ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АБРАМЕЦ НАТАЛЬЯ ЮРЬЕВНА

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ ЗАПАДНО-СИБИРСКОЙ РАВНИНЫ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,

доцент

Коломиец Наталья Эдуардовна

Томск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений ……. 4

ВВЕДЕНИЕ …….……..……..….5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА КАЧЕСТВО СЫРЬЯ …….….…….. 12

1.1 Краткая характеристика района исследований и природного ресурсного потенциала Томского района..……..…….…… 12

1.2 Характеристика основных загрязнителей Томского района ……...…….……16

1.3. Современное состояние исследований влияния техногенного загрязнения на растения …….…….20

1.4 Современные представления о роли флавоноидов, полисахаридов, хлорофилла и эфирных масел в защите растений от стресс-факторов…….….33

1.5. Показатели экологической чистоты лекарственного растительного сырья .....….....……..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..... 42

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ……...46

2.1. Объекты исследования……46

2.2. Методики морфологического и анатомического исследования ……50

2.3. Методики химического исследования …….……51

2.4. Статистическая обработка …….58

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ …….59

3.1. Определение золы общей и минеральной примеси ...…….59

3.2. Исследование тяжелых металлов ……..64

3.3. Определение радиоактивных нуклидов…….…….……70

Глава 4. ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ БАВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ БАВ …….…….…….…….…..... 76

4.1. Количественное определение полисахаридов…….…..…..76

4.2. Количественное определение антоцианов …….……..78

4.3. Количественное определение эфирного масла ……..79
4.4. Оценка влияния загрязнения на содержание некоторых БАВ……81
4.4.1 Полисахаридный комплекс……..82
4.4.2. Антоцианы ……...…91
4.4.3. Эфирное масло……93
4.4.4. Фотосинтезирующие пигменты ……99

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ (АНАТОМИЧЕСКИХ) И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО…….. 105

Глава 6. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ…….. 116

6.1. Совершенствование методов стандартизации листьев подорожника большого ……116
6.1.1. Разработка методики количественного определения гидроксикоричных кислот ……119
6.1.2. Разработка методики количественного определения хлорофилла……....……127
6.1.3. Разработка методики количественного определения полисахаридов……133
6.1.4. Разработка методики определения подлинности ……...144
6.1.5. Разработка товароведческих показателей ……146
6.2. Совершенствование методов стандартизации почек сосны обыкновенной ……154

Выводы……...…158

Список литературы…….……161

Приложение:

Приложение 1 ……..……..……..…179

Приложение 2 ……..……...… 190

Приложение 3 ……..……..… 191

Приложение 4 …….…….…… 192

Приложение 5 ……..……..… 193

Приложение 6…….…….…… 194

Приложение 7…… 195

Приложении 8 ……196

Список сокращений:

ЛР – лекарственные растения;
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
ЛРС – лекарственное растительное сырье;
ЛРП – лекарственный растительный препарат;
БАВ – биологически активные вещества;
ПВ – пектиновые вещества;
ГцА – гемицеллюлоза А;
ГцБ – гемицеллюлоза Б;
ВРПС – водорастовримые полисахариды;
ФС – фармакопейная статья;
ГЖХ – газожидкостная хроматография;
ТСХ – хроматография в тонком слое сорбента;
ГСО – Государственный стандартный образец;
ГФ – Государственная фармакопея;
ЛРС – лекарственное растительное сырье;
НАА – нейтронно-активационный анализ;
РФ – рентгено-флуоресцентный анализ;
ПСК – полисахаридный комплекс;
СФ – спектрофотометрия, спектрофотометр;
т.н. – точная навеска;
н/о – не обнаружено;
УФ – ультрафиолетовый;
ФКК – фенолкарбоновые кислоты;
НД – нормативная документация;
ФС – фармакопейная статья;
РАО – радиоактивные отходы;
ГОСТ – государственный отраслевой стандарт;
n.d. – нет данных/данные не обнаружены в доступной литературе;
АК – аскорбиновая кислота;
ДКГК – декетогулоновая кислота;
ДАК – дегидроаскорбиновая кислота;
ЯТЦ – ядерно-топливный цикл;
ТМ – тяжелые металлы;
ССЗ – санитарно-защитная зона;
РАО – радиоактивные отходы;
ТО – Томская область;
СХК – Сибирский химический комбинат.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Глобальное загрязнение биосферы, является одной из актуальнейших проблем современного мира. Экологические проблемы по продолжительности, выраженности и последствиям своего отрицательного воздействия на все живое несравнимы ни с какими другими проблемами [115, 146]. За несколько последних десятилетий негативные тенденции изменения окружающей природной среды не только не уменьшились, а напротив увеличились, и в перспективе ученые ожидают сохранение этих тенденций на прежнем уровне или даже их рост [31].

В настоящее время большинство зарослей дикорастущих и культивируемых лекарственных растений (ЛР) находятся в зонах активной хозяйственной деятельности человека, ведущей к загрязнению сырья различными ксенобиотиками, представляющими даже в малых дозах значительный риск для здоровья человека и животных. Это обусловливает необходимость контроля качества сырья в том числе с учётом требований экологической чистоты и безопасности [61]. Данный тезис подкрепляется и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по разработке национальных требований в области безопасности и качества на лекарственное растительное сырье (ЛРС) и препаратов на его основе. Так, по мнению экспертов ВОЗ, к числу причин риска медицинского применения лекарственных растительных препаратов (ЛРП) относят проблемы их качества, связанные в т.ч. с загрязнением исходного сырья потенциально токсичными веществами (остаточные количества органических растворителей и пестицидов, радионуклиды, токсичные металлы и неметаллы, микотоксины и фумиганты, микробная загрязненность) [23, 29, 30, 77].

Проблема заготовки экологически чистого сырья относится и к Томской области – одному из крупнейших субъектов РФ, расположенному в юго-восточной части Западно-Сибирской равнины, по площади территории занимающему 5-е место в Сибирском Федеральном округе и 16-е место в России. Самым густонаселенным и экономически развитым регионом области

является Томский район. Почти 75% его территории занимают уникальные экосистемы болот и лесов. По оценкам ресурсоведов на территории Томского района возможна заготовка до 25 тыс. тонн дикорастущего сырья. Для стимулирования заготовительной и перерабатывающей отрасли администрация Томской области запустила комплексные программы «Сибирские дикоросы», «Модернизация заготовительных пунктов», а также дополнительные меры стимулирования в виде льготного кредитования, налогообложения и софинансирования деятельности подобных предприятий. Предпринятые областным руководством меры привели к тому, что о состоянию на 1 сентября 2018 года объем закупок дикорастущего сырья в Томской области впервые достиг 1 млрд. рублей. По экспертным оценкам потенциал заготовительной отрасли в закупочных ценах составляет 10-12 млрд. руб., что сравнимо по величине с доходами бюджета, которые получает регион от продажи газа и нефти [145, 147, 149].

Таким образом, в регионе сложились объективные предпосылки для успешного развития сферы заготовки растительного сырья, необходимого для нужд различных отраслей промышленности. Вместе с тем действующие на территории региона крупнейшие в России предприятия: «Томскнефтехим», «Сибирский химический комбинат», а также около 400 предприятий других отраслей промышленности и транспорт представляют потенциальную опасность для окружающей среды. В связи с чем, с одной стороны, существенно возрастает вероятность сбора сырья, загрязненного тяжелыми металлами, радионуклидами, пестицидами, гербицидами и др. ксенобиотиками. С другой стороны, постоянное техногенное воздействие оказывает влияние на процессы жизнедеятельности растений, вызывая изменения на разных уровнях: анатомическом, морфологическом, синтезе физиологически и биологически активных веществ (БАВ). Использование такого сырья или ЛРП на его основе, способно изменять физиологические реакции, биохимические показатели организма, приводить к заболеваниям различного генеза и тяжести, и даже вызывать гибель.

В связи с вышесказанным в настоящее время актуальность представляют исследования, посвященные не только изучению накопления тех или иных групп БАВ в растениях, но и содержанию химических элементов, радионуклидов, других ксенобиотиков, на накопление которых существенное влияние оказывает окружающая среда.

Таким образом, с фундаментальной и практической точек зрения комплексные исследования по оценке качества ЛРС, установлению его экологической безопасности, определению содержания тяжелых металлов, радионуклидов, и их воздействию на растения, актуализации нормативной документации, являются важными задачами современной фармацевтической науки и практики.

В качестве объектов исследования нами были выбраны используемые в качестве лекарственного растительного сырья представители естественных фитоценозов и урбанофлоры [16,33,34,36,42,64,65,124,128,128,134,148] - подорожник большой *(Plantago major* L.), рябина обыкновенная (*Sorbus sibirica* L.), мать-и-мачеха (*Tussilago farfara* L.) и сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.).

Цель исследования: оценка качества и безопасности сырья подорожника большого, рябины обыкновенной, мать-и мачехи, сосны обыкновенной, произрастающих в Томском районе Томской области.

Достижение поставленной цели решалось через постановку и выполнение следующих **задач**:

1. Провести анализ литературы отечественных и зарубежных авторов по проблематике исследования.

2. Определить содержание тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье района исследования.

3. Оценить безопасность образцов ЛРС по содержанию радиоактивных нуклидов.

4. Оценить содержание БАВ в образцах ЛРС на предмет соответствия требованиям нормативной документации.

5. Оценить влияние загрязнения на морфологические, микроскопические (анатомические) признаки ЛРС, качественный состав и количественное содержание БАВ.

6. На основе проведенных исследований разработать проект новой ФС «Подорожника большого листья», проект изменений в ФС «Сосны обыкновенной почки».

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка качества, экологической безопасности сырья дикорастущих лекарственных растений (сосны обыкновенной, подорожника большого, мать-и-мачехи, рябины обыкновенной), произрастающих на урбанизированных территориях Томского района Томской области.

Выявлено, что высококачественное сырье подорожника большого и мать-и-мачехи с высоким содержанием действующих веществ, соответствующее требованиям экологической чистоты и безопасности можно заготавливать в окрестностях д. Калтай (фоновый район), а также окрестностях других населенных пунктов Томского района (д. Коларово, д. Кисловка, д. Наумовка, п. Степановка, д. Аникино, с. Тимирязево, п. Зональная станция); сосны обыкновенной - д. Калтай, с. Тимирязево, д. Коларово; рябины обыкновенной - в д. Калтай и с. Тимирязево.

Установлено, что содержание суммы полисахаридов, α-, β- хлорофилла, каротиноидов больше в фоновых образцах и образцах из населенных пунктов Томского района по сравнению с образцами из парков и зон отдыха, а также мест с повышенной техногенной нагрузкой (улицы города, дорожные магистрали, СЗЗ предприятий). В образцах из фонового района и окрестностей населенных пунктов Томского района (деревни, села, поселки) преимущественно накапливается Гц В, превосходя содержание ВРПС в 1,5-2 раза; в образцах из мест с повышенной техногенной нагрузкой (дорожные магистрали и улицы города) преимущественно накапливаются Гц А, или ВРПС. Содержание эфирного масла в почках сосны обыкновенной снижается по мере увеличения техногенной нагрузки мест заготовки сырья. Суммарная доля кислородсодержащих монотерпенов в составе эфирных масел коррелирует

с уровнем загрязнения: по мере ее снижения возрастает в образцах из фонового района. Определено, что эфирное масло почек сосны, заготовленных на территории Томского района Томской области, преимущественно относится к «кареновому» хемотипу.

В образцах из мест с повышенной техногенной нагрузкой значительно возрастает число простых волосков, устьиц, головчатых волосков. Для характеристики экологически безопасного сырья листьев подорожника рекомендованы количественные пределы устьиц на 1см^2 на нижней стороне листа не более 200, количество головчатых волосков не более 35, количество простых волосков не более 10; а на верхней стороне – устьиц не более 130, головчатых волосков не более 16, количество простых волосков не более 5.

Разработана методика стандартизации сырья подорожника большого спектрофотометрическим методом по содержанию хлорофилла и гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту.

Практическая значимость.

На основании проведенных исследований разработаны и внедрены:

- методика количественного определения в подорожнике большом хлорофилла в пересчете на хлорофилл β, гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту, суммы полисахаридов в пересчете на глюкозу. Методики апробированы на ООО «Фарм-Трейд», ООО « СИБРЕСУРС»;

- проект изменений в Фармакопейную статью «Сосны обыкновенной почки»;

- проект новой ФС «Подорожника большого листья»;

- «Практические рекомендации по планированию и организации заготовок дикорастущего растительного сырья на территории Томского района Томской области»;

- результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии при обучении студентов по специальности «Фармация», ординаторов по специальности «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», аспирантов по специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» ФГБОУ ВО

«Сибирский государственный медицинский университет»; в учебном процессе кафедры фармации ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» при обучении студентов по дисциплине «Фармакогнозия».

На защиту выносятся:

- материалы комплексной оценки качества и безопасности лекарственного растительного сырья на территории Томского района Томской области;

- результаты оценки влияния загрязнения на микроскопические, морфологические признаки, состав и содержание некоторых групп БАВ;

- результаты предложенных изменений в нормативную документацию на листья подорожника большого и почки сосны обыкновенной.

Личный вклад автора заключается в выборе направления исследования, постановке цели, определении задач исследований, заготовке образцов, выполнении исследований, обобщении полученных экспериментальных данных и их статистической обработки, оформлении и представлении научных работ.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Научные положения диссертационного исследования соответствуют пунктам 3,5,6,7 паспорта специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Апробация работы. Основные положения диссертации обсуждались на: международной заочной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной медицины» (г. Новосибирск, 2013); VII международной научно-практической конференции «Проблемы современной биологии» (г.Москва, 2013); научно-методической конференции «II Гаммермановские чтения» (г.Санкт-Петербург, 2014); Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне «Инновационные технологии в фармации» **(**г.Иркутск, 2015), Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» (г.Москва, 2016), Международной научной конференции, посвященной 100-летию профессора А.В. Положий (г.Томск, 2017).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ в рамках комплексной темы «Разработка инновационных технологий новых фармацевтических продуктов на основе природных биологически активных комплексов» (Регистрационный № 01201152362).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых перечнем ВАК.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА КАЧЕСТВО СЫРЬЯ

1.1 Краткая характеристика района исследований и природного ресурсного потенциала Томского района

Томский район – самый густонаселенный и экономически развитый регион, расположенный в юго-восточной части Томской области, которая по площади территории занимает 5-е место в Сибирском Федеральном округе и 16-е место в России. Район граничит на юге с Кемеровской и Новосибирской областью, на севере с Асиновским и Кривошеинским районами, на востоке с Асиновским и Зырянским, на западе с Кожевниковским и Шегарским районами (рис.1а). Крупными административными и промышленными центрами района являются города Томск и Северск, в которых проживает более половины населения Томской области (около 650 тыс.чел.) [149,150,152].

Томский район располагает существенными природными ресурсами. К числу значимых активов региона относятся каменный уголь, белая глина, месторождения песчано-гравийной смеси, редкоземельных металлов (цинка, сурьмы), титана, бокситов, циркония, золота, минеральных вод, сапропеля, торфа, продуктивных земель. Район является крупнейшим в области поставщиком подземных вод, на его территории сконцентрировано 58,3% утвержденных эксплуатационных запасов подземных вод. Кроме того, Томский район располагает одной из самых разветвленных систем поверхностных вод, по его территории протекает 114 рек, общая протяженность которых составляет 2193 км.

Большую ценность Томского района представляют уникальные природные экосистемы болот и лесов, занимающие 72-75% территории (рис. 1б). Наиболее распространенными как в целом на территории Томской области, так и Томского района в частности, являются сосновые леса,

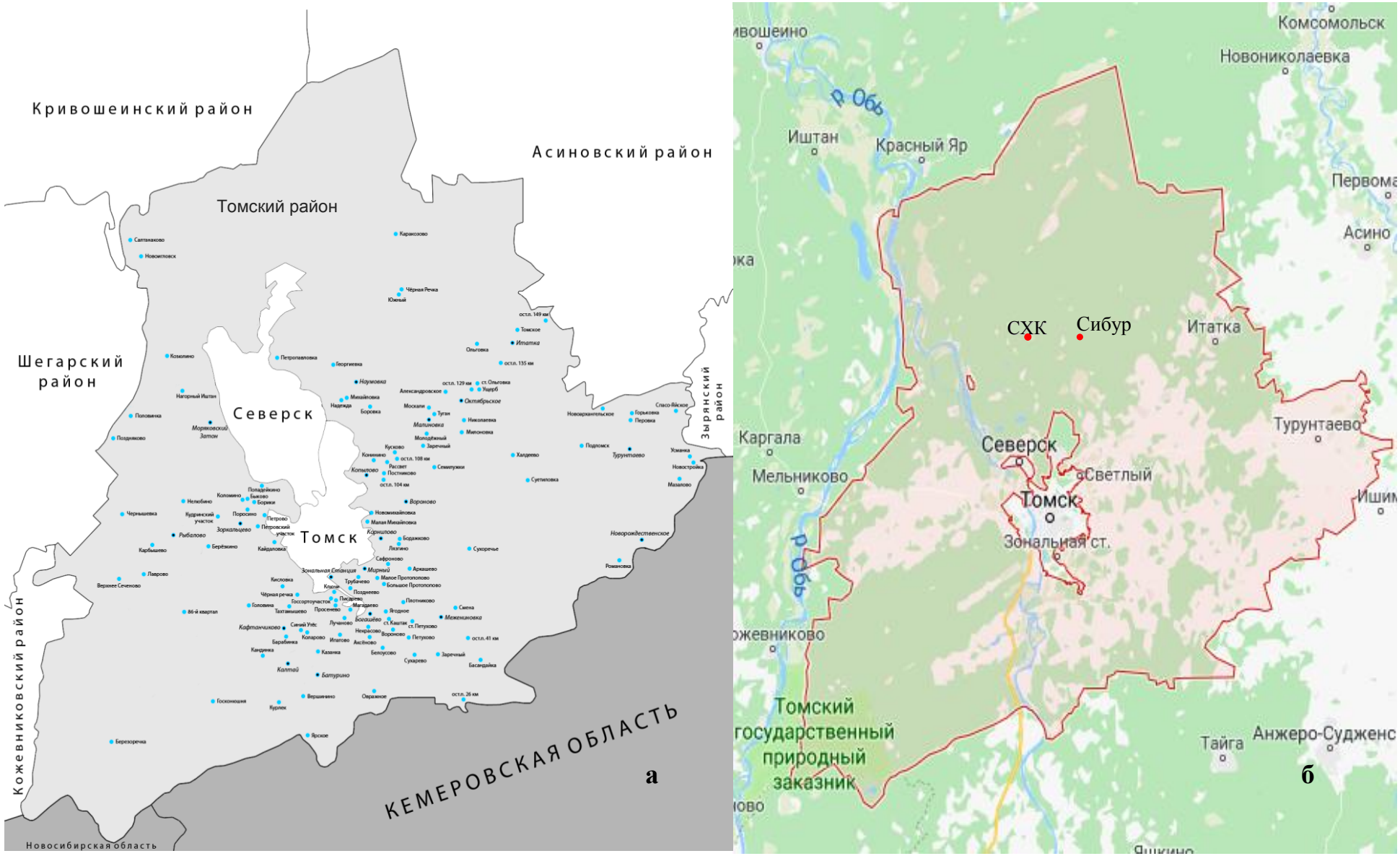


Рис.1а,б. Карта Томского района Томской области

составляющие около 29-32% от площади всех лесов (5-5,5 млн. га), покрывающих территорию региона.

Интерес к лесным ресурсам региона проявляют не только лесозаготовительные компании, поставляющие древесину для нужд деревообрабатывающей и строительной отраслей, но и предприятия, занимающиеся производством лекарственных средств и биологически активных добавок. Так, на территории Томского района в окрестностях д.Семилужки резидент томской особой экономической зоны (ТОЭЗ) научно-производственное предприятие «Солагифт», являющееся дочерней компанией *«Solagran», Australia* и «*SibEx», Tomsk, Russia*, планирует запуск фармацевтического завода площадью 15 тыс. $м^2$ по переработке и производству лекарственных средств и биологически активных добавок из хвойных пород деревьев (сосны обыкновенной и ели европейской). Как заявляет компания, планируемая ежедневная потребность производства в сырье составит 15-20$м^3$ древесины. На сегодняшний день «Солагифт» осуществляет выпуск около 20 наименований фармацевтических продуктов в рамках действующего опытного производства, расположенного недалеко от строящегося завода [147].

Флора региона исследований богата не только ценными породами хвойных деревьев, здесь произрастает более 80 видов съедобных грибов и 50 видов лекарственных и пищевых растений, весьма значительными являются запасы кедрового ореха. По оценкам экспертов ресурсный потенциал только Томского района огромен и ежегодно может составлять около 25 тыс. тонн экологически чистого растительного сырья [145].

Следует отметить, что с 1998 г. и 2005 г. на территории области реализуются две областные программы по комплексному использованию природного растительного сырья - «Сибирские дикоросы» и «Модернизация заготовительных пунктов». Результатом их реализации является действующая в области схема заготовки дикорастущего растительного сырья, развитие местного производства по переработке сырья и выпуску конечной продукции, установка в заготовительных пунктах новейшего современного оборудования

по первичной переработке сырья. Стимулирующие меры в виде льготного кредитования и налогообложения, софинансирования, привели к тому, что на сегодняшний день, на рынке заготовок дикорастущего сырья в регионе работают около 25 компаний. Однако несмотря на это, по-прежнему в структуре заготовок, 80% собранного сырья приходится на долю самозанятого населения.

Предпринятые областным руководством шаги привели к тому, что в 2018 году объемы закупок дикорастущего сырья в Томской области впервые достигли 1 млрд. рублей. Поставки дикорастущего сырья осуществляются в разные регионы: 40% в центральную Россию, 10% в дальнее зарубежье (Италию, Германию, Индию, Болгарию, Сербию, Голландию, Китай), 30% в страны СНГ (Украину, Казахстан) [145, 147, 149,153].

По экспертным оценкам потенциал заготовительной отрасли в закупочных ценах составляет 10-12 млрд. руб., что сравнимо по величине с доходами бюджета, которые получает регион от продажи газа и нефти [145, 147, 149].

Областные программы стимулировали создание и успешное развитие не только заготовительных организаций, но и предприятий по переработке сырья и производству на его основе продуктов различного назначения. Это такие томские компании как ООО «Артлайф», ООО «Биолит», ООО «Фабрика здорового питания», ООО «Красота СМ», ООО «Томские травы», ООО «САВВА» и др., которые активно работают на рынке лекарственных средств, биологически активных добавок, чайных, травяных напитков, косметических средств, пищевых наполнителей, и др. продукции [143, 144, 149, 153, 154].

Тем не менее наряду с имеющимися достижениями и перспективами в сфере заготовки и переработки сырья имеется ряд проблем, главной из которой является то, что основные экологически чистые участки, пригодные для заготовок находятся в труднодоступных районах, где практически отсутствуют дороги с твердым покрытием. Это в свою очередь привело к тому, что фактически заготовка сырья осуществляется в радиусе 15 км от населенных пунктов, составляя только около 6% от общих ресурсных запасов региона, в то

время как ежегодный объем потребления вышеперечисленных компаний по производству и переработке сырья оценивается не менее чем в 100 т. лекарственного растительного сырья и более чем в 300 т. дикоросов. Поэтому большую часть сырья компании вынуждены закупать за пределами региона [143, 144, 146, 147, 149,153].

Таким образом, в регионе существуют объективные предпосылки для развития сферы заготовки и переработки дикорастущего сырья. Чему способствуют растущий внутренний и мировой спрос на экологически чистое сырье, низкая занятость населения в селах и деревнях региона, а также предпринимаемые областным руководством меры по поддержке данной отрасли [149, 150].

1.2 Характеристика основных загрязнителей Томского района

Ведущими отраслями экономики Томского района, оказывающими влияние на состояние окружающей среды, является агропромышленный комплекс, лесозаготовительная отрасль, а также предприятия различных отраслей промышленности. В административном центре Томского района - г. Томске действуют предприятия нефтегазовой и нефтехимической отрасли (ООО «Томскнефтехим» – одно из крупнейших предприятий отрасли); предприятия по производству строительных материалов и строительству; фармацевтической, машиностроительной, пищевой промышленности; ГРЭС и ТЭЦ. На территории г.Северска, другого административного центра Томского района, действует одно из крупнейших в России предприятие атомной промышленности – АО «Сибирский химический комбинат». Всего на территории Томского района действуют около 400 промышленных объектов.

Кроме промышленных предприятий на экологическое состояние региона большое влияние оказывает транспорт, работающий на дизельном и бензиновом топливе. В местах большого скопления автомобилей на перекрёстках, развилках дорог концентрация оксида углерода превышает предельно допустимые значения в десятки раз. Наиболее грязными в г.Томске с этой точки зрения считаются перекрёстки улиц Белы Куна и Ивана Черных,

проспекта Фрунзе и улицы Красноармейской, проспектов Ленина и Фрунзе, Иркутского тракта и улицы Суворова, Телецентра, проспекта Комсомольского и улицы Герцена, район 4-й поликлиники [1,10, 85,87,116].

Подавляющее большинство промышленных источников экологической опасности (ГРЭС-2, ТЗРО, «Манотомь», «Ролтом», Томский электроламповый завод, «Сибэлектромотор» и др.), располагающихся в г. Томске имеют санитарно-защитные зоны (СЗЗ), не соответствующие СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03 «Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов». В настоящее время в СЗЗ указанных предприятий попадает зона массовой жилой застройки. Так, в СЗЗ находятся ряд жилых домов Соснового Бора, мкр-на Каштак-III, Заозёрья, Телецентра, Иркутский тракт, р-на спичфабрики, улица Сибирская, проспект Кирова, ряд домов на улице Московский тракт в районе завода «Томское пиво», улица Нахимова, мкр-н Степановка. Основные кварталы городской застройки также страдают от высокого уровня загрязнения, и, прежде всего это относится к Воскресенской горе, мкр-ну Каштак, Томск-II, мкр-ну Высотный, районам вдоль улицы Сибирской и Нижняя Елань. Очень высокий уровень загрязнения наблюдается в окрестностях улицы Бердской, ПАТП-2 (пассажирского автотранспортного предприятия), Иркутского тракта, спичфабрики «Сибирь», Томскнефтехима, Татарской слободы и район, включающий Верхнюю Елань, Юрточную гору и ГРЭС-2.

Тепловая электростанция ГРЭС – 2 является в настоящее время подразделением ОАО ТКГ-11. Была построена в 1943 году для обеспечения работы эвакуированных в г. Томск промышленных предприятий. Основным видом топлива до сих пор является уголь, газ используется только для розжига. В результате производственной деятельности ГРЭС - 2 в процессе сжигания твердого топлива в котлах, в атмосферу выбрасывается летучая зола, оксиды азота, серы и углерода, шлак, мышьяк. Выброс вредных веществ составляет по данным мониторинга 1200 тонн в год. При этом зона распространения высоких

концентраций золы может составлять от 8 до 10 км, а ПДК по следу факела может превышать нормы в 7 раз.

ТЭЦ-3 – еще одна тепловая электростанция, располагающаяся в северо-восточной части города, рядом с ООО «Томскнефтехим», построенная в конце 80-х годов прошлого столетия как составная часть новой схемы теплоснабжения г.Томска. К числу наиболее распространенных загрязнителей, попадающих в атмосферу в результате деятельности ТЭЦ-3 и негативно воздействующих на организм человека, относятся диоксид серы, твердые частицы, оксид азота, угарный газ, полициклические ароматические углеводороды, тяжелые металлы.

Помимо тепловых электростанций к основным источникам экологической опасности в Томской области, как уже было отмечено ранее, относят крупнейшие в России предприятия: ООО «Томскнефтехим» – одно из крупнейших предприятий по производству этиленгликолей, акриловых кислот, эфиров, входящее в холдинг ПАО «СИБУР Холдинг», и АО «Сибирский химический комбинат» - одно из крупнейших предприятий Госкорпорации «Росатом», состоящее из четырех заводов по обращению с ядерными материалами: СХК-1 – завод разделения изотопов; СХК-10 – сублиматный завод; СХК-15 – радиохимический завод; СХК-25 – химико-металлургический завод; СХК-20 – завод «Гидроэнергоснабжения».

Основное направление деятельности ООО «Томскнефтехим» (далее по тексту «Томскнефтехим», «Нефтехим»), построенное в 1974 году – производство полимеров бытового и промышленного назначения. Поставки базового сырья (широкая фракция легких углеводородов) на предприятие осуществляются по железной дороге. Основным загрязнителем воздуха в районе действия «Томскнефтехима» является этилен, при этом загрязнение атмосферы в целом наблюдается на расстоянии до 10 км от источника загрязнения, а наибольшее загрязнение – 1-3 км [156]. Опасность для окружающей среды представляют следующие вещества производственного цикла предприятия: окись этилена, синтетические жирные кислоты, аммиак,

предельные и непредельные углеводороды, спирты, кетоны, фенол и др. соединения, относящиеся ко 1-4 классам опасности. Окись этилена является одним из наиболее опасных загрязнителей, обладающих раздражающим, сенсибилизирующим, наркотическим действием, а при хроническом воздействии мутагенным; IARC (Международное агенство по изучению рака) относит это вещество к группе 1, с доказанной канцерогенностью для человека. По данным литературы концентрация этилена до 3 мг/м^3 на расстоянии 2,5 км может вызывать у сельскохозяйственных растений негативные изменения: снижение продуктивности, эпинастии листьев и др. [54].

ОАО «Сибирский химический комбинат» (СХК) – основное градообразующее предприятие закрытого административного территориального образования (ЗАТО) г. Северска. Одно из направлений работы СХК – обеспечение потребностей атомных электростанций в уране для ядерного топлива. СХК был создан в Томской области в начале 1950-х как единый комплекс ядерного технологического цикла для создания компонентов ядерного оружия на основе делящихся материалов (высокообогащенного урана и плутония), а также с целью наработки этих материалов.

В результате производственной деятельности СХК образуется большое количество жидких, твердых и газоаэрозольных выбросов (инертные радиоактивные газы (криптон и др.), йод-131, α- и β-активные нуклиды, стронций-90), которые требуют улавливания и захоронения. Кроме того, в атмосферу выбрасываются вредные химические вещества, связанные с основным производством: соединения фтора; четыреххлористый углерод; азотная кислота - 2 класс опасности; оксиды азота - 2-3 класс опасности; аммиак; ацетон - 4 класс опасности; трибутилфосфат (ТБФ); парафины; бензол и ряд др. компонентов.

СХК является основным источником радиоактивного загрязнения окружающей среды на территории Томской области. Загрязнение окружающей среды радионуклидами происходит в результате как плановых (штатных), так и аварийных газоаэрозольных выбросов и сбросов сточных вод в р.Томь, а также

вследствие хранения и захоронения жидких и твердых радиоактивных отходов. За весь период деятельности СХК произошло более 30 аварийных инцидентов, пять из них относятся к третьему уровню по международной шкале событий на атомных станциях и квалифицируются как серьезные происшествия [1,85,116].

Таким образом, оба предприятия (ООО «Томскнефтехим» и АО «Сибирский химический комбинат») представляют потенциальную угрозу, связанную не только с особенностями производства, но и в связи с близостью размещения к населенным пунктам (10-15 км от жилой зоны г.Томска и г.Северска). Особую остроту вопросам загрязнения придает тот факт, что основным потребителем водных ресурсов на территории региона является СХК. Как было отмечено ранее, Томский район и область в целом имеют разветвленную речную сеть, вследствие чего существует угроза того, что загрязняющие вещества, попадающие из многочисленных притоков в р.Обь будут активно мигрировать, поступая в Обскую губу и далее в Ледовитый океан. При этом опасности разрушения могут подвергаться даже те экосистемы, которые находятся на значительном удалении от непосредственных источников загрязнения. В связи с этим вероятность заготовки и выращивания лекарственного растительного сырья, загрязненного тяжелыми металлами, радионуклидами и другими ксенобиотиками существенно возрастает. Это объясняет неободимость регулярного мониторинга экологической ситуации в регионе, для предотвращения появления на рынке сырья не соответствующего требованиям нормативной документации по качеству и безпасности.

1.3. Современное состояние исследований влияния техногенного загрязнения на растения

Воздействие на морфологические и анатомические признаки

Первые публикации, описывающие повреждения деревьев от газодымовых выбросов фабрик появились в Западной Европе еще в XIX веке. Впоследствии подобные исследования приобрели в среде исследователей

разную направленность и стали публиковаться во многих странах на разных континентах [12, 17, 24,52,69, 101, 108 , 135].

Большая часть исследований в отечественной и зарубежной литературе посвящена влиянию техногенного загрязнения на элементный состав почв. В значительно меньшем количестве работ изучено влияние загрязнения на состояние деревьев, травянистых растений и кустарников. Как следует из публикаций, элементный состав видов определяется с одной стороны, геохимическим составом почвы, на которых они произрастают, с другой - техногенной нагрузкой, при которой ксенобиотики проникают в растения как фолиарным путем при аэротехногенном загрязнении воздуха, оседая на листьях и стеблях растений, так и корневым поступлением из почвы [2,3,11,15,16,19,20,24,35,41-50,52,53,55,57,58,60,61,63-66,73,74,78,79,82,86,88, 90-92,94-96,98,101,108,109,111-114,131,136].

Публикации по изучению влияния техногенного загрязнения на анатомические, морфологические признаки растений и содержание биологически активных веществ в литературе фрагментарны. При этом большинство работ, как отечественных, так и зарубежных авторов посвящены изучению хвойных пород деревьев, как наиболее чутких индикаторов загрязнения в условиях городской среды [16,22,66,73,74,88,91,95,98,101,104, 108,114,126,132,136,139,142].

В работах, посвященных изучению влияния тяжелых металлов на морфологические признаки видов и структуру популяций было установлено, что в условиях загрязнения эти изменения не являются специфичными и носят разнонаправленный характер. То есть загрязнение может приводить как к подавлению, так и стимуляции жизненного состояния особей. В условиях постоянного загрязнения виды развивают устойчивость, цель которой состоит в снижении повреждаемости и способности листьев к накоплению токсичных веществ и газов. Проявления устойчивости заключаются в ксероморфизации листьев; уменьшении размеров и количества листьев на годичном побеге, их увядании и скручивании; увеличении плотности жилкования; изменении

формы листовой пластинки; общем торможении роста, хлорозе листьев, связанном с нарушением фотосинтеза; некрозе верхушек и краев листьев; изменении количества и длины вегетативных, генеративных побегов (как возрастанию, так и уменьшению) и диаметра дерновины; отмиранию корней; увеличении числа патологических генеративных клеток, которые приводят к снижению фертильности видов [42, 66,102].

Как уже было отмечено, наиболее изученными обектами среди растительных организмов являются хвойные деревья, среди которых наиболее изученной является сосна, которая считается идеальным объектом экологического мониторинга состояния окружающей среды. Так, в одном из таких исследований установлено, что при воздействии аэротехногенного загрязнения на вегетативную и репродуктивную систему хвойных (сосна обыкновенная и ель) было установлено, что под воздействием промышленных выбросов происходит разрастание механических тканей, в частности гиподермы (вместо одного слоя клеток в норме, обнаружено два), а также утолщение клеток эпидермиса [4,7,13,22,82,88,108,111,114,117].

Наряду с хвойными деревьями, другим классическим индикатором загрязнения являются лишайники, чутко реагирующие на ухудшение качества воздуха. При этом воздействие различных загрязнителей может вызывать у лишайников уменьшение размера, сворачивание, обесцвечивание слоевищ, снижение фертильности, и даже гибель чувствительных видов лишайников. Анатомические изменения заключаются в снижении числа клеток, ультраструктурных изменениях слоевищ, деградации фотосинтезирующих пигментов, снижении фотосинтеза и показателей дыхания, увеличении проницаемости мембран [123].

Менее изучены изменения морфологических и анатомических признаков под влиянием загрязнения на других представителей растительного мира.

В одном из исследований по изучению влияния радиационного воздействия на морфометрические показатели *Pentaphylloides fructicosa L.* (курильский чай, лапчатка кустарниковая), было показано статистически

значимое уменьшение поверхности листьев и их конечной доли, длины и ширины листьев, прироста годичных побегов и длины черешка [107].

В исследовании некоторых видов деревьев, кустарников и травянистых растений, произрастающих в пределах г. Грозного были определены растения-индикаторы состояния окружающей среды. К ним были отнесены виды с высокой пластичностью: на морфологическом уровне - *Syringa vulgaris L.* (сирень обыкновенная) и *Acer negundo L.* (клен американский, к.ясенелистный), на анатомическом – *Acer platanoides L.* (клен остролистный) и *A. pseudoplatanus L.* (клен белый), которые рекомендованы для городского озеленения [64].

В исследовании Убаевой Р.Ф. с соавт. был сделан вывод о том, что относительная изменчивость морфолого-анатомических признаков может не совпадать, находясь в зависимости от напряженности выполняемых ими функций, биологических особенностей и условий местообитания вида. Вариабельность большинства анатомических признаков всех видов в условиях техногенной нагрузки изменяется в направлении, противоположном вариабельности морфологических признаков [101].

Изучение пижмы обыкновенной, произрастающей в индустриальной и парковой зоне г. Белграда, показало, что существует корреляция между местом произрастания, содержанием некоторых биологически активных веществ и анатомо-морфологическим строением. Авторами данного исследования было установлено, что в листьях растений индустриальной зоны толщина клеток верхней и нижней палисадной паренхимы, мезофилла, находящихся в непосредственном контакте с окружающей средой, значительно тоньше, чем у листьев растений, не подверженных техногенному воздействию. Данный факт исследователи связали с адаптацией растений к непрерывно воздействующим загрязнителям (тяжелые металлы, строительные материалы, оксиды азота и серы, и т.д.) [120].

Учеными из Индии было исследовано воздействие загрязняющих веществ от глиняной промышленности, выхлопных газов автомобилей на

тропические растения *Abutilon indicum* G.Don. (канатник или абутилон индийский), *Croton sparsiflorus* Morong (кротон страстоцветный) и *Cassia occidentalis* Linn. (кассия западная). Результаты, представленные авторами показали, что загрязнители оказывают влияние только на некоторые морфолого-анатомические признаки исследованных видов. Так, например, было отмечено значительное уменьшение окружности оси побегов, области ксилемы и количества устьиц. При этом кора и участки пробки не показали иных значительных изменений между контролем и загрязненными образцами. В этом исследовании авторы пришли к заключению о том, что сосудистые элементы растений более чувствительны к действию загрязняющих веществ, изменяясь больше в размерах и пропорциях, а также о том, что различные ткани одного и того же растения отличаются по своим «откликам» на одно и то же загрязняющее вещество [121].

В другом исследовании были изучены изменения эпидермиса листьев *Pennisetum purpureum* Schumach (слоновая трава) и *Sida acuta* Burm.F. (сида остролистная) в условиях загрязнения цементной пылью. При этом по данным авторов *Pennisetum purpureum* не претерпевал изменений анатомических признаков, что может свидетельствовать с одной стороны о том, что доза загрязняющих веществ для ответной реакции не была достаточной, а с другой о том, что этот вид повышает устойчивость и длительность выживания в сложившихся условиях. В листьях *S.acuta*, подвергшихся загрязнению напротив были зафиксированы значительные изменения в размере устьиц, их плотности и устьичного индекса. Возникшие в листьях *S.acuta* изменения авторы предлагают рассматривать и использовать в качестве биологических маркеров загрязнения [126].

Исследователи из Аргентины изучили возможность использования эпидермальных характеристик вечнозеленых листьев *Ficus benjamina* (фикуса Бенджамина) и лиственных листьев *Fraxinus pennsylvanica* (ясень пенсильванский) в качестве индикаторов загрязнения в г.Буэнос-Айресе. В зрелых листьях обоих видов, отобранных по трем зонам, имеющим различный

уровень загрязнения: городской, пригородной и сельской местности изучили длину, ширину устьиц и эпидермальных клеток, их количество на единицу площади. Авторы не обнаружили корреляции между изменениями эпидермальных характеристик и климатическими переменными (средняя температура, среднее количество осадков), воздушными поллютантами, C, N, P, концентрацией металлов в почве. Что касается связи между изменениями в эпидермальных характеристиках и концентрацией в почве тяжелых металлов, положительная корреляция была найдена между длиной устьиц *Ficus*, произрастающего в городской зоне г. Буэнос-Айреса и концентрацией железа [122].

Отечественными учеными было проведено исследование подорожника большого и горца птичьего, произрастающих в г.Воронеже и его окрестностях. При этом были определены анатомические признаки экологической чистоты сырья. К ним было отнесено наличие на нижней стороне листа не более 250 устьиц на 1 см^2 поверхности, более 35 головчатых волосков; на верхней стороне – не более 150 устьиц, более 16 головчатых волосков [16].

Воздействие на синтез физиологически и биологически активных веществ

Как и в случае изучения воздействия загрязнения на морфолого-анатомические признаки растений, большинство отечественных и зарубежных работ по изучению влияния загрязнения на состав и содержание физиологически и биологически активных веществ посвящено хвойным и листопадным породам деревьев. Работы по исследованию представителей травянистого и кустарникового ярусов единичны [16, 38, 73, 92, 107, 117].

Достаточно полно изучено влияние техногенного загрязнения на количество эфирного масла сосны и его качественный состав, степень выраженности антимикробного действия и токсичность. Во всех исследованих достоверно установлено, что сосна крайне чувствительна к экологическому загрязнению. При высокой степени техногенной нагрузки содержание тяжелых металлов, фтора и серы в хвое сосны увеличивается, при этом содержание эфирного масла, напротив, снижается. При слабой и средней степени

загрязнения воздушной среды содержание эфирного масла в хвое повышается. В отдельных публикациях авторы делают заключение о коррелировании интенсивности образования монотерпеноидов с освещенностью, которая возрастает по мере увеличения прозрачности атмосферы и снижения загрязнения. При этом авторы отмечают перераспределение в составе монотерпеновой фракции по мере увеличения загрязнения: доля α-пинена в эфирном масле от общей суммы снижается, а среди монотерпеноидов возрастает, что вероятно связано с тем, что монотерпеноиды выполняют защитую функцию. Снижение доли других монотерпенов в эфирном масле сосны с загрязненных территорий, предположительно связано со спецификой механизма биосинтеза терпеноидов, и их окислением. Содержание сесквитерпеноидов, напротив, увеличивается, что вероятно связано со слабой зависимостью их биосинтеза от освещенности. Доля кислородсодержащих компонентов в эфирном масле возрастает с повышением техногенной нагрузки, что может быть связано с увеличением интенсивности окислительных и других превращений, катализируемых ксенобиотиками [4,5, 63, 108, 114, 117].

По данным некоторых авторов на фоне общего уменьшения содержания монотерпеноидов в эфирном масле сосны, доля α-пинена в нем увеличивается, что связывают с его защитной функцией для самого дерева; содержание же 3-карена в эфирном масле наоборот, уменьшается в 2-3 раза, что связывают с его окислением. Еще в конце 60-х годов прошлого века было показано, что сосны, имеющие повышенное содержание 3-карена в эфирном масле, имеют большую устойчивость к некоторым грибковым заболеваниям. Вместе с тем установлено, что 3-карен обладает выраженным аллергенным действием на организм человека, вызывая дерматиты, что предполагает ограничения применения эфирных масел с высоким содержанием этого компонента [4,13,108].

В исследовании Шубиной Н.В. было показано влияние техногенного загрязнения (металлургический завод) на содержание зеленых (хлорофилла) и желтых (каротиноидов) пигментов в хвое сосны. Установлено, что на их

максимальное количество, наблюдаемое в августе-сентябре и марте-мае не влияет расстояние от металлургического производства [18].

На примере *Pentaphylloides fructicosa L.* (курильский чай, лапчатка кустарниковая), было показано, что в условиях радиационного загрязнения с ростом уровня облучения, общее содержание флавоноидов в листьях растений, произрастающих на средне- и сильно облученных участках, в сравнении с не облученными, не изменяется. Однако при этом меняется качественный состав флавоноидов: с увеличением радионуклидного загрязнения повышается содержание изокверцитрина, кверцитрина, астрагалина и кемпферола, а концентрация неидентифицированного компонента флавоноидной природы снижается [107].

В исследовании 171 вида цветковых растений и 24 видов мхов, произрастающих в бассейне р. Сура Пензенской области, имеющих различную степень загрязнения показало, что степень загрязнения влияет на изменение пигментации соцветий. Так, в условиях слабого загрязнения они светло-зеленые, при среднем – имеют сероватый оттенок, при высоком – коричневый, что связано с накоплением антоцианов, которые защищают фотосинтетический аппарат растений от обширного окислительного повреждения, возникающего под действием поллютантов. И как полагают исследователи, факт увеличения уровня антоцианов в растениях в условиях увеличения техногенной нагрузки позволяет использовать их в качестве биоиндикатора физиологического состояния растений [92].

В работе Осиповой Е.С. исследовалось влияние нефтяного загрязнения на биохимические и морфологические показатели растений (осока сероватая, рогоз узколистный, элодея канадская). Было установлено, что концентрация хлорофилла *a* у некоторых растений увеличивается. В отдельных случаях было отмечено увеличение концентрации парааминобензойной кислоты, хлорофилла *b,* каротиноидов, устраняющих избыток активных форм кислорода и защищающих пигменты и липиды от окислительного повреждения. В этом исследовании было показано, что система фенольной

защиты растений является высоко чувствительной к действию нефтяного загрязнения. У растений с нефтяных месторождений содержание фенольных соединений изменялось по – разному. Так, у рогоза узколистного и осоки сероватой повышалось в 2,5-3 раза; у осоки острой в одних случаях увеличивалось, в других уменьшалось; у овса посевного, находившегося в угнетенном состоянии содержание фенольных соединений снижалось в 1,2 раза. Такой разный ответ на загрязнение автор связывал с видоспецифичностью реакций растений. В целом, автором отмечена высокая эффективность защитных свойств флавоноидов при больших концентрациях нефтяного загрязнения [73,74].

Костюк В.И. с соавт. при изучении сосны обыкновенной, произрастающей в зоне воздействия Кандалакшского алюминиевого завода (1 – ая площадка в 8 км; 2 – ая в 21 км от КАЗа) заметили, что содержание каротиноидов в хвое в образцах с 1-ой площадки было больше по сравнению с образцами со 2-ой площадки на 7,5%; флавоноидов – на 62,5%; хлорофилла – на 17,7%. Усиление синтеза флавоноидов вблизи источника загрязнения авторы связывают с хемоиндуцированным изменением «нормального» гомеостатического соотношения элементов (*N, P, K*), относящихся к категории биогенных, возникновением относительного дефицита *K*, и необходимостью иммобилизации избытка *Al* и фторидов. Как отметили авторы, выявленные ими физиологические адаптации могут свидетельствовать о том, что вблизи КАЗа метаболические процессы ориентированы не только и не столько на осуществление процессов роста, сколько на защитно-приспособительные и репарационные функции.

Этими же авторами было изучено влияние радионуклидов на ассимилирующие органы сосны, произрастающей в зоне действия Кольской АЭС. Площадки, на которых проводился отбор проб располагались симметрично относительно источника радиоактивного загрязнения на расстоянии 5-15 км (1 – ая площадка) и на расстоянии 30 км зоны действия АЭС (2 – ая площадка). При этом наибольшее накопление *Cs-137* в хвое

наблюдалось в образцах из 1 зоны, максимально приближенной к АЭС, а *Sr-90* – в образцах из 30 - км зоны. Общее содержание хлорофилла в образцах из 1 – ой было ниже на 16%, по сравнению со 2-ой. При этом снижение концентрации хлорофилла *b* происходило более быстрыми темпами, чем хлорофилла *a*. Таким образом, авторы сделали вывод о влиянии *Cs-137* на процессы свободнорадикального окисления липидных компонентов мембран в хлорофилл содержащих тканях и в наибольшем влиянии на ингибирование этого звена биосинтеза хлорофилла. Также в образцах из 1-ой зоны возросло отношение хлорофилла *a/b*, что косвенно может свидетельствовать об радиоиндуцированных нарушениях оптимальных стехеометрических соотношений компонентов электрон-транспортной цепи фотосинтеза в хлоропластах. Наряду со снижением уровня хлорофилла, происходило и снижение уровня каротиноидов (на 10%), однако при этом отношение содержания каротиноидов к содержанию хлорофилла несколько возросло (на 7%), что указывает на активацию радиопротекторных свойств каротиноидов, что связано с их антиоксидантными свойствами. Наиболее же заметным было значительное снижение содержания суммы флавоноидов (на 24%), что также может быть связано с их окислительной деградацией по свободнорадикальному механизму в связи с их участием в защите пигментного комплекса.

Эти же авторы изучили влияние горно-металлургического комбината (ГМК) «Североникель» на структурно-функциональные показатели представителей древесного и кустарникового ярусов: сосны, березы, вереска, вороники, золотарника, толокнянки, брусники. Образцы также как и в предыдущих исследованиях заготавливали на площадках, находящихся на различном удалении от источника загрязнения: 1- ая – 9км; 2 - ая – 11 км; 3 –я – 32 км; 4 - ая – 47км. Как отметили авторы влияние ГМК на пигментный комплекс сосны имеет двухфазный характер. На 2-ой площадке общее содержание хлорофилла и каротиноидов в хвое увеличивалось, что говорит о стимуляции процессов биосинтеза пигментов тяжелыми металлами и является важным звеном в

развитии неспецифического адаптационного синдрома вида, находящегося под техногенным воздействием. На 1-ой площадке напротив наблюдалось существенное снижение уровня хлорофилла *a* и *b,* каротиноидов, что связано, вероятно, с ингибирующим действием повышенных концентраций металлов в тканях. Содержание флавоноидов по мере удаления от ГМК возрастало приблизительно до 11 км (2-ая площадка), а затем начало снижаться, достигнув к 47 км (4-ая площадка) уровня 0,63% (снижение на 23% от уровня 2-ой площадки). Увеличение уровня флавоноидов в хвое сосны на 2-ой площадке авторы рассматривают как ответную реакцию на окислительный стресс, вызванный повышенными концентрациями тяжелых металлов.

Приводя анализ влияния ГМК на некоторые кустарниковые и травянистые виды растений авторы отмечают, что для большинства видов достоверными являются различия по содержанию пигментов только из крайних точек наблюдения: вблизи комбината (1-ая зона) и условно фоновой (4-ая зона). При этом степень уменьшения содержания пигментов в зоне сильного загрязнения зависела от видовой принадлежности растений. Так, высокой устойчивостью отличались толокнянка и золотарник (снижение уровня хлорофилла составило 35%), среднюю устойчивость проявили вороника, вереск и береза (снижение на 53-58%), наиболее чувствительной к загрязнению оказалась брусника (снижение на 62%). По содержанию каротиноидов самой устойчивой была вороника (24%), средняя – у вереска, золотарника, толокнянки (42-46%), слабая - у березы и брусники (56-61%). Таким образом, авторы сделали заключение о том, что наиболее чувствительным к действию поллютантов является фотосинтетический аппарат вечнозеленых видов. В качестве биоиндикаторов состояния окружающей среды авторы рекомендуют использовать бруснику из вечнозеленых видов, особенно листья текущего года и из листопадных видов березу [95].

В работе Галибиной Н.А. были выявлены изменения в содержании углеводных соединений в хвое сосны и ели в условиях сильного промышленного загрязнения. Так, было установлено, что по мере

приближения к источнику загрязнения происходит снижение количества крахмала, стабильных и лабильных гемицеллюлоз [22].

Исследование подорожника большого и горца птичьего показало большие аккумулирующие способности листьев подорожника большого в отношении тяжелых металлов и радионуклидов (*Cs*-137 и *Sr*-90). Автором был сделан вывод о сильном угнетающем действии тяжелых металлов, особенно цинка, меди и кадмия на биосинтез флавоноидов, хрома, никеля и мышьяка на биосинтез ВРПС. Было показано, что в районах с повышенной загрязненностью содержание суммы ПСК уменьшается, что может являьтся показателем экологической чистоты. Поэтому автором было предложено внести изменения в числовой показатель соответствующей фармакопейной статьи на листья подорожника большого – «содержание суммы ПСК» в сторону его увеличения [16].

В Ханты-Мансийском автономном округе было изучено влияние техногенных загрязнений, в т.ч. нефтяного, на накопление низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновая, дегидроаскорбиновая и декетогулоновая кислоты, каротиноиды, флавоноиды) в 25 видах наиболее распространенных растений, в том числе лекарственных. Было установлено, что в условиях нефтезагрязнения растения имеют повышенное содержание АК, ДАК, ДКГК, а также характерным было повышение уровня суммы флавоноидов и снижение содержания каротиноидов. Авторами были выделены виды растений, отличающихся различной степенью устойчивости к стрессовым факторам в зависимости от содержания веществ с антиоксидантной активностью. Так, из проанализированных видов растений: *Chamaenerion angustifolium* L. (Иван-чай узколистный), *Artemisia vulgaris* L. (полынь обыкновенная), *Plantago major* L. (подорожник большой), *Taraxacum officinale* Webb. (одуванчик лекарственнный), *Polygonum aviculare* L. (горец птичий) наиболее устойчивым видом была признана полынь обыкновенная, у которой был отмечен усиленный синтез АК при высоком уровне ДГК. *Chamaenerion angustifolium* оказался наиболее чувствительным к нефтезагрязнению, что проявилось в

значительном повышении уровня ДКГК, флавоноидов и резком снижении уровня каротиноидов. Авторами был сделан вывод о меньшем воздействии городских условий на физиологические процессы в растениях, по сравнению с нефтезагрязнением, что проявлялось в более низком содержании АК, ДКГК и меньшем угнетении синтеза АК. С целью экологического мониторинга нефтезагрязненных территорий, а также для оценки возможности использования ЛРС в медицинской практике и для производства БАД к пище авторами рекомендовано использовать показатели содержания ДКГК, каротиноидов, флавоноидов и селена [98].

Анализ влияния ТМ на содержание дубильных веществ в лекарственных растениях, произрастающих на территории Кемеровской области, в районах с высокой техногенной нагрузкой, позволил сделать предположение о том, что содержание дубильных веществ имеет линейную зависимость от содержания меди и марганца [113].

Сжигание твердых бытовых отходов (ТБО) на свалках создает разнообразие газообразных загрязнителей воздуха (SO_2, NO_2, CO, NH_3, летучих органических соединений, H_2S и др.), которые загрязняют окружающий воздух и снижают содержание аскорбиновой кислоты и хлорофилла α и β. Это было показано на примере *Chromolaena odorata* L. (хромолена душистая) и *Morinda lucida* L. (моринда), произрастающих в окрестностях полигона ТБО в Ибадане (Нигерия) [121].

В Пакистане провели исследование влияния автомобильного загрязнения на содержание хлорофилла в различных видах деревьев: *Azadirachta indica* L. (азадирахта индийская), *Conocarpus erectus* L. (конокарпус прямой), *Guiacum officinale* L. (гваяковое дерево), *Eucalyptus* sp. (виды эвкалипта) растущих вдоль городских дорог. Были обнаружены существенные изменения уровней хлорофилла α, β и суммы хлорофилла $\alpha + \beta$ в листьях всех видов по сравнению с контролем. Самая низкая концентрация хлорофилла α, β, суммы $\alpha+\beta$ была определена в образцах листьев всех видов, собранных с участка близи аэропорта по сравнению с контролем [122].

Поиску модели для биомониторинга качества атмосферы, было посвящено исследование, проведенное в Турции. Оно показало, что наиболее чувствительной моделью, даже при низких уровнях загрязнения, является кедр ливанский. В ходе эксперимента было выяснено, что обмен веществ в хвое кедра в значительной степени направлен на защиту от значительного количества АФК, вырабатывающихся в ответ на загрязнение. Авторы наблюдали значительное увеличение в хвое биомаркеров антиоксидантной защиты: S-трансферазы, глутатиона, малонового диальдегида, общего содержания растворимого белка, значительное снижение уровня хлорофилла [137].

В совместном исследовании американских и индийских ученых было изучено влияние разных концентраций *Pb* (от 100 до 1000 мг/л) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях гиацинта. Было установлено, что содержание хлорофилла α, β и каротиноидов уменьшается по сравнению с контролем по мере увеличения концентрации металла [131].

Некоторая противоречивость результатов воздействия техногенных факторов на растения, приведенных в литературе может быть объяснена различиями в типах, концентрациях вредных веществ, длительности воздействия; восприимчивости растений к тем или иным токсикантам; стадиях физиологического развития растений или их частей в момент воздействия загрязнителей; дополнительном влиянии света, температуры в момент воздействия стресс-фактора и/или отбора проб, а также различиями в функциях выполняемых в растениях физиологически / биологически активных веществ [63].

1.4 Современные представления о роли флавоноидов, полисахаридов, хлорофилла и эфирных масел в растениях в защите от стресс-факторов

Растения – сложные по составу организмы. Из неорганических минеральных веществ почвы, воды и углекислого газа воздуха растительные организмы под действием света синтезируют большое количество соединений различного строения, среди которых различают вещества первичного и

вторичного синтеза. К веществам первичного синтеза, которые содержат все растения, относятся: белки, аминокислоты, витамины, ферменты, липиды, углеводы, органические кислоты. К веществам вторичного синтеза, накапливающимся только в определенных видах, родах, семействах, и образующимся в процессе распада веществ первичного синтеза относятся терпеноиды, алкалоиды, сапонины, фенольные соединения и др. При этом как первичные, так и вторичные вещества обладают физиологической/ биологической активностью, и необходимы не только для жизнедеятельности самого растения, но также для животных и человека. Однако биологическая роль и роль в защите от стресс-факторов многих из них еще до конца не выяснена.

Практически все органы растения содержат пигменты, которые делят на два типа: вегетативные и декоративные. Антоцианы, по сути, являются группой декоративных водорастворимых пигментов красного, синего или фиолетового цвета, встречающихся в цветках, плодах, листьях многих растений. Антоцианы синтезируются в цитоплазме и депонируются в вакуоли клеток с помощью глутатионового насоса. Обнаруживаются антоцианы не только в растворенном виде в клеточном соке, но и в виде отложений кристаллов или аморфных соединений в протоплазме клеток. Химически они представляют собой гликозиды, при гидролизе которых отщепляются молекулы сахара, с образованием агликонов антоцианидинов. На сегодняшний день известны 17 антоцианидинов, встречающихся в природе, 6 из которых встречаются в высших растениях [103].

Что касается роли антоцианов для растений, то на сегодняшний день окончательная их роль неясна, и факт активации биосинтеза антоцианов в ответ на стресс пока не получил глубокого физиолого-биохимического обоснования. Тем не менее, исследователи выделяют несколько функций антоцианов, суть которых сводится к универсальной и эффективной защите, повышению адаптации растений в условиях стресса [51, 72, 103, 132, 138]:

1. Защита фотолабильных соединений от повреждения за счет поглощения избыточных квантов света.

2. Защита фотосинтетического аппарата в условиях избыточной освещенности за счет снижения частоты фотоингибирования, абсорбирования избыточных фотонов, ускорения восстановления фотосинтетического аппарата.

При сильной освещенности, антоцианы являются оптическим фильтром, предохраняющим от высокоэнергетических квантов насыщенную фотосинтетическую электронную транспортную цепь и повышают поглощение солнечной энергии в пределах видимой области (380–700 нм) в среднем на 8–12 %. Поэтому антоцианы причисляют к нефотохимическим защитным механизмам, эффективным в долгосрочный период, в то время как пигменты ксантофилового цикла играют большую роль в защите растений в течение краткосрочных световых стрессов.

3. Защита от ультрафиолетового излучения за счет индуцирования выработки антоцианов в ответ на УФ-излучение, имеющих в молекуле ацильную группу, поглощающих в УФ-области и снижающих степень повреждения ДНК.

4. Повышение устойчивости к стрессу. Синтез антоцианов стимулируется при охлаждении и замораживании растений, загрязнении тяжелыми металлами, засухе.

5. Антоцианы, придавая цвет растениям, играют определенную роль в привлечении насекомых и животных для опыления и переноса семян. Также есть предположение о том, что, антоцианы, как и флавоноиды, способны повышать устойчивость растений к атакам насекомых.

Другой значимой группой биологически активных веществ являются полисахариды (ПС), которые представляют собой высокомолекулярные продукты конденсации более 5 моносахаридов и их производных, связанных друг с другом О-гликозидными связями и образующие линейные разветвленные цепи. Выделяют два типа полисахаридов: *гомополисахариды,* построенные из моносахаров одного типа (например, хитин, клетчатка,

крахмал, гликоген) и *гетерополисахариды,* состоящие из остатков различных моносахаров и их производных (например, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, слизи, инулин, камеди). В зависимости от выполняемых функций полисахариды делятся на запасные, структурные, защитные; в зависимости от кислотности различают кислые и нейтральные; по характеру скелета полисахариды бывают линейные и разветвленные; в зависимости от происхождения различают зоополисахариды, фитополисахариды и полисахариды микроорганизмов [39,72,89].

В соответствии с современными представлениями полисахаридный комплекс (ПСК) состоит из нескольких фракций – ВРПС (водрастворимые полисахариды), ПВ (пектиновые вещества), Гц А и Гц В (гемицеллюлоза). При этом разные фракции ПСК в соответствии с современными представлениями играют важную роль в структуре клеточных стенок и процессах жизнедеятельности растений в норме и в условиях воздействия абиотических и биотических факторов среды.

Клеточная стенка высших растений представляет собой сложную систему, выполняющую структурную, защитную и транспортную функции. Согласно современным представлениям, клеточная стенка состоит из первичной оболочки, образующейся в развивающейся клетке; вторичной оболочки, возникающей вслед за первичной и накладывающейся на нее изнутри; и межклеточного вещества (срединной пластинки). Известно, что первичные и вторичные стенки содержат в разных пропорциях целлюлозу, Гц, ПВ. При этом пектиновые вещества составляют большую часть первичной стенки, придавая оболочке пластичность. Кроме ПВ в состав первичной оболочки входят Гц (на долю ПВ и Гц приходится 50-60% сухого веса), целлюлоза (не более 30%) и структурный белок (около 10%). Срединная пластинка состоит преимущественно из ПВ. Вторичная оболочка состоит из целлюлозы (40-50%), Гц (20-30%) и лигнина (25-30%), ПВ практически отсутствуют.

Клеточная стенка представляет собой физический барьер для проникновения тяжелых металлов (ТМ) в клетку. И именно полисахариды

растительной клеточной стенки играют важную роль в их связывании и накоплении в клеточной стенке, хотя белки, аминокислоты и фенольные соединения также могут принимать участие в этом процессе. Пектин, вместе с гемицеллюлозами, играет решающую роль в связывании ТМ. Так, достоверно установлено, что присутствие рамногалактуронана II в клеточной стенке способствует образованию комплекса с *Al*, предотвращая тем самым повреждение и необратимое ингибирование роста растений. А наличие экзогенного *Si* в клеточной стенке корней кукурузы и саженцах риса увеличивает ее сродство к *Zn,* снижая тем самым его поглощение и транслокацию. Способность связывать катионы двухвалентных металлов зависит от количества функциональных групп, таких как -COOH, -OH, -SH и присутствующего в клеточной стенке. Присутствие ТМ в клеточной стенке не всегда приводит к ее ужесточению и торможению удлинения клеток. Например, присутствие *Cu* и *Fe*, может привести к расщеплению полисахаридов, стимулируя клеточное удлинение. Эти данные показывают ключевую роль состава клеточной стенки в толерантности растений к ТМ [106,107, 118, 133].

Пектиновые вещества (ПВ), или пектины – большая группа высокомолекулярных гетерополисахаридов гликаногалактуронанов, кислых растительных полисахаридов, образованных остатками α-D-галактуроновой кислоты [66]. Являясь структурным элементом растительных клеток и тканей, пектины выполняют важные биологические функции. Так, например, они участвуют в образовании клеточных стенок, регулируют водный и ионный обмен, способствуя поддержанию тургора и повышению засухоустойчивости растений. А благодаря тому, что ПВ содержат большое количество карбоксильных групп, они эффективно связывают ионы металлов, обеспечивая повышение резистентности растений к действию поллютантов [50,66,90]. Содержание пектиновых веществ в растениях зависит не столько от воздействия стресс-факторов на растения, сколько от условий местообитания, условий хранения сырья в дальнейшем. Так, установлено, что общее содержание пектина и протопектина в процессе двухлетнего хранения яблок

различных сортов возрастает в течение первых 4-12 месяцев хранения, причем в зимних сортах по сравнению с осенними ПВ в 1,5 раза больше. По мнению В.В. Арасимович повышение уровня ПВ в процессе хранения связано с преобразованием гемицеллюлозы в протопектин [8,37,56].

Также на примере пектиновых веществ, содержащихся в стеблях и листьях льна посевного, были показаны изменения в их количестве, составе и структуре в процессе роста и развития вида. Установлено, что содержание ПВ в стеблях растения уменьшается с 7% в начальной стадии до 2% в фазе увядания, в то время как в листьях содержание ПВ остается постоянным на уровне 4% в течение всего вегетационного периода [75].

Гемицеллюлоза представляет собой растительные гомо- и гетерополисахариды, имеющие молекулярную массу (10000-40000). Строение гемицеллюлоз напоминает крахмал и целлюлозу, цепи которых состоят из остатков гексоз либо пентоз, связанных кислородными мостиками, но их цепочки более короткие. Гемицеллюлоза - один из компонентов первичной клеточной стенки и основной компонент вторичной клеточной стенки, обеспечивающий им дополнительную прочность и жесткость, и могут быть ключевым компонентом в реакции растений на неблагоприятные факторы окружающей среды. В обеспечении прочности клеточной стенки участвуют пентозы (рибоза, арабиноза, ксилоза, рибулоза, кетопентоза и др.). Некоторые Гц, например, гексозы, встречающиеся в свободном виде (глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза) являются запасными веществами и входят в состав других групп БАВ. Поскольку образуются гексозы в результате фотосинтеза, их концентрация в растениях снижается при действии стресс-фактора.

Слизи – гидрофильные гетерополисахариды, не являющиеся экссудативными продуктами, и образующиеся обычно в процессе естественного развития в неповрежденных клетках растений в результате слизистого перерождения клеточных стенок или клеточного содержимого. При этом могут ослизняться отдельные клетки (алтей, фиалка) или целые слои (подорожник, лен). Также слизи образуются у растений засушливых

местообитаний. Живые секретирующие слизь клетки растений имеют сходную структуру: большое количество митохондрий с хорошо развитыми кристами богаты цитоплазмой, имеют развитый аппарат Гольджи [14]. Показано, что кристаллы слизи первоначально образуются в маленьких вакуолях, потом диффундируют в центральную вакуоль, где далее слизь аккумулируется вокруг рафидных тяжей. Идиобласты, содержащие слизь образуются преимущественно в паренхимных тканях органов, в эпидермисе стеблей и листьев. Слизевые клетки почти всегда присутствуют в генеративных органах (цветоложе, лепестках, столбике и тычиночной трубке) [21].

По данным K.Distelbarth содержание слизей в растениях подвержено сезонным колебаниям; при этом наибольшее их количество накапливается зимой, снижаясь весной и достигая максимума летом [137].

В растениях слизи выполняют важную биологическую роль: являются запасными питательными веществами; защищают растение от пересыхания; способствуют прорастанию семян и их распространению [63].

Имеются данные о том, что слизь, выделяемая корнями растений, способна связывать некоторые ТМ (алюминий, свинец, медь, кадмий, цинк) тем самым предотвращая повреждения, которые они могут вызвать. Вместе с тем, слизь связывает и необходимые микроэлементы, такие, как железо и марганец, осложняя, таким образом, минеральное питание растений. Относительно механизмов связывания металлов у ученых в настоящее время нет ясности, но предполагают, что существует несколько механизмов: адсорбция, образование комплексов и др. [118,133].

Еще одной значимой для растений группой являются эфирные масла, которые представляют собой жидкие легко летучие многокомпонентные смеси органических веществ (углеводороды, спирты, сложные эфиры, кетоны, лактоны, ароматические компоненты). В растениях эфирные масла накапливаются в специализированных образованиях, которые могут находиться в цветках, плодах, листьях, коре, подземных органах и древесине. Составляющими эфирных масел являются терпеноиды - многочисленная

группа веществ, насчитывающая более 20 тыс. соединений. Терпеноиды защищают растения от болезней, вредителей, стрессовых факторов (высокие и низкие температуры, механические повреждения, техногенное загрязнение и т.п.). До 1960-х гг. терпеноидам отводилась второстепенная роль, чаще всего они рассматривались как вторичные, «бесполезные» вещества, которые в большом количестве синтезируются растениями, не неся при этом никакой функциональной нагрузки. Однако к настоящему времени получены убедительные доказательства участия терпеноидов во многих биохимических процессах, обеспечивающих жизнедеятельность живых организмов от растений до животных и человека. Терпеноиды учавствуют в регулировании активности растительных генов, в фотосинтезе, переносе электронов по дыхательной цепи, в защите фотосинтетического аппарата клеток от активных форм кислорода, стабилизации растительных мембран, контроле их проницаемости, в репаративных процессах в экстремальных условиях за счет выделения веществ/продуктов, препятствующих проникновению патогенной флоры и обладающих антимикробными свойствами [62].

Среди всех биологически/физиологически активных веществ растений наиболее изученными в плане их изменения под действием загрязнения являются фотосинтетические пигменты.

Хлорофилл – пластидный пигмент, содержащий стабильное порфириновое кольцо, вокруг которого электроны могут свободно мигрировать. Поскольку электроны движутся свободно, кольцо имеет потенциал, чтобы легко приобрести или потерять электроны. Это основной процесс, с помощью которого хлорофилл «захватывает» энергию солнечного света. Таким образом, хлорофилл является светопоглощающим пигментом, и фактически обретает свой зеленый цвет, потому что поглощает синие и красные длины волн света. Зеленые длины волн отражаются, давая неповторимый цвет растениям. Поскольку это светопоглощающий пигмент хлорофилл называют фоторецептором. Есть несколько видов хлорофилла, наиболее важным из которых является хлорофилл α - молекула, которая делает

возможным фотосинтез. Все растения, водоросли, цианобактерии содержат хлорофилл *α*. Второй вид хлорофилла - хлорофилл *b*, который содержится в зеленых водорослях и в растениях. Обычно на три части хлорофилла *a* приходится одна часть хлорофилла *b*. Суммарное содержание хлорофилла варьирует у разных видов, причем разница может достигать двух - трех раз. Изменения в количестве хлорофилла *α* и *b* прослеживается даже у одного и того же растения. Например, в листьях, подвергнутых действию водного стресса, хлорофилл *α* разрушается быстрее хлорофилла *b*. Полагают, что основная функциональная роль в фотосинтезе из этих двух форм принадлежит хлорофиллу *α*. Роль хлорофилла *b*, как и каротиноидов ограничивается защитной функцией и вспомогательной ролью (для передачи захваченной энергии на хлорофилл *α*). Многочисленными исследованиями доказана важная роль концентрации фотосинтетических пигментов в формировании урожая и накоплении биоэнергии растений в агроэкосистемах. Она, очевидно, имеет еще большее значение для экосистем, где растения постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных почвенно-климатических условий и антропогенному прессингу [35,122,123].

На образование и накопление хлорофилла в растениях большое влияние, помимо генетических факторов, оказывают условия жизни растений, среди которых существенная роль принадлежит условиям почвенного питания [69]. Антропогенное загрязнение окружающей среды оказывает негативное воздействие на растения, поскольку поллютанты часто выступают в роли ингибиторов основного процесса жизнедеятельности растений – фотосинтеза, снижая содержание хлорофилла и каротиноидов, вызывая сдвиги в структуре мембран хлоропластов. Исследования последних лет свидетельствуют, что ингибирующее действие ТМ на фотосинтетические функции растений обусловлено их взаимодействием с компонентами фотосистемы II. Ряд экспериментальных данных подтверждает, что ионы ТМ способны модифицировать состояние кислородвыделяющего комплекса фотосистемы II на внутренней стороне тилакоидной мембраны, либо взаимодействовать со

звеньями цепи транспорта электронов фотосистемы II, расположенными на внешней поверхности мембраны [96].

Воздействие УФ-облучения в зависимости от дозы приводит к снижению уровня хлорофилла. При этом увеличение скорости деградационных процессов, происходит вследствие того, что под влиянием стресс - факторов активность хлорофиллазы возрастает, что приводит к распаду хлорофилла [38].

С ростом растений отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* уменьшается. Когда новообразование хлорофилла ослабевает, а переход хлорофилла *a* в хлорофилл *b* хотя, по-видимому, более медленно, но совершается, увеличивается количество хлорофилла *b*. Отношение *a:b* снижается, однако и в этот период микроэлементы способствуют сохранению более высокого уровня хлорофилла *a* [69].

Приведенные сведения показывают, что под влиянием загрязнения количество биологически/физиологически активных веществ в растениях изменяется, что может служить индикатором экологической чистоты, гарантией качества и безопасности сырья.

1.5. Показатели экологической чистоты лекарственного растительного сырья

Разработка научно-обоснованных отечественных нормативов оценки качества и безопасности ЛРС и ЛРП, повышение уровня требований к их качеству с точки зрения оценки содержания чужеродных токсичных и потенциально опасных веществ является чрезвычайно важной задачей, поскольку это связано с применением в разных формах человеком и животными.

Анализ нормативной базы РФ, стран Евросоюза, СНГ, США, Японии и Китая показывает значительные принципиальные различия в подходах к нормированию содержания ксенобиотиков, в принципах их оценки, количестве объектов и единицах нормирования, терминологии и, что наиболее важно в пределах их допустимого содержания. Нормируемые в России и за рубежом показатели качества представлены в таблице 1. Установлено, что общим

обязательным требованием является определение и нормирование 4-х основных потенциально токсичных элементов: *Pb, Cd, Hg, As*, и обязательное определение содержания хлорорганических пестицидов, имеющих длительное остаточное действие [23, 77].

Таблица 1

Нормируемые показатели качества и безопасности ЛРС, ЛРП, БАД

Нормативные документы (название, номер статьи)	Принцип / Метод /Пределы допустимого содержания
1	2
«Зола общая» ГФ СССР VIII - по н. время ГФ XIII	Гравиметрический. Показатель включен в монографии на ЛРС
в 2003г. ОФС 42-0011-03 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье» В ГФ XIII ОФС 1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Определение удельной активности стронция-90 и цезия-137. Определяется удельная активность Cs-137 не более 400 Бк/кг, Sr-90 не более 200 Бк/кг
впервые в ГФ XIII ОФС 1.5.3.0011.15«Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Хроматографический и масс-спектрометрический методы. Регламентируют содержание 65 веществ
«Определение содержания тяжелых металлов в ЛРС» проект ОФС для ГФ РФ XII впервые в ГФ XIII ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Индивидуальное определение Pb, Cd, Hg. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Пределы, мг/кг: Pb – 6,0; Cd – 1,0; Hg – 0,1 Атомно-абсорбционная, атомно-абсорбционная спектроскопия, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Пределы, мг/кг: Pb – 6,0; Cd – 1,0; Hg – 0,1; As – 0,5
Европейская фармакопея «Herbal drugs» 2.4.27 «Heavy metals in herbal drugs and fatty oils»	Индивидуальное определение металлов. атомно-абсорбционная спектроскопия: метод I (Cd, Fe, Cu, Pb, Ni, Zn), метод II (As, Hg). Пределы в общей статье не указаны (в частной статье KELP, Fucus vel ascopullum: Pb - не более 5 ppm, Cd - 4 ppm, Hg - 0б1 ppm)

1	2
СанПин 2.3.2 1078-01 от 14.11.2001/22.03.02 Биологически активные добавки к пище Раздел 1.10, Пункт 1.10.7	Индивидуальное определение Pb, Cd, Hg, As. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Пределы, мг/кг: Pb – 6,0; Cd – 1,04; Hg – 0,1; As – 0,5
Фармакопея США 30, НФ 25 «Dietary supplements», 231 «Heavy metals»	Суммарное полуколичественное определение Pb, Hg, Bi, As, Sb, Zn, Cd, Ag, Cu, Mo Метод: определение с тиоацетамидным реактивом «Heavy metals» в сравнении с эталонным раствором. Пределы указаны в частных статьях (10 - 50% /10 - 50 мг/кг)
Фармакопея Китая	Индивидуальное определение металлов. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Пределы, мг/кг: Pb – не более 5; Cd – 0,3; Hg – 0,2
Фармакопея Японии «General rules for crude drugs» 1.07 «Heavy Metals Limit Test» 1.11 «Arsenic Limit Test»	Суммарное полуколичественное определение металлов (металлы не указаны) Метод: определение с сульфидным реактивом в золе в сравнении с эталонным раствором Пределы: 10-20 ppm (указаны в частных статьях на ЛРС), As (нормы указаны в частных статьях на ЛРС)

Анализируя отечественную нормативную базу, следует заметить, что в РФ оценку экологической чистоты ЛРС ранее проводили только по содержанию золы общей, и лишь в 2003, 2007 и 2015 гг. в нормативную документацию дополнительно были введены три показателя - «содержание радионуклидов», «тяжелых металлов», «содержание остаточных пестицидов». Как следует из представленных в таблице 1 данных, предлагаемые для определения данных показателей методы предполагают использование специализированного дорогостоящего оборудования и сложной пробоподготовки. В связи с чем разработка новых методов / способов

диагностики техногенного загрязнения, определения качества и безопасности ЛРС является актуальной задачей.

***

Таким образом, представленные в настоящем обзоре сведения показывают, что в Томском районе имеются объективные предпосылки для успешного развития сферы заготовки и переработки растительного сырья. Этому способствуют значительные запасы природных ресурсов на территории региона, комплексные программы поддержки отрасли на областном уровне, низкая занятость населения сельской местности, возрастающий спрос на экологически чистое сырье.

Однако наряду с очевидными перспективами, имеется и ряд опасений, связанных с проблемой заготовки и выращивания экологически чистого сырья, вследствие воздействия на окружающую среду около 400 действующих предприятий разных отраслей промышленности и транспорта. При этом данные литературы свидетельствуют о том, что в условиях техногенного загрязнения в растениях возникают трансформации на анатомическом, морфологическом уровнях, изменения в качественном составе, количественном содержании отдельных групп БАВ.

Для решения данных вопросов необходимо провести оценку качества ЛРС, произрастающего на территории региона, установить экологическую безопасность сырья, определить содержание тяжелых металлов, радионуклидов, и их воздействие на растения, актуализировать нормативную документацию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами данного исследования являлись надземные части дикорастущих растений, собранные в различных местах Томского района Томской области в течение вегетационного периода (с мая по октябрь) 2013-2017 гг. При заготовке сырья выбирали участки с близкими условиями затененности / освещенности, увлажненности, сбор проводили в одно и то же время суток. Характеристика образцов представлена в таблице 2.

Места сбора сырья были разделены на группы:

− деревни, поселки, села (смешанный, хвойный лес): д. Кисловка, с.Тимирязево, д. Наумовка, п. Степановка, д. Коларово, д. Аникино, п.Зональная станция, п. Заварзино;

− фоновые (смешанный, хвойный лес): д. Калтай [1,25, 87,116,150,152,155,156].

В связи с тем, что самозанятым населением сбор сырья прозводится на территории некоторых пригородных и городских парков, лесопарков и зон отдыха, нами были заготовлены образцы из наиболее популярных мест заготовки − парки, зоны отдыха: лесопарковая зона Лагерного сада, набережная р. Томь, парковая зона Буфф-сада, парковая зона Новособорной площади, питомник СибГМУ (лаборатория по выращиванию лекарственных растений).

Для изучения влияния различных загрязнителей на анатомические, морфологические признаки, содержание биологически активных веществ, дополнительно были отобраны образцы из мест с повышенной техногенной нагрузкой:

− улицы города: 4-ая поликлиника, Иркутский тракт 37а, аллея на пр.Кирова, перекресток улиц Фрунзе – Шевченко;

− СЗЗ предприятий: ООО «Томскнефтехим», СХК-10, СХК-1, СХК-15, СХК-25;

– дорожные магистрали: пр.Комсомольский, дорожная развязка на г.Северск и ООО «Томскнефтехим», с. Тимирязево, улица Ново-Трактовая, заправка «Газпромнефть».

Таблица 2

Характеристика объектов исследования

Вид	Место сбора	Дата сбора
Plantago major L.	***СЗЗ предприятий***	
	г.Томск, СЗЗ ООО «Томскнефтехим»	15.09.13
	г. Северск, завод разделения изотопов (СХК-1)	25.07.14
	г. Северск, СХК – 10	15.09.13; 27.06.14; 18.07.15; 25.06.17
	г. Северск, СХК – 15	01.08.14
	Улицы города	
	г.Томск, проспект Комсомольский	01.09.13
	г. Томск, Иркутский тракт 37 а	07.07.14
	г. Томск, аллея на пр. Кирова (в пересечении с ул. Вершинина)	24.07.14
	г. Томск, 4-я поликлиника, пр. Комсомольский – Пушкина 16.08.14	
	Дорожные магистрали	
	г. Томск, дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим»	30.07.14; 19.05.15; 01.06.15; 14.06.15 27.06.15; 10.07.15; 27.07.15; 05.08.15; 23.08.15; 06.09.15; 20.09.15; 19.05.16; 01.06.16; 16.06.16; 01.07.16; 14.07.16; 01.08.16; 16.08.16; 01.09.16; 18.09.16; 05.10.16
	Деревни, поселки, села	
	д. Наумовка, смешанный лес	27.07.14 28.08.14; 23.06.17
	д. Кисловка, смешанный лес	27.07.14
	п. Степановка, смешанный лес	27.07.14
	д. Кисловка, смешанный лес, около ЛЭП	27.07.14
	с.Тимирязево, смешанный лес	07.07.14; 04.06.15; 18.06.15; 26.06.15; 02.07.15; 10.07.15; 27.07.15; 20.08.15; 03.09.15; 18.09.15;

		01.06.16; 17.06.16; 29.06.16; 14.07.16; 02.08.16; 16.08.16; 07.09.16; 18.09.16; 05.10.16
	д. Аникино, смешанный лес	20.07.14; 16.05.14 01.06.15; 14.06.15; 28.06.15; 13.07.15; 25.06.17
	п.Зональная станция, смешанный лес	4.07.14
	Фоновый район	
	д. Калтай, смешанный лес	27.07.13; 27.07.14; 18.06.15; 02.07.15; 19.07.15; 05.08.15; 23.08.15; 06.09.15; 20.09.15; 01.06.16; 16.06.16; 01.07.16; 14.07.16 31.07.16; 17.08.16; 30.08.16; 18.09.16; 03.10.16; 26.06.17
	Парки, зоны отдыха	
	г. Томск, питомник СибГМУ	18.07.14; 28.07.14 15.10.14
	г. Томск, парковая зона Буфф-сада	20.07.14
	г. Томск, парковая зона Новособорной площади	23.07.14
Tussilago farfara L.	***Улицы города***	
	г. Томск, пр. Комсомольский	01.09.13
	г. Томск, 4-я поликлиника, пр. Комсомольский – ул. Пушкина	15.08.14
	г. Томск, Иркутский тракт, 37 А	07.07.14
	СЗЗ предприятий	
	г. Северск, СХК-1	22.07.14; 25.06.17
	Парки, зоны отдыха	
	г. Томск, Питомник СибГМУ	28.08.14
	Деревни, поселки, села	
	д. Наумовка, смешанный лес	14.07.14, 28.08.14; 28.06.17
	п.Степановка, смешанный лес	27.07.14
	п.Зональная станция, смешанный лес	04.07.14
	д. Аникино, смешанный лес	30.08.14; 25.06.17

Sorbus sibirica L.	***СЗЗ предприятий***	
	г. Северск, СХК – 25	24.08.14; 30.08.17..
	Дорожные магистрали	
	г. Томск, дорожная развязка на г. Северск и ООО Нефтехим	06.09.15
	Улицы города	
	г.Томск, проспект Комсомольский	09.15
	г. Томск, Иркутский тракт, 37 А	21.09.14
	г.Томск, перекресток улиц Фрунзе и Шевченко	15.09.14; 20.09.14; 14.09.15
	г.Томск, аллея на пр. Кирова (в пересечении с ул. Киевской)	12.09.14
	Парки, зоны отдыха	
	г. Томск, парковая зона Новособорной площади	14.09.14; 20.09.14
	г. Томск, Питомник СибГМУ	12.09.14; 10.09.15; 14.09.15
	г.Томск, парковая зона Лагерного сада	18.09.14
	г. Томск, парковая зона Новособорной площади	20.09.14
	г.Томск, Набережная реки Томь, администрация Белого дома	15.09.14; 20.09.14
	Деревни, поселки, села	
	с.Тимирязево, смешанный лес	01.09.14; 03.09.15; 06.09.17
	д. Аникино, смешанный лес	05.09.14; 03.09.17
	п. Заварзино, смешанный лес	09.14
	д. Наумовка, смешанный лес	06.09.15
	Фоновый район	
	д. Калтай, смешанный лес	04.09.14; 06.09.15; 03.09.17
Pinus sylvestris L.	***Парки, зоны отдыха***	
	г.Томск, лесопарковая зона Лагерного сада	12.05.15; 02.06.15; 01.06.17
	г. Томск, набережная р. Томь, рядом с администрацией Томской области	20.05.14; 19.05.15; 12.05.16; 18.05.17
	Улицы города	
	г. Томск, Иркутский тракт,37 А	13.05.14; 24.05.15; 12.05.16; 11.05.17
	Дорожные магистрали	
	г. Томск, дорожная развязка на г. Северск и ООО Нефтехим	13.05.14; 19.05.15; 21.05.16; 17.05.17
	Томский район, с. Тимирязево, заправка	20.05.14; 19.05.15;

	«Газпромнефть»	15.05.16; 20.05.17
	СЗЗ предприятий	
	г. Томск, СЗЗ ООО «Томскнефтехим»	13.05.14; 19.05.15; 21.05.16; 17.05.17
	г. Северск, СХК- 15	30.05.14; 19.05.17
	г. Северск, СХК- 25	30.05.14; 19.05.17
	Фоновый район	
	д. Калтай, хвойный лес	18.05.14; 25.05.16; 22.05.17
	Деревни, поселки, села	
	с.Тимирязево, хвойный лес	20.05.14; 19.05.15; 15.05.16
	д. Коларово, хвойный лес	16.05.14; 21.05.15; 21.05.16; 20.05.17
	п. Заварзино, хвойный лес	19.05.15; 15.05.16; 18.05.17
	п.Зональная станция, хвойный лес	22.05.15; 16.05.16; 19.05.17

2.2. Методики морфологического и анатомического исследования

Морфологические (внешние) признаки сырья изучали при рассматривании под лупой (2х;10х) и в стереоскопический микроскоп МБС-10 (8х;16х;32х).

Для анатомических исследований использовали достоверные образцы надземной части подорожника большого, мать-и-мачехи, плодов рябины обыкновенной, почек сосны. Для изучения анатомической структуры были взяты листья, плоды и почки, которые исследовали, используя световой микроскоп. Приготовление и просветление препаратов проводили в соответствии со статьями «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», частных фармакопейных статей ГФ XIII издания [157]. Всего было изготовлено 420 препаратов. Готовые препараты изучали под микроскопом Carl Ziess (увеличения 7х1,5х4,5; 7х1,5х8; 7х1,5х20; 7х1,5х40), цифрового фотоаппарата «Olympus Camedia» digital compact camera C-4000 zoom. Фотографии обрабатывали в программе «Adobe Photoshop CS».

Подсчет количества клеток, устьиц, трихом их размеров проводили в 30-кратной повторности с подсчетом средней величины.

2.3. Методики химического исследования

В работе были использованы вещества известного состава (стандартные вещества) производства Sigma, Aldrich, Sigma-Aldrich, USP, Supelco: *ferulic acid* феруловая кислота – № Y0001013 (Sigma-Aldrich); *caffeic acid* кофейная кислота - № C0625 (Sigma); *chlorogenic acid* хлорогеновая кислота - № Y0000569 (Sigma-Aldrich); *D-(+)-glucose* глюкоза - № 47829 (Supelco); *3,4-dihydroxybenzoic acid* протокатеховая кислота - № 08992 (Aldrich); *aucubin* аукубин - № 55561 (Sigma-Aldrich); *cyanidin 3-O-glucoside chloride* цианидин-3-О-глюкозид - № 1151935 (USP); *chlorophyll a* хлорофилл - № 96145 (Sigma-Aldrich), предоставленные аккредитованной лабораторией контроля качества ООО «Артлайф» и физико-химической лабораторией ООО «Биолит».

При реализации методик химического исследования были использованы растворы стандартных образцов: кофейной кислоты, приготовленного по методике [168]; хлорогеновой кислоты [97, 159]; цианидин-3-О-глюкозид [51, 68, 158]; аукубина [40]; глюкозы [93].

Раствор СО феруловой кислоты: т.н. 0,002 г помещали в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляли 15-20 мл 95% -ного этилового спирта, при необходимости нагревали на водяной бане до полного растворения. После чего доводили объем колбы до метки 95% -ным этиловым спиртом.

Раствор СО протокатеховой кислоты: т.н. 0,002 г растворяли в мерной колбе объемом 10 мл в 10 мл 95% -ного этилового спирта.

Срок годности растворов феруловой и протокатеховой кислоты 3 месяца.

Раствор СО хлорофилла: т.н. 0,001 г помещали в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляли 95% -ный этиловый спирт, доводя объем в колбе до метки. Раствор использовали свежеприготовленным.

<u>Полисахариды</u> [32,72,89,157]. *Содержание суммы водорастворимых полисахаридов* определяли гравиметрическим методом. Для этого аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь

сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10 г (т.н.) сырья помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяли еще четыре раза по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водное извлечение центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантировали в мерную колбу вместимостью 500 мл через пять слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм, предварительно смоченную водой. Фильтр промывали водой очищенной и доводили объем раствора до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещали в центрифужную пробирку, прибавляли 75 мл 95%-ного этилового спирта, перемешивали, подогревали на водяной бане при температуре 60ºС в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПА через высушенный до постоянной массы при 105ºС стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносили на тот же фильтр и промывали 15 мл смеси 95%-ного этилового спирта и воды (3:1).

Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, затем при температуре 100-105ºС до постоянной массы. Содержание суммы водорастворимых полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (Х) вычисляли по формуле:

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

m_1 − масса фильтра, г;

m_2 − масса фильтра с осадком, г;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Для более детального изучения полисахаридного комплекса определяли сумму полисахаридов по фракциям.

Для этого остаток сбора после определения суммы полисахаридов обрабатывали экстрагентом (100 мл кипящей очищенной воды с 0,4 мл концентрированной хлористоводородной кислоты) на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Раствор фильтровали и охлаждали. Пектиновые вещества осаждали двукратным объемом этанола. Через 12 часов осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывали 95%-ным этиловым спиртом. Осадок подсушивали и доводили до постоянной массы (пектиновые вещества – ПВ).

Содержание пектиновых веществ в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса осадка водорастворимых полисахаридов, г;

m_2 – масса осадка пектиновых веществ, г;

W – потеря в массе при высушивании сбора, %.

Остаток сбора экстрагировали 100 мл 10% водного раствора щелочи при температуре 20ºС в течение 24 часов на встряхивающем аппарате. После этого профильтровали и к полученному извлечению добавляли 40 мл 50% кислоты уксусной для осаждения гемицеллюлозы А (Гц А). В фильтрате двукратным объемом 95%-ного этилового спирта осаждали гемицеллюлозу В (Гц В). Осадок подсушивали при температуре 90ºС и доводили до постоянной массы.

Содержание гемицеллюлозы А в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса осадка водорастворимых полисахаридов;

m_2 – масса осадка гемицеллюлозы А, г;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), %.

Содержание гемицеллюлозы В в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса осадка водорастворимых полисахаридов;

m_2 – масса осадка гемицеллюлозы В, г;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), %.

Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров определяли в пересчете на глюкозу спектрофотометрическим методом [157].

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 2,0 г (т.н.) сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл воды и 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживают через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды. Марлю с остатками сырья помещают в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяют еще один раз указанным выше способом. Полученное извлечение процеживают через пять слоев марли в ту же мерную колбу, марлю промывают, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают (р-р А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мл р-ра А, прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с pH 4,0-4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (р-р Б), отбрасывая первые 10-15 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 % и 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5 мл р-ра Б и колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем мерную колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (испытуемый р-р В).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 7,5 мл натрия карбоната раствора 20 %и 5

мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл. Мерную колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, после чего охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 10мм.

Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{\grave{A} \times 100 \times 50 \times 100 \times 100}{E_{1\tilde{n}\grave{i}}^{1\%} \times \grave{a} \times 10 \times 5 \times (100 - \mathrm{W})}$$, где

A – оптическая плотность испытуемого раствора В;

a – навеска сырья, г;

$E_{1\tilde{n}\grave{i}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса СО глюкозы с пикриновой кислотой при 470 нм, равный 273,24.

W – влажность сырья, %;

Эфирное масло. Для количественного определения содержания *эфирного масла* использовали метод перегонки с водяным паром из растительного сырья по методу 2 ГФ XIII [157].

Исследование компонентного состава эфирного масла проводили методом хромато-масс-спектрометрии с использованием газового хроматографа Agilent 6890 с квадрупольным масс-спектрометром (HP MSD 5973N). Условия хроматографирования: 30-метровая кварцевая колонка HP-5MS с внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки – 0,25 μм (сополимер 5%, дифенил 95% диметилсилоксан), газ-носитель – гелий (постоянный поток – 1 мл/мин), температура колонки - 500С (изотерма 2мин), 50-2000С (40С в мин), 200-2800С (200С/мин), 2800С (изотерма 5мин), температура испарителя – 2800С, источника ионов - 1700С, интерфейса между газовым хроматографом и масс-селективным детектором 2800С. Энергия ионизирующих электронв 70эВ. Объем вводимой пробы 1 мкл с разделением потока 60:1. Количественное содержание масла вычисляли по площадям пиков на хроматограмме без

использования корректирующих коэффициентов. Компонентный состав определяли путем сравнении времен и индексов удерживания, значений масс-спектров, базы данных библиотеки хромато-масс-спектрометрических данных летучих веществ растительного происхождения [100].

Антоцианы. Количественное определение проводили спектрофотометрическим методом [51]. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0.3 г (т.н.) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 95 % этанола, содержащего 1 % кислоты хлористоводородной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и экстракт фильтруют в мерную колбу вместимостью 25 мл. Фильтр с остатками сырья помещают в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяют еще 1 раз указанным выше способом; фильтр промывают 2 мл 95% этанола, содержащего 1% кислоты хлористоводородной и доводят объем извлечения 95% этанолом, содержащим 1% кислоты хлористоводородной до метки (р- А).

3 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем 95% этанолом, содержащим 1% кислоты хлористоводородной до метки (раствор Б – испытуемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм. В качестве раствора сравнения используют 95 % этанол, содержащий 1% кислоты хлористоводородной.

Содержание суммы антоцианов в сырье в пересчёте на цианидин хлорид и абсолютно сухое сырьё в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$x = \frac{D * V_1 * V_3 * 100}{m * V_2 * E * (100 - W)}, \text{где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, в граммах;

V_1 – объём раствора, в миллилитрах;

V_2 – аликвота раствора А, в миллилитрах;

V_3 – объем раствора Б, в миллилитрах;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах;

$E_{1\tilde{n}\grave{i}}^{1\%}$ – 100 –удельный показатель поглощения цианидин хлорида при длине волны 546 нм.

Хлорофилл. Количественное определение хлорофилла проводили по следующей методике. Около 0,5 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 95%, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре СФ-2000 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длинах волн 440 нм (хлорофилл α), 649 нм (хлорофилл β) и 665 нм (каротиноиды). Концентрацию пигментов рассчитывали по формулам Vernon (1960) и Wettstein (1957) для хлорофиллов и каротиноидов соответсвенно [112].

Спектральные методы анализа. Для снятия УФ - спектров поглощения готовили $1x10^{-3}$-$2x10^{-3}$% растворы в абсолютном этаноле. Электронные спектры в УФ и видимой областях снимали на приборе СФ-2000 в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Определение влажности, золы общей и нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, содержания посторонних примесей, измельченности сырья вели по общепринятым методикам, изложенным в ГФ XIII издания [157].

Определение химических элементов в золе растительных образцов и почве проводили двумя методами: рентгено–флуоресцентным и нейтронно-активационным [59, 84, 99].

2.4. Статистическая обработка

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятым методом с определением средней арифметической (М) и ошибки средней арифметической (м). Достоверность результатов оценивали параметрически по t-критерию Стьюдента и критерия инверсий Мана-Уитни. Кроме того, использовали пакет статистических программ «Statistica for Windows 7,0» [157].

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Как уже было отмечено ранее, в настоящее время значительная часть зарослей лекарственных растений расположена в зоне ведения активной хозяйственной деятельности человека. В связи с чем экосистемы, и лекарственные растения как ее составные части, испытывают ту или иную степень воздействия различными группами ксенобиотиков. Большинство загрязняющих веществ обладают синергизмом, т.е. взаимным потенцирующим действием. Попадая в живой организм, в зависимости от дозы, они могут нарушать процессы биосинтеза, обмена веществ, вызывать изменения анатомических, морфологических и других признаков, приводить к снижению продуктивности, нарушению естественно сложившихся фитоценозов, снижению иммунитета и развитию заболеваний различного генеза и тяжести. Это в свою очередь определяет необходимость и важность оценки качества лекарственного растительного сырья по фармакопейным показателям, включающим в настоящее время показатели экологической чистоты и безопасности (зола общая, минеральная примесь, ТМ, радионуклиды).

Поэтому на первом этапе нами была проведена оценка чистоты ЛРС по содержанию минеральных примесей, золы общей, содержанию тяжелых металлов и радионуклидов.

3.1. Определение золы общей и минеральной примеси

Зола общая – показатель качества, отражающий уровень содержания суммы минеральных веществ, содержащихся в растении, а также минеральных примесей в виде земли, песка, камней, пыли. Числовые значения показателей «зола общая» и «минеральная примесь» зависят от места произрастания видов, фазы вегетации, наличия и выраженности опушенности растений, заготавливаемой части растения, качества и условий заготовки, первичной обработки и сушки сырья, а также уровня техногенной нагрузки в месте произрастания видов.

При оценке качества исследованных образцов руководствовались нормативами, указанными в соответствующих разделах фармакопейных статей на ЛРС ГФ XIII и XI изданий. Так, согласно нормативным документам, показатель «зола общая» в листьях подорожника и мать-и-мачехи не должен превышать 20%, плодах рябины - 5%, почках сосны - 2%, а содержание «минеральной примеси» не должно превышать 1% в листьях подорожника, мать-и-мачехи и плодах рябины, и 0,5% в почках сосны соответственно [25-27, 157].

Полученные результаты, представленные как среднее из трех определений в таблице 3 показали, что требованиям фармакопейных статей по содержанию золы общей и минеральной примеси соответствуют:

- 8 из 12 образцов почек сосны (66,6% от общего количества образцов);
- 4 из 11 образцов плодов рябины обыкновенной (36,36%);
- 5 из 6 образцов листьев мать-и-мачехи (83,3%);
- 51 из 52 образцов листьев подорожника (98,07%).

Таблица 3

Результаты определения содержания золы общей и минеральной примеси

№	Место сбора	Содержание в %	
		Зола общая	Минер-я примесь
1	2	3	4
Листья подорожника большого *ОФС 2.5.32 Г XIII*		*не более 20%*	*не более 1%*
Деревни, поселки, села			
10	Томский район, д. Наумовка 27.07.2014	14,00	0,99
11	Томский район, д. Наумовка 28.08.2014	14,51	0,83
12	Томский район, д. Кисловка, смешанный лес 27.07.2014	14,39	0,72
13	Томский район, д. Кисловка 20 м от ЛЭП 27.07.2014	14,09	0,78
Парки, зоны отдыха			
14	г. Томск, питомник СибГМУ 18.07.2014	17,99	0,69
15	г. Томск, питомник СибГМУ 28.07.2014	18,85	0,82
16	г. Томск, питомник СибГМУ 15.10.2014	**34,73**	**2,34**
Деревни, поселки, села			
17	Томский район, п.Зональная станция 04.07.2014	13,74	0,29
18	Томский район, п. Степановка, смешанный лес 27.07.2014	14,71	0,37

1	2	3	4
Парки, зоны отдыха			
19	г. Томск, парковая зона Буфф- сада 20.07.2014	17,68	0,69
20	г. Томск, парковая зона Новособорной площади 23.07.2014	17,12	0,62
Деревни, поселки, села			
Томский район, д. Аникино смешанный лес			
42	20.07.2014	14,11	0,72
43	01.06. 2015	14,48	0,69
44	14.06. 2015	14.68	0,72
45	28.06. 2015	14,37	0,47
46	13.07.2015	14,13	0,49
Томский район, с.Тимирязево, смешанный лес			
47	03.07.2014	14,75	0,53
48	04.06.2015	14,14	0,68
49	18.06.2015	12,05	0,19
50	26.06.2015	12,82	0,20
51	02.07.2015	12,85	0,22
52	10.07.2015	11,57	0,17
53	27.07.2015	13,13	0,25
54	20.08.2015	14,13	0,27
55	03.09.2015	14,16	0,49
56	18.09.2015	14,38	0,51
57	01.06.2016	10,08	0,23
58	17.06.2016	13,71	0,26
59	29.06.2016	13,21	0,21
60	14.07.2016	14,80	0,28
61	02.08.2016	13,12	0,22
62	16.08.2016	14,64	0,47
63	07.09.2016	14,44	0,49
64	18.09.2016	14,56	0,97
65	05.10.2016	14,97	0,92
Фоновый район			
Томский район, д. Калтай, смешанный лес			
66	27.07.2014	13,46	0,32
67	18.06.2015	12,28	0,19
68	02.07.2015	14,59	0,96
69	19.07.2015	14,89	0,70
70	05.08.2015	14,42	0,67
71	23.08.2015	14,07	0,88
72	06.09.2015	14,32	0,98
73	20.09.2015	14,45	0,99
74	01.06.2016	14,90	0,44

1	2	3	4
75	16.06.2016	14,78	0,51
76	01.07.2016	14,77	0,55
77	14.07.2016	14,77	0,62
78	31.07.2016	14,46	0,76
79	17.08.2016	14,41	0,66
80	30.08.2016	14,92	0,58
81	18.09.2016	13,85	0,59
82	03.10.2016	14,73	0,48
Листья мать-и-мачехи *ОФС 2.5.27 Г XIII* *не более 20% не более 1%*			
Парки, зоны отдыха			
86	г.Томск, питомник СибГМУ 28.07.2014	**22,79**	**1,80**
Деревни, поселки, села			
87	Томский район, д. Наумовка, смешанный лес 14.07.2014	17,69	0,79
88	Томский район, д. Наумовка, смешанный лес 28.09.2014	18,95	0,73
89	Томский район, п.Зональная станция04.07.14	18,54	0,49
90	Томский район, п.Степановка 27.07.2014	15,57	0,62
91	Томский район, д. Аникино 30.08.2014	19,27	0,95
Почки сосны *ОФС 2.5.41 Г XIII не более 2% не более 0,5%*			
Деревни, поселки, села			
92	д. Коларово, хвойный лес 15.05.14	1,74	0,34
93	д. Коларово, хвойный лес 21.05.16	1,53	0,42
94	д. Коларово, хвойный лес 20.05.17	1.37	0,41
Парки, зоны отдыха			
95	г.Томск, лесопарковая зона Лагерного сада 12.05.15	**4,08**	**0,68**
96	г.Томск, лесопарковая зона Лагерного сада 02.06.15	**3,01**	0,47
97	г.Томск, лесопарковая зона Лагерного сада 20.05.17	**2,99**	**0,55**
106	г. Томск, набережная р.Томь, недалеко от здания администрации ТО 2015	**4,04**	**0,62**
107	г. Томск, набережная р.Томь, недалеко от здания администрации ТО 12.05.16	**3,90**	**0,52**
108	г. Томск, набережная р.Томь, недалеко от здания администрации ТО 18.05.17	**3,76**	**0,59**
Фоновый район			
121	Томский район, д. Калтай, хвойный лес 25.05.2016	1,96	0,43
122	Томский район, д. Калтай, хвойный лес 22.05.2017	1,99	0,49
Деревни, поселки, села			
123	с.Тимирязево, хвойный лес	2,00	0,45
Плоды рябины *согласно ФС Г XI* *не более 5% не более 0,2%*			
Парки, зоны отдыха			
125	г. Томск, парковая зона Новособорной площади 20.09.2014	**7,39**	**0,37**

1	2	3	4
127	г. Томск, Питомник СибГМУ 11-12.09.2014	**7,48**	**0,37**
128	г. Томск, Питомник СибГМУ 10.09.2015	4,55	0,18
Деревни, поселки, села			
129	Томский район, д. Аникино, 05.09.2014	**15,96**	**0,69**
130	Томский район, п. Заварзино 09.2014	**13,79**	**0,57**
Парки, зоны отдыха			
131	г.Томск, набережная р. Томь, недалеко от здания администрации ТО 20.09.2014	**8,63**	**0,41**
134	г.Томск, лесопарковая зона Лагерного сада 18.09.2014	4,49	0,16
136	г.Томск, набережная р. Томь, недалеко от здания администрации ТО 15.09.2014	**8,01**	**0,40**
138	г. Томск, парковая зона Новособорной площади 14.09.2014	**5,49**	**0,24**
Фоновый район			
139	Томский район, д. Калтай, смешанный лес 06.09.15	4,32	0,16
Деревни, поселки, села			
141	Томский район, с.Тимирязево, смешанный лес 03.09.2015	4,49	0,19

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - парки и зоны отдыха

Анализируя полученные результаты по видам сырья и местам его заготовки, следует заметить, что полностью соответствовали требованиям образцы представителей нижнего яруса леса - листья подорожника и мать-и-мачехи из фонового района (д.Калтай); деревень, поселков, сел Томского района - д. Коларово, д. Кисловка, д. Наумовка, п. Степановка, д,Аникино, с. Тимирязево, п.Зональная станция; а также некоторых парков и зон отдыха - парковая зона Буфф- сада и Новособорной площади.

Почки сосны, заготовленные в фоновом районе и 2-х населенных пунктах (деревнях, селах и поселках) Томского района, соответствовали требованиям нормативной документации. Превышение допустимых значений содержания «золы общей» и «минеральной примеси» обнаружено в образцах из некоторых парков и зон отдыха, находящихся в городской черте (Лагерный сад, набережная р.Томь).

Плоды рябины из фонового района и села Тимирязево требованиям действующей ГФ соответствовали. Как и в случае с почками сосны

превышение предельных верхнеуровневых значений наблюдали в образцах из некоторых парков и зон отдыха, находящихся в пригородной и городской черте. Неожиданными стали результаты выявленного несоотвествия требованиям НД в плодах рябины из двух населенных пунктов – д. Аникино и п.Заварзино, что учтено в практических рекомендациях по планированию и организации заготовок сырья на территории Томского района.

Следующим этапом исследования стало изучение содержания тяжелых металлов (ТМ).

3.2. Исследование тяжелых металлов

Определение уровней содержания ТМ, радионуклидов и других ксенобиотиков в почве, ЛРС, ЛРП позволяет не только судить о степени загрязненности той или иной территории, но также является современной тенденцией в создании и совершенствовании требований к качеству и безопасности лекарственных средств. Полученная информация может стать основой при разработке предельно допустимых уровней содержания ксенобиотиков в сырье и почве, разработке научно обоснованных рекомендаций по заготовке ЛРС и культивированию ЛР, с учетом меняющейся экологической обстановки и для предотвращения реализации сырья, заготовленного в экологически неблагоприятных регионах.

ТМ подразделяются на те, которые имеют важное значение для многих физиологических процессов, например, *Cu, Zn* и *Fe*, однако их избыток или дефицит может вызвать нежелательные эффекты в клетках растений; и элементы не основные (несущественные) такие как *Pb, Cd, Hg* и *Al*, которые могут быть токсичны даже в относительно низких концентрациях. В отличие от человека растения не могут избегать стрессовых условий, «убегая» с загрязненных территорий. Таким образом, им эволюционно пришлось разработать ряд приспособительных механизмов, которые позволяют им избегать и/или допускать стрессовые факторы и выживать даже в сильно загрязненных почвах и воде [17,58].

Повышенное содержание в почвах *Cd, Pb, As* – элементов, относящихся к I классу опасности (высокоопасные) и *Cu, Cr, Ni, Co* – элементов II класса опасности (умеренно-опасные), является важной составляющей мониторинга урбанизированных территорий и определяет необходимость контроля за их содержанием как в почвах, так и растениях.

Для оценки возможности заготовки сырья листьев подорожника большого, листьев мать-и-мачехи, почек сосны, плодов рябины обыкновенной на территории Томского района было проведено исследование содержания тяжелых металлов (табл.4) нейтронно-активационным и рентгено-флуоресцентным методами анализа.

Сравнение полученных значений проводили с нормами, указанными в СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (для биологически активных добавок к пище на растительной основе), а также требованиями ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ XIII. В соответствии с этими документами нормируется только содержание Pb; Cd; Hg и As, в отличие от зарубежных фармакопей (European Pharmacopoeia, US Pharmacopoeia), которые регламентируют содержание 8-10 тяжелых металлов.

Результаты показали соответствие всех образцов из всех мест сбора требованиям нормативных документов по содержанию *Pb*. Однако, содержание *Cd* и *As* в некоторых образцах плодов рябины, листьев мать-и-мачехи и подорожника значительно превышало допустимые верхнеуровневые показатели, регламентированные действующей ГФ.

Требованиям действущей ГФ соответствовали образцы из фонового района, населенных пунктов Томского района и некоторых парков и зон отдыха, расположенных в городской черте:

- все образцы почек сосны (100%),
- 5 из 11 образцов плодов рябины (45,45%),
- 48 из 52 образцов листьев подорожника (92,3%),

Таблица 4

Содержание тяжелых металлов в ЛРС, мг/кг

№ образца	Pb	Cu	Fe	Zn	Co	Ni	Cr	Mn	Cd	As
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ЛИСТЬЯ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО										
Деревни, поселки, села										
10	0,068	0,16	0,55	56,49	0,11	0,21	0,19	1,68	0,13	<0,50
11	0,08	0,09	0,48	54,93	0,09	0,18	0,18	1,60	0,12	0,33
12	0,10	0,14	0,33	64,24	0,08	0,22	0,23	1,81	0,17	0,47
13	<0,03*	0,034	<0,16*	24,60	<0,03*	0,14	0,17	1,55	0,12	0,45
Парки и зоны отдыха										
14	0,09	0,032	0,23	19,99	<0,03*	0,12	0,33	0,059	0,14	**0,58**
15	0,10	0,73	7,13	14,93	0,08	0,08	0,22	0,05	0,15	**0,76**
16	0,085	0,84	6,46	15,59	0,06	0,09	0,21	0,26	0,16	**0,55**
Деревни, поселки, села										
17	0,098	0,03	0,29	11,26	0,15	0,11	0,25	0,18	0,13	0,40
18	0,088	0,15	0,51	10,81	0,13	0,09	0,19	0,11	0,21	0,47
Парки и зоны отдыха										
19	0,07	0,055	0,41	32,32	0,10	0,07	0,18	0,98	0,31	**0,56**
20	0,082	0,067	2,41	42,49	0,12	0,08	0,23	0,87	0,22	0,43
Деревни, поселки, села										
42	0,11	0,31	0,61	110,80	5,15	0,13	9,02	2,01	0,20	0,47
43	0,08	0,13	0,55	68,46	2,04	0,08	3,29	1,45	0,30	<0,50
44	0,10	0,10	0,44	87,99	1,86	0,05	2,58	1,78	0,25	0,44
45	0,09	0,12	0,57	96,89	2,75	0,07	2,99	1,57	0,17	0,48
46	0,07	0,11	0,67	110,38	2,46	0,08	2,64	1,56	0,13	<0,50
47	0,08	0,14	0,77	146,54	2,19	0,09	3,45	1,96	0,15	0,45
48	0,10	0,09	0,23	344,24	1,08	0,09	3,43	1,81	0,17	0,46
49	0,08	0,08	0,14	505,60	1,09	0,10	4,09	0,99	0,15	0,32
50	0,05	0,12	0,33	396,64	0,78	0,11	3,61	1,06	0,13	<0,50
51	0,09	0,28	0,61	323,92	0,87	0,10	2,99	1,03	0,14	0,43

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
52	0,07	0,22	0,11	446,50	1,02	0,07	2,27	1,34	0,16	0,249
53	<0,15	0,13	0,74	276,78	0,96	0,10	2,54	2,12	0,12	<0,50
54	0,11	0,19	0,14	338,80	1,27	0,088	3,85	1,49	0,14	0,39
55	<0,15*	0,15	<0,15*	245,89	1,15	0,11	2,19	1,11	0,14	0,44
56	0,12	0,23	0,31	452,31	2,50	0,12	8,32	1,36	0,15	<0,50
57	0,15	0,09	0,32	274,49	1,12	0,020	4,42	1,83	0,13	0,33
58	0,12	0,06	0,16	703,7	1,13	0,016	4,05	1,45	0,20	0,35
59	0,09	0,09	0,57	306,51	1,17	0,07	5,75	1,68	0,24	0,41
60	0,08	0,11	0,12	509,9	1,23	0,071	2,42	1,87	0,15	0,39
61	0,10	0,14	0,38	434,32	1,08	0,083	5,41	1,81	0,17	<0,50
62	0,11	0,10	0,28	435,1	2,28	0,082	7,74	1,24	0,14	0,43
63	0,09	0,21	0,37	299,66	1,07	0,09	3,56	1,09	0,12	<0,50
64	0,14	0,18	0,21	402,60	2,08	0,09	4,77	1,38	0,17	0,41
65	0,11	0,17	0,088	303,21	0,95	0,07	0,88	1,34	0,11	<0,50
Фоновый район										
66	<0,15	0,13	0,74	266,44	1,05	0,10	4,52	2,13	0,14	0,33
67	0,012	0,04	0,33	40,24	5,08	0,06	1,93	0,99	0,13	0,49
68	0,013	0,03	0,19	38,60	4,64	0,02	1,19	0,51	0,13	0,33
69	0,047	0,07	0,24	98,01	3,27	0,08	4.47	0,36	0,12	0,49
70	0,025	0,08	0,22	62,64	3,16	0,09	3,32	0,86	0,22	0,28
71	0,049	0,09	0,38	23,49	4,15	0,06	3,12	0,37	0,32	<0,5
72	0,068	0,12	0,35	46,44	3,12	0,10	3,21	0,68	0,25	0,16
73	0,063	0,09	0,52	73,61	2,91	0,11	1,98	0,33	0,16	0,25
74	0,091	0,13	0,33	44,27	2,08	0,06	2,23	0,83	0,13	0,37
75	0,056	0,08	0,24	54,68	2,46	0,09	2,37	0,30	0,15	0,49
76	0,029	0,06	0,28	42,32	2,10	0,09	2,15	0,59	0,17	0,18
77	0,055	0,09	0,31	28,60	2,97	0,08	2,21	0,36	0,16	0,48
78	0,011	0,07	0,33	38,19	0,10	0,09	2,12	0,55	0,15	0,48
79	0,049	0,06	0,35	22,46	2,88	0,07	2,47	0,34	0,13	<0,5
80	0,08	0,09	0,48	40,93	2,79	0,08	2,18	0,61	0,12	0,48
81	0,055	0,05	0,29	57,20	2,31	0,09	3,08	0,75	0,19	<0,5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
82	0,016	0,04	0,31	41,62	2,36	0,07	2,19	0,55	0,28	0,43
ЛИСТЬЯ МАТЬ-МАЧЕХИ										
Парки и зоны отдыха										
86	0,077	0,15	2,89	4,13	0,46	0,12	0,36	0,66	**1,21**	**2,45**
Деревни, поселки, села										
87	0,17	0,07	0,33	2,36	<0,14	0,09	0,31	0,85	0,99	0,48
88	0,19	0,11	<0,14*	4,25	<0,14*	0,26	0,05	0,64	0,31	<0,50
89	0,025	0,087	0,22	2,24	0,19	0,15	0,18	0,68	0,79	0,48
90	0,026	0,054	0,29	2,05	0,23	0,21	0,22	0,77	0,88	<0,50
91	0,022	0,066	0,38	2,78	0,19	0,25	0,21	0,65	0,97	0,44
ПОЧКИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ										
Деревни, поселки, села										
92	0,07	0,25	1,98	3,90	<0,17*	<0,17*	0,023	0,78	0,35	0,47
93	0,05	0,18	1,75	606,44	<0,17*	<0,17*	0,018	0,65	0,47	<0,5
94	0,04	0,20	1,41	3,52	<0,16*	<0,17*	0,03	0,77	0,49	<0,5
Парки и зоны отдыха										
95	0,12	0,36	3,43	10,05	<0,10*	<0,10*	0,21	0,66	0,45	<0,5
96	0,05	0,05	5,61	8,54	<0,04*	<0,04*	0,209	0,83	0,31	<0,5
97	0,18	0,21	34,3	8,09	<0,037	0,005	0,060	0,76	0,67	<0,5
106	0,05	0,19	1,75	923,88	1,19	<0,17*	<0,17*	0,66	0,49	<0,5
107	0,06	0,20	0,228	1132,4	2,94	<0,17*	<0,4	0,69	0,41	0,49
108	0,12	0,26	3,43	710,05	2,01	<0,10*	<0,10*	0,73	0,44	<0,5
Фоновый район										
121	0,08	0,22	0,14	1146,7	4,80	<0,04*	<0,4	0,64	0,74	0,48
122	0,12	0,23	0,18	931,2	4,01	0,005	<0,4	0,65	0,97	0,45
Деревни, поселки, села										
123	0,09	0,19	0,16	1011,3	3,85	0,007	<0,4	0,61	0,53	0,38
ПЛОДЫ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ										
Парки и зоны отдыха										
125	0,04	0,14	0,039	72,02	0,59	0,09	3,18	0,52	**1,76**	**0,85**
127	0,03	0,12	0,035	90,30	0,28	0,17	<0,40	0,63	0,83	<0,5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
128	0,070	0,11	0,043	112,40	0,417	0,19	<0,40	0,81	0,74	<0,5
Деревни, поселки, села										
129	0,04	0,09	0,044	76,64	0,69	0,20	2,18	0,64	0,64	0,34
130	0,039	0,08	0,029	52,44	0,51	0,18	3,23	0,60	0,37	0,48
131	0,028	0,12	0,081	130,90	0,302	0,20	<0,40	0,79	**1,34**	**1,14**
134	0,042	0,08	0,094	63,62	0,89	0,09	2,18	0,53	0,36	<0,5
136	0,06	0,087	0,09	71,77	0,96	0,11	2,16	0,66	**1,43**	**0,98**
138	0,04	0,11	0,053	74,80	0,37	0,12	<0,40	0,64	**1,65**	**0,51**
Фоновый район										
139	0,05	0,050	0,033	89,50	0,51	0,16	0,06	0,69	0,74	0,43
Деревни, поселки, села										
141	0,05	0,09	0,090	182,20	0,79	0,17	2,44	0,60	0,33	<0,50
СанПиН 2.3.2.1078-01	6,0	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,5
ГФ XIII	6,0	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,5

- 4 из 6 образцов листьев мать-и-мачехи (66,6%).

Анализируя полученные результаты нами отмечено превышение действующих показателей по содержанию ТМ в тех же образцах, в которых было установлено превышение по содержанию «золы общей» и «минеральной примеси» (образцы из некоторых парков и зон отдыха, находящихся в пригородной и городской черте).

3.3. Определение радиоактивных нуклидов

Как уже было отмечено в обзоре литературы на территории Томской области располагается одно из крупнейших в России предприятие ядерно-топливного цикла - АО «Сибирский химический комбинат» государственной корпорации по атомной энергии «Росатом» по производству оружейного плутония. Радиационную обстановку в области формировали и формируют на протяжении длительного периода времени следующие факторы:

- выпадение радиоактивных нуклидов из атмосферы, в результате проводившихся ранее ядерных испытаний на полигонах;

- эксплуатация нескольких заводов АО «Сибирский химический комбинат» и 50 хранилищ радиоактивных отходов, в том числе известные случаи аварий на данном производстве.

С момента запуска Сибирского химического комбината в 1953 году и по настоящее время в 30-ти километровой зоне влияния АО «СХК» располагаются около 80-ти населённых пунктов, в том числе г. Томск и г.Северск и проживают почти 700 000 человек.

Наиболее опасными радионуклидами для живых организмов являются стронций-90, цезий-137, имеющие высокую энергию излучения и большой период полураспада 28,79 и 30,167 лет соответственно. Таким образом, эти и другие радиоактивные нуклиды, накапливаясь в значительных количествах в литосфере, гидросфере, растениях, имеющих пищевую и лекарственную ценность, могут представлять существенную опасность для живых организмов [71].

В связи с вышеизложенным нами была проведена оценка содержания радиоактивных нуклидов в образцах сырья, заготовленных в разные годы на территории Томской области. Исследования проводили на *β-γ*-спектрометрическом комплексе «Прогресс БГ» [10], с использованием программного обеспечения «Прогресс» в лаборатории радиоэкологического мониторинга ФГУП «Горно-химический комбинат» государственной корпорации по атомной энергии «Росатом» в г. Железногорске Красноярского края. Значения минимальной детектируемой активности (МДА) для данного комплекса при измерении удельной объемной активности радионуклидов (геометрия Маринелли): Cs-137 10 Бк/кг; К-40 100 Бк/кг; Ra-226 18 Бк/кг; Th-232 16 Бк/кг. Полученные результаты сравнивали с требованиями, изложенными в ОФС 1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов». Подготовку проб проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Полученные результаты минимальной детектируемой активности (МДА) в Бк/кг приведены в таблице 5.

Радионуклиды, обнаруженные в ЛРС, относятся как естественным (К-40, Th-232, Ra-226), так и искусственным (Cs-137, Co-60). При этом как следует из представленных в таблице 5 данных, уровни естественных радионуклидов не превышают пределов фоновых значений данных элементов в земной коре (К-40 – 40-1000 Бк/кг; Th-232– 40 Бк/кг; Ra -226 – 40 Бк/кг). Что касается содержания Cs-137, то следует отметить, что в исследуемых образцах превышения уровня этого элемента обнаружено не было, хотя полученные значения находятся в пограничной зоне допустимого уровня 400 Бк/кг. Сравнивая результаты оценки содержания радионуклидов в ЛРС, полученные в нашем исследовании и исследовании, выполненном в 1993 году на кафедре фармакогнозии СибГМУ, можно констатировать факт улучшения радиационной обстановки в регионе, что может являться следствием прекращения выработки и переработки облученного уранового сырья,

остановки ядерных реакторов в 1990-1992, 2008 году, консервации хранилищ, введения на производстве системы экологического менеджмента.

Таблица 5

Содержание гамма-активных нуклидов в лекарственном растительном сырье

нуклид	Наименование вида	Место заготовки	МДА		
			1993*	2014	2017
Co-60	Листья подорожника большого	д. Аникино, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		с.Тимирязево, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Калтай, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Наумовка, смешанный лес	102	н/о	н/о
		СХК-10	172,0	19,09	н/о
	Листья мать-и-мачехи	д. Аникино, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Наумовка	212,1	н/о	н/о
		СХК-1	263,3	18,3	н/о
	Почки сосны	с.Тимирязево, хвойный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Калтай, хвойный лес	н/о	н/о	н/о
		СХК-15	143,7	7,48	н/о
		СХК-25	159,5	6,83	н/о
	Плоды рябины	д. Аникино, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		с.Тимирязево, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Калтай, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		СХК-25	132,78	11,24	н/о
Cs-137	Листья подорожника большого	д. Аникино, смешанный лес	1,74	1,21	0,94
		с.Тимирязево, смешанный лес	1,63	0,94	0,37
		д.Калтай, смешанный лес	0,84	0,38	0,21
		д.Наумовка смешанный лес	310,52	237,5	216,26
		СХК-10	**433,02**	399,42	396,63
	Листья мать-и-мачехи	д. Аникино, смешанный лес	1,53	1,21	0,94
		д.Наумовка смешанный лес	**418,59**	384,54	376,76
		СХК-1	**427,05**	394,36	389,32
	Почки сосны	с.Тимирязево, хвойный лес	1,56	0,76	0,35
		д.Калтай, хвойный лес	0,99	0,63	0,24
		СХК-15	**410,35**	398,6	389,72
		СХК-25	**413,40**	392,73	394,65
	Плоды рябины	д. Аникино, смешанный лес	1,74	1,21	0,94
		с.Тимирязево, смешанный лес	1,63	1,09	0,35
		д.Калтай, смешанный лес	0,84	1,00	0,30
		СХК-25	**411,42**	383,42	389,63
Th-232	Листья подорожника большого	д. Аникино, смешанный лес	2,09	1,58	1,93
		с.Тимирязево, смешанный лес	2,64	2,62	2,01
		д.Калтай, смешанный лес	1,28	1,71	1,16
		д.Наумовка смешанный лес	7,8	7,11	7,15
		СХК-10	7	6,62	6,48
	Листья мать-и-мачехи	д. Аникино, смешанный лес	1,89	1,45	1,49
		д.Наумовка смешанный лес	6,93	2,29	2,26
		СХК-1	7,49	3,55	3,54
	Почки сосны	с.Тимирязево, хвойный лес	1,04	0,56	0,51

		д.Калтай, хвойный лес	0,41	н/о	0,2
		СХК-15	4,73	2,52	2,31
		СХК-25	6,42	3,73	3,75
	Плоды рябины	д. Аникино, смешанный лес	0,83	0,45	0,43
		с.Тимирязево, смешанный лес	0,78	0,56	0,51
		д.Калтай, смешанный лес	0,57	0,58	0,54
		СХК-25	5,37	2,16	2,22
К-40	Листья подорожника большого	д. Аникино, смешанный лес	18,53	17,20	17,35
		с.Тимирязево, смешанный лес	20,18	17,55	18,97
		д.Калтай, смешанный лес	18,56	19,35	18,56
		д.Наумовка	346,02	334,58	338,66
		СХК-10	388,87	377,59	377,57
	Листья мать-и-мачехи	д. Аникино, смешанный лес	19,34	19,20	19,31
		д.Наумовка смешанный лес	672,74	678,83	661,22
		СХК-1	772,4	757,93	745,83
	Почки сосны	с.Тимирязево, хвойный лес	22,15	21,35	21,86
		д.Калтай, хвойный лес	19,44	16,27	16,33
		СХК-15	564,53	549,88	548,55
		СХК-25	645,44	598,92	566,58
	Плоды рябины	д. Аникино, смешанный лес	15,45	14,37	15,33
		с.Тимирязево, смешанный лес	23,52	21,08	19,86
		д.Калтай, смешанный лес	17,50	14,11	13,33
		СХК-25	634,39	557,66	548,53
U-235	Листья подорожника большого	д. Аникино, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		с.Тимирязево, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Калтай, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Наумовка смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		СХК-10	5	4	4
	Листья мать-и-мачехи	д. Аникино, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Наумовка	1	н/о	н/о
		СХК-1	772	745	742
	Почки сосны	с.Тимирязево, хвойный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Калтай, хвойный лес	н/о	н/о	н/о
		СХК-15	9	8	4
		СХК-25	25	24	7
	Плоды рябины	д. Аникино, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		с.Тимирязево, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		д.Калтай, смешанный лес	н/о	н/о	н/о
		СХК-25	31	29	16

Обозначения: ■- фоновые образцы; □ - деревни, поселки, села; ■ - СЗЗ предприятий.
*Примечание:**по данным дипломной работы, выполненной на кафедре фармакогнозии и ботаники СибГМУ; н/о – не обнаружено.

Таким образом, согласно ОФС для лекарственного сырья содержание искусственных радионуклидов в проанализированных образцах 2014 и 2017 года сбора не превышает допустимые уровни и не представляет опасности загрязнения радионуклидами.

***

Проведенная в данной главе оценка экологической чистоты образцов ЛРС: содержания минеральной примеси, золы общей, тяжелых металлов и радионуклидов показала, что:

- по содержанию «золы общей» и «минеральной примеси» требованиям соответствующих разделов фармакопейных статей соответствуют 66,6% образцов почек сосны; 36,36% образцов плодов рябины обыкновенной, 83,3% образцов листьев мать-и-мачехи; 98,07% образцов листьев подорожника.

При этом полностью соответствовали требованиям НД образцы представителей нижнего яруса леса - листья подорожника и мать-и-мачехи из фонового района (д.Калтай); 7-ми населенных пунктов Томского района: д. Коларово, д. Кисловка, д. Наумовка, п. Степановка, д. Аникино, с. Тимирязево, п.Зональная станция; некоторых парков и зон отдыха - парковая зона Буфф-сада и Новособорной площади.

Почки сосны, заготовленные в фоновом районе и 2-х населенных пунктах Томского района, соответствовали требованиям нормативной документации. Превышение допустимых значений содержания «золы общей» и «минеральной примеси» обнаружено в образцах сосны из некоторых парков и зон отдыха, находящихся в городской черте (Лагерный сад, набережная р.Томь).

Плоды рябины из фонового района и села Тимирязево требованиям действующей ГФ соответствовали. Как и в случае с почками сосны превышение предельных верхнеуровневых значений наблюдали в образцах из некоторых парков и зон отдыха, находящихся в городской черте. Неожиданными стали результаты по плодам рябины из двух населенных пунктов – д. Аникино и п. Заварзино, что учтено в практических рекомндациях по заготовке сырья на территории Томского района.

- требованиям действующих нормативных документов (СанПиН 2.3.2.1078-01, ОФС 1.5.3.0009.15) по содержанию тяжелых металлов соответствуют образцы (100% почек сосны, 45,45% плодов рябины, 92,3%

листьев подорожника, 66,6% листьев мать-и-мачехи) из фонового района, 7-ми населенных пунктов Томского района и некоторых парков и зон отдыха.

В некоторых образцах плодов рябины, листьев мать-и-мачехи и поорожника содержание *Cd* и *As* значительно превышало допустимые верхнеуровневые показатели, регламентированные действующей ГФ. При этом превышение действущих показателей отмечено в тех же образцах, в которых было установлено превышение показателей «зола общая» и «минеральная примесь» (образцы из некоторых парков и зон отдыха, находящихся в городской черте).

- содержание искусственных радионуклидов в образцах ЛРС 2014 и 2017 года сбора не превышает допустимые уровни и не представляет опасности загрязнения радионуклидами.

Глава 4. ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ БАВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ БАВ

Перспективность применения дикорастущего лекарственного растительного сырья определяется не только его экологической чистотой и безопасностью, но и, содержанием в нем комплекса действующих биологически активных веществ, которые обусловливают терапевтическую эффективность самого сырья и лекарственных препаратов на его основе.

В связи с этим, следующим этапом нашего исследования стало изучение содержания действующих биологически активных в исследуемых образцах сырья по методикам действующих фармакопейных статей ГФ**,** изложенным в гл. 2.

4.1. Количественное определение полисахаридов

Сумму ПС в листьях подорожника большого и мать-и-мачехи определяли гравиметрическим методом в 6 – кратной повторности. Результаты представлены в таблице 6.

В соответствии с требованиями к качеству ФС ГФ XIII на «Подорожника большого листья» содержание ПС должно составлять не менее 12%. В нашем исследовании установлено, что из 42 образцов подорожника требованиям соответствуют 40 образцов. При этом содержание суммы ПС в этих образцах находилось в пределах 12,02 – 16,20%. Образцы не соответствующие требованиям ГФ были заготовлены в городских парках и зонах отдыха.

Таблица 6

Содержание суммы полисахаридного комплекса в листьях подорожника и мать-и-мачехи, %

Наименование объекта, место, дата сбора	Содержание в %
1	2
Листья подорожника большого (ГФ XIII, сумма ПС не менее 12%)	
Парки и зоны отдыха	
питомник СибГМУ (18.07.14)	16,5±1,6
питомник СибГМУ (28.07.14)	12,02±1,2
парковая зона Буфф- сада (20.07.14)	**7,60**±0.74
парковая зона Новособорной площади (23.07.14)	**6,51**±0,63

1	2
Фоновый район	
д. Калтай, смешанный лес (27.07.14)	13,5±1,3
д. Калтай, смешанный лес (18.06.15)	12,54±1,20
д. Калтай, смешанный лес (02.07.15)	12,37±1,22
д. Калтай, смешанный лес (19.07.15)	13,80±1,37
д. Калтай, смешанный лес (05.08.15)	14,74±1,43
д. Калтай, смешанный лес (23.08.15)	15,11±1,50
д. Калтай, смешанный лес (06.09.15)	13,95±1,37
д. Калтай, смешанный лес (20.09.15)	13,42±1,32
д. Калтай, смешанный лес (16.06.16)	12.47±1,21
д. Калтай, смешанный лес (14.07.16)	12.68±1,23
д. Калтай, смешанный лес (17.08.16)	17.89±1,75
д. Калтай, смешанный лес (18.09.16)	18.05±1,79
д. Калтай, смешанный лес (03.10.16)	15.95±1,52
Деревни, поселки, села	
д. Наумовка, смешанный лес (27.07.14)	13,4±1,31
д. Наумовка, смешанный лес (28.08.14)	13,75±1,32
д. Кисловка, смешанный лес (27.07.14)	14,62±1,37
д. Кисловка, смешанный лес (01.07.15)	15,00±1,47
д. Аникино, смешанный лес (20.07.14)	15,47±1,39
д. Аникино, смешанный лес (01.06.15)	15,53±1,52
д. Аникино, смешанный лес (14.06.15)	13,21±1,28
д. Аникино, смешанный лес (28.06.15)	12,44±1,24
д. Аникино, смешанный лес (13.07.15)	12,05±1,17
п. Степановка, смешанный лес (27.07.14)	12,14±1,11
п.Зональная станция, смешанный лес (04.07.14)	14,5±1,36
д. Кисловка 20 м от ЛЭП (27.07.14)	13,5±1,31
с. Тимирязево, смешанный лес (03.07.14)	16,20±1,53
с. Тимирязево, смешанный лес (04.06.15)	12,84±1,27
с. Тимирязево, смешанный лес (18.06.15)	12,81±1,26
с. Тимирязево, смешанный лес (26.06.15)	12,77±1,19
с. Тимирязево, смешанный лес (10.07.15)	12,32±1,20
с. Тимирязево, смешанный лес (27.07.15)	13,42±1,33
с. Тимирязево, смешанный лес (20.08.15)	12,89±1,26
с. Тимирязево, смешанный лес (03.09.15)	13,42±1,32
с. Тимирязево, смешанный лес (18.09.15)	13,58±1,23
с. Тимирязево, смешанный лес (17.06.16)	14,05±1,39
с. Тимирязево, смешанный лес (14.07.16)	12,11±1,16
с. Тимирязево, смешанный лес (16.08.16)	12.68±1,25
с. Тимирязево, смешанный лес (18.09.16)	12.47±1,23
с. Тимирязево, смешанный лес (05.10.16)	12.42±1,22
Листья мать-и-мачехи (ГФ XIII, сумма ПС не менее 10%)	
Парки и зоны отдыха	
Питомник СибГМУ (28.07.2014)	**7,5**±0,72
Деревни, поселки, села	

1	2
д. Наумовка смешанный лес (14.07.2014)	12,15±1,12
п.Степановка, смешанный лес (27.07.2014)	13,55±1,32
п. Зональная станция, смешанный лес (4.07.2014)	13,45±1,27
д. Аникино, смешанный лес (30.08.2014)	12,73±1,24

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - парки и зоны отдыха.

Из 5 образцов листьев мать-и-мачехи по суммарному содержанию полисахаридов требованиям ФС не соответствовал только 1 образец, заготовленный в черте города на территории питомника СибГМУ.

4.2 Количественное определение антоцианов

ФС 39 ГФ XI издания не предусматривает стандартизацию плодов рябины по содержанию действующих веществ. В связи с этим мы руководствовались методикой количественного определения антоцианов, разработанной на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ для проекта ФС на плоды рябины обыкновенной. Рекомендуемое при этом содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид в плодах рябины, должно составлять «не менее 2%» [51]. Количественное определение антоцианов в исследуемых образцах из разных мест сбора проводили в 5-ти кратной повторности спектрофотометрическим методом по собственному поглощению антоцианов в диапазоне 490-550 нм (см.п.2.3). Результаты представлены в таблице 7. В качестве стандартного образца использовали известное вещество цианидин-3-О-глюкозид, имеющий основной максимум поглощения при 544±5нм, совпадающий с максимумом водно-спиртового извлечения плодов рябины обыкновенной (рис. 2).

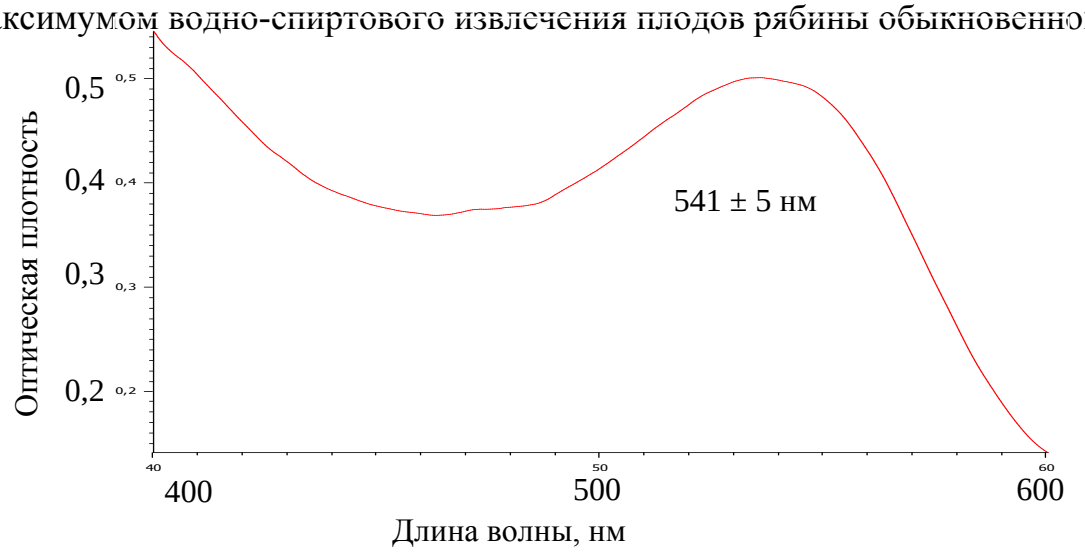


Рис. 2. Электронный спектр 95% водно-спиртового извлечения плодов рябины обыкновенной

Таблица 7

Содержание антоцианов в плодах рябины обыкновенной, %

Место сбора	Содержание
Парки и зоны отдыха	
парковая зона Новособорной площади 14.09.2014	2,29±0,21
Питомник СибГМУ 11-12.09.2014	2,69±0,26
набережная р.Томь 20.09.2014	**1,90±0,15**
лесопарковая зона Лагерного сада 18.09.2014	3,58±0,31
Питомник СибГМУ 10.09.2015	**1,08±0,10**
Деревни, поселки, села	
д. Аникино, смешанный лес 05.09.2014	2,92±0,28
п. Заварзино смешанный лес 18.09.2014	2,63±0,26
с. Тимирязево, смешанный лес 03.09.2015	2,03±0,20
д. Наумовка, смешанный лес 06.09.15	2,12±0,21
Фоновый	
д. Калтай, смешанный лес 06.09.2015	2,09±0,18

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - парки и зоны отдыха.

Как следует из представленных данных, в зависимости от года заготовки сырья сумма антоцианов в образцах из разных мест сбора варьирует в следующих диапазонах: в 2014 году – 1,9-3,58%; в 2015 году – 1,08-2,12%. С учетом рекомендуемого в проекте ФС значения содержания суммы антоцианов «не менее 2%», можно констатировать факт соответствия всех образцов, за исключением образцов, собранных в городской черте – на набережной р.Томь и питомнике СибГМУ.

4.3. Количественное определение эфирного масла

Эфирное масло в почках сосны из разных мест сбора, получали фармакопейным методом (гидродистилляции) в 5-ти кратной повторности. Полученные результаты сравнивали с показателем содержание эфирного масла фармакопейной статьи «Сосны обыкновенной почки» ГФ XIII издания, норма которого регламентирована на уровне «не менее 0,3%» [157]. Результаты определения эфирного масла представлены в таблице 8.

Таблица 8

Содержание эфирного масла в почках сосны обыкновенной, %

Наименование образца	Содержание, %
1	2
Парки и зоны отдыха	

1	2
лесопарковая зона Лагерного сада 12.05.2015	0,58±0,05
лесопарковая зона Лагерного сада 02.06.2015	0,68±0,05
Фоновый	
д. Калтай, хвойный лес 24.05.15	0,75±0,04
Деревни, поселки, села	
с.Тимирязево, хвойный лес 19.05.15	0,72±0,03
д. Коларово, хвойный лес 21.05.15	0,52±0,02
п. Заварзино, хвойный лес 19.05.15	0,71±0,03
п.Зональная станция, хвойный лес 22.05.15	0,74±0,03
д. Коларово, хвойный лес 21.05.16	**0,27**±0,01
с.Тимирязево, хвойный лес 15.05.16	0,70±0,03
п. Заварзино, хвойный лес 15.05.16;	0,73±0,03
п.Зональная станция, хвойный лес 16.05.16	0,72±0,03
Парки и зоны отдыха	
набережная р. Томь 12.05.16	**0,26**±0,01
Фоновый	
д. Калтай, хвойный лес 25.05.16	0,71±0,03
Парки и зоны отдыха	
лесопарковая зона Лагерного сада 20.05.17	0,73±0,04
Деревни, поселки, села	
д. Коларово, хвойный лес 20.05.17	0,41±0,01
п. Заварзино, хвойный лес 18.05.17	0,78±0,04
п.Зональная станция, хвойный лес 19.05.17	0,76±0,04
Фоновый	
д. Калтай, смешанный лес 22.05.17	0,87±0,03

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - парки и зоны отдыха.

Как следует из представленных данных, по содержанию эфирного масла требованиям фармакопейной статьи из 18 образцов не соответствует только 2 образца 2016 г., один из которых заготовлен на территории городской лесопарковой зоны Лагерного сада, второй - в окрестностях д. Коларово.

По результам исследований, выполненных в данном разделе проведена статистическая обработка, а также установлены показатели среднего содержания действующих веществ для выявления мест заготовки с высоким содержанием БАВ (табл.9). Оценка содержания БАВ в листьях подорожника, мать-и-мачехи, плодах рябины обыкновенной и почках сосны обыкновенной, показывает, что заготовка высококачественного сырья с высоким содержанием действующих веществ, возможна в окрестностях населенных пунктов Томского района: д. Кисловка, с. Тимирязево, д. Наумовка, п. Степановка, д.

Коларово, д. Аникино, п. Зональная станция, п. Заварзино; д. Калтай. В большинстве случаев ЛРС, заготовленное на территории городских и пригородных парков не соответствует требованиям по содержании ю БАВ.

Таблица 9

Среднее содержание БАВ в исследуемых образцах ЛРС, %

Наименование сырья	Место сбора и содержание БАВ,%		
	деревни, села, поселки	фоновый район	парки, зоны отдыха
листья подорожника	13,44±1,41	14,34±3,71	10,66±4,19
	по ГФ не менее 12%		
листья мать-и-мачехи	12,97±0,59	-	7,50±0,72
	по ГФ не менее 10%		
плоды рябины	2,42±0,49	2,09±0,18	2,31±1,27
	по проекту ФС не менее 2%		
почки сосны	0,64±0,14	0,77±0,1	0,56±0,17
	по ГФ не менее 0,3%		

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - парки и зоны отдыха.

4.4. Оценка влияния загрязнения на содержание некоторых БАВ

Загрязняющие вещества, проникая и накапливаясь в живых организмах обладают способностью оказывать воздействие на метаболические обменные процессы, приводящие к изменениям на разном уровне, в том числе изменению состава и количества биологически активных веществ.

В связи с этим следующим этапом исследования стало изучение влияния загрязнения на содержание некоторых БАВ. При выборе группы БАВ учитывали их роль для самих растений, в том числе защитную функцию, и вклад в фармакологическое действие видов. Как уже было отмечено в обзоре литературы, большую роль в защите растений от стресс-факторов играют зеленые и красные пигменты - хлорофилл, антоцианы, каротиноиды. С точки зрения проявления фармакологического действия значимыми биологически активными веществами для листьев подорожника большого и мать-и-мачехи является полисахаридный комплекс, с которым связывают отхаркивающее и обволакивающее действие этих видов; для почек сосны - эфирное масло, определяющее отхаркивающее, антисептическое действие; для плодов рябины обыкновенной – комплекс витаминов, обеспечивающих поливитаминное действие, а также проантоцианидины и антоцианы, обладающие

антиоксидантными, иммунотропными, противовоспалительными и капилляроукрепляющими свойствами.

Количественное определение полисахаридного комплекса (ПСК), эфирного масла, антоцианов, хлорофилла в исследуемом сырье проводили по методикам, изложенным в гл. 2.

4.4.1. Полисахаридный комплекс

Результаты количественного определения полисахаридов в листьях подорожника и мать-и-мачехи представлены в таблице 10.

Полученные результаты сравнивали с требованиями ФС «Подорожника большого листья», которая регламентирует содержание ПС на уровне не менее 12%. В нашем исследовании установлено, что в ряде случаев сумма ПС в листьях подорожника, заготовленных как в фоновом районе, населенных пунктах Томского района, некоторых парках и зонах отдыха, так и в СЗЗ предприятий, вблизи дорожных магистралей, на улицах города, соответствует требованиям ФС. В связи с этим, для исключения попадания на рынок загрязненного сырья, вероятно, необходимо поднять нижнюю границу данного числового показателя.

Это совпадает с мнением наших коллег из Воронежа [16], которые также считают, что значение числового показателя «полисахаридов не менее 12 %» следует изменить в сторону его увеличения.

Поскольку действующая ФС предполагает определение суммы ПС довольно трудоемким и затратным по времени гравиметрическим методом, нами была разработана методика спектрофотометрического определения суммы ПС в пересчете на глюкозу (Гл.5). Результаты количественного определения суммы ПС в 6-ти кратной повторности представлены в таблице 10.

Таблица 10

Содержание и состав полисахаридного комплекса, %

Наименование объекта, место, дата сбора	Содержание в %						
	Метод ГФ	ВРПС	ПВ	ГЦ А	ГЦ В	Сумма	Σ, СФ
1	2	3	4	5	6	7	8

1	2	3	4	5	6	7	8
Листья подорожника большого (ГФ XIII, сумма ПС не менее 12%)							
Улицы города							
проспект Комсомольский (09.13)	9,13	8.22	1.15	10.52	0.47	20,38	12,72
		40,3	5,64	51,6	2,33	100	
пр. Комсомольский – ул. Пушкина (16.08.14)	6,4	6,0	0,52	11,0	2,0	19,53	12,11
		30,7	2,7	56,3	10,2	100	
Иркутский тракт 37а (07.07.14)	**13,6**	13,75	0,5	6,5	2,5	23,25	12,33
		58,5	2,15	27,9	10,7	100	
аллея на пр.Кирова в пересечении с ул. Вершинина (24.07.14)	6,7	6,5	0,5	1,5	3,0	11,5	7,88
		56,52	4,347	13,04	26,08	100	
Дорожные магистрали							
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (30.07.14)	10,10	10,0	0,475	3,0	1,0	14,48	9,47
		69,0	3,3	20,7	6,9	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (01.06.15)	**12,14**	12,11	1,05	7,11	3,95	24,22	15,78
		50,00	4,35	29,35	16,30	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (14.06.15)	5,55	5,53	1,32	4,47	19,74	31,06	14,26
		17,79	4,23	14,40	63,5	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (27.06.15)	11,46	11,58	0,53	8,42	3,42	23,92	13,31
		48,35	2,20	35,16	14,29	100	
дорожная развязка на г.Северск и ООО «Томскнефтехим» (10.07.15)	6,40	6,32	22,11	6,58	5,79	40,80	19,46
		15,48	54,19	16,13	14,20	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (27.07.15)	6,26	6,32	0,79	5,79	3,95	16,85	10,21
		37,50	4,68	34,37	23,44	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (05.08.15)	6,29	6,32	1,57	5,53	33,68	47,1	13,27
		13,41	3,35	11,73	71,51	100	

1	2	3	4	5	6	7	8
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (23.08.15)	10,72	10,79	1,32	9,21	26,05	47,37	14,15
		22,78	2,78	19,44	55,00	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (06.09.15)	4,47	5,00	3,68	1,58	14,74	25	15,02
		20,00	14,74	6,32	58,94	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (20.09.15)	3,10	3,16	2,89	6,84	0,79	13,68	8,56
		23,08	21,15	50,00	5,77	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (16.06.16)	9,03	9,11	0,90	7,58	8,84	26,43	13,12
		34,46	3,39	2,69	33,46	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (14.07.16)	**12,52**	12,58	1,00	8,47	25,6	47,21	18,22
		26,64	2,12	17,95	53,29	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (16.08.16)	8,43	8,32	1,11	10,26	7,84	27,53	13,16
		30,21	4,02	37,29	28,48	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (18.09.16)	11,52	11,53	2,11	6,84	20,53	41,01	19,56
		28,12	5,14	16,69	50,05	100	
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» (05.10.16)	11,27	11,42	2,46	7,39	3,67	24,94	14,51
		40,16	8,66	25,98	25,20	100	
СЗЗ предприятий							
СЗЗ «Томскнефтехим» (15.09.13)	11,01	11,075	1,15	16,225	0,5	28,95	13,53
		38,2	3,9	56	1,7	100	
СХК-10 (15.09.13)	9,73	10	0,8	3,75	0,275	14,83	9,37
		67,4	5,4	25,2	1,85	100	
СХК - 1 (25.07.14)	10,05	10	0,425	2	3	15,43	11,44
		64,8	2,75	13,0	19,4	100	
СХК -15 (01.08.14)	4,63	4,75	0,25	1,5	5	**11,5**	5,51
		41,3	3,1	13,0	43,5	100	

1	2	3	4	5	6	7	8
Парки и зоны отдыха							
питомник СибГМУ (18.07.14)	**16,50**	16,50	1,5	2,0	14,0	34,0	17,57
		48,5	4,4	5,8	41,2	100	
питомник СибГМУ (28.07.14)	**12,02**	12,0	0	1,75	22	35,75	17,42
		33,6	0	4,9	61,5	100	
парковая зона Буфф- сада (20.07.14)	7,60	7,0	0,09	3,5	3,0	13,59	7,77
		51,51	0,66	25,75	22,08	100	
парковая зона Новособорной площади (23.07.14)	6,51	6,50	0,05	4,0	4,0	14,55	7,03
		44,67	0,35	27,49	27,49	100	
Фоновый район							
д. Калтай, смешанный лес (27.07.14)	13,5	13,5	2,5	1,5	26	43,5	25,37
		33,0	5,7	3,44	60	100	
д. Калтай, смешанный лес (18.06.15)	12,54	0,53	5,00	5,79	3,42	14,74	25,63
		3,57	33,93	39,29	23,21	100	
д. Калтай, смешанный лес (02.07.15)	12,37	2,37	1,32	6,58	46,05	56,32	30,12
		4,21	2,34	11,68	81,77	100	
д. Калтай, смешанный лес (19.07.15)	13,80	0,79	1,32	6,58	46,05	54,74	29,59
		4,48	7,46	31,34	56,72	100	
д. Калтай, смешанный лес (05.08.15)	14,74	14,74	1,32	6,58	6,32	28,96	28,72
		50,91	4,55	22,73	21,81	100	
д. Калтай, смешанный лес (23.08.15)	15,11	7,11	1,32	4,74	7,63	20,8	26,03
		34,18	6,33	22,78	36,71	100	
д. Калтай, смешанный лес (06.09.15)	13,95	3,95	1,32	6,32	7,37	18,96	26,25
		20,83	6,94	33,33	38,90	100	
д. Калтай, смешанный лес (20.09.15)	13,42	3,42	1,32	3,95	9,21	17,9	26,31
		19,12	7,35	22,06	51,47	100	
д. Калтай, смешанный лес (16.06.16)	12.47	12.47	0.95	7.79	7.79	29,00	34,61
		43.01	3.27	26.86	26.86	100	

1	2	3	4	5	6	7	8
д. Калтай, смешанный лес (14.07.16)	12.68	12.68	0.79	7.63	7.74	28,84	29,25
		43/98	2.74	26.46	26.82	100	
д. Калтай, смешанный лес (17.08.16)	17.89	7.89	1.84	9.53	21.37	40,63	36,48
		19.43	4.53	23.45	52.59	100	
д. Калтай, смешанный лес (18.09.16)	18.05	8.05	0.95	6.63	2.37	18,00	25,09
		44.74	5.26	36.84	13.16	100	
д. Калтай, смешанный лес (03.10.16)	15.95	10.95	1.37	7.68	4.79	24,79	28,42
		44.16	5.52	31.00	19.32	100	
Деревни, поселки, села							
д. Наумовка смешанный лес (27.07.14)	13,4	7	0,175	12	5	24,18	29,06
		28,9	0,72	49,6	20,7	100	
д. Наумовка смешанный лес (28.08.14)	13,75	9,75	0,25	3	11,5	24,5	28,11
		39,8	1,02	12,2	46,9	100	
д. Кисловка, смешанный лес (27.07.14)	14,62	4	0,175	2	7	13,18	25,36
		30,3	1,3	15,2	53,1	100	
д. Кисловка, смешанный лес (01.07.15)	15,00	5,00	1,32	3,42	6,32	16,06	25,36
		31,15	8,20	21,31	39,34	100	
п. Зональная станция, смешанный лес (04.07.14)	14,5	4,5	0	2	8,5	15,0	25,27
		30,0	0	13,3	56,6	100	
д. Аникино, смешанный лес (20.07.14)	15,47	7	0,5	3,5	25	36	28,59
		19,4	1,38	12,6	69,4	100	
д. Аникино, смешанный лес (01.06.15)	15,53	5,53	1,84	4,47	6,05	17,89	25,27
		30,88	10,29	25,00	33,83	100	
д. Аникино, смешанный лес (14.06.15)	13,21	7,11	3,16	3,42	8,68	22,37	25,63
		31,77	14,12	15,29	38,82	100	
д. Аникино, смешанный лес (28.06.15)	12,44	8,42	2,11	3,42	8,68	22,63	30,66
		40,00	10,00	16,25	33,75	100	
д. Аникино, смешанный лес (13.07.15)	12,05	6,05	11,3	4,21	11,06	32,62	30,12
		18,55	34,68	12,90	33,87	100	
п. Степановка, смешанный ле (27.07.14)	12,14	11	0,08	6	23	40,08	25,55

1	2	3	4	5	6	7	8
		27,44	0,199	14,97	57,38	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (03.07.14)	16,20	6,0	0,5	4,0	4,0	14,50	25,25
		41,38	3,46	27,59	27,58	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (04.06.15)	12,84	1,84	1,32	10,00	5,00	18,16	25,02
		10,14	7,25	55,07	27,54	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (18.06.15)	12,81	2,11	1,32	8,16	2,63	14,22	25,04
		14,81	9,26	57,41	18,52	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (26.06.15)	12,77	2,37	1,32	3,68	15,26	22,63	33,76
		10,47	5,81	16,28	67,44	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (10.07.15)	12,32	1,32	1,32	3,95	6,32	12,91	24,63
		10,20	10,20	30,62	48,98	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (27.07.15)	13,42	13,42	1,32	10,53	4,21	29,48	31,42
		45,54	4,46	35,71	14,29	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (20.08.15)	12,89	12,89	1,32	8,95	9,21	32,37	34,63
		39,84	4,06	27,64	28,46	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (03.09.15)	13,42	3,42	2,37	5,53	4,74	16,06	25,53
		21,31	14,75	34,43	29,51	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (18.09.15)	13,58	1,58	1,84	3,95	9,21	16,58	26,83
		9,52	11,11	23,81	55,56	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (17.06.16)	14,05	8.05	2.37	14.89	1.58	26,89	27,61
		29.94	8.81	55.38	5.87	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (14.07.16)	12,11	12.11	6.26	9.58	3.58	31,53	33,16
		38.40	19.87	30.39	11.34	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (16.08.16)	12.68	10.68	5.79	11.84	11.83	40,14	36,36
		26.61	14.42	29.49	29.48	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (18.09.16)	12.47	10.47	2.00	8.00	0.32	20,79	26,27
		50.38	9.62	38.48	1.52	100	
с. Тимирязево, смешанный лес (05.10.16)	12.42	11.42	2.16	6.68	5.37	25,63	27,46
		44.56	8.42	26.08	20.94	100	

1	2	3	4	5	6	7	8
Листья мать-и-мачехи (ГФ XIII, сумма ПС не менее 10%)							
СЗЗ предприятий							
СХК-1 (22.07.2014)	4,57	4,12	8,5	10,5	4,75	27,63	16,53
		14,9	30,8	38,0	17,2	100	
	Улицы города						
4-я поликлиника, пр. Комсомольский - Пушкина (15.08.2014)	0,34	0,125	1,5	1,875	1,25	4,75	2,41
		2,6	31,6	39,5	26,3	100	
Иркутский тракт, 37 А 7.07.2014	3,41	3,25	0,75	2,75	9,25	16	8,34
		20,3	4,7	17,2	57,8	100	
Парки и зоны отдыха							
Питомник СибГМУ (28.07.2014)	7,5	7,5	4,5	4,375	6,25	22,88	13,25
		32,7	19,6	19,2	27,3	100	
Деревни, поселки, села							
д. Наумовка (14.07.2014)	12,15	2,75	2,25	3,875	2,75	11,63	5,39
		23,6	19,3	33,3	23,6	100	
п.Степановка (27.07.2014)	13,55	8,75	1,125	7,75	4,5	22,13	12,44
		39,5	5,1	35,0	20,3	100	
п. Зональная станция, смешанный лес (4.07.2014)	13,45	3,75	0,25	9,125	11,375	24,5	14,65
		15,3	1,02	37,2	46,4	100	
д. Аникино, смешанный лес (30.08.2014)	12,73	7,5	1,25	5	10,125	23,87	13,43
		31,4	5,2	20,1	42,4	100	

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - парки и зоны отдыха; - СЗЗ предприятий, улицы города, дорожные магистрали

Из представленных данных видно, что содержание суммы ПС в образцах с дорожных магистралей находится в диапазоне 7,88-24,15%, в образцах из парков, зон отдыха - 7,03-17,57%, в образцах из фонового района и населенных пунктов Томского района в диапазоне 25,04-30,12%. В связи с чем наиболее целесообразным является числовое значение показателя «содержание суммы ПС в пересчете на глюкозу» на уровне «не менее 25%».

В отличие от листьев подорожника все листья мать-и-мачехи, которые были заготовлены в местах с повышенным техногенным загрязнением по суммарному содержанию полисахаридов требованиям ФС не соответствовали.

Поэтому в данном случае целесообразности в пересмотре нормативных значений этого показателя нет.

Таким образом, на основании приведенных результатов в целом можно сделать заключение о влиянии загрязнения на содержание суммы ПС в растительном сырье.

Также в нашем исследовании было изучено возможное влияние техногенного загрязнения на отдельные фракции ПСК в листьях подорожника большого и мать-и-мачехи.

Обнаружение, выделение ПСК и его фракций в листьях подорожника большого и листьях мать-и-мачехи проводили по общепринятой в фитохимическом анализе методике путем последовательного фракционного выделения и осаждения водорастворимых полисахаридов (ВРПС), пектиновых веществ (ПВ) и гемицеллюлоз А (Гц А) и В (Гц В) (табл.10).

Так, фракция ПВ занимает небольшую, но постоянную долю. Водорастворимые полисахариды (ВРПС) и фракции гемицлеллоз (Гц) в образцах из разных мест сбора занимают ведущее место. Так, например, для образцов из фонового района и населенных пунктов Томского района (деревни, села, поселки) характерно преимущественное накопление Гц В, при этом содержание Гц В превосходит содержание ВРПС в 1,5-2 раза; для образцов из мест с повышенной техногенной нагрузкой (дорожные магистрали и улицы города) характерным является либо преимущественное накопление Гц А, либо ВРПС (рис.3).

Повышение уровней гемицеллюлозы А (Гц А), представленной структурными полисахаридами, и водорастворимых полисахаридов (ВРПС), представленных слизями, в образцах из мест с повышенной техногенной нагрузкой, не вызывают удивления и может быть объяснено защитными свойствами структурных полисахаридов и слизей. Это соотносится с данными литературы, о том, что повышенные концентрации ТМ увеличивают содержание веществ, выполняющих защитные функции в растительных организмах.

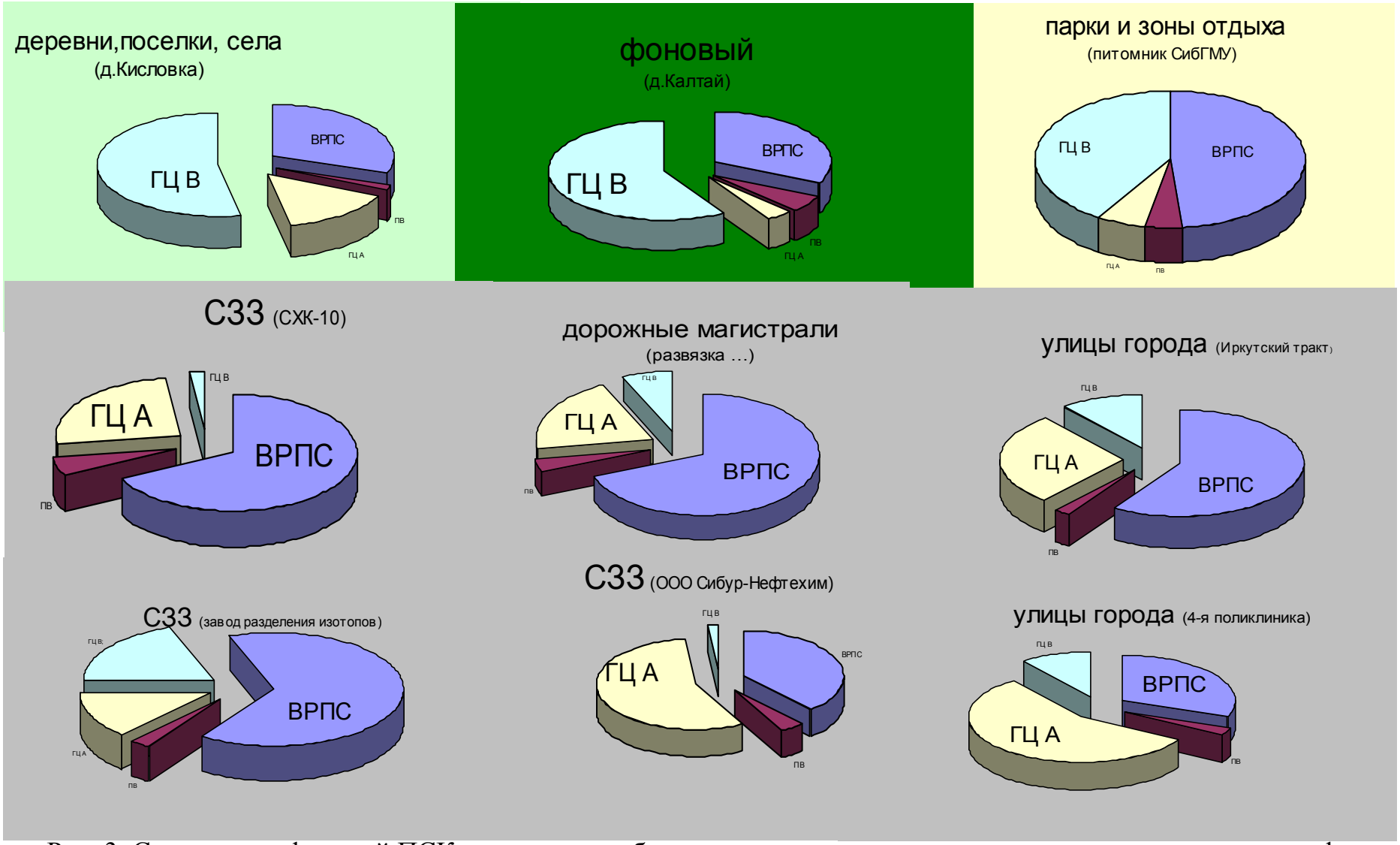


Рис. 3. Содержание фракций ПСК в некоторых образцах из парков и зон отдыха, деревень, сел, поселков, фонового района, дорожных магистралей, улиц города, СЗЗ предприятий.

Изменение уровня ГцВ в образцах, подверженных техногенному воздействию можно объяснить тем, что входящие в состав данной фракции запасающие гексозы, образуются в процессе фотосинтеза, а их образование в свою очередь ингибируют повышенные концентрации ТМ [118,129,133].
На содержание ПВ техногенное загрязнение влияние не оказывает, вероятно, поэтому в нашем исследовании содержание этой фракции во всех образцах изменялось незначительно.

Таким образом, полученные нами данные о количественном содержании и доли каждой фракции к общему количеству всех фракций коррелируют с современными представлениями о роли фракций ПС в структуре клеточных стенок и процессах жизнедеятельности растений в норме и в условиях воздействия абиотических и биотических факторов среды.

4.4.2. Антоцианы

Как уже отмечалось ранее в разделе 4.2. в связи с тем, что действующая ФС не предусматривает стандартизацию плодов рябины по содержанию действующих веществ, мы руководствовались методикой количественного определения антоцианов, разработанной на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ.

Количественное определение антоцианов в исследуемых образцах из разных мест сбора проводили в 5-ти кратной повторности спектрофотометрическим методом по собственному поглощению антоцианов в диапазоне 490-550 нм (см.п.2.3). Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11

Содержание антоцианов в плодах рябины обыкновенной, %

Место сбора	Содержание
1	2
СЗЗ предприятий	
СХК -25 24.08.2014	2,33-2,46
Улицы города	
Иркутский тракт, 37а 21.09.2014	2,17-2,25

1	2
перекресток улиц Фрунзе / Шевченко 20.09.2014	3,02-3,12
аллея на пр. Кирова в пересечении с ул.Киевской 12.09.2014	2,03-2,09
перекресток улиц Фрунзе / Шевченко 14.09.2015	0,69-0,74
Дорожные магистрали	
дорожная развязка на г.Северск - ООО «Томскнефтехим» 06.09.2015	0,92-0,99
Парки и зоны отдыха	
парковая зона Новособорной площади 20.09.2014	2,19-2,23
парковая зона Новособорной площади 14.09.2014	2,29±0,07
Питомник СибГМУ 11-12.09.2014	2,69±0,07
набережная р.Томь, 20.09.2014	1,90±0,05
набережная р.Томь, 15.09.2014	1,42-1,50
лесопарковая зона Лагерного сада 18.09.2014	3,58±0,11
Питомник СибГМУ 10.09.2015	1,08±0,02
Деревни, поселки, села	
с. Тимирязево, смешанный лес 03.09.2015	2,03±0,19
д. Аникино, смешанный лес 05.09.2014	2,92±0,07
п. Заварзино смешанный лес 18.09.2014	2,63±0,06
д. Наумовка, смешанный лес 06.09.15	2,12±0,18
Фоновый	
д. Калтай, смешанный лес 06.09.2015	2,09±0,13

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - дорожные магистрали, СЗЗ предприятий, улицы города; - парки и зоны отдыха.

Как следует из представленных данных сопоставимые уровни антоцианов обнаружены как в образцах из фонового района, деревень, поселков и сел Томского района, так и с улиц города, и СЗЗ предприятий. При этом максимальное количество красных пигментов обнаруживается как в образцах с повышенной техногенной нагрузкой, так и в образцах из населенных пунктов Томского района, парков и зон отдыха.

Полученные нами результаты соотносятся с данными других исследователей о стимулирующем влиянии техногенного загрязнения и УФ-излучения на содержание выполняющих защитную функцию антоцианов, количество которых повышается по мере увеличения степени техногенной нагрузки и УФ-облучения.

4.4.3. Эфирное масло

Как уже было отмечено в обзоре литературы, сосна обыкновенная является индикаторным объектом при изучении влияния техногенного загрязнения на экосистемы. При этом изменение содержания и состава терпеноидов в составе эфирного масла является одной из чувствительных реакций ранней диагностики состояния древостоя сосны. По данным некоторых авторов, накопление терпеноидов коррелирует с уровнем загрязнения воздушной среды, снижаясь в экземплярах, произрастающих на сильно загрязненных территориях. Кроме того, индикатором аэротехногенного загрязнения является изменчивость компонентного состава эфирного масла.

Эфирное масло в почках сосны из разных мест сбора, получали методом гидродистилляции в 5-ти кратной повторности. Полученные результаты, прежде всего, сравнивали с показателем содержание эфирного масла фармакопейной статьи «Сосны обыкновенной почки», норма которого установлена на уровне «не менее 0,3%» [157]. Результаты определения представлены в таблице 12.

Таблица 12

Содержание эфирного масла в почках сосны обыкновенной, %

код	Наименование образца	Содержание, %
1	2	3
	2015	
	Дорожные магистрали	
teo14	с. Тимирязево, заправка «Газпромнефть» 19.05.15	0,32±0,01
teo13	дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим»19.05.15	0,47±0,02
	СЗЗ предприятий	
teo12	СЗЗ ООО «Томскнефтехим»19.05.15	0,30±0,01
teo11	СХК -25 29.0515	0,40±-0,02
	Улицы города	
	Иркутский тракт 37а 24.05.15	0,42±0,02
	Парки и зоны отдыха	
teo15	лесопарковая зона Лагерного сада 12.05.2015	0,58±0,05
teo16	лесопарковая зона Лагерного сада 02.06.2015	0,68±0,05

1	2	3
	Фоновый	
	д. Калтай, смешанный лес 24.05.15	0,75±0,04
	Деревни, поселки, села	
	с.Тимирязево, хвойный лес 19.05.15	0,72±0,03
	д. Коларово, хвойный лес 21.05.15	0,52±0,02
	п. Заварзино, хвойный лес 19.05.15	0,71±0,03
	п.Зональная станция, хвойный лес 22.05.15	0,74±0,03
	2016	
	Деревни, поселки, села	
teo18	д. Коларово, хвойный лес 21.05.16	**0,25-0,29**
	с.Тимирязево, хвойный лес 15.05.16	0,70±0,03
	п. Заварзино, хвойный лес 15.05.16;	0,73±0,03
	п.Зональная станция, хвойный лес 16.05.16	0,72±0,03
	Парки и зоны отдыха	
teo17	набережная р. Томь 12.05.16	**0,26**±0,01
	СЗЗ предприятий	
teo19	СЗЗ ООО «Томскнефтехим»21.05.16	0,35±0,015
	Улицы города	
	Иркутский тракт 37а 12.05.16	0,44±0,02
	Дорожные магистрали	
teo20	дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим» 21.05.16	0,47±0,02
teo2	с. Тимирязево, заправка «Газпромнефть» 20.05.16	0,54±0,02
	Фоновый	
teo1	д. Калтай, смешанный лес 25.05.16	0,71±0.03
	2017	
	Парки и зоны отдыха	
teo9	лесопарковая зона Лагерного сада 20.05.17	0,73±0,04
	Деревни, поселки, села	
teo5	д. Коларово, хвойный лес 20.05.17	0,39-0,43
	п. Заварзино, хвойный лес 18.05.17	0,78±0,04
	п.Зональная станция, хвойный лес 19.05.17	0,76±0,04
	СЗЗ предприятий	
teo6	СЗЗ ООО «Томскнефтехим»17.05.17	0,47±0,02
teo4	СХК -25 19.05.2017	0,54±0,02
teo3	СХК -15 19.05.17	0,55±0,22
	Дорожные магистрали	
teo8	с. Тимирязево, заправка «Газпромнефть» 20.05.17	0,65±0,03
teo7	дорожная развязка на г. Северск - ООО «Томскнефтехим» 17.05.2017	0,64±0,03
	Фоновый	
teo10	д. Калтай, смешанный лес 22.05.17	0,87±0,03

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, парки, села; - дорожные магистрали, СЗЗ предприятий, улицы города; - парки и зоны отдыха.

Как следует из представленных данных, по содержанию эфирного масла требованиям фармакопейной статьи «Сосны обыкновенной почки» соответствуют все образцы из мест с повышенной техногенной нагрузкой, что также как и в случае с подорожником указывает на необходимость пересмотра допустимой нижней границы данного показателя.

Анализируя содержание эфирного масла в целом по местам сбора, следует отметить, что самое высокое его содержание отмечено в образцах из фонового района д.Калтай. В остальных образцах его содержание снижается по мере увеличения загрязнения, что подтверждает данные литературы о снижении количества эфирного масла по мере увеличения техногенной нагрузки.

Для установления влияния загрязнения на компонентный состав эфирных масел, методом ГЖХ (п.2.3) было детально исследовано 20 образцов эфирных масел почек сосны разных мест сбора. Результаты изучения приведены в таблице 1 в Приложении 8. Как следует из данных таблицы, в образцах с 1 по 20 было обнаружено и идентифицировано: teo1 – 100 компонентов/из них идентифицировано 88, что составляет 88%; teo2 – 112/95 (85%); teo3 – 115/93 (81%); teo4 – 101/90 (89%); teo5 – 115/96 (84%); teo6 – 121/ 98 (81%); teo7 – 108/93 (86%) ; teo8 – 113/90 (80%); teo9 – 114/91 (80%); teo10 – 116/97 (84%); teo11 -139/104 (75%) ; teo12 – 132/99 (75%); teo13 – 143/105 (73%); teo14 – 141/103 (74%); teo15 – 136/107 (79%); teo16 – 122/103 (84%); teo17 – 124/97 (78%); teo18 – 136/108 (79%); teo19 – 141/107 (76%); teo20 – 141/106 (75%).

Максимальное количество обнаруженных компонентов в разных образцах эфирных масел составило от 100 до 143.

Как следует из представленных данных, идентифицированные терпеноиды в составе эфирных масел сосны представлены монотерпенами, сесквитерпенами, дитерпенами (табл.13). Анализируя фракционный состав, следует отметить, что наибольшую долю составляют монотерпены (60,71–84,36%), из них кислородсодержащие 6,09-12,19%.

Суммарная доля монотерпенов в составе эфирных масел коррелирует с освещенностью и уровнем загрязнения, увеличиваясь по мере снижения уровня загрязненности и достигая максимальных значений в образцах из фонового

района. При этом следует отметить, что наиболее значительно изменяется содержание кислородсодержащих монотерпенов, доля которых по мере снижения уровня загрязненности снижается, а в образцах с повышенной техногенной нагрузкой их доля увеличивается как в целом, в составе эфирного масла, так и в составе монотерпеновой фракции, что соотносится с данными других авторов [4,13,67] и вероятно связано с увеличением интенсивности окислительных реакций, катализируемых тяжелыми металлами.

Таблица 13

Фракционный состав эфирных масел сосны обыкновенной, %

Характеристика образцов / фракция терпеноидов	монотерпены / из них кисло-родсодержащие	сескви-терпены	дитерпены	неидентифицированные
1	2	3	4	5
2015				
Дорожные магистрали				
с. Тимирязево, заправка «Газпромнефть» 19.05.15	60,71 / 11,32	26,72	5,09	7,47
дорожная развязка на г. Северск- ООО «Томск-нефтехим» 19.05.15	65,58 / 10,16	19,99	7,38	7,04
СЗЗ предприятий				
г. Северск, СХК -25 29.05.15	68,26 / 9,98	17,89	7,13	6,72
СЗЗ ООО «Томскнефтехим»19.05.15	71,12 / 14,26	16,92	5,07	6,72
Парки и зоны отдыха				
лесопарковая зона Лагерного сада 12.05.2015	80,00 / 10,96	13,75	3,40	2,84
лесопарковая зона Лагерного сада 02.06.2015	67,45 / 6,09	23,51	3,16	5,86
Фоновый				
д. Калтай, хвойный лес 24.05.15	81,05 / 4,67	12,08	3,40	3,47
2016				
Деревни, поселки, села				
д. Коларово, хвойный лес 21.05.16	63,28 / 8,81	19,82	10,87	6,03

1	2	3	4	5
Парки и зоны отдыха				
набережная р. Томь 12.05.16	67,35 / 8,01	21,52	5,33	5,79
СЗЗ предприятий				
СЗЗ ООО «Томскнефтехим»21.05.16	71,38 / 10,87	15,34	6,55	4,72
Дорожные магистрали				
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томск-нефтехим» 21.05.16	71,62 / 11,52	19,23	4,42	4,73
с. Тимирязево, заправка «Газпромнефть» 20.05.16	76,82 / 12,19	14,99	4,41	3,77
Фоновый				
д. Калтай, хвойный лес 25.05.16	77,33 / 5,82	15,02	5,87	7,77
2017				
Парки и зоны отдыха				
д. Коларово, хвойный лес 20.05.17	81,99 / 10,34	10,24	4,19	3,65
лесопарковая зона Лагерного сада 20.05.17	75,40 / 5,46	20,77	1,70	2,12
СЗЗ предприятий				
СЗЗ ООО «Томскнефтехим»17.05.17	74,00 / 9,93	16,14	4,65	5,20
СХК -25 19.05.17	82,01 / 9,09	13,92	1,63	2,43
СХК -15 19.05.17	78,13 / 6,55	14,00	4,68	3,17
Дорожные магистрали				
с. Тимирязево, заправка «Газпромнефть» 20.05.17	74,98 / 9,19	16,41	4,02	4,58
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томск-нефтехим»17.05.17	77,04 /7,66	18,00	3,00	1,92
Фоновый				
д. Калтай, хвойный лес 22.05.17	84,36 / 5,47	11,70	2,22	1,72

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, парки, села; - дорожные магистрали, СЗЗ предприятий, улицы города; - парки и зоны отдыха

Значительно меньше содержится в эфирном масле сесквитерпенов, на долю которых приходится 10,24–26,72%. Доли дитерпенов и неидентифицированных компонентов в составе эфирных масел сопоставимы и находятся в разных образцах на уровне 1,63-10,87%.

Доминирующими компонентами в составе фракции монотерпенов являются 3-карен, α-пинен, β-пинен, терпинолен, β-мирцен; в составе сесквитерпенов – α- лонгипинен, лонгифолен, кариофиллен, Δ- кадинен, спатуленол; в составе дитерпенов – дегидроабиетан, палюстраль (табл. 1 Приложение 8).

Нами, также как и некоторыми другими авторами, отмечено перераспределение доли α-пинена в составе фракции монотерпенов в образцах из разных с экологической точки зрения мест сбора. По мере увеличения загрязнения доля α-пинена в составе монотерпеновой фракции увеличивается, по сравнению с образцами из фонового района. Доля α-пинена в общей сумме всех фракций эфирного масла незначительно снижается по мере увеличения загрязнения. Что касается доли других монотерпенов в составе монотерпеновой фракции (карена, мирцена, терпинолена) и в общей сумме всех фракций эфирного масла, то нами отмечается их снижение по мере увеличения загрязнения. Так, например, доля 3-карена значительно снижается в образцах с дорожной развязки по сравнению с фоновыми, что вероятно связано с его окислением. В нашем исследовании не подтверждаются данные некоторых исследователей о снижении уровня α-пинена при одновременном увеличении содержания 3-карена.

Согласно данным литературы, в зависимости от содержания в эфирном масле пинена и карена выделяют два хемотипа эфирного масла - «пиненовый», с содержанием α-пинена свыше 60%, и «кареновый» – 3-карена свыше 11%. Из 20 исследованных нами образцов эфирных масел почек сосны, заготовленных на территории Томского района Томской области, 18 можно отнести к «кареновому» хемотипу. Его содержание в этих образцах составило 13,38-35,43%. Полученные нами данные представляют практический интерес, поскольку 3-карен по данным литературы является аллергенным для организма человека, в связи с чем, такое эфирное масло должно иметь ограниченное применение [125].

4.4.4. Фотосинтезирующие пигменты

Исследование содержания хлорофилла является традиционным и одним из эффективных методов оценки воздействия экологических факторов на растения. Данный метод давно и широко используется в работах на экологическую тематику как в России, так и за-рубежом. При этом все исследователи сходятся во мнении о том, что содержание отдельных форм хлорофилла α и β, отношение их концентраций (Cα/Cβ) в растениях можно использовать в качестве маркеров антропогенного загрязнения [4,43,63,64].

Использование в фармакогностических исследованиях содержание фотосинтезирующего пигмента хлорофилла как показателя экологической чистоты ЛРС, может быть обосновано с нескольких сторон. Во-первых, хлорофилл - пигмент, играющий очень важную роль в процессах фотосинтеза высших растений, присутствующий во всех фотосинтезирующих организмах и чутко реагирующий на изменения экологической обстановки. Во-вторых, хлорофилл, определяет многие фармакологические свойства растений, такие как антибактериальные, противовоспалительные, ранозаживляющие.

Содержание хлорофилла определяли по методике, изложенной в п.2.3. Результаты представлены в таблице 14, как среднее из 5 определений.

Таблица 14

Содержание хлорофилла в листьях подорожника большого, %

Характеристика образцов	Cα	Cβ	Cα+Cβ	Cα/Cβ	Cc	Cα+Cβ /Cc
1	2	3	4	5	6	7
Фоновый						
д.Калтай смешанный лес						
04.06.2015	2,16	0,97	3,13	2,23	2,04	1,53
18.06. 2015	2,77	1,09	3,88	2,49	2,63	1,47
27.06.2015	3,09	1,17	4,26	2,64	2,71	1,57
02.07.2015	3,12	1,24	4,36	2,51	3,08	1,41
19.07. 2015	3,19	1,26	4,45	2,53	3,02	1,47
28.07.2015	3,24	1,28	4,52	2,53	3,12	1,44
1	2	3	4	5	6	7
05.08.2015	3,77	1,35	5,12	2,79	3,43	1,49
23.08.2015	4,66	1,44	6,1	3,33	4,22	1,45
06.09.2015	3,80	1,41	5,21	2,69	3,48	1,75
20.09.2015	2,28	1,38	3,66	1,65	2,11	1,73

01.06.2016	2,44	0,89	3,33	2,74	2,25	1,48
16.06.2016	2,86	0,92	3,78	3,01	2,54	1,49
01.07.2016	2,97	0,94	3,91	3,15	2,69	1,45
14.07.2016	3,68	1,09	4,77	3,37	3,44	1,39
31.07.2016	3,99	1,14	5,13	3,50	3,58	1,43
17.08.2016	4,83	1,33	6,16	3,63	4,76	1,29
30.08.2016	3,62	1,27	4,89	2,85	3,57	1,37
18.09.2016	1,53	1,19	2,72	1,28	1,33	2,05
03.10.2016	1,38	1,08	2,46	1,27	1,28	1,92
Деревни, поселки, села						
д. Кисловка, смешанный лес						
лес 27.072014	1,59	0,69	2,29	2,28		
лес, ЛЭП 27.07.2014	0,63	0,31	0,94	2,007		
с. Тимирязево, смешанный лес						
04.06.2015	1,51	0,85	2,36	1,77	1,73	1,36
18.06.2015	1,83	1,03	2,86	1,77	1,95	1,46
26.06. 2015	2,08	1,23	3,31	1,69	2,23	1,48
02.07.2015	2,39	1,37	3,76	1,74	2,43	1,54
10.07.2015	2,87	1,63	4,50	1,76	2,97	1,51
27.07.2015	3,18	1,84	5,02	1,72	3,33	1,50
05.08.2015	3,05	1,78	4,83	1,71	3,40	1,42
20.08.2015	2,94	1,61	4,55	1,82	3,06	1,48
03.09.2015	2,45	1,36	3,81	1,80	2,76	1,38
18.09.2015	2,13	1,16	3,29	1,83	2,74	1,20
01.06.2016	0,97	0,45	1,42	2,15	1,05	1,35
17.06.2016	1,09	0,52	1,61	2,09	1,25	1,29
29.06.2016	1,31	0,65	1,96	2,01	1,64	1,19
14.07.2016	1,20	0,73	1,93	1,64	1,54	1,25
02.08.2016	1,09	0,76	1,85	1,43	1,32	1,40
16.08.2016	0,88	0,56	1,44	1,57	0,97	1,48
07.09.2016	0,74	0,67	1,41	1,10	0,89	1,58
18.09.2016	0,65	0,52	1,17	1,25	0,83	1,69
05.10.2016	0,43	0,36	0,79	1,19	0,56	1,41
д. Аникино, смешанный лес						
16.05.2015	0,73	0,399	1,13	1,83	0,92	1,23
01.06.2015	1,46	0,497	1,956	2,93	1,73	1,13
14.06.2015	0,96	0,36	1,326	2,66	1,23	1,08
28.06. 2015	2,67	0,869	3,54	3,08	2,89	1,07
13.07. 2015	2,12	0,74	2,86	2,86	2,74	1,04
Дорожные магистрали						
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим»						
19.05.2015	0,68	0,35	1,03	1,94	0,77	1,34
01.06. 2015	1,09	0,57	1,66	1,91	1,22	1,36
14.06.2015	1,12	0,59	1,71	1,89	1,29	1,32
27.06.2015	1,38	0,79	2,17	1,89	1,55	1,40
1	2	3	4	5	6	7
02.07.2015	1,63	0,88	2,51	1,85	1,79	1,40
10.07.2015	1,93	1,08	3,01	1,78	2,17	1,38
27.07.2015	2,09	1,34	3,43	1,55	2,49	1,37
05.08.2015	2,01	1,21	3,22	1,66	2,30	1,39

23.08.2015	1,89	1,16	3,05	1,63	2,03	1,50
06.09.2015	1,78	1,08	2,86	1,64	1,95	1,46
20.09.2015	1,39	0,95	2,34	1,46	1,61	1,45
19.05.2016	0,47	0,25	0,72	1,88	0,53	1,35
01.06.2016	0,61	0,32	0,93	1,90	0,68	1,36
16.06.2016	0,78	0,43	1,21	1,81	0,92	1,31
01.07.2016	0,92	0,51	1,43	1,80	1,12	1,27
14.07.2016	1,87	1,15	3,02	1,62	2,18	1,38
01.08.2016	1,81	1,09	2,90	1,66	2,03	1,42
16.08.2016	1,67	1,03	2,70	1,62	1,91	1,41
01.09.2016	1,55	0,95	2,50	1,63	1,87	1,33
18.09.2016	1,32	0,83	2,15	1,59	1,73	1,24
05.10.2016	0,784	0,50	1,28	1,51	1,02	1,52
Парки и зоны отдыха						
питомник СибГМУ						
18.07.2014	1,36	0,55	1,91	2,48	1,36	1,40
28.07.2014	1,90	0,42	1,32	2,12	1,40	0,94
15.10.2014	0,21	0,069	0,27	2,99	0,21	1,28

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, парки, села; - дорожные магистрали, СЗЗ предприятий, улицы города; - парки и зоны отдыха.

В наших исследованиях установлено, что содержание фотосинтетического пигмента хлорофилла в листьях подорожника большого из разных мест сбора варьировало от 0,27±0,02 до 6,16±0,05мг/г. Закономерности содержания пигментов в течение периода вегетации по местам сбора были идентичны. Так установлено, что содержание хлорофилла α и отношение Cα/Cβ постепенно увеличивается в независимости от места произрастания растения по мере их развития приблизительно до момента полного формирования листовой пластинки и начала цветения, после чего снижается. Данный факт также был отмечен в работах других исследователей [5, 13, 15, 48, 65, 66]. Возникающие отклонения от описанной схемы интенсивности фотосинтеза в первую половину вегетации связаны с воздействием на растения различных факторов, таких как интенсивные, продолжительные осадки, высокая и низкая (ниже 10ºС) температура окружающего воздуха, которые приводят к снижению интенсивности фотосинтеза, что подтверждает данные других авторов [88, 92, 108, 117, 121, 122].

Пиковое значение уровней хлорофилла в образцах с повышенной техногенной нагрузкой (дорожные магистрали) наблюдается на один-полтора месяца раньше по сравнению с фоновыми и условно-чистыми, что можно объяснить более ранним старением этих образцов в результате деструктивных изменений в условиях повышенной нагрузки.

Содержание хлорофилла α, β и каротиноидов в нашем исследовании было больше в фоновых образцах, образцах из деревень, сел и поселков Томского района, по сравнению с образцами из парков и зон отдыха и мест с повышенной техногенной нагрузкой (дорожные магистрали). Вероятно это может быть связано с тем, что загрязнение окружающей среды ТМ, в т.ч. запыление растений зон с промышленной и транспортной нагрузкой снижает поглощение наиболее активных для фотосинтеза лучей спектра, вызывая нарушения в пигментном комплексе растений [53].

Загрязнение воздуха приводит к снижению отношения хлорофилла α/β, характеризующего потенциальную фотохимическую активность, что наблюдается на примере образцов с дорожно-транспортной развязки.

Очевидно, что в условиях загрязнения среды значительнее всего уменьшалось содержание хлорофилла β, что может быть связано с тем, что при действии стресс-факторов переход хлорофилла α в β затруднен в меньшей степени, чем образование хлорофилла β.

***

Проведена оценка качества сырья подорожника большого, мать-и-мачехи, рябины обыкновенной, почек сосны, произрастающих на территории Томского района по содержанию основных действующих веществ.

При этом установлено, что высококачественное сырье подорожника большого, мать-и-мачехи, рябины обыкновенной, почек сосны, с высоким содержанием действующих веществ можно заготавливать в окрестностях деревень, поселков и сел Томского района (д. Калтай, д. Наумовка, д. Кисловка, д. Аникино, п. Степановка, п.Зональная станция, с. Тимирязево, д. Коларово, п. Заварзино).

В большинстве случаев сырье не соответствующее требованиям действующей ГФ по содержанию БАВ, было заготовлено в некоторых парках и зонах отдыха, находящихся в пригородной и городской черте.

При изучении влияния техногенного загрязнения на содержание БАВ установлено, что:

- в листьях подорожника большого и мать-и-мачехи по мере увеличения уровня загрязнения содержание суммы ПС снижается;

- в некоторых образцах листьев подорожника, заготовленных в СЗЗ предприятий, вблизи дорожных магистралей, на улицах города, сумма ПС соответствует требованиям действующей ФС. Это дает основание для пересмотра нижней границы показателя «содержание суммы ПС» в сторону его увеличения;

- загрязнение влияет на фракционный состав полисахаридного комплекса. В образцах подорожника большого и мать-и-мачехи из фонового района, населенных пунктов Томского района, парков и зон отдыха характерно преимущественное накопление Гц В; в образцах из мест с повышенной техногенной нагрузкой (дорожные магистрали и улицы города) характерным является преимущественное накопление Гц А или ВРПС;

- на содержание антоцианов в плодах рябины обыкновенной уровень загрязнения влияния не оказывает;

- содержание эфирного масла в почках сосны снижается по мере увеличения загрязнения, достигая минимальных значений в образцах с повышенной техногенной нагрузкой, что можно рассматривать в качестве маркера экологической чистоты сырья;

- изучение компонентного состава 20 образцов эфирных масел, проведенное методом ГЖХ показало, что наибольшую долю в составе эфирных масел составляют фракция монотерпенов (60,71–84,36%), из них кислородсодержащих 6,09-12,19%. При этом суммарная доля монотерпенов в составе эфирных масел коррелирует с освещенностью и уровнем загрязнения, увеличиваясь по мере снижения загрязненности и достигая максимальных

значений в образцах из фонового района. Установлено, что наиболее значительно изменяется содержание кислородсодержащих монотерпенов, доля которых по мере снижения уровня загрязненности снижается, а в образцах с повышенной техногенной нагрузкой их доля увеличивается как в целом, в составе эфирного масла, так и в составе монотерпеновой фракции. Доля α-пинена в составе монотерпеновой фракции эфирных масел образцов из мест с повышенной техногенной нагрузкой увеличивается, по сравнению с образцами из фонового района.

Из 20 образцов эфирных масел почек сосны, заготовленных на территории Томского района Томской области, 18 можно отнести к «кареновому» хемотипу (13,38-35,43%).

- загрязнение влияет на содержание хлорофилла и каротиноидов. При этом содержание хлорофилла α, β и каротиноидов больше в фоновых образцах по сравнению с образцами из деревень, сел и поселков Томского района, парков и зон отдыха, дорожных магистралей, что может быть связано с нарушением в пигментном комплексе растений в условиях промышленной и транспортной нагрузки.

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ (АНАТОМИЧЕСКИХ) И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО

Изменения в биохимических процессах приводят к анатомическим и морфологическим трансформациям в растительном организме. В результате кратковременного или долговременного воздействия стресс-факторов у растений могут изменяться внешние (морфологические) признаки. В условиях длительного или постоянного воздействия загрязнителей на растения происходят серьезные изменения анатомической структуры. И это не случайно, а связано с тем, что анатомические и морфологические особенности растения играют большую роль в развитии устойчивости растений, формировании ответной реакции на стресс факторы. Строение покровных тканей, сосудистой системы, размер и количество устьиц, толщина кутикулы, наличие воскового налета, покровных волосков, двигательные и физиологические реакции, выработка защитных веществ играют огромную роль в создании защитного экрана от палящих лучей солнца, низких и высоких температур, поражения тяжелыми металлами, вредителями и др. [9].

Оценку воздействия загрязнения на морфологические и анатомические признаки проводили на примере листьев подорожника. Морфологические и анатомические признаки ЛРС исследовали по методикам ОФС и ФС ГФ XIII издания [157]. Полученные результаты представлены в таблицах 15, 16 и рисунках 5, 6.

Анализ внешних признаков большинства образцов не выявил их несоответствия действующей ФС на листья подорожника большого по форме, цвету листьев, краю листа, характеру обрыва черешка. Только в нескольких образцах листьев, собранных вблизи дорожно-транспортной развязки имели место отклонения в цвете сырья, ржавые пятна, признаки хлороза и микробного обсеменения (табл.15).

Рис. 4. Листья подорожника большого (фоновый район д. Калтай)

Рис. 5. Листья подорожника большого (дорожная развязка на г.Северск и ООО «Нефтехим»)

Кроме традиционно описанных в ФС внешних призанков дополнительно нами было изучено влияние загрязнения на количество листьев, длину междоузлия, длину и ширину листовой пластинки и др. Для этого измеряли ширину и длину трех средних листьев вместе с черешком от трех экземпляров подорожника, взятых с каждой площадки. При этом длина

Таблица 15

Результаты изучения внешних признаков образцов листьев подорожника большого с разных мест сбора

Внешние признаки сырья	Место и сроки сбора	Листья	
		длина с черешком, см	ширина,см
1	2	3	4
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. Цвет зеленый, без бурых пятен и точек	д. Калтай, смешанный лес 19.07.15	15,19±0,52	7,43±0,08
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет буровато-зеленый	д. Кисловка, смешанный лес 27.07.2014	8,83 ± 0,13	4,11 ±0,09
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый	д. Кисловка, лес, 20 м от ЛЭП 27.07.2014	7,49 ± 0,01	3,32 ± 0,11
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками, суженными в широкий черешок различной длины. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый или желтовато-зеленый	п.Степановка, смешанный лес 04.08.2014	16,31 ±0,51	8,44 ± 0,22
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние с продольными дугообразными жилками, суженными в широкий черешок различной длины. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый	с.Тимирязево, смешанный лес 03.07.2014	7,13± 0,33	3,11±0,02
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными жилками, суженные в широкий черешок различной длины. Цвет зеленый и буро-зеленый	д. Наумовка 27.07.2014	10,21± 0,33	5,32±0,08
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками, суженные в широкий черешок различной длины. Цвет зеленый с желтоватым оттенком и бурыми пятнами	д. Наумовка 28.09.2014	11,15±0,48	5,36±0,23

1	2	3	4
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет преимущественно буро-зеленый с желтовато-зелеными пятнами	СХК-15 01.08.14	17,14± 0,31	10,67±0,13
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый, буро-зеленый	СЗЗ ООО «Томскнефтехим» 15.09.13	8,61 ± 0,49	4,55 ± 0,10
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками, суженными в широкий черешок различной длины с остатками темных нитевидных жилок. Цвет зеленый и буро-зеленый	пр. Комсомольский – ул. Пушкина 16.08.2014	13,27± 0,73	7,08 ± 0,12
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый и желтовато-зеленый с редкими буроватыми пятнами	Иркутский тракт 37 07.07.14	11,0 ± 0,36	4,32±0,08
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. Цвет буро-зеленый с редкими бурыми пятнами	дорожная развязка на г. Северск и ООО Томскнефтехим» 30.07.2014	22,54±0,65	10,27±0,82
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет преимущественно зеленый с желтовато-зелеными пятнами	СХК Завод разделения изотопов 25.07. 2014	12,36±0,54	6,07±0,28
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый и буро-зеленый	аллея на пр.Кирова / ул. Вершинина 24.07.2014	8,82±0,92	4,30±0,28

1	2	3	4
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками, суженные в широкий черешок. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленовато-коричневый с вкраплениями желтого. На листьях есть черные пятна и мелкие отверстия	питомник СибГМУ 15.10.2014	8,01 ± 0,19	3,30 ±0,07
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый с редкими вкраплениями желто-зеленого	питомник СибГМУ 18.07.2014 28.07.2014	9,72 ± 0,31	6,07 ±0,08
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый и буро-зеленый	Парковая зона Новособорной площади 23.07. 2014	7,28±0,88	3,33±0,24
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет листьев зеленый с редкими буро-зелеными вкраплениями	Парковая зона Буфф-сада 20.07.2014	8,29±0,71	4,65±0,52
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние с продольными дугообразными жилками, суженными в широкий черешок различной длины с остатками темных нитевидных жилок. Цвет зеленый и буро-зеленый	п.Зональная станция 04.07. 2014	15,21 ±0,63	7,67 ±0,09
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый и буро-зеленый	с. Парабель 07.2014	8,38±0,73	4,13±0,44
Цельные, широкояйцевидные, цельнокрайние, с продольными дугообразными жилками. В месте обрыва черешка видны длинные остатки темных нитевидных жилок. Цвет зеленый	дАникино 20.07.2014	13,41±0,49	7,07±0,24

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки, села; - дорожные магистрали, СЗЗ предприятий, улицы города; - парки и зоны отдыха

и ширина листьев образцов из фонового района, деревень, сел, поселков оказалась меньше, или имела такие же размеры, как и у образцов из районов подверженных техногенному воздействию (табл.15). Это несколько противоречит данным литературы, согласно которым длина и ширина листовой пластинки видов, подверженных техногенному загрязнению значительно снижается [19]. Возможно, что в нашем исследовании на изменение длины и ширины листовой пластинки влияние оказали иные экологические факторы (затененность, степень увлажнения почвы и другие).

Следующим этапом исследования стало изучение анатомических признаков листьев подорожника большого разных мест сбора (табл.16, рис.5,6). Микроскопический анализ всех образцов показал присутствие основных анатомо-диагностических признаков, подтверждающих подлинность сырья и регламентируемых ФС «Подорожника большого листья». К основным диагностическим признакам относятся: наличие на верхней стороне листа многоугольных клеток эпидермиса с прямыми стенками; на нижней стороне - эпидермиса со слабоизвилистыми стенками; складчатой местами кутикулы; округлых устьиц аномоцитного типа на обеих сторонах листа; простых и головчатых волосков, образующих в местах прикрепления розетку из 6-9 клеток; простых волосков многоклеточных, гладких, конической формы с расширенным основанием, часто оборваны. Головчатые волоски двух типов: на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой – встречаются по всей поверхности с обеих сторон листа, реже встречаются головчатые волоски на многоклеточной ножке с шарообразной или овальной одноклеточной головкой [157].

Как следует из представленного в нормативной документации описания, в нем не регламентируется количество устьиц, головчатых и простых волосков. А для простых волосков даже отмечена их редкость. Однако анализ образцов из разных мест сбора показал, что их количество в

Таблица 16

Результаты подсчета среднего количества устьиц, головчатых и простых волосков

Место сбора сырья	Дата сбора сырья	Нижняя сторона листа			Верхняя сторона листа		
		Среднее количество на 1см^2			Среднее количество на 1см^2		
		устьиц	головчатых волосков	простых волосков	устьиц	головчатых волосков	простых волосков
Иркутский тракт 37	07.07.2014	237,2±17,3	38,7±4,1	28,0±3,8	162,1±16,1	15,3±1,3	2,3±0,8
пр.Комсомольский ул.Пушкина	16.08.2014	236,3±18,9	38±4,4	17,3±1,04	144,2±12,3	21,1±2,4	4,7±0,2
аллея на пр.Кирова	24.07.2014	239,9±21,1	41,7±3,8	18,45±1,4	157,3±12,7	23,4±2,1	6,9±0,54
дорожная развязка на г. Северск и ООО «Томскнефтехим»	30.07.2014	276,2±22,2	56,2±4,2	26,9±2,1	157±13,6	32±3,1	17,3±1,7
	19.05.2015	261,3±21,5	38±3,5	14±1,2	145,6±12,4	23,4±2,1	12,8±1,2
	01.06.2015	274,2±20,1	42,3±3,9	12,4±1,2	158,7±13,2	24±2,3	14,4±1,2
	14.06.2015	276,4±21,2	44,6±3,8	36,6±2,3	158,4±12,5	29,5±2,8	19,8±1,8
	27.06.2015	272,9±21,4	47,9±3,9	26,6±2,1	155,6±12,8	30,2±2,9	6,4±0,3
	10.07.2015	289,1±19,4	50,7±5,0	36,2±2,6	168,2±13,6	31,4±2,8	13,4±0,9
	27.07.15	291,5±23,4	41±3,8	24±2,2	165±15,5	23,4±2,2	16,4±1,3
	05.08.2015	294,0±22,3	42±4,1	38,2±3,4	177±14,1	25±2,1	15,6±1,4
	23.08.2015	293±25,1	44,5±4,2	19,2±1,5	169±14,4	29±2,5	9,1±0,8
	06.09.2015	297,5±23,3	47,0±4,5	36,2±2,9	165±13,1	30±2,9	19,6±1,7
	20.09.2015	292,1±21,4	50,0±4,9	26,6±2,1	167±14,2	28±2,6	11,2±1,1
СХК – 15	01.08.2014	235,6±16,8	44,2±4,3	37,1±4,7	172±16,9	21,2±1,8	32,9±10,8
СХК завод разделения изотопов	25.07.2014	234,3±19,7	39,8±3,4	34,5±2,1	166,8±14,3	16,3±1,5	29,2±1,61
д. Калтай, смешанный лес	27.07.2014	165±17,8	21,9±4,0	9,6±1,6	98,4±10,9	12,5±1,2	3,65±1,4
	18.06.2015	172,5±18,2	22,2±3,5	8,8±1,6	100,3±12,0	13,7±2,7	4,8±2,9
	02.07.2015	175,4±17,1	23,4±3,2	4,8±1,5	100,6±13,2	14,9±1,8	3±1,5
	19.07.15	174,1±16,9	27,5±4,0	6,2±1,1	102±13,1	13±1,2	3±1,6
	05.08.2015	172,7±17,3	15,4±1,8	0	107±12,8	6±0,42	0
	23.08.2015	177,5±17,9	31,7±4,2	8,6±1,2	108±12,7	12±1,1	4±1,2
	06.09.2015	170,4±16,8	32,6±3,3	5,6±1,1	103±13,3	13±1,2	4,8±1,4
	20.09.2015	170,2±15,3	26,3±2,9	9,8±0,8	103±12,9	14±1,3	3,8±1,1

питомник СибГМУ	18-28.07.14	196,4±15,5	24,7±2,7	27±1,7	136,3±11,1	14,6±1,3	14,6±1,2
	15.10.2014	195,5±15,8	21,9±1,8	13,5±4,2	113,6±11,4	19,8±1,8	6,8±0,8
п.Зональная станция, смешанный лес	04.07.2014	195±18,1	19,7±1,4	9±0,6	133,2±11,3	15,3±1,2	0,14±0,03
Парковая зона Буфф-сада	20.07.2014	183,7±17,3	35±2,9	13,6±1,2	149,4±9,7	15,3±1,5	4,5±0,4
Парковая зона Новособорной площади	23.07.2014	238,1±21,9	33,9±2,9	10,7±0,7	154,2±15,2	16,7±1,4	6,3±0,88
д.Аникино, смешанный лес	27.07.2014	245,8±22,7	34,5±3,1	14,8±1,4	152,8±9,9	16±1,4	3,8±0,4
	28.09.2014	248,4±23,1	37,8±3,5	16,5±1,2	155,1±11,3	17,9±1,3	7,5±0,7
	01.06.2015	239,6±21,7	33,2±3,1	11,4±0,7	151,2±11,2	15,1±1,3	5,2±0,5
	14.06.2015	237,1±19,6	34,1±2,9	4,8±0,4	155,7±10,7	15,3±1,4	1,2±0,01
	25.06.2015	241,6±19,9	34,7±2,8	20,6±1,6	162,1±12,9	15,4±1,5	8,6±0,7
	28.06.2015	243,4±21,2	34,6±3,1	19,6±1,3	158,4±12,1	15,4±1,3	5,6±0,4
	13.07.2015	244±23	35,5±3,2	7,0±0,5	155,2±11,8	14±1,2	2,8±0,1
д. Кисловка, смешанный лес	27.07.2014	161,9±14,6	11,8±1,5	13,5±2,2	119,5±11,7	16±2,0	18,2±1,4
	01.07.2015	160,7±14,2	12,3±1,6	6,2±0,3	110,5±12,1	14,7±1,3	2,2±0,3
д. Кисловка 20 м от ЛЭП	27.07.2014	131,3±14,0	8,1±0,5	4±0,07	90,2±10,9	3,3±0,4	2,5±0,3
п.Степановка,смешанный лес	04.08.2014	199,1±19,6	34,2±3,9	13,1±1,2	140,3±12,2	15,7±1,2	3±0,2
с.Тимирязево, смешанный лес	03.07.2014	183,1±17,9	34,1±3,8	31±2,4	132,3±12,9	16±1,4	9,7±0,8
	04.06.2015	191,8±17,1	30±3,3	3,6±0,4	139,6±10,7	15,4±1,8	1,2±0,15
	18.06.2015	192±18,2	33,2±3,5	5,76±0,5	139,5±11,8	15,7±1,3	3,2±0,7
	02.07.2015	196±16,2	34,0±3,7	6,6±0,6	148±11,0	15,8±2,6	1,4±0,3
	10.07.2015	197±19,1	32,5±3,2	14,8±1,1	101±9,9	15,9±1,3	6,2±0,4
	27.07.2015	192±18,4	31±2,8	6,8±0,9	109±8,6	15,5±1,8	2±0,2
	20.08.2015	193±17,3	32±2,9	9,2±0,8	100±6,7	15,6±1,4	4,6±0,3
	03.09.2015	195±18,8	33±2,6	20,0±1,8	108±6,3	15,8±1,6	12,4±1,1
	18.09.2015	192±18,1	32±3,1	13,8±1,2	100±7,8	16±1,5	8,2±0,7
д. Наумовка, смешанный лес	27.07.2014	231,3±21,7	29,8±2,7	42,7±0,3	154,2±13,8	13,8±1,1	21,2±2,1
	28.09.2014	234,7±20,3	37,1±3,4	37,5±3,2	155,4±12,6	19,2±1,7	24,8±1,29

Обозначения: - фоновые образцы; - деревни, поселки,села; - дорожные магистрали, СЗЗ предприятий, улицы города; - парки и зоны отдыха

отдельных случаях, в образцах с повышенной техногенной нагрузкой (дорожные магистрали) не вписывается в определение «редко».

Согласно данным, представленным в таблице 16 среднее число простых волосков на 1 см^2 может варьировать от 0 до 42,7 на нижней стороне листа, и от 0 до 32 на верхней стороне листа соответственно. При этом наибольшее количество трихом от 12 до 38 на нижней стороне листа и от 6 до 19,8 на верхней стороне листа соответственно наблюдается в образцах, подверженных техногенному стрессу. Кроме того, в некоторых образцах с дорожной развязки были обнаружены фрагменты гифов грибов (рис. 6). В образцах из фонового района количество простых волосков не превышало 10 и 4,8 на нижней и верхней стороне листа соотвественно.

Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении головчатых волосков: их количество увеличивалось по мере увеличения техногенной нагрузки с 15-32 в образцах из фонового района до 38-56 в образцах из мест с повышенной техногенной нагрузкой на нижней стороне листа, и с 6-15 до 23-32 на верхней стороне листа соответственно. Полученные нами результаты не совпадают с данными, полученными исследователями Воронежского государственного университета при изучении подорожника большого, произрастающего в г.Воронеже и его окрестностях [16].

В нашем исследовании подтвердились данные литературы о том, что близость ЛЭП приводит к снижению количества трихом в листьях [6]. Так, в образцах собранных в д.Кисловка в непосредственной близости от ЛЭП, было отмечено снижение количества простых и головчатых волосков, как на верхней, так и нижней сторонах листа.

Количество устьиц в нашем исследовании в образцах из загрязненных мест, по сравнению с фоновыми и населенными пунктами Томского района, увеличивается, что соотносится с данными литературы.

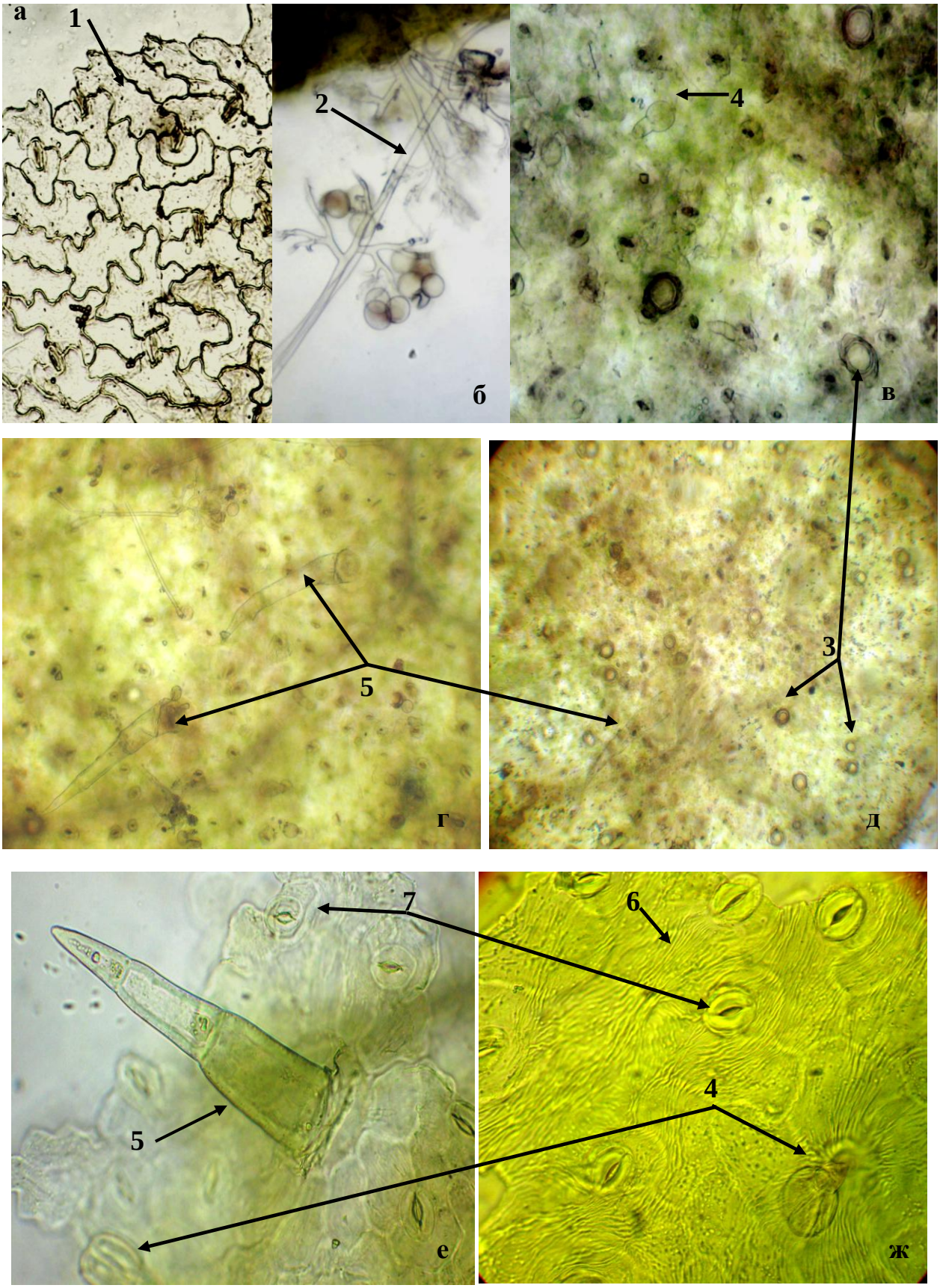


Рис. 6. Микропрепараты листьев подорожника большого (а-д - дорожная развязка на ООО «Томскнефтехим» и г.Северск; е, ж - фоновый район, д. Калтай): 1 – эпидермис с устьицами; 2 – гифы грибов; 3 – место прикрепления простого волоска; 4 – головчатый волосок; 5 – простой волосок; 6 – складчатость кутикулы; 7 – устьица).

***

Таким образом, детальное изучение микропризнаков листьев подорожника из разных с экологической точки зрения мест сбора, позволило дополнить описание микроскопических (анатомических) признаков листьев в проекте фармакопейной статьи пределами обнаружения основных анатомо-диагностических признаков, характерных для сырья подорожника большого, произрастающего в экологически благоприятных районах, которое можно рекомендовать к применению в медицинской практике. Эти пределы следующие: количество устьиц на нижней стороне листа не более 200, количество головчатых волосков не более 35 на 1см^2, количество простых волосков не более 10 на 1см^2, а на верхней стороне – устьиц не более 130, головчатых волосков не более 16 на 1см^2, количество простых волосков не более 5 на 1см^2, без видимых утолщений стенок клеток эпидермиса.

ГЛАВА 6. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ

Требования к качеству растительного сырья, лекарственных средств и других продуктов на его основе излагаются в различных видах нормативной документации: фармакопейных статьях, технических условиях, других стандартах качества (ГОСТ, ОСТ). Эти нормативные документы являются инструментом, гарантирующим качество, эффективность и безопасность лекарственных средств, парафармацевтической и другой продукции, обращающейся на рынке Российской Федерации. Поэтому вопросы стандартизации, контроля качества, разработки и совершенствования нормативной документации продолжают оставаться актуальными. Кроме того, как было показано нами в гл.4, гл.5, техногенное загрязнение оказывает влияние на морфологические и анатомические признаки видов, содержание и состав БАВ, что позволяет предложить ряд изменений в соответствующие разделы действующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье.

6.1. Совершенствование методов стандартизации листьев подорожника большого

Листья подорожника большого являются официнальным лекарственным сырьем, нормативная документация на которое представлена в Государственной Фармакопее XIII издания. Существующая концепция при создании новых отечественных фармакопей состоит в реализации основополагающих принципов, заключающихся в соответствии современному развитию научно-технического прогресса и гармонизации с международными фармакопеями. Действующая фармакопейная статья на листья подорожника в ГФ XIII издания полностью дублирует аналогичную уже устаревшую статью ГФ XI издания, за исключением того, что в качестве сырья, кроме цельного и измельченного сырья, рассматривается еще и порошок. Описательная часть фармакопейной статьти (основные диагностические признаки, качественные реакции, числовые показатели) не

претерпели изменений. Поэтому нами была поставлена задача совершенствования фармакопейной статьи, в части усовершенстовования методик количественного определения действующих веществ, диагностики сырья и повышения требований к его качеству и безопасности.

При разработке проекта ФС руководствовались методическими рекомендациями «Правила составления, изложения и оформления стандартов качества на фармацевтические субстанции», действующими ОФС и ФС ГФ XIII издания, монографиями международных фармакопей: японской (JP), европейской (PhEur), британской (BP), а также результатами собственных исследований.

Микроскопический анализ сырья проводили в соответствии со статьей «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья лекарственных растительных препаратов» (ГФ XIII).

По результатам исследований анатомических (микроскопических) признаков (гл.5) нами предлагается внести ряд уточнений в описательную часть соответствующего раздела фармакопейной статьи.

Химический анализ. Одним из наиболее важных вопросов при разработке нормативной документации, является вопрос о выборе метода, группы веществ для стандартизации растительного сырья и препаратов.

Как показывают результаты нашего исследования и данные литературы (табл.17), листья подорожника большого содержат различные вещества и группы БАВ: гликозид аукубин, генипозидовая кислота, мелиттозид, каталпол и другие иридоиды, дубильные вещества, аскорбиновую кислоту, каротин, витамины *K,U*, флавоноиды (производные флавона), фенолокислоты (фумаровая, сиреневая, феруловая, салициловая, бензойная, коричная, хлорогеновая, неохлорогеновая, ванилиновая, п-кумаровая, протокатеховая, кофенйая), фенилэтаноиды (актеозид, плантамайозид, изоплантамайозид), маннит, сорбит, органические кислоты (фумаровая, винная, лимонная), тритерпеновые кислоты (олеаноловая, урсоловая), полисахариды (слизи,

пектиновые вещества), аллантоин, холин, хлорофилл, микро- и макроэлементы [16, 76, 80,83].

Таблица 17

Содержание биологически активных веществ в листьях подорожника большого

Группы БАВ, %	Содержание, % от массы абс.-сух. сырья
полисахариды	9,09 – 47,37
флавоноиды	0,67 – 1,36
гидроксикоричные кислоты	0,97 – 1,66
каротиноиды мг/%	0,13 – 2,04
аскорбиновая кислота мг/%	202,31 – 289,46
горькие гликозиды (иридоиды)	0,23 - 0,42
хлорофилл	3,00-9,22

Критериями выбора группы БАВ для стандартизации являются: роль в фармакологическом действии вида, максимальный выход при экстрагировании тем или иным растворителем, гармонизация с международными фармакопеями. Кроме того, нами в качестве дополнительного критерия предлагается учитывать чувствительность группы БАВ к загрязнению окружающей среды.

Говоря о зарубежных фармакопеях, следует отметить, что монографии на подорожник большой в них нет, однако имеются монографии на систематически близкие виды: подорожник блошный (семена), подорожник ланцетный (листья, стебли), подорожник азиатский (трава, семена) [119,130, 140]. Количественное определение в п.ланцетном, например, проводят спектрофотометрическим методом по содержанию производных дигидроксикоричных кислот в пересчете на актеозид (не менее 1,5%), а в подорожнике азиатском определяют экстрактивные вещества (не менее 14%).

Руководствуясь перечисленными выше критериями, а также тем, что предлагаемый метод количественного определения должен отвечать принципам точности, воспроизводимости, доступности и нетрудозатратности, стандартизацию листьев подорожника большого нами предлагается проводить спектрофотометрическим методом по содержанию гидроксикоричных кислот, хлорофиллу и ПС.

6.1.1. Разработка методики количественного определения гидроксикоричных кислот

Для разработки методики использовали 6 образцов сырья. На предварительном этапе изучили электронные спектры экстрактов, полученных с использованием водно-этанольных смесей. Извлечения, полученные с использованием 40% и 70% этанола, имеют общие максимумы поглощения в области 290-295нм, 324-330нм, обусловленные присутствием гидроксикоричных кислот и флавоноидов. Кроме того, в видимой области спектров 70% извлечения присутствуют выраженные максимумы поглощения в области 414, 435, 467, 663нм, характерные для хлорофилла (рис.7). Сравнение спектральных характеристик стандартных веществ феруловой, протокатеховой, кофейной, хлорогеновой кислот и 40%, 70% этанольных извлечений показало близость основных максимумов поглощения в диапазоне волн УФ - области спектра 292, 330 нм близок максимумам поглощения кофейной и хлорогеновой кислот. В связи с тем, что хроматографически установлено присутствие хлорогеновой кислоты в следовых количествах, нами было принято решение проводить количественное определение гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту.

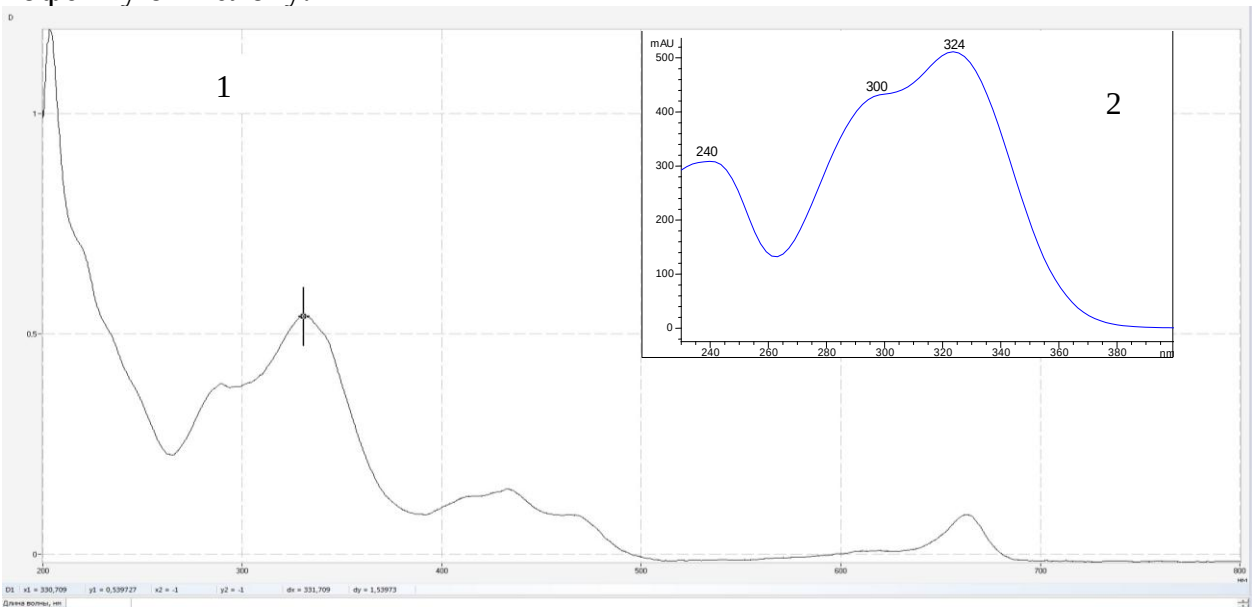


Рис. 7. Электронный спектр 70% этанольного экстракта подорожника большого (1) и стандартного образца кофейной кислоты (2).

Для определения оптимальных параметров методики количественного определения гидроксикоричных кислот, отрабатывали такие параметры экстракции, как степень измельченности исходного сырья, экстрагент, сооношение сырье: экстрагент, температура процесса экстрагирования, время экстракции и ее кратность (табл.18).

Как следует из представленных в таблице данных оптимальными следует считать: размер частиц сырья – 1мм; концентрация этилового спирта – 70%; время экстрагирования - 30 минут; экстракция однократная; сооношение сырье: экстрагент – 1:90; температура - 100ºС.

Таблица 18

Результаты определения оптимальных условий экстракции гидроксикоричных кислот

Условия	№ образца / содержание ГКК, %					
	68	77	58	37	52	62
1	2	3	4	5	6	
Экстрагент						
вода	0,81	0,52	0,83	0,37	0,75	0,12
40 % этанол	1,21	0,77	0,97	0,84	1,99	1,29
70% этанол	2,48	1,58	2,02	1,26	2,46	1,63
95% этанол	1,23	0,51	0,69	0,57	0,62	0,54
Соотношение сырьё: экстрагент						
1:50	1,71	1,31	1,25	0,57	0,75	0,92
1:70	2,01	1,47	1,77	0,88	1,72	1,15
1:90	2,48	1,58	2,02	1,26	2,46	1,68
1:100	1,79	1,32	1,83	0,97	1,78	1,54
Размер частиц сырья, мм						
Менее 1	1,85	1,47	1,83	0,97	1,78	1,54
1	2,48	1,58	2,02	1,26	2,46	1,68
3	1,48	0,52	1,77	0,88	0,75	0,92
Время экстрагирования,мин						
15	2,00	1,47	1,75	0,90	2,12	1,15
30	2,48	1,58	2,02	1,26	2,46	1,68
45	2,23	1,41	1,88	1,02	2,23	1,54

1	2	3	4	5	6	7
Количество экстракций						
1	2,48	1,58	2,02	1,26	2,46	1,68
2	2,33	1,47	1,89	0,99	2,27	1,54
3	2,12	1,11	1,77	0,89	1,97	1,45
Температурный режим, ºС						
60	1,86	1,31	1,77	0,88	1,72	1,25
80	2,11	1,47	1,83	1,01	1,81	1,52
100	2,48	1,58	2,02	1,26	2,46	1,68

Методика. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм. Точную навеску измельченного сырья, около 0,5 г помещали в стеклянную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 90 мл спирта 70%, и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Колбу и бумажный фильтр промывали с 10 мл 70% этанола, фильтрат помещали в мерную колбу.

Объединенные извлечения в мерной колбе при необходимости доводили до метки спиртом 70%, перемешивали (р-р А).

2 мл полученного р-ра А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора спиртом 70% до метки (р-р Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 330нм. В качестве раствора сравнения использовали 70% спирт этиловый.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в процентах (Х) в пересчете на кофейную кислоту и абсолютно-сухую массу сырья вычисляли по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A} \times \mathrm{V}_1 \times V_2 \times 100}{m \times 735 \times (100 - W) \times V_3}$$, где:

А – оптическая плотность р-ра Б;

m – масса сырья в гр;

V_1 – объем р-ра А (100), мл;

V_2 – объем р-ра Б (25), мл;

V_3 – объем аликвоты р-ра А (2), мл;

W – влажность сырья в %;

735 - удельный показатель поглощения ($E_{1см}^{1\%}$) кофейной кислоты.

Валидация методики определения ГКК

Пригодность разработанной нами методики прямого спектрофотометрического определения суммы гидроксикоричных кислот в листьях подорожника подтверждена путем ее валидации по правильности, прецизионности, линейности [141,157].

Повторяемость определяли одним методом, в одной лаборатории, одним оператором, с использованием одного спектрофтометра СФ-2000 в течение короткого интервала времени. Результаты, полученные при статистической обработке, представленные в таблице 19 достоверны (RSD 1,55% не превышает критерия приемлемости 5%). Рассчитанное значение стандартного отклонения (SR) должно составлять менее 1%, в нашем случае оно составило 0,389%, что подтверждает прецизионность методики.

Таблица 19

Метрологические характеристики методики

Оптическая плотность		0,68664	0,65961	0,70013	0,68652	0,6272	0,69251	
Содержание ГКК, %		2,48	2,45	2,53	2,48	2,42	2,50	
Среднее значение содержания ГКК, % 2,48								
$X_{ср}$ ГКК должно быть не менее 2,48 (принятое опорное значение)								
f	$X_{ср}$	S^2	S	S_x	S_R,%	P (%)	t (P,f)	RSD,%
6	2,48	0,0014799	0,03847	0,015708	0,389	95	2,57	1,55

Результаты оценки воспроизводимости методики представлены в таблице 20. Меры прецизионности не превышают критериев приемлемости

Таблица 20

Результаты оценки внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости методики

		Лаборатория № 1			Лаборатория № 2			Лаборатория № 3		
Образцы		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Оптическая плотность A_1		0,68664	0,6770	0,6911	0,67532	0,68021	0,6807	0,6796	0,68652	0,6946
Оптическая плотность A_2		0,65961	0,6695	0,6784	0,68053	0,67996	0,6832	0,6804	0,6272	0,6904
Оптическая плотность A_3		0,70013	0,6824	0,7009	0,6730	0,68250	0,6799	0,6902	0,69251	0,7031
Содержание ГКК, X_1		2,48	2,449	2,500	2,443	2,461	2,4630	2,459	2,48	2,513
Содержание ГКК, X_2		2,45	2,442	2,454	2,462	2,460	2,472	2,462	2,42	2,498
Содержание ГКК, X_3		2,53	2,469	2,536	2,435	2,470	2,4601	2,497	2,50	2,544
$X_{ср}$ ГКК,		2,496	2,446	2,452	2,446	2,463	2,465	2,472	2,47	2,518
№ лаб-рии	уровни	$X_{ср}$	S^2		S	S_x	S_r,	P,%	t (P,f)	RSD,%
1	1	2,496	0,001699844		0,04062	0,02872	1,41	95	2,57	1,65
1	2	2,446	0,00168999		0,041109	0,02390	1,72	95	2,57	1,15
1	3	2,452	0,002349922		0,048476	0,034278	1,41	95	2,57	1,97
2	1	2,446	0,0000385066		0,006205	0,004387	1,41	95	2,57	0,25
2	2	2,463	0,0000309914		0,005567	0,0062052	0,89	95	2,57	0,23
2	3	2,465	0,0000385045		0,0062052	0,0043876	1,41	95	2,57	0,18
3	1	2,472	0,000446999		0,02114237	0,0149500	1,41	95	2,57	0,85
3	2	2,47	0,00174999		0,041833	0,02958068	1,41	95	2,57	1,69
3	3	2,518	0,000550498		0,0234627	0,01659079	1,41	95	2,57	0,93
Результаты оценки воспроизводимости методики										
Уровень	*p*	$X_{ср}$	S^2		S	S_x	S_r% метода		S_{RR}% метода	
1	3	2,46	0,000064		0,008	0,00565690	1,39		3,84	
2	3	2,458	0,0001		0,01	0,00707113				
3	3	2,486	0,00033999		0,018439	0,03038				

Примечание: f- число степеней свободы, X ср -среднее выборки, S ² -дисперсия, S- стандартное отклонение, S_x стандартное отклонение среднего результата (стандартная ошибка), S_r- относительное стандартное отклонение расчетной величины, P- доверительная вероятность, t (p,f) -критерий Стьюдента, S*r* - стандартное отклонение повторяемости метода, S_R - стандартное отклонение воспроизводимости метода.

для внутрилабораторной прецизионности 1,39% < 5%, и для межлабораторной прецизионности 3,84% < 10%, что подтверждает удовлетворительную воспроизводимость методики.

Правильность методики устанавливали измерением содержания ГКК в в растворах после добавления к исследуемому раствору необходимого количества стандарта. В качестве критерия приемлемости выступал средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%. Его средняя величина должна находиться в пределах 100±5%.

Результаты представлены в таблице 21. В предлагаемой нами методике процент восстановления находился в пределах от 99,31% до 103,00%, его средняя величина составила 100,44%.

Таблица 21

Результаты определения правильности методики

Уровни	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Оптическая плотность	0,69	0,68	0,69	0,67	0,68	0,68	0,68	0,67	0,69
Содержание ГКК, мг	2,49	2,46	2,49	2,42	2,46	2,46	2,46	2,42	2,49
Добавлено РСО КК, мг	0,005	0,005	0,005	0,010	0,010	0,010	0,015	0,015	0,015
Ожидаемое содержание ГКК, мг	2,495	2,465	2,495	2,43	2,47	2,47	2,475	2,435	2,505
Оптическая плотность	0,700	0,687	0,685	0,665	0,683	0,6820	0,686	0,68	0,697
фактическое содержание ГКК, мг	2,533	2,485	2,478	2,406	2,471	2,467	2,482	2,46	2,522
Ошибка, % ($M_{факт}/M_{ожид}$x100%)	103,00	100,81	99,31	99,01	100,04	99,87	100,28	101,02	100,68

Для определения линейности методики нами рассчитан коэффициент корреляции на 4 уровнях концентраций от принятого опорного значения (2,48%) и построен график зависимости, представленный на рисунке 8. Установлено, что график зависимости имеет линейный характер, а коэффициент корреляции близок к единице (0,999).

Таким образом, валидационная оценка показывает, что предлагаемая нами методика количественного определения ГКК в листьях подорожника большого методом прямой спектрофотометрии является правильной, воспроизводимой и линейной.

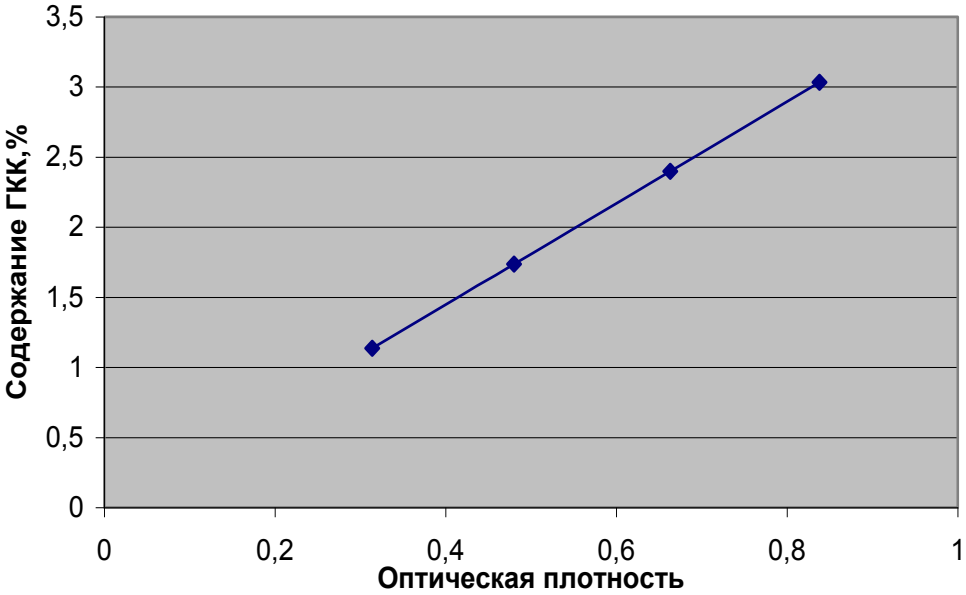


Рис. 8. График определения линейности методики

С целью определения допустимого предела показателя «содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту» в листьях подорожника было проанализировано 35 образцов листьев, заготовленных в разных по степени техногенной нагрузки местах (дорожные магистрали, фоновые, условно-чистые), и в т.ч. серийных. Результаты, представленные в таблице 22, показывают, что содержание ГКК в листьях подорожника колеблется от 0,53% до 2,85%. При этом на содержание ГКК значительное влияние оказывает степень загрязнения, так по мере увеличения техногенной нагрузки в образцах с дорожной развязки содержание ГКК снижается. В связи с вышеизложенным в проект ФС предлагаем установить данный показатель на уровне «не менее 1,5%».

Таблица 22

Содержание суммы ГКК в листьях подорожника большого, %

№ образца	Характеристика образца	Значение оптической плотности	Содержание ГКК, %
1	2	3	4

1	2	3	4
Дорожные магистрали			
Дорожная развязка на Северск и ООО «Томскнефтехим»			
26	10.07.2015	0,164054	0,59
28	05.08.2015	0,16355	0,59
30	06.09.2015	0,188961	0,68
31	30.09.2015	0,147391	0,53
32	19.05.2016	0,227079	0,82
34	16.06.2016	0,391051	1,41
35	01.07.206	0,400176	1,45
37	01.08.2016	0,349435	1,26
39	01.09.2016	0,406037	1,45
40	18.09.2016	0,289658	1,05
41	05.10.2016	0,349531	1,26
Деревни, поселки, села			
с. Тимирязево, смешанный лес			
49	18.06.2015	0,665	2,41
51	02.07.2015	0,769578	2,78
52	10.07.2015	0,679674	2,46
54	20.08.2015	0,518474	1,88
55	03.09.2015	0,59879	2,17
56	18.09.2015	0,413661	1,50
58	17.06.2016	0,55956	2,02
60	14.07.2016	0,521901	1,88
62	16.08.2016	0,543429	1,96
64	18.09.2016	0,540278	1,95
65	05.10.2016	0,465905	1,68
Фоновые			
д. Калтай, смешанный лес			
68	02.07.2015	0,686647	2,48
70	05.08.2015	0,758464	2,74
72	06.09.2015	0,530308	1,92
73	20.09.2015	0,552022	1,99
74	01.06.2016	0,493344	1,78
75	16.06.2016	0,690955	2,50
77	14.07.2016	0,437421	1,58
79	17.08.2016	0,661292	2,39
81	18.09.2016	0,530427	1,93
82	03.10.2016	0,446543	1,62
Серийные образцы АО «Красногорсклексредства»			
	51017	0,395738	1,59
	81016	0,389988	1,62
	71017	0,565838	2,05

6.1.2. Разработка методики количественного определения хлорофилла

Изучение спектральных характеристик извлечений из листьев подорожника большого, полученных с помощью различных экстрагентов (ацетон, этиловый спирт 95%, гексан) наблюдали несколько максимумов поглощения в области 290-295нм, 330-335нм, 505-507 нм, 530-535нм и 663-665 нм. Основной максмум поглощения в области 663-665 нм, совпадающий с максимумом поглощения стандартного образца хлорофилла β (663±2) наблюдали во всех извлечениях (рис. 9). В дальнейшей работе с учетом известной токсичности таких растворителей как ацетон и гексан, наш выбор при дальнейшей работе по разработке методики был сделан в пользу 95% этилового спирта.

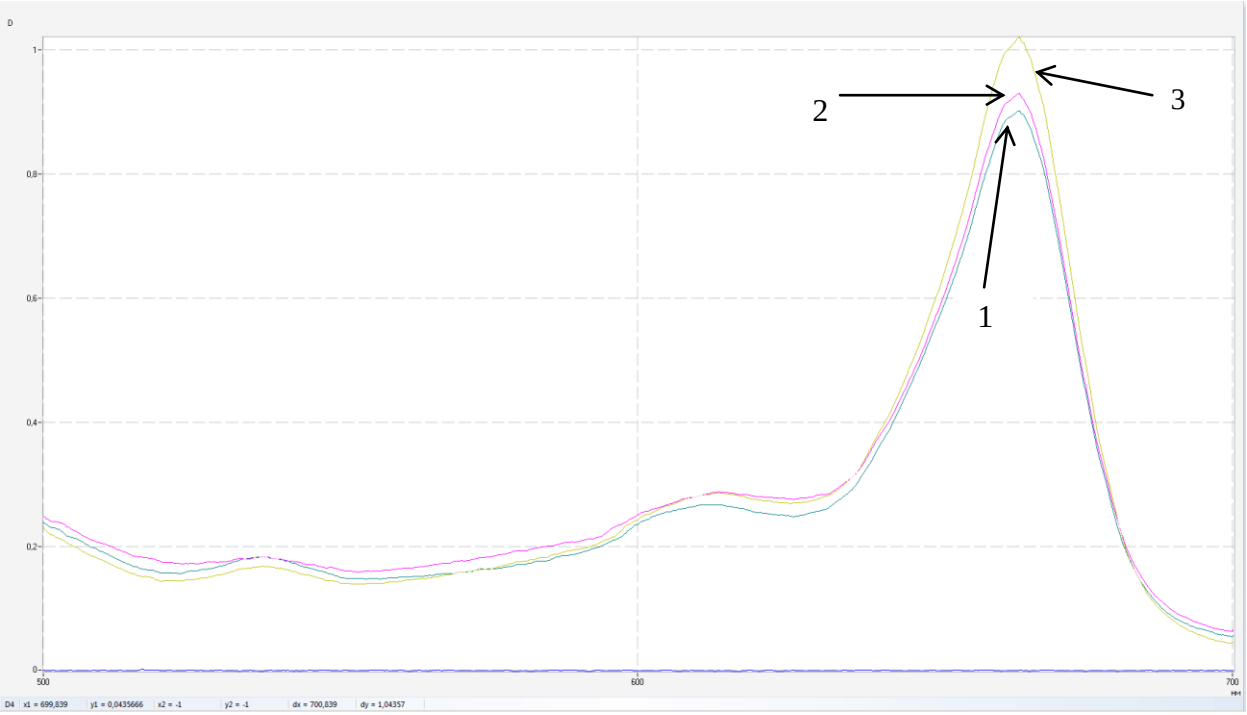


Рис. 9. Спектр извлечений листьев подорожника большого (1-ацетоновое, 2 –гексановое, 3 –этанольное 95%)

При разработке оптимальных параметров данной методики также отрабатывали различные параметры процесса экстракции (табл.20). Как показали результаты, оптимальными параметрами являются: размер частиц сырья – 2мм; экстрагент – 95%-ый этиловый спирт, температура водяной

бани - 100ºС, экстракция двукратная, время экстрагирования 45 минут; сооношение сырье: экстрагент – 1:100.

Методика. Около 0,5 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 95%, нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Извлечение повторяли еще раз, используя 50 мл спирта 95%, при этом бумажный фильтр также переносили в колбу для экстракции. Объединенные извлечения в мерной колбе доводили до метки спиртом 95%, одновременно промывая колбу, в которой проводят экстракцию и перемешивали (р-р А).

2 мл полученного раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора спиртом 95% до метки (р-р Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 663±5 нм. В качестве раствора сравнения использовали 95% спирт этиловый.

Содержание хлорофилла в процентах (Х) в пересчете на абсолютно-сухую массу сырья вычисляли по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{D \times V_1 \times V_2 \times 100}{m \times 944{,}5 \times (100 - W) \times V_3},$$ где:

D – оптическая плотность раствора Б; m – масса сырья, г; V_1 – объем раствора А (100), мл; V_2 – объем раствора Б (25), мл; V_3 – объем аликвоты р-ра А (2), мл; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 944,5 – удельный показатель поглощения $E_{1см}^{1\%}$ хлорофилла при 663±5нм.

Аналогичным образом (приведенным выше 6.1.2. для гидроксикоричных кислот) была подтверждена воспроизводимость и верность предлагаемой методики количественного определения хлорофилла (табл.23-25). При этом коэффициент корреляции составил более 0,995. Относительное стандартное отклонение (RSD, %) составило менее 5%.

Таблица 23

Результаты определения оптимальных условий экстракции хлорофилла

Условия экстракции	Содержание хлорофилла, %									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Экстрагент спирт, %										
40	1,53	1,70	2,98	2,97	2,92	1,11	1,08	1,10	2,89	1,08
70	2,03	2,13	3,09	3,09	3,03	1,90	1,95	1,88	3,06	1,74
95	2,11	2,25	3,12	3,19	3,15	2,01	2,00	1,95	3,09	1,99
Соотношение сырья и экстрагента										
1:30	1,55	1,72	2,93	2,88	2,82	1,14	1,10	1,11	2,83	1,10
1:50	2,09	2,16	3,07	3,02	2,99	1,94	1,95	1,90	2,99	1,78
1:100	2,13	2,27	3,12	3,19	3,15	2,03	2,00	1,99	3,08	2,01
Размер частиц сырья, мм										
1	1,88	1,90	2, 78	3,00	3,01	1,68	1,79	1,70	2,86	1,68
2	2,03	2,09	3,16	3,11	3,13	1,83	1,81	1,82	3,07	1,75
3	1,99	1,97	3, 08	3,03	3,01	1,75	1,72	1,75	2,99	1,78
Время экстракции										
15 минут	1,56	1,50	2,97	2,91	2,98	1,16	1,13	1,15	2,86	1,20
30 минут	2,02	2,06	3,27	3,21	3,14	2,01	2,01	1,94	3,13	1,99
45 минут	2,14	2,29	3,34	3,32	3,19	2,08	2,04	2,02	3,20	2,05
Количество экстракций										
Однократная	2,21	2,14	3,63	3,59	3,54	1,59	1,67	1,60	3,44	1,62
Двухкратная	2,97	2,95	3,93	3,74	3,65	2,57	2,56	2,56	3,69	2,57
Трехкратная	2,93	2,88	3,9	3,72	3,61	2,52	2,51	2,52	3,67	2,53

Таблица 24

Результаты оценки воспроизводимости методики количественного определения хлорофилла

	Лаборатория № 1			Лаборатория № 2			Лаборатория № 3		
Уровни (концентрации)	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
Объем аликвоты р-ра А (мл)	2	2,5	3	2	2,5	3	2	2,5	3
Оптическая плотность D_1	0,616	0,675	0,716	0,539	0,616	0,708	0,549	0,578	0,606
Оптическая плотность D_2	0,597	0,628	0,729	0,547	0,604	0,727	0,520	0,585	0,620
Оптическая плотность D_3	0,627	0,674	0,732	0,548	0,588	0,698	0,545	0,563	0,598
Содержание хлорофилла, X_1	1,73	1,90	2,02	1,52	1,73	1,99	1,54	1,62	1,71
Содержание хлорофилла, X_2	1,68	1,77	2,05	1,54	1,70	2,04	1,46	1,65	1,74
Содержание хлорофилла, X_3	1,77	1,90	2,06	1,54	1,65	1,96	1,53	1,58	1,68
Среднее значение хлорофилла, $X_{ср}$	1,74	1,85	2,04	1,53	1,69	2,00	1,51	1,62	1,71

Метрологические характеристики

№ лабор.	f	$X_{ср}$	S^2	S	S_x	S_r,%	P,%	t (P,f)	**RSD**,%
1	2	1,74	0,000511108	0,0226077	0, 0130680	1,73	95	2,57	1,93
1	2	1,85	0,005699948	0,075498	0,04364	1,71	95	2,57	6,06
1	2	2,04	0,000449999	0,021213203	0,012261967	1,73	95	2,57	2,19
2	2	1,53	0,000149999	0,01224744	0,00707944	1,73	95	2,57	2,03
2	2	1,69	0,003299996	0,0574456	0,033205564	1,72	95	2,57	4,99

2	2	2,00	0,000230466	0,015181138	0,00913953	1,66	95	2,57	1,03
3	2	1,51	0,0021499914	0,0463680	0,026802365	1,72	95	2,57	4,56
3	2	1,62	0,0025	0,05	0,0289017341	1,73	95	2,57	4,58
3	2	1,71	0,0009	0,03	0,017341	1,73	95	2,57	2,61

Результаты оценки воспроизводимости методики

Уровень	p	$X_{ср}$	S_r по уровню	S_R по уровню	S_R метода	S_r %, метода
1	3	1,88	0,000447	0,000812	3,38	1,71
2	3	1,74	0,000603	0,001434		
3	3	1,61	0,000759	0,001725		

Таблица 25

Результаты определения правильности методики

Уровни (концентрации)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
V─ объем аликвоты р-ра А, мл;	2,00	2,00	2,00	2,50	2,50	2,50	3,00	3,00	3,00
Оптическая плотность, *D*	0,540	0,552	0,518	0,642	0,65	0,654	0,776	0,782	0,792
Содержание хлорофилла, г	1,52	1,55	1,459	1,81	1,83	1,84	2,18	2,20	2,23
Добавлено РСО хлорофилла, г	0,005	0,005	0,005	0,010	0,010	0,010	0,015	0,015	0,015
Содержание хлорофилла (ожидаемое), г	1,525	1,555	1,464	1,815	1,835	1,845	2,185	2,205	2,235
Оптическая плотность, D_1	0,66	0,677	0,615	0,878	0,855	0,84	1,06	1,08	1,082
Содержание хлорофилла (полученное), г	1,526	1,558	1,463	1,816	1,835	1,825	2,180	2,203	2,28
Отношение М полученное*100% / М ожидаемое,%	100,06	100,19	99,93	100,05	100	98,91	99,77	99,91	102,01

Примечание: f- число степеней свободы, X ср -среднее выборки, S^2 -дисперсия, S- стандартное отклонение, S_x стандартное отклонение среднего результата (стандартная ошибка), S_r- относительное стандартное отклонение расчетной величины, P- доверительная вероятность, t (p,f) -критерий Стьюдента, Δx -доверительный интервал среднего результата, ε- относительная ошибка среднего результата, *p*- количество лабораторий, участвовавших в совместном оценочном эксперименте, *m* –общее среднее значение по уровню, C-значение тестовой статистики Кохрена, при критических значениях (5%) 0,871 и (1%) 0,942 для *n*=3 и *p*=3, S*r* - стандартное отклонение повторяемости метода, S_R - стандартное отклонение воспроизводимости метода.

Правильность определяли путем проведения анализа одним аналитиком на одной серии сырья с одной концентрацией определяемого вещества, к которой добавляли разное количество стандарта. Критерием приемлемости являлся «выход», величина которого находится в пределах 98,91-102,01%.

На основании полученных результатов, методику определения хлорофилла спектрофотометрическим методом можно считать прошедшей валидацию, что позволяет включить ее в проект Фармакопейной статьи.

Данная методика апробирована на 35 образцах сырья, в том числе и серийных. Полученные результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26

Содержание хлорофилла в листьях подорожника большого, %

№ образца	Характеристика образца	Значение оптической плотности	Содержание, %
1	2	3	4
Дорожные магистрали			
Дорожная развязка на г.Северск и ООО «Нефтехим»			
26	10.07.2015	0,5934	1,67
28	05.08.2015	0,6762	1,92
30	06.09.2015	0,4776	1,34
31	30.09.2015	0,51	1,43
32	19.05.2016	0,2034	1,095
34	16.06.2016	0,622	1,75
35	01.07.206	0,3816	1,074
37	01.08.2016	0,6348	1,79
39	01.09.2016	0,6942	1,95
40	18.09.2016	0,6024	1,70
41	05.10.2016	0,369	1,04
Деревни, поселки, села			
с. Тимирязево, смешанный лес			
49	18.06.2015	0,9880	2,78
51	02.07.2015	0,6604	1,87
52	10.07.2015	0,5928	1,67
54	20.08.2015	0,6416	1,81
55	03.09.2015	0,6294	1,77
56	18.09.2015	0,5144	1,45
58	17.06.2016	0,4086	1,15
60	14.07.2016	0,472	1,32

1	2	3	4
62	16.08.2016	0,6876	1,94
64	18.09.2016	0,5376	1,51
65	05.10.2016	0,4914	1,38
Фоновые			
д. Калтай, смешанный лес			
68	02.07.2015	0,7434	2,09
70	05.08.2015	0,7144	2,01
72	06.09.2015	0,882	2,48
73	20.09.2015	0,7149	2,01
74	01.06.2016	0,8654	2,43
75	16.06.2016	0,8184	2,30
77	14.07.2016	0,8757	2,46
79	17.08.2016	1,0398	2,93
81	18.09.2016	0,945	2,66
82	03.10.2016	0,7465	2,10
Серийные образцы			
АО «Красногорсклексредства»			
	51017	0,8235	2,31
	81016	0,8964	2,52
	71017	0,87436	2,47

Содержание хлорофилла в разных образцах имеет диапазон от 1,07 до 2,93%, при этом отмечено более высокое содержание хлорофилла в образцах из фонового района по сравнению с образцами с дорожной развязки и условно-чистых. На основании этого считаем возможным установить норму содержания хлорофилла в листьях подорожника большого в проекте новой ФС на уровне «не менее 2,0%».

6.1.3. Разработка методики количественного определения полисахаридов

Как уже было отмечено в гл.4 действующая ФС на листья подорожника предполагает проведение стандартизации данного сырья по содержанию суммы полисахаридов классическим гравиметрическим методом, который не может дать действительной картины их содержания вследствие наличия примесей, а также трудоемок, длителен, имеет большие потери и большую относительную ошибку метода. Качество сырья, проявление фармакологической активности взаимосвязаны с множеством углеводных

составляющих полисахаридов, химическая природа которых весьма многообразна. При этом наиболее полно извлекаются в водную фазу при приготовлении настоя свободные восстанавливающие сахара, определение которых и является наиболее рациональным. Кроме того он является менее трудоемким, более точным, легко воспроизводимым. В связи с этим нами предложен спектрофотометрический метод определения полисахаридов в перечете на глюкозу. Результаты определения суммы ПС этим методом представлены в табл. 9 гл.4.

Методика. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм. Около 2,0 г сырья (т.н.) помещают в колбу со шлифом объемом 100 мл, прибавляют 50 мл воды, подкисленной 5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане 30 минут. По истечении этого времени колбу охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры, содержимое процеживают в мерную колбу объемом 100 мл через пять слоев марли. Остаток сырья промывают 10 мл воды очищенной. Марлю помещают в колбу с сырьем и экстракцию повторяют один раз выше указанным способом. Полученное извлечение процеживают через пять слоев марли в мерную колбу, промывают марлю, и доводят объем извлечения в колбе водой очищенной до метки (раствор А).

В колбу объемом 50 мл прибавляют 10 мл раствора А, и по каплям 40% раствор натрия гидроксида до получения раствора, имеющего pH 4,0-4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу объемом 50 мл и доводят объем раствора в колбе водой очищенной до метки (раствор Б). Раствор Б фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10-15 мл фильтрата.

В мерную колбу объемом 100 мл прибавляют 2,5 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната. В эту колбу помещают 5 мл фильтрата раствора Б, после чего колбу нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. По истечении времени колбу

охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры и доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор В).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната и 5 мл воды очищенной, помещенных в колбу объемом 100 мл. Колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут, затем охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры, доводя объем раствора водой очищенной до метки.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 470±5нм.

Содержание суммы ПС и свободных сахаров в сырье в пересчете на глюкозу и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A\times V_1\times V_3\times V_5\times 100}{m\times E_{1\%}^{1\tilde{n}\grave{i}}\times V_2\times V_4\times(100-W)}$$, где

A – оптическая плотность раствора В;

m – масса сырья, г;

V_1 – объема раствора А, мл;

V_2 –аликвота из раствора А, мл;

V_3 – объем раствора Б, мл;

V_4 – аликвота из раствора Б, мл;

V_5 – объем раствора В, мл;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

$E_{1\tilde{n}\grave{i}}^{1\%}$ - 273,24 – удельный показатель поглощения комплекса РСО глюкозы с пикриновой кислотой при 470 ± 5нм.

Как и в случае с методиками количественного определения гидроксикоричных кислот и хлорофилла была проведена статистическая обработка резульатов и валидация методики.

Содержание суммы ПС и свободных сахаров в образцах колебалось от 25,04 % до 25,63 % (табл. 27).

Таблица 27

Результаты определения суммы ПС

№ образца	Содержание ПС,% от массы абс. сухого сырья
17	25,27
18	25,55
49	25,04
66	25,07
67	25,63
АО «Красногорсклексредства» 51017	25,28

Таблица 28

Метрологическая характеристика методики

f	S^2	S	S_x	ΔX	P,%	t(P,f)	E,%	±ΔX
5	0,0690375	0,26275	0,1072467	0,2756	95,000	2,570	1,089	25,30 ± 0,27

Результаты статистической обработки (табл. 28) свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятности 95,00% находится в пределах ± 0,27. Ошибка методики составляет 1,089% и не превышает 5%.

В качестве рабочего стандартного образца (РСО) использовали субстанцию D-глюкозы моногидрата (ГОСТ 975-88, серия С705Н14), который с 1% раствором пикриновой кислоты в щелочной среде дает основной максимум поглощения при длине волны 470±5нм. Аналогичный максимум 470±5 нм дает водное извлечение из листьев подорожника с 1% раствором пикриновой кислоты (рис. 10). Удельный показатель $E^{1\%}_{1\,ñì}$ комплекса раствора РСО глюкозы с пикриновой кислотой при длине волны 470±5 нм составляет 273,24 ± 0,66.

Определение удельного показателя поглощения комплекса раствора РСО глюкозы с 1% раствором пикриновой кислоты

Построение калибровочного графика. Около 0,05 г (точная навеска) Рабочего стандартного образца (РСО) глюкозы (D-глюкоза моногидрат, ГОСТ, Россия), предварительно высушенного при температуре 60-65 ^{0}С в течение 2 ч (температура плавления D-глюкозы моногидрата 83,00 ^{0}С),

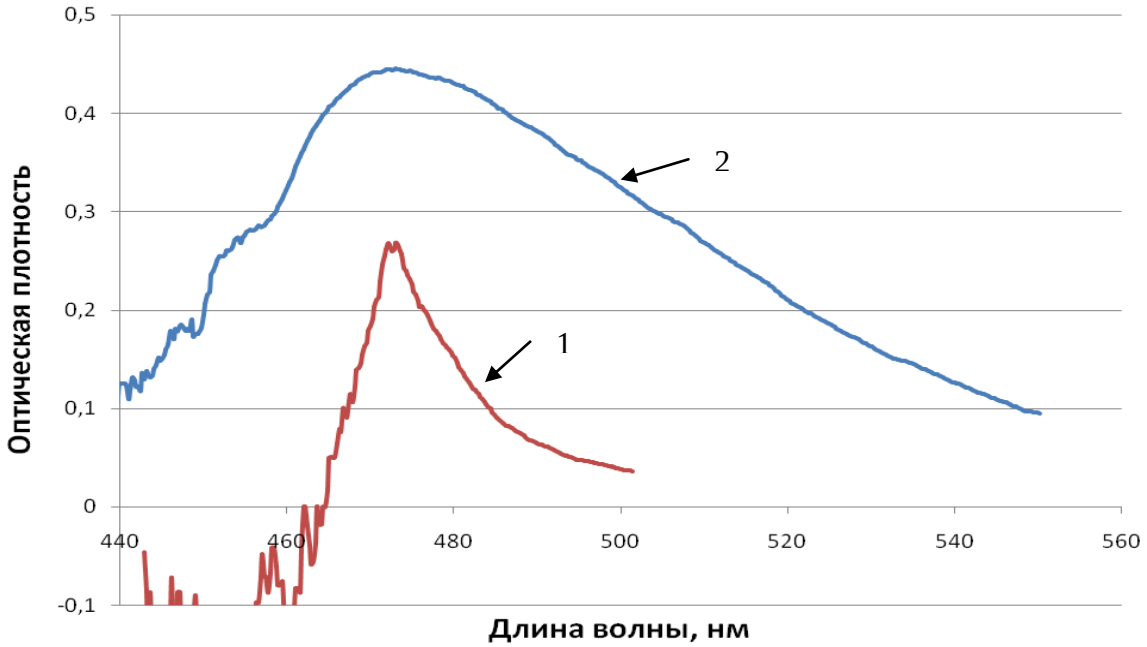


Рис.10 Спектры поглощения комплексов с пикриновой кислотой водного извлечения из листьев подорожника и раствора РСО глюкозы

1 – комплекс пикриновая кислота + водное извлечение из листьев подоожника;

2 - комплекс пикриновая кислота + раствор РСО глюкозы

растворяли в 100 мл воды очищенной в мерной колбе вместимостью 250 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, доводили объем раствора водой очищенной до метки и перемешивали (исходный раствор). Раствор использовали свежеприготовленным. В шесть мерных колб на 100 мл помещали по 2,50 мл 1% раствора пикриновой кислоты, затем по 7,50 мл 20% раствора натрия карбоната и по 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00 мл исходного раствора. Колбы с содержимым погружали на 10 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждали до комнатной температуры и доводили полученные растворы водой очищенной до метки (исследуемые растворы). Для приготовления раствора сравнения в мерную колбу на 100 мл помещали 2,50 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 7,50 мл 20% раствора натрия карбоната, 5,00 мл воды очищенной и погружали на 10 мин в кипящую водяную баню. Затем охлаждали до комнатной температуры и доводили полученный раствор водой очищенной до метки. Оптическую плотность

исследуемых растворов измеряли на спектрофотометре при длине волны 470-475 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для построения калибровочного графика на оси абсцисс откладывали количество РСО глюкозы в 1 мл спектрофотометрируемого раствора в граммах согласно таблице 29, а на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности (рис. 11,12).

Таблица 29

Концентрация РСО глюкозы и оптическая плотность раствора

№ п/п	Количество исходного раствора, мл	Количество РСО глюкозы в 1 мл спектрофотометрируемого раствора, г	Оптическая плотность
1	4	0,000006968	0,188
2	5	0,000008710	0,233
3	6	0,000010452	0,279
4	7	0,000012194	0,335
5	8	0,000013936	0,380
6	9	0,000015678	0,445

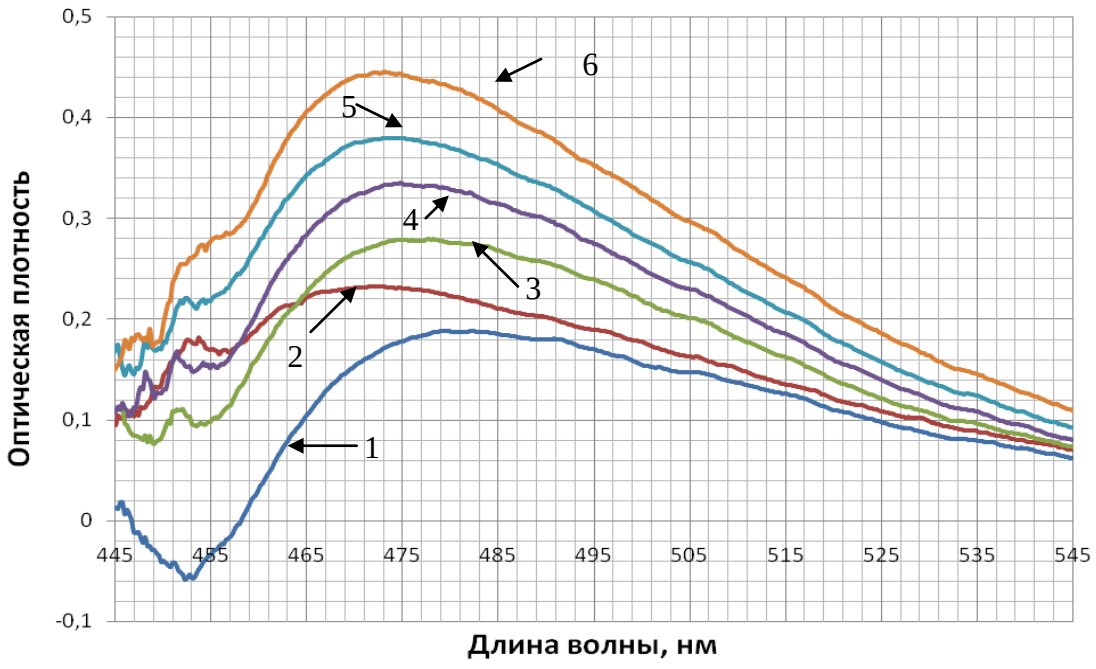


Рис. 11. Спектры поглощения комплексов с 1% раствором пикриновой кислоты серийных разведений раствора РСО глюкозы
1 – аликвота 4 мл; 2 – аликвота 5 мл;
3 – аликвота 6 мл; 4 – аликвота 7 мл;
5 – аликвота 8 мл; 6 – аликвота 9 мл.

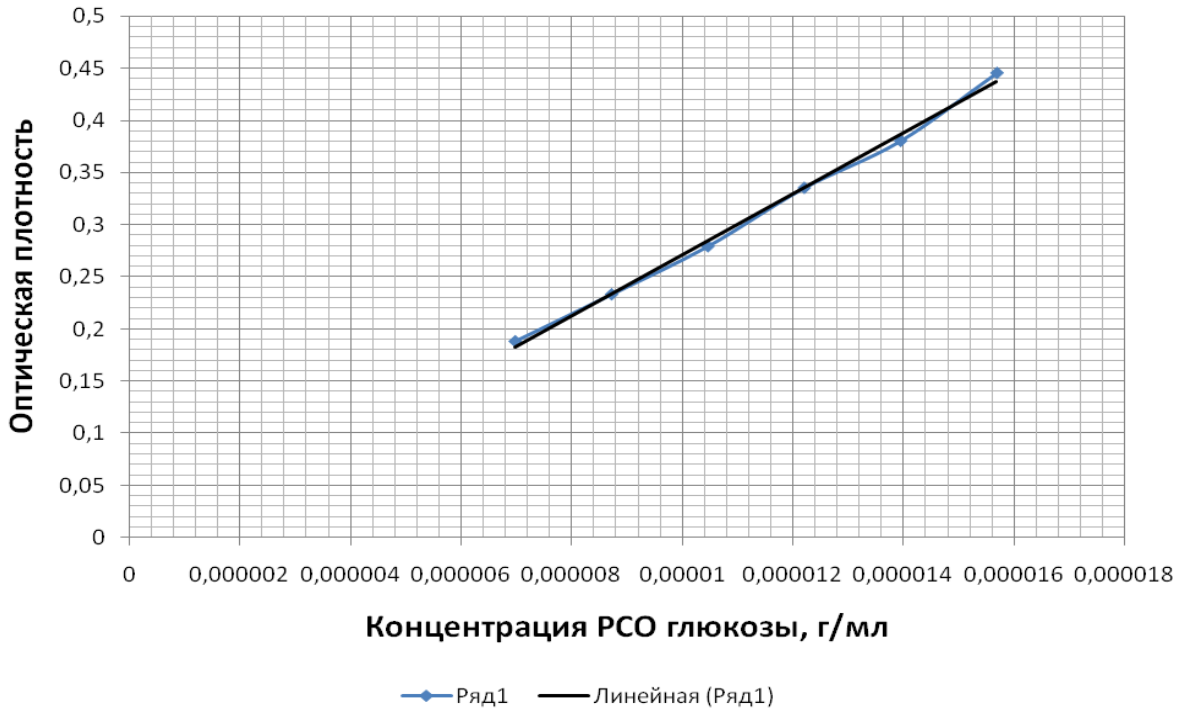


Рис. 12. Калибровочный график комплекса раствора РСО глюкозы с 1% раствором пикриновой кислоты

Значение удельного показателя поглощения ($E_{1\ см}^{1\%}$) комплекса раствора РСО глюкозы с 1% раствором пикриновой кислоты определяли по опытным данным серии спектрофотометрируемых растворов и калибровочному графику раствора РСО глюкозы различной концентрации (в %) по формуле (табл. 30):

$$E_{1\,см}^{1\%} = \frac{A}{C \times l}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность;

C – концентрация вещества в процентах;

L – толщина поглощающего слоя в сантиметрах.

Таблица 30

Расчет удельного показателя поглощения

№ п/п	Концентрация РСО глюкозы в 1 мл спектрофотометрируемого раствора, %	Оптическая плотность	Удельный показатель поглощения, %
1	0,00000720	0,190	263,89
2	0,00000755	0,200	264,90
3	0,00000790	0,210	265,82
4	0,00000825	0,220	266,67
5	0,00000860	0,230	267,44

6	0,00000895	0,240	268,16
7	0,00000930	0,250	268,82
8	0,00000960	0,260	270,83
9	0,00000990	0,270	272,73
10	0,00001025	0,280	273,17
11	0,00001060	0,290	273,58
12	0,00001095	0,300	273,97
13	0,00001130	0,310	274,34
14	0,00001165	0,320	274,68
15	0,00001200	0,330	275,00
16	0,00001230	0,340	276,42
17	0,00001265	0,350	276,68
18	0,00001300	0,360	276,92
19	0,00001335	0,370	277,15
20	0,00001370	0,380	277,37
21	0,00001405	0,390	277,58
22	0,00001440	0,400	277,78
23	0,00001470	0,410	278,91
24	0,00001505	0,420	279,07
25	0,00001540	0,430	279,22
26	*Среднее значение удельного показателя поглощения:*		**273,24**

При разработке методики анализа отрабатывали степень измельчения сырья, соотношение сырья и экстрагента, температурный режим экстрагирования, время и количество экстракций, объем гидролизанта, время гидролиза и образования комплекса с пикриновой кислотой при нагревании (табл. 31). Оптимальными параметрами методики являются: измельченность - 0,5 мм; соотношение сырья и экстрагента - 1:40, экстракция трехкратная; объем гидролизата при экстрагировании полисахаридов - 4 мл; время экстракции - 30 минут; водяная баня с температурой 90 ^{0}С; объем гидролизанта (HCl) - 3 мл; время гидролиза - 10 минут; время образования комплекса с пикриновой кислотой при нагревании - 10 минут.

Таблица 31

Влияние условий экстракции на выход полисахаридов

Условия экстракции	Содержание ПС, %					
	17	18	49	66	67	80
Размер частиц сырья, мм 0,5	20,22	20,55	19,24	20,17	20,63	22,30

1	17,95	17,55	16,43	17,98	19,35	17,64
2	14,00	14,07	13,87	14,13	13,83	13,76
Соотношение сырья и экстрагента 1:20	18,23	17,69	16,00	17,65	16,13	17,99
1:40	19,00	19,13	18,87	19,17	17,98	19,06
Температурный режим экстракции t^0 кипящей водяной бани	19,23	19,13	18,77	19,32	18,93	8,33
Время экстракции 15	14,21	13,00	11,98	11,64	12,46	12,33
30	16,99	14,56	13,98	14,33	14,00	13,86
45	12,21	12,00	11,98	12,36	12,49	12,41
60	11,48	11,13	10,96	11,49	11,07	10,54
Количество экстракций (30 минут) Однократная	14,45	14,37	14,13	13,99	13,07	14,65
Двухкратная	13,90	14,00	13,56	13,11	14,32	14,78
Трехкратная	18,62	18,24	17,99	17,13	18,00	18,36
Объем гидролизанта (HCl), мл 1	17,75	18,64	17,33	17,00	18,09	18,36
2	21,90	21,98	22,54	24,66	24,49	23,72
3	23,00	24,03	23,94	24,33	24,11	23,06
4	25,27	25,55	25,04	25,07	25,63	25,28
Время гидролиза, мин 5	17,01	17,12	16,98	16,64	17,34	17,22
10	21,90	21,41	20,64	20,38	21,37	21,13
15	14,93	14,69	15,13	14,47	14,39	15,00
20	13,79	13,33	14,09	13,97	13,17	14,00
Время образования комплекса с пикриновой кислотой при нагревании, мин 5	19,64	18,97	19,14	19,46	18,33	18,59
10	24,20	23,99	24,06	24,33	23,11	23,58
15	17,13	17,00	16,74	16,49	17,11	17,83
20	17,37	17,73	16,79	17,43	17,70	16,39

Валидация методики количественного определения суммы ПС

Линейность методики определяли на 4 уровнях концентраций от принятого опорного значения расчетной величины (табл.32). Растворы готовили путем разбавления и увеличения аликвоты в пределах 40-100%. Критерий приемлемости: коэффициент корреляции должен быть не менее 0,995. В ходе определения линейности методики установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации суммы ПС

25,16–26,68% и описывается уравнением y=4,008x+23,33, коэффициент корреляции близок к единице (0,99938) (рис.13), это свидетельствует о сильной линейной зависимости значения оптической плотности от концентрации действующих веществ в лекарственном растительном сырье.

Таблица 32

Результаты определения линейности

Уровни	Объём Аликвоты р-ра Б, мл	% от принятого опорного значения	Объем раствора В, мл	Оптическая плотность раствора В	Содержание суммы ПС в пересчете на глюкозу, %
1	2	40	100	0,432	25,16
2	3	60	100	0,480	25,28
3	4	80	100	0,663	25,98
4	5	100	100	0,838	26,68
Коэффициент корреляции					0,99938

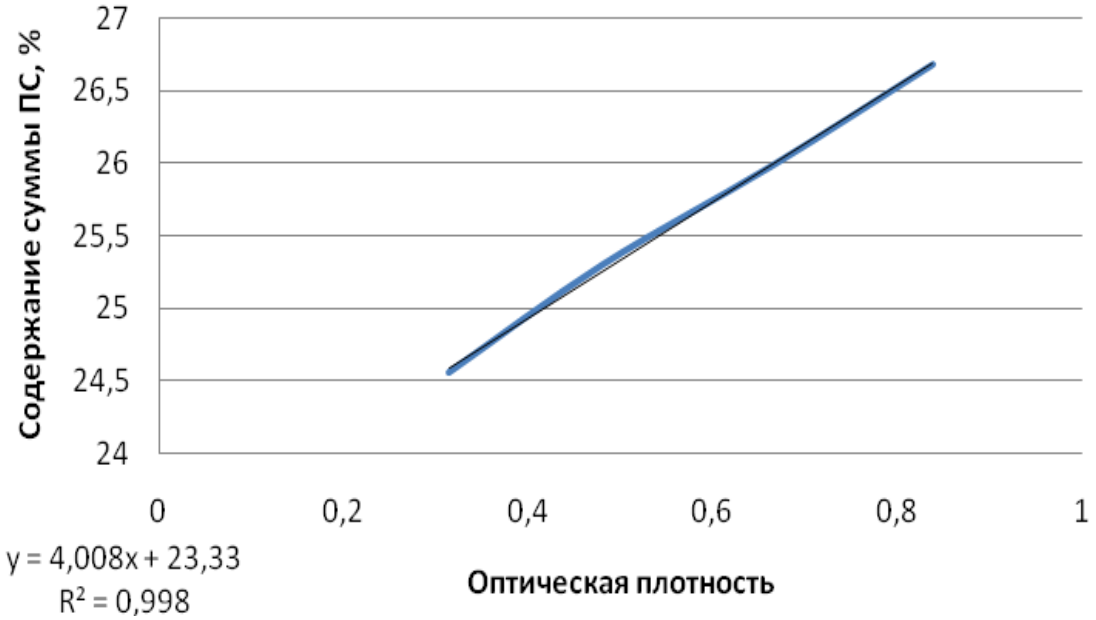


Рис. 13. График определения линейности методики

Повторяемость определяли путем проведения анализа одним аналитиком на одной серии в течение короткого промежутка времени в одинаковых условиях, с использованием одних и тех же реактивов и оборудования, число повторностей – 6. Относительное стандартное отклонение, выраженное в процентах (RSD, %), не должно превышать 10%. По результатам проведенных исследований RSD составило менее 5%. Полученные результаты представлены в таблице 33.

Таблица 33

Результаты определения повторяемости

№ измерения	Содержание суммы ПС в пересчете на глюкозу, %
1	25,27
2	25,55
3	25,04
4	25,07
5	25,63
6	25,28
Относительное стандартное отклонение **RSD**, %	1,089

Воспроизводимость определялась путем проведения анализа разными (двумя) аналитиками на одной серии сырья в разное время. Число повторностей для каждого аналитика (для одной серии) - 3, общее число повторностей – 6.

Относительное стандартное отклонение, выраженное в процентах (RSD, %), не должно превышать 10%. По результатам проведенных исследований RSD составило менее 10%. Полученные результаты представлены в таблице 34.

Таблица 34

Результаты определения воспроизводимости

Повторность	Аналитик	Содержание суммы ПС в пересчете на глюкозу, %
1	1	25,55
2	1	25,04
3	1	25,28
4	2	25,12
5	2	25,38
6	2	25,46
Среднее значение		25,31
Относительное стандартное отклонение RSD, %		0,83 %

Правильность определяли путем проведения анализа одним аналитиком на одной серии сырья с одной концентрацией определяемого

вещества, к которой добавляли разное количество стандарта. Число повторностей для каждого уровня -3. Критерием приемлемости являлся «выход», величина которого должна находиться в пределах 95-105%. По результатам проведенных исследований «выход» находился в пределах 95-105%. Полученные результаты приведены в таблице 35.

Таблица 35

Результаты определения правильности

Найдена сумма ПС в пересчете на глюкозу, мг	Добавлено глюкозы, мг	Ожидаемое содержание суммы ПС в пересчете на глюкозу, мг	Фактическое содержание суммы ПС в пересчете на глюкозу, мг	Выход, %
0,23964	-	-	-	-
Первый уровень	0,0005000 0,0005000 0,0005000	0,2401400 0,2401400 0,2401400	0,2421650 0,2421820 0,2422730	100,84 100,85 100,89
Второй уровень	0,0002500 0,0002500 0,0002500	0,2398900 0,2398900 0,2398900	0,2498880 0,2485690 0,2459720	104,15 103,62 102,54
Третий уровень	0,0001250 0,0001250 0,0001250	0,2397650 0,2397650 0,2397650	0,2448551 0,2449689 0,2456110	102,12 102,17 102,44
Четвертый уровень	0,0000625 0,0000625 0,0000625	0,2397025 0,2397025 0,2397025	0,2409852 0,2417640 0,2399859	100,54 100,86 100,12
Средний % выхода	101,76			

На основании полученных результатов, методику определения полисахаридов в листьях подорожника спектрофотометрическим методом можно считать прошедшей валидацию, что позволяет включить ее в проект Фармакопейной статьи и установить значение показателя содержание суммы полисахаридов в пересчете на глюкозу на уровне «не менее25%».

6.1.4. Разработка методики определения подлинности

ГФ XIII предлагает определение подлинности листьев подорожника по результатам качественных реакций на полисахариды и галактуроновую

кислоту. В зарубежных фармакопеях подлинность сырья определяют методом ТСХ по наличию на хроматограммах пятен аукубина и актеозида, в сравнении с соответствующими стандартными образцами.

Нами для определения подлинности сырья предлагается определение аукубина методом ТСХ (рис. 14). Для этого были разработаны условия его хроматографического анализа на пластинах с силикагелем «Kieselgel F_{254}» (Merk) в системе н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (7:1:2) в присутствии известного вещества аукубина при длинах волн 365/254 нм.

Методика. Аналитическую пробу листьев подорожника большого измельчали до частиц размером около 1 мм. Точную навеску (1,0 г) измельченного сырья помещали в плоскодонную коническую колбу объемом 50 мл, прибавляли 15 мл метилового спирта, и нагревали на водяной бане в

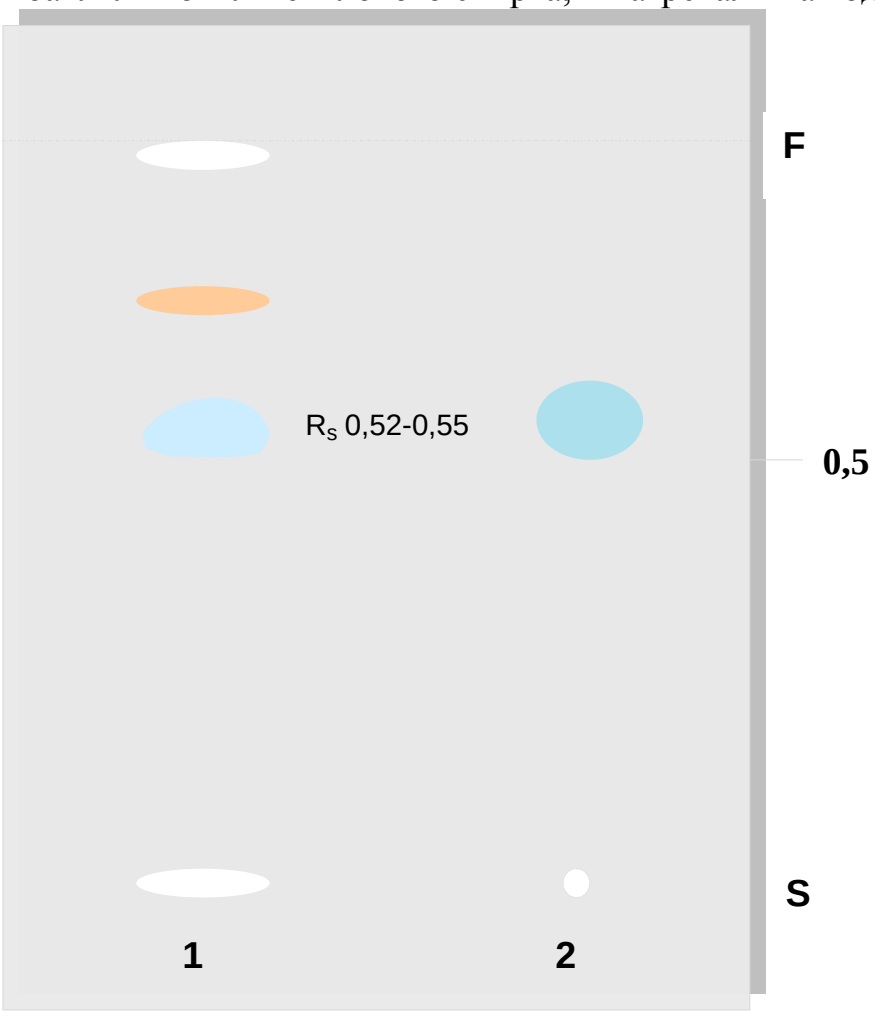


Рис.14. Схема ТС -хроматограммы извлечения листьев подорожника большого
1- исследуемое извлечение, 2 – раствор аукубина

течение 30 минут. По истечении времени полученное извлечение охлаждают, фильтруют. Охлажденное профильтрованное извлечение используют для нанесения на хроматографическую пластинку размером 10х10см в виде полосы длиной 15-20 мм. На расстоянии 2 см от пятна исследуемого раствора наносили в виде точки микропипеткой 10 мкл раствора известного вещества аукубина. Пластину с нанесенными образцами подсушивали на воздухе и хроматографировали при комнатной температуре в камере для восходящей хроматографии в системе растворителей: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (7:1:2) После прохождения растворами около 8 см, пластинку вытаскавали и подсушивали до удаления паров растворителя.

На хроматограмме (рис.14) проявилась основная зона адсорбции (R_s около 0,52-0,55) с голубой или темно-голубой флюоресценцией при 365нм. На хроматограмме видны и другие зоны адсорбции в виде пятен и полос.

6.1.5. Разработка товароведческих показателей

Числовые показатели / Испытания.

В разделе «Испытания» издания ГФ XIII на статью «Подорожника большого листья» содержатся следующие числовые показатели: влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, измельченность сырья, посторонние примеси (листья, изменившие окраску, кусочки листьев, изменивших окраску, цветочные стрелки, кусочки цветочных корзинок), орагническая примесь, минеральная примесь, тяжелые металлы, радионуклиды, остаточные количества пестицидов, микробилогическая чистота, экстрактивные вещества.

Европейская, Британская, Японская фармакопеи, по сравнению с Российской, содержат более ограниченный перечень числовых показателей, определяющих качество сырья. Так, качество п.азиатского, п.блошного и п.ланцетного определяют по следующим числовым показателям: зола общая (п.азиатский не более 15%, п.ланцетный максимум 14%, п.блошный максимум 4%), зола н/р в 10% р-ре HCl (п.азиатский не более 4%), влажность

(п. ланцетный максимум 10%, п.блошный максимум 14%), посторонние примеси (п.ланцетный листьев с измененной окраской максимум 5%, других посторонних примесей максимум 2%; п.блошный максимум 1%), экстрактивные вещества (п.азиатский водно-этанольный экстракт не более 14%) [119,130,140]. Несмотря на то, что перечень показателей в зарубежных фармакопеях значительно меньше, чем в отечественной, их числовые значения значительно отличаются от российских, и их можно охарактеризовать как более жесткие.

Определение *влажности* в нашем исследовании было проведено двумя способами: с помощью анализатора влажности «Элвиз 2» («ЭЛИЗА», Россия), и фармакопейным методом ГФ XIII.

Как следует из данных, представленных в таблицах 36 - 38, влажность цельного, измельченного сырья и порошка, колебалась в пределах от от 4,65% до 9,87%. На основании этого, предлагаем показатель влажности в проекте новой ФС ограничить верхним пределом «не более 10%».

Таблица 36

Результаты товароведческого анализа листьев подорожника большого цельных

Показатели, %	№ образца				
	17	18	45	46	49
✓ Органические примеси	0,58	0,62	0,88	0,14	0,23
✓ Минеральные примеси	0,25	0,11	0,66	0,72	0,97
✓ Листьев, изменивших окраку	3,43	4,89	4,58	2,19	3,86
✓ Цветочные стрелки	0,33	0,14	0,13	0,45	0,95
Влажность	4,65	5,24	6,98	9,63	9,82
✓ Зола общая	13,74	14,71	14,37	14,13	12,05
✓ Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной к-ты	3,39	3,31	3,65	3,10	3,58

Таблица 37

Результаты товароведческого анализа листьев подорожника большого измельченных

Показатели, %	№ образца				
	54	59	66	67	74
✓ Органические примеси	0,55	-	0,89	0,58	0,62
✓ Минеральные примеси	0,73	-	0,28	0,63	0,95

✓ Кусочки листьев, изменивших окраку	0,92	0,53	0,92	0,77	0,55
✓ Кусочки цветочных стрелок	0,66	0,75	0,79	0,72	0,47
Влажность	6,88	8,09	8,20	9,87	7,57
✓ Зола общая ✓ Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной к-ты	14,13 2,99	13,21 3,44	13,46 3,84	12,28 3,37	14,90 3,65

Таблица 38

Результаты товароведческого анализа порошка листьев подорожника большого

Показатели, %	№ образца		
	80	82	51017
✓ Минеральные примеси	0,91	0,53	0,86
Влажность	6,96	5,60	8,26
✓ Зола общая	14,92	14,73	13,15
✓ Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной к-ты	3,76	3,62	3,50

Зола общая и зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте. С целью совершенствования требований к качеству сырья, нами было проведено изучение данных показателей на образцах из разных мест сбора, в том числе из мест с повышенной техногенной нагрузкой (табл. 39). Установлено, что в образцах из фонового района и условно-чистых мест содержание показателей «зола общая» составляет 12,05-14,92%, «зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» - 2,99%-3,84%, в то время как в образцах с мест с повышенной техногенной нагрузкой – 15,36-34,73% и 4,1-5,44% соответственно. При этом образцы из мест с повышенной техногенной нагрузкой соответствуют действующим значениям ГФ, что на наш взгляд требует их пересмотра.

Таблица 39

Результаты определения показателей «зола общая» и «зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной к-ты» в образцах из разных с экологической точки зрения мест сбора, %

№	Место сбора	зола общая	зола, н/р в 10% р-ре хлористоводородной к-ты
1	2	3	4

1	2	3	4
	ОФС 2.5.32 Г XIII	*не более 20%*	*не более 5%*
	Улицы города		
1	г. Томск, проспект Комсомольский 01.09.13	**17,58**	**4,45**
2	г.Томск, 4-я поликлиника, пр.Комсомольский – Пушкина 16.08.2014	27,64	5,44
3	г. Томск, Иркутский тракт 37а 07.07.2014	**18,00**	**4,26**
9	г.Северск, СХК -15 01.08.2014	**15,36**	**4,13**
4	г. Томск, аллея на пр.Кирова в пересечении с ул. Вершинина 24.07.2014	24,5	6,84
	СЗЗ предприятий		
5	г.Томск, СЗЗ ООО «Томскнефтехим» 15.09.2013	**18,04**	**4,16**
6	г.Северск СХК-10 15.09.2013	**15,37**	**4,21**
7	г.Северск СХК-10 18.07.15	**15,67**	**4,34**
8	г. Северск, СХК-1 25.07.2014	**19,59**	**4,76**
	Деревни, поселки, села		
10	Томский район, д. Наумовка, смешанный лес 27.07.2014	14,00	3,80
11	Томский район, д. Наумовка, смешанный лес 28.08.2014	14,51	3,75
12	Томский район, д. Кисловка, смешанный лес 27.07.2014	14,39	3,61
13	Томский район, д. Кисловка, смешанный лес 20 м от ЛЭП 27.07.2014	14,09	3,79
	Парки и зоны отдыха		
14	г. Томск, питомник СибГМУ 18.07.2014	17,99	3,45
15	г. Томск, питомник СибГМУ 28.07.2014	18,85	3,74
16	г. Томск, питомник СибГМУ 15.10.2014	**34,73**	3,55
17	п.Зональная станция, смешанный лес 04.07.2014	13,74	3,39
	Деревни, поселки, села		
18	Томский район, п. Степановка, , смешанный лес 27.07.2014	14,71	3,31
	Парки и зоны отдыха		
19	г. Томск, парковая зона Буфф- сада 20.07.2014	17,68	4,14
20	г. Томск, парковая зона Новособорной площади 23.07.2014	17,12	4,20
	Дорожные магистрали		
	г. Томск, дорожная развязка г. Северск и ООО «Томскнефтехим»		
21	30.07.2014	20,52	5,11
22	19.05.2015	**16,45**	**4,11**
23	01.06. 2015	**17,88**	**4,16**
24	14.06.2015	**18,76**	**4,27**
25	27.06.2015	**19,09**	**4,73**
26	10.07.2015	**18,36**	**4,25**
27	27.07.2015	20,71	5,13
28	05.08.2015	20,96	5,26

1	2	3	4
29	23.08.2015	20,21	5,40
30	06.09.2015	21,58	5,24
31	20.09.2015	29,06	5,44
32	19.05.16	**15,60**	**4,10**
33	01.06.16	**15,44**	**4,19**
34	16.06.16	**16,41**	**4,26**
35	01.07.16	**17,31**	**4,37**
36	14.07.16	**17,18**	**4,33**
37	01.08.16	**18,31**	**4,36**
38	16.08.16	**19,43**	**4,44**
39	01.09.16	**17,70**	**4,73**
40	18.09.16	20,27	5,22
41	05.10.16	**17,56**	**4,27**
Парки и зоны отдыха			
д. Аникино, смешанный лес			
42	20.07.2014	14,11	3,52
43	01.06. 2015	14,48	3,15
44	14.06. 2015	14.68	3,79
45	28.06. 2015	14,37	3,65
46	13.07.2015	14,13	3,10
Деревни, поселки, села			
Томский район, с.Тимирязево, смешанный лес			
47	03.07.2014	14,75	3,84
48	04.06.2015	14,14	3,74
49	18.06.2015	12,05	3,58
50	26.06.2015	12,82	3,59
51	02.07.2015	12,85	2,99
52	10.07.2015	11,57	3,02
53	27.07.2015	13,13	2,99
54	20.08.2015	14,13	3,12
55	03.09.2015	14,16	3,00
56	18.09.2015	14,38	3,42
57	01.06.2016	10,08	2,99
58	17.06.2016	13,71	2,99
59	29.06.2016	13,21	3,44
60	14.07.2016	14,80	3,73
61	02.08.2016	13,12	3,67
62	16.08.2016	14,64	3,84
63	07.09.2016	14,44	3,75
64	18.09.2016	14,56	3,27
65	05.10.2016	14,97	3,53
Фоновый район			
Томский район, д. Калтай, смешанный лес			
66	27.07.2014	13,46	3,84

1	2	3	4
67	18.06.2015	12,28	3,37
68	02.07.2015	14,59	2,99
69	19.07.2015	14,89	3,28
70	05.08.2015	14,42	3,56
71	23.08.2015	14,07	3,42
72	06.09.2015	14,32	3,17
73	20.09.2015	14,45	3,27
74	01.06.2016	14,90	3,65
75	16.06.2016	14,78	3,05
76	01.07.2016	14,77	3,11
77	14.07.2016	14,77	3,54
78	31.07.2016	14,46	3,71
79	17.08.2016	14,41	3,74
80	30.08.2016	14,92	3,76
81	18.09.2016	14,85	3,62
82	03.10.2016	14,73	3,68

В связи с этим в проекте ФС нами изменены числовые значения данных показателей в сторону их уменьшения: не более 15% и не более 4% для показателей «зола общая» и «зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» соответственно. Предлагаемые изменения не ухудшат качество данного сырья, а напротив, позволят уже на этом этапе не допустить прохождения загрязненных образцов по данному числовому показателю.

Листья, изменившие окраску и кусочки листьев, изменивших окраку. Анализ цельного и измельченного сырья показал, что листья и кусочки листьев, изменивших окраску, содержатся в пределах 2,19–4,89% и 0,53-0,92% соотвественно. Это позволяет оставить в проекте новой ФС прежние значения для показатлей «листья, изменившие окраску» не более 5%, «кусочки листьев, изменивших окраку» не более 1%.

Цветочные стрелки и кусочки цветочных стрелок. Данный вид примесей содержится в цельном и измельченном сырье в количестве 0,13-0,95% и 0,47-0,79% соответственно. На основании полученных результатов предлагаем в проекте новой ФС показатели «цветочных стрелок» и «кусочки цветочных стрелок» оставить без изменения (не более 1%).

Содержание органической примеси в цельном и измельченнос сырье подорожника составило до 0,91%; минеральной примеси не превышало 0,97%. В с вязи с этим в проекте ФС предлагаем оставить действующие нормы содержания органической примеси – не более 1%, минеральной – не более 1%. Также следует отметить, что данные показатели отсутствуют в международных фармакопеях.

Измельченность. Отметим, что показатели измельченности не регламентируются зарубежными фармакопеями. Однако мы считаем возможным оставить данный показатель и предлагаем оставить его без изменения в проекте новой ФС. Так, в цельном сырье регламентируется содержание «частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, не более 5%» (табл.40-42). В измельченном сырье - «частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 5%», «частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18мм – не более 5%» в порошке - «частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм – не более 5%», «частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18мм – не более 5%».

Таблица 40

Результаты ситового анализа цельного сырья

№	Частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером мм, %
	1
17	4,34
18	4,62
45	3,15
46	4,16
49	3,74

Таблица 41

Результаты ситового анализа измельченного сырья

№	Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7мм, %	Частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером мм, %			
		3	2	1	0,18
1	2	3	4	5	6

1	2	3	4	5	6
54	3,55	53,22	25,38	20,81	3,48
59	2,94	33,88	29,54	31,23	2,41
66	2,45	36,67	22,23	34,45	4,20
67	4,24	40,47	32,25	19,88	3,16
74	4,72	41,70	27,45	21,95	4,18

Таблица 42

Результаты ситового анализа порошка

№	Частиц сырья, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, %	Частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером мм, %				
		2	1	0,5	0,25	0,18
80	4,56	35,39	35,55	15,84	9,34	3,88
82	2,23	39,36	37,27	10,79	5,43	4,92
51017	1,97	44,68	34,33	12,34	2,45	4,23

Таким образом, в проект новой ФС внесены существенные изменения и дополнения в разделы «Микроскопия», «Определение основных групп биологически активных веществ», «Испытания», «Количественное определение» (табл.43). Внесенные изменения и дополнения повышают требования к качеству сырья и позволят гарантировать потребителю приобретение безопасной эффективной продукции.

Таблица 43

Разделы и показатели качества листьев подорожника большого, включенные в проект новой ФС

Разделы ФС	Изменения
1	2
Микроскопические признаки	Введены числовые значения некоторых анатомо-диагностических признаков для цельного и измельченного сырья
Определение основных групп биологически активных веществ. Тонкослойная хроматография	Определение гликозида аукубина методом ТСХ
Количественное определение	Содержание ПС спектрофотометрическим методом в пересчете на глюкозу Содержание хлорофилла СФ методом Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту СФ методом

1	2
Испытания Влажность Зола общая Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте	 не более 10% не более 15% не более 4%

6.2. Совершенствование методов стандартизации почек сосны обыкновенной

Как уже было отмечено нами в гл.4, разделе 4.3 (табл. 8) и разделе 4.4.3 (табл. 11). максимальное содержание эфирного масла наблюдается в почках сосны обыкновенной, заготовленной в экологически чистом фоновом районе и находится в диапазоне от 0,71 до 0,88%. В остальных образцах его содержание снижалось по мере увеличения техногенной нагрузки, находясь на уровне 0,26 - 0,69 %. Даный факт позволил нам сделать вывод о том, что содержание эфирного масла является для почек сосны маркерным показателем загрязнения и позволяет внести изменения в соответствующий числовой показатель действующей ФС «Сосны обыкновенной почки» (разработанной кафедрой фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ).

Для определения пределов числового значения показателя «содержание эфирного масла» использовали образцы почек сосны из экологически чистых мест (фоновые районы) на территории РФ: д.Калтай Томского района, окр.поселка Висим, Свердловская область (рядом с Висимским биосферным заповедником, окр. села Куду-Кюель, Олёкминский район Республики Саха (Якутия) (неподалеку от Олемкинского государственного природного заповедника), а также серийные образцы, реализуемые на фармацевтическом рынке г.Томска.

Характеристика образцов и результаты определения эфирного масла как среднее из трех определений, представлены в таблице 44.

Таблица 44

Характеристика образцов и содержание эфирного масла

Место сбора / производитель сырья	Содержание, %
ООО Лекс+, Московская обл., г.Химки 010317	0,72±0,06
ООО Фирма «Здоровье», Московская обл.,Красногорский район, г. Нахабино 010317	0,75±0,07
Окр.поселка Висим, Свердловская область 13-15.05.16	1,27±0,11
Окр. села Куду-Кюель, Олёкминский район Республики Саха (Якутия) 19-20.05.16	1,52±0,13
Томский район, д. Калтай, смешанный лес 24.05.15	0,76±0,073
Томский район, д. Калтай, смешанный лес 22.05.17	0,88±0,06
Томский район, д. Калтай, смешанный лес 25.05.16	0,71±0,068

Для получения доказательств о воспроизводимости и верности методики была проведена валидационная оценка, включающая определение повторяемости, воспроизводимости. Результаты представленные в таблицах 44, 45 полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95%, значение RSD – 3,23% не превышает критериев приемлемости - 5%. Стандартное отклонение (SR) составило при возможном диапазоне от 2 до 20 %, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 45

Метрологические характеристики методики при оценке повторяемости

Содержание эфирного масла, %	0,88	0,85	0,90	0,87	0,88	0,83
Содержание эф.масла должно быть не менее 0,86 (принятое опорное значение)						
Метрологические характеристики						
f	$\bar{X}$	S^2	S	S_x	P (%)	t (P,f)
6	0,86	0,000699999	0,0264575	0,0107989	95	2,57

Примечание: f- число степеней свободы, Xср - среднее выборки, S^2 - дисперсия, S - стандартное отклонение, S_x - стандартное отклонение среднего результата (стандартная ошибка), P- доверительная вероятность, t (95,5) - критерий Стьюдента.

Результаты оценки воспроизводимости методики количественного определения и ее метрологические характеристики представлены в таблице 46. Окончательными показателями прецизионности стали средние значения стандартных отклонений. Меры прецизионности для предложенного метода измерений не превышают критериев приемлемости ни для внутрилабораторной прецизионности 1,64%<5%, ни для межлабораторной

прецизионности 4,91% < 15%, что говорит о том, что предложенная методика имеет удовлетворительную воспроизводимость.

На основании полученных результатов, методику количественного определения эфирного масла в почках сосны можно считать прошедшей валидацию, что позволяет включить ее в проект Фармакопейной статьи.

Метод был апробирован на 7 образцах сырья, заготовленного в экологически чистых местах Россиской Федерации, а также серийных образцах двух производителей. В таблице 44 представлены результаты количественного определения эфирного масла, которое колебалось от 0,71 до 1,52%. В связи с этим для повышения требований к качеству лекарственного растительного сырья, с точки зрения его экологической чистоты нами предлагается внести изменения в ФС в числовой показатель «содержание эфирного масла», который увеличен и установлен на уровне «не менее 0,7%» (Приложение 2).

***

Проведенные в данной главе исследования позволили разработать и внести ряд предложений по актуализации ФС «Подорожника большого листья» и «Сосны обыкновенной почки»:

- для цельного и измельченного сырья листьев подорожника большого определены диагностические микроскопические признаки и их количественные пределы; предложено определение гликозида аукубина методом ТСХ; количественное определение ПС предложено проводить определение хлорофилла СФ методом, суммы ПС спектрофотометрическим методом в пересчете на глюкозу, суммы гидроксикоричных кислот СФ методом в пересчете на кофейную кислоту, внесены изменения в числовые показатели «влажность», не более 10%, «зола общая» не более 15%, «зола нерастворимая в 10% р-ре HCl» не более 4%;

- в ФС на «Сосны обыкновенной почки» внесены изменения в числовой показатель «содержание эфирного масла», который увеличен и установлен на уровне «не менее 0,7%» .

Таблица 46

Результаты оценки внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости методики количественного определения эфирного масла и метрологические характеристики

	Лаборатория								
	№ 1			№ 2			№ 3		
Уровни	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Содержание эфирного масла, X_1	0,88	0,85	0,90	0,82	0,86	0,89	0,89	0,74	1,09
Содержание эфирного масла, X_2	0,90	0,87	0,89	0,84	0,89	0,90	0,87	0,76	1,07
Содержание эфирного масла, X_3	0,85	0,84	0,93	0,84	0,87	0,87	0,83	0,73	1,04
Среднее значение содержания эфирного масла, $X_{ср}$	0,88	0,85	0,91	0,83	0,87	0,89	0,86	0,74	1,06

Метрологические характеристики

лаборатор	уровни	$X_{ср}$	S^2	S	S_x (SD)	S_r,%	P,%	t (P,f)	RSD,%
1	1	0,88	0,000649995	0,025495	0,0147370	1,73	95	2,57	4,30
1	2	0,85	0,00025	0,01581138	0,00913953	1,73	95	2,57	2,76
1	3	0,91	0,00045	0,021213203	0,012261967	1,73	95	2,57	3,46
2	1	0,83	0,00015	0,01224744	0,00913953	1,34	95	2,57	2,19
2	2	0,87	0,00025	0,01581138	0,00913953	1,73	95	2,57	2,70
2	3	0,89	0,00025	0,01581138	0,00913953	1,73	95	2,57	1,03
3	1	0,83	0,00015	0,01224744	0,00913953	1,34	95	2,57	2,19
3	2	0,74	0,00025	0,01581138	0,00913953	1,73	95	2,57	3,17
3	3	0,91	0,00025	0,01581138	0,00913953	1,73	95	2,57	3,17

Результаты оценки воспроизводимости

Уровень	*p*	m	S^2	S	S_x	S_r,%	S_r,%	S_R%
1	3	0,00007099999	0,0084214977	0,0048648421	0,84	0,01	1,64	4,91
2	3	0,000121	0,011	0,0064	1,21	0,01		
3	3	0,00002449999	0,00494974746	0,00285773936	0,50	0,01		

Выводы

1. Установлено, что требованиям действующих нормативных документов по содержанию тяжелых металлв (*Pb, Cd, As*) соответствуют 100% образцов почек сосны, 45,45% плодов рябины; 92,3% листьев подорожника; 66,6% листьев мать-и-мачехи, заготовленных в фоновом районе (д. Калтай), населенных пунктах Томского района (д. Коларово, д. Кисловка, д. Наумовка, п. Степановка, д. Аникино, с. Тимирязево, п. Зональная станция) и некоторых парках и зонах отдыха. Превышение допустимых верхнеуровневых показателей по содержанию *Cd* и *As*, регламентированных действующей ГФ, выявлено в некоторых образцах плодов рябины, листьев мать-и-мачехи и подорожника, заготовленных в некоторых парках и зонах отдыха, находящихся в городской и пригородной черте.

2. Содержание естественных (*K-40, Th-232, Ra-226*) и искусственных (*Cs-137, Co-60*) радионуклидов в образцах ЛРС не превышает пределов фоновых значений данных элементов в земной коре и уровней допустимых пределов, установленных действующей ГФ и не представляет опасности для потребителей.

3. Высококачественное сырье подорожника большого, мать-и-мачехи, рябины обыкновенной и сосны обыкновенной, с высоким содержанием действующих веществ можно заготавливать на территории деревень, поселков и сел Томского района (д. Калтай, д. Наумовка, д. Кисловка, д. Аникино, п. Степановка, п. Зональная станция, с. Тимирязево, д. Коларово, п. Заварзино).

4. С увеличением уровня загрязнения мест сбора растительного сырья подорожника большого, мать-и-мачехи, сосны обыкновенной снижается содержание суммы ПС, эфирного масла, хлорофилла α, и β каротиноидов; содержание Гц В в полисахаридном комплексе подорожника большого и мать-и-мачехи снижается, а Гц А или ВРПС повышается; суммарная доля монотерпенов в эфирном масле почек сосны снижается, при этом

увеличивается содержание кислородсодержащих монотерпенов как в составе эфирного масла, а также и в составе монотерпеновой фракции. Эфирное масло почек сосны преимущественно относится к «кареновому» хемотипу.

5. Выявлено наличие ржавых пятен, признаки хлороза и микробного обсеменения для листьев подорожника большого из мест с повышенной техногенной нагрузкой; значительно возрастает число простых и головчатых волосков, устьиц.

6. Для характеристики экологической чистоты заготавливаемого растительного сырья «Подорожника большого листья» определена нижняя граница числового показателя – содержание полисахаридов – на уровне не менее 25,0%; «Сосны обыкновенной почки» - содержание эфирного масла - не менее 0,7%.

7. Разработаны и предложены показатели качества для цельного, измельченного сырья и порошка листьев подорожника большого; определены диагностические микроскопические признаки и их количественные пределы для оценки экологической чистоты сырья; предложено определение гликозида аукубина методом ТСХ; методики количественного определения ПС; хлорофилла; суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту; установлены товароведческие показатели: «Влажность» - не более 10%, «Зола общая» - не более 15%, «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» – не более 4 %,

8. Созданы и утверждены проекты нормативной документации: Фармакопейной статьи «Подорожника большого листья»; Изменения в Фармакопейную статью «Сосны обыкновенной почки».

Список литературы

1. Адам, А. М. Экология северного промышленного узла города Томска: проблемы и их решения / А.М. Адам. – Томск: Т., 1994. – 259 с.

2. Александрова, Э. А. Тяжелые металлы в почвах и растениях и их аналитический контроль. - Краснодар : Куб. гос. аграр. ун-т, 2001. - 166 с.

3. Алексеев, Ю.В. Тяжелые металлы в почвах и растениях / Ю.В. Алексеев.-СПб.: Агропромиздат, 1987.- 142 с.

4. Акимов, Ю. А. Состав и изменчивость эфирного масла сосен юга Украины и перспективы его применения: автореф. дис. .. канд. биол. наук / Ю. А. Акимов.- Моск. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева. – М.,1972. - 13 с.

5. Анализ содержания эфирных масел и пигментов в хвое Pinus sylvestris в условиях породного отвала уголного разреза / О.Л. Цандекова, О.А. Неверова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.-2015.-т.17.-№4.-С.226-231.

6. Анатомические особенности листьев подорожника большого, собранного вблизи высоковольтных линий электропередач / Н.А. Дьякова, И.А. Самылина, А.И. Сливкин, С.П. Гапонов, Л.Л. Кукуева, А.А. Мындра // Научно-исследовательские публикации.-2015.-т.1-№(23).-С.7-11.

7. Аникеев, Д.Р. Состояние репродуктивной системы сосны обыкновенной при аэротехногенном загрязнении / Д.Р.Аникеев, Л.Г.Бабушкина, Г.В. Зуева. - М-во образования Рос. Федерации. Ур. гос. лесотехн. акад. - Екатеринбург, 2000. - 81 с.

8. Арасимович, В.В. Биохимия созревания плодов. Физиология сельскохозяйственных растений: монография в 2 т. /В. В. Арасимович // М.: Изд-во МГУ, 1968.- 66 с.

9. Биохимия и физиология иммунитета растений / Б.А Рубин, Е.В.Арциховская.- Изд-во: М.: Высшая школа, 1968.- 412с.

10. Бондарчук, Р.А. К вопросу о радиоактивной чистоте некоторых видов, произрастающих в районе ОАО «Сибирский химический комбинат» / Р.А.Бондарчук, Н.Э. Коломиец, А.А. Марьин, Н.Ю. Абрамец // «Проблемы

современной биологии»: материалы VII международной научно-практической конференции (15.01.2013). – Москва, 2013. – С. 50-54.

11. Брукс, Р.Р. Загрязнение микроэлементами / Р.Р. Брукс //Химия окружающей среды. - М.: Химия, 1982. – С.371-413.

12. Буренков, Э.К. Комплексная эколого-геохимическая оценка техногенного загрязнения окружающей природной среды / Э.К. Буренков, Л.Н. Гинзбург, Н.К. Грибанова [и др.]. – М.: Изд-во «ПРИМА-ПРЕСС», 1997. – 72 с.

13. Васфилов, С.П. Влияние загрязнения воздуха на сосну обыкновенную / С. П. Васфилов.- Рос. акад. наук, Урал. отд-ние, Ботан. сад. - Екатеринбург: УрО РАН, 2005. – 214 с.

14. Васильев, А.Е. Функциональная морфология секреторных клеток растений / А.Е. Васильев.- Л.: Наука, 1977.-208с.

15. Вахрушева, О.М. Влияние загрязнения почв вблизи Кирово-Чепецкого химического комбината на растения : автореф. дис. ... канд. биол. наук / О. М. Вахрушева. - Сыктывкар, 2013. - 18 с.

16. Великанова, Н.А. Экологическая оценка состояния лекарственного растительного сырья (на примере Polygonum aviculare l. и Plantago major l.) / Н. А. Великанова. – Воронеж: В., 2013 – 21 с.

17. Влияние техногенного воздействия на содержание валовых и подвижных форм тяжелых металлов в почвах / О.Я.Соколова, А.В,Стряпков, С.В,Антимонов, С.Ю.Соловых // Вестник ОГУ.- 2006.-№2.-т.2.- С.35-42.

18. Влияние выбросов металлургического производства на микроэлементный состав хвои сосны / Н.В. Шубина, Ю.Л. Юрьев.- Химия растительного сырья.- 2009.- С.36-42.

19. Воскресенская, О.Л. Динамика ростовых процессов и накопление тяжелых металлов в онтогенезе подорожника большого в условиях антропогенного загрязнения / О.Л. Воскресенская // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование, 2009.-№.3.- С.71-80.

20. Войтюк, Е.А. Аккумуляция тяжелых металлов в почве и растениях в условиях городской среды: на примере г. Чита: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. А. Войтюк. - Улан-Удэ, 2011. - 22 с.

21. Выделительная функция высших растений / В.В. Рощина, В.Д. Рощина. - Saarbrücken: LAP LAMBERT, 2012. – 476с.

22. Галибина, Н.А. Клеточная стенка хвои деревьев сосны обыкновенной и ели сибирской в условиях аэротехногенного загрязнения : автореф. дисс. … канд. биол. наук / Н. А. Галибина.- Петрозаводск, 2003. - 137 с.

23. Гармонизация подходов к оценке безопасности состава лекарственных растительных препаратов / О.И.Терешкина, И.А Самылина, И.П.Рудакова, И.В. Гравель // Биомедицина, 2011. - № 3. - С. 80-86.

24. Геохимия окружающей среды: учебник / Ю. Е. Сает, Б. А. Ревич, Е. П. Янин.- М.: Недра, 1990.- 335 с.

25. Геоэкологический мониторинг. Учебное пособие для вузов / Е.Г.Язиков, А.Ю. Шатилов. – Томск, 2003. – 336 с.

26. Государственная фармакопея СССР. – Вып. 2. – Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М., 1989. – 400 с.

27. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР.-11-е изд., доп.- М: Медицина, 1989. - 400 с.

28. Государственная фармакопея СССР. Вып.1. Общие методы анализа. / МЗ СССР.-11-е изд., доп.- М: Медицина, 1987. - 335 с.

29. Гравель, И.В. Эколого-фармакогностический анализ некоторых видов лекарственного растительного сырья, заготавливаемого в Алтайском крае: автореф. дис. ... канд. фарм. наук /И. В. Гравель.- С.-Петербург. хим.-фармацевт. ин-т. - Санкт-Петербург, 1995. - 26 с.

30. Гравель, И.В. Региональные проблемы экологической оценки лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на примере

Алтайского края : дис. ... д- ра фарм. наук / И. В. Гравель . - Москва, 2005. - 363 с.

31. Грешневиков, А.Н. Проблемы экологической безопасности России / А. Н. Грешневиков, В. Ф. Протасов // Право и безопасность. – 2005. - № 3 (16). – С. 58-61.

32. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.А. Сафронич. - Москва: Высшая школа, 1983.- 176 с.

33. Губанов, И. А. и др. Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. — М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2004. — Т. 3. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). — С. 240.

34. Губанов, И. А. и др. Plantago major L. s.l. (incl. P. intermedia DC., P. major L. subsp. intermedia (DC.) Arcang.) - Подорожник большой // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. - М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2004. - Т. 3. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). - С. 240.

35. Губарева, В.Т. Влияние комплекса токсикантов Невинномысского промышленного узла на отдельные виды растений в природных фитоценозах, произрастающих на разном удалении от источников загрязнения : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / В. Т. Губарева.- Ставропольская с.-х. акад. - Ставрополь, 1997. - 21 с.

36. Дикорастущие лекарственные растения Урала: учеб. пособие / Е. С. Васфилова, А. С. Третьякова, Е. Н. Подгаевская, Н. В. Золотарева, М. Г. Хохлова и др; под общ. ред. В. А. Мухина. – Е.: Уральский федеральный университет, 2014. – 206 с.

37. Динамика содержания пектиновых веществ в плодах яблони в процессе хранения / О.А.Новикова, Н.А.Голикова, Р.И. Овчинникова // Аграрный вестник Урала, 2009. - №12 (66).- С. 49-50.

38. Динамика концентрации хлорофилла в онтогенезе семядольных листьев Linum usitatissimum, подвергшихся УФ-В облучению / А.Н.

Берестяная, Д.М. Гроздинский // Доповіді НАН України.- 2012.- № 12.-С.137-141.

39. Ефремов, А.А. Выделение пектина из нетрадиционного растительного сырья и применение его в кондитерском производстве /А. А. Ефремов, Т. А. Кондратюк // Химия растительного сырья. -2008. -№4.- С. 171–176.

40. Жогова, А.А. Разработка методик идентификации и определения содержания иридоидов в лекарственном растительном сырье: дис…канд.фарм.наук / А.А. Жогова. - Москва, 2015.- 166с.

41. Жуйкова, Т. В. Ценопопуляции Taraxacum officinale S. L. в условиях токсического загрязнения среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т. В. Жуйкова.- Ин-т экологии растений и животных Уральского отд-ления РАН. - Екатеринбург, 1999. - 26 с.

42. Жуйкова, Т. В. Реакция ценопопуляций и травянистых сообществ на химическое загрязнение среды : дис. ... д-ра биол. наук / Т. В. Жуйкова . - Екатеринбург, 2009. - 449 с.

43. Зверев, В. Е. Влияние промышленного загрязнения на экологию березы Черепанова (Betula pubescens ssp. czerepanovii (Orlova) Hmet-Ahti) на Кольском полуострове: автореф. дис. … канд. биол. наук / Е.В. Зверев. - Екатеринбург, 2012.- 19 с.

44. Зубкова, В. М. Химический состав растений при загрязнении почвы тяжелыми металлами: монография / В.М. Зубкова, Н.В. Зубков. - Москва : Изд-во Российского гос. социального ун-та, 2013. – 149 с.

45. Иванов, В.П. Растительные выделения и их значение в жизни фитоценозов / В.П.Иванов.-М.:Наука, 1973.-295с.

46. Избирательное поглощение тяжелых металлов растениями в Зауральской лесостепи / О. З. Еремченко, М. Г. Кусакина, Л.В. Шушминцева, Е. А. Шемякина, Е.М. Еремченко // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2005. – Вып.6. - С. 161-163.

47. Изменения анатомических и морфологических признаков хвои Pinus sylvestris в техногенных условиях угольного отвала / О.Л.Цандекова, О.М.Легощина // Бюллетень науки и практики.-2017.-№17.-С.44-48.

48. Изучение влияния техногенных факторов на содержание экстрактивных веществ в коре лиственницы / Н.В. Иванова, А.А.Левчук, В.А.Бабкин // Химия растительного сырья.- 2014.- №1.- С.113-117.

49. Ильин, В. Б. Тяжелые металлы и неметаллы в системе почва-растение: монография / В. Б. Ильин; отв. ред. А. И. Сысо; Российская акад. наук, Сибирское отд-ние, Ин-т почвоведения и агрохимии. - Новосибирск: Изд-во Сибирского отд-ния Российской акад. наук, 2012. – 218 с.

50. Ильин, В. Б. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах и растениях Новосибирской области / В. Б. Ильин, А. И. Сысо .- Новосибирск : СО РАН, 2001. – 226 с.

51. Исследование химического состава плодов рябины обкновенной / Н.В.Исайкина, Н.Э.Коломиец, Н.Ю.Абрамец, Р.А.Бондарчук // Химия растительного сырья. – 2017.- №3.- С. .

52. Кабата-Пендиас, А., Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас.- М.: Мир, 1989.- 440 с.

53. Казанцев, И.В. Экологическая оценка влияния железнодорожного транспорта на содержание тяжелых металлов в почвах и растениях полосы отвода : автореф. дис. ... канд. биол. Наук / И. В. Казанцев. - Тольятти, 2008. - 19 с.

54. Карамова, Л. М., Галиев, М. А., Сулейманов, Р. А. Нефть и здоровье: в 2 частях / под ред. Л. М. Карамовой; Уфим. НИИ медицины труда и экологии человека. - Уфа: УфНИИМТИЭЧ, 1993. – 592 с.

55. Касимов, Н.С. Геохимия городов и городских ландшафтов / Н.С. Касимов, ЕМ.Никифорова.- М.: Научный мир, 2004.- С. 234-268.

56. Кварацхелия, В. Н. Изменение аналитических характеристик пектиновых веществ яблок зимнего срока созревания при длительном

влиянии низких температур / В.Н. Кварацхелия, Л. Я. Родионова // Научный журнал КубГАУ.- 2014. - №100(06) .-2014 . – С. 1-14.

57. Клинская, Е.О. Оценка состояния окружающей среды г.Биробиджана по содержанию свинца, цинка, никеля и кадмия в почве, снеге и одуванчике лекарственном: Taraxacum officinale: дис. ... канд. биол. наук / Е. О. Клинская. - Биробиджан, 2005. - 154 с.

58. Ковальский, В. В. Геохимическая экология: учебник / В.В. Ковальский.- М.: Наука, 1974.- 298 с.

59. Коломиец, Н.Э. Фармакогностическое исследование рода EQUISETUM L. флоры Сибири как источника лекарственных средств: дисс… д-ра фарм.наук / Н.Э. Коломиец. - Москва, 2010.- 414 с.

60. Коршиков И.И. Устойчивость растений к техногенным загрязнителям окружающей среды / Промышленная ботаника. - 2004. С.46-57.

61. Клемпер, А.В. Изучение содержания неорганических экотоксикантов в некоторых видах лекарственного растительного сырья северо-запада Российской Федерации: автореф. дис. … канд. фарм. наук / А.В.Клемпер. – Санкт-Петербург, 2013. – 24 с.

62. Лацерус, Л.А. Растительные терпеноиды как возможные противоопухолевые агенты / Л.А.Лацерус, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал.- 2010.- №1.- т.9.-С.3-8.

63. Лесопользование в насаждениях, подверженных влиянию промышленных выбросов: учебное пособие / Е. М. Рунова, Б.И. Угрюмов, Г.П. Нежевец. - Братск, 1995. – 71 с..

64. Лорсанова, Я. Э. Растения – индикаторы состояния окружающей среды (на примере воздействия атмосферного воздуха) / Я. Э. Лорсанова. – Грозный: Г., 2009 – 25 с.

65. Мандра, Ю. А. Растения как индикаторы экологического состояния среды курортного региона (на примере города Кисловодска)/ Ю. А. Мандра. – Москва: М., 2010 – 22 с.

66. Майдебура, И. С. Влияние загрязнения воздушного бассейна города Калининграда на анатомо-морфологические и биохимические показатели древесных растений: дис. ... канд. биол. Наук / И. С. Майдебура. - Калининград, 2006. - 147 с.

67. Максимов, В.М. Структура коренных типов леса по составу монотерпенов в условиях Центральной лесостепи / В. М. Максимов.- Воронеж. гос. лесотехн. акад. - Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2003. - 150с.

68. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной / Андреева В.Ю., Калинкина Г.И., Коломиец Н.Э., Исайкина Н.В. // Фармация. - 2013. - № 3. - С. 19-21.

69. Микроэлементы – регуляторы жизнедеятельности и продуктивности растений под. ред. акад. Я.В. Пейве. - Рига, 1971. - 248 с.

70. Минеральный состав пылеаэрозольных выпадений снегового покрова Томской агропромышленной агломерации / Е.Г. Язиков, Р.В. Голева, Л.П. Рихванов, В.Т. Дубинчук, А.Ю. Шатилов // Записки Всероссийского минералогического общества.- М., 2004. - №5. - С.53-63.

71. Москвин, А.В. Новый справочник химика и технолога. Радиоактивные вещества. Вредные вещества. Гигиенические нормативы / А.В.Москвин.- СПб.: Профессионал, 2004.-1142 с.

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

73. Осипова, Е. С. Влияние нефтяного загрязнения на биохимические и морфофизиологические показатели растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. С. Осипова. - Тюмень, 2013. - 16 с.

74. Осипова, Е. С. Влияние нефтяного загрязнения на биохимические и морфофизиологические показатели растений / Е. С. Осипова. – Тюмень: Т., 2013. – 54 с.

75. Оводов, Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах /Ю. С. Оводов // Биоорганическая химия.- 2009.- т.35.-№3.-С.293-310.

76. Определение содержания гидроксикоричных кислот в листьях подорожников большого (Plantago major L) и среднего (Plantago media L) / Т.В.Хортецкая, Г.П.. Смойловская, А.В. Мазулин, Г.В. Мазулин // Химия растительного сырья. – 2014. №2. – С.177-180.

77. Оценка риска радионуклидного загрязнения лекарственного растительного сырья / О.И.Терешкина, И.П.Рудакова, И.А. Самылина // Фармация – 2011. - №7. – с 1-14.

78. Оценка экологического состояния растительности в районе промышленного комплекса Тобольского нефтехимического комбината / Е.И. Попова // Научные ведомости БелГУ. - 2013. – № 7 (160). - Вып. 24. – С.102-107.

79. Поклонов, В. А. Мутагенные ксенобиотики, тяжёлые металлы и поверхностно - активные вещества в почвах и высших водных растениях: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В. А. Поклонов. - Москва, 2013. - 25 с.

80. Подорожник большой (Plantago major L.). Химический состав и применение / Д.Н.Оленников, A.B. Samuelsen, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2007. №2. – С.37-50.

81. Применение нейронных сетей для решения задач прогнозирования поглощения тяжелых металлов растениями / А.А.Григорьев, О.В.Руденко, Ю.А.Сова, А.С. Бородихин // Матер. 3 междунар. научно-практич. конф. «Инновационные пищевые технологии в области хранения и переработки сельскохозяйственного сырья».- Краснодар, 2013. – С. 259-263.

82. Прохорова, Н. В. Распределение тяжелых металлов в почвах и растениях в зависимости от экологических особенностей лесостепного Поволжья: дис. ... канд. биол. наук. - Самара, 1996. - 290 с.

83. Разработка технологии получения экстракта подорожника большого сухого / Д.Н.Оленников, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2006. №1. – С.49-54.

84. Рентгеноспектральный флуоресцентный анализ на «Спектроскане»: Метод. рекомендации / Сост.Л.Д. Агеева, О.А. Ожерельев.- Северск, 1998. -16 с.

85. Рихванов, Л.П. Эколого-геохимические особенности природных сред Томского района и заболеваемость населения /Л. П. Рихванов, Е. Г. Язиков, [и др.].- Томск, 2006.- 216 с.

86. Рождественская, Т. А. Тяжелые металлы в почвах и растениях юго-западной части Алтайского края: дис. ... канд. биол. наук / Т. А. Рождественская. - Барнаул, 2003. - 116 с.

87. Росляков, Н.А. Экогеохимия Западной Сибири. Тяжелыеметаллы и радионуклиды // Новосибирск, Изд-во СО РАН. НИЦ ОИГГМ, 1996.- 248 с.

88. Рунова, Е. М. Влияние техногенного загрязнения на состояние хвойных древостоев / Е. М. Рунова. – Красноярск: К.,1999 – 56 с.

89. Самылина, И. А. Фармакогнозия: учебник / И. А. Самылина. – СПб: СпецЛит, 2006.-845 с.

90. Санникова, А. Б. Тяжелые металлы в почвах и растениях геохимических ландшафтов Северо-Западного Кавказа: дис. ... канд. географ. Наук / А. Б Санникова. - Новороссийск, 2005. - 314 с.

91. Северюхина, О.А. Репродуктивные особенности Taraxacum officinale S.L. в условиях химического загрязнения среды: дис. ... канд. биол. наук / О. А. Северюхина. - Екатеринбург, 2004. - 162 с.

92. Селина, Е.Е. Оценка влияния техногенного загрязнения на состояние растений в долинах малых рек: автореф. дис. … канд. биол. наук / Е.Е.Селина. - Саратов, 2010. – 19 с.

93. Сиденова, С.С. Разработка и стандартизация многокомпонентного растительного средства, обладающего адаптогенной активностью: дисс…канд.фарм.наук / С.С. Сиденова. - Улан-Удэ, 2013.- 184 с.

94. Сосорова, С. Б. Тяжелые металлы в почвах и растениях дельты реки Селенги / С. Б. Сосорова, В. К. Кашин.- Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2009. – 159 с.

95. Состояние ассимилирующих органов растений в условиях техногенного загрязнения / В. И.Костюк, Н. А.Мельник, Н. Ю. Шмакова. - Апатиты, 2009. – 81 с.

96. Сиромля, Т.И. Влияние автотранспортного загрязнения на экологическое состояние подорожника большого / Т.И. Сиромля // Сибирский экологический журнал. – 2011. - №5. – С.677-688.

97. Стандартизация листьев крапивы двудомной / Н.Э. Коломиец, Г.И.Калинкина, Н.Н.Сапронова // Фармация. - 2011. - № 6. - С. 22-24.

98. Суслонов, А.В. Влияние нефтяного загрязнения почв на морфологические и генетические характеристики растений и на формирование растительного покрова: автореф. дис. канд. биологических наук / А.В. Суслонов. – Пермь, 2010. – 19 с.

99. Судыко, А.Ф. Определение урана, тория, скандия и некоторых редкоземельных элементов в двадцати четырех стандартных образцах сравнения инструментальным нейтронно-активационным методом. // Материалы V Международной конференции.- Томск, 2016 г.- С. 620-624.

100. Ткачев, А.В. Исследование летучих веществ растений / А.В.Ткачев.- Новосибирск, 2008. -969 с..

101. Убаева, Р. Ш. Влияние загрязнения атмосферного воздуха на древесные насаждения г. Грозный: монография / Р. Ш. Убаева, М. У. Умаров. - Грозный: Изд-во Чеченского гос. ун-та, 2012. – 222 с.

102. Убугунов, В. Л. Тяжелые металлы в садово-огородных почвах и растениях г. Улан-Удэ: дис. ... канд. биол. Наук / В. Л. Убугунов. - Улан-Удэ, 2003. - 195 с.

103. Функции и свойства антоцианов растительного сырья / Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. // Труды БГУ, 2010. - том 4. - выпуск 2. - С.1-11.

104. Халиева, А.С. Влияние постоянного магнитного поля и ультрафиолетового излучения на процессы роста высших растений и

фиторемедиацию ими почв от тяжелых металлов и нефтепродуктов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. С. Халиева.- Пенза, 2013. - 22 с.

105. Хожаенко, Е. В. Сорбция стабильных изотопов церия, стронция, иттрия и цезия некрахмальными полисахаридами: дис ... канд. биол. наук /Е. В. Хожаенко. - Владивосток, 2010. - 146 с.

106. Хожаенко, Е. В. Сорбция стабильных изотопов церия, стронция, иттрия и цезия некрахмальными полисахаридами: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. В. Хожаенко. - Владивосток, 2011. - 24 с.

107. Храмова, Е.П. Род Pentaphylloides Hill (Rosaceae) азиатской России (фенольные соединения, элементный состав в природе и культуре, хемотаксономия): автореф. дис. ... докт. биол. наук / Е. П. Храмова. - Новосибирск, 2016. - 35 с.

108. Чжан, С. А. Особенности влияния техногенного загрязнения на хвойные древостои / С. А. Чжан. – БрГУ.-Братск , 2010. - 67 с.

109. Шагиева, Ю. А. Тяжелые металлы в почвах и растениях Башкирского Зауралья в условиях техногенеза: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ю. А. Шагиева. - Тольятти, 2002. - 20 с.

110. Шепелева, Л.Ф. Организация луговых сообществ поймы Средней Оби : дис. ... д-ра биол. наук / Л. Ф. Шепелева.-Новосибирск, 1998. - 431 с.

111. Шихова, Л. Н.Тяжёлые металлы в почвах и растениях таёжной зоны Северо-Востока Европейской России / Л. Н. Шихова, Т. Л. Егошина. – Киров. - 262 с.

112. Шлык, А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений.- М.:Наука, 1971.- С. 154–171.

113. Шпанько, Д.Н. Влияние антропогенных факторов на элементный состав лекарственных растений Кемеровской области, содержащих дубильные вещества: автореф. дис... канд. фарм. наук / Д.Н. Шпанько. - Москва, 1998. – 24 с.

114. Элементный состав хвои и морфофизиологические параметры сосны обыкновенной в условиях техногенного загрязнения / Т. А. Михайлова, Н. С. Бережная, О. В. Игнатьева. - Изд-во Ин-та географии СО РАН. – Иркутск, 2006 - 134 с.

115. Экологическая безопасность в системе национальной безопасности Российской Федерации / Г.А. Тимофеев, О.М. Орлинская // Власть. - 2017.- №2. – С. 69-.74.

116. Язиков, Е Г. Экогеохимия урбанизированных территорий юга Западной Сибири: дис. ... д-ра геол-минерал. наук / Е. Г. Язиков. - Томск, 2006. - 423 с.

117. Biomonitoring air pollutants with plants / W.J. Manning, W.A. Feder // London, 1980. –142 p.

118. Dissolution of oxides of manganese and iron by root exudate components / M.A. Jauregui, H.M. Reisenauer // Soil. Sci. Amer.J.-1982.-vol.46.-P.314-317.

119. European Pharmacopoeia 6th Edition / Council of Europe European-European Directorate for the Quality of Medicines//Two Volumes.-2007.-4392p.

120. Environmental impact quantification and correlation between site location and contents and structure of Tansy / Stevović S., Devrnja N., Ćalić-Dragosavac D. / The African Journal of Biotechnology. 2011.-Vol.10(26). - Pp. 5075-5083.

121. Effects of dumpsites air pollution on the ascorbic acid and chlorophyll contents of medicinal plants / B.A. Falusi, O.A. Odedokun, A.Abubakar, A.Agoh, D. Hui // Cogent Enviromenatal Science, 2016.-vol.2.-I.1.-P.1-13.

122. Effect of automobile pollution on chlorophyll content of roadside urban trees / M. Iqbal, M. Shafiq, S. Zaidi, M. Athar // Global Journal of Environmental Science and Management.- 2015.-vol.1.-Is.4.-P.283-296.

123. Epiphytic lichen distribution and plant leaf heavy metal concentrations in Russian-Norwegian boreal forests influenced by air pollution from nickelcopper

smelters / J. Berke, H.Tommervik, T.E.Finne, H.Jensen, N.Lukina, V.Barestuen // Boreal Environ Res.- 2006. — 6. P. 441–450.

124. Grubov, V.I. Key to the vascular plants of Mongolia // Science Publishers, Inc.-2001.- 817 p.

125. Human exposure to 3-carene by inhalation: toxicokinetics, effects on pulmonary function and occurrence of irritative and CNS symptoms / A. Falk, A.Löf, M. Hagberg, E.W. Hjelm, Z.Wang // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1991.- vol.1.- №110(2).- Pp. 198-205.

126. Influence of cement dust pollution on leaf epidermal features of Pennisetum purpureum and Sida acuta / C.O.Ogunkunle, A.A. Abdulrahaman, P.O. Fatoba // Enviromental and Experimental Biology.-2013.-№11.-Pp.73-79.

127. Komarov, V. L. et al., eds. Flora SSSR.- M.; S-Pt.: Nauka, 1934-1964.-470p.

128. Krasnoborov, I. M., ed. Flora of Siberia (English translation).: Science Publishers, 2007.–499p.

129. Krzeslowska, M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defence strategy // Acta Physiol Plant.-2011.-№33.- Pp.35-51

130. Japanese Pharmacopoeia.- 17th Edition.- The MHLW Ministerial Notification .- 2016.- 1802p.

131. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.) / S.Malar, S. Shivendra Vikram, P.JC. Favas, V. Perumal // Botanical StudiesAn International Journal. - 2014.- Pp.55-54.

132. McAllister, H. The genus Sorbus: mountain ash and other rowans / H. McAllister. - Richmond: Royal Botanic Gardens Kew, 2005. – 252 p.

133. Mucilage protects root meristems from aluminium injury / W.J. Horst , A.Wagner, H.Marscher // Z. Pflanzenpysiol.-1982.-P.435-444.

134. Tutin, T.G. Flora europaea, Volume 4: Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae) / T.G. Tutin, et al.- Cambrige University Press, 2010. – 534 p.

135. Oztetik, E Biomarkers of ecotoxicological oxidative stress in an urban environment: using evergreen plant in industrial areas / Ecotoxicology. - 2015.- №24 (4).- Pp. 903-914.

136. Permanent monitoring of pyrrolizidine alkaloid content in micropropagated Tussilago farfara L.: A tool to fulfill statutory demands for the quality of coltsfoot in Austria and Germany / Ch. Wawrosch, B.Kopp, H.Wiederfield // Acta horticulturae. - 2000. - № 530. - Pp. 469-472.

137. Physiological investigations of leaf mucilages II. The mucilage of *TAXUS BACCATA* L. and of *THUJA OCCIDENTALE* L. / H.Distelbarth, U. Kull // Israel Journal of Botany.- 1985.-Vol. 34. – Iss. 2-4.-Pp. 113-128.

138. Role of anthocyanins in plant defence / S.Lev-Yadun, K.S.Gould.- Anthocyanins.- Springer Science+Business Media, 2009.-Pp.21-48.

139. Sukumaran, D. Effect of Air Pollution on the Anatomy Some Tropical Plants / D.Sukumaran // Appl.Ecology and Enviromental Sciences.- 2014.- vol.2.- №1.- Pp.32-36.

140. The British Pharmacopoeia sedition of the British Pharmacopoeia or in the associated edition of the British Pharmacopoeia. (veterinary). See General Notices.- Four Volumes. – 2009. - 10952 p.

141. Validation of analytical procedures: methodology Q2B / Intern, conf. on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.- Geneva: ICH Secretariat, 1996.-8p.

142. Use of epidermal characters as bioindicators of environmental pollution / M.O.Arriaga, M.L. Stampacchio, M.G. Fernández Pepi, P.E.Perelman, A. María Faggi // Multequina.- 2014.- №23.- Pp.41-53.

143. Артлайф [электронный ресурс]: http://artlife.ru/, свободный.

144. Биолит [электронный ресурс]: http://biolit.ru/, свободный

145. Заготовительная деятельность [электронный ресурс]. – Режим доступа: https://tomsk.gov.ru/Zagotovitelynaya-deyatelynosty, свободный.

146. О Стратегии экологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года, 2017 [электронный ресурс]. – Режим доступа:

http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody=&firstDoc=1&lastDoc=1&nd=102430636, свободный.

147. Открытые данные. Реестр ведущих компаний в сфере заготовительной деятельности [электронный ресурс] . – Режим доступа: https://depnature.tomsk.gov.ru/opendata/front/getTable/id/165, свободный.

148. Официальный сайт журнала « Ботаника» [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.botanical.com/botanical/mgmh/p/placom43.html, свободный.

149. Официальный информационный интернет-портал администрации Томской области [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://tomsk.gov.ru/ru/spravka-o-regione/goroda-i-rayony/tomskiy-rayon#nature_resources, свободный.

150. Официальный сайт мунипипального образования [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.tradm.ru/nat_resurs, свободный.

151. Официальный сайт ООО «Томскнефтехим» [электронный ресурс]. – Режим доступа:http://pda.sibur.ru/tnhk/about , свободный.

152. Официальный портал МО город Томск [Электронный ресурс] . – Режим доступа: http://www.admin.tomsk.ru/

153. Реестр производителей Томской области [Электронный ресурс] . – Режим доступа: http://дикоросы.томск.рф/reestr/, свободный.

154. Томские травы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://томскиетравы.рф/, свободный.

155. Трасару. Заповедники Томской области [Электронный ресурс] . – Режим доступа: http://trasa.ru/region/tomskaya_zapov.html, свободный.

156. Экодело [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://ecodelo.org/3179-tomskaya_oblast-tomskaya_oblast, свободный.

157. Фармакопея РФ. Том 1. Том2. Том 3. [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://femb.ru/feml, свободный.

158. Фармакопея РФ. Том 3. ФС.2.5.0003.15 Аронии черноплодной сухие плоды [электронный ресурс]. – Режим доступа:

http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#318, свободный.

159. Фармакопея РФ. Том 3. ФС.2.5.0019.15 Крапивы двудомной листья [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#450, свободный.

160. Фармакопея РФ. Том 3. ФС.2.5.0024.15 Липы цветки [электронный ресурс]. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#496, свободный.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Подорожника большого листья	**ФС**
Plantaginis majoris folia	Взамен ГФ XIII, ст. 2.5.0032.15

Собранные в период цветения и высушенные листья дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения подорожника большого – *Plantago major L.*, сем. подорожниковых – *Plantaginaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки

Цельное сырье. Цельные или частично измельченные листья, простые, форма листа широкояйцевидная или широкоэллиптическая, у основания округлая, верхушка заостренная или притуплённая, черешок крылатый, голый, различной длины. В месте обрыва черешка видны длинные остатки нитевидных жилок. Край листа цельный или слегка зубчатый, жилкование дугонервное; поверхность листа голая с обеих сторон, длина листьев с черешком до 24 см, ширина от 3 до 11 см. Цвет листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого, черешков – светло-зеленого, беловато-серого или желтовато-белого, часто с фиолетовым оттенком. Запах слабый, вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого цвета с неровной поверхностью и, редко, белесыми торчащими волосками, кусочки черешков светло-зеленого, желтовато-белого или белого цвета, часто с фиолетовым оттенком, на поперечном сечении которых могут быть видны черные дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет от светло-зеленого до коричневато-зеленого с коричневыми, белыми, желтовато-белыми и редкими фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый, вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Порошок. Кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листовых пластинок от светло-зеленого до коричневато-зеленого цвета с неровной поверхностью и, редко, белесыми торчащими волосками, кусочки черешков светло-зеленого, желтовато-белого или белого цвета, часто с фиолетовым оттенком, на поперечном сечении которых могут быть видны черные дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет от светло-зеленого до коричневато-зеленого с коричневыми, белыми, желтовато-белыми и редкими фиолетовыми вкраплениями. Запах слабый, вкус водного извлечения слегка горьковатый.

Микроскопические признаки

Цельное и измельченное сырьё. При рассмотрении листа с поверхности на верхней стороне листовой пластинки видны многоугольные клетки эпидермиса с прямыми боковыми стенками. Клетки нижнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками. Кутикула местами образует складки. Устьица на обеих сторонах листа аномоцитного типа, округлые, окружены 3-4 клетками эпидермиса. Количество устьиц на нижней стороне листа не более

200, на верхней - не более 130. Встречаются простые и головчатые волоски. Простые волоски конической формы с расширенным основанием, многоклеточные, гладкие, часто оборваны. Головчатые волоски двух типов: на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой – встречаются по всей поверхности с обеих сторон листа, реже встречаются головчатые волоски на многоклеточной ножке с шарообразной или овальной одноклеточной головкой. В местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку из 6-9 клеток. На нижней эпидерме количество головчатых волосков не более 35 на 1см^2, простых волосков не более 10 на 1см^2, на верхней стороне головчатых волосков не более 16 на 1см^2, количество простых волосков не более 5 на 1см^2.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты эпидермиса верхней стороны листа из клеток с почти прямыми стенками, нижней – со слабоизвилистыми; клетки эпидермиса над крупными жилками и черешка листа – продольно-вытянутые; кутикула местами складчатая; округлые устьица окружены 3-4 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) – более многочисленные на нижней стороне листа; волоски простые многоклеточные с расширенным основанием, иногда со спавшимися клетками; головчатые волоски, как правило, на одноклеточной ножке с удлиненной двухклеточной головкой и, реже, на многоклеточной ножке с шарообразной или овальной одноклеточной головкой, встречаются также головчатые волоски с трех- или четырехклеточной головкой, клетки последней часто с заостренными концами, располагаются в 2 ряда (волоски могут быть обломаны и видны только округлые места их прикрепления); в местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку; фрагменты черешка, где проводящие пучки представлены спиральными и сетчатыми сосудами в сопровождении многочисленных неодревесневших волокон.

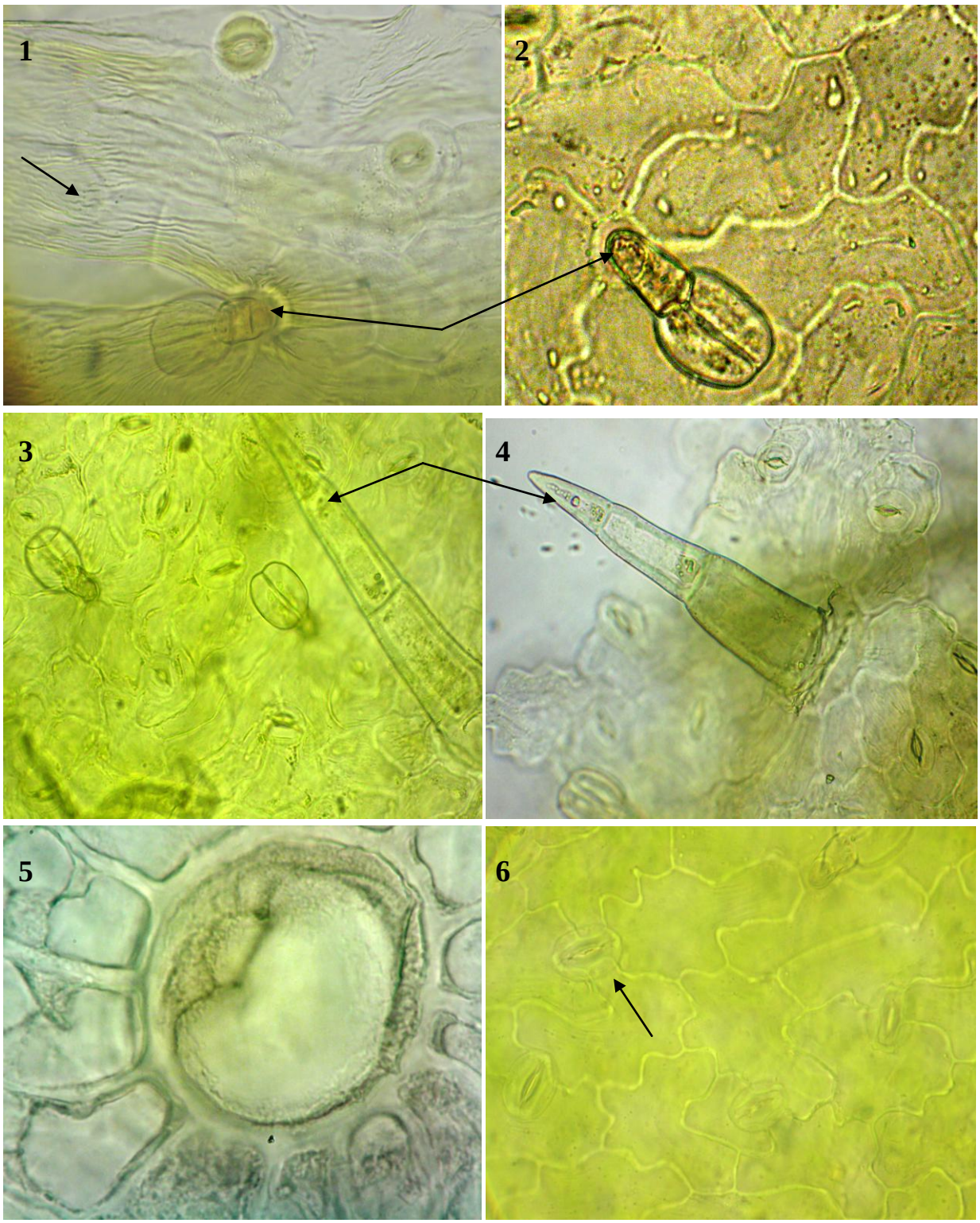


Рис.1 - Подорожника большого листья

фрагмент эпидермиса листа: 1- эпидермис с прямыми боковыми стенками и складчатой кутикулой; головчатый волосок на одноклеточной ножке с двухклеточной головкой; 2- головчатый волосок; 3,4 - простой 3-5-клеточный волосок, с расширенным основанием; 5 - место прикрепления простого волоска; 6 - многоугольные, извилистостенные клетки верхнего эпидермиса с устьицами

Примечание. К другим видам подорожников, встречающимся в сырье как примесь, относят:

а) Подорожник средний (*Plantago media L.*): листовая пластинка эллиптическая, опушенная, особенно по жилкам и краю листа. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса видны многочисленные простые, многоклеточные волоски, не имеющие расширенного основания, с гладкой или нежно-бородавчатой поверхностью, тонкостенные, часто со спавшимися члениками. Головчатые волоски с одноклеточной ножкой и удлиненной двухклеточной головкой.

б) Подорожник ланцетный (*Plantago lanceolata L.*): листовая пластинка удлиненно-ланцетовидная, опушена по жилкам. Под микроскопом при рассмотрении эпидермиса по жилкам и краю листа встречаются заостренные, длинные, толстостенные волоски, имеющие одну короткую базальную клетку и 2-3 длинные конечные клетки со своеобразным их сочленением. Головчатые волоски имеют одноклеточную ножку и многоклеточную (из 8-10 клеток) головку.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Аналитическую пробу листьев подорожника большого измельчают до частиц размером около 1 мм. Точную навеску (1,0 г) измельченного сырья помещают в плоскодонную коническую колбу объемом 50 мл, прибавляют 15 мл метилового спирта, и нагревают на водяной бане в течение 30 минут. По истечении времени полученное извлечение охлаждают, фильтруют. Охлажденное профильтрованное извлечение нанесят на хроматографическую пластинку размером 10х10см в виде полосы длиной 15-20 мм. На расстоянии 2 см от пятна исследуемого раствора наносят в виде точки микропипеткой 10 мкл раствора известного вещества аукубина. Пластину с нанесенными образцами подсушивют на воздухе и хроматографируют при комнатной температуре в камере для восходящей хроматографии в системе растворителей: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (7:1:2) После прохождения фронотом растворителя около 8 см, пластинку вытаскавают и подсушивают до удаления паров растворителя.

На хроматограмме проявляется основная зона адсорбции (R_f около 0,52-0,55) с голубой или темно-голубой флюоресценцией при 365нм. На хроматограмме могут быть видны и другие зоны адсорбции в виде пятен или полос.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность

Цельное сырье – не более 10 %; *измельченное сырье* – не более 10 %; *порошок* – не более 10 %.

Зола общая

Цельное сырье – не более 15 %; *измельченное сырье* – не более 15 %; *порошок* – не более 15 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте

Цельное сырье – не более 4%; *измельченное сырье* – не более 4%; *порошок* – не более 4%.

Измельченность сырья

Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, – не более 5 %.

Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %.

Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 1 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Листья, изменившие окраску. *Цельное сырье* – не более 5 %.

Кусочки листьев, изменивших окраску. *Измельченное сырье* – не более 5 %.

Цветочные стрелки. *Цельное сырье* – не более 1 %.

Кусочки цветочных стрелок. *Измельченное сырье* – не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %; *измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье* – не более 1 %; *измельченное сырье* – не более 1 %; *порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Цельное сырьё: содержание суммы полисахаридов в пересчете на глюкозу, не менее 25%; содержание гидроксикоричных кислот, в пересчете на кофейную кислоту – не менее 1,5%; содержание хлорофилла – не менее 2,0%. *Измельченное сырье:* содержание суммы полисахаридов в пересчете на глюкозу, не менее 25%; содержание гидроксикоричных кислот, в пересчете на кофейную кислоту – не менее 1,5%. содержание хлорофилла – не менее 2,0%. *Порошок:* содержание суммы полисахаридов в пересчете на глюкозу, не менее 25%; содержание гидроксикоричных кислот, в пересчете на кофейную кислоту – не менее 1,%; содержание хлорофилла – не менее 2,0%.

Полисахариды. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 2,0 г сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл воды очищенной и 4 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, колбу присоединяют к

обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживают через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды очищенной. Марлю с остатками сырья помещают в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяют еще один раз указанным выше способом. Полученное извлечение процеживают через пять слоев марли в ту же мерную колбу, марлю промывают и доводят объем извлечения водой очищенной до метки (раствор А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мл раствора А, прибавляют по каплям 40% раствор натрия гидроксида до получения раствора с pH 4,0-4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор Б). Раствор Б фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10-15 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл 1% раствора пикриновой кислоты и 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5 мл фильтрата раствора Б и колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем мерную колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор В).

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната и 5 мл воды очищенной, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл. Мерную колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин., после чего охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и доводят объем раствора водой очищенной до метки.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 470 ± 5нм.

Содержание суммы ПС и свободных сахаров в сырье в пересчете на глюкозу и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A\times V_1\times V_3\times V_5\times 100}{m\times E_{1\%}^{1\text{ñì}}\times V_2\times V_4\times(100-W)}$$, где

A – оптическая плотность раствора В;

m – масса сырья, г;

V_1 – объема раствора А, мл;

V_2 –аликвота из раствора А, мл;

V_3 – объем раствора Б, мл;

V_4 – аликвота из раствора Б, мл;

V_5 – объем раствора В, мл;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

$E_{1\text{ñì}}^{1\%}$ - 273,24 – удельный показатель поглощения комплекса РСО глюкозы с пикриновой кислотой при 470 ± 5нм.

Примечание.

Приготовление 40% раствора натрия гидроксида: 40,00 г натрия гидроксида (натра едкого, ГОСТ 4328-77) растворяют в 60 мл воды очищенной в мерной колбе объемом 100 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Хранят в склянках с резиновыми пробками.

Приготовление 20% раствора натрия карбоната: 20,00 г карбоната натрия безводного (натрий углекислый, ГОСТ 83-79) растворяют в 60 мл воды очищенной в мерной колбе бъемом 100 мл. При необходимости приготовленный раствор фильтруют. Сохраняют в склянках с резиновыми пробками.

Приготовление 1% раствора пикриновой кислоты: 1,00 г пикриновой кислоты (ТУ 6-09-08-317-80) растворяют в 50 мл 95% спирта в мерной колбе объемом 100 мл. Хранят в склянках с притертыми пробками, в защищенном от света месте, вдали от огня (взрывчатое вещество).

Гидроксикоричные кислоты. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм. Точную навеску измельченного сырья, около 0,5 г помещают в стеклянную колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 90 мл спирта 70%, и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Колбу и бумажный фильтр промывают с 10 мл 70% этанола, помещая фильтрат в мерную колбу.

Объединенные извлечения в мерной колбе при необходимости доводят до метки спиртом 70%, перемешивают (р-р А).

2 мл полученного р-ра А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом 70% до метки (р-р Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре СФ-2000 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 330нм. В качестве раствора сравнения используют 70% спирт этиловый.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в процентах (Х) в пересчете на кофейную кислоту и абсолютно-сухую массу сырья вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\mathrm{A} \times \mathrm{V}_1 \times V_2 \times 100}{m \times 735 \times (100 - W) \times V_3}$$, где:

А – оптическая плотность р-ра Б;

m – масса сырья в гр;

V_1 – объем р-ра А (100), мл;

V_2 – объем р-ра Б (25), мл;

V_3 – объем аликвоты р-ра А (2), мл;

W – влажность сырья в %;

735 - удельный показатель поглощения ($E_{1см}^{1\%}$) кофейной кислоты.

Хлорофилл. *Методика.* Около 0,5 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 95%, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Извлечение повторяют еще раз, используя 50 мл спирта 95%, при этом бумажный фильтр также переносят в колбу для экстракции. Объединенные извлечения в мерной колбе доводят до метки спиртом 95%, одновременно промывая колбу, в которой проводят экстракцию и перемешивают (р-р А).

2 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом 95% до метки (р-р Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре СФ-2000 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 663±5 нм. В качестве раствора сравнения используют 95% спирт этиловый.

Содержание хлорофилла в процентах (X) в пересчете на абсолютно-сухую массу сырья вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times V_1 \times V_2 \times 100}{m \times 944{,}5 \times (100 - W) \times V_3},$$

где: А – оптическая плотность раствора Б;

m – масса сырья, г;

V_1 – объем раствора А (100), мл;

V_2 – объем раствора Б (25), мл;

V_3 – объем аликвоты р-ра А (2), мл;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

944,5 – удельный показатель поглощения $E_{1см}^{1\%}$ хлорофилла при 663±5нм.

Примечание. Определение полисахаридов проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение гидроксикоричных кислот, проводят для сырья, предназначенного для производства настойки, экстракта.

Упаковка, маркировка и транспортирование

В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение

В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Приложение 2

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Утверждаю
_____ Ф.И.О.
«__» _____ 2018 г.

ФС.2.5.0041.15
(Обозначение ФС или ФСП)

Сосны обыкновенной почки ***Pini silvestris gemmae***
(Наименование ФС или ФСП)

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федераци
(Наименование организации -разработчика) лекарственного средства)

Изменение № ___

Срок введения изменений с "__" _____ ____ г.

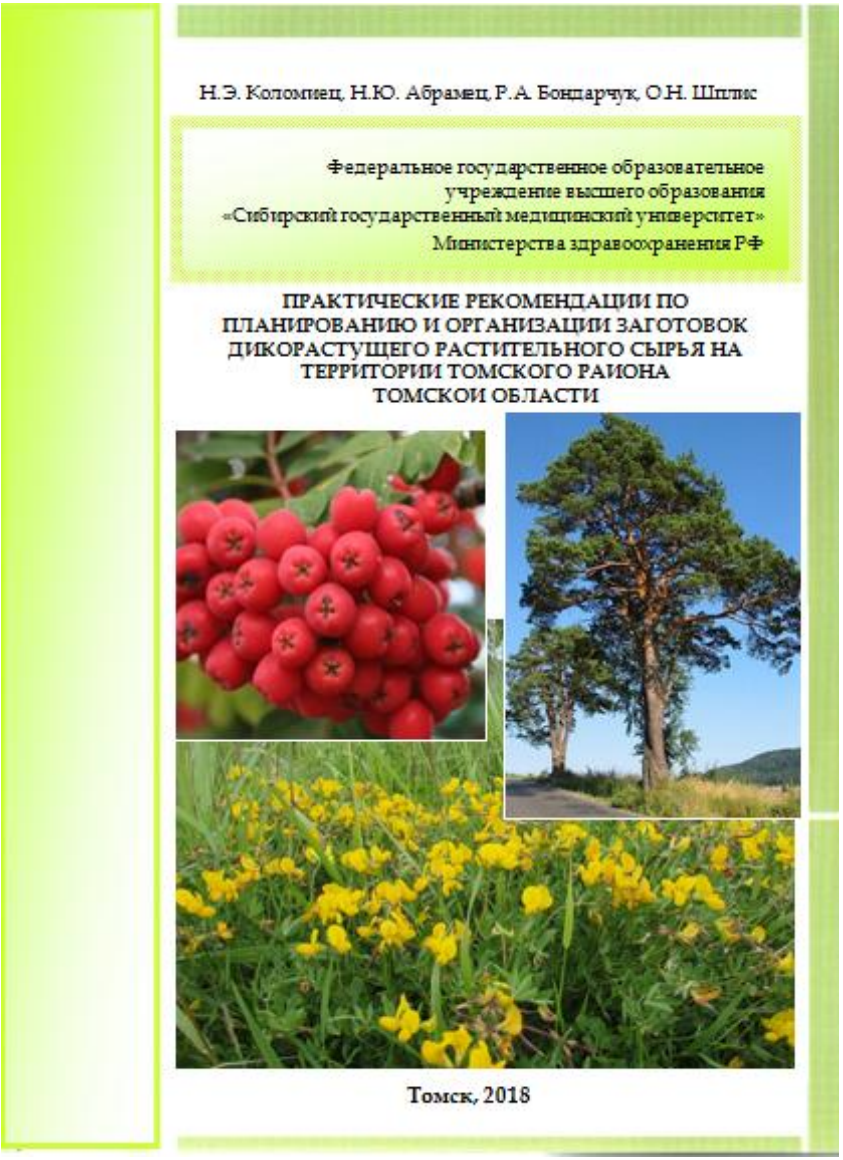
Количественное определение	**Количественное определение**
Цельное сырье: эфирного масла — не менее 0,3 %. Определение ***эфирного масла*** проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 20,0 г крупноизмельченного (без просеивания) сырья, время перегонки — 2 ч).	*Цельное сырье:* эфирного масла — не менее 0,7 %. Определение ***эфирного масла*** проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 2, из навески 20,0 г крупноизмельченного (без просеивания) сырья, время перегонки — 2 ч).
Старая редакция	Новая редакция

Изменения в ФС «Сосны обыкновенной почки» разработали и составили:

Профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, д-р фарм.наук — Н.Э.Коломиец

Старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России — Н.Ю.Абрамец

Канд.фарм.наук — Р.А. Бондарчук



Н.Э. Коломиец, Н.Ю. Абрамец, Р.А. Бондарчук, О.Н. Шплис

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПЛАНИРОВАНИЮ И ОРГАНИЗАЦИИ ЗАГОТОВОК ДИКОРАСТУЩЕГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА ТЕРРИТОРИИ ТОМСКОГО РАЙОНА ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Томск, 2018

УДК 631/635:633.83
ББК 41.8/41.9
К 22

Авторы:
профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии,
доктор фармацевтических наук Н.Э. Коломиец
старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии,
Н.Ю. Абрамец
кандидат фармацевтических наук Р.А. Бондарчук
старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии,
О.Н. Шплис

К 22 Практические рекомендации по организации и планированию заготовок дикорастущего растительного сырья на территории Томского района Томской области. – ФГБОУ ВО СибГМУ, 2018. – 83 с.

В практических рекомендациях отражена краткая систематическая, эколого-географическая характеристика, хозяйственное назначение основных видов лекарственных растений, произрастающих в Томском районе.

Даны рекомендации по организации, планированию сбора, переработке лекарственных растений в естественных условиях.

Приведены перспективные технологии выращивания лекарственного сырья в крестьянских (фермерских) и личных подсобных хозяйствах. Отражена экономика заготовки лекарственного сырья, приведена нормативная и правовая база обеспечения заготовительной деятельности.

Рекомендации предназначены для оказания практической помощи сельскому населению по организации альтернативной занятости в сфере заготовок и выращивания лекарственных растений, а также могут быть использованы специалистами государственных и муниципальных органов управления и информационно – консультационных и учебно – методических центров, преподавателями профильных образовательных учреждений.

УДК 631/635:633.83
ББК41.8/41.9
©ФГБОУ ВО СибГМУ, 2018

Приложение 4

Общество с ограниченной ответственностью
«Фарм-Трейд»
филиал в г. Томске

г. Томск « 11 » мая 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки (рекомендации, материалов):

- методики количественного определения в листьях подорожника хлорофилла, гидроксикоричных кислот, полисахаридов; суммы антоцианов плодах рябины обыкновенной;
- практические рекомендации по планированию и организации заготовок лекарственного растительного сырья на территории Томской области.

Авторы, адрес организации-исполнителя: старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Абрамец Наталья Юрьевна, профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д-р фарм.наук Коломиец Наталья Эдуардовна; канд.фарм.наук Бондарчук Руслан Анатольевич; Шплис Ольга Николаевна, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 634050, г.Томск, Московский тракт, 2.

Где, в каком виде внедрено: ООО «Фарм-Трейд», лаборатория контроля качества, отдел планирования. Начало внедрения – февраль 2018 года.

Заместитель директора
по качеству А.Н. Рыбаков

Приложение 5

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

ООО «СИБРЕСУРС»

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование предложения для внедрения (разработки):

- методики количественного определения хлорофилла, гидроксикоричных кислот, полисахаридов в листьях подорожника, суммы антоцианов плодах рябины обыкновенной;

- практические рекомендации по планированию и организации заготовок лекарственного растительного сырья на территории Томской области.

Авторы, адрес организации-исполнителя: профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д-р фарм.наук Коломиец Наталья Эдуардовна, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Абрамец Наталья Юрьевна; канд.фарм.наук Бондарчук Руслан Анатольевич; Шплис Ольга Николаевна, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии. ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 634050, г.Томск, Московский тракт, 2.

Где, в каком виде внедрено: ООО «СибРесурс», физико-химическая лаборатория; питомник плодовых, декоративных лиственных, хвойных растений, оранжерея экзотических растений. Начало внедрения – май 2018 года.

« 18 » июня 2018 г.

Генеральный директор _____ В. В. Гольдман

Приложение 6

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ

Кафедра фармакогнозии с курсами ботаники и экологии

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки (рекомендации, материалов):

- методики количественного определения хлорофилла, гидроксикоричных, полисахаридов кислот в листьях подорожника, суммы антоцианов плодах рябины обыкновенной.

Авторы: старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Абрамец Наталья Юрьевна, профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д-р фарм.наук Коломиец Наталья Эдуардовна; канд.фарм.наук Бондарчук Руслан Анатольевич.

Где, в каком виде внедрено (используется): в учебном процессе кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии при обучении студентов по специальности «Фармация»; ординаторов по специальности «Фармацевтическая химия и фармакогнозия»; аспирантов по специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

«25» декабря 2018 г.

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь _____ М.Ю. Хлусова
25.12 2018 г.

Заведующий кафедрой фармакогнозии
с курсами ботаники и экологии,
д-р фарм.наук, профессор _____ Г.И. Калинкина

Приложение 7

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра фармации

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки (рекомендации, материалов):

- методики количественного определения хлорофилла, гидроксикоричных кислот в листьях подорожника, суммы антоцианов в плодах рябины обыкновенной.

Авторы: старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Абрамец Наталья Юрьевна, профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д-р фарм. наук Коломиец Наталья Эдуардовна; канд. фарм. наук Бондарчук Руслан Анатольевич.

Где, в каком виде внедрено (используется): в учебном процессе кафедры фармации КемГМУ при обучении студентов по дисциплине «Фармакогнозия» по темам занятий: «Лекарственные растения и сырье, содержащие полисахариды», ««Лекарственные растения и сырье, содержащие простые фенолы, фенологликозиды, фенилпропаноиды».

« 14 » июня 2019 г.

Заведующий кафедрой фармации КемГМУ,
канд. фарм.наук, доцент _____ И. Г. Танцерева

Подпись заверяю:
Специалист по кадрам

Приложение 8

Таблица 1

Компонентный состав эфирного масла в почках сосны обыкновенной

Компонент	RT	RI	teo1	teo2	teo3	teo4	teo5	teo6	teo7	teo8	teo9	teo10	teo11	teo12	teo13	teo14	teo15	teo16	teo17	teo18	teo19	te020
tricyclene	7,25	921	0,025	0,033	0,05	0,047	0,089	0,072	0,057	0,062	0,052	0,046	0,037	0,054	0,031	0,019	0,077	0,087	0,021	0,023	0,06	0,031
thujene, 3-	7,41	926	0,223	0,229	0,077	0,179	0,127	0,185	0,123	0,189	0,121	0,138	0,191	0,209	0,148	0,152	0,154	0,2	0,226	0,128	0,198	0,181
pinene, alpha-	7,62	932	7,041	6,901	11,891	9,811	10,699	11,697	11,312	10,393	8,659	18,592	4,339	7,389	5,127	4,874	12,72	8,593	4,383	5,288	8,098	6,994
camphene	8,08	947	0,203	0,194	0,333	0,289	0,673	0,363	0,358	0,312	0,298	0,288	0,193	0,287	0,168	0,158	0,49	0,453	0,088	0,159	0,313	0,223
verbenene	8,26	952	0,065	0,099	0,114	0,102	0,276	0,166	0,114	0,113	0,036	0,039	0,09	0,182	0,057	0,096	0,169	0,027	0,077	0,094	0,209	0,114
cyclohepta-1,3,5-triene, 3,7,7-trimethyl-	8,79	970	1,844	3,182	0,38	1,141	0,476	1,259	0,6	1,269	0,269	0,413	2,34	2,876	1,446	2,091	0,936	1,001	2,568	2,615	2,687	1,859
sabinene	8,9	973	0,792	0,529	0,626	0,818	0,568	0,91	0,618	0,911	0,701	0,757	0,419	0,277	0,463	0,353	0,178	0,389	0,74	0,36	0,451	0,538
pinene, beta-	8,99	975	5,302	7,056	5,286	5,251	8,058	5,061	7,46	6,424	4,758	6,267	2,644	3,275	3,13	4,34	9,449	1,036	2,323	4,141	4,097	4,463
myrcene, beta-	9,5	991	3,792	3,436	8,052	5,452	8,316	6,25	7,973	4,283	10,076	6,278	3,083	5,936	6,294	1,117	2,104	4,135	1,611	1,594	7,791	5,094
phellandrene, alpha-	9,94	1004	0,154	0,233	0,179	0,215	0,304	0,156	0,243	0,16	0,193	0,211	0,269	0,41	0,182	0,134	0,384	0,194	0,268	0,112	0,27	0,251
carene, 3-	10,18	1010	35,453	25,837	15,783	28,905	13,381	21,959	17,35	24,557	22,838	27,475	26,217	21,06	21,98	19,9	7,973	32,328	28,394	22,048	19,897	21,391
terpinene, alpha-	10,36	1017	0,33	0,253	0,174	0,3	0,184	0,192	0,183	0,183	0,338	0,374	0,365	0,361	0,23	0,187	0,216	0,394	0,366	0,112	0,293	0,284
cymol, para-	10,55	1024	0,159	0,394	0,063	0,17	0,09	0,165	0,086	0,247	0,055	0,064	0,31	0,326	0,233	0,221	0,124	0,104	0,278	0,286	0,333	0,234
cymene, orto-	10,63	1039	0,915	1,478	0,513	0,956	0,728	1,021	0,535	0,958	0,446	0,415	1,404	1,597	1,097	1,073	0,76	0,704	1,323	1,441	1,439	1,047
phellandrene, beta-	10,79	1028	9,233	10,112	24,98	14,698	17,645	11,583	19,52	12,207	16,61	20,331	10,59	7,885	10,21	10,7	30,99	5,091	10,828	12,067	9,997	13,497
cineol, 1,8-	10,86	1031	0,241	0,114	0,044	0,046	0,052	0,05	0,057	0,093		0,071	0,088		0,057	0,078	0,079	0,062	0,07	0,024	0,059	0,047
ocimene, trans-, beta-	11,48	1048	0,254	0,076	0,436	0,161	0,026	0,106	0,147	0,094	0,224	0,289	0,097	0,153	0,223	0,084	0,014	0,558		0,025	0,112	0,118
terpinene, gamma-	11,84	1058	0,755	0,527	0,34	0,576	0,314	0,398	0,392	0,404	0,656	0,729	0,741	0,678	0,513	0,454	0,324	0,851	0,787	0,305	0,538	0,552
cymenene, meta-	12,67	1082	0,172	0,314	0,086	0,121	0,077	0,137	0,062	0,144		0,023	0,337	0,369	0,185	0,242	0,181	0,114	0,32	0,348	0,298	0,198
terpinolene	12,89	1088	4,125	2,447	2,04	3,082	1,429	1,891	1,986	2,124	3,489	3,893	3,692	2,406	3,05	2,175	1,388	4,799	3,569	2,239	2,359	2,854
?	13,14							0,037		0,049			0,051		0,058	0,085	0,082		0,09	0,055	0,1	0,044
linalool	13,35	1100		0,078	0,086	0,106	0,272	0,288	0,124	0,104	0,065			0,183	0,093	0,039		0,024	0,027	0,119	0,164	0,132
menth-2-en-1-ol, para-, cis-	14,04	1121	0,079	0,117	0,186	0,154	0,222	0,202	0,144	0,15	0,102	0,12	0,084	0,101	0,113	0,147	0,176	0,024	0,138	0,125	0,111	0,102
campholenal, alpha-	14,23	1126	0,061	0,156	0,117	0,083	0,25	0,173	0,093	0,117	0,036	0,043	0,104	0,226	0,054	0,129	0,176	0,016	0,082	0,037	0,192	0,123
limonene oxide, cis-	14,54	1133	0,272	0,357	0,181	0,291	0,164	0,454	0,174	0,407	0,08	0,071	0,162	0,162	0,101	0,269	0,089	0,07	0,328	0,429	0,282	0,187
pinocarveol, trans-	14,66	1138	0,406	1,174	0,495	0,458	0,994	0,663	0,58	0,635	0,241	0,31	0,594	0,988	0,546	0,904	1,197	0,148	0,448	0,623	0,831	0,623
camphor	14,88	1144		0,128	0,186	0,166	0,24	0,367	0,121	0,231	0,06	0,047	0,093	0,089	0,118	0,103	0,099	0,027	0,059	0,098	0,112	0,059
?	15,02		0,1	0,202	0,118	0,099	0,23	0,253	0,129	0,094	0,088	0,095	0,208	0,389	0,156	0,243	0,293	0,043	0,207	0,125	0,351	0,222
?	15,14		0,041	0,131				0,064	0,036				0,116	0,147	0,068	0,128		0,021	0,149	0,15	0,13	
?	15,42		0,689	0,916	0,413	1,291	0,473	1,341	0,709	1,5	0,48	0,577	0,515	0,824	0,421	0,818	0,239	0,294	0,858	0,776	0,699	0,602
pinocarvone	15,52	1162	0,074	0,21	0,071	0,07	0,187	0,093	0,101	0,092	0,036	0,059	0,146	0,148	0,067	0,19	0,304	0,012	0,054	0,069	0,191	0,137
mentha-1,5-dien-8-ol, para-	15,66	1168	0,665	1,262	0,577	1,142	1,114	1,138	0,777	1,166	0,503	0,48	0,912	1,317	0,63	1,164	1,015	0,385	0,962	0,608	1,163	0,961
terpinen-4-ol	16,03	1177	0,858	0,939	0,582	0,959	0,65	0,876	0,571	0,75	0,705	0,722	1,127	1,356	1,017	0,895	0,621	1,094	1,102	1,08	0,92	0,878
cymen-8-ol, meta-	16,2	1184	0,544	0,911	0,177	0,595	0,201	0,462	0,274	0,582	0,18	0,195	0,704	0,658	0,482	0,626	0,363	0,199	0,604	0,792	0,568	0,548
cymen-8-ol, para-	16,31	1186	0,543	0,972	0,407	0,693	0,554	0,752	0,474	0,665	0,312	0,317	0,763	0,891	0,791	0,81	0,497	0,306	0,412	0,988	0,724	0,733
terpineol, alpha-	16,5	1191	0,378	0,598	0,317	0,418	0,536	0,318	0,387	0,381	0,34	0,437	0,507	0,759	0,502	0,543	0,755	0,418	0,387	0,602	0,516	0,457
.alpha.-Thujenal	16,71		0,346	1,237	0,465	0,491	0,836	0,577	0,533	0,592	0,2	0,283	0,541	0,908	0,543	0,956	1,193	0,116		0,632	0,792	0,624
2,4-Cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl-	17,12		0,597	0,931	0,157	0,431	0,228	0,546	0,303	0,702	0,137	0,19	0,814	1,036	0,562	0,934	0,401	0,251	0,836	0,862	0,819	0,672
carveol, trans-	17,47	1219		0,202	0,236	0,176	0,229	0,121	0,213	0,164	0,05	0,082	0,151	0,149	0,105	0,248	0,398	0,015	0,056	0,117	0,132	0,139
car-2-en-4-one	17,62	1223	0,16	0,312	0,09	0,241	0,105	0,241	0,126	0,23	0,085	0,089	0,313	0,321	0,179	0,242	0,082	0,086	0,276	0,182	0,277	0,239
citronellol	17,81	1229														0,099	0,104			0,081		

carveol, cis-	17,88	1233		0,064	0,076	0,06	0,072	0,049	0,097			0,042	0,057		0,023	0,872	0,144			0,053	0,042	0,045
thymol methyl ether	18,05	1236	0,514	0,651	1,026	0,802	1,499	1,281	0,641	0,644	0,659	0,701	0,859	1,479	0,893	0,155	1,424	0,559	1,795	0,967	1,165	1,168
cumine aldehyde	18,21	1241	0,073	0,131	0,093	0,084	0,171	0,187	0,056	0,083	0,024	0,028	0,149	0,329	0,134	0,194	0,149	0,027	0,208	0,143	0,217	0,139
carvone	18,35	1245	0,043	0,18	0,195	0,105	0,13	0,075	0,132	0,091	0,023	0,052	0,141	0,081	0,057	0,115	0,392	0,016	0,058	0,098	0,094	0,105
car-3-en-2-one	18,62	1253	0,103	0,222	0,046	0,144	0,054	0,132	0,077	0,165	0,042	0,046	0,101	0,095	0,092	0,03	0,044	0,057	0,114	0,172	0,128	0,105
?	19,22																			0,158		
phellandral	19,41	1276	0,172	0,355	0,28	0,226	0,608	0,504	0,314	0,246	0,204	0,188	0,333	1,072	0,35	0,504	0,646	0,159	0,561	0,357	0,751	0,413
bornyl acetate	19,81	1287	0,392	0,643	0,642	0,545	1,27	0,882	0,863	0,653	0,833	0,506	1,278	1,806	1,194	0,653	0,978	1,129	0,477	0,421	1,162	0,881
carvacrol	20,29	1302											0,04	0,063	0,051	0,053	0,044	0,018	0,089	0,06	0,049	0,058
car-3-en-5-one	20,63	1315		0,222											0,058	0,034		0,018	0,04	0,16	0,021	0,032
?	20,77														0,176			0,036				0,089
?	21,52								0,048		0,128	0,075			0,03	0,032	0,015					0,042
?	21,59					0,231		0,068	0,072	0,19	0,097	0,117	0,243	0,265	0,493	0,224	0,033	0,415		0,075	0,117	0,368
terpineol acetate, alpha-	21,91	1351		1,321		1,258			0,723	1,004	0,665	0,555	0,841	1,173	2,004	1,357		1,162			0,461	2,089
longipinene, alpha-	21,94	1352	1,367		0,372		0,759	1,137					0,189	0,406			1,025		0,453	3,422	0,563	
cyclosativene	22,5	1368	0,036			0,024	0,049	0,038	0,026				0,025	0,065	0,025	0,028	0,033		0,091	0,164	0,053	0,038
longicyclene	22,61	1370	0,143	0,089	0,115	0,116	0,221	0,209	0,1	0,084	0,049	0,065	0,122	0,315	0,134	0,126	0,205	0,097	0,367	0,339	0,236	0,167
copaene, alpha-	22,78	1378	0,229	0,246	0,18	0,21	0,142	0,209	0,361	0,282	0,3	0,167	0,219	0,231	0,254	0,428	0,201		0,285	0,233	0,185	0,284
?	22,89																			0,183		
bourbobene, beta-	23,07	1387	0,042	0,252	0,154	0,148	0,086	0,246	0,197	0,286	0,126	0,064	0,216	0,188	0,118	0,195	0,042	0,297	0,213		0,25	0,232
sativene	23,24	1390	0,127	0,099	0,094	0,085	0,147	0,161	0,107	0,1	0,066		0,108	0,235	0,111	0,196	0,153	0,039	0,27	0,412	0,149	0,189
elemene, beta-	23,3	1392	0,24	0,226	0,338	0,399	0,131	0,124	0,45	0,492	0,97	0,423	0,178	0,097	0,17	0,329	0,014	0,106	0,061	0,053	0,128	0,247
longipinene, beta-	23,54	1401															0,047	0,218		0,178		
longifolene	23,73	1408	1,384	1,011	1,809	1,622	3,044	2,819	1,182	1,181	0,616	0,651	1,563	3,8	1,631	1,635	2,193	0,692	5,075	4,393	2,876	1,82
caryophyllene	24,18	1422	1,402	0,457	1,099	0,765	0,343	1,097	0,879	0,779	0,705	0,641	0,657	0,835	1,888	0,97	0,594	3,46	2,924	0,623	0,766	1,137
copaene, beta-	24,48	1432	0,064	0,105	0,116	0,071	0,064	0,167	0,124	0,164	0,119	0,064	0,129	0,137	0,131	0,196	0,075	0,14	0,143	0,07	0,131	0,124
aromadendrene	24,77	1440	0,101	0,121	0,126	0,129	0,105	0,156	0,133	0,132	0,154	0,084	0,12	0,184	0,176	0,235	0,146	0,097	0,141	0,114	0,153	0,163
guaia-6,9-diene	24,91	1445	0,457	0,464	0,653	0,398	1,038	1,269	0,745		1,06	0,771	0,679	0,675	1,279	0,555	0,126	0,365	0,764	0,87	0,968	0,906
?	25,09				0,054		0,081				0,068		0,045	0,06	0,086	0,045				0,163	0,067	0,063
muurola-3,5-diene, cis-	25,14	1448	0,128	0,159	0,186	0,118	0,046	0,076	0,273	0,185	0,204	0,164	0,114	0,163	0,09	0,244	0,132	0,136	0,158	0,086	0,108	0,156
humulene	25,24	1456	0,234	0,107	0,09	0,111	0,065	0,174	0,173	0,136	0,142	0,124	0,153	0,194	0,355	0,215	0,148	0,653	0,565	0,161	0,15	0,207
farnesene, (E)-, beta-	25,3	1458															0,119			0,173		
muurola-4(14),5-diene, cis-	25,53	1465								0,134	0,14	0,034	0,034			0,046	0,034	0,071			0,025	0,059
cadina-1(6),4-diene, trans-	25,85	1476	0,155	0,216	0,263	0,141		0,07	0,282	0,401	0,255	0,142	0,164	0,218	0,166	0,396	0,172	0,272	0,152	0,113	0,146	0,217
muurolene, gamma-	25,94	1480	0,253	0,388	0,862	0,238	0,106	0,427	0,414	0,734	0,488	0,205	0,343	0,293	0,341	0,496	0,37	0,84	0,453	0,202	0,324	0,434
germacrene D	26,09	1484	0,462	0,31	0,122	0,334	0,164	1,617	0,774	0,298	0,89	0,477	0,262	0,171	0,409	0,38	0,312	3,037	0,366	0,2	0,202	0,417
humulene, gamma-	26,16	1484																		0,118		
selinene, beta-	26,24	1488	0,214	0,357	0,094	0,213	0,119	0,067	0,222	0,086	0,46	0,163	0,433	0,239	0,375	0,631	0,155	0,284	0,108	0,106	0,239	0,351
?	26,32		0,103		0,144	0,05	0,142	0,073	0,101	0,233	0,236	0,188	0,096	0,053	0,126	0,054		0,052	0,155		0,105	0,112
bicylosesquiphllandrene	26,42	1494	0,168	0,262	0,21	0,204	0,127	0,118	0,334	0,428	0,296	0,193	0,24	0,287	0,269	0,49	0,142	0,167	0,295	0,183	0,25	0,315
amorphene, gamma-	26,5	1496	0,191	0,303		0,248	0,134	0,233	0,381	0,247	0,309	0,188	0,273	0,214	0,332	0,629	0,188	0,428	0,219	0,196	0,221	0,341
bicyclogermacrene	26,56	1500	0,339	0,158	0,183	0,239	0,062	0,049	0,197	0,828	0,869	0,34	0,103	0,504	0,1	0,163	0,232	0,148		0,105	0,077	0,239
muurolene, alpha-	26,66	1502	0,576	0,74	0,612	0,691	0,257	0,436	0,935		1,177	0,594	0,628		0,72	1,064	0,473	0,729	0,632	0,379	0,442	0,807
bisabolene, beta-	26,9	1511			0,034		0,367	0,116	0,059			0,04	0,079	0,071	0,043	0,067	0,359	0,111	0,094	0,203	0,139	0,111
cadinene, gamma-	27,08	1517	0,686	1,02	0,699	0,94	0,247	0,81	1,338	1,43	1,545	0,695	0,97	0,569	0,932	1,732	0,78	1,348	0,53	0,519	0,522	1,068
?	27,16			0,564	0,126	0,348	0,429		0,338	0,635	0,25		0,948	0,243	0,292	0,238	0,117				0,324	0,165
cadinene, delta-	27,35	1527	1,993	2,554	1,733	2,122	0,617	1,364	3,111	2,269	3,978	1,832	2,379	1,8	2,389	3,852	1,827	3,95	1,431	1,412	1,435	2,554
zonarene	27,42	1528									0,137	0,076	0,118	0,122	0,125	0,257	0,086	0,201	0,131	0,088	0,089	0,131
cadina-1,4-diene, trans-	27,62	1536	0,087	0,17	0,067	0,072	0,06	0,073	0,189	0,114	0,168	0,077	0,131	0,146	0,23	0,384	0,126	0,162	0,113	0,082	0,127	0,153
cadinene, alpha-	27,77	1541	0,063	0,107	0,061	0,1	0,021	0,049	0,137	0,13	0,217	0,061	0,097	0,063	0,095	0,108	0,095	0,155	0,05	0,046	0,049	0,097
	27,85						0,075	0,14		0,148		0,015	0,129	0,177	0,117	0,144			0,123	0,171	0,181	0,097
calacorene, alpha	27,93	1546	0,109	0,241	0,076	0,128	0,035	0,074	0,11	0,163	0,076	0,046	0,299	0,232	0,261	0,476	0,209	0,07	0,175	0,2	0,183	0,235

salviadienol	28,24	1555	0,051	0,07	0,036		0,057	0,08	0,076	0,056		0,011	0,107	0,101	0,12	0,15	0,081	0,115	0,206		0,146	0,111
?	28,4																			0,142		
longicamphenylone	28,49	1567	0,109	0,156	0,065	0,082	0,089	0,078	0,091	0,088		0,013	0,195	0,313	0,166	0,296	0,176	0,073	0,32	0,498	0,163	0,175
spathulenol	28,94	1580	1,158	1,618	0,892	1,444	0,511	0,453	1,217	1,97	1,338	0,839	1,638	1,064	1,707	3,264	0,587	0,687	0,212	0,508	0,78	1,718
caryophyllene oxide	29,11	1586	0,633	0,488	0,553	0,477	0,178	0,751	0,452	0,612	0,213	0,23	0,605	0,903	1,107	1,234	0,421	0,482	2,344	0,779	0,874	0,846
?	29,23			0,077			0,086	0,131		0,063	0,061	0,047	0,138	0,118	0,167	0,113	0,021		0,125	0,171	0,199	0,16
longiborneol	29,5	1600	0,066		0,066	0,055	0,132	0,128				0,041	0,159	0,283	0,146		0,109	0,032	0,316	0,231	0,226	0,111
copaborneol	29,72	1605	0,068	0,083	0,047	0,104				0,048	0,085	0,044	0,114	0,107	0,125	0,175	0,028	0,034	0,146	0,088	0,101	0,102
?	29,87				0,168			0,214		0,109			0,084	0,137	0,167	0,216	0,059	0,104	0,298	0,163	0,08	0,117
?	29,92	1600									0,079		0,13	0,124	0,156	0,214	0,076		0,213		0,138	0,152
?	30,03												0,101				0,076					
selin-6-en-4-ol	30,12	1620					0,053	0,1		0,067	0,068	0,042	0,132	0,124	0,168	0,13	0,05	0,058	0,09	0,171	0,124	0,135
corocalene, alpha-	30,22	1624									0,052		0,166	0,07	0,115	0,163	0,031	0,059			0,062	0,071
?	30,28												0,135	0,358			0,22					
cubenol, 1-epi-	30,39	1632	0,246	0,309	0,19	0,178	0,118	0,167	0,36	0,288	0,254	0,185	0,43	0,688	0,46	0,776	0,508	0,351	0,276	0,476	0,291	0,372
.tau.-Muurolol	30,76		0,67	0,941	0,773	0,851	0,225	0,393	1,15	1,041	1,531	0,906	1,379	0,17	1,075	1,938		1,377	0,511	0,695	0,572	1,097
cadinol, delta-	30,88	1649	0,149	0,178	0,158	0,119	0,067	0,146	0,311	0,174	0,181	0,189	0,296	0,525	0,259	0,388	0,176	0,233	0,268	0,211	0,175	0,29
cadinol, alpha-	31,12	1658	0,62	0,722	0,848	0,744	0,198	0,397	1,063	0,946	1,533	0,805	1,241		0,924	1,434	0,361	1,591	0,43	0,448	0,499	0,811
?	31,56												0,174	0,197	0,248	0,291	0,079	0,064	0,371	0,147	0,099	0,143
?	31,65							0,084						0,217		0,277			0,178	0,233	0,17	0,171
cadalene	31,68	1677		0,19			0,057						0,246		0,222		0,143					
bisabolol, alpha-	31,96	1688															0,248			0,221		
eudesma-4(15),7-dien-1beta-ol	31,99	1688		0,075	0,028			0,063	0,051	0,041		0,013	0,082	0,06	0,113	0,112		0,121	0,137		0,09	0,123
?	32,11			0,066						0,068		0,014	0,154	0,058	0,12	0,203					0,049	0,081
?	32,46			0,094					0,08	0,09	0,036	0,035	0,234	0,063	0,104	0,197	0,032	0,031			0,056	0,106
?	32,69				0,13		0,063	0,136		0,089	0,031			0,059		0,101			0,07	0,049		
?	32,91												0,078	0,038	0,098	0,198		0,044		0,041		0,098
chamazulene	33,18	1730											0,07	0,054	0,131	0,138	0,022	0,023		0,048	0,053	0,073
?	36,7		0,07	0,176	0,074	0,038	0,115	0,207	0,064	0,077	0,028	0,028	0,189	0,337	0,209	0,203	0,133	0,062	0,228	0,234	0,34	0,131
?	36,885			0,114									0,073	0,068	0,072	0,075			0,02		0,087	0,041
?	36,99		0,091	0,287	0,039			0,089	0,039	0,076	0,022		0,224	0,196	0,161	0,17	0,065	0,044	0,083	0,13	0,212	0,107
?	37,38				0,029			0,092			0,012		0,094	0,181	0,091		0,075		0,126		0,169	0,055
?	37,47				0,058			0,273			0,012		0,039	0,067	0,05		0,035		0,041		0,063	0,017
?	37,61		0,047	0,175	0,087	0,051	0,135	0,36	0,065	0,117	0,048	0,029	0,22	0,385	0,257	0,218	0,215	0,043	0,199	0,205	0,407	0,159
?	37,77		0,079	0,252	0,119	0,075	0,202		0,128	0,174	0,057	0,049	0,324	0,491	0,315	0,31	0,295	0,055	0,38	0,269	0,431	0,183
?	37,83				0,16							0,03			0,245	0,171	0,025					0,088
cembrene	38,32	1937					0,069	0,086					0,128	0,113	0,139	0,13	0,455	0,072	0,11	0,561	0,128	0,089
?	38,48				0,083		0,148	0,161			0,034	0,009	0,167	0,256	0,162	0,177	0,15	0,036	0,187	0,179	0,27	0,105
pimara-8(14),15-diene	38,62	1945		0,072	0,063	0,041	0,105	0,142	0,032		0,028	0,027	0,097		0,135	0,084		0,039	0,116		0,178	0,086
cembrene, iso-	38,65	1950									0,064						0,191			0,157		
?	38,73			0,2	0,175	0,085	0,333	0,375	0,137	0,173	0,067	0,063	0,351	0,433	0,267	0,296	0,299	0,048	0,354	0,353	0,444	0,211
camphorene, meta-	38,79	1953									0,053			0,167	0,223			0,088			0,118	0,058
cembrene, neo-	39,04	1965	0,247	0,161	0,135	0,109	0,133	0,21	0,151	0,22	0,081	0,088	0,199	0,096	0,271	0,203	0,122	0,037		0,426	0,138	0,165
?	39,32			0,191			0,257	0,279		0,203	0,076		0,069	0,125	0,111		0,055	0,053			0,194	0,066
dehydroabietan, nor- (isomer 1)	39,46	1983	0,381	0,645	0,208	0,131	0,18	0,223	0,197	0,322		0,104	0,794	0,596	0,582	0,577	0,223	0,11	0,327	0,783	0,63	0,368
?	39,69												0,16	0,146	0,139	0,104	0,047		0,092	0,239	0,166	0,083
isopimara-7,15-diene	39,77		0,264	0,156	0,551	0,239	0,425	0,36	0,237	0,275	0,131	0,159	0,26	0,365	0,367	0,395	0,363	0,18	0,725	0,505	0,308	0,241
dehydroabietan, nor- (4-methylene-)	39,97	2004	0,311	0,466	0,214	0,094	0,178	0,195	0,138	0,249	0,048	0,082	0,734	0,542	0,487	0,462	0,239	0,105	0,377	1	0,6	0,329
dehydroabietan, nor- (isomer 2)	40,33	2020	1,373	1,711	1,358	0,589	0,896	1,08	0,792	1,391	0,383	0,458	2,147	1,627	1,739	1,646	0,777	0,496	1,414	2,666	1,903	1,242
isocembrol	41,15	2058															0,112			0,383		

dehydroabietane	41,25	2060	0,289	0,288	0,39	0,101	0,177	0,269	0,163	0,226	0,068	0,1	0,508	0,384	0,51	0,473	0,229	0,135	0,335	1,177	0,483	0,301
?	41,66														0,089	0,101					0,09	
abietadiene	41,84	2083	0,157	0,059	0,145	0,029	0,102	0,111	0,081	0,081	0,057	0,09	0,128	0,049	0,154	0,089	0,047	0,092	0,081	0,122	0,101	0,092
?	42,38				0,115		0,384	0,273		0,166	0,069	0,083	0,171	0,138	0,194	0,086	0,04	4,048			0,129	0,091
?	42,42															0,133			0,155			
?	43,32		0,095		0,162		0,068	0,07		0,053	0,034	0,061	0,077		0,143	0,089	0,033		0,275		0,055	0,086
?	43,42		0,088	0,09	0,065		0,048	0,057		0,053		0,022	0,213	0,107	0,183	0,166	0,046		0,101	0,362	0,171	0,102
pimarinal	43,7	2167	0,144	0,09	0,187		0,187	0,327	0,121	0,112	0,071	0,072	0,199	0,23	0,373	0,207	0,081	0,146	0,297	0,19	0,358	0,186
?	44,05		0,108	0,126	0,076		0,052	0,059	0,06	0,049		0,029	0,353	0,169	0,317	0,276	0,072		0,164	0,537	0,19	0,108
?	44,9		0,242	0,115	0,276	0,048	0,255	0,366	0,171	0,179	0,107	0,143	0,291	0,277	0,653	0,393	0,173	0,375	0,566	0,411	0,387	0,26
palustral	45,24	2238	1,588	0,318	1,011	0,181	0,821	0,777	0,569	0,562	0,417	0,648	0,793	0,301	0,873	0,502	0,18	0,89	0,709	0,532	0,571	0,606
?	46,66												0,129			0,066				0,143		
?	45,74				0,502	0,119									0,243	0,536						
dehydroabietal	45,93	2272	0,583	0,298	0,177	0,047	0,287	0,391	0,29	0,393	0,138	0,218	0,649	0,411	0,896	0,088	0,157	0,364	0,434	1,104	0,522	0,386
?	46,51														0,111	0,146				0,16	0,056	
abietal	46,73	2308	0,255	0,056	0,046		0,159	0,197	0,107	0,088	0,082	0,091	0,183	0,064	0,263	0,145	0,045	0,21	0,169	0,305	0,195	0,116
lambertianic acid methyl ester	47,08	2325															0,128			0,106		
dehydroabietic acid methyl ester	47,42	2343		0,045			0,051	0,049					0,168	0,08	0,171		0,027	0,019	0,115	0,545	0,149	0,062
dehydroabietol	47,86	2363																		0,192	0,043	
neoabietal	48,06	2372	0,283	0,049	0,203	0,068	0,423	0,238	0,126	0,1	0,083	0,087	0,144	0,044	0,198	0,089	0,026	0,183	0,122	0,117	0,128	0,093
			100,006	99,999	100	100,002	100,001	100	100,259	100,002	99,996	99,995	99,999	100	100	100,1	100,3	99,999	100,007	99,996	100,004	99,998