104.6
2'''	3.35 (1H, м)	74.2
3'''	3.36 (1H, м)	76.4
4'''	3.55 (1H, м)	70.3
5'''	3.27 (1H, м), 4.01 (1H, м)	65.2
	6''-O- α -L-Rhap	

1''	4.53 (1H, д, J = 1.9)	101.7
2''	3.63 (1H, м)	71.5
3''	3.50 (1H, м)	71.8
4''	3.23 (1H, м)	73.7
5''	3.40 (1H, м)	69.4
6''	1.11 (1H, д, J = 6.8)	17.5

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Толокнянки листья

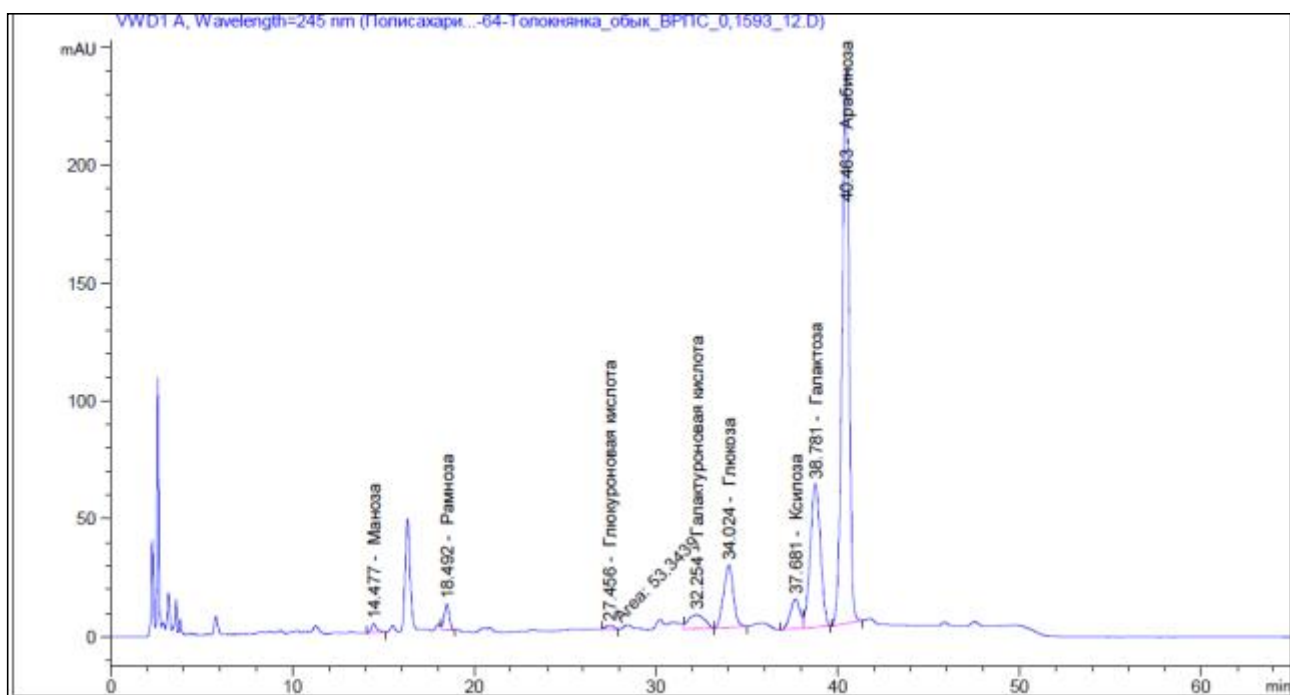


Рисунок 5.1 – Хроматограмма испытуемого раствора толокнянки обыкновенной (листья) ВРПС

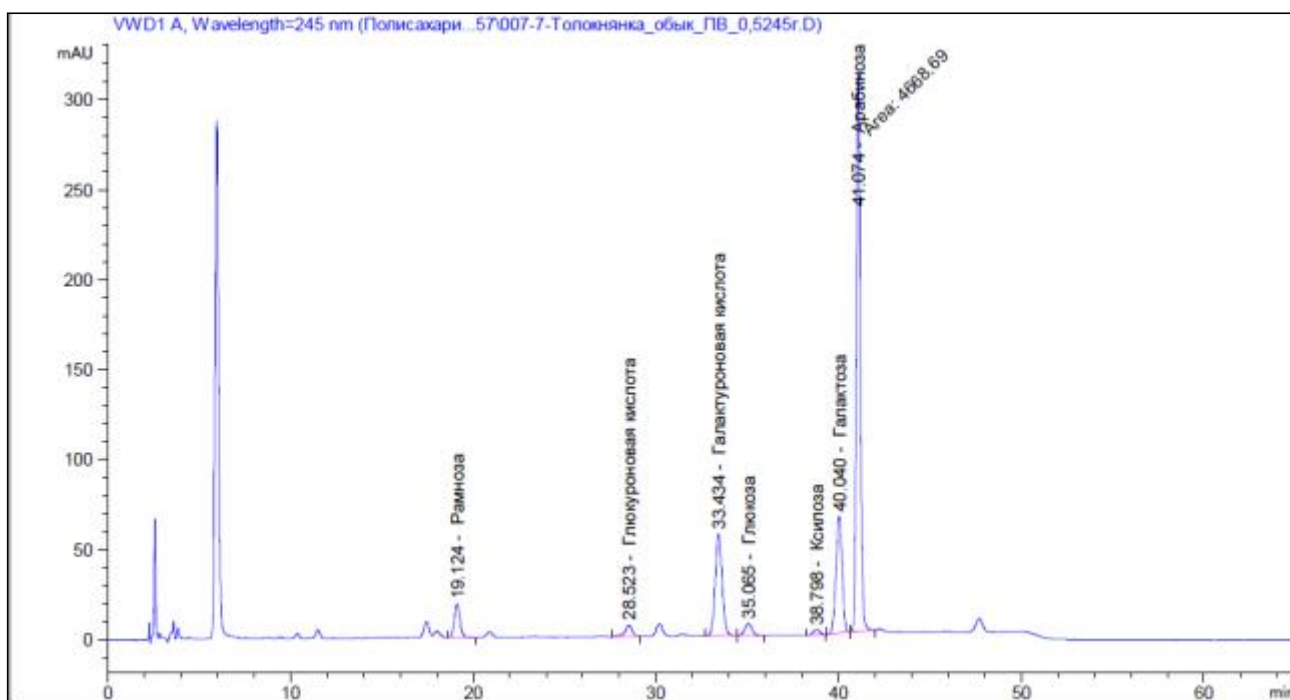


Рисунок 5.2 – Хроматограмма испытуемого раствора толокнянки обыкновенной (листья) ПВ

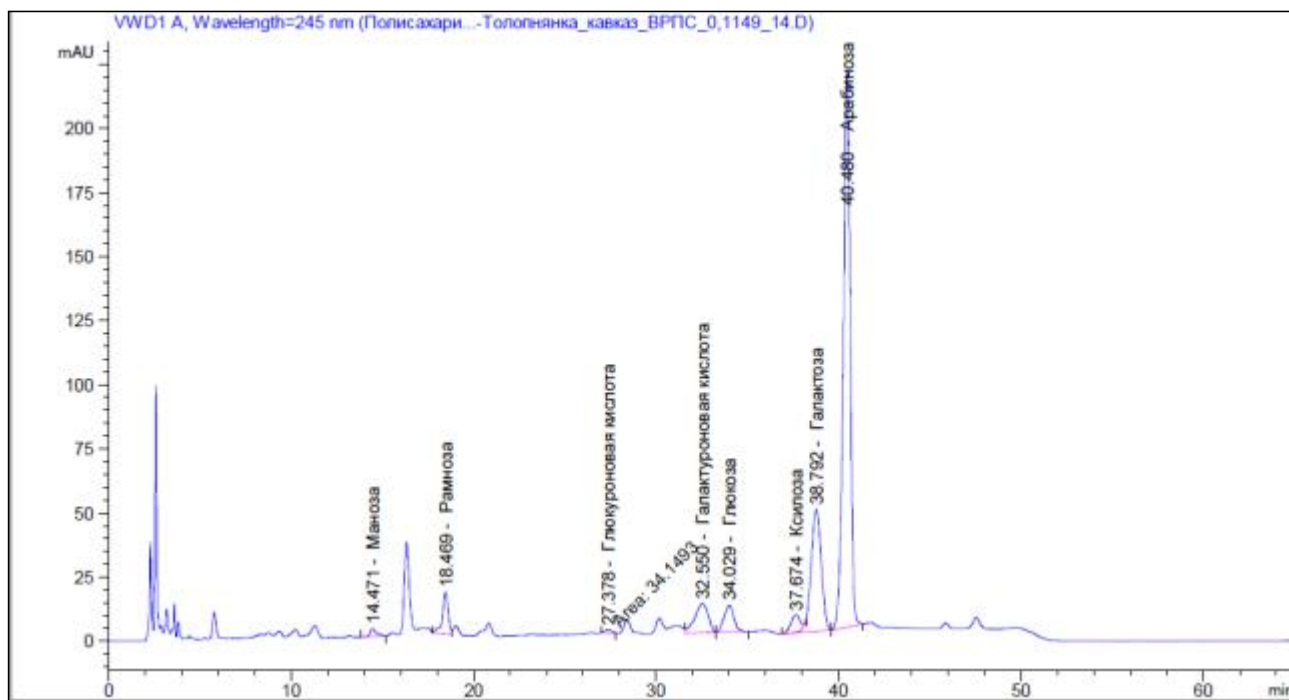


Рисунок 5.3 – Хроматограмма испытуемого раствора толокнянки кавказской (листья) ВРПС

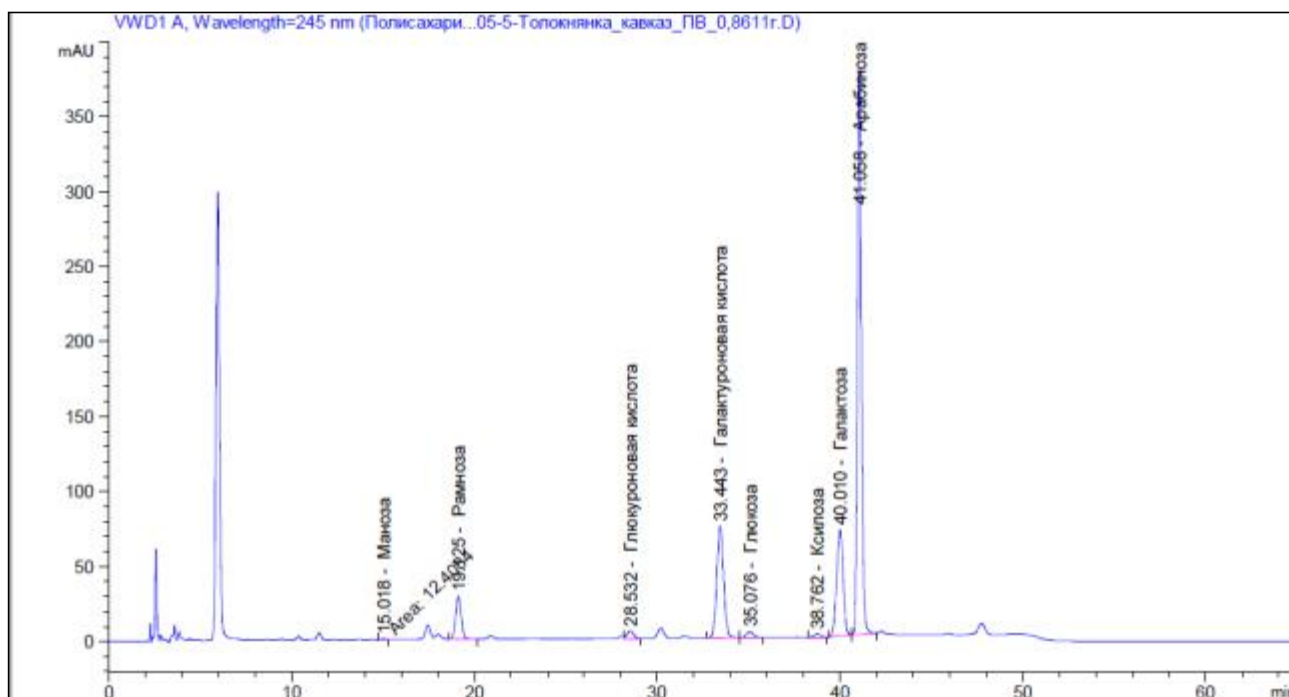
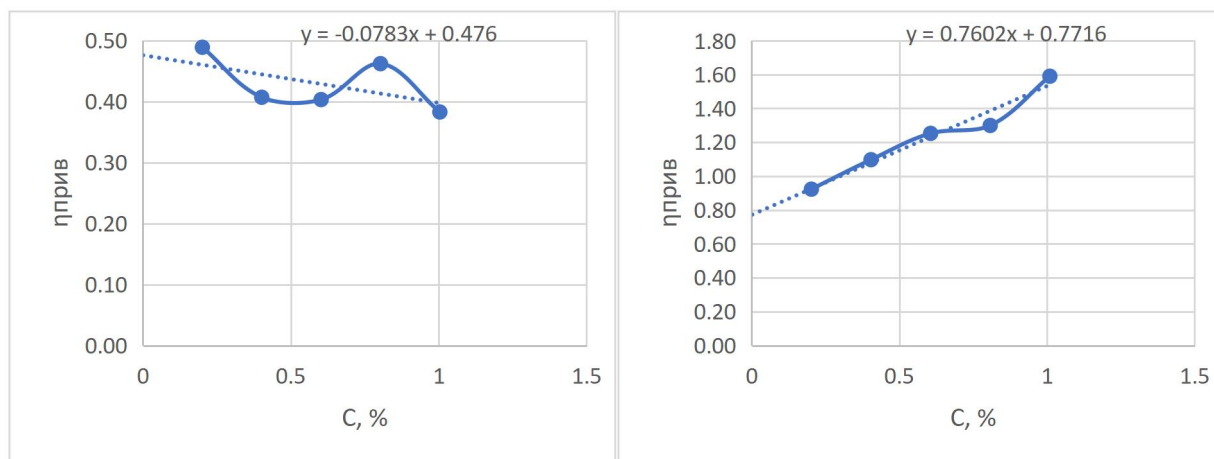


Рисунок 5.4 –Хроматограмма испытуемого раствора толокнянки кавказской (листья) ПВ

Таблица 5.1 – Определение средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, выделенных из толокнянки листьев (температура 21°C)

№	Концентрация C, %	Время истечения t, с	$\eta_{\text{отн}}$	$\eta_{\text{уд}}$	$\eta_{\text{пр}}$	Характеристическая вязкость $[\eta]$	Молярная масса M, г/моль
ВРПС толокнянки обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,48	7303
1	0,20	28,76	1,10	0,10	0,49		
2	0,40	30,72	1,16	0,16	0,41		
3	0,60	33,89	1,24	0,24	0,40		
4	0,80	34,22	1,37	0,37	0,46		
5	1,00	27,15	1,38	0,38	0,38		
ПВ толокнянки обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,77	10916
1	0,20	29,33	1,19	0,19	0,92		
2	0,40	35,67	1,44	0,44	1,10		
3	0,60	43,47	1,76	0,76	1,25		
4	0,80	50,65	2,05	1,05	1,30		
5	1,00	64,39	2,60	1,60	1,59		
ВРПС толокнянки кавказской							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,20	3516
1	0,20	25,80	1,04	0,04	0,22		
2	0,40	27,21	1,10	0,10	0,25		
3	0,60	28,20	1,14	0,14	0,23		
4	0,80	29,64	1,20	0,20	0,25		
5	1,00	32,39	1,31	0,31	0,31		
ПВ толокнянки кавказской							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,54	8150

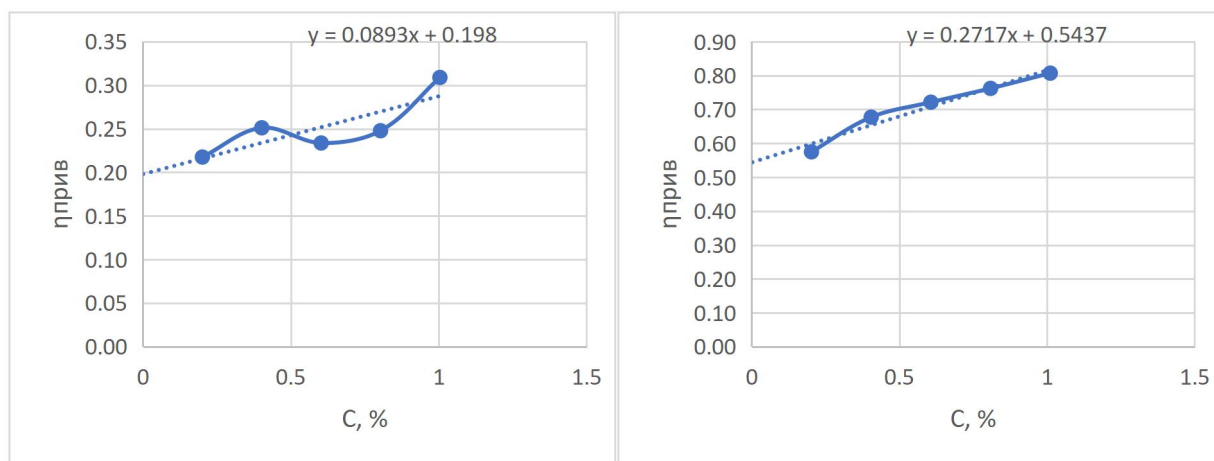
1	0,20	27,59	1,12	0,12	0,57		
2	0,40	31,49	1,27	0,27	0,68		
3	0,60	35,54	1,44	0,44	0,72		
4	0,80	39,96	1,62	0,62	0,76		
5	1,00	44,89	1,82	0,82	0,81		



(a)

(b)

Рисунок 5.5 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций толокнянки обыкновенной листьев: а – ВРПС; б– ПВ



(a)

(b)

Рисунок 5.6 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций толокнянки кавказской листьев: а – ВРПС; б– ПВ

Таблица 5.2 – Определение ИЭТ ВРПС и ПВ, выделенных из толокнянки листьев (температура 21°C)

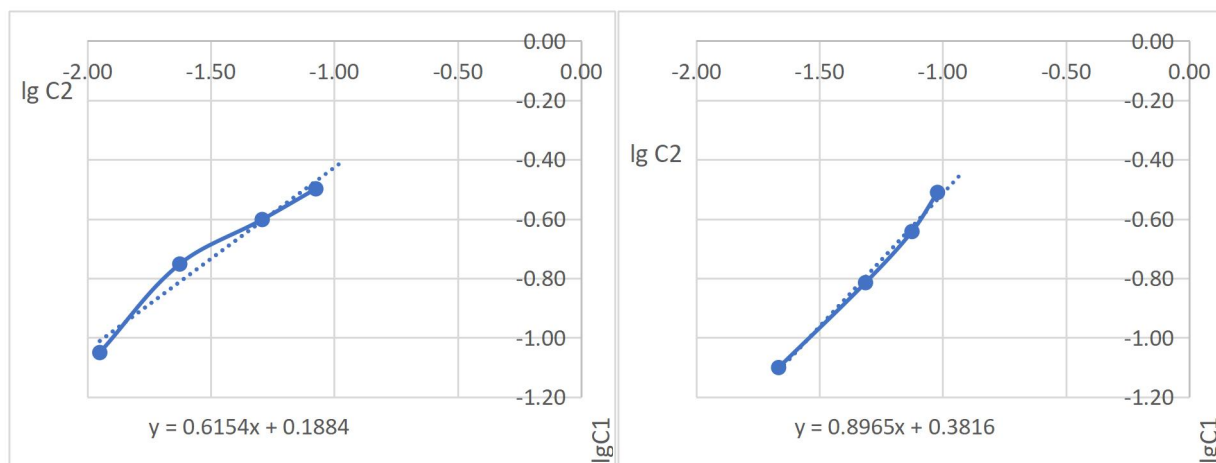
№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9,7	9,2	7,8	5,2	2,6	1,0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0,3	0,8	2,2	4,8	7,4	9,0	–
pH раствора	3,2	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	–
ВРПС толокнянки обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	29,00	29,18	28,53	29,31	28,88	29,23	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,17	1,18	1,15	1,19	1,17	1,18	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						
ПВ толокнянки обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	29,05	29,07	28,56	28,49	28,60	28,76	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,18	1,18	1,16	1,15	1,16	1,16	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,7						
ВРПС толокнянки кавказской							
Время истечения <i>t</i> , с	24,75	25,11	25,12	25,16	25,49	25,40	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,00	1,02	1,02	1,02	1,03	1,03	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,2						
ПВ толокнянки кавказской							
Время истечения <i>t</i> , с	29,95	29,48	28,75	29,62	28,30	29,36	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,21	1,19	1,16	1,20	1,14	1,19	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	5,2						

Таблица 5.3 – Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС и ПВ,

выделенных из толокнянки листьев

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %
<i>ВРПС толокнянки обыкновенной</i>											
1	0,10	9228	10392	0,09	0,01	-1,05	-1,95	1,54	0,62	1,41	39,2
2	0,20	5397	6119	0,18	0,02	-0,75	-1,63			1,77	
3	0,30	3706	4463	0,25	0,05	-0,60	-1,29			1,56	
4	0,40	2845	3600	0,32	0,08	-0,50	-1,07			1,45	
									K _{сред} =	1,55	
<i>ПВ толокнянки обыкновенной</i>											
1	0,10	2220,4	2825	0,08	0,02	-1,10	-1,67	2,40	0,90	2,46	29,4
2	0,20	1222,75	1610,63	0,15	0,05	-0,81	-1,31			2,30	
3	0,30	859,03	1141,92	0,23	0,08	-0,64	-1,12			2,32	
4	0,40	692,64	906,36	0,31	0,10	-0,51	-1,02			2,54	
									K _{сред} =	2,41	
<i>ВРПС толокнянки кавказской</i>											
1	0,10	4554	4789	0,10	0,00	-1,02	-2,31	0,50	0,24	0,34	65,9
2	0,20	2968	3066	0,19	0,01	-0,71	-2,19			0,65	
3	0,30	2190	2413	0,27	0,03	-0,56	-1,56			0,65	
4	0,40	1795	2720	0,26	0,14	-0,58	-0,86			0,43	
									K _{сред} =	0,52	

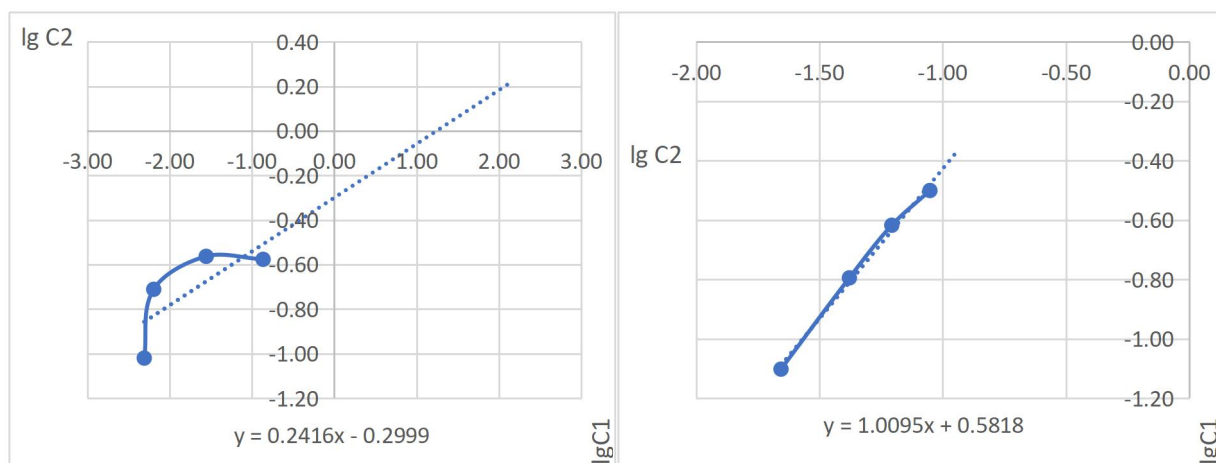
<i>ПВ толокнянки кавказской</i>											
1	0,10	767	982	0,08	0,02	-1,10	-1,66	3,81	1,01	3,70	20,8
2	0,20	408	514	0,16	0,04	-0,79	-1,38			3,94	
3	0,30	281	353	0,24	0,06	-0,62	-1,21			3,98	
4	0,40	225	288	0,32	0,09	-0,50	-1,05			3,64	
									К _{сред} =	3,82	



(a)

(b)

Рисунок 5.7 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций толокнянки обыкновенной листьев: а – ВРПС; б– ПВ



(a)

(b)

Рисунок 5.8 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций толокнянки кавказской листьев: а – ВРПС; б– ПВ

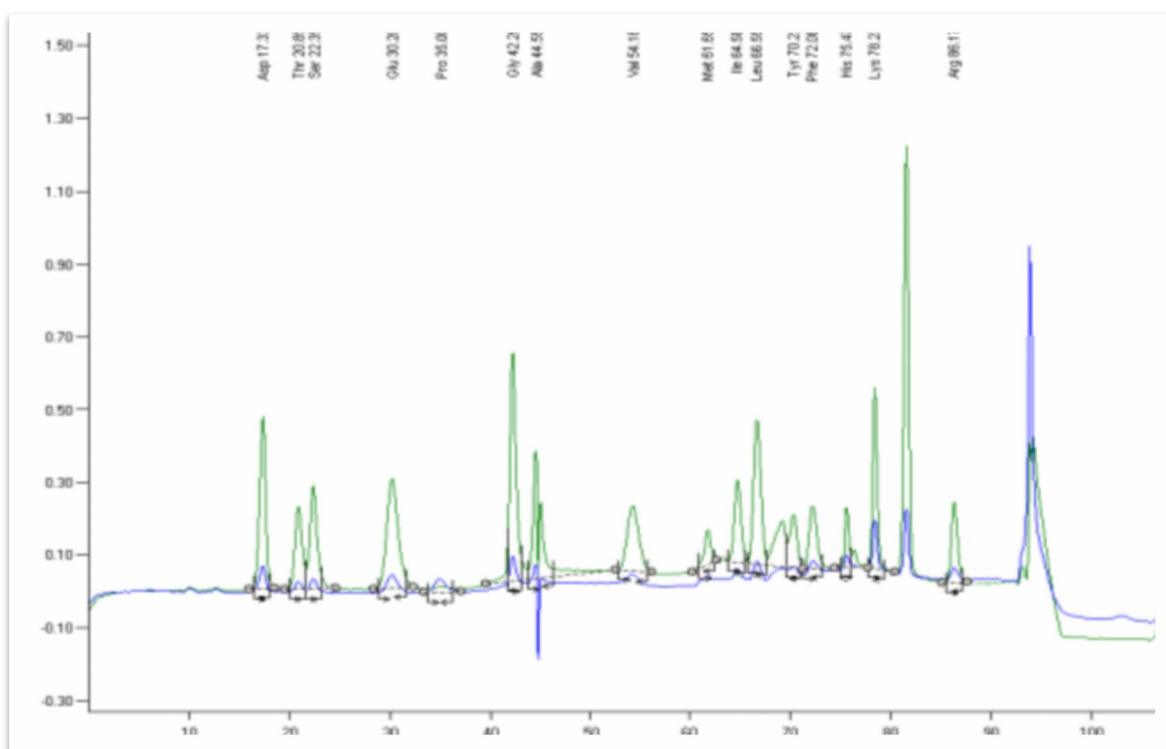


Рисунок 5.9 – Аминограмма извлечения из толокнянки кавказской листьев

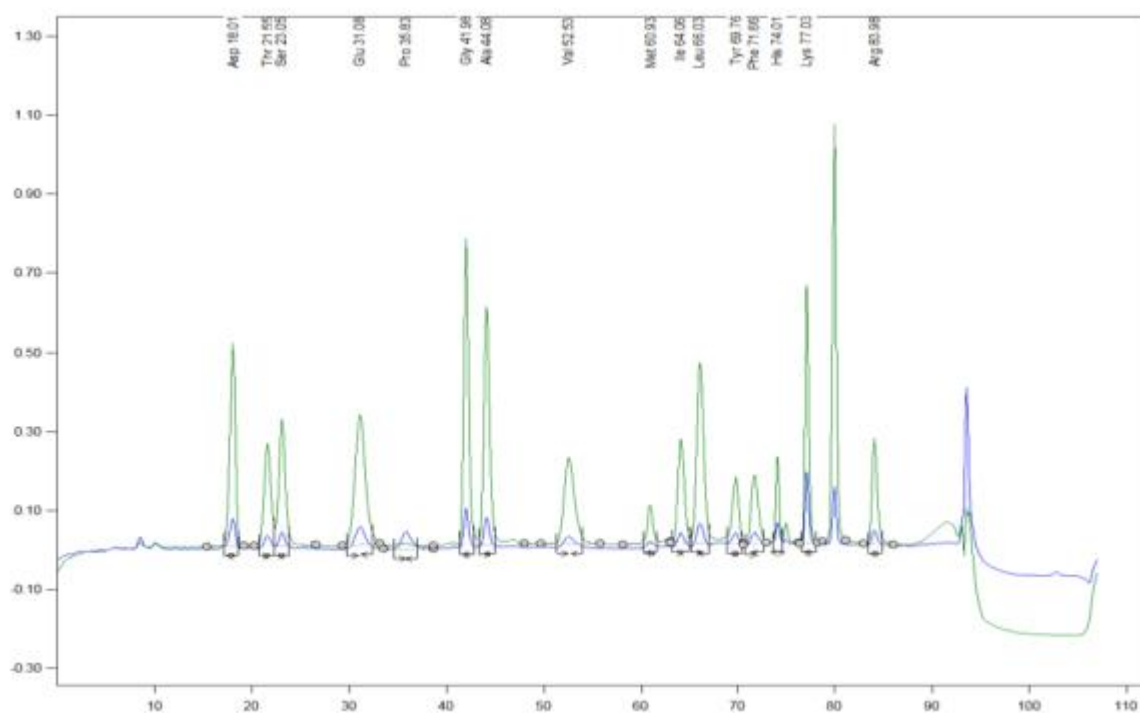


Рисунок 5.10 – Аминограмма извлечения из толокнянки обыкновенной листьев

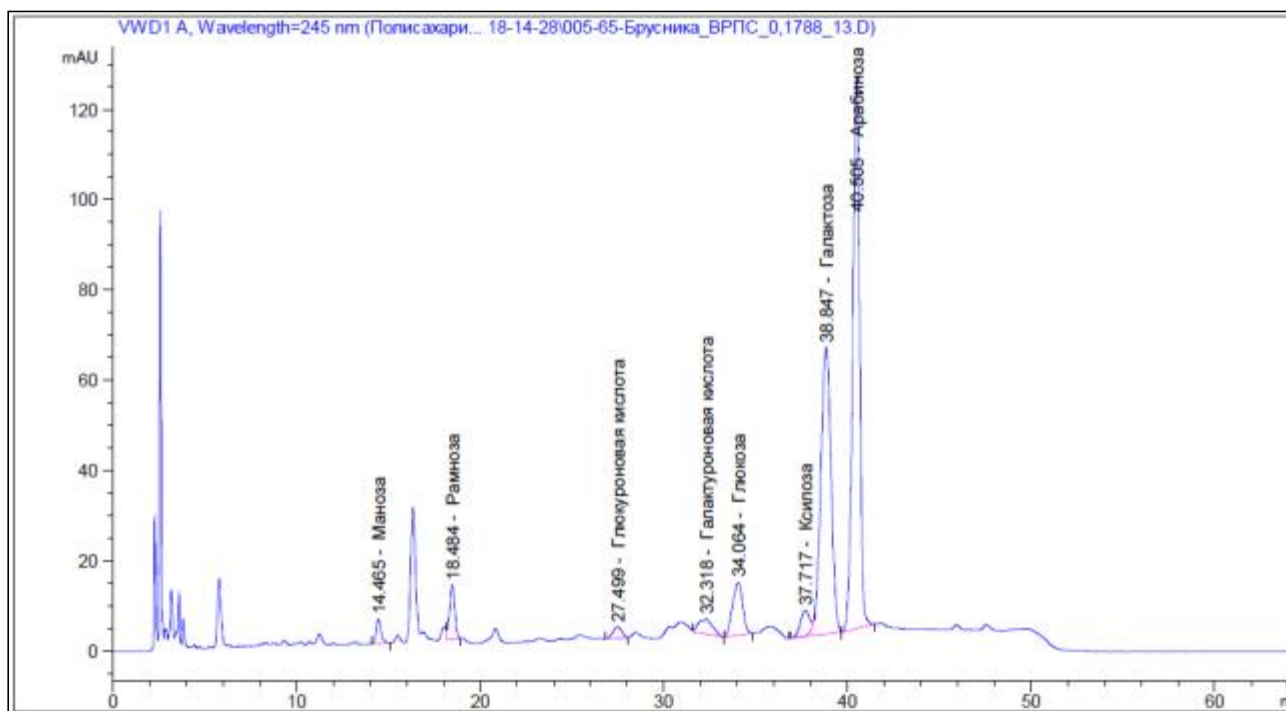


Рисунок 5.11 – Хроматограмма испытуемого раствора брусники (листья) ВРПС

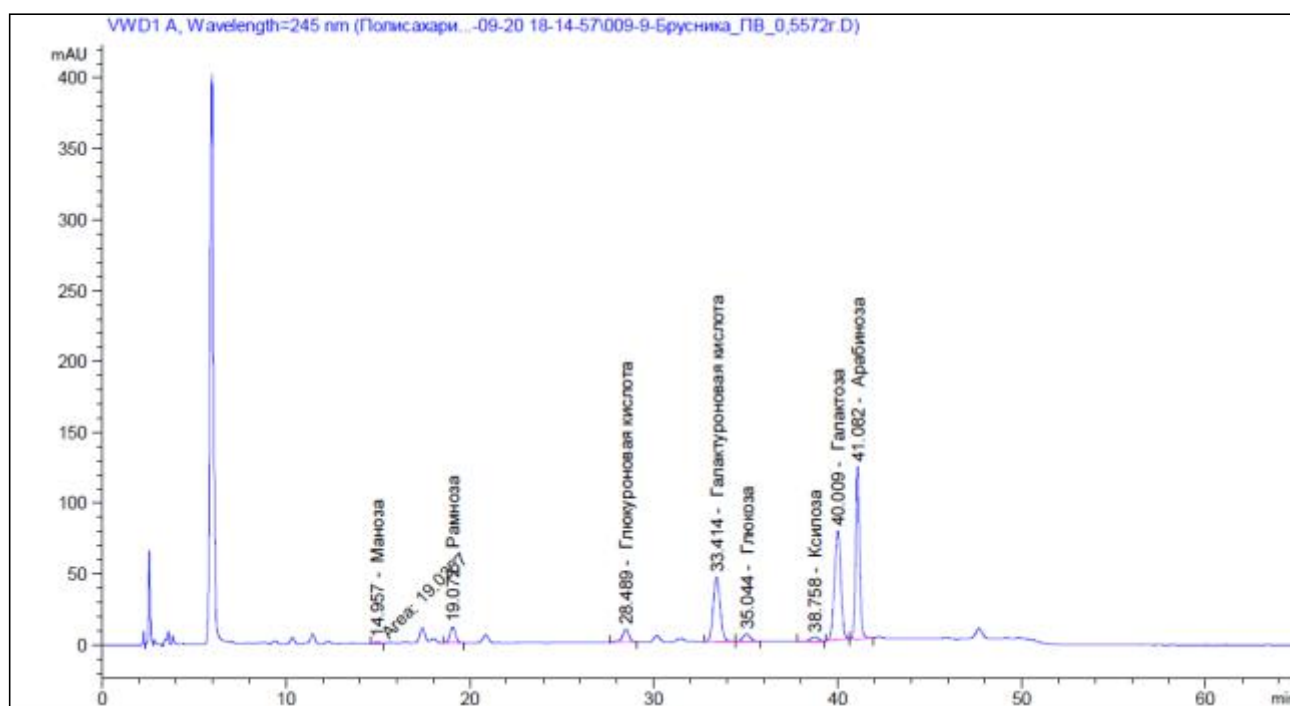


Рисунок 5.12 – Хроматограмма испытуемого раствора брусники (листья) ПВ

Таблица 5.4 – Определение средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, выделенных из брусники листьев (температура 21°C)

№	Концентрация C, %	Время истечения t, с	$\eta_{\text{отн}}$	$\eta_{\text{уд}}$	$\eta_{\text{пр}}$	Характеристическая вязкость $[\eta]$	Молярная масса M, г/моль
ВРПС брусники обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,31	5067
1	0,20	26,70	1,0802	0,0802	0,397345		
2	0,40	31,89	1,2900	0,2900	0,718226		
3	0,60	36,37	1,4711	0,4711	0,777773		
4	0,80	42,07	1,7020	0,7020	0,869151		
5	1,00	52,09	2,1072	1,1072	1,096673		
ПВ брусники обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,48	7393
1	0,20	27,37	1,1073	0,1073	0,535179		
2	0,40	31,20	1,2620	0,2620	0,653174		
3	0,60	33,65	1,3611	0,3611	0,600171		
4	0,80	38,62	1,5624	0,5624	0,701078		
5	1,00	44,64	1,8060	0,8060	0,80371		

Таблица 5.5 – Определение ИЭТ ВРПС и ПВ, выделенных из брусники обыкновенной листьев
(температура 21°C)

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9,7	9,2	7,8	5,2	2,6	1,0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0,3	0,8	2,2	4,8	7,4	9,0	–
pH раствора	3,2	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	–
ВРПС брусники обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	24,76	24,78	25,02	25,61	25,19	25,68	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,00	1,00	1,01	1,04	1,02	1,04	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,2						
ПВ брусники обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	26,06	26,70	26,55	26,03	26,58	26,37	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,05	1,08	1,07	1,05	1,08	1,07	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,7						

Таблица 5.6 – Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС и ПВ, выделенных из брусники обыкновенной листьев

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %
ВРПС брусники обыкновенной											
1	0,10	4727	4836	0,10	0,00	-1,01	-2,64	0,57	0,29	0,59	63,4
2	0,20	2671	3042	0,18	0,02	-0,75	-1,61			0,53	
3	0,30	1442	1880	0,23	0,07	-0,63	-1,15			0,51	
4	0,40	1538	1914	0,32	0,08	-0,49	-1,10			0,68	
									K _{сред} =	0,58	
ПВ брусники обыкновенной											
1	0,10	1992	2620	0,08	0,02	-1,12	-1,62	5,55	1,14	5,37	15,2
2	0,20	1051	1334	0,16	0,04	-0,80	-1,37			5,80	
3	0,30	775,2	973,1	0,24	0,06	-0,62	-1,21			5,81	
4	0,40	608,2	771,5	0,32	0,08	-0,50	-1,07			5,27	
									K _{сред} =	5,56	

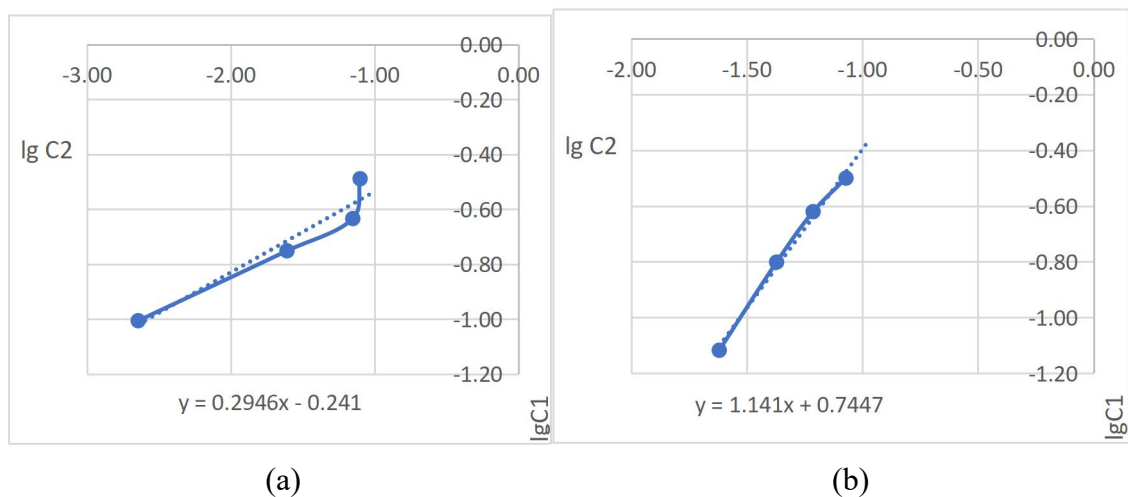


Рисунок 5.13 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций брусники обыкновенной листьев: а – ВРПС; б- ПВ

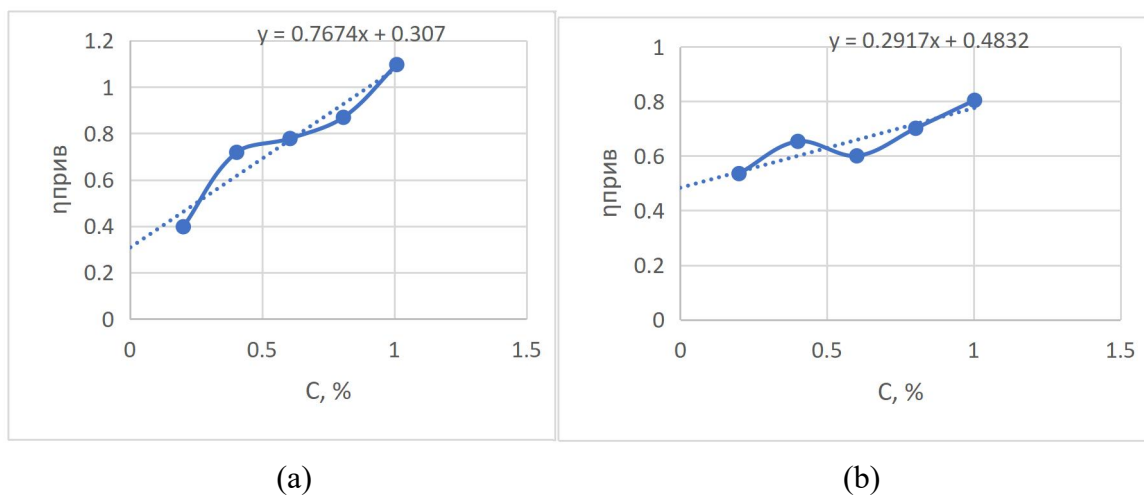


Рисунок 5.14 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций брусники обыкновенной листьев: а – ВРПС; б- ПВ

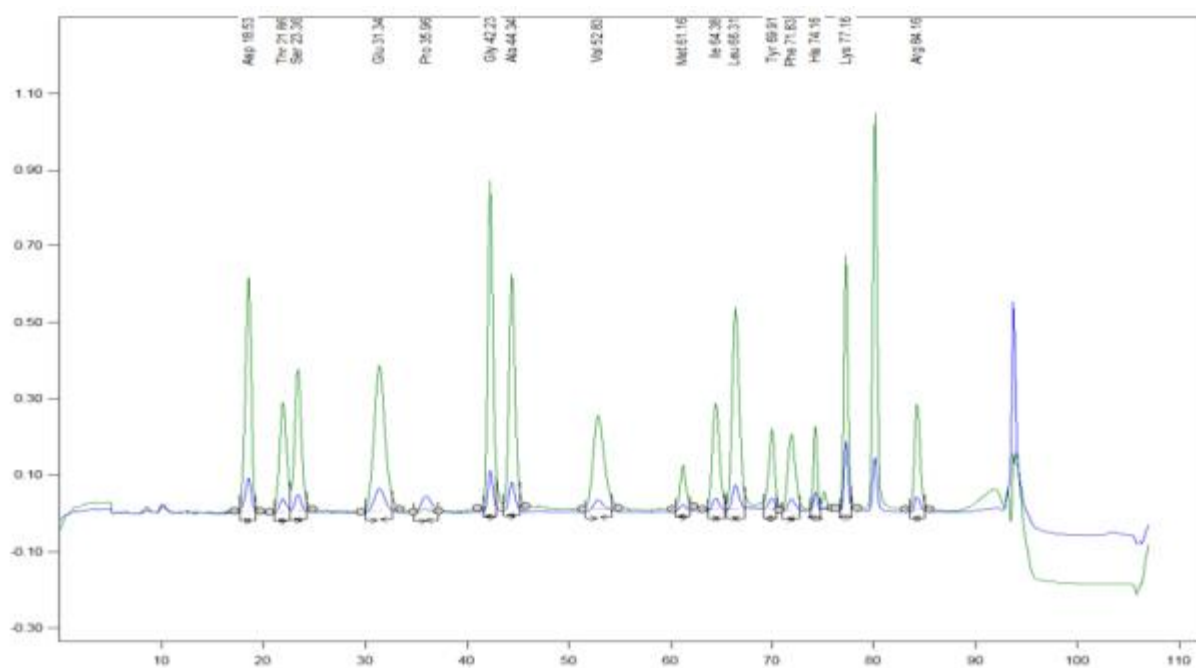


Рисунок 5.15 – Аминограмма брусники обыкновенной листьев

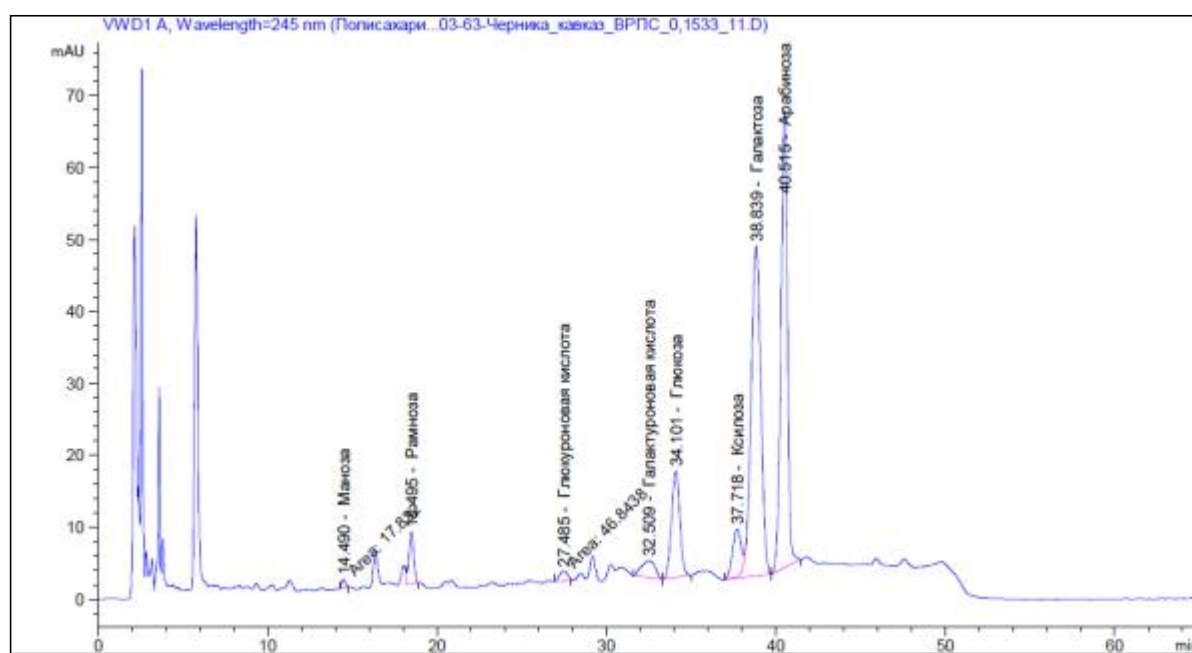


Рисунок 5.16 – Хроматограмма испытуемого раствора черники кавказской (листья) ВРПС

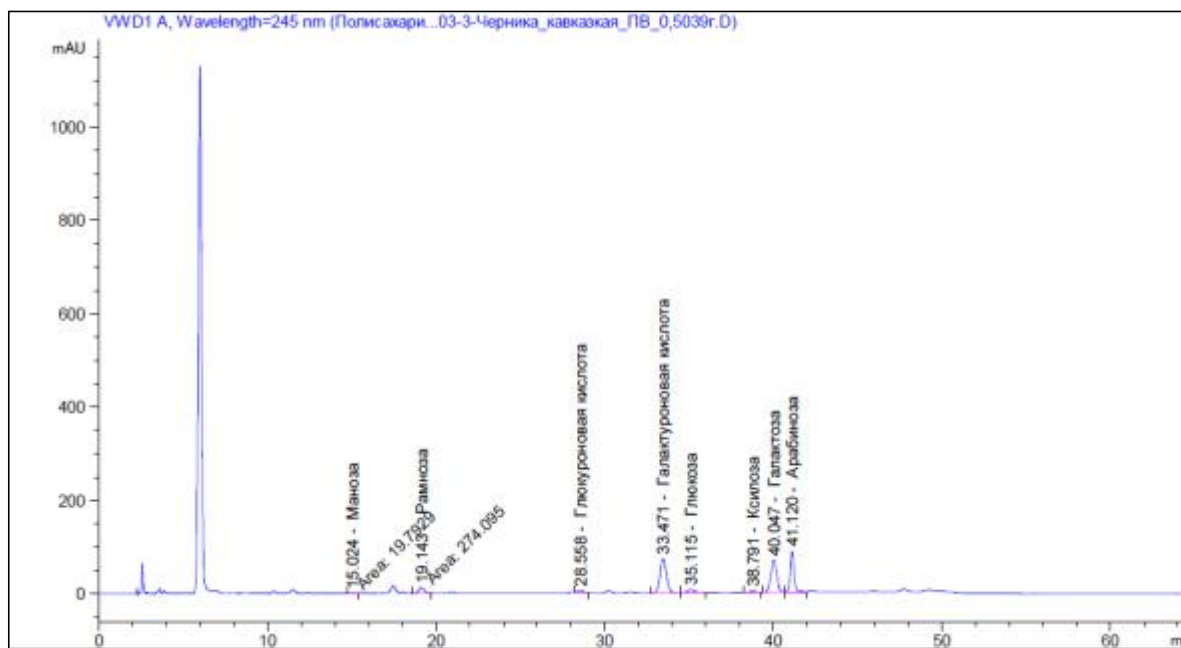


Рисунок 5.17 – Хроматограмма испытуемого раствора черники кавказской (листья) ПВ

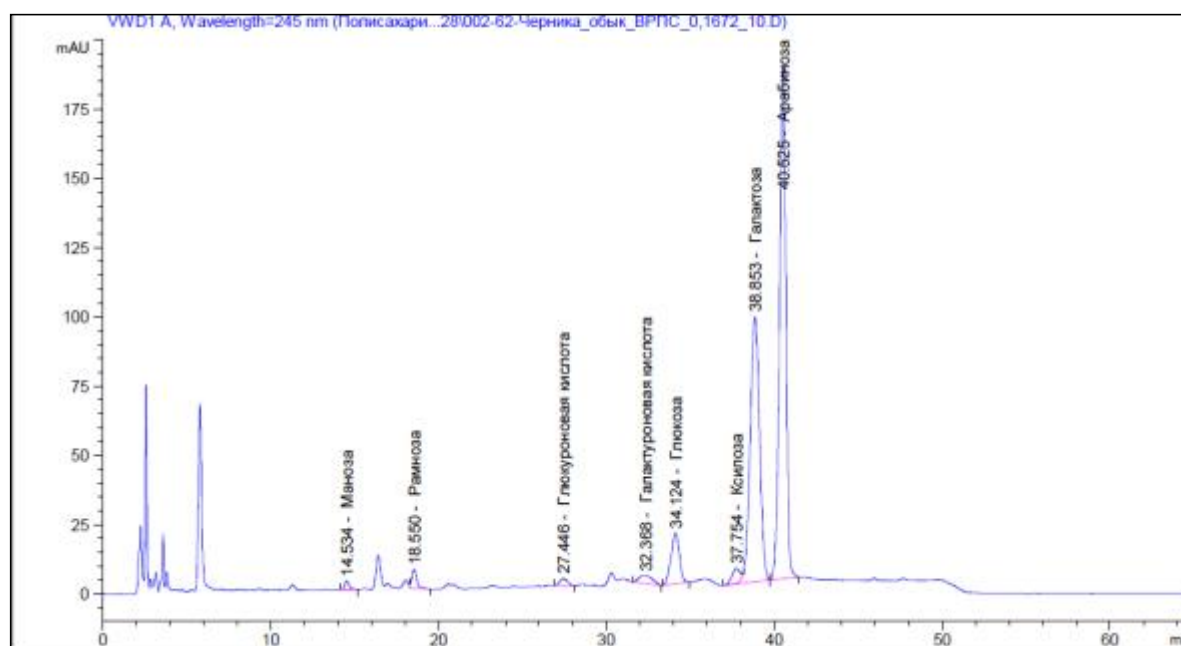


Рисунок 5.18 – Хроматограмма испытуемого раствора черники обыкновенной (листья) ВРПС

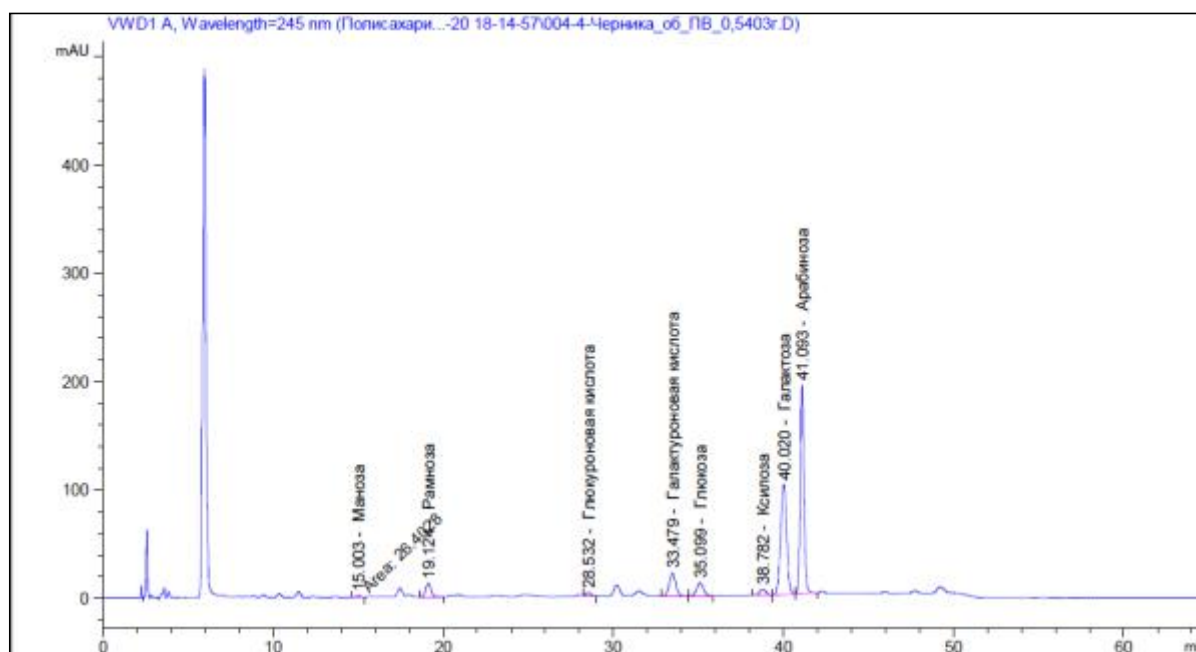
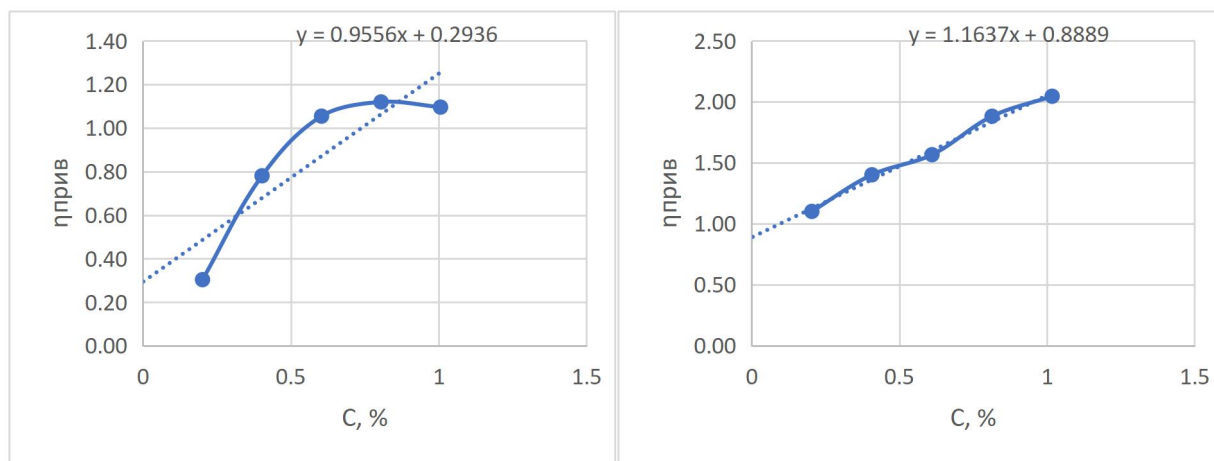


Рисунок 5.19 – Хроматограмма испытуемого раствора черники обыкновенной (листья)
ПВ

Таблица 5.7 – Определение средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, выделенных из черники листьев (температура 21°C)

№	Концентрация С, %	Время истечения t, с	η _{отн}	η _{уд}	η _{пр}	Характеристическая вязкость [η]	Молярная масса М, г/моль
ВРПС черники кавказской							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,29	4882
1	0,20	26,23	1,06	0,06	0,30		
2	0,40	32,48	1,31	0,31	0,78		
3	0,60	40,45	1,64	0,64	1,05		
4	0,80	46,99	1,90	0,90	1,12		
5	1,00	51,97	2,10	1,10	1,10		
ПВ черники кавказской							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,89	12280
1	0,20	30,26	1,22	0,22	1,10		
2	0,40	38,82	1,57	0,57	1,40		
3	0,60	48,36	1,96	0,96	1,57		
4	0,80	62,58	2,53	1,53	1,88		
5	1,00	76,16	3,08	2,08	2,05		
ВРПС черники обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,33	5341
1	0,20	23,20	0,94	-0,06	-0,30		
2	0,40	23,79	0,96	-0,04	-0,09		
3	0,60	24,83	1,00	0,00	0,01		

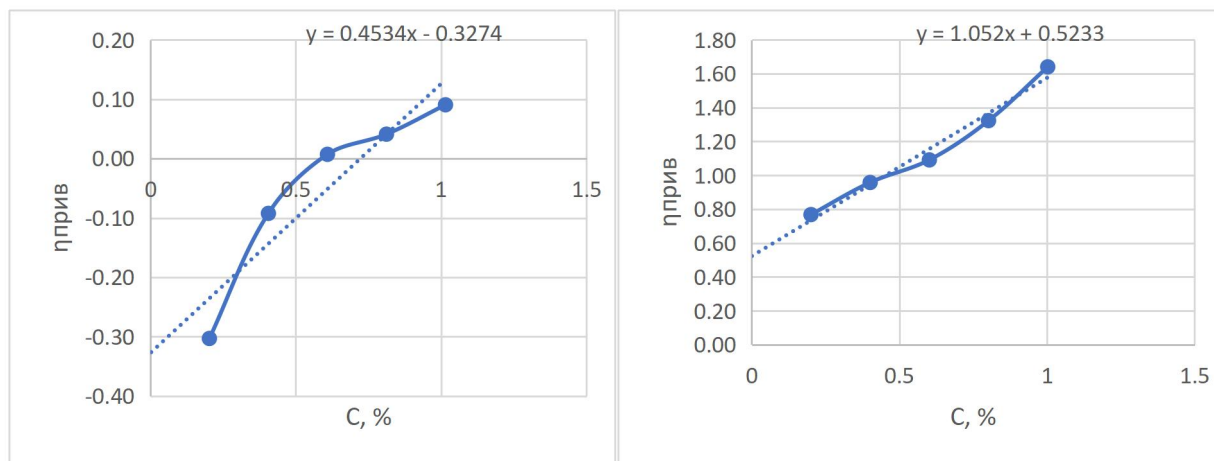
4	0,80	25,54	1,03	0,03	0,04		
5	1,00	26,99	1,09	0,09	0,09		
ПВ черники обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,52	7899
1	0,20	28,53	1,15	0,15	0,77		
2	0,40	34,21	1,38	0,38	0,96		
3	0,60	40,94	1,66	0,66	1,09		
4	0,80	50,94	2,06	1,06	1,32		
5	1,00	65,36	2,64	1,64	1,64		



(a)

(b)

Рисунок 5.20 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций черники кавказской: а – ВРПС; б- ПВ



(a)

(b)

Рисунок 5.21 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций черники обыкновенной: а – ВРПС; б- ПВ

Таблица 5.8 – Определение ИЭТ ВРПС и ПВ, выделенных из черники листьев (температура 21°C)

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9,7	9,2	7,8	5,2	2,6	1,0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0,3	0,8	2,2	4,8	7,4	9,0	–
pH раствора	3,2	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	–
ВРПС черники кавказской							
Время истечения <i>t</i> , с	24,18	24,57	24,43	24,86	24,77	23,95	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	0,98	0,99	0,99	1,01	1,00	0,97	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	5,7						
ПВ черники кавказской							
Время истечения <i>t</i> , с	29,72	30,22	29,43	30,05	29,93	29,18	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,20	1,22	1,19	1,22	1,21	1,20	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						
ВРПС черники обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	24,45	24,57	24,62	24,83	25,10	24,91	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	0,99	0,99	1,00	1,00	1,02	1,01	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,2						
ПВ черники обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	28,03	27,59	27,64	27,41	27,74	27,65	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,13	1,12	1,12	1,11	1,12	1,12	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,7						

Таблица 5.9 – Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС и ПВ, выделенных из черники листьев

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %
ВРПС черники кавказской											
1	0,10	7987	8380	0,10	0,00	-1,02	-2,33	1,31	0,49	1,27	43,2
2	0,20	4249	4588	0,19	0,01	-0,73	-1,83			1,42	
3	0,30	3375	3917	0,26	0,04	-0,58	-1,38			1,20	
4	0,40	2673	3120	0,34	0,06	-0,46	-1,24			1,36	
									K _{сред} =	1,31	
ПВ черники кавказской											
1	0,10	3652	4414	0,08	0,02	-1,07	-1,76	1,50	0,72	1,53	40,0
2	0,20	2265,17	2919	0,16	0,05	-0,80	-1,34			1,45	
3	0,30	1700,06	2248,9	0,23	0,07	-0,64	-1,13			1,49	
4	0,40	1392,75	1868,82	0,30	0,10	-0,52	-0,98			1,54	
									K _{сред} =	1,50	
ВРПС черники обыкновенной											
1	0,10	5217	5517	0,10	0,01	-1,02	-2,26	0,81	0,38	0,69	54,7
2	0,20	3037	3233	0,19	0,01	-0,72	-1,91			1,01	
3	0,30	2260,25	2962	0,23	0,07	-0,63	-1,14			0,63	
4	0,40	1830,02	2158,54	0,34	0,06	-0,46	-1,21			0,99	
									K _{сред} =	0,83	
ПВ черники обыкновенной											

1	0,10	3696	4739	0,08	0,02	-1,11	-1,66	2,70	0,92	2,61	27,0
2	0,20	2178,23	2763	0,16	0,04	-0,80	-1,37			2,89	
3	0,30	1585,19	2080,04	0,23	0,07	-0,64	-1,15			2,59	
4	0,40	1262,82	1650,62	0,31	0,09	-0,51	-1,03			2,70	
									К _{сред} =	2,70	

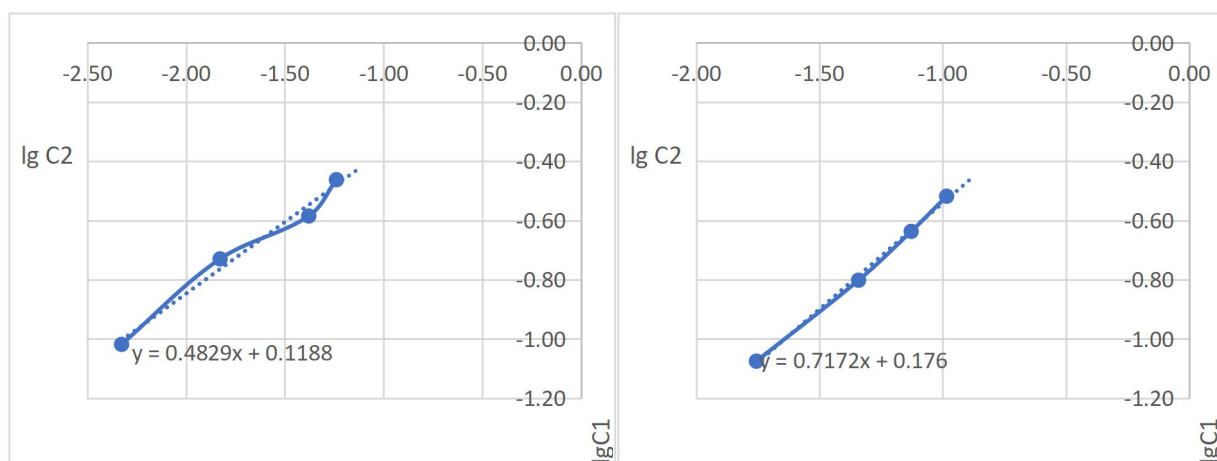


Рисунок 4.22 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций черники кавказской листьев: а – ВРПС; б- ПВ

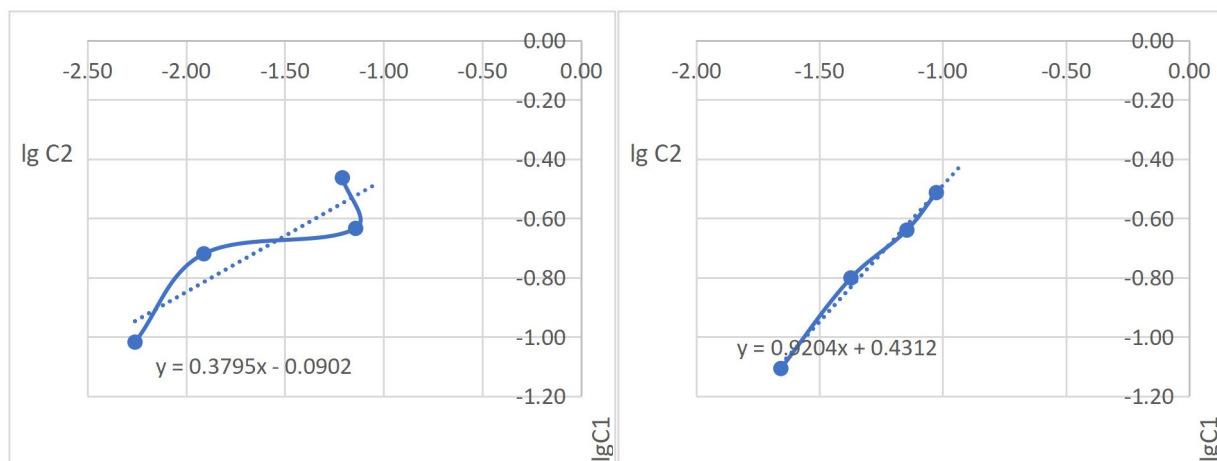


Рисунок 5.23 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций черники обыкновенной листьев: а – ВРПС; б- ПВ

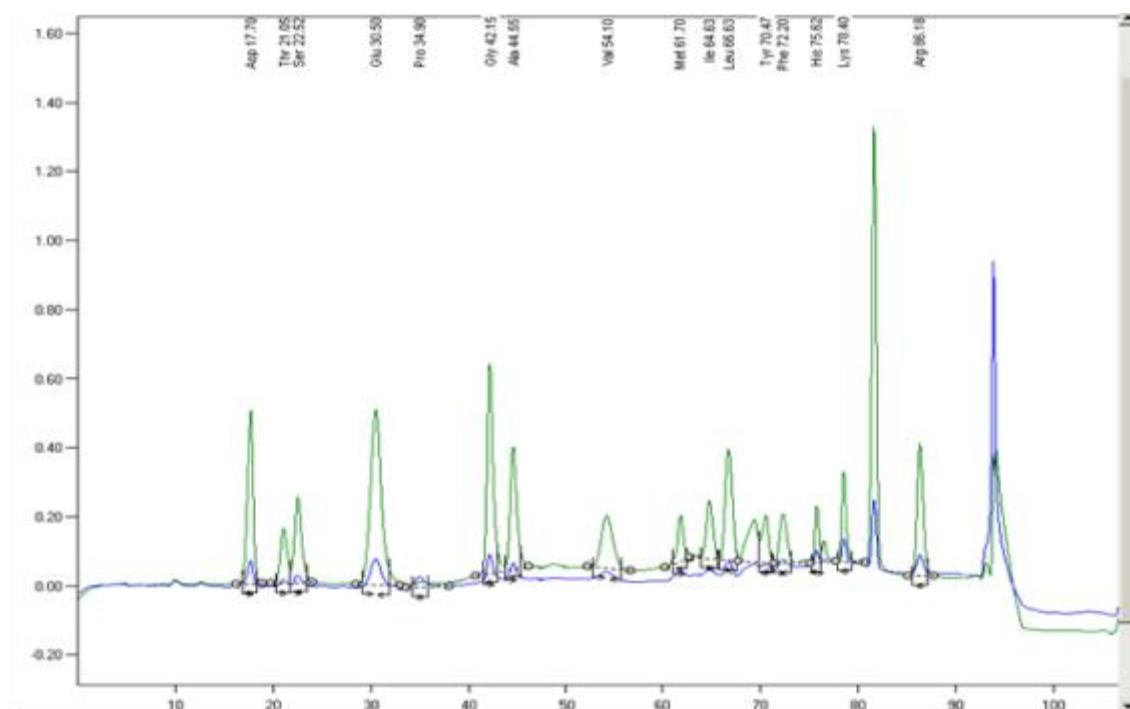


Рисунок 5.24 – Аминограмма черники кавказской листьев

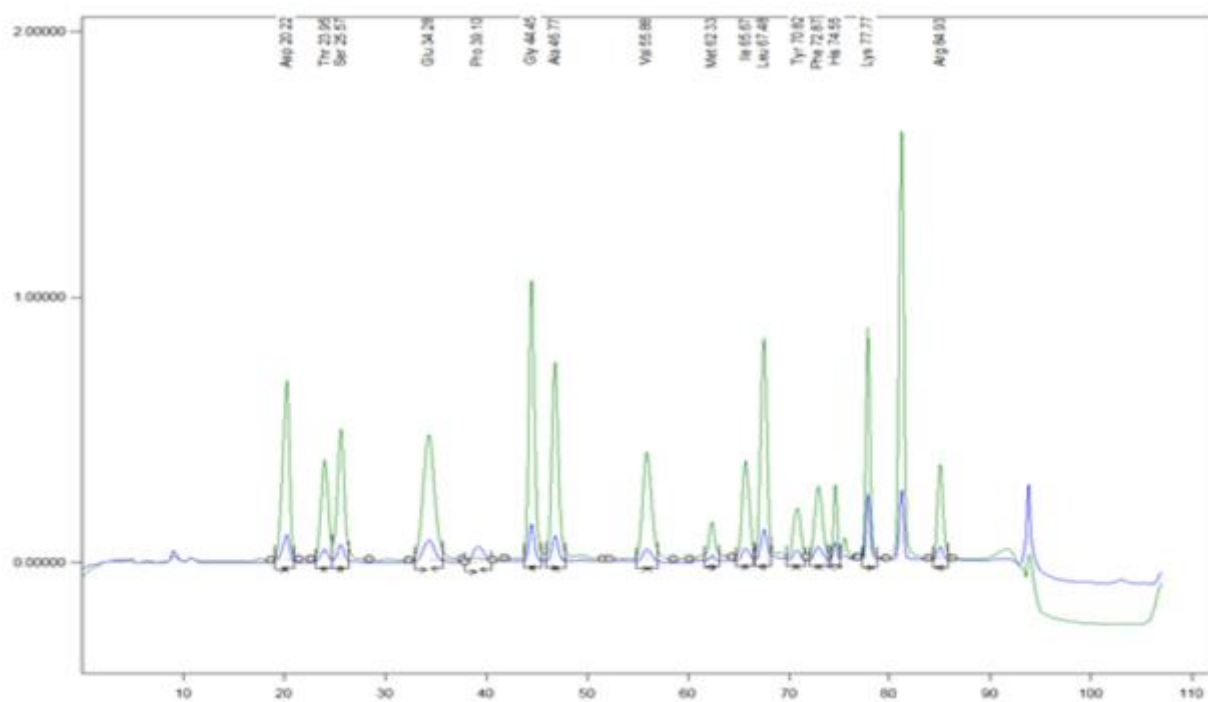


Рисунок 5.25 – Аминограмма черники обыкновенной листьев

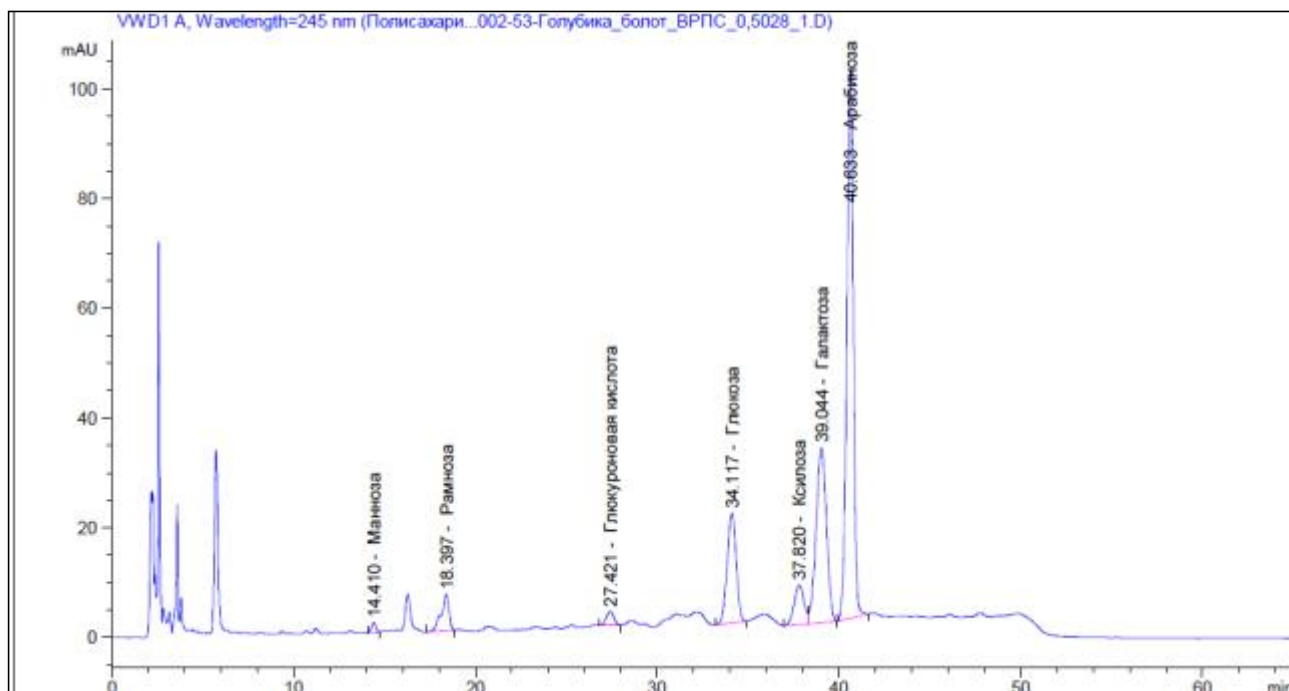


Рисунок 5.26 – Хроматограмма испытуемого раствора голубики обыкновенной (листья) ВРПС

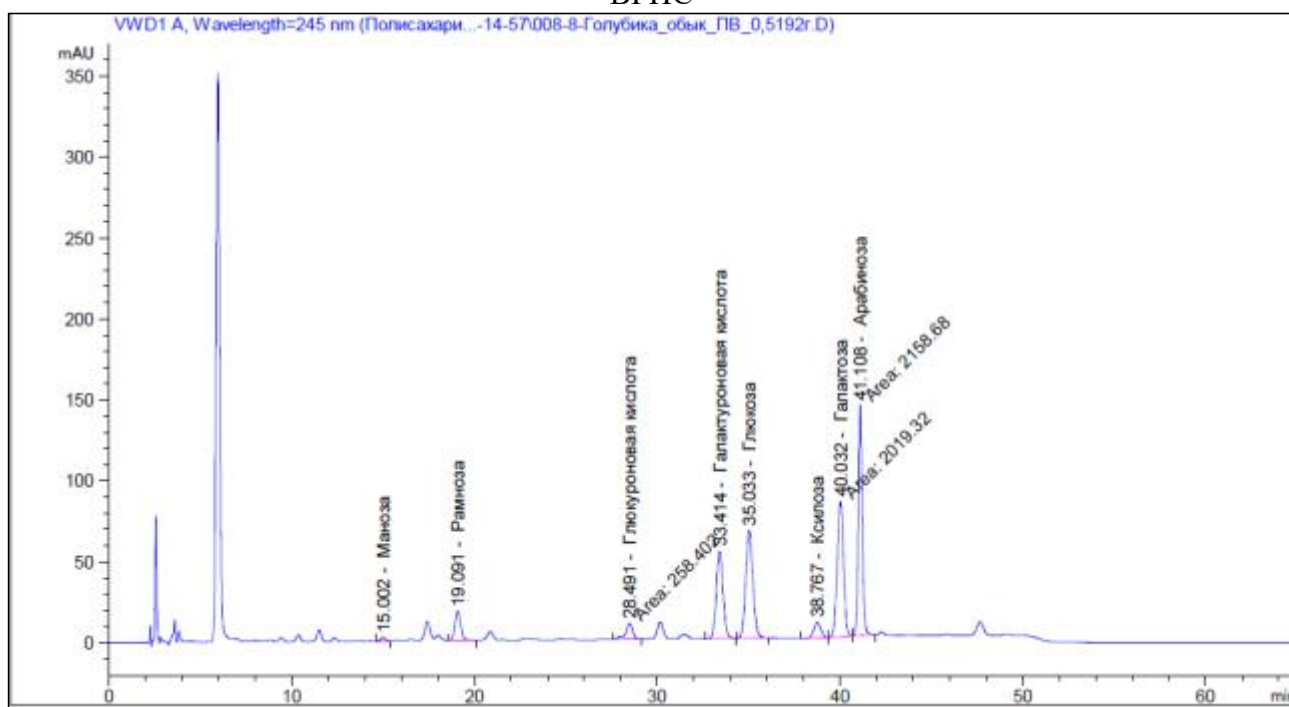


Рисунок 5.27 – Хроматограмма испытуемого раствора голубики обыкновенной (листья) ПВ

Таблица 5.10 – Определение средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, выделенных из голубики обыкновенной листьев (температура 21°C)

№	Концентрация С, %	Время истечения t, с	η _{отн}	η _{уд}	η _{пр}	Характеристическая вязкость [η]	Молярная масса М, г/моль
ВРПС голубики обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,12	2287
1	0,20	25,24	1,02	0,02	0,10		
2	0,40	25,87	1,05	0,05	0,11		
3	0,60	26,19	1,06	0,06	0,10		
4	0,80	26,55	1,07	0,07	0,09		
5	1,00	26,76	1,08	0,08	0,08		
ПВ голубики обыкновенной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,47	7226
1	0,20	28,33	1,15	0,15	0,72		
2	0,40	32,28	1,31	0,31	0,75		
3	0,60	36,95	1,49	0,49	0,81		
4	0,80	47,49	1,92	0,92	1,13		
5	1,00	58,01	2,35	1,35	1,33		

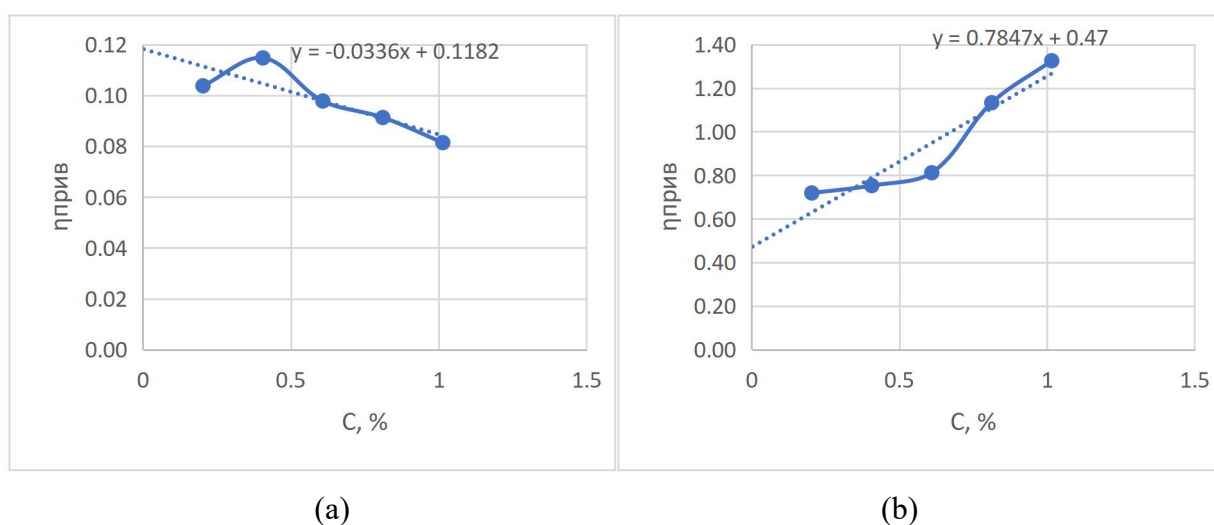


Рисунок 5.28 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций голубики обыкновенной листьев: а – ВРПС; б- ПВ

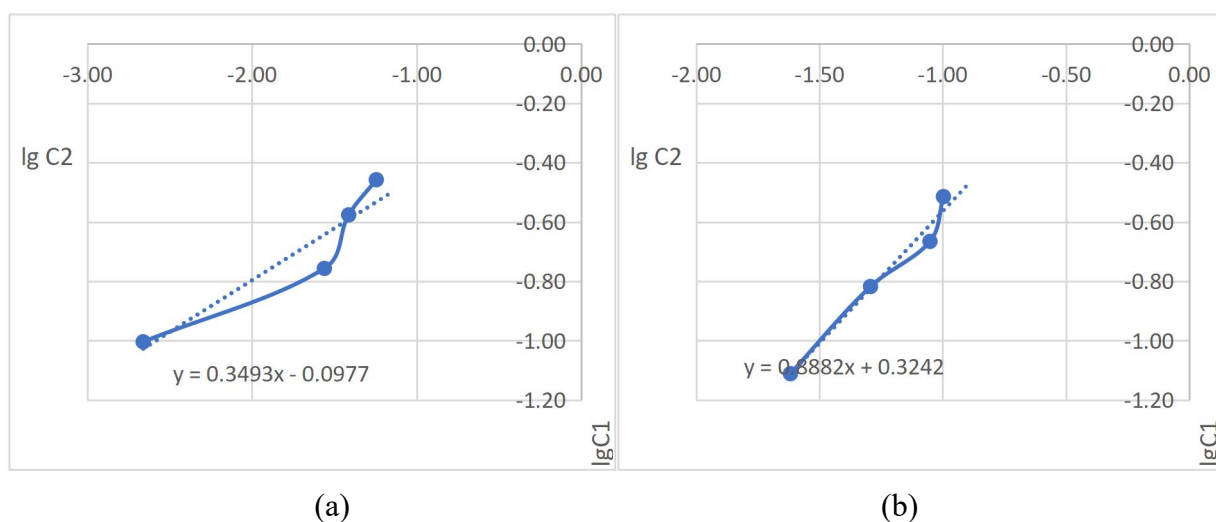


Рисунок 5.29 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций голубики обыкновенной листьев: а – ВРПС; б- ПВ

Таблица 5.11 – Определение ИЭТ ВРПС и ПВ, выделенных из голубики обыкновенной листьев (температура 21°C)

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9,7	9,2	7,8	5,2	2,6	1,0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0,3	0,8	2,2	4,8	7,4	9,0	–
pH раствора	3,2	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	–
ВРПС голубики обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	23,66	23,80	23,71	24,86	24,77	23,95	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	0,96	0,96	0,96	1,01	1,00	0,97	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,2						
ПВ голубики обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	28,35	28,14	27,44	27,68	28,73	28,49	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,15	1,14	1,11	1,12	1,16	1,15	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						

Таблица 5.12 – Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС и ПВ,
выделенных из голубики обыкновенной листьев

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %
ВРПС голубики обыкновенной											
1	0,10	3856	3941	0,10	0,00	-1,00	-2,66	0,80	0,35	0,84	55,3
2	0,20	2321,4	2686	0,18	0,03	-0,76	-1,56			0,61	
3	0,30	1689	1935,16	0,27	0,04	-0,58	-1,41			0,83	
4	0,40	1361,82	1584,07	0,35	0,06	-0,46	-1,25			0,95	
									K _{сред} =	0,81	
ПВ голубики обыкновенной											
1	0,10	2572	3373	0,08	0,02	-1,11	-1,62	2,11	0,89	2,12	32,1
2	0,20	1605	2142,12	0,15	0,05	-0,82	-1,29			2,14	
3	0,30	1081,13	1525,2	0,22	0,09	-0,67	-1,05			1,86	
4	0,40	895,38	1190,11	0,31	0,10	-0,51	-1,00			2,35	
									K _{сред} =	2,12	

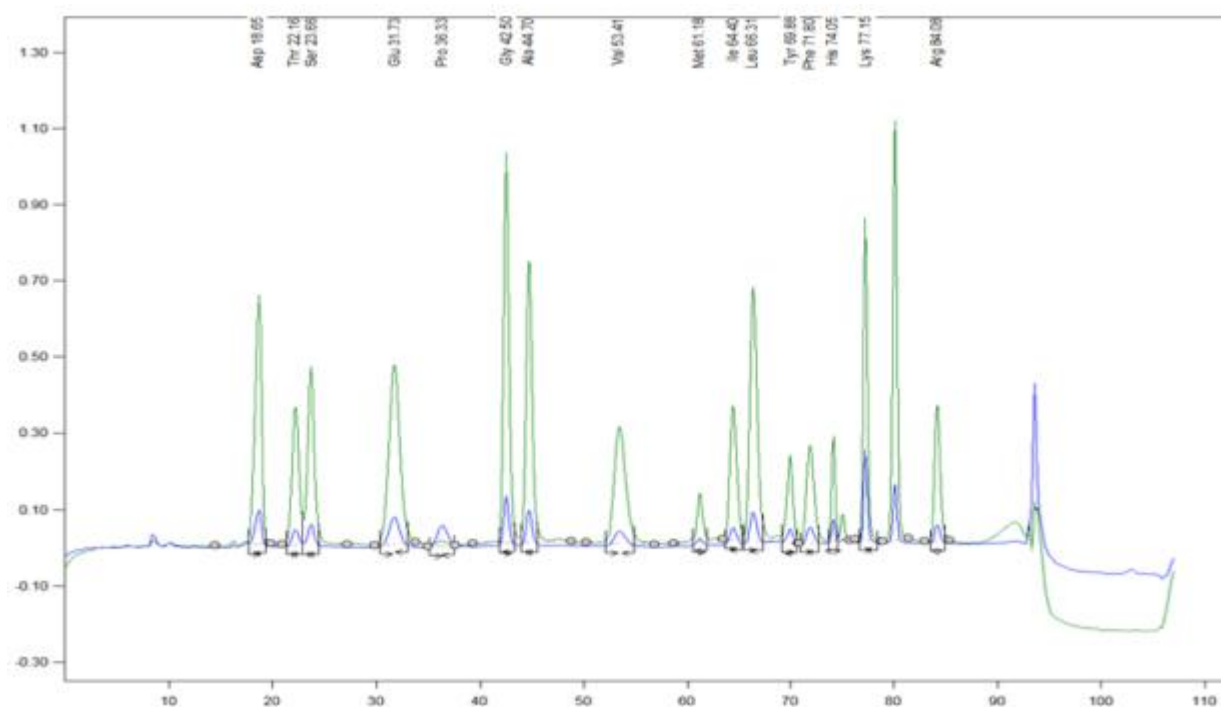


Рисунок 5.30 – Аминограмма голубики обыкновенной листьев

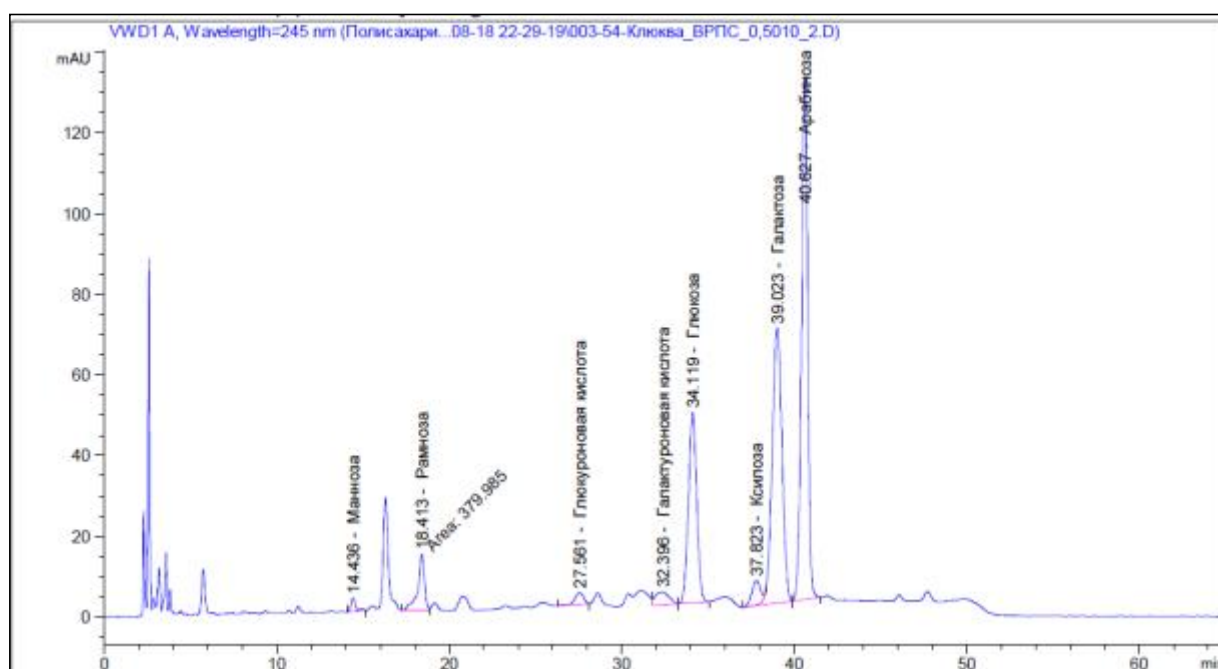


Рисунок 5.31 – Хроматограмма испытуемого раствора клюквы (побеги) ВРПС

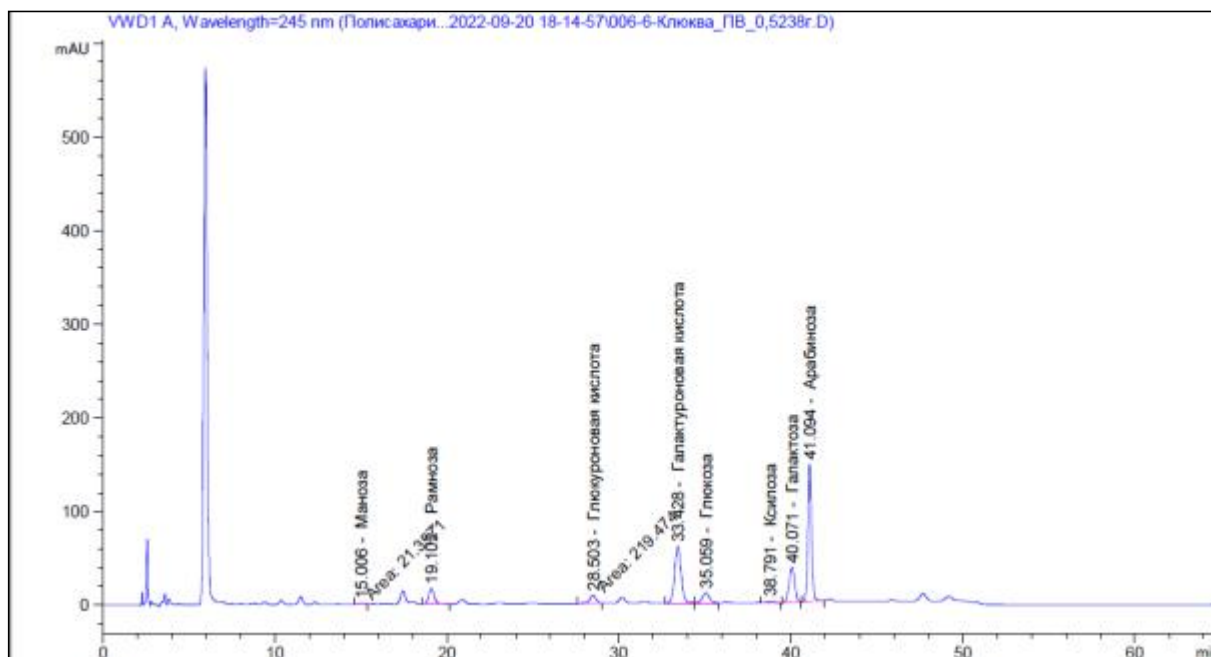
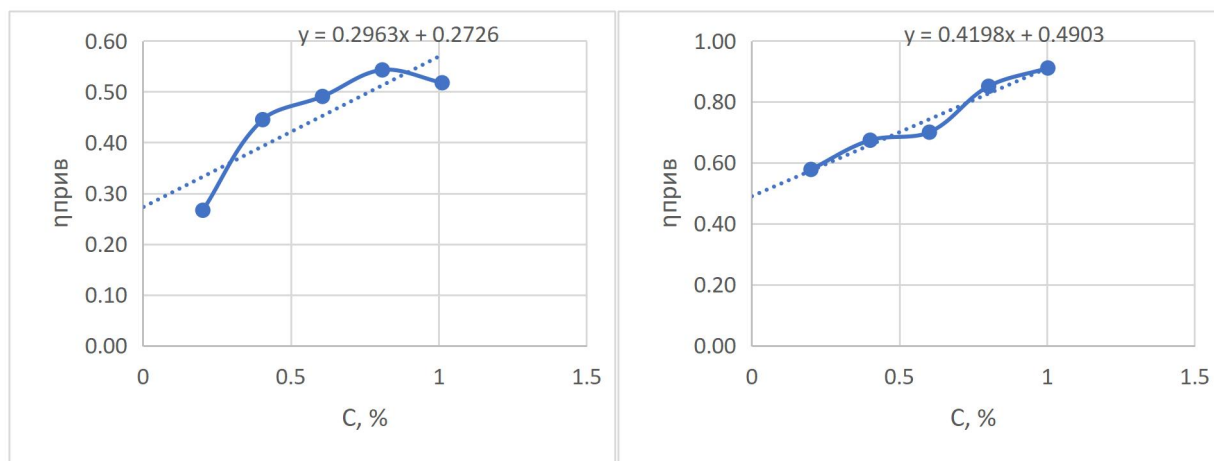


Рисунок 5.32 – Хроматограмма испытуемого раствора клюквы (побеги) ПВ

Таблица 5.13 – Определение средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, выделенных из клюквы болотной побегов (температура 21°C)

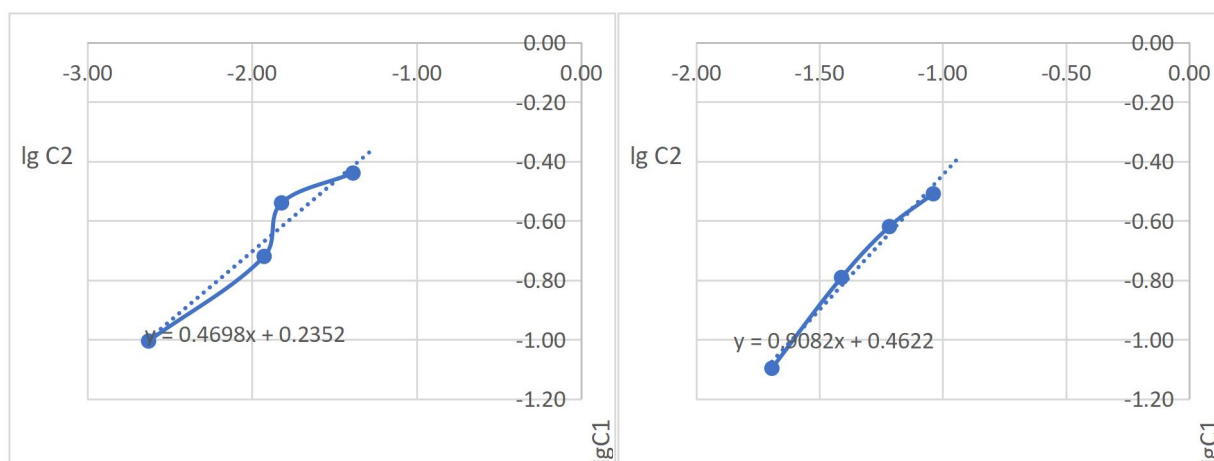
№	Концентрация С, %	Время истечения t, с	η _{отн}	η _{уд}	η _{пр}	Характеристическая вязкость [η]	Молярная масса М, г/моль
ВРПС клюквы болотной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,27	4581
1	0,20	26,05	1,05	0,05	0,27		
2	0,40	29,17	1,18	0,18	0,44		
3	0,60	32,08	1,30	0,30	0,49		
4	0,80	35,58	1,44	0,44	0,54		
5	1,00	37,66	1,52	0,52	0,52		
ПВ клюквы болотной							
H ₂ O	-	24,72	-	-	-	0,49	7486
1	0,20	27,59	1,12	0,12	0,58		
2	0,40	31,40	1,27	0,27	0,67		
3	0,60	35,14	1,42	0,42	0,70		
4	0,80	41,59	1,68	0,68	0,85		
5	1,00	47,30	1,91	0,91	0,91		



(a)

(b)

Рисунок 4.33 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций клюквы болотной побегов: а – ВРПС; б- ПВ



(a)

(b)

Рисунок 5.34 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций клюквы болотной побегов: а – ВРПС; б– ПВ

Таблица 5.14 – Определение ИЭТ ВРПС и ПВ, выделенных из клюквы болотной побегов
(температура 21°C)

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9,7	9,2	7,8	5,2	2,6	1,0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0,3	0,8	2,2	4,8	7,4	9,0	–
pH раствора	3,2	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	–
ВРПС клюквы болотной							
Время истечения <i>t</i> , с	25,80	26,18	26,59	26,73	26,69	26,71	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,04	1,06	1,08	1,08	1,08	1,08	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,2						
ПВ клюквы болотной							
Время истечения <i>t</i> , с	26,49	26,99	26,53	26,86	26,55	27,36	24,72
Относительная вязкость η _{отн}	1,07	1,09	1,07	1,09	1,07	1,11	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						

Таблица 5.15 – Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС и ПВ,
выделенных из клюквы болотной побегов

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %
ВРПС клюквы болотной											
1	0,10	7585	7766	0,10	0,00	-1,01	-2,63	1,72	0,47	1,70	36,6
2	0,20	4882	5186	0,19	0,01	-0,72	-1,93			1,53	
3	0,30	3584	3772	0,29	0,02	-0,54	-1,82			2,07	
4	0,40	2981	3318	0,36	0,04	-0,44	-1,39			1,63	
									K _{сред} =	1,73	
ПВ клюквы болотной											
1	0,10	1634	2048,59	0,08	0,02	-1,10	-1,69	2,90	0,91	2,76	25,6
2	0,20	905,45	1123	0,16	0,04	-0,79	-1,41			3,09	
3	0,30	625,55	783,95	0,24	0,06	-0,62	-1,22			3,05	
4	0,40	522,75	677,37	0,31	0,09	-0,51	-1,04			2,71	
									K _{сред} =	2,90	

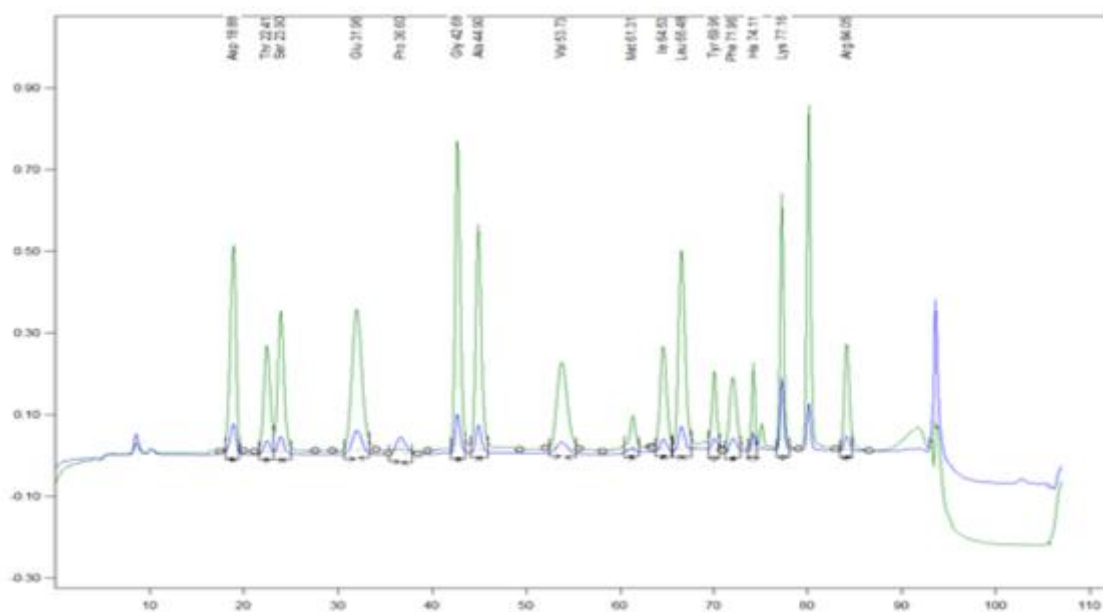


Рисунок 5.35 – Аминограмма клюквы болотной побегов

Таблица 5.16 – Определение средней молекулярной массы ВРПС и ПВ, выделенных из черноголовки травы (температура 21°C)

№	Концентрация C, %	Время истечения t, с	$\eta_{\text{отн}}$	$\eta_{\text{уд}}$	$\eta_{\text{пр}}$	Характеристическая вязкость $[\eta]$	Молярная масса M, г/моль
ВРПС черноголовки обыкновенной							
H ₂ O	-	26,29	-	-	-	1,71	21200
1	0,25	38,03	1,45	0,45	1,79		
2	0,50	50,34	1,91	0,91	1,83		
3	0,75	63,94	2,43	1,43	1,91		
4	1,00	78,45	2,98	1,98	1,98		
ПВ черноголовки обыкновенной							
H ₂ O	-	26,29	-	-	-	1,44	18370
1	0,25	37,41	1,42	0,42	1,69		
2	0,50	47,68	1,81	0,81	1,63		
3	0,75	64,14	2,44	1,44	1,92		
4	1,00	82,18	3,13	2,13	2,13		
ВРПС черноголовки крупноцветковой							
H ₂ O	-	26,29	-	-	-	1,23	16110
1	0,25	34,51	1,31	0,31	1,25		
2	0,5	42,91	1,63	0,63	1,26		
3	0.75	51,73	1,97	0,97	1,29		
4	1,00	60,56	2,30	1,30	1,30		
ПВ черноголовки крупноцветковой							
H ₂ O	-	26,29	-	-	-	1,82	22330
1	0,25	39,37	1,50	0,50	1,99		
2	0,50	53,90	2,05	1,05	2,10		
3	0.75	71,24	2,71	1,71	2,28		

4	1,00	90,44	3,44	2,44	2,44		
ВРПС черноголовки разрезной							
H ₂ O	-	26,29	-	-	-	2,65	30490
1	0,25	46,59	1,77	0,77	3,09		
2	0,50	69,57	2,65	1,65	3,29		
3	0,75	100,62	3,83	2,83	3,77		
4	1,00	136,15	5,18	4,18	4,18		
ПВ черноголовки разрезной							
H ₂ O	-	26,29	-	-	-	2,15	25610
1	0,25	41,06	1,56	0,56	2,25		
2	0,50	55,78	2,12	1,12	2,24		
3	0,75	72,82	2,77	1,77	2,36		
4	1,00	90,69	3,45	2,45	2,45		

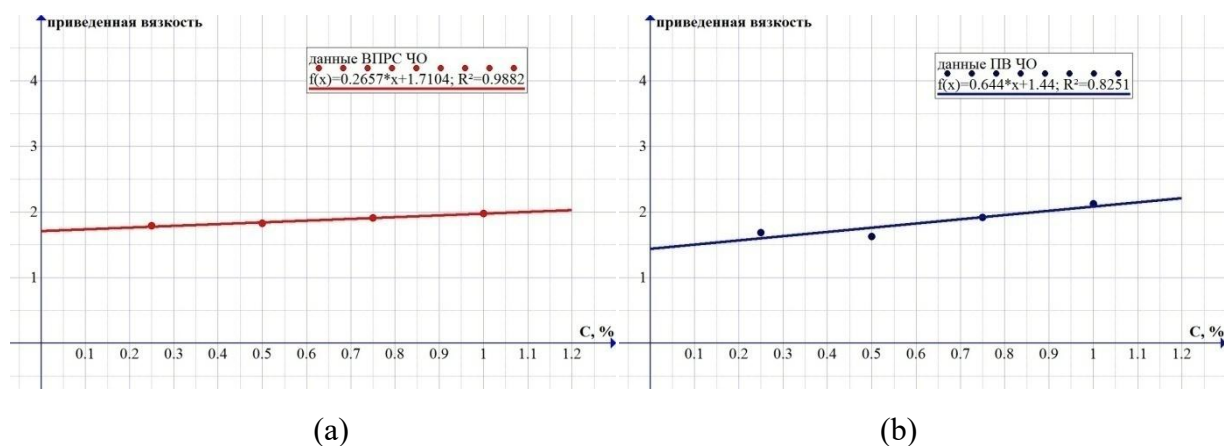


Рисунок 5.36 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций черноголовки обыкновенной травы: а – ВРПС; б- ПВ

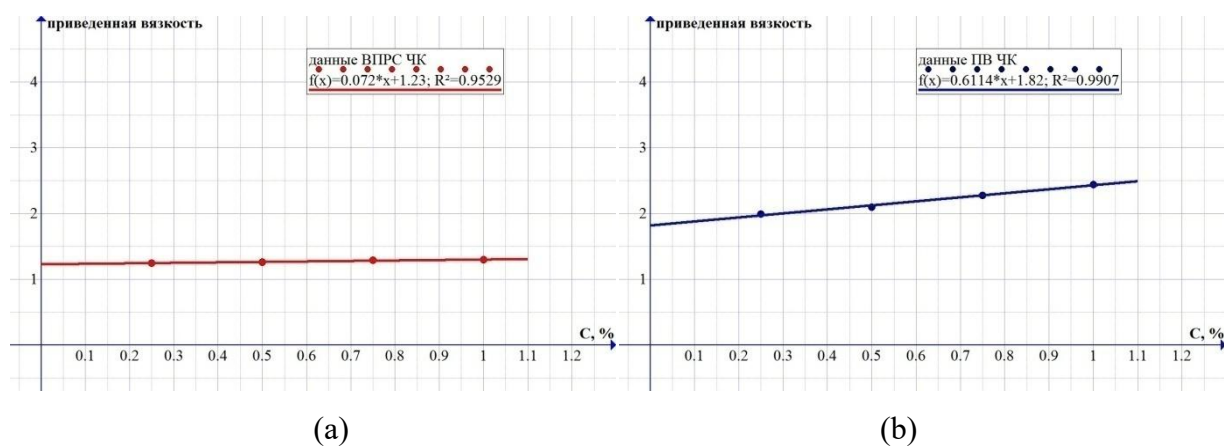


Рисунок 5.37 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций черноголовки крупноцветковой травы: а – ВРПС; б- ПВ

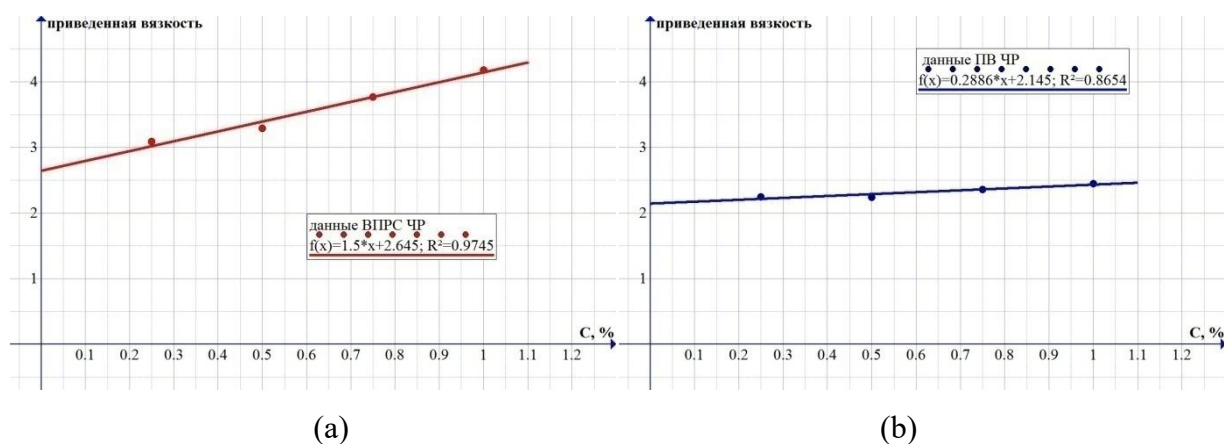


Рисунок 5.38 – Определение характеристической вязкости растворов полисахаридных фракций черноголовки разрезной травы: а – ВРПС; б- ПВ

Таблица 5.17 – Определение ИЭТ ВРПС и ПВ, выделенных из черноголовки травы
(температура 21°C)

№	1	2	3	4	5	6	H ₂ O
V _{CH₃COOH} , мл	9,7	9,2	7,8	5,2	2,6	1,0	–
V _{CH₃COONa} , мл	0,3	0,8	2,2	4,8	7,4	9,0	–
pH раствора	3,2	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	–
ВРПС черноголовки обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	38,24	39,09	37,95	40,25	39,34	39,61	26,29
Относительная вязкость η _{отн}	1,45	1,49	1,44	1,53	1,50	1,51	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						
ПВ черноголовки обыкновенной							
Время истечения <i>t</i> , с	41,12	39,18	41,66	40,71	42,02	39,97	26,29
Относительная вязкость η _{отн}	1,56	1,49	1,58	1,55	1,60	1,52	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,7						
ВРПС черноголовки крупноцветковой							
Время истечения <i>t</i> , с	37,29	37,47	36,01	38,45	38,57	38,95	26,29
Относительная вязкость η _{отн}	1,42	1,43	1,37	1,46	1,47	1,48	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						
ПВ черноголовки крупноцветковой							
Время истечения <i>t</i> , с	45,11	41,26	43,53	42,46	44,23	41,60	26,29
Относительная вязкость η _{отн}	1,72	1,57	1,66	1,62	1,68	1,58	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	3,7						
ВРПС черноголовки разрезной							
Время истечения <i>t</i> , с	51,02	51,15	49,95	51,80	52,68	51,66	26,29
Относительная вязкость η _{отн}	1,94	1,95	1,90	1,97	2,00	1,96	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						
ПВ черноголовки разрезной							
Время истечения <i>t</i> , с	45,95	47,25	45,69	46,52	46,36	49,61	26,29
Относительная вязкость η _{отн}	1,75	1,80	1,74	1,77	1,76	1,89	–
Изоэлектрическая точка (ИЭТ)	4,2						

Таблица 5.18 – Экспериментальные данные и результаты определения коэффициента распределения и степени извлечения ВРПС и ПВ, выделенных из черноголовки травы

№	C ₀ , %	R ₀ , Ом/см	R ₁ , Ом/см	C ₁	C ₂	lg C ₁	lg C ₂	K _{граф}	n	K	α, %
<i>ВРПС черноголовки обыкновенной</i>											
1	0,03	4,72	3,99	0,02	0,01	-1,58	-2,32	2,79	0,86	2,64	26,3
2	0,06	8,07	6,70	0,05	0,01	-1,29	-1,98			2,62	
3	0,13	13,86	11,90	0,11	0,02	-0,97	-1,75			3,48	
4	0,25	26,43	20,91	0,20	0,05	-0,70	-1,28			2,53	
									K _{сред} =	2,82	
<i>ПВ черноголовки обыкновенной</i>											
1	0,03	8,06	7,35	0,02	0,01	-1,55	-2,56	1,24	0,67	1,42	44,5
2	0,06	14,55	11,71	0,05	0,01	-1,30	-1,91			0,94	
3	0,13	25,54	20,30	0,10	0,03	-1,00	-1,59			1,14	
4	0,25	48,07	38,83	0,20	0,05	-0,70	-1,32			1,52	
									K _{сред} =	1,26	
<i>ВРПС черноголовки крупноцветковой</i>											
1	0,03	4,73	4,15	0,02	0,01	-1,56	-2,41	2,95	0,84	2,82	25,4
2	0,06	8,19	7,12	0,05	0,01	-1,27	-2,09			3,01	
3	0,13	15,25	13,08	0,12	0,01	-0,97	-1,75			3,11	
4	0,25	28,22	23,30	0,21	0,04	-0,69	-1,36			2,83	
									K _{сред} =	2,94	
<i>ПВ черноголовки крупноцветковой</i>											
1	0,03	9,09	7,60	0,02	0,01	-1,58	-2,29	4,21	1,01	4,25	19,2
2	0,06	16,74	13,90	0,05	0,01	-1,29	-1,97			4,17	
3	0,13	30,40	25,20	0,10	0,03	-0,99	-1,67			4,23	
4	0,25	55,37	45,66	0,21	0,04	-0,69	-1,36			4,22	
									K _{сред} =	4,22	
<i>ВРПС черноголовки разрезной</i>											
1	0,03	4,01	3,79	0,02	0,01	-1,53	-2,76	0,92	0,57	1,09	51,7
2	0,06	7,13	5,86	0,05	0,01	-1,29	-1,96			0,66	
3	0,13	12,51	9,98	0,10	0,03	-1,00	-1,60			0,80	

4	0,25	20,77	17,30	0,21	0,04	-0,68	-1,38			1,25	
									$K_{\text{сред}} =$	0,95	
<i>ПВ черноголовки разрезной</i>											
1	0,03	11,28	8,99	0,02	0,01	-1,60	-2,20	8,19	1,15	8,63	10,8
2	0,06	13,78	10,82	0,05	0,01	-1,31	-1,87			7,12	
3	0,13	24,89	20,79	0,10	0,03	-0,98	-1,69			9,22	
4	0,25	45,95	38,22	0,21	0,04	-0,68	-1,38			8,05	
									$K_{\text{сред}} =$	8,25	

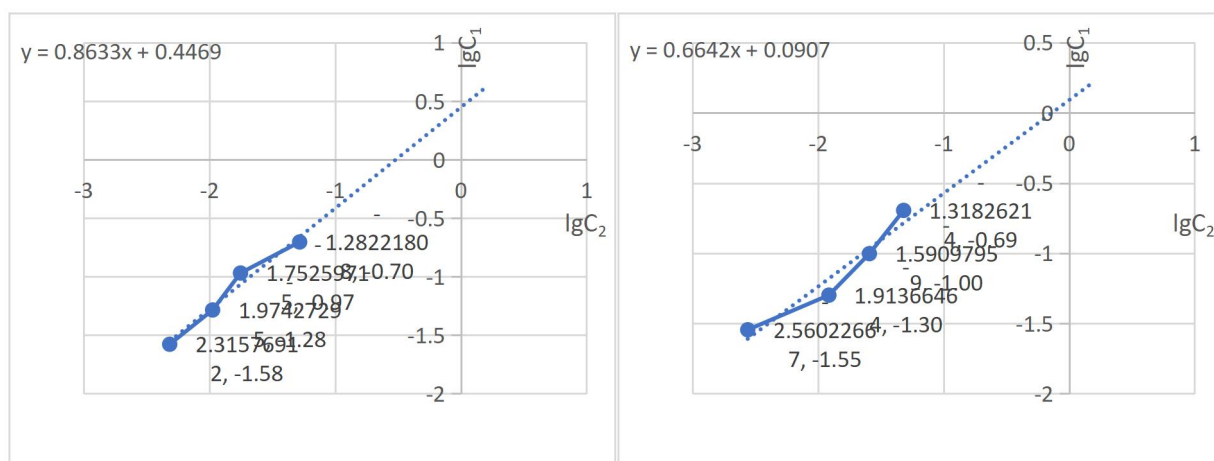


Рисунок 5.39 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций черноголовки обыкновенной травы: а – ВРПС; б- ПВ

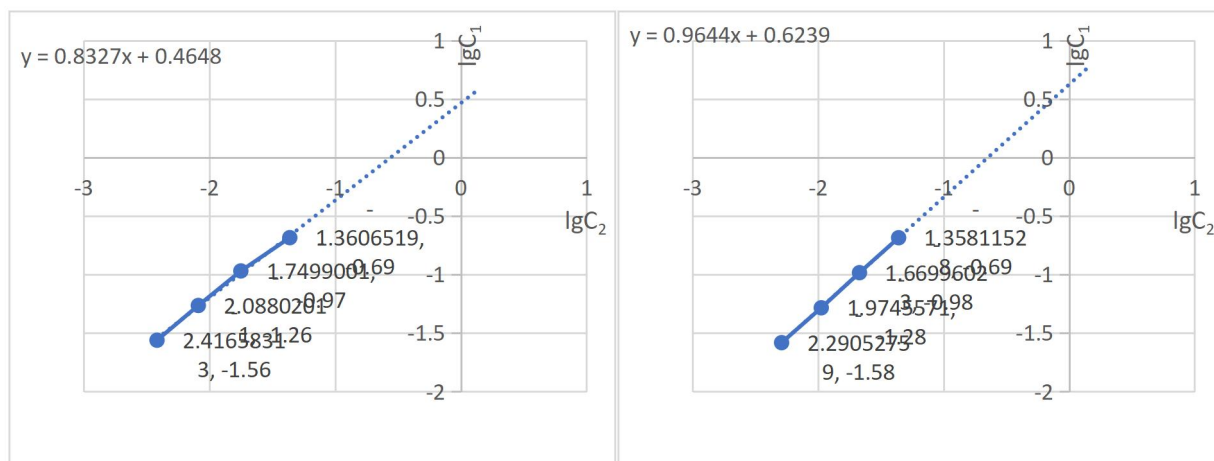


Рисунок 5.40 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций черноголовки крупноцветковой травы: а – ВРПС; б- ПВ

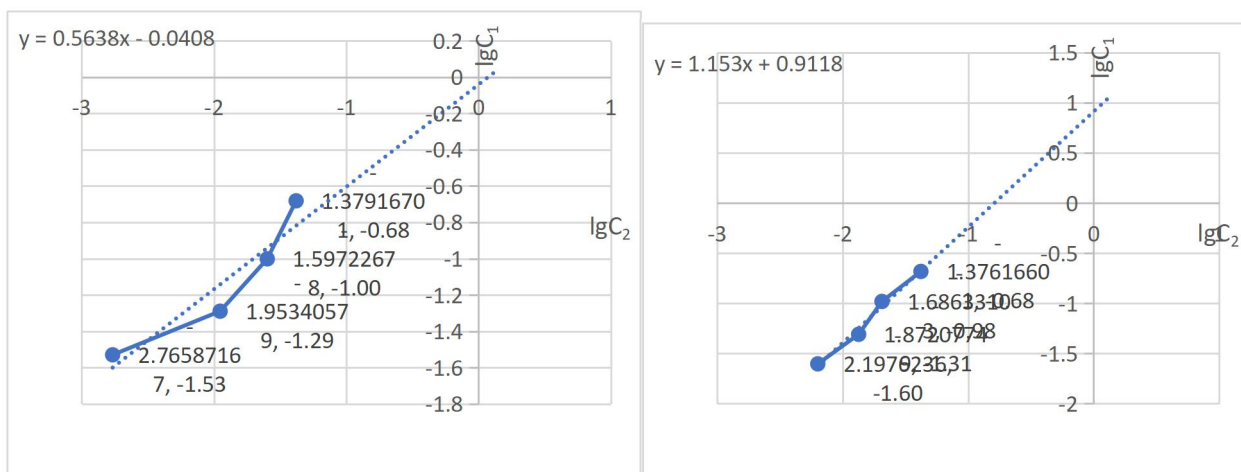


Рисунок 5.41 – Графическое определение коэффициента распределения полисахаридных фракций черноголовки разрезной травы: а – ВРПС; б- ПВ

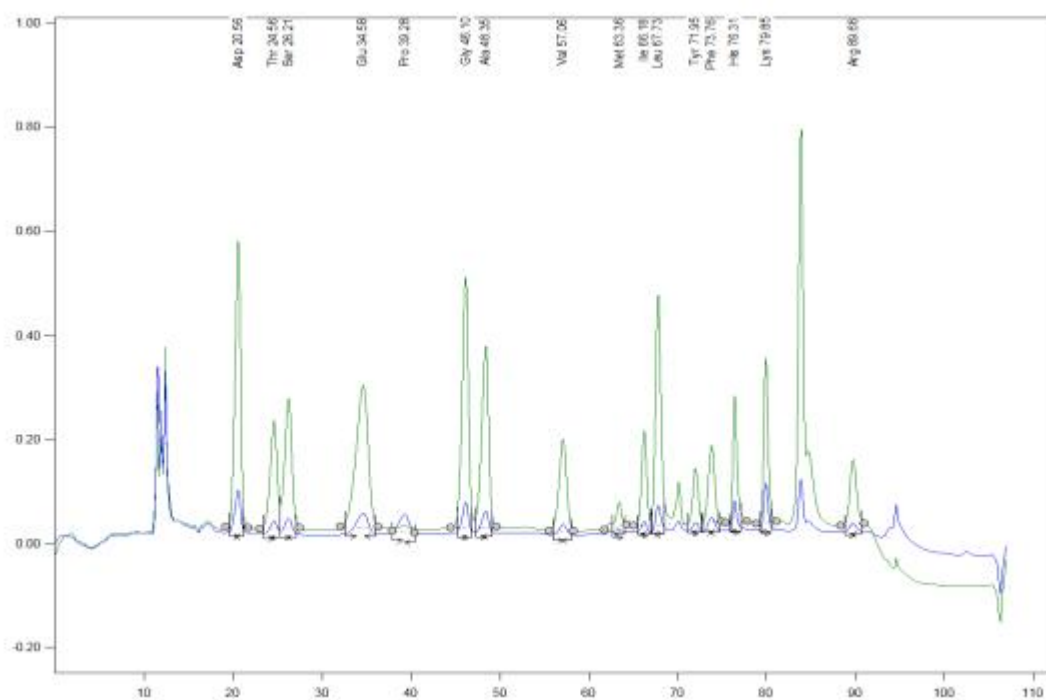


Рисунок 5.42 – Аминограмма черноголовки обыкновенной травы

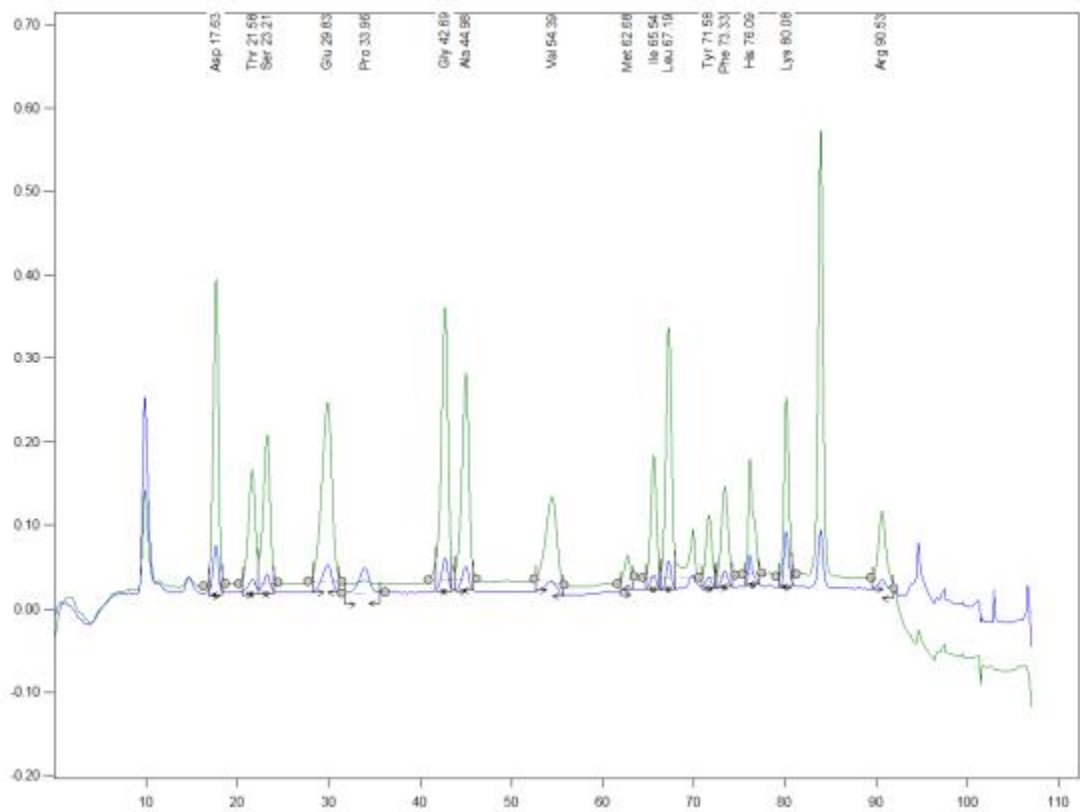


Рисунок 5.43 – Аминограмма черноголовки крупноцветковой травы

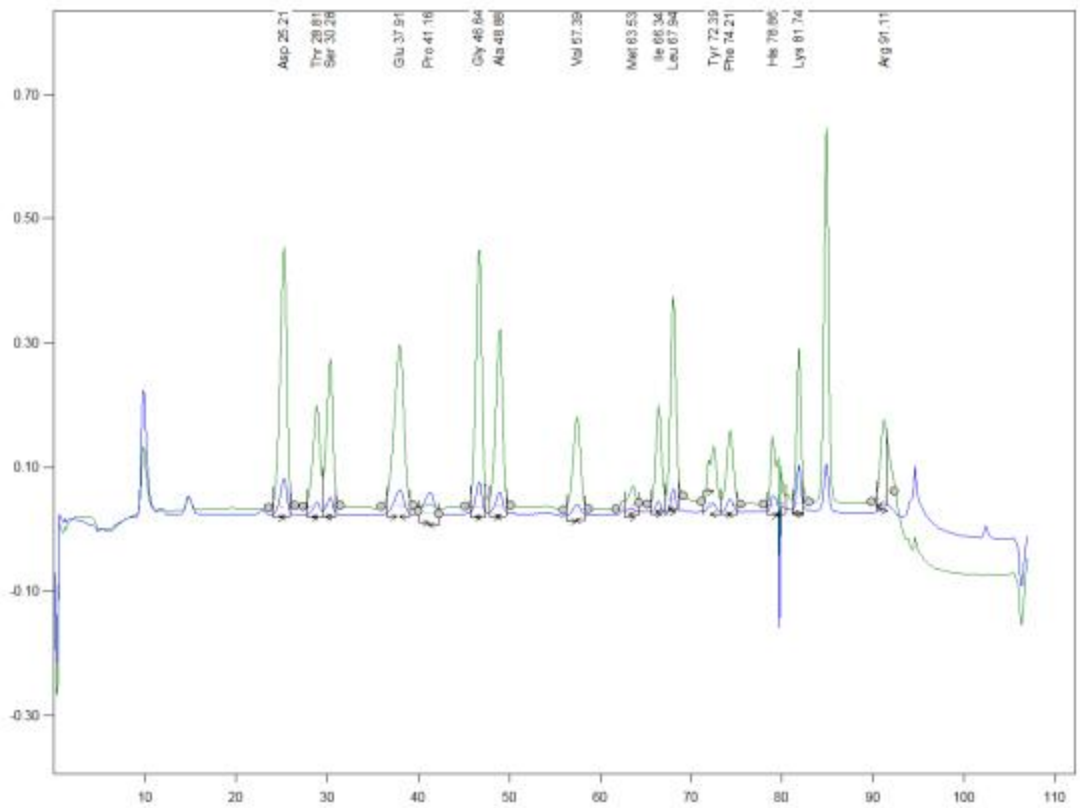


Рисунок 5.44 – Аминограмма черноголовки разрезной травы

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

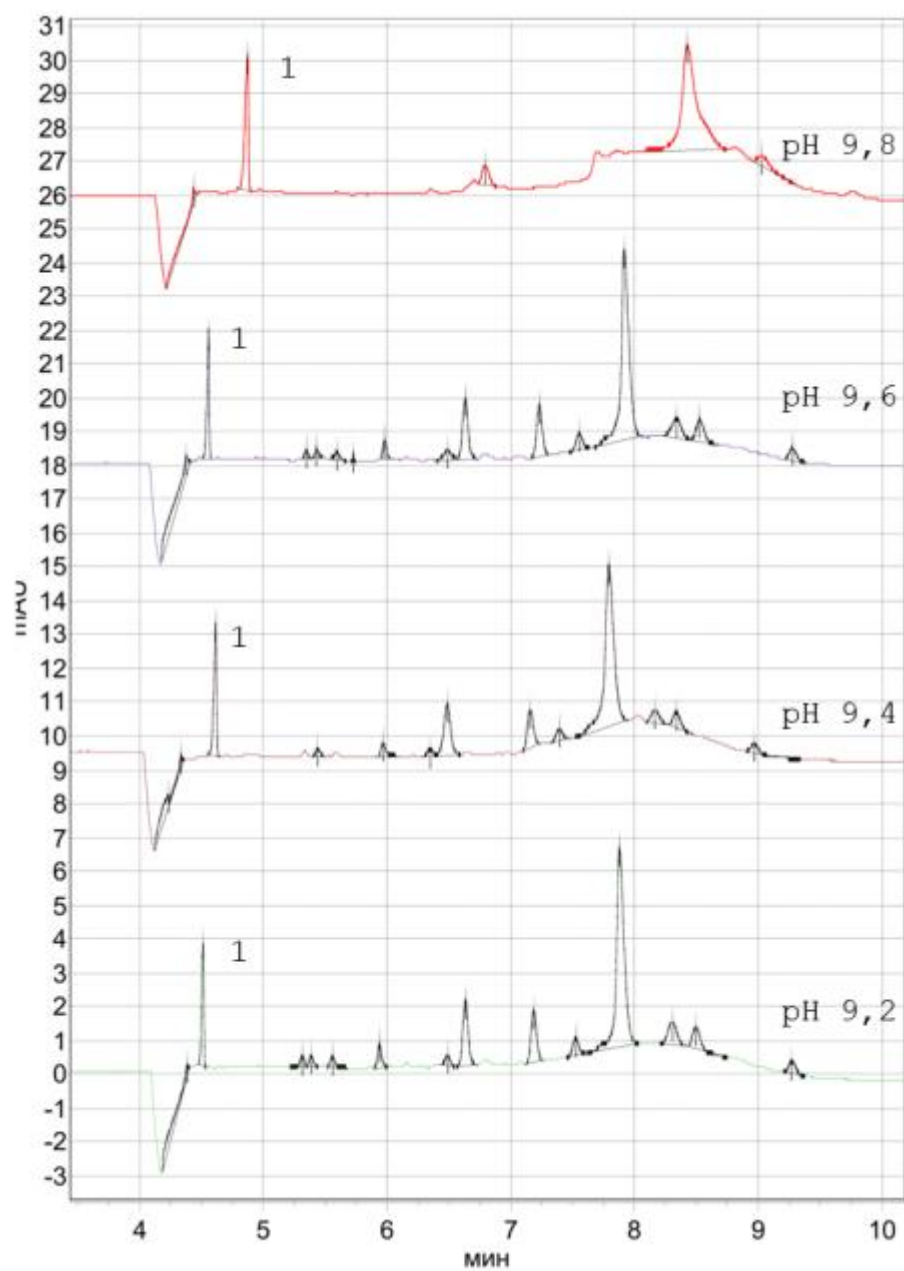


Рисунок 6.1 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – арбутин)
(Толокнянки листья)

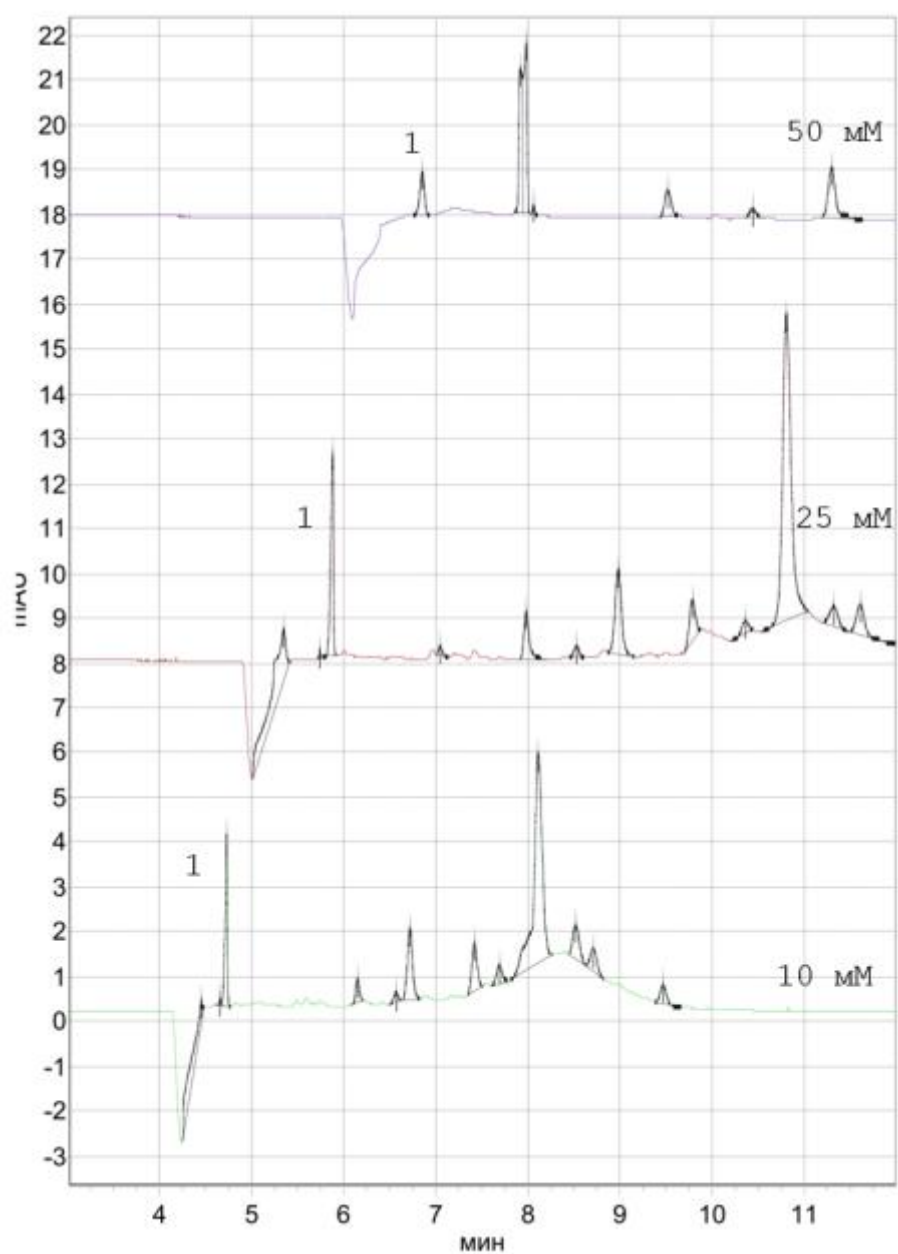


Рисунок 6.2 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – арбутин)
(Толокнянки листья)

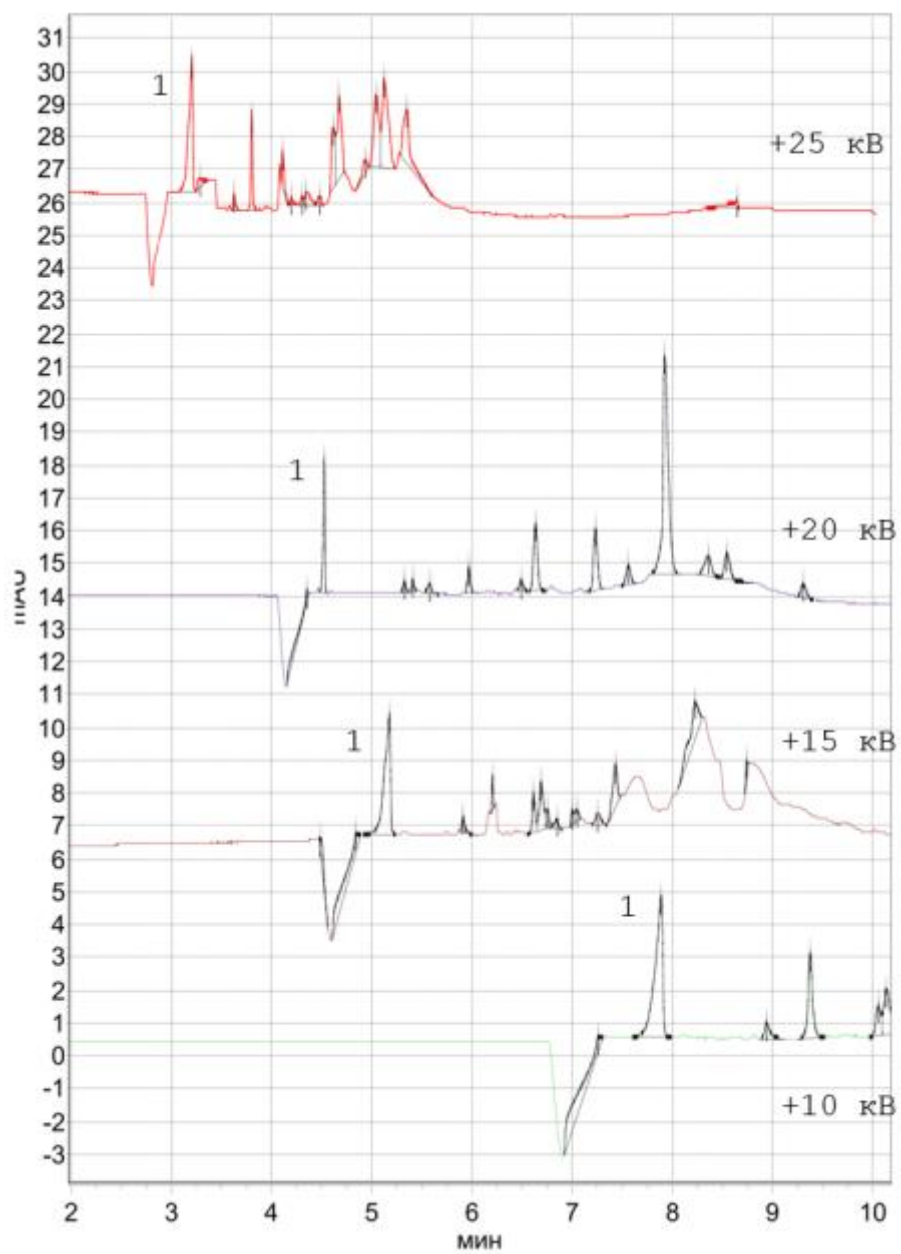


Рисунок 6.3 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – арбутин) (*Толокнянки листья*)

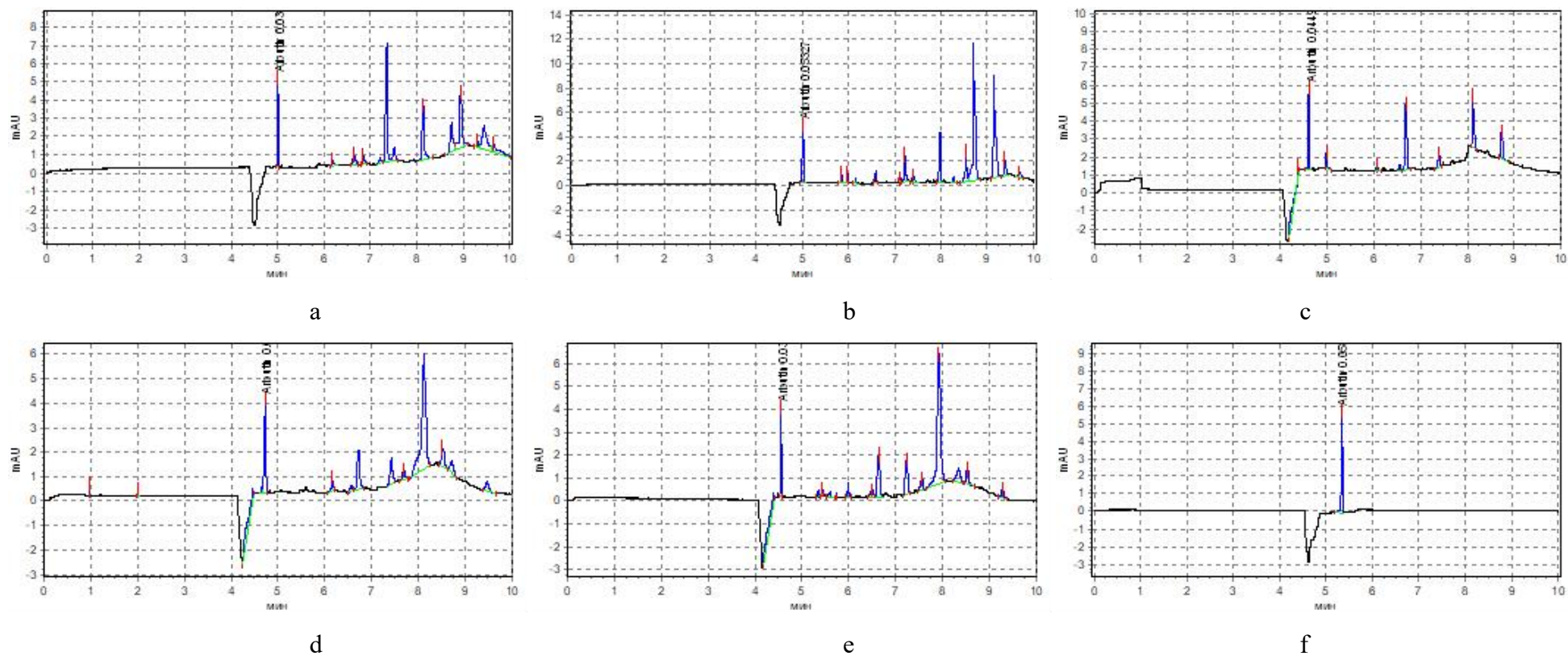


Рисунок 6.4 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из а – толокнянки кавказской листьев (КЧР); толокнянки обыкновенной листьев: б – Ленинградская область; с – Челябинская область; д – Республика Алтай; е – Иркутская область; ф - электрофореграмма СО арбутина (0,06 мг/мл)

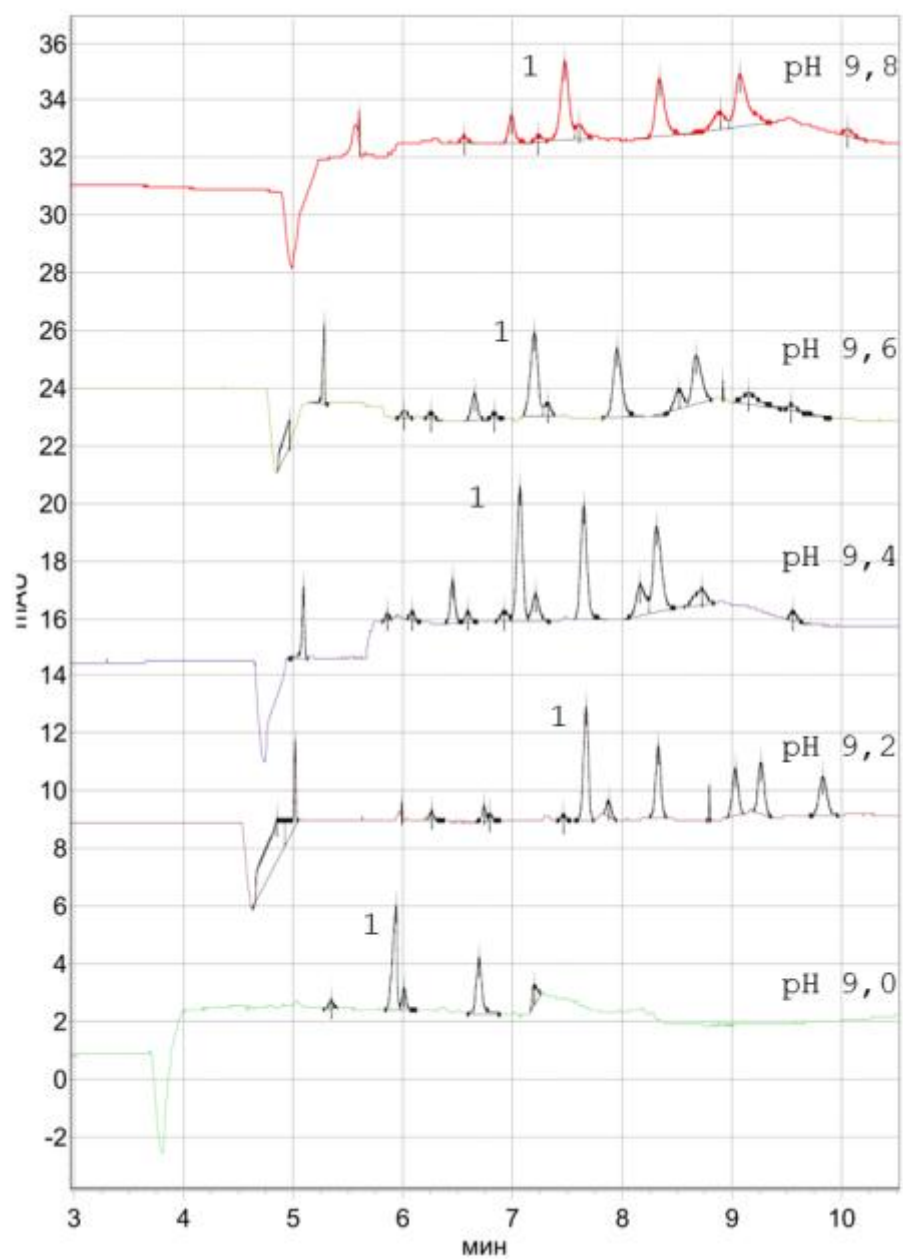


Рисунок 6.5 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – гиперозид)
(Толокнянки листья)

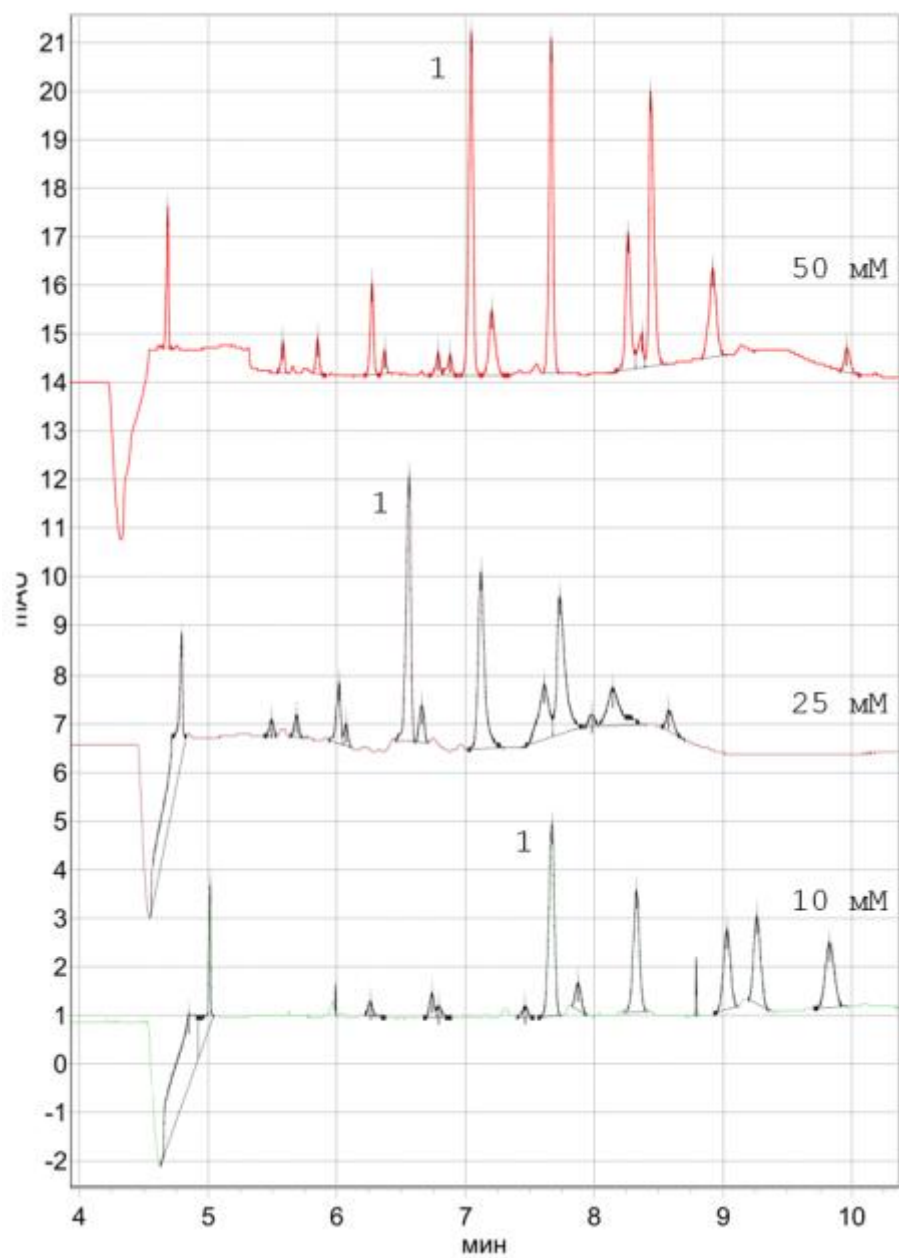


Рисунок 6.6 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – гиперозид)
(Толокнянки листья)

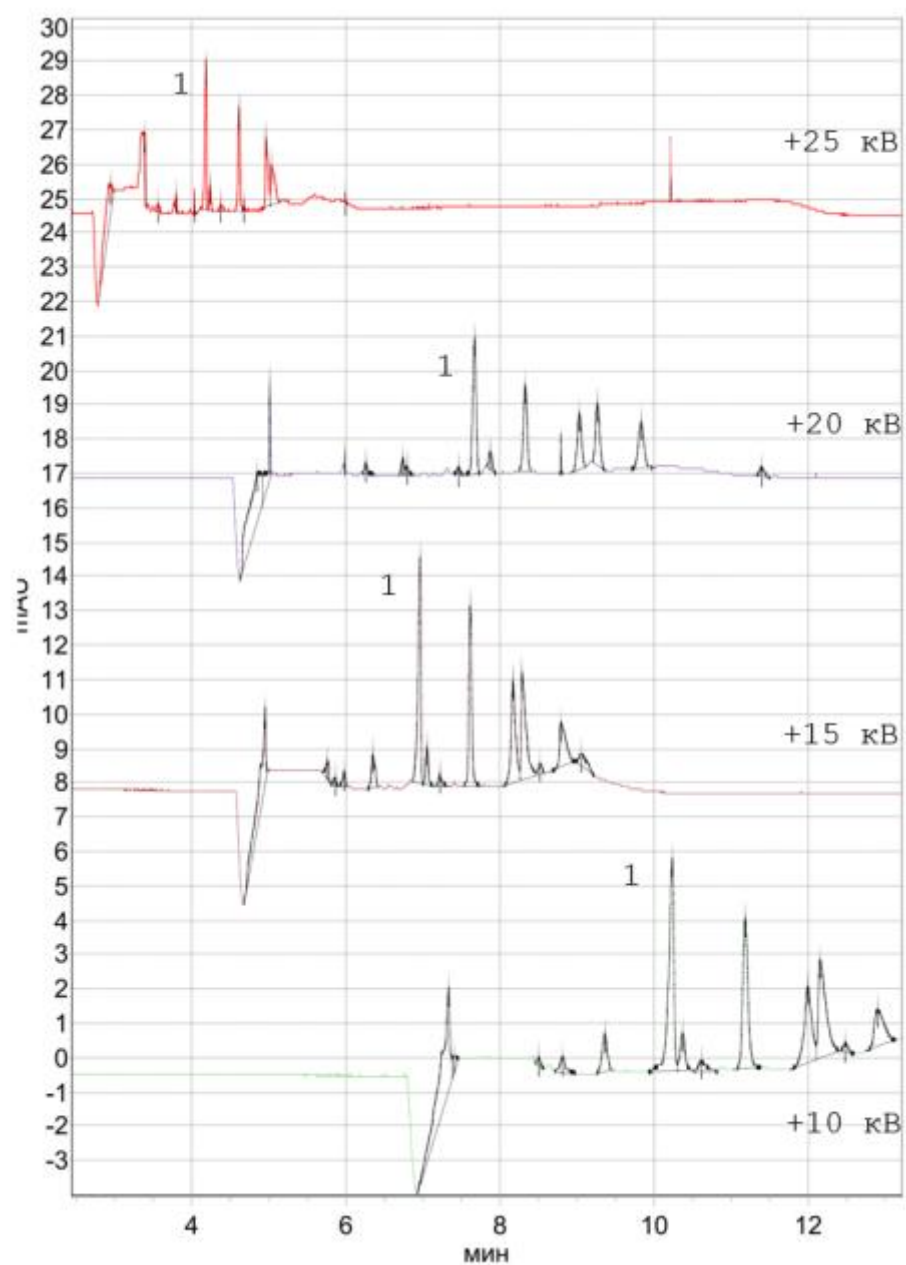


Рисунок 6.7 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – гиперозид)
(Толокнянки листья)

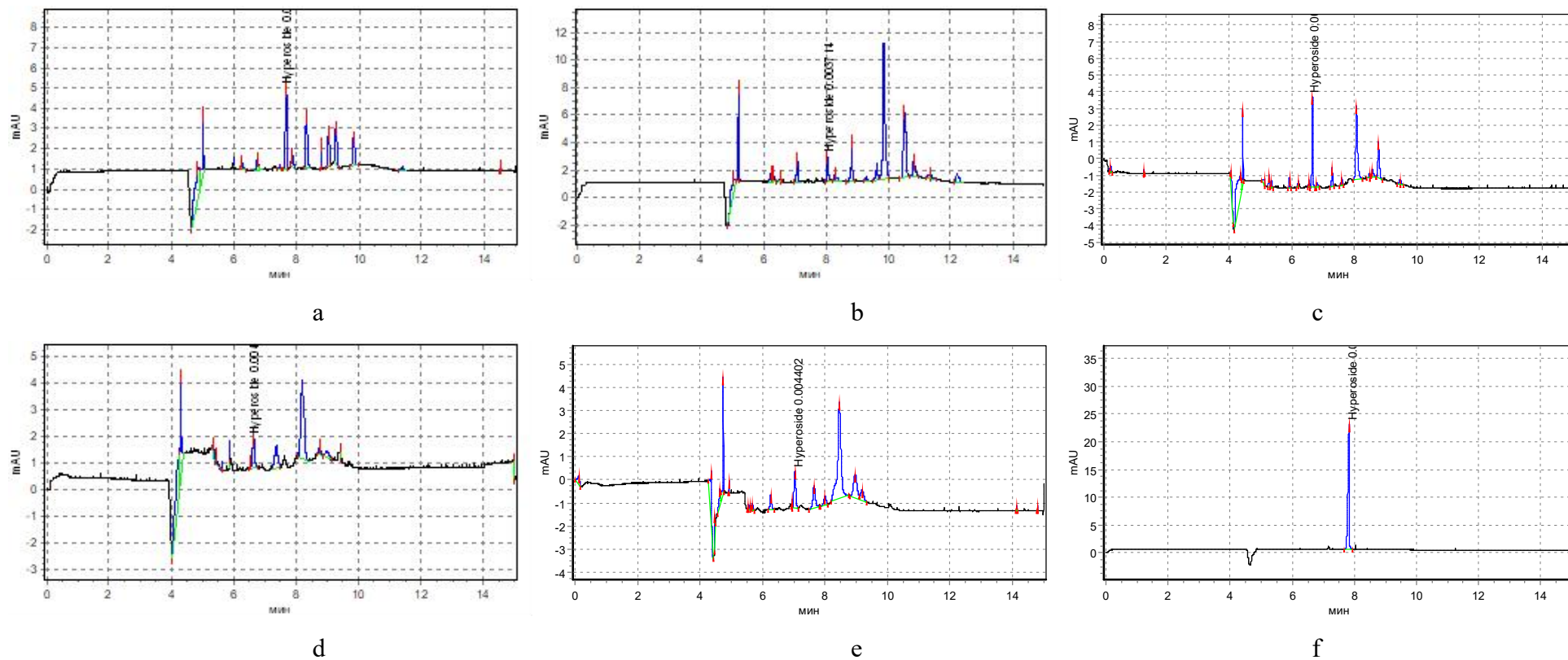


Рисунок 6.8 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из а – толокнянки кавказской листьев (КЧР); толокнянки обыкновенной листьев; б – Ленинградская область; с – Челябинская область; д – Республика Алтай; е – Иркутская область; ф– электрофореграмма СО гиперозида (0,04 мг/мл)

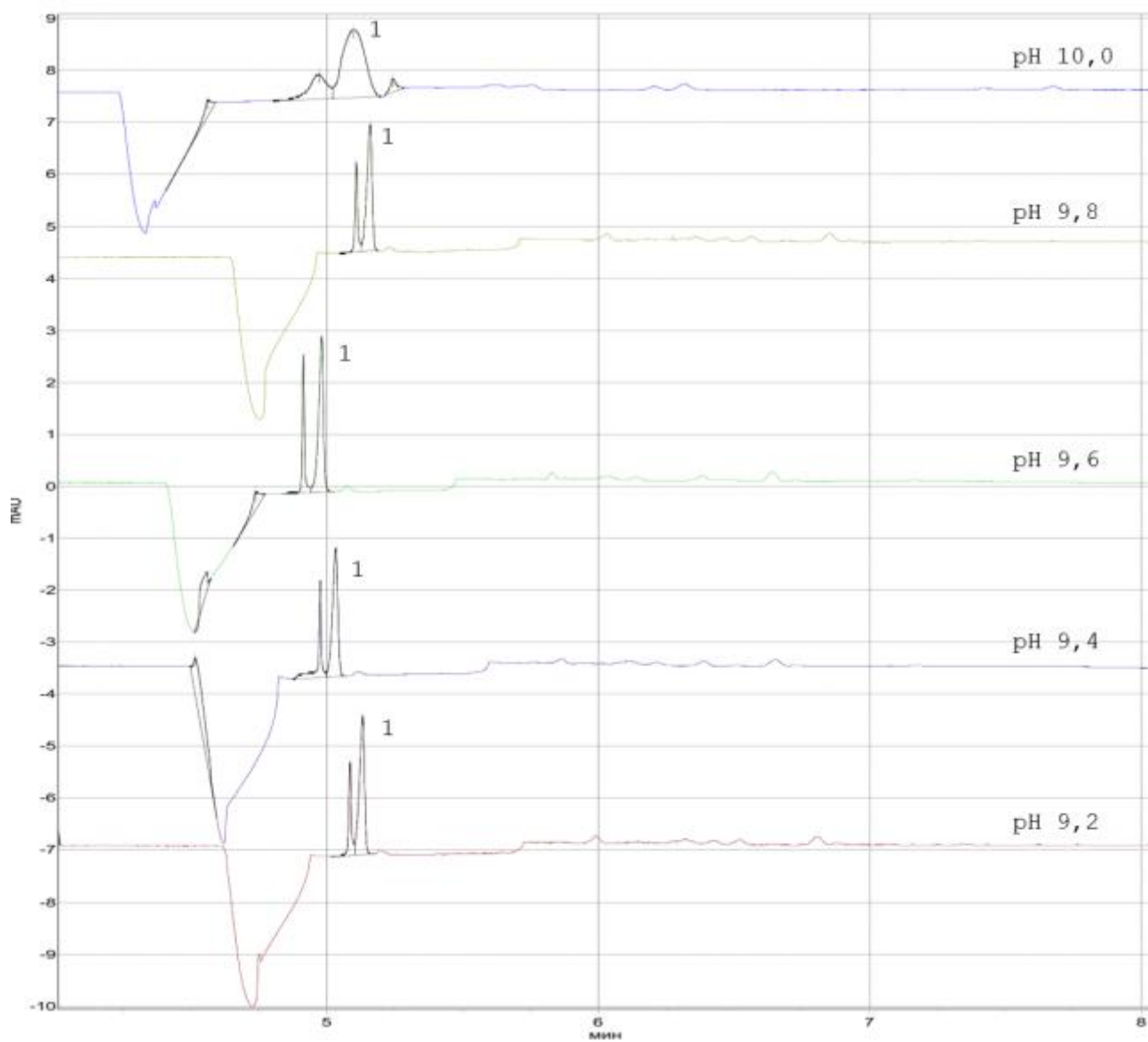


Рисунок 6.9 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – арбутин) (Брусники обыкновенной листья)

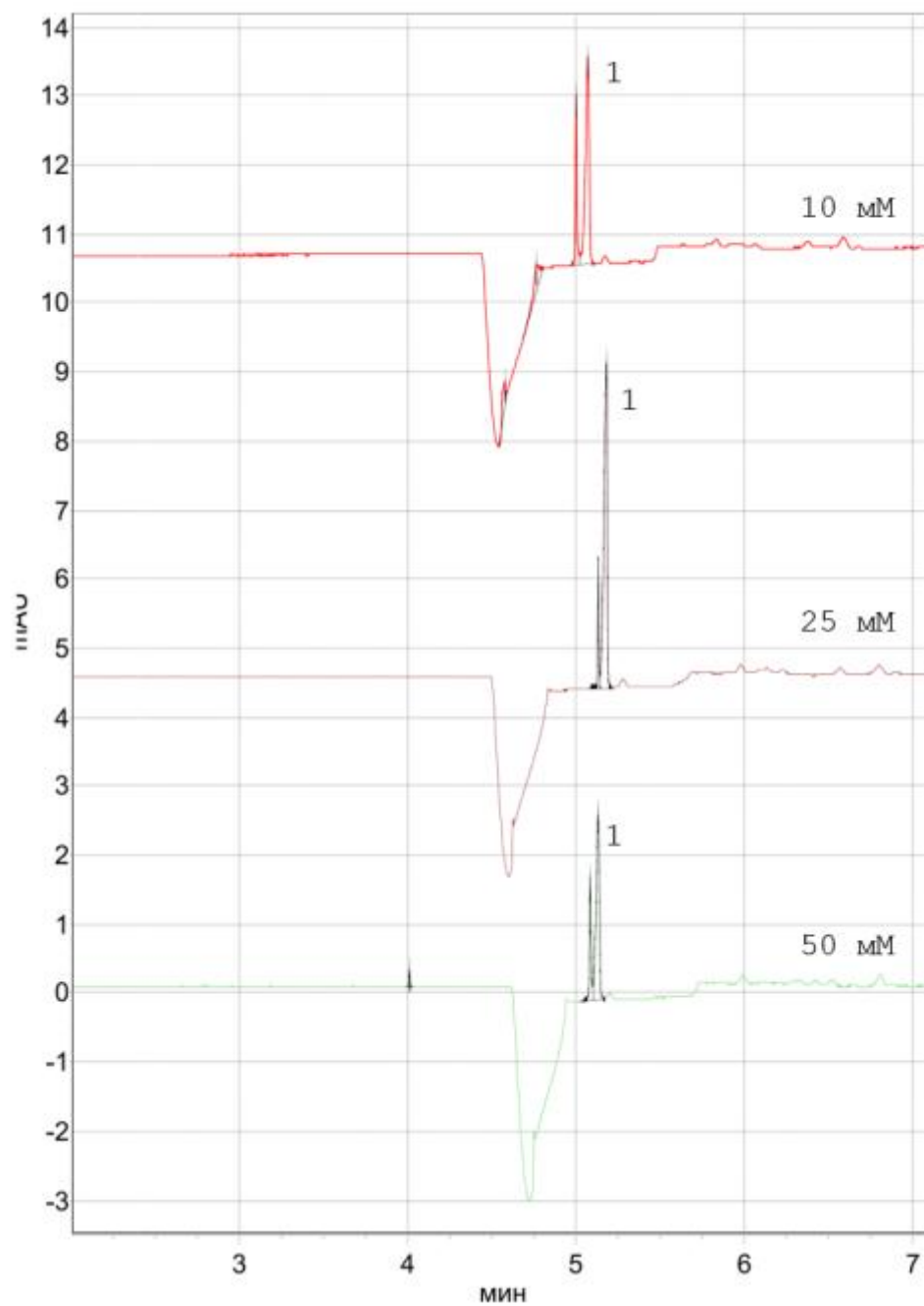


Рисунок 6.10 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – арбутин) (Брусники обыкновенной листья)

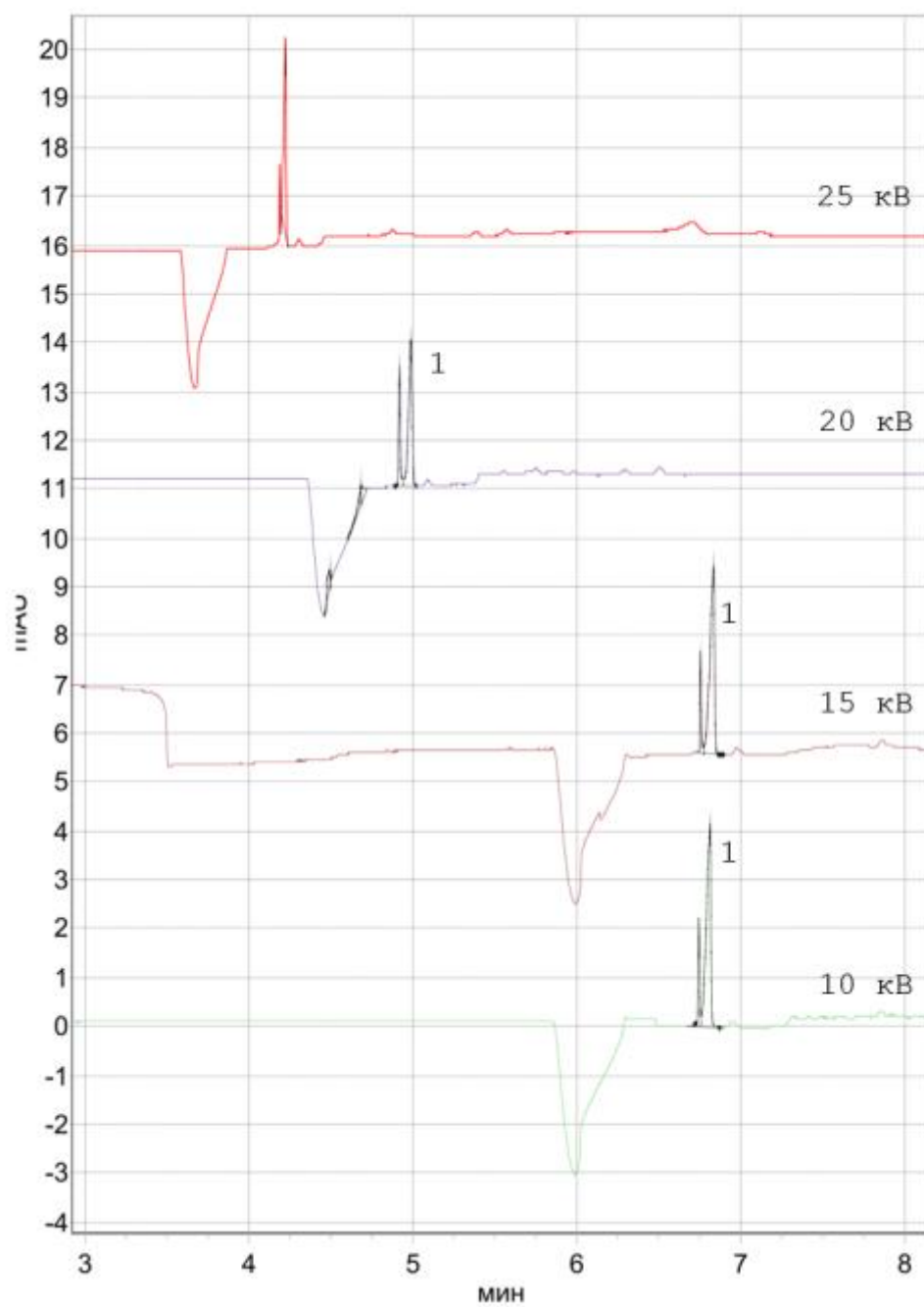


Рисунок 6.11 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – арбутин)
(Брусники обыкновенной листья)

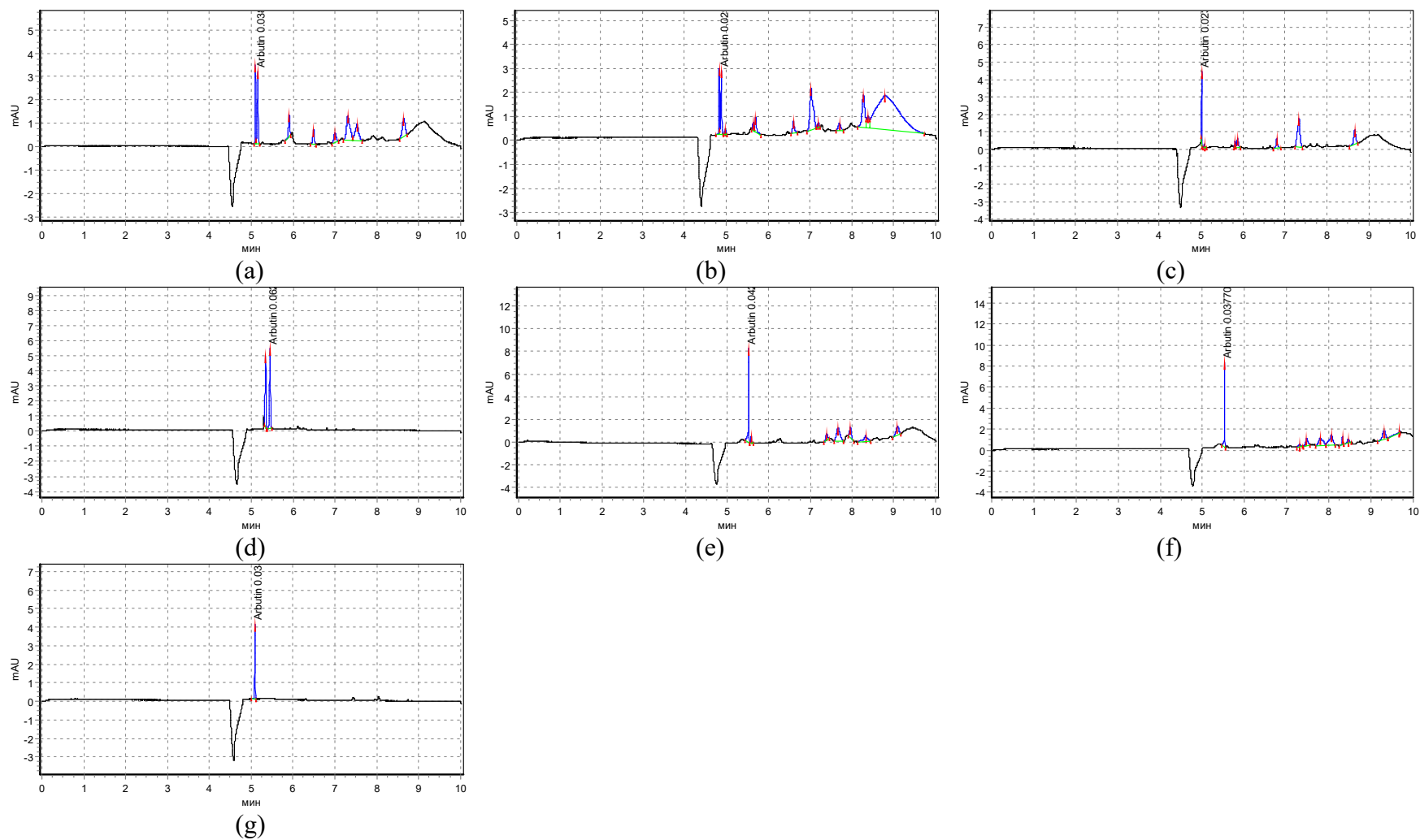


Рисунок 6.12 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из листьев брусники: (а)– берег реки Харбас, Зольский район, Кабардино-Балкарская Республика (КБР); (б) – Кудымкарский район, Пермский край; (с) – поселок Белая Березка, Трубчевский район. Брянская область; (d) – деревня Новое Приречье, Братский район, Иркутская область; (е) – ленточный бор, Павловский район, Алтайский край; (f) – бУчинское водохранилище, Мытищинский район, Московская область; (g) –электрофореграмма СО арбутина (0,0384 мг/мл)

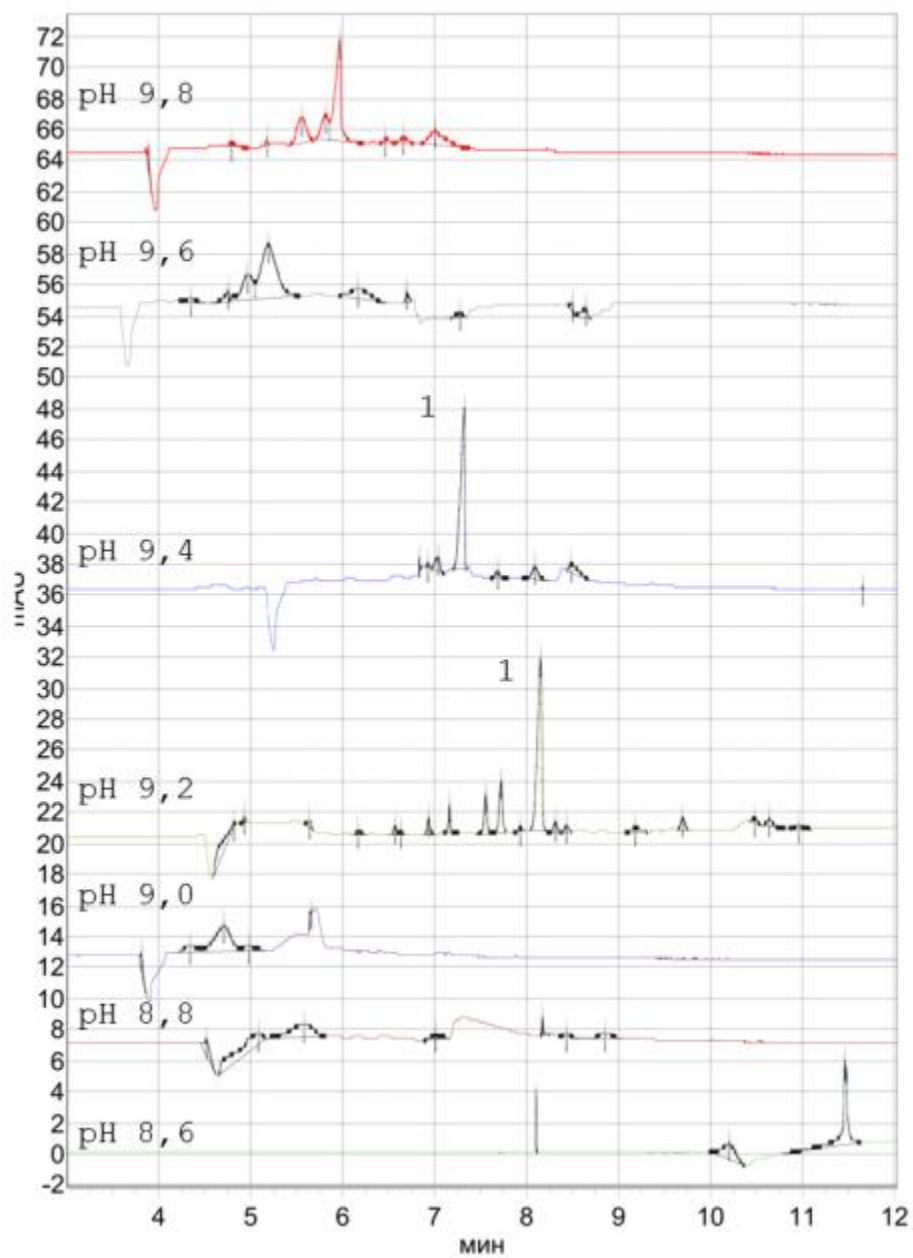


Рисунок 6.13 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – хлорогеновая кислота) (Черники листья)

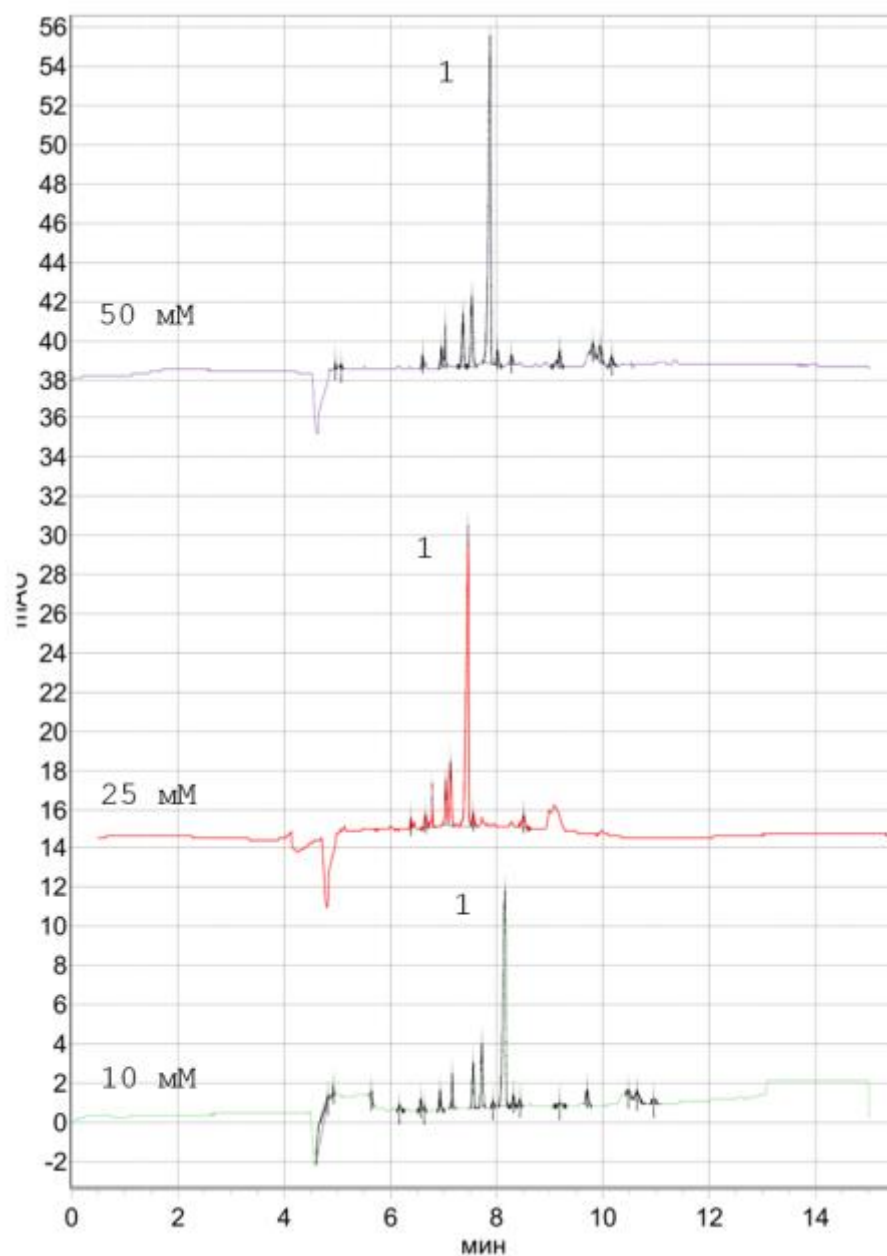


Рисунок 6.14 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – хлорогеновая кислота) (*Черники листья*)

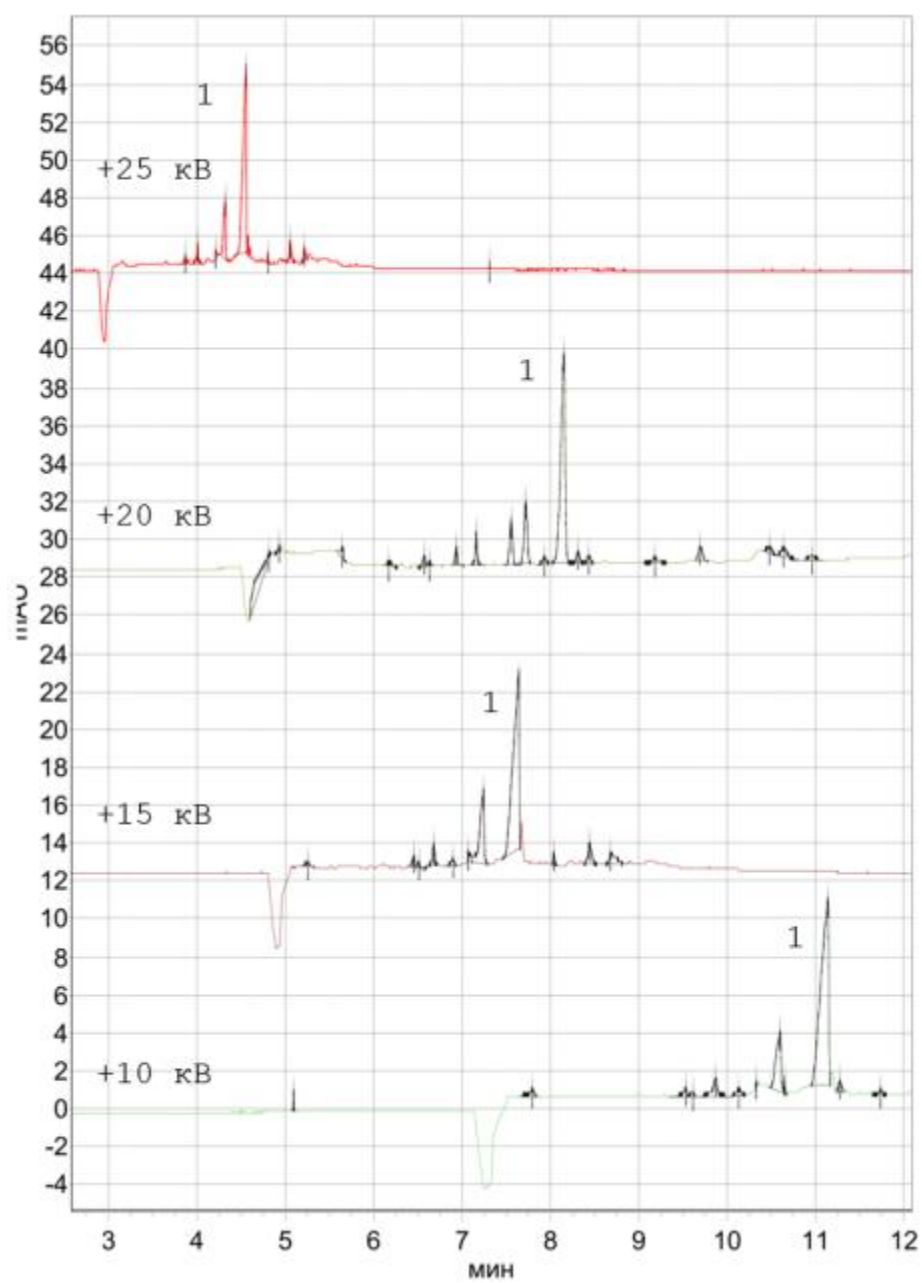


Рисунок 6.15 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – хлорогеновая кислота)
(Черники листья)

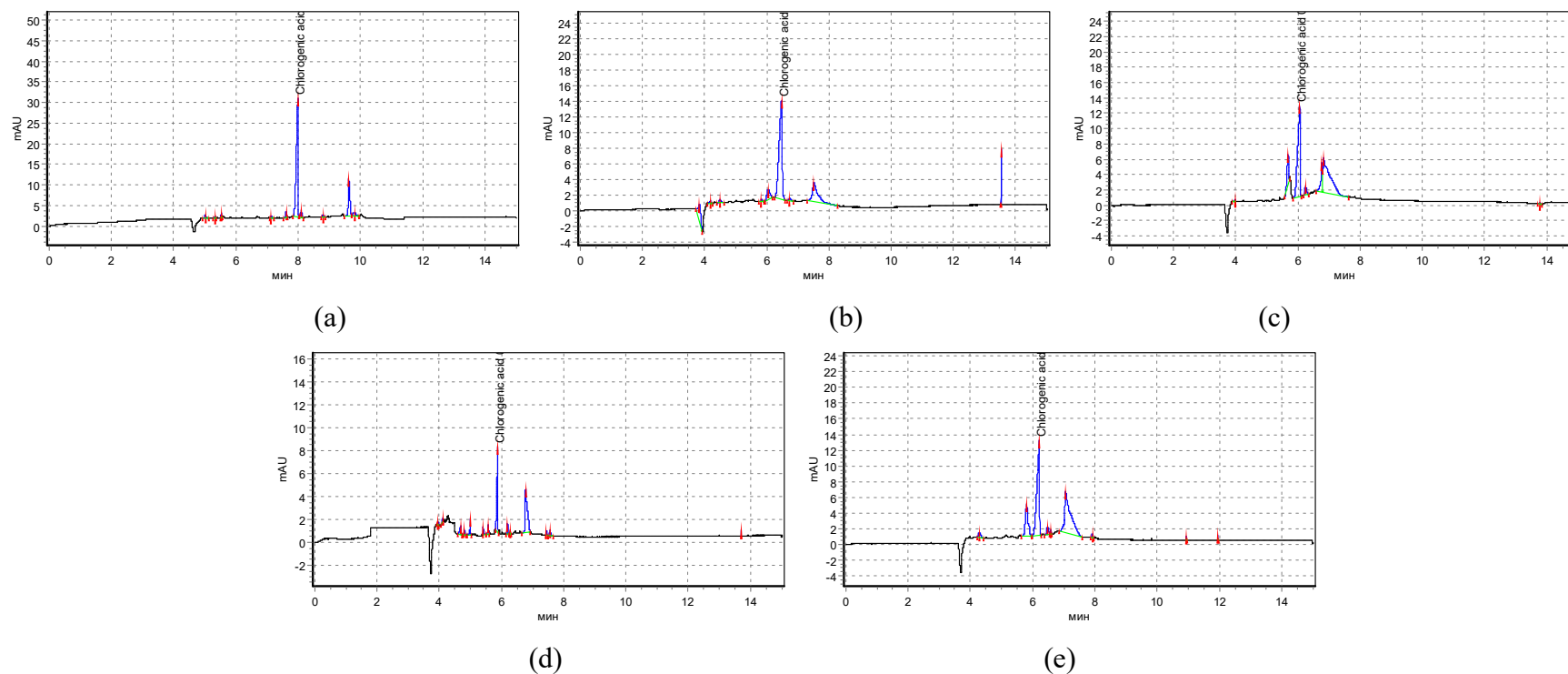


Рисунок 6.16 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из черники обыкновенной листьев: (а)- Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область; (b) – поселок Визимьяры, Республика Марий-Эл; (с) – окрестности села Химой, Чеченская Республика; (d) – окрестности озера Туманлы-Кель, КЧР; (е) – окрестности села Ахты, Республика Дагестан

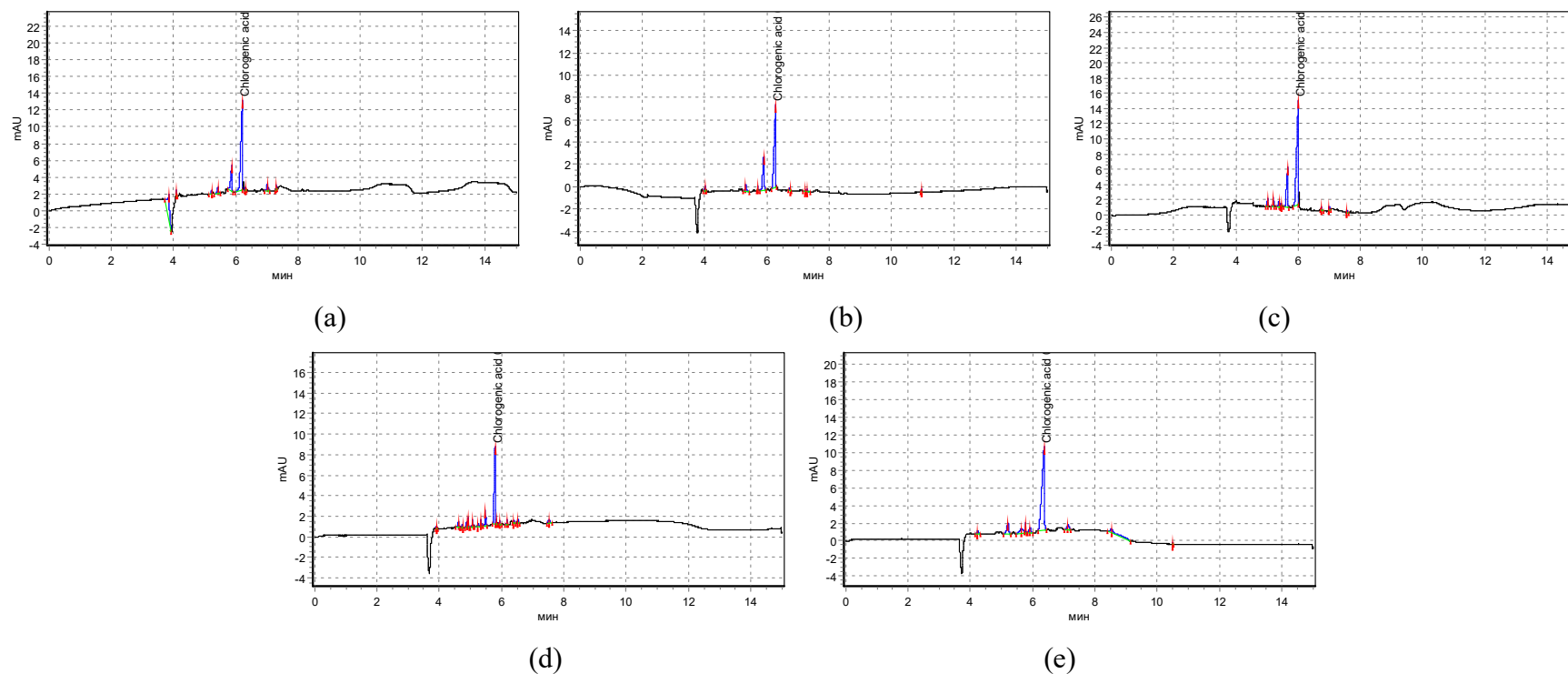


Рисунок 6.17 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из черники кавказской листьев: (a)– село Хамышки, Республика Адыгея; (b) – Яворова поляна, окрестности поселка Гузерипль, Республика Адыгея; (c) – 1 км западнее Партизанской поляны, окрестности поселка Гузерипль, Республика Адыгея; (d) – окрестности горы Шупсе, Апшеронский район, Краснодарский край; (e) – окрестности озера Туманлы-Кель, Карачаевский район, Карачаево-Черкесская Республика

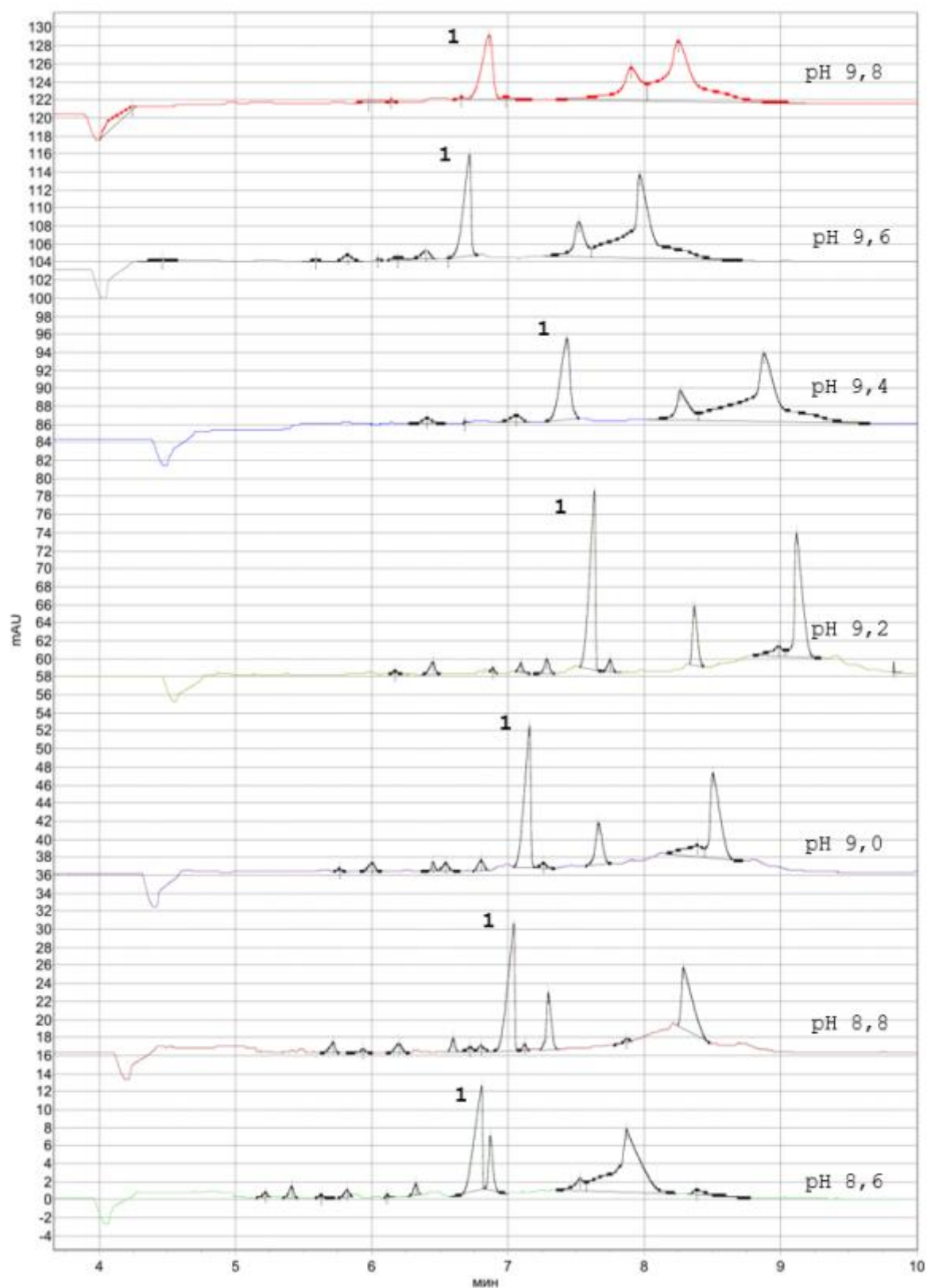


Рисунок 6.18 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – хлорогеновая кислота) (Голубики обыкновенной листья)

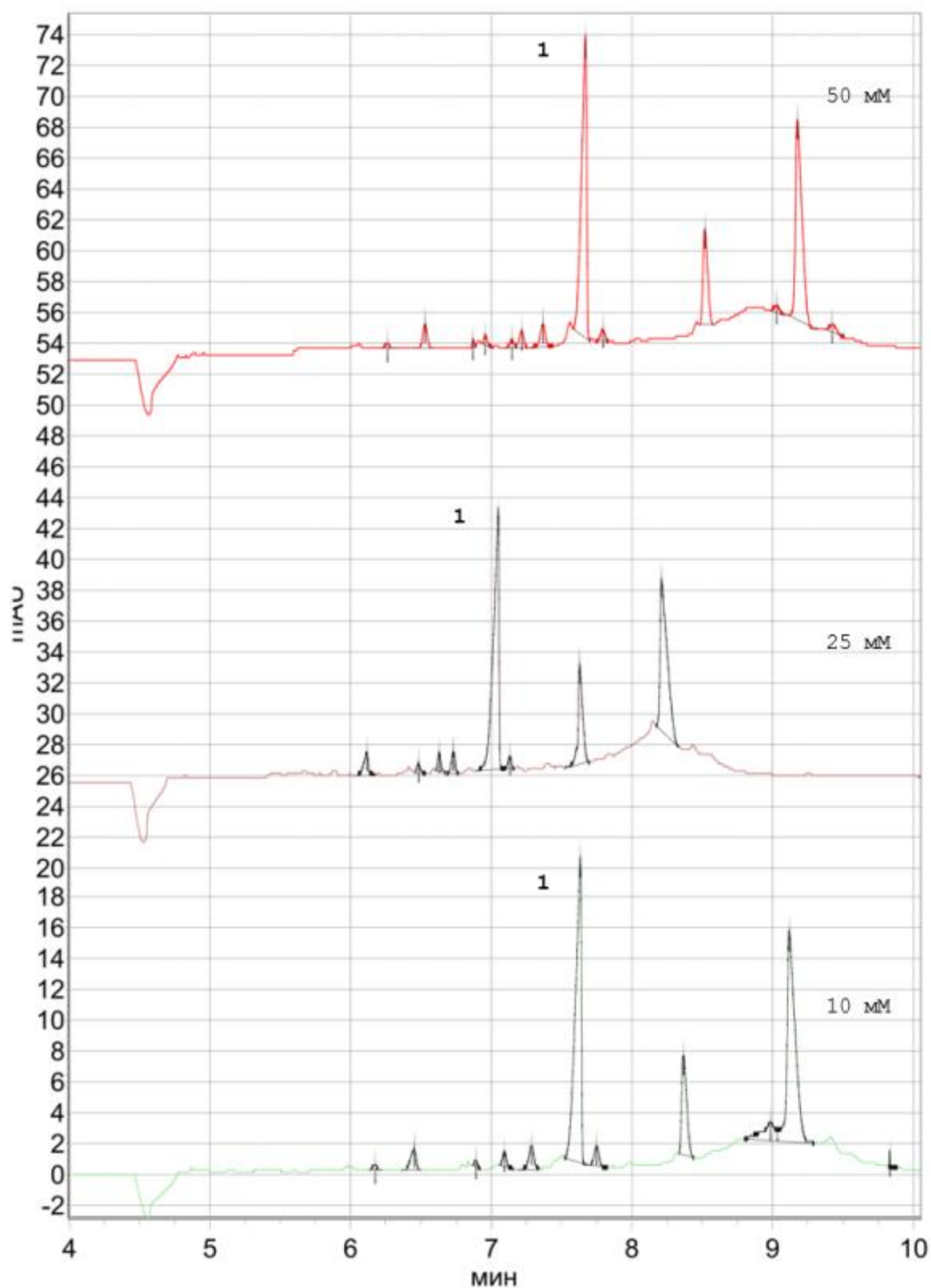


Рисунок 6.19 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – хлорогеновая кислота) (*Голубики обыкновенной* листья)

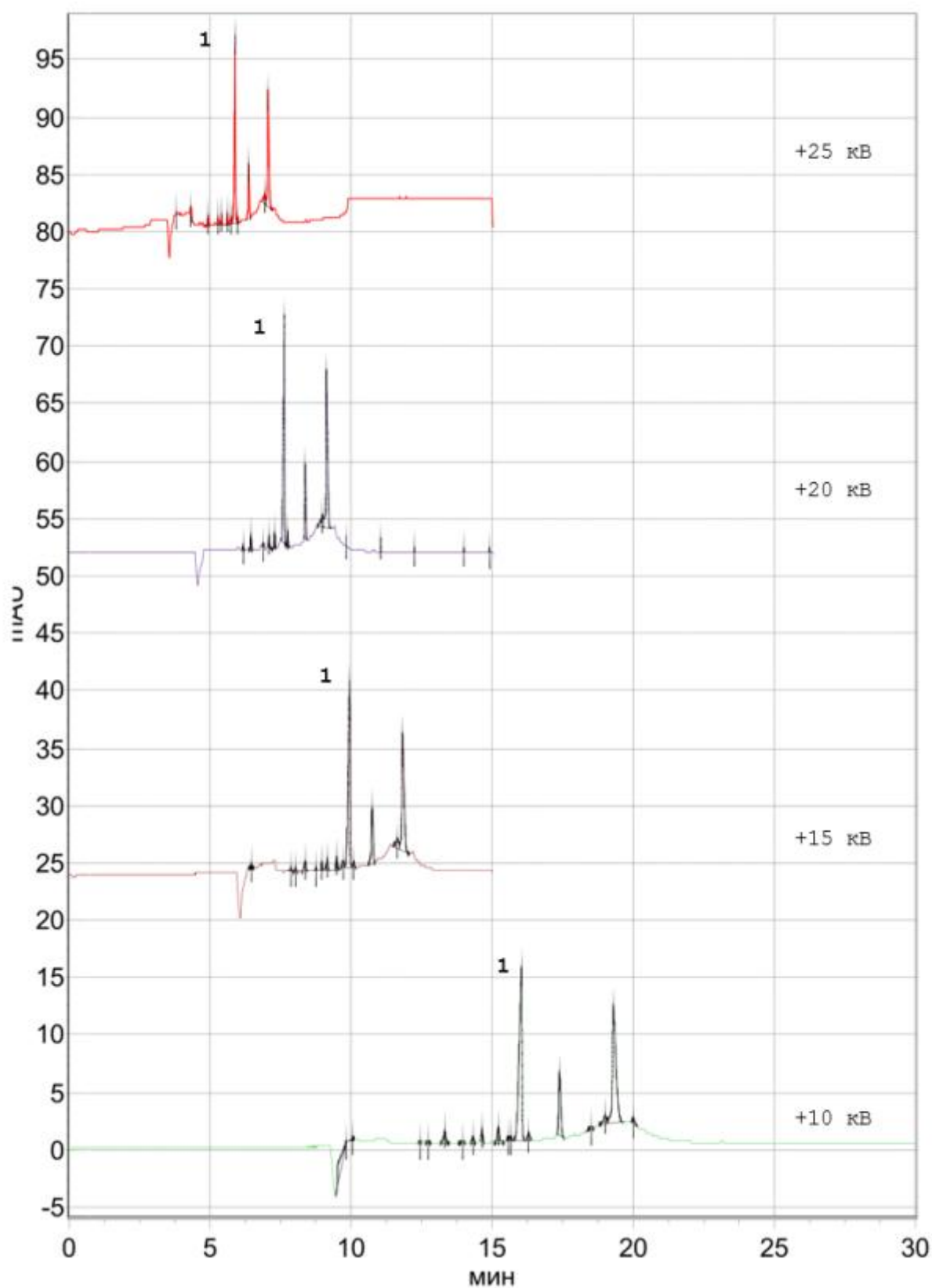
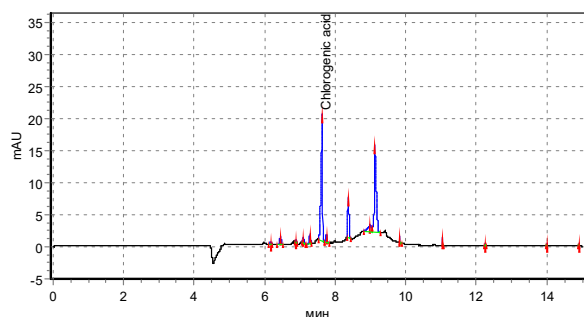
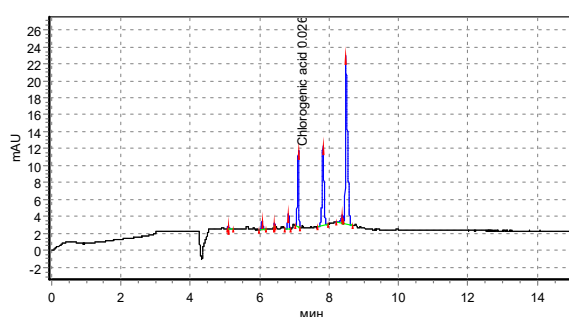


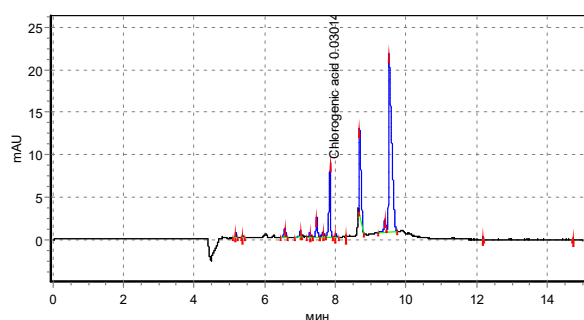
Рисунок 6.20 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – хлорогеновая кислота)
(Голубики обыкновенной листья)



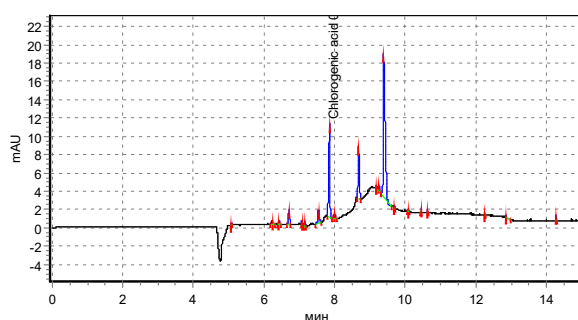
(a)



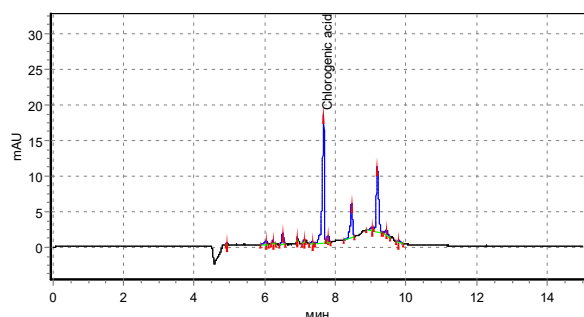
(b)



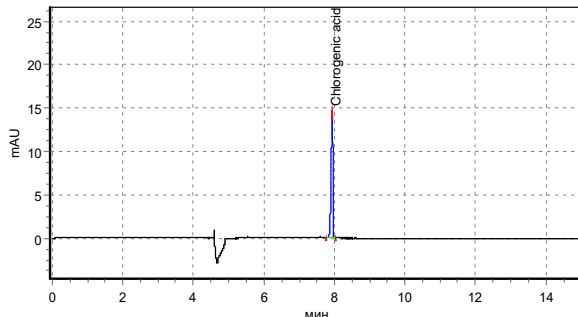
(c)



(d)



(e)



(f)

Рисунок 6.21 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из голубики обыкновенной листьев: (a)- Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область; (b) – гора Иремель, Челябинская область; (c) – гора Малый Иремель, Челябинская область; (d) -деревня Шамокша, Ленинградская область; (e) - – село Визимьяры, Республика Марий Эл; (f) - электрофореграмма СО хлорогеновой кислоты (0,05 мг/мл)

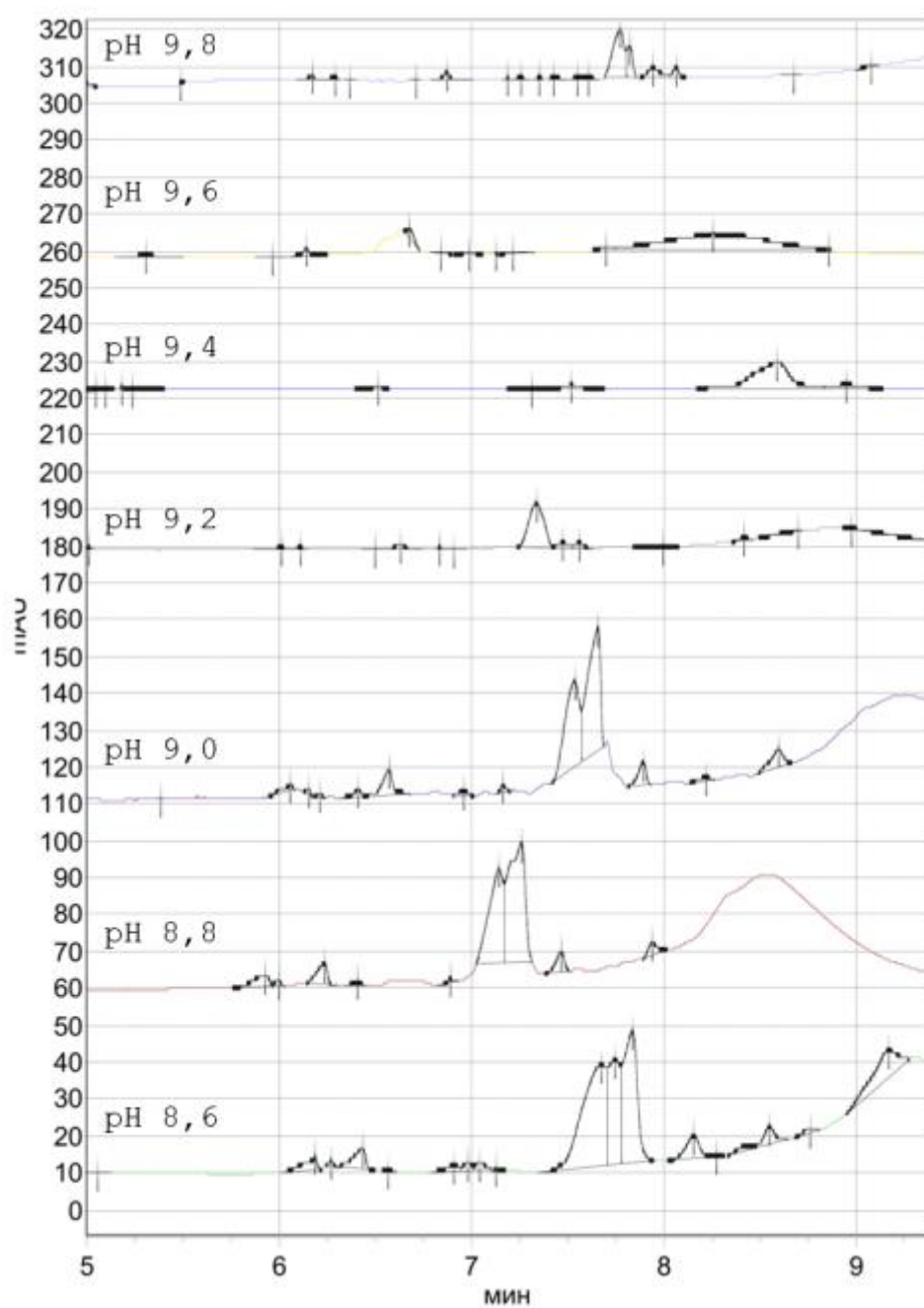


Рисунок 6.22 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – хлорогеновая кислота) (*Клюквы болотной побеги*)

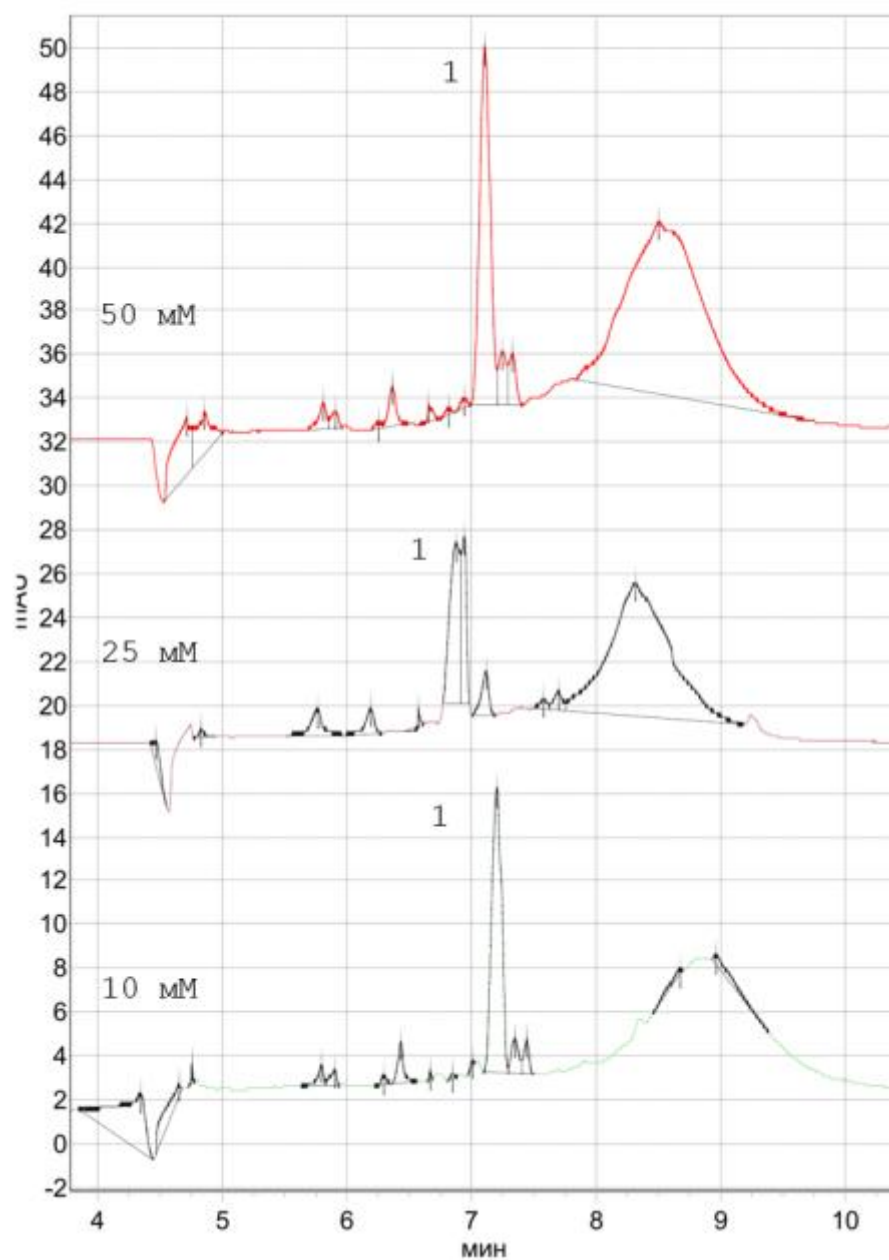


Рисунок 6.23 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – хлорогеновая кислота) (*Клюквы болотной побеги*)

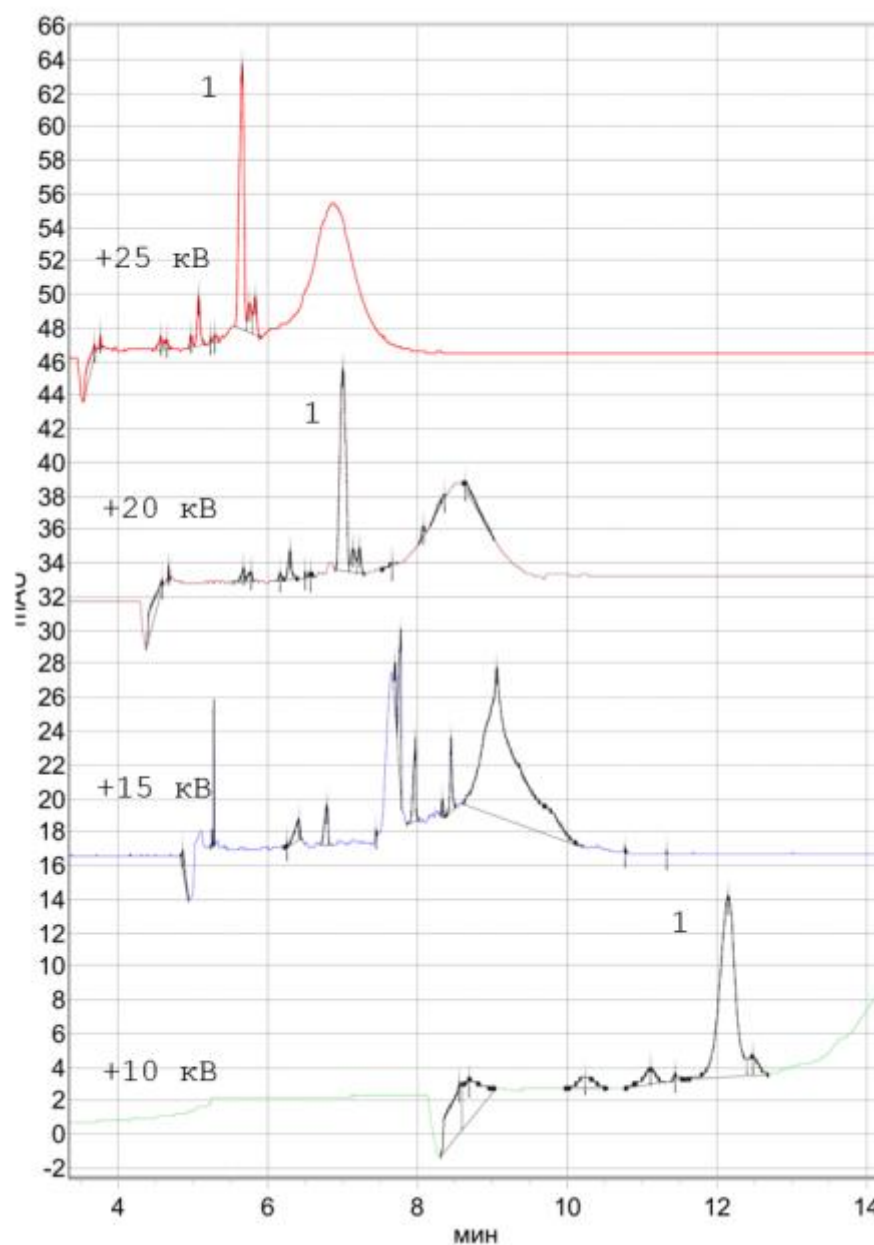


Рисунок 6.24 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – хлорогеновая кислота)

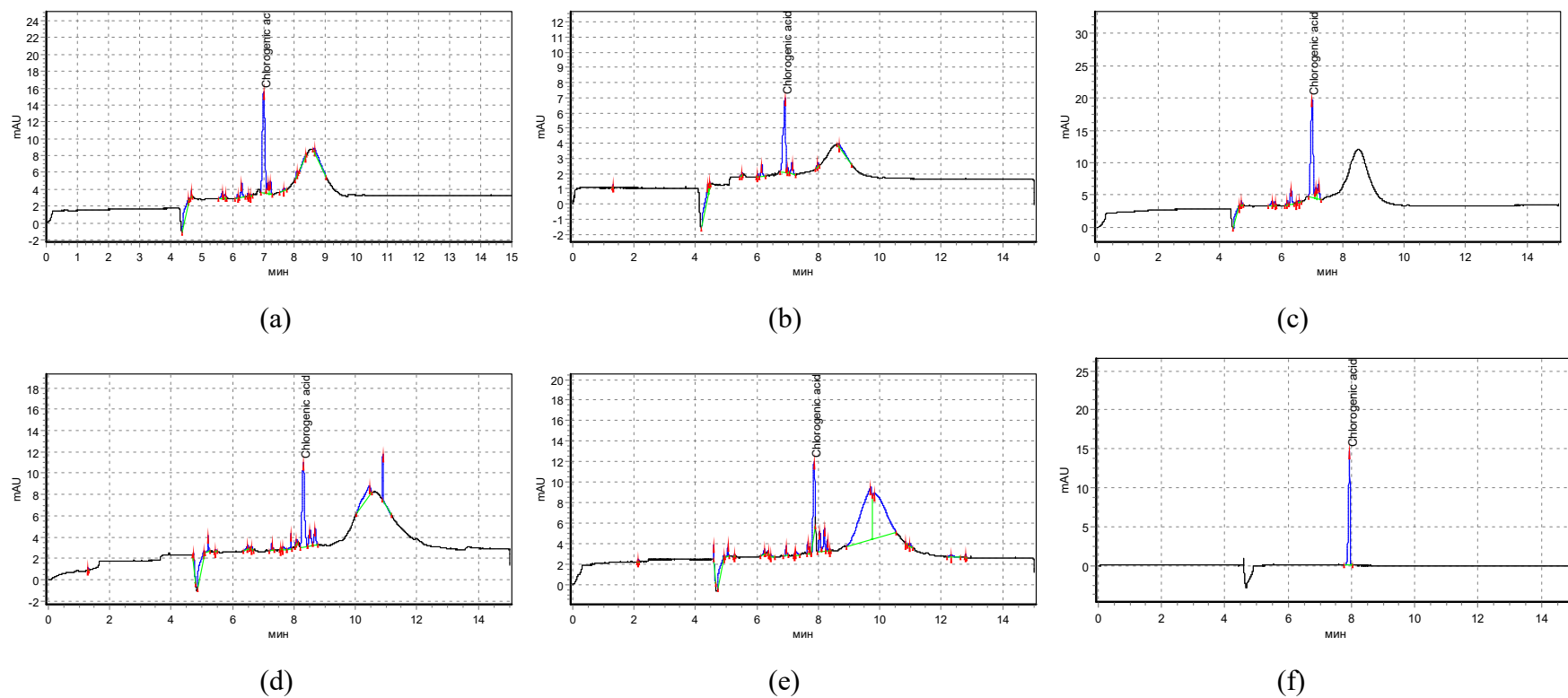


Рисунок 6.25 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из клюквы болотной побегов: (а)– Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область; (б) – деревня Шамокша, Ленинградская область; (с) – село Визимьяры, Республика Марий Эл; (д) – Кличевский район, Могилевская область, Республика Беларусь; (е) – Вилейский район, Минская область, Республика Беларусь; (ф) – электрофореграмма СО хлорогеновой кислоты (0,05 мг/мл)

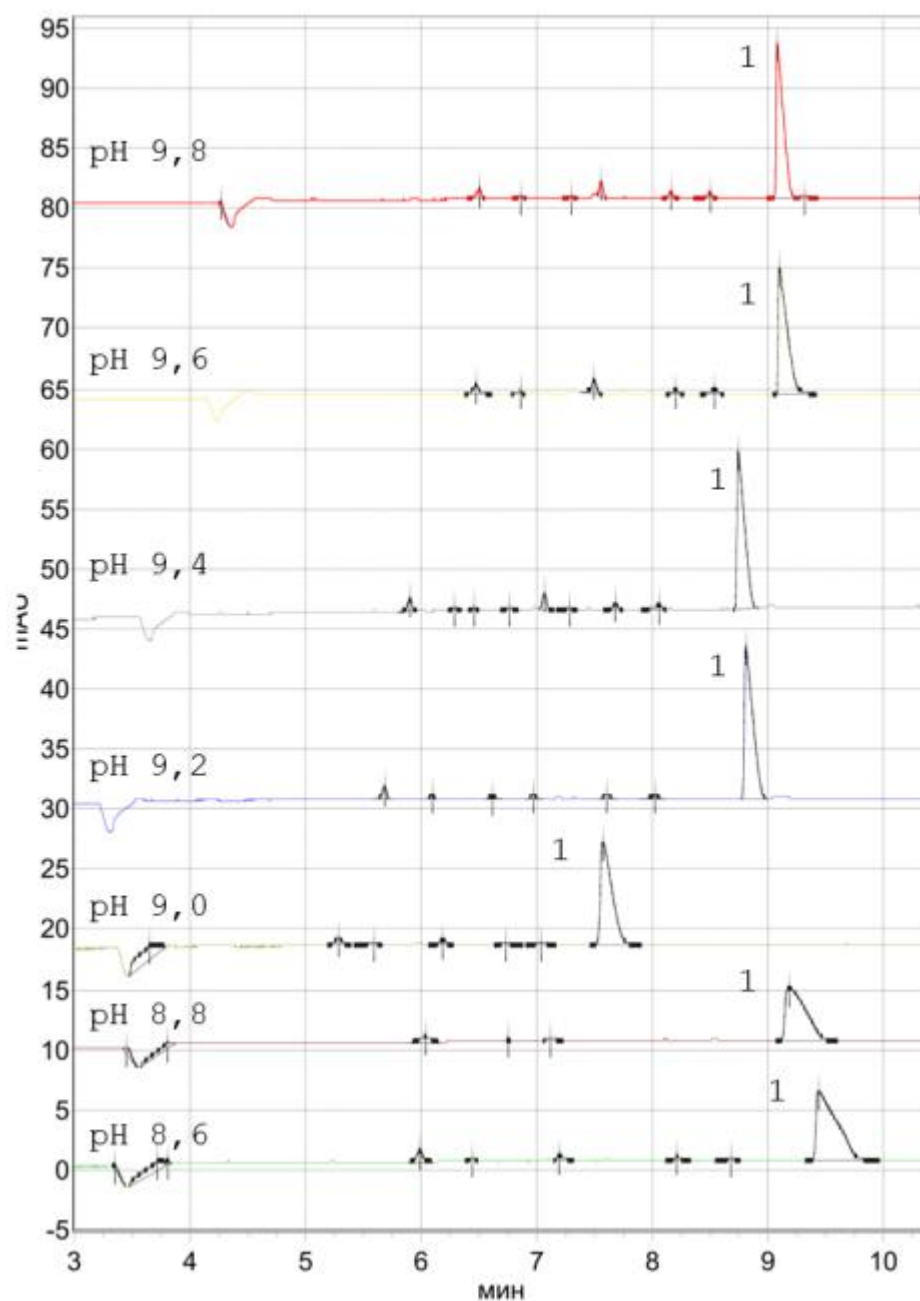


Рисунок 6.26 – Выбор оптимального значения pH боратного буферного раствора (1 – розмариновая кислота) (*Черноголовки трава*)

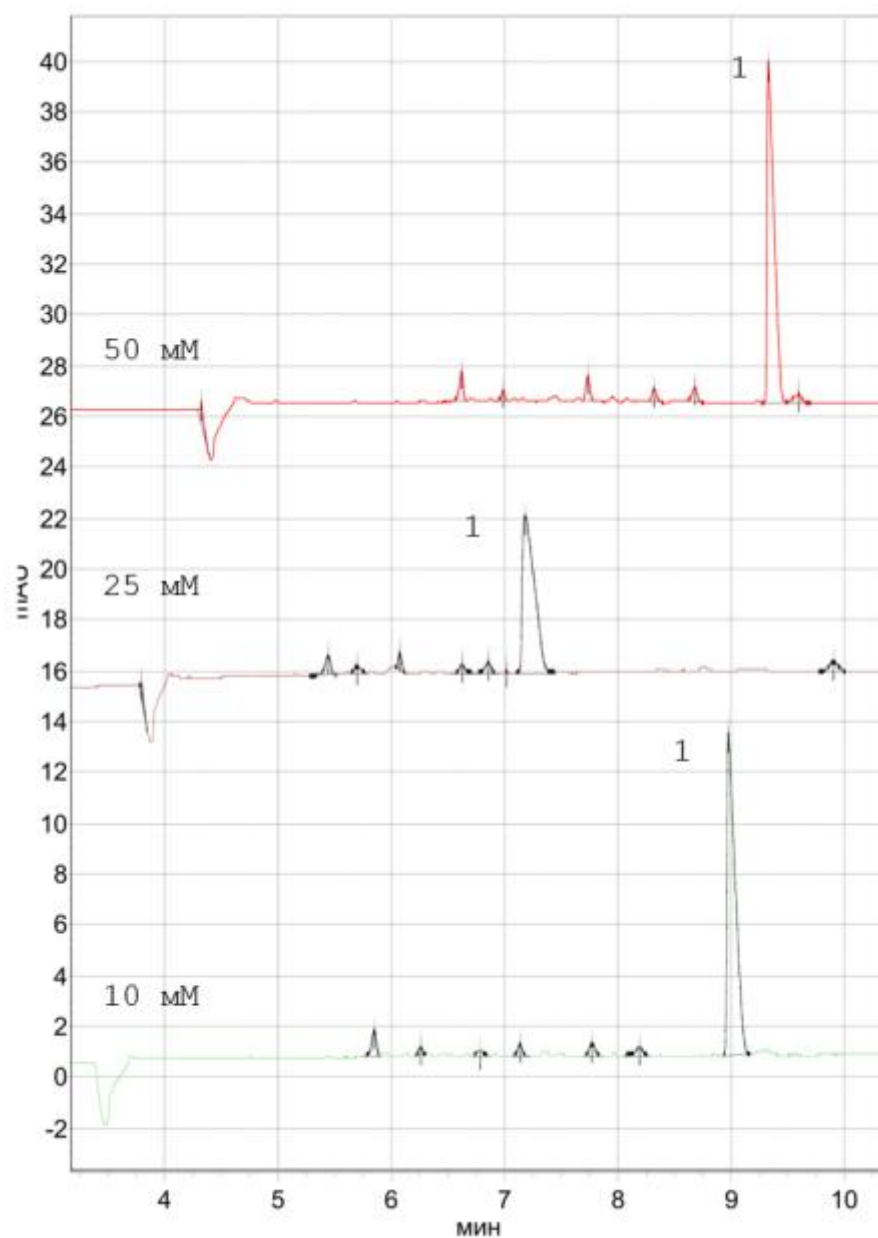


Рисунок 6.27 – Выбор оптимальной концентрации боратного буферного раствора (1 – розмариновая кислота) (*Черноголовки трава*)

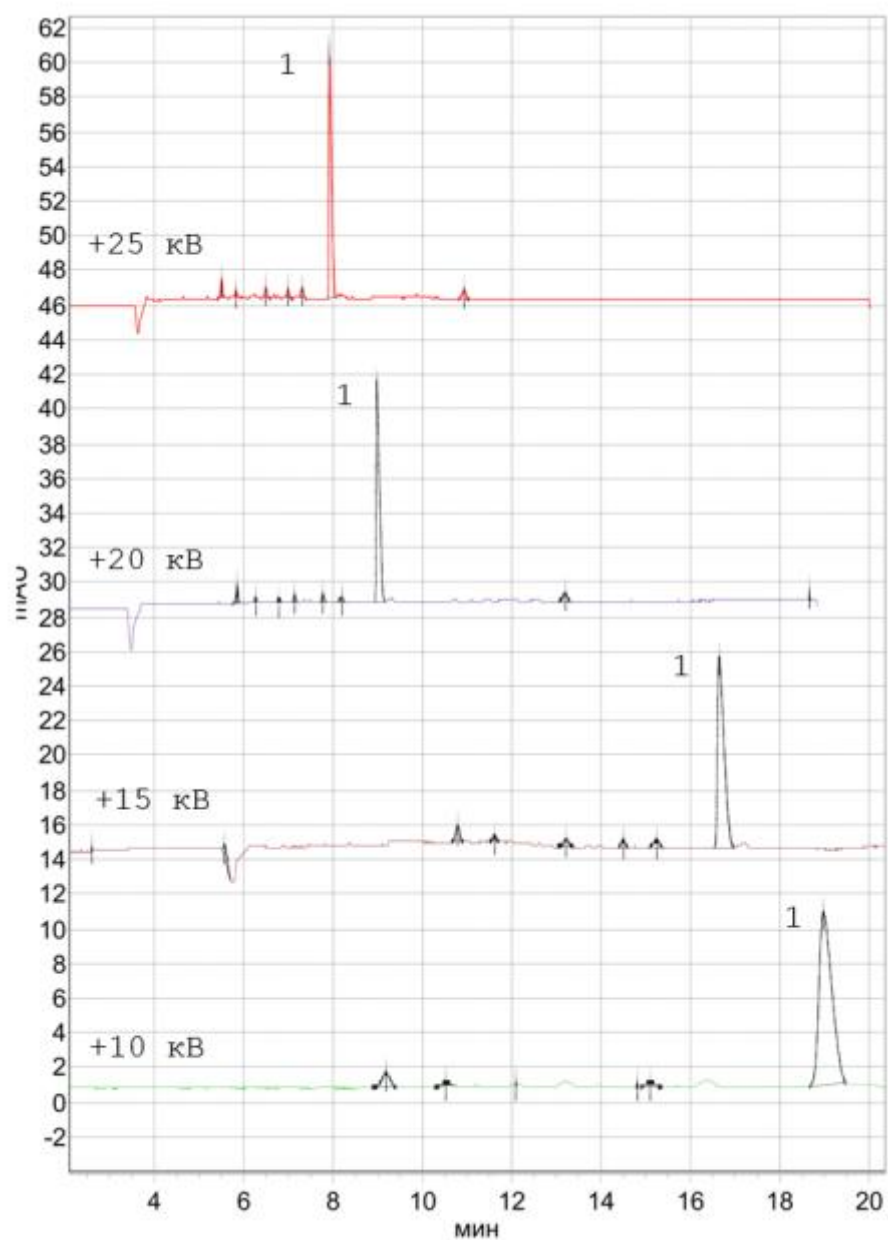


Рисунок 6.28 – Выбор оптимального напряжения в капилляре (1 – розмариновая кислота)
(Черноголовки трава)

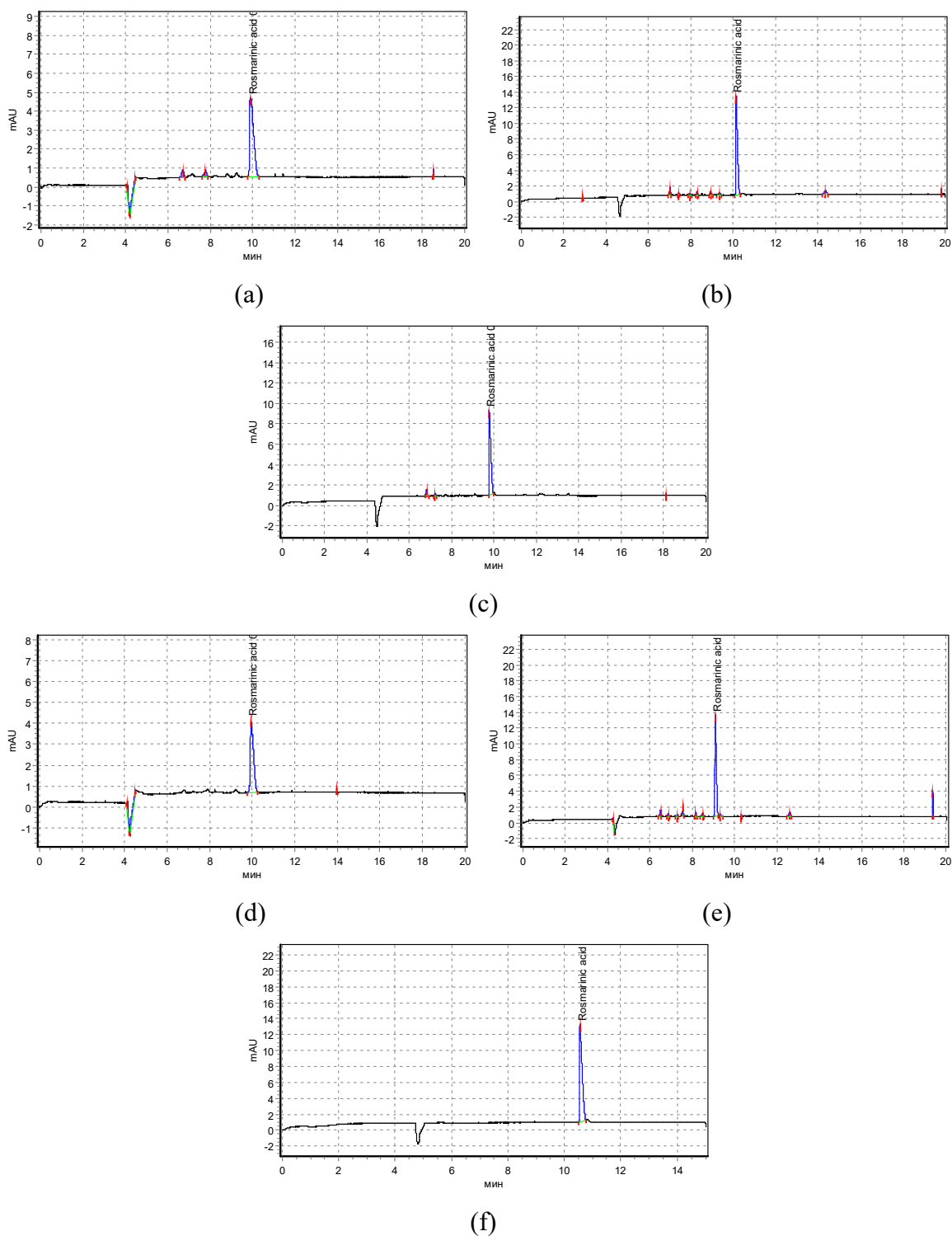


Рисунок 6.29 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из чернойголовки обыкновенной травы (а) – Куйвозовское сельское поселение, Ленинградская область; (б) – берег реки Харбас, КБР; (с) – перевал Гумбаши, КЧР; (д) – окрестности озера Курортное, г. Нальчик, КБР; (е) – юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край; (ф)– электрофореграмма СО розмариновой кислоты (0,0364 мг/мл)

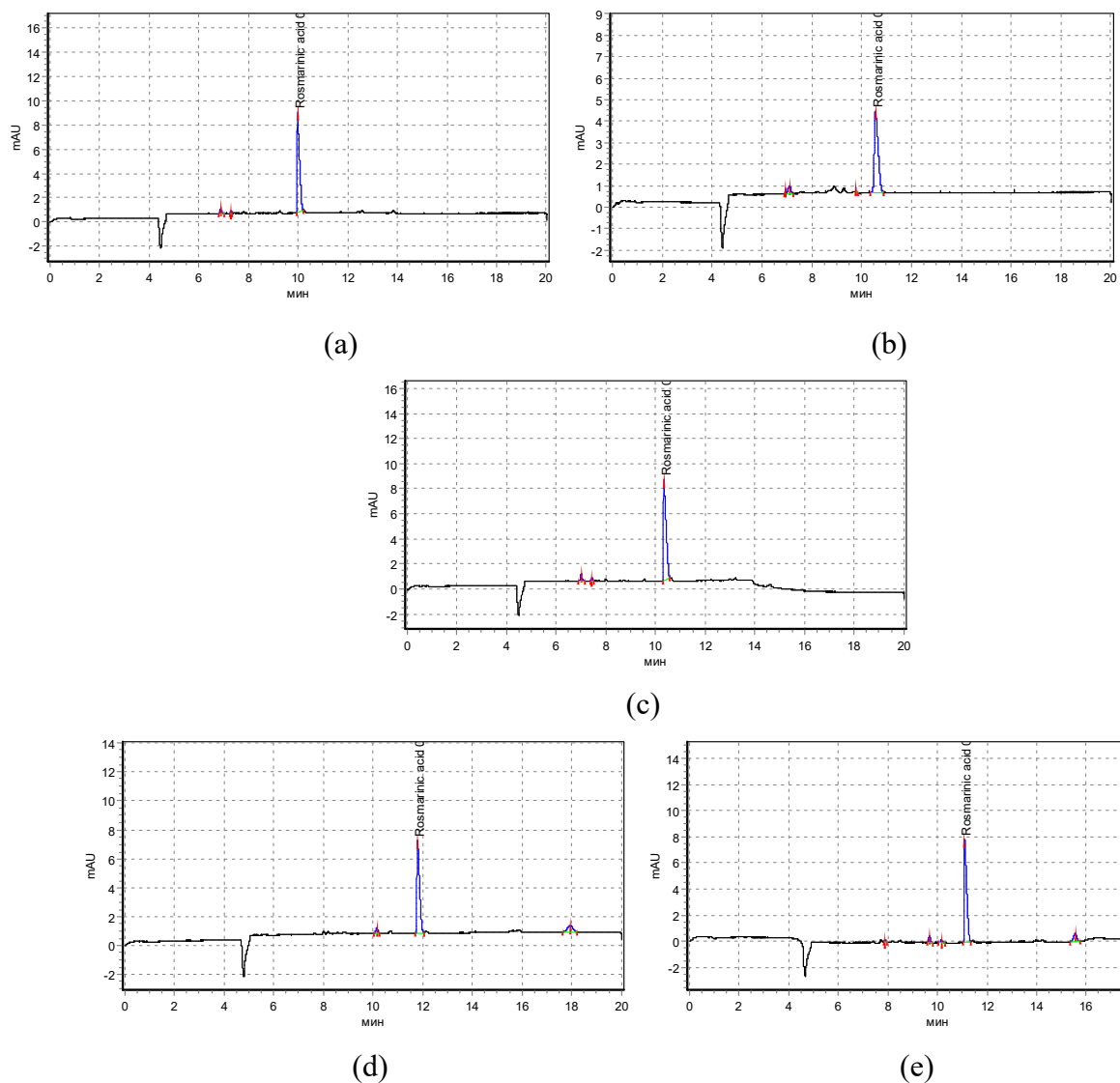


Рисунок 6.30 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из черноголовки крупноцветковой травы (а) – перевал Гумбаши, КЧР; (б)– сосновый лес по дороге на Кичи-Балык, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край; (с) – окрестности горной вершины Красивый Курган, Малокарачаевский район, КЧР; (д) – окрестности горы Кабан, городской округ Кисловодск, Ставропольский край; (е)– окрестности горы 1-я Джуца, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край юго-восточные окрестности горы Бештау, Ставропольский край

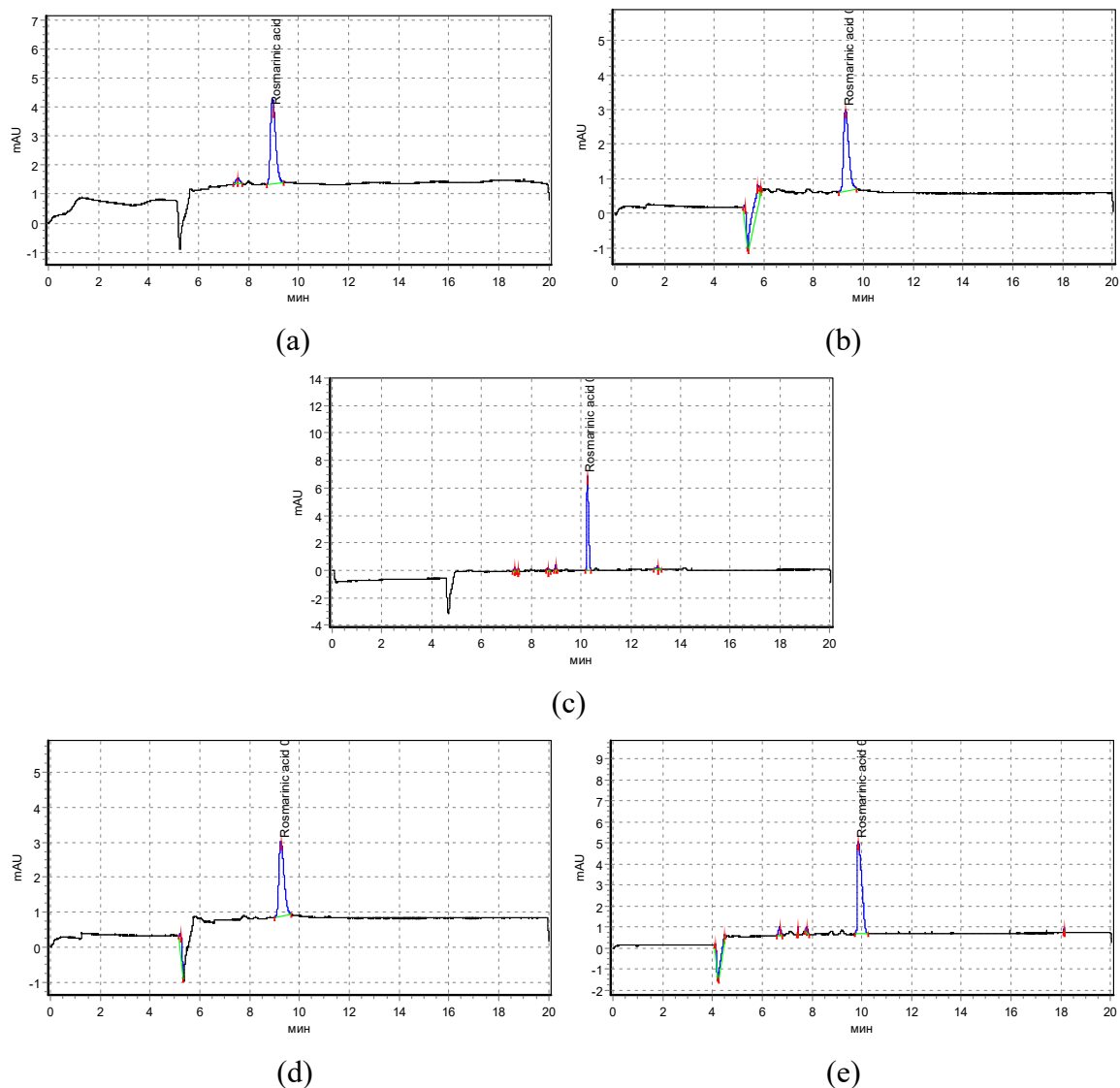


Рисунок 6.31 – Электрофореграммы водно-спиртовых извлечений из черноголовки разрезной травы (а) – юго-западный склон горы Машук, г. Пятигорск, Ставропольский край; (б)– окрестности горы Дубровка, г. Пятигорск, Ставропольский край; (с) – окрестности горы Лысой, станция Лысогорская, Ставропольский край; (d) – окрестности горы 1-я Джуца, Предгорный муниципальный округ, Ставропольский край; (е) – юго-восточные окрестности горы Бештау, Ставропольский край

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Таблица 7.1 – Влияние режима сушки на содержание суммы фенологликозидов и суммы флавоноидов в толокнянки обыкновенной листьях

Режим сушки	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Толокнянки обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Сумма фенологликозидов в пересчете на арбутин</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	10,88	0,3116	0,1799	2,57	0,46	4,25
Конвективная 40°C	6	5	10,27	0,3427	0,1399	2,57	0,36	3,50
Конвективная 50°C	6	5	9,81	0,3382	0,1381	2,57	0,35	3,62
Конвективная 60°C	6	5	9,66	0,4237	0,1730	2,57	0,44	4,60
Конвективная 70°C	6	5	9,58	0,2957	0,1207	2,57	0,31	3,24
ИК 40°C	6	5	7,99	0,2893	0,1181	2,57	0,30	3,80
ИК 50°C	6	5	9,46	0,3262	0,1332	2,57	0,34	3,62
ИК 60°C	6	5	7,30	0,3033	0,1238	2,57	0,32	4,36
ИК 70°C	6	5	6,28	0,2892	0,1181	2,57	0,30	4,83
<i>Толокнянки обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	1,01	0,0240	0,0138	2,57	0,04	3,53
Конвективная 40°C	6	5	0,83	0,0378	0,0154	2,57	0,04	4,76
Конвективная 50°C	6	5	0,87	0,0374	0,0153	2,57	0,04	4,53
Конвективная 60°C	6	5	0,85	0,0351	0,0143	2,57	0,04	4,31
Конвективная 70°C	6	5	0,85	0,0338	0,0138	2,57	0,04	4,16
ИК 40°C	6	5	0,81	0,0234	0,0096	2,57	0,03	3,03
ИК 50°C	6	5	0,83	0,0252	0,0103	2,57	0,03	3,19
ИК 60°C	6	5	0,84	0,0352	0,0144	2,57	0,04	4,38
ИК 70°C	6	5	0,78	0,0263	0,0107	2,57	0,03	3,53
<i>Толокнянки обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Арбутин (КЭ)</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	8,84	0,2533	0,1462	2,57	0,38	4,25
Конвективная 40°C	6	5	7,39	0,2681	0,1095	2,57	0,28	3,81
Конвективная 50°C	6	5	7,95	0,3077	0,1256	2,57	0,32	4,06
Конвективная 60°C	6	5	6,54	0,3020	0,1233	2,57	0,32	4,85
Конвективная 70°C	6	5	4,65	0,1262	0,0515	2,57	0,13	2,85

ИК 40°С	6	5	7,10	0,3044	0,1243	2,57	0,32	4,50
ИК 50°С	6	5	6,75	0,3113	0,1271	2,57	0,33	4,84
ИК 60°С	6	5	5,66	0,2325	0,0949	2,57	0,24	4,31
ИК 70°С	6	5	4,18	0,1699	0,0694	2,57	0,18	4,26
<i>Толокнянки обыкновенной листья (образец 1)</i> <i>Гиперозид (КЭ)</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	0,65	0,0199	0,0115	2,57	0,03	4,53
Конвективная 40°С	6	5	0,39	0,0165	0,0067	2,57	0,02	4,40
Конвективная 50°С	6	5	0,42	0,0129	0,0053	2,57	0,01	3,23
Конвективная 60°С	6	5	0,42	0,0110	0,0045	2,57	0,01	2,76
Конвективная 70°С	6	5	0,31	0,0130	0,0053	2,57	0,01	4,34
ИК 40°С	6	5	0,41	0,0076	0,0031	2,57	0,01	1,92
ИК 50°С	6	5	0,47	0,0106	0,0043	2,57	0,01	2,38
ИК 60°С	6	5	0,42	0,0120	0,0049	2,57	0,01	3,03
ИК 70°С	6	5	0,21	0,0072	0,0029	2,57	0,01	3,66

Таблица 7.2 – Результаты определения измельченности цельного, измельченного и порошка толокнянки листьев

Вид	№ обр.	Цельное сырье, % (n=6)	Измельченное сырье, % (n=6)		Порошок сырья, % (n=6)	
		Проходящее сквозь сито диаметром 3 мм	Не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм	Проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм	Не проходящее сквозь сито диаметром 2 мм	Проходящее сквозь сито диаметром 0,18 мм
Толокнянка обыкновенная	1	1,31±0,04	2,22±0,110	2,46±0,102	3,75±0,11	3,45±0,10
	2	1,14±0,05	1,90±0,039	2,21±0,092	2,96±0,07	2,94±0,06
	3	0,81±0,03	2,57±0,106	1,94±0,075	3,51±0,11	3,72±0,12
	4	1,73±0,05	2,09±0,090	1,87±0,050	4,24±0,13	4,38±0,12
Толокнянка кавказская	1	1,53±0,05	2,14±0,056	2,58±0,091	2,60±0,09	4,11±0,12

Таблица 7.3– Результаты определения посторонних примесей в толокнянке листьях

Вид	№ обр.	Вид примеси, % (n=6)			
		Содержание сырья (цельное ЛРС), изменившее окраску (почерневших и побуревших с обеих сторон)	Содержание других частей растений / веточки, плоды (цельное, измельченного ЛРС)	Органическая примесь (цельное, измельченного ЛРС)	Минеральная примесь (цельное, измельченное, порошок)
Толокнянка обыкновенная	1	0,97±0,04	3,18±0,13	0,41±0,02	0,14±0,006
	2	1,44±0,06	2,45±0,10	0,24±0,01	0,22±0,009
	3	1,78±0,08	1,92±0,06	0,36±0,01	0,18±0,007
	4	2,11±0,09	2,97±0,10	0,28±0,01	0,25±0,012
Толокнянка кавказская	1	1,17±0,04	2,55±0,10	0,26±0,01	0,15±0,006

Таблица 7.4 – Влияние режима сушки на содержание суммы фенологликозидов, фенолокислот, флавоноидов и основных компонентов в сырье видов рода *Vaccinium* L.

Режим сушки	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Брусники обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Сумма фенологликозидов в пересчете на арбутин</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	8,47	0,1296	0,0529	2,57	0,14	1,61
Конвективная 40°C	6	5	8,11	0,2149	0,0877	2,57	0,23	2,78
Конвективная 50°C	6	5	7,40	0,1628	0,0665	2,57	0,17	2,31
Конвективная 60°C	6	5	6,22	0,1607	0,0656	2,57	0,17	2,71
Конвективная 70°C	6	5	6,07	0,1945	0,0794	2,57	0,20	3,36
ИК 40°C	6	5	8,10	0,3273	0,1336	2,57	0,34	4,24
ИК 50°C	6	5	8,11	0,3457	0,1411	2,57	0,36	4,47
ИК 60°C	6	5	6,16	0,2020	0,0825	2,57	0,21	3,44
ИК 70°C	6	5	5,83	0,2397	0,0979	2,57	0,25	4,31
<i>Брусники обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	1,16	0,0171	0,0070	2,57	0,02	1,55
Конвективная 40°C	6	5	1,14	0,0316	0,0129	2,57	0,03	2,91
Конвективная 50°C	6	5	1,07	0,0397	0,0162	2,57	0,04	3,91
Конвективная 60°C	6	5	1,01	0,0385	0,0157	2,57	0,04	3,98
Конвективная 70°C	6	5	1,00	0,0270	0,0110	2,57	0,03	2,84
ИК 40°C	6	5	1,07	0,0449	0,0183	2,57	0,05	4,40
ИК 50°C	6	5	1,06	0,0281	0,0115	2,57	0,03	2,78
ИК 60°C	6	5	0,97	0,0460	0,0188	2,57	0,05	4,99
ИК 70°C	6	5	0,84	0,0310	0,0126	2,57	0,03	3,85
<i>Брусники обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Арбутин (КЭ)</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	6,75	0,1993	0,0814	2,57	0,21	3,10
Конвективная 40°C	6	5	5,67	0,1428	0,0583	2,57	0,15	2,64
Конвективная 50°C	6	5	5,40	0,1603	0,0655	2,57	0,17	3,12
Конвективная 60°C	6	5	3,55	0,1099	0,0449	2,57	0,12	3,24
Конвективная 70°C	6	5	1,48	0,0650	0,0265	2,57	0,07	4,60
ИК 40°C	6	5	5,69	0,1086	0,0443	2,57	0,11	2,00
ИК 50°C	6	5	5,46	0,1638	0,0669	2,57	0,17	3,15
ИК 60°C	6	5	4,56	0,1947	0,0795	2,57	0,20	4,48
ИК 70°C	6	5	-	-	-	2,57	-	-
<i>Черники обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Сумма фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	11,07	0,1282	0,0523	2,57	0,13	1,13
Конвективная 40°C	6	5	9,72	0,2258	0,0922	2,57	0,24	2,44
Конвективная 50°C	6	5	9,94	0,2520	0,1029	2,57	0,26	2,66
Конвективная 60°C	6	5	9,96	0,3847	0,1570	2,57	0,40	4,05
Конвективная 70°C	6	5	9,35	0,3500	0,1429	2,57	0,37	3,93
ИК 40°C	6	5	10,91	0,4077	0,1664	2,57	0,43	3,92
ИК 50°C	6	5	9,87	0,3118	0,1273	2,57	0,33	3,31
ИК 60°C	6	5	9,84	0,2084	0,0851	2,57	0,22	2,22
ИК 70°C	6	5	9,73	0,4002	0,1634	2,57	0,42	4,31
<i>Черники обыкновенной листья (образец 1)</i>								
<i>Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	1,23	0,0227	0,0093	2,57	0,02	1,95

Конвективная 40°C	6	5	1,10	0,0379	0,0155	2,57	0,04	3,60
Конвективная 50°C	6	5	1,13	0,0331	0,0135	2,57	0,03	3,09
Конвективная 60°C	6	5	1,15	0,0307	0,0126	2,57	0,03	2,80
Конвективная 70°C	6	5	1,04	0,0410	0,0167	2,57	0,04	4,14
ИК 40°C	6	5	1,11	0,0338	0,0138	2,57	0,04	3,18
ИК 50°C	6	5	1,14	0,0439	0,0179	2,57	0,05	4,05
ИК 60°C	6	5	1,15	0,0305	0,0125	2,57	0,03	2,79
ИК 70°C	6	5	1,03	0,0456	0,0186	2,57	0,05	4,66
<i>Черники обыкновенной листья (образец 1)</i> <i>Хлорогеновая кислоту (КЭ)</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	8,05	0,3512	0,1434	2,57	0,37	4,58
Конвективная 40°C	6	5	6,19	0,2600	0,1062	2,57	0,27	4,41
Конвективная 50°C	6	5	6,07	0,2074	0,0847	2,57	0,22	3,59
Конвективная 60°C	6	5	6,03	0,1448	0,0591	2,57	0,15	2,52
Конвективная 70°C	6	5	5,07	0,1959	0,0800	2,57	0,21	4,05
ИК 40°C	6	5	6,41	0,2019	0,0824	2,57	0,21	3,31
ИК 50°C	6	5	5,44	0,2532	0,1034	2,57	0,27	4,88
ИК 60°C	6	5	5,44	0,2434	0,0994	2,57	0,26	4,70
ИК 70°C	6	5	4,96	0,2281	0,0931	2,57	0,24	4,82
<i>Черники кавказской листья (образец 1)</i> <i>Сумма фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	5,66	0,2061	0,0842	2,57	0,22	3,82
Конвективная 40°C	6	5	5,64	0,2396	0,0978	2,57	0,25	4,46
Конвективная 50°C	6	5	4,60	0,2064	0,0843	2,57	0,22	4,71
Конвективная 60°C	6	5	4,50	0,1738	0,0709	2,57	0,18	4,05
Конвективная 70°C	6	5	4,37	0,1990	0,0813	2,57	0,21	4,78
ИК 40°C	6	5	4,78	0,1694	0,0691	2,57	0,18	3,72
ИК 50°C	6	5	5,72	0,2385	0,0974	2,57	0,25	4,37
ИК 60°C	6	5	4,53	0,1859	0,0759	2,57	0,20	4,31
ИК 70°C	6	5	4,35	0,1761	0,0719	2,57	0,18	4,25
<i>Черники кавказской листья (образец 1)</i> <i>Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	1,16	0,0182	0,0074	2,57	0,02	1,65
Конвективная 40°C	6	5	1,14	0,0424	0,0173	2,57	0,04	3,91
Конвективная 50°C	6	5	1,10	0,0344	0,0141	2,57	0,04	3,28
Конвективная 60°C	6	5	0,97	0,0368	0,0150	2,57	0,04	3,98
Конвективная 70°C	6	5	0,87	0,0384	0,0157	2,57	0,04	4,61
ИК 40°C	6	5	1,13	0,0448	0,0183	2,57	0,05	4,15
ИК 50°C	6	5	1,05	0,0378	0,0154	2,57	0,04	3,77
ИК 60°C	6	5	0,92	0,0407	0,0166	2,57	0,04	4,66
ИК 70°C	6	5	0,89	0,0284	0,0116	2,57	0,03	3,36
<i>Черники кавказской листья (образец 1)</i> <i>Хлорогеновая кислоту (КЭ)</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	2,78	0,1290	0,0526	2,57	0,14	4,07
Конвективная 40°C	6	5	2,29	0,0751	0,0307	2,57	0,08	3,44
Конвективная 50°C	6	5	2,27	0,0653	0,0267	2,57	0,07	3,03
Конвективная 60°C	6	5	2,14	0,0826	0,0337	2,57	0,09	4,04
Конвективная 70°C	6	5	1,78	0,0749	0,0306	2,57	0,08	4,43
ИК 40°C	6	5	2,39	0,0709	0,0289	2,57	0,07	3,12
ИК 50°C	6	5	2,38	0,0774	0,0316	2,57	0,08	3,41

ИК 60°С	6	5	2,11	0,0885	0,0361	2,57	0,09	4,41
ИК 70°С	6	5	1,67	0,0691	0,0282	2,57	0,07	4,34
<i>Голубики обыкновенной листьа (образец 1)</i> <i>Сумма фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту</i>								
Воздушно-теневая	6	5	9,09	0,1646	0,0659	2,57	0,17	1,90
Конвективная 40°С	6	5	8,01	0,3717	0,1517	2,57	0,39	4,87
Конвективная 50°С	6	5	8,82	0,1946	0,0795	2,57	0,20	2,32
Конвективная 60°С	6	5	8,40	0,2511	0,1025	2,57	0,26	3,13
Конвективная 70°С	6	5	8,41	0,2392	0,0977	2,57	0,25	2,99
ИК 40°С	6	5	8,11	0,3281	0,3281	2,57	0,34	4,25
ИК 50°С	6	5	7,97	0,2778	0,1134	2,57	0,29	3,65
ИК 60°С	6	5	8,10	0,3159	0,1290	2,57	0,33	4,09
ИК 70°С	6	5	7,42	0,3229	0,1318	2,57	0,34	4,56
<i>Голубики обыкновенной листьа (образец 1)</i> <i>Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид</i>								
Воздушно-теневая	6	5	2,09	0,0300	0,0123	2,57	0,03	1,51
Конвективная 40°С	6	5	1,73	0,0724	0,0296	2,57	0,08	4,40
Конвективная 50°С	6	5	1,66	0,0735	0,0300	2,57	0,08	4,65
Конвективная 60°С	6	5	1,51	0,0590	0,0241	2,57	0,06	4,09
Конвективная 70°С	6	5	1,50	0,0621	0,0253	2,57	0,07	4,35
ИК 40°С	6	5	1,80	0,0604	0,0247	2,57	0,06	3,51
ИК 50°С	6	5	1,58	0,0619	0,0253	2,57	0,06	4,10
ИК 60°С	6	5	1,54	0,0677	0,0276	2,57	0,07	4,61
ИК 70°С	6	5	1,50	0,0566	0,0231	2,57	0,06	3,95
<i>Голубики обыкновенной листьа (образец 1)</i> <i>Хлорогеновая кислоту (КЭ)</i>								
Воздушно-теневая	6	5	4,34	0,1543	0,0630	2,57	0,16	3,73
Конвективная 40°С	6	5	4,02	0,1666	0,0680	2,57	0,17	4,35
Конвективная 50°С	6	5	4,26	0,1667	0,0681	2,57	0,17	4,10
Конвективная 60°С	6	5	3,93	0,0969	0,0396	2,57	0,10	2,59
Конвективная 70°С	6	5	3,60	0,1270	0,0519	2,57	0,13	3,71
ИК 40°С	6	5	4,11	0,1594	0,0651	2,57	0,17	4,07
ИК 50°С	6	5	4,32	0,1028	0,0420	2,57	0,11	2,50
ИК 60°С	6	5	4,29	0,0960	0,0392	2,57	0,10	2,35
ИК 70°С	6	5	3,71	0,1319	0,0538	2,57	0,14	3,73
<i>Клюквы болотной побеги (образец 1)</i> <i>Сумма флавоноидов в пересчете на рутин</i>								
Воздушно-теневая	6	5	2,35	0,0295	0,0121	2,57	0,03	1,32
Конвективная 40°С	6	5	0,87	0,0316	0,0129	2,57	0,03	3,80
Конвективная 50°С	6	5	0,91	0,0272	0,0111	2,57	0,03	3,12
Конвективная 60°С	6	5	0,62	0,0211	0,0086	2,57	0,02	3,56
Конвективная 70°С	6	5	0,56	0,0246	0,0100	2,57	0,03	4,58
ИК 40°С	6	5	0,81	0,0195	0,0080	2,57	0,02	2,54
ИК 50°С	6	5	0,94	0,0365	0,0149	2,57	0,04	4,07
ИК 60°С	6	5	0,82	0,0302	0,0123	2,57	0,03	3,87
ИК 70°С	6	5	0,77	0,0354	0,0145	2,57	0,04	4,86

Таблица 7.5 – Результаты определения измельченности цельного, измельченного и порошкового сырья видов рода *Vaccinium* L.

Вид	№ обр.	Цельное сырье, % (n=6)	Измельченное сырье, % (n=6)		Порошок сырья, % (n=6)	
		Проходящее сквозь сито диаметром 3 мм	Не проходящих сквозь сито диаметром 3 мм	Проходящих сквозь сито диаметром 0,5 мм	Не проходящее сквозь сито диаметром 2 мм	Проходящее сквозь сито диаметром 0,18 мм
Брусника обыкновенная	1	0,71±0,030	2,11±0,103	1,62±0,072	3,67±0,115	3,24±0,112
	2	1,45±0,069	1,86±0,084	2,42±0,058	3,25±0,116	2,77±0,088
	3	1,32±0,056	2,49±0,110	1,99±0,096	4,23±0,133	2,05±0,087
	4	1,18±0,051	2,58±0,080	2,14±0,088	4,26±0,167	2,50±0,104
	5	1,05±0,081	1,65±0,075	1,75±0,080	3,80±0,096	1,85±0,072
Черника обыкновенная	1	1,34±0,042	3,21±0,104	2,66±0,099	3,07±0,118	2,57±0,085
	2	1,58±0,077	2,79±0,102	3,08±0,117	2,01±0,094	1,94±0,091
	3	2,33±0,065	2,31±0,104	1,88±0,068	2,67±0,107	2,11±0,094
	4	1,92±0,081	1,90±0,094	2,16±0,096	2,81±0,092	2,84±0,093
	5	2,42±0,082	1,95±0,096	2,01±0,076	1,94±0,086	2,97±0,125
Черника кавказская	1	0,93±0,035	2,26±0,093	1,96±0,096	2,21±0,089	3,30±0,100
	2	2,27±0,101	1,93±0,090	2,27±0,105	2,90±0,099	2,39±0,106
	3	3,16±0,140	3,52±0,132	3,27±0,102	2,59±0,088	2,72±0,084
	4	2,61±0,085	2,76±0,084	2,51±0,113	2,01±0,083	2,23±0,093
	5	1,87±0,086	3,20±0,080	2,86±0,084	3,15±0,094	1,80±0,088
Голубика болотная	1	1,50±0,061	1,55±0,061	2,09±0,090	0,98±0,034	2,08±0,070
	2	0,99±0,043	2,31±0,102	1,61±0,369	1,86±0,078	2,58±0,078
	3	1,37±0,054	2,17±0,048	2,17±0,048	1,52±0,063	3,25±0,148
	4	1,40±0,069	1,85±0,085	1,85±0,085	1,96±0,081	2,76±0,112
	5	1,96±0,079	2,41±0,071	2,41±0,071	2,51±0,114	3,46±0,132
Клюква болотная	1	0,96±0,038	2,44±0,107	2,65±0,093	2,76±0,104	1,83±0,079
	2	1,89±0,073	2,27±0,057	1,95±0,077	1,87±0,089	2,81±0,092
	3	1,58±0,069	1,69±0,082	2,54±0,104	1,52±0,068	1,95±0,086
	4	1,27±0,062	1,43±0,050	1,99±0,090	2,11±0,102	1,74±0,080
	5	2,09±0,096	1,90±0,078	1,63±0,064	3,01±0,116	1,80±0,075

Таблица 7.6 – Результаты определения посторонних примесей в сырье видов рода *Vaccinium* L.

Вид	№ обр.	Вид примеси, % (n=6)			
		Содержание листьев, почерневших и побуревших с обеих сторон (цельное, измельченное ЛРС)	Содержание других частей растений (цельное, измельченное ЛРС)	Органическая примесь (цельное, измельченное ЛРС)	Минеральная примесь (цельное, измельченное, порошок)
Брусника обыкновенная	1	3,23±0,127	0,54±0,025	0,95±0,027	0,48±0,021
	2	4,27±0,120	0,78±0,033	0,84±0,040	0,36±0,017
	3	6,16±0,295	0,86±0,040	0,63±0,025	0,29±0,012
	4	5,83±0,239	0,91±0,032	0,77±0,031	0,43±0,020
	5	4,90±0,197	0,68±0,030	0,85±0,031	0,31±0,015
Вид	№ обр.	Содержание сырья, побуревших, почерневших, выцветших (цельное, измельченное ЛРС)	Содержание других частей растений / веточки, плоды (цельное, измельченное ЛРС)	Органическая примесь (цельное, измельченное ЛРС)	Минеральная примесь (цельное, измельченное, порошок)
Черника обыкновенная	1	2,36±0,109	3,44±0,150	0,69±0,030	0,30±0,012
	2	2,64±0,098	2,23±0,099	1,09±0,047	0,33±0,016
	3	3,41±0,112	2,77±0,096	0,88±0,039	0,41±0,019
	4	3,36±0,142	3,07±0,106	1,33±0,052	0,32±0,014
	5	2,84±0,113	3,82±0,176	1,15±0,044	0,39±0,016
Черника кавказская	1	2,20±0,103	2,48±0,113	1,24±0,057	0,38±0,017
	2	3,29±0,112	3,93±0,117	0,88±0,043	0,22±0,009
	3	4,03±0,188	2,68±0,132	0,61±0,028	0,34±0,015
	4	3,48±0,128	4,09±0,180	1,03±0,047	0,25±0,012
	5	2,62±0,091	3,28±0,122	0,73±0,032	0,35±0,015
Голубика болотная	1	2,45±0,082	3,27±0,132	1,09±0,051	0,39±0,017
	2	3,54±0,142	2,26±0,089	1,21±0,056	0,27±0,011
	3	2,30±0,102	3,87±0,159	0,87±0,035	0,30±0,012
	4	4,03±0,152	3,03±0,149	1,01±0,044	0,33±0,014
	5	2,05±0,085	2,29±0,094	0,70±0,028	0,42±0,019
Вид	№ обр.	Содержание сырья, побуревших, почерневших,	Содержание других частей растений / цветки, корни	Органическая примесь (цельное, измельченное	Минеральная примесь (цельное, измельченное,

		выцветших (цельное, измельченное ЛРС)	(цельное, измельченное ЛРС)	ЛРС)	порошок)
Клюква болотная	1	4,01±0,184	3,24±0,158	0,91±0,042	0,39±0,015
	2	2,29±0,110	2,29±0,110	1,17±0,055	0,29±0,014
	3	3,42±0,139	2,96±0,131	1,30±0,057	0,42±0,019
	4	2,78±0,116	2,78±0,116	0,76±0,029	0,20±0,009
	5	3,27±0,130	3,88±0,180	0,97±0,047	0,36±0,014

Таблица 7.7 – Влияние режима сушки на содержание суммы фенольных соединений, флавоноидов и розмариновой кислоты в траве видов рода *Prunella* L.

Режим сушки	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t(p, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
<i>Черноголовки обыкновенной трава (образец 1)</i> <i>Сумма фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	5,46	0,0825	0,0337	2,57	0,09	1,58
Конвективная 40°C	6	5	6,42	0,2487	0,1015	2,57	0,26	4,07
Конвективная 50°C	6	5	5,66	0,1538	0,0628	2,57	0,16	2,85
Конвективная 60°C	6	5	4,98	0,1806	0,0737	2,57	0,19	3,81
Конвективная 70°C	6	5	3,71	0,1110	0,0453	2,57	0,12	3,14
ИК 40°C	6	5	5,74	0,1822	0,0744	2,57	0,19	3,33
ИК 50°C	6	5	5,16	0,2084	0,0851	2,57	0,22	4,24
ИК 60°C	6	5	4,00	0,1660	0,0678	2,57	0,17	4,36
ИК 70°C	6	5	3,14	0,1037	0,0423	2,57	0,11	3,46
<i>Черноголовки обыкновенной трава (образец 1)</i> <i>Сумма флавоноидов в пересчете на рутин</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	1,15	0,0311	0,0127	2,57	0,03	2,84
Конвективная 40°C	6	5	1,27	0,0549	0,0224	2,57	0,06	4,54
Конвективная 50°C	6	5	1,08	0,0405	0,0165	2,57	0,04	3,95
Конвективная 60°C	6	5	1,02	0,0412	0,0168	2,57	0,04	4,23
Конвективная 70°C	6	5	0,77	0,0338	0,0138	2,57	0,04	4,60
ИК 40°C	6	5	1,02	0,0393	0,0160	2,57	0,04	4,04
ИК 50°C	6	5	0,98	0,0271	0,0111	2,57	0,03	2,90
ИК 60°C	6	5	0,92	0,0382	0,0144	2,57	0,04	4,38
ИК 70°C	6	5	0,75	0,0350	0,0143	2,57	0,04	4,88
<i>Черноголовки обыкновенной трава (образец 1)</i> <i>Розмариновая кислота (КЭ)</i>								
Воздушно-тенивая	6	5	3,84	0,1336	0,0545	2,57	0,14	3,65
Конвективная 40°C	6	5	3,96	0,1412	0,0577	2,57	0,15	3,74
Конвективная 50°C	6	5	3,15	0,1357	0,0554	2,57	0,14	4,52
Конвективная 60°C	6	5	2,46	0,0952	0,0389	2,57	0,10	4,06
Конвективная 70°C	6	5	1,12	0,0484	0,0197	2,57	0,05	4,55
ИК 40°C	6	5	3,37	0,1120	0,0457	2,57	0,12	3,48

ИК 50°С	6	5	2,59	0,1126	0,0460	2,57	0,12	4,56
ИК 60°С	6	5	1,78	0,0717	0,0293	2,57	0,08	4,23
ИК 70°С	6	5	1,14	0,0288	0,0118	2,57	0,03	2,65
Черноголовки крупноцветковой трава (образец 1) Сумма фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту								
Воздушно-теневая	6	5	8,54	0,1755	0,0716	2,57	0,18	2,16
Конвективная 40°С	6	5	8,79	0,2139	0,0873	2,57	0,22	2,55
Конвективная 50°С	6	5	6,12	0,1577	0,0644	2,57	0,17	2,70
Конвективная 60°С	6	5	5,53	0,1975	0,0806	2,57	0,21	3,75
Конвективная 70°С	6	5	4,04	0,1376	0,0562	2,57	0,14	3,58
ИК 40°С	6	5	7,98	0,2295	0,0937	2,57	0,24	3,02
ИК 50°С	6	5	6,05	0,2077	0,0848	2,57	0,22	3,60
ИК 60°С	6	5	5,45	0,1495	0,0610	2,57	0,16	2,88
ИК 70°С	6	5	4,24	0,1330	0,0543	2,57	0,14	3,29
Черноголовки крупноцветковой трава (образец 1) Сумма флавоноидов в пересчете на рутин								
Воздушно-теневая	6	5	2,37	0,0486	0,0199	2,57	0,05	2,15
Конвективная 40°С	6	5	2,43	0,0864	0,0353	2,57	0,09	3,73
Конвективная 50°С	6	5	2,15	0,0543	0,0222	2,57	0,06	2,65
Конвективная 60°С	6	5	1,67	0,0519	0,0212	2,57	0,05	3,26
Конвективная 70°С	6	5	1,31	0,0366	0,0149	2,57	0,04	2,93
ИК 40°С	6	5	2,22	0,0641	0,0262	2,57	0,07	3,03
ИК 50°С	6	5	2,35	0,0897	0,0366	2,57	0,09	4,00
ИК 60°С	6	5	1,96	0,0831	0,0339	2,57	0,09	4,44
ИК 70°С	6	5	1,62	0,0538	0,0220	2,57	0,06	3,48
Черноголовки крупноцветковой трава (образец 1) Розмариновая кислота (КЭ)								
Воздушно-теневая	6	5	4,52	0,1261	0,0515	2,57	0,13	2,92
Конвективная 40°С	6	5	4,74	0,1234	0,0504	2,57	0,13	2,73
Конвективная 50°С	6	5	2,53	0,0636	0,0259	2,57	0,07	2,64
Конвективная 60°С	6	5	2,36	0,0876	0,0357	2,57	0,09	3,89
Конвективная 70°С	6	5	0,93	0,0316	0,0129	2,57	0,03	3,59
ИК 40°С	6	5	4,13	0,1854	0,0757	2,57	0,19	4,71

ИК 50°С	6	5	3,53	0,1577	0,0644	2,57	0,17	4,69
ИК 60°С	6	5	2,81	0,1156	0,0472	2,57	0,12	4,31
ИК 70°С	6	5	1,38	0,0529	0,0216	2,57	0,06	4,02
<i>Черноголовки разрезной трава (образец 1)</i> <i>Сумма фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту</i>								
Воздушно-теневая	6	5	5,45	0,1848	0,0755	2,57	0,19	3,56
Конвективная 40°С	6	5	6,15	0,1998	0,0816	2,57	0,21	3,41
Конвективная 50°С	6	5	5,83	0,2392	0,0977	2,57	0,25	4,31
Конвективная 60°С	6	5	5,53	0,1643	0,0671	2,57	0,17	3,12
Конвективная 70°С	6	5	4,41	0,1984	0,0810	2,57	0,21	4,72
ИК 40°С	6	5	5,44	0,1993	0,0814	2,57	0,21	3,84
ИК 50°С	6	5	4,02	0,1647	0,0672	2,57	0,17	4,30
ИК 60°С	6	5	4,79	0,1257	0,0513	2,57	0,13	2,76
ИК 70°С	6	5	3,08	0,1287	0,0526	2,57	0,14	3,29
<i>Черноголовки разрезной трава (образец 1)</i> <i>Сумма флавоноидов в пересчете на рутин</i>								
Воздушно-теневая	6	5	1,13	0,0419	0,0171	2,57	0,04	3,90
Конвективная 40°С	6	5	2,34	0,1069	0,0436	2,57	0,11	4,80
Конвективная 50°С	6	5	2,34	0,0771	0,0315	2,57	0,08	3,46
Конвективная 60°С	6	5	2,25	0,0512	0,0209	2,57	0,05	2,39
Конвективная 70°С	6	5	1,98	0,0684	0,0279	2,57	0,07	3,63
ИК 40°С	6	5	2,34	0,0728	0,0297	2,57	0,08	3,27
ИК 50°С	6	5	2,20	0,0718	0,0293	2,57	0,06	3,43
ИК 60°С	6	5	1,92	0,0802	0,0327	2,57	0,08	4,39
ИК 70°С	6	5	1,80	0,0672	0,0274	2,57	0,07	3,91
<i>Черноголовки разрезной трава (образец 1)</i> <i>Розмариновая кислота (КЭ)</i>								
Воздушно-теневая	6	5	3,30	0,1053	0,0430	2,57	0,11	3,46
Конвективная 40°С	6	5	3,94	0,1218	0,0497	2,57	0,13	3,24
Конвективная 50°С	6	5	3,70	0,1342	0,0548	2,57	0,14	3,81
Конвективная 60°С	6	5	2,98	0,1266	0,0517	2,57	0,13	4,46
Конвективная 70°С	6	5	1,79	0,0757	0,0309	2,57	0,08	4,44
ИК 40°С	6	5	3,25	0,1106	0,0451	2,57	0,12	3,57

ИК 50°C	6	5	2,38	0,0709	0,0290	2,57	0,07	3,13
ИК 60°C	6	5	2,14	0,0861	0,0351	2,57	0,09	4,21
ИК 70°C	6	5	1,33	0,0535	0,0219	2,57	0,06	4,22

Таблица 7.8 – Результаты определения измельченности цельного, измельченного и порошкового сырья видов рода *Prunella* L.

Вид	№ обр.	Цельное сырье, % (n=6)	Измельченное сырье, % (n=6)		Порошок сырья, % (n=6)	
		Проходящее сквозь сито диаметром 3 мм	Не проходящих сквозь сито диаметром 7 мм	Проходящих сквозь сито диаметром 0,18 мм	Не проходящее сквозь сито диаметром 2 мм	Проходящее сквозь сито диаметром 0,18 мм
Черноголовка обыкновенная	1	3,26±0,157	2,49±0,116	3,62±0,177	2,68±0,133	2,32±0,101
	2	3,77±0,150	3,97±0,182	3,04±0,131	3,33±0,118	3,74±0,156
	3	3,01±0,121	3,78±0,157	2,60±0,105	3,16±0,146	2,83±0,114
	4	2,68±0,114	2,79±0,131	3,32±0,116	2,83±0,116	3,95±0,188
	5	3,06±0,147	3,27±0,144	2,80±0,092	4,03±0,169	3,56±0,133
Черноголовка крупноцветковая	1	2,97±0,128	3,77±0,177	3,11±0,135	3,27±0,151	2,04±0,101
	2	3,14±0,134	2,90±0,127	2,59±0,126	4,04±0,176	3,87±0,151
	3	2,63±0,128	3,00±0,124	3,92±0,180	2,26±0,086	3,79±0,135
	4	4,04±0,163	2,46±0,095	2,84±0,110	3,30±0,117	2,76±0,112
	5	3,69±0,172	2,78±0,126	2,27±0,096	2,83±0,135	2,51±0,093
Черноголовка разрезная	1	2,53±0,121	3,96±0,129	2,54±0,116	4,03±0,130	3,25±0,135
	2	3,35±0,162	2,61±0,105	3,84±0,187	2,36±0,102	4,01±0,189
	3	3,17±0,150	1,97±0,086	3,25±0,147	2,89±0,130	2,38±0,102
	4	3,95±0,154	3,41±0,110	2,83±0,104	3,40±0,149	3,75±0,116
	5	2,75±0,106	3,15±0,144	3,63±0,161	3,69±0,166	2,79±0,095

Таблица 7.9 – Результаты определения посторонних примесей в сырье видов рода *Prunella* L.

Вид	№ обр.	Содержание в сырье, пожелтевших листьев и стеблей, выцветших цветков/кусочков листьев, стеблей и цветков (цельное, измельченное ЛРС)	Содержание других частей растений, плодов и корней (цельное, измельченное ЛРС)	Органическая примесь (цельное, измельченное ЛРС)	Минеральная примесь (цельное, измельченное, порошок)
Черноголовка обыкновенная	1	1,87±0,079	2,24±0,091	1,39±0,066	0,86±0,036
	2	2,29±0,104	1,79±0,087	2,26±0,108	0,58±0,024
	3	3,55±0,144	2,02±0,078	1,78±0,071	0,79±0,036
	4	3,86±0,167	1,51±0,074	2,06±0,099	0,50±0,024
	5	2,87±0,111	2,12±0,104	2,20±0,090	0,70±0,032
Черноголовка крупноцветковая	1	3,97±0,195	1,92±0,086	2,29±0,097	0,44±0,019
	2	1,56±0,070	1,42±0,065	1,61±0,079	0,65±0,029
	3	2,36±0,112	2,40±0,090	1,92±0,081	0,83±0,036
	4	3,04±0,149	1,74±0,076	1,36±0,036	0,73±0,031
	5	2,77±0,134	2,22±0,105	2,11±0,103	0,56±0,022
Черноголовка разрезная	1	3,47±0,140	1,76±0,074	2,26±0,093	0,54±0,022
	2	2,73±0,129	2,33±0,114	2,01±0,095	0,73±0,031
	3	4,02±0,179	1,81±0,077	1,48±0,072	0,80±0,032
	4	1,68±0,083	2,03±0,096	1,76±0,087	0,42±0,019
	5	3,08±0,113	2,41±0,105	2,41±0,107	0,63±0,028

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)

федеральное
государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
(ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России)

127051 Москва, Петровский бульвар д. 8 стр.2.
Тел. (499) 190-18-18, (495) 625-43-48, (495) 625-43-42

04 MAR 2024

№

4148

на №

от



ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, осуществляющее разработку общих фармакопейных статей и фармакопейных статей для Государственной фармакопеи в соответствии с п. 4 Порядка разработки общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и включения их в Государственную фармакопею, а также размещения на официальном сайте в сети «Интернет» данных о Государственной фармакопее, утвержденного приказом Минздравсоцразвития России от 26.08.2010 № 756н, подтверждает, что Шамилов Арнольд Алексеевич, доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, участвовал в качестве соавтора в разработке фармакопейных статей ФС.2.5.0063.18 «Брусники обыкновенной листья» и ФС.2.5.0099.18 «Толокнянки обыкновенной листья», утвержденных приказом Минздрава России от 31.10.2018 № 749 и включенных в Государственную фармакопею XIV издания в установленном порядке.

Заместитель генерального директора

А.А. Трапкова

Исполнитель: Багирова В.Л.
(495)-121-06-00 доб. 6323

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУЧНЫЙ
ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Толокнянки листья

ФС 42-

Uvae ursi folia

Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. № 26

Цельные, измельченные, порошок

Собранные весной до и в начале цветения или осенью с начала созревания плодов до появления снежного покрова и высушенные листья дикорастущего вечнозеленого кустарничка толокнянки обыкновенной – *Arctostaphylos Uva-ursi (L.)*, семейства вересковых – *Ericaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к проекту фармакопейной статьи "Толокнянки листья"

Проект фармакопейной статьи "Толокнянки листья" составлен на кафедре фармакогнозии и ботаники КГМУ в соответствии с перспективным планом исследования лекарственного растительного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 [8].

В настоящее время лист толокнянки применяется в качестве диуретического, антисептического и противовоспалительного средства.

Номер регистрационного удостоверения листа толокнянки – 71/145/61.

Толокнянка обыкновенная (медвежье ушко, толоконница, мучница) –
ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI (L.) SPRENG. – многолетний вечнозеленый, распростертый по поверхности почвы кустарничек, семейства вересковых (Ericaceae). Очень короткий центральный ствол толокнянки обычно покрыт опавшими листьями, веточками и песком. От него во все стороны расходятся стелющиеся и укореняющиеся стебли длиной до 2 м. От них отходят прямостоячие облиственные побеги высотой 10-15 см. Молодые незимовавшие стебли имеют зеленую или зеленовато-бурую окраску; многолетние старые стебли покрыты многослойной темно-бурой (или темно-коричневой) коркой опробковевших тканей, которая легко осыпается. Листья очередные, кожистые, голые, цельнокрайние, продолговато-обратно-яйцевидные, длиной 1-2,2 см и шириной 0,5-1,2 см, суженные в короткий черешок, сверху темно-зеленые, снизу немного светлее, блестящие, с обеих сторон с сетью хорошо заметных вдавленных жилок; молодые листья бледнее, значительно нежнее и тоньше старых, по краю опушены.

Цветки овально-кувшинчатой формы, бледно-розовые, длиной 3-5 мм, с пятизубчатым венчиком. Они собраны в поникающие, верхушечные кистевидные соцветия по 3-5-7 цветков в каждом. Плод – ягодообразная, красная, сплюснутая, мучнистая костянка с 5 косточками. В обычных условиях толокнянка размножается вегетативным путем. Семенным путем размножается главным образом на гарях и лесосеках, где она быстро разрастается. Семена разносятся птицами. В сомкнутых древостоях толокнянка деградирует; рост горизонтальных побегов почти прекращается, число листьев уменьшается, часть побегов отмирает.

Толокнянка распространена в лесной зоне Европейской части России, Сибири и некоторых районах Дальнего Востока. Растет в изреженных, сухих сосновых и

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУЧНЫЙ
ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Брусника листья

ФС 42-

Vitis-idaea folia

Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. № 27

Цельные, измельченные, порошок

Собранные до начала цветения или после созревания плодов и высушенные листья многолетнего вечнозеленого дикорастущего кустарничка брусники обыкновенной – *Vaccinium vitis-idaea*, семейства брусничные – *Vacciniaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к проекту фармакопейной статьи "Брусники листья"

Проект фармакопейной статьи "Брусники листья" составлен на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники КГМУ в соответствии с перспективным планом исследования лекарственного растительного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 [8].

В настоящее время лист брусники применяется в качестве диуретического, противомикробного средства [Реестр].

Номер регистрационного удостоверения листа брусники – 71/145/42.

Брусника обыкновенная – VACCINIUM VITIS-IDAEA L. – Небольшой кустарничек семейства брусничных с ползучим корневищем и прямостоячими ветвистыми стеблями. Листья очередные на коротких черешках, зимующие, кожистые, округлые, обратнойцевидные или эллиптические, почти цельнокрайние, по краю несколько завернутые. С верхней стороны листья темно-зеленые, блестящие, с нижней – светло-зеленые с бурыми точками. Цветки на коротких цветоножках с двумя прицветниками, собраны в короткие поникшие верхушечные кисти из 4-8 цветков. Чашечка четырехраздельная, с короткими треугольными красноватыми долями; венчик колокольчатый, розовый, с четырьмя завернутыми наружу зубчиками, завязь нижняя. Плод – шаровидная блестящая, при созревании красная сочная ягода с многочисленными мелкими семенами.

В лесах брусника, как правило, достигает высоты 15-25 см, на болотах, в тундре и лесотундре высота брусники значительно меньше (3-7 см), кисть рыхлая, всего из 1-4 цветков, венчик ярко-розовый.

Цветет в мае – июне; плоды созревают в августе – сентябре [Правила заготовки].

Брусника обильно растет по всей лесной и тундровой зонам России, в гольцах Сибири и дальнего Востока, реже в альпийском поясе Кавказа. Произрастает в сосновых, лиственничных и еловых лесах, нередко образуя сплошные заросли. Заготавливают листья брусники по всей лесной (таежной) зоне [Правила заготовки].

Сбор листьев производят весной и осенью: весной – до цветения, пока нет бутонов или они еще очень мелкие, зеленые, что обычно наблюдается в апреле – начале мая, а осенью при полном созревании ягод – в конце сентября – в октябре. Если собирать листья брусники при наличии крупных бутонов, зеленых и первых зрелых ягод или во время цветения, то



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Методики стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья – черники листья, голубики листья, клюквы болотной побег, черноголовки трава.

Авторы (разработчики): Шамилов А.А. - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России (г. Пятигорск);

Коновалов Д.А. - заместитель директора по научной работе, заведующий кафедрой фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор.

Учреждение-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России: Россия, Ставропольский край, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11.

Источники информации: результаты и публикации научно-исследовательской работы, выполненной в рамках диссертационного исследования А.А. Шамилова на тему: «Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. как потенциальных источников фенольных соединений и перспективы их использования в фармации».

Где внедрено: компания «Марьян_дуг» ИП Повышева

Цель внедрения: Трансфер методик стандартизации нового вида растительного сырья (черники листья, голубики листья, клюквы болотной побег, черноголовки трава.) - для рассмотрения целесообразности выпуска лекарственных форм на его основе.

Эффективность и значимость внедрения: Внедрение методик анализа позволит проводить полный входной контроль качества данного вида растительного сырья, использование которого, в свою очередь, позволит расширить ассортиментный перечень отечественных лекарственных растительных препаратов с диуретической, нейропротекторной и актопротекторной активностью.

Технолог Николаева О.В.

подпись

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Черники листья

ФС

Vaccinii folia

Вводится впервые

Собранные в конце лета или начала осени в фазу полного созревания плодов до их опадания высушенные листья дикорастущих листопадных кустарников различных видов черники (*Vaccinium*): черники обыкновенной – *V. myrtillus* L. и черники кавказской – *V. arctostaphylos* L. сем. вересковые – *Ericaceae*.

Подлинность

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья, простые, короткочерешковые до 3 мм длиной, без прилистников. Листовая пластинка яйцевидно-продолговатой или эллиптической формы от 9 до 80 мм длиной и 2-35 мм шириной; верхушка листа заостренная, к обеим сторонам сужена, основание слегка сердцевидное или закругленное с мелкопильчато-зубчатым краем; жилкование сетчатое. Цвет листьев с верхней стороны - зеленый, темно-зеленый, красновато-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, серо-зеленый, коричневатозеленый.

Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев различной формы и черешков, проходящих сквозь сито с отверстием размером 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с мелкопильчато-зубчатым краем от серовато-зеленого, светло-зеленого до темно-зеленого цвета.

Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, слегка горьковато-вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки листьев от серовато-зеленого, светло-зеленого до темно-зеленого цвета.

Люминисцентная микроскопия. Люминесценция тканей верхней стороны листа хорошо выражена, свечение от коричневатозеленого до желтоватозеленого цвета. Отчетливо заметно яркое зеленое свечение жилок и оснований железистых трихом по

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к проекту фармакопейной статьи "Черники листья"

Проект фармакопейной статьи "Черники листья" составлен на кафедре фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов и ботаники Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ в соответствии с перспективным планом исследования лекарственного растительного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 [8] и вводится впервые.

В настоящее время лист черники в разных странах применяется в качестве диуретического и противовоспалительного средства.

Черника обыкновенная – *VACCINIUM MYRTILLUS* L. листопадный кустарник от 10 до 40 см высотой с остро ребристыми голыми ветвями, семейства вересковых (Ericaceae). Листья опадающие, светло-зеленые, осенью краснеющие, тонкие, яйцевидные или эллиптические, тупые или острые, но с мягким шипиком, в основании округлые или слабо сердцевидные, по краю мелко пильчато-зубчатые, с обеих сторон рассеяно волосистые, на коротких черешках. Цветки одиночные, при основании молодых веточек, поникающие, на коротких цветоножках, чашечка с почти цельнокрайним отгибом, венчик зеленовато-розоватый, кувшинчато-шарообразный, с 4-5 зубчатым отгибом, тычинок 8-10, с голыми, к основанию расширенными нитями, пыльники с 2 шиловидными придатками; столбик длиннее венчика, ягода шарообразная, черная, с сизоватым налетом, с красноватой мякотью и красящим соком.

Черника обыкновенная встречается в лесной зоне сосновых борах, в пихтово-еловых, кедровых, лиственнично-хвойных и березовых лесах, а также в тундрово-альпийской и полярно-арктической областях. Ареалом произрастания является Восточная и западная Сибирь, Кавказ, Европейская часть РФ, Дальний Восток, Хабаровский край, Еврейская автономная область (хребет Даур), Республика Бурятия, Амурская область (Верхнезейск) и Приморский край (Уссурийск).

Черника кавказская – *VACCINIUM ARCTOSTAPHYLOS* L. высокий кустарник или небольшое деревцо до 2-3 м высоту с кругловатыми ветками, семейства вересковых (Ericaceae). Листья очередные, сидячие, крупные, продолговатые или удлинненно продолговатые, к обоим концам суженные, сверху иногда сильно вытянутые, по краям мелкозубчатые, снизу более светлые. Цветки в рыхлой малоцветковой кисти, на длинных цветоножках, в пазухах мелких яйцевидных листочков. Чашечка с широкими округлыми

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Голубики болотной листья

ФС

Vaccinii uliginosi folia

Вводится впервые

Собранные в конце лета или начала осени в фазу полного созревания плодов до их опадания высушенные листья дикорастущего листопадного кустарника голубики болотной – *Vaccinium uliginosum* L. сем. вересковых – *Ericaceae*.

Подлинность

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Цельные или частично измельченные листья, простые, короткочерешковые до 1 мм длиной, без прилистников. Листовая пластинка кожистая, голая, цельнокрайняя, с загнутыми книзу краями, обратнойцевидной или эллиптической формы от 5 до 40 мм длиной и 4-25 мм; верхушка листа округлая или туповатая, основание клиновидное с; жилкование перисто-сетчатое. Цвет листьев с верхней стороны - зеленый, светло-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, сизоватый с выдающимися жилками. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков листьев различной формы и черешков, проходящих сквозь сито с отверстием размером 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с цельным краем от зеленого, светло-зеленого, до сизого цвета.

Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны фрагменты листьев от зеленого, светло-зеленого, до сизого цвета.

Цвет порошка зеленого, светло-зеленого или сизого цвета. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения кисловато-вяжущий.

Люминесцентная микроскопия. При оценке автолюминесценции листа следует отметить, что верхняя сторона листа имеет слабое свечение, в основном люминесцирует

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к проекту фармакопейной статьи "Голубики обыкновенной листья"

Проект фармакопейной статьи "Голубики обыкновенной листья" составлен на кафедре фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ в соответствии с перспективным планом исследования лекарственного растительного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 [8] и вводится впервые.

В настоящее время лист голубики обыкновенной в разных странах применяется в качестве диуретического, антисептического и противовоспалительного средства.

Голубика обыкновенная – *VACCINIUM ULIGINOSUM* L. – листопадный кустарник до 0,5-1 м. высотой с коричнево-бурой или темно-серой корой и округлыми ветвями, листья очередные, мелкие, на очень коротких черешках, обратнойцевидные, обычно на конце округлые, реже островатые, светло-зеленые, снизу сизоватые, с выдающимися жилками. Цветков 1-3, сидящих на конце коротких прошлогодних веточек, на коротких поникающих цветоножках, цветки обладают слабым, но приятным запахом, чашечка с 4-5 короткими округлыми зубцами, венчик кувшинчатый, беловатый или слабо розоватый, тычинок 8-10, с голыми, в основании слегка расширенными нитями, ягода округлая, синеватая, с сизым налетом, внутри с зеленой мякотью. Встречается в сыроватых хвойных и лиственных лесах на торфяниках, в кустарниковых зарослях и в зарослях кедрового стланика и рододендронов, часто растет с багульником. Ареал произрастания Кавказ (Абхазия, Грузия), Республика Башкирия, Западная и восточная Сибирь, Все районы северного Дальнего Востока; Европейская часть РФ.

Сбор листьев голубики обыкновенной следует проводить в один срок: поздним летом или ранней осенью – с момента созревания плодов до их осыпания (т.е. с конца августа до конца сентября). После осыпания плодов листья начинают темнеть и наблюдается активный прирост молодых побегов. Почерневшие листья, попадая в сырье, делают его нестандартным. Кроме того, в период отрастания молодых побегов листья содержат минимальное количество суммы фенольных соединений и хлорогеновой кислоты в том числе. Вот почему заготовку сырья голубики обыкновенной с конца сентября производить нельзя.

При заготовке сырья облиственные веточки голубики обыкновенной отрубают мотыгой или специальным длинным ножом. Отрубленные ветви собирают, отряхивают от

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Клюквы болотной побеги

ФС

Vaccinii oxycocci cormus

Вводится впервые

Собранные в конце лета или начала осени в фазу полного созревания плодов до их опадания высушенные побеги текущего года дикорастущего вечнозеленого кустарника клюквы болотной – *Vaccinium oxycoccus* L. сем. вересковых – *Ericaceae*.

Подлинность

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь олиственных побегов, листьев и небольшого количества плодов. Листья очередные, простые, короткочерешковые до 1 мм длиной, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, кожистые, плотные, цельнокрайные длиной 5 - 16 мм, шириной 2 – 8 мм, с заостренной верхушкой и закругленным основанием, с завернутым вниз краем; с верхней стороны листья темно-зеленые, блестящие, голые, с вдавленной средней жилкой; с нижней стороны голубовато-сизые с восковым налетом. Стебли цилиндрические, нитевидные, красновато-коричневые, опушенные. Плод – многосеменная красная или темно красная ягода с сизоватым налетом, шаровидной формы от 10-20 мм в диаметре, сверху с остатками чашечки или со следом от него. Цвет - красный или темно-красный.

Запах отсутствует. Вкус водного извлечения слабокислый, горько-вяжущий.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев и плодов, проходящих сквозь сито с отверстием размером 3 мм. При рассмотрении сырья под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) должны просматриваться фрагменты листовой пластинки с блестящей поверхностью темно-зеленого (верхняя сторона – кожистая), светло-зеленого, светло-серого цвета; кусочки цилиндрических стеблей с красновато-коричневым опушением; кусочки плода-ягоды красного или темно-красного цвета.

Цвет темно-зеленый, светло-зеленый, светло-серый, красновато-коричневый. Запах слабый, неспецифичный. Вкус водного извлечения кисловатый, горько-вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны фрагменты

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к проекту фармакопейной статьи "Клюквы болотной побеги"

Проект фармакопейной статьи "Клюквы болотной побеги" составлен на кафедре фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ в соответствии с перспективным планом исследования лекарственного растительного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 [8] и вводится впервые.

В настоящее время побеги клюквы болотной в разных странах применяется в качестве диуретического, антисептического, вяжущего, жаропонижающего и противовоспалительного средства.

Клюква болотная – VACCINIUM OXYCOCCUS L.

Клюква болотная - вечнозеленый кустарник со стелющимися, тонкими, ползучими вегетативными побегами длиной до 80 см и приподнимающимися генеративными побегами с поникающими цветками в зонтиковидных соцветиях. Корневая система-стержневая. Метаморфозы корней и побегов отсутствуют. Листья очередные, короткочерешковые, кожистые, продолговато-яйцевидные с завернутыми на нижнюю сторону краями, сверху блестящие, темно-зеленые, снизу беловато-сизые от воскового налета. Листья длиной 5-16 мм, шириной 2-6 мм, на коротких черешках. На верхушках острые. Цветки розовые или темно – розовые, Актиноморфный (правильный), с четырехраздельными венчиком, на длинных пушенных цветоножках поникающие, собраны по 2-5 на верхушках прошлогодних побегов в зонтиковидные соцветия. Изредка цветки бывают одиночные. Цветоножки длинные, чашечка с четырьмя чашелистиками, венчик глубокочетырёхраздельный, длиной 5-7 мм, шириной 1,5 – 2 мм. Гинецей цепокарпный. Завязь нижняя. Цветки собираются в моноподиальное соцветие в виде короткой кисти. Плод - темно-красная шаровидная очень кислая многосемянная ягода с сочной мякотью и блестящей тонкой кожицей. Ареалом произрастания является Европейская часть РФ; Республика Башкирия; Якутия; Западная Сибирь; Дальний Восток и Алтайский край.

Сбор побегов следует проводить в один срок: с начала сентября и до октября – с момента созревания плодов. С начала октября листья начинают краснеть. Покрасневшие листья, попадая в сырье, делают его нестандартным. Кроме того, в период отрастания молодых побегов листья содержат минимальное количество суммы флавоноидов. По этой причине заготовку сырья побегов клюквы болотной с начала октября производить нельзя.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Черноголовки трава

ФС

Prunellae herba

Вводится впервые

Собранная в фазу цветения, высушенная трава дикорастущих, многолетних травянистых растений видов черноголовок (*Prunella*): черноголовки обыкновенной – *P. vulgaris* L., черноголовки крупноцветковой – *P. grandiflora* L., черноголовки разрезной – *P. laciniata* L. сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

Подлинность

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Смесь цельных и частично измельченных листьев, стеблей, фрагментов соцветий, плодов и семян. Стебли четырехгранные, ветвящиеся, до 40 см (без одревесневших частей). Листья от яйцевидной или узкояйцевидной до ланцетной формы длиной до 7 см, шириной до 3 см, слабо опушенные, зубчатые или городчато-зубчатые или цельнокрайние с туповатой (у черноголовки обыкновенной) или заостренной верхушкой, часть листьев с черешками длиной до 4 см. Листорасположение супротивное, жилкование перисто-краевое или перисто-петлевое (у черноголовки крупноцветковой). Встречаются прилистники от двух до четырех длиной до 3 см. Соцветие – колосовидный тирс, продолговатое до 8 см длиной. Прицветники почти широко яйцевидные (у черноголовки обыкновенной), округлые до 2 см, перепончато-сетчатые, опушенные, на верхушке заостренные, по краю реснитчатые. Цветки в ложных мутовках, иногда формируются боковые соцветия, при основании которых имеется пара короткочерешковых листьев. Чашечка сидячая или на короткой ножке, у основания может иметь опушение, двугубая; нижняя губа до середины двураздельная или трехраздельная (у черноголовки крупноцветковой), зубцы ланцетные или перепончато-реснитчатые (у черноголовки разрезной)); верхняя губа с тремя короткими зубцами, иногда почти тупая (у черноголовки обыкновенной) или с зубцами. Венчик длиной до 2,5 см, немного длиннее чашечки (у черноголовки разрезной), в полтора-два раза длиннее чашечки (у черноголовки обыкновенной) или в 2–4 раза (у черноголовки крупноцветковой), двугубый, иногда мало выдающийся. Тычинок 4, передняя пара тычинок длиннее задних, нити

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к проекту фармакопейной статьи "Черноголовки трава"

Проект фармакопейной статьи "Черноголовки травы" составлен на кафедре фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов и ботаники Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ в соответствии с перспективным планом исследования лекарственного растительного сырья.

Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 [8] и вводится впервые.

В настоящее время трава черноголовки обыкновенной входит в Фармакопею Китая, Японии и Европы. В разных странах виды черноголовок используют как гемостатическое, ранозаживляющее, противовоспалительное, антимикробное, жаропонижающее, отхаркивающее и тонизирующее средства.

Черноголовка обыкновенная - *PRUNELLA VULGARIS* L. Многолетнее травянистое растение с ползучим эпигеогенным корневищем, семейства яснотковых (Lamiaceae). Стебель прямостоячий или приподнимающийся. Листья за исключением верхней пары, на черешках, яйцевидные или продолговатые, цельно-крайние. Стеблевые листья супротивные. Цветки в ложных мутовках, скученных в головчатые или колосовидные соцветия. При основании соцветия имеется пара сидячих листьев. Прицветные листья широкояйцевидные с сердцевидным основанием. Нижние прицветные листья длиннозаостренные, остальные 0,8-1,2 см длиной. Чашечка почти сидячая, двугубая. Венчик двугубый, фиолетовый, 8-12 мм длиной, в полтора-два раза длиннее чашечки. Плоды - орешки яйцевидные или эллиптические, трехгранные, блестящие.

Черноголовка обыкновенная встречается в смешанных лесах, лесных опушках и на лугах. Ареалом произрастания является Европейская часть РФ, Кавказ, Восточная и западная Сибирь, Дальний Восток и Средняя Азия.

Черноголовка крупноцветковая - *PRUNELLA GRANDIFLORA* L. Многолетнее травянистое растение с ползучим корневищем. Стебли приподнимающиеся. Растение голое или скудно опушенное, 15-60 см высотой. Листья на длинных черешках, продолговатые или яйцевидно продолговатые, цельнокрайние или реже у основания, по краю расставленно зубчатые. Прицветники перепончатые, округлые, с сердцевидным основанием, по краю реснитчатые, остроконечные. Соцветия яйцевидные или продолговатые, без парных листьев при основании, реже с придвинутой к соцветию парой листьев. Венчик, в два-четыре раза



(51) МПК
A61K 36/536 (2006.01)
A61K 127/00 (2006.01)
A61K 133/00 (2006.01)
A61K 135/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 36/536 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022110045, 14.04.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 14.04.2022

Дата регистрации:
 24.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.04.2022

(45) Опубликовано: 24.04.2023 Бюл. № 12

Адрес для переписки:
 305041, Курская обл., г. Курск, ул. Карла
 Маркса, 3, ФГБОУ ВО "Курский ГМУ",
 Лазаренко Виктор Анатольевич

(72) Автор(ы):

Бубенчикова Валентина Николаевна (RU),
 Шапилов Арнольд Алексеевич (RU),
 Поздняков Дмитрий Игоревич (RU),
 Гарсия Екатерина Робертовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Курский государственный
 медицинский университет" Министерства
 здравоохранения Российской Федерации
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2691079 C1, 10.06.2019.
 MRUDULA, G., et al. Antistress and antioxidant
 effects of *Prunella vulgaris* leaves //
Pharmacology online. 2010. Vol.2. PP.952-962.
 BRINDLEY, M., et al. Inhibition of lentivirus
 replication by aqueous extracts of *Prunella*
vulgaris // *Virology Journal*. 2009. Vol.6(1):8.
 ШАМИЛОВ А.А. и др. Некоторые аспекты
 (см. прод.)

(54) Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью

(57) Реферат:

Изобретение относится к пищевой и
 фармацевтической промышленности, а именно к
 фармацевтическим субстанциям, обладающим
 актопротекторной активностью.
 Фармацевтическая субстанция, обладающая
 актопротекторной активностью, отличается тем,
 что представляет собой густой экстракт травы

Prunella vulgaris L., или травы *Prunella laciniata* L.,
 или травы *Prunella grandiflora* L., полученный из
 следующей композиции: трава черноголовки 100,0
 г, вода 1500,0 мл. Вышеуказанное изобретение
 позволяет расширить ассортимент
 фармацевтических субстанций с
 актопротекторной активностью. 2 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

церебропротективного действия извлечений из травы представителей рода черноголовка // Фармация. - 2020. - Т.69. - №5. - С.51-56. МОРОЗОВ И.С. и др. Актопротекторные и адаптогенные свойства производных адамантана (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. - 2001. - Т.35. - №5. - С.3-6. OLIYNYK, S., OH, S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance // *J Ginseng Res*. Vol.37, No.2, 144-166 (2013).

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Перкальского
дендрологического парка Ботанического
института им. В.Л. Комарова РАН,
кандидат биологических наук

Шильников Д.С.
2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

ПО СБОРУ И СУШКЕ ТОЛОКНЯНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЕВ

(Информационное письмо)

г. Пятигорск

2024

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Перкальского
дендрологического парка Ботанического
института им. В.Л. Комарова РАН,
кандидат биологических наук

Шильников Д.С.

2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

ПО СБОРУ И СУШКЕ БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЕВ

(Информационное письмо)

г. Пятигорск

2024

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий Перкальского
дендрологического парка Ботанического
института им. В.Л. Комарова РАН,
кандидат биологических наук

Шильников Д.С.

2024 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ ЧЕРНИКИ ЛИСТЬЕВ**

(Информационное письмо)

г. Пятигорск

2024

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Перкальского
дендрологического парка Ботанического
института им. В.Л. Комарова РАН,
кандидат биологических наук

Шильников Д.С.

2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

ПО СБОРУ И СУШКЕ ГОЛУБИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЕВ

(Информационное письмо)

г. Пятигорск

2024

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Перкальского
дендрологического парка Ботанического
института им. В.Л. Комарова РАН,
кандидат биологических наук

Шильников Д.С.

2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

ПО СБОРУ И СУШКЕ КЛЮКВЫ БОЛОТНОЙ ПОБЕГОВ

г. Пятигорск

2024

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Перкальского
дендрологического парка Ботанического
института им. В.Л. Комарова РАН,
кандидат биологических наук
Шильников Д.С.
2024 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ ЧЕРНОГОЛОВКИ ТРАВЫ**

г. Пятигорск

2024

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор по производству
ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО»
И.В.Здобина

2024 г.

АКТ

о внедрении (использовании) результатов научной и инновационной деятельности

Авторы внедрения: Шамилов А.А. - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск);

Источник предложения: результаты и публикации научно-исследовательской работы, выполненной в рамках диссертационного исследования А.А. Шамилова на тему: «Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. как потенциальных источников фенольных соединений и перспективы их использования в фармации».

Публикация: Шамилов, А.А. Разработка методики определения подлинности голубики болотной листьев методом тонкослойной хроматографии / А.А. Шамилов [и др.] / Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022. – Т. 25. № 11. – С. 10-15.

Учреждение-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; Россия, Ставропольский край, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11.

Название объекта внедрения: Методика определения хлорогеновой кислоты в листьях голубики обыкновенной методом тонкослойной хроматографии.

Наименование организации, где используются результаты исследования: фармацевтическое предприятие ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО».

Ответственный за внедрение: начальник отдела контроля качества ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО» П.В. Фадеев.

Дата начала отсчета внедрения: используется с 01.02.2024 года при проведении входного контроля качества исходного сырья для определения хлорогеновой кислоты в рамках фармацевтической разработки перспективных лекарственных препаратов на основе растительного сырья.

Заключение об эффективности: данная методика позволяет определить наличие хлорогеновой кислоты в листьях голубики обыкновенной методом тонкослойной хроматографии в извлечении, приготовленном путем экстракции спиртом этиловым 70%. Методика валидирована по показателю специфичность.

Начальник отдела контроля качества
ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО»

П.В. Фадеев

01.02.2024 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Декан фармацевтического факультета,
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
доктор фармацевтических наук,
профессор Е.Е. Чупандина

2024 г.



АКТ

**о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности**

Авторы внедрения: Шамилов А.А. - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск);

Источник предложения: результаты и публикации научно-исследовательской работы, выполненной в рамках диссертационного исследования А.А. Шамилова на тему: «Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. как потенциальных источников фенольных соединений и перспективы их использования в фармации».

Учреждение-разработчик: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; Россия, Ставропольский край, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11.

Название объекта внедрения: Методика определения хлорогеновой кислоты в листьях черники обыкновенной и черники кавказской методом капиллярного электрофореза.

Наименование организации, где используются результаты исследования: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет».

Ответственный за внедрение: заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», доктор фармацевтических наук, профессор Сливкин А.И.

Дата начала отчета внедрения: используется с 2024 года в учебном процессе кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии при определении хлорогеновой кислоты в лекарственном растительном сырье.

Заключение об эффективности: данная методика позволяет определить содержание хлорогеновой кислоты в листьях черники обыкновенной и черники кавказской методом капиллярного электрофореза в извлечение, приготовленное путем экстракции спиртом этиловым 70%. Методика валидирована по показателям линейности, прецизионность и правильности.

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и
фармацевтической технологии,
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
доктор фармацевтических наук, профессор



Сливкина А.И.

начальник отдела кадров

подпись

О.И. Заверва

подпись

А.И. Сливкин