

ПУГАЧЕВА ОЛЬГА ВАЛЕРИЕВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
АРОНИИ МИЧУРИНА ЛИСТЬЕВ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Самара 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент _____ **Тринеева Ольга Валерьевна**

Официальные оппоненты:

Сергунова Екатерина Вячеславовна, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), кафедра фармацевтического естествознания, профессор.

Успенская Елена Валерьевна, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы", кафедра фармацевтической и токсикологической химии, профессор.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск

Защита диссертации состоится «__» _____ 202_ г. в 1_00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

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

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В современной медицине и фармации, несмотря на большой ассортимент синтетических лекарственных препаратов (ЛП), широко продолжают использоваться и ЛП растительного происхождения. Это связано с такими факторами, как приверженность пациентов к натуральным препаратам, а также более мягкое действие комплекса биологически активных веществ (БАВ), содержащегося в растительном сырье. Кроме того, на данном этапе развития фармацевтической науки не разработаны методики получения синтетических аналогов некоторых групп БАВ, таких, например, как антоцианы.

В связи с этим представляет интерес поиск новых перспективных видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), как потенциальных источников комплекса природных БАВ для получения лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на его основе. Также в настоящее время актуален вопрос рационального использования растительных сырьевых источников, в связи с чем рассматривается возможность заготовки и комплексной переработки нефармакопейных видов сырья от лекарственных растений, включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ).

Арония Мичурина (*Aronia* × *Mitchurinii* Skvortsov & Maitulina) или рябина черноплодная – культивированный гибрид аронии черноплодной и рябины обыкновенной. Плоды аронии являются достаточно изученными, находят свое применение в медицине и включены в ГФ РФ XIV изд. Однако, и другие части данного растения, в частности листья, являются потенциальными источниками уникального комплекса природных БАВ. Арония Мичурина широко распространена на территории Российской Федерации (РФ), в отличие от родительского вида – аронии черноплодной, что обеспечивает сырьевую базу для заготовки и производства ЛРП в промышленных масштабах.

Таким образом, фармакогностическое изучение и стандартизацию листьев аронии Мичурина как перспективного источника БАВ можно считать актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Большинство исследований аронии Мичурина как в России, так и за рубежом направлены на изучение плодов данного растения. Однако, в основном в зарубежных литературных источниках, встречаются разрозненные данные по фитохимическому исследованию листьев, в том числе в сравнении с плодами. С использованием методов высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) определен полифенольный профиль листьев аронии Мичурина, заготовленных на территории дальнего зарубежья. В сравнительных исследованиях показано, что профиль флавоноидов и оксикоричных кислот плодов и листьев сходны между собой, при этом количественное содержание флавоноидов выше в листьях. Данная работа является продолжением сбора и систематизации данных об особенностях морфологии, анатомии, состава БАВ и видах фармакологической активности листьев аронии Мичурина, произрастающих на территории Центрального черноземья (на примере Тамбовской области). Сведений о химическом составе листьев аронии Мичурина, заготовленных на территории РФ в литературе крайне ограничены.

Цель исследования

Комплексное фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев как перспективного источника биологически активных веществ для научного

обоснования возможности получения на их основе лекарственных растительных препаратов (ЛРП).

Задачи исследования

1. Изучить макро- и микродиагностические признаки листьев аронии Мичурина различными методами;
2. Определить товароведческие показатели качества листьев аронии Мичурина;
3. С применением современных физико-химических методов анализа изучить профиль БАВ листьев аронии Мичурина на разных сроках заготовки и научно обосновать оптимальный период сбора сырья;
4. Провести анализ особенности накопления экотоксикантов в листьях аронии Мичурина для оценки их безопасности;
5. Разработать и валидировать методики определения целевых групп БАВ полифенольной природы (дубильных веществ, антоцианов и флавоноидов), а также пигментов в листьях аронии Мичурина и водно-спиртовых извлечениях на их основе;
6. Провести прогностическую (*in silico*) оценку возможных фармакологических свойств комплекса БАВ листьев и выбрать целесообразные направления дальнейшей разработки ЛРП;
7. Провести (*in vitro*) оценку различных видов фармакологической активности извлечений из листьев аронии Мичурина (антиокислительной, антибактериальной, противогрибковой, биостимулирующей и мембранопротекторной) и обосновать перспективность получения жидких водных и спиртосодержащих ЛФ на основе изучаемого сырья;
8. На основе проведенных исследований разработать критерии качества листьев аронии Мичурина и подготовить проект современной нормативной документации (НД) для стандартизации сырья данного вида.

Научная новизна

С применением различных современных методов микроскопического исследования впервые определены основные диагностически значимые, в том числе петиолярные, признаки листьев аронии Мичурина. С учетом полученных результатов разработаны показатели для определения подлинности листьев в цельном, измельченном и порошкованном виде.

Установлены особенности накопления различных элементов, в т.ч. нормируемых тяжелых металлов, а также содержание радионуклидов в листьях аронии Мичурина. Установлено, что изученные образцы экологически безопасны и могут быть рекомендованы для массовой заготовки.

Определены основные товароведческие показатели качества сырья для включения их в проект фармакопейной статьи (ФС).

Впервые методами капиллярного электрофореза (КЭ), газожидкостной хроматографии с масс-детекцией (ГХ-МС), тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии (СФМ) установлен состав БАВ в листьях (флавоноиды, дубильные вещества, аминокислоты, стерины, антоциановые соединения, органические кислоты и др.), а также изучена динамика накопления комплекса БАВ в сырье различных фенологических фаз заготовки. Получены инфракрасные (ИК) спектры листьев на разных сроках заготовки и выявлены специфические полосы поглощения.

Впервые разработаны и валидированы спектрофотометрические методики определения целевых групп БАВ (флавоноидов, дубильных веществ, антоциановых соединений) в листьях аронии Мичурина и водно-спиртовых извлечениях на их основе (настое, настойке и жидком экстракте).

Проведена первичная оценка возможных направлений использования данного сырья. *In vitro* подтверждена антиокислительная активность (АОА) извлечений на основе листьев. Методом компьютерного моделирования *in silico* определены основные виды фармакологической активности и побочных действий основных представителей целевых групп БАВ листьев. С использованием тест-системы инфузорий *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» впервые установлено, что отвар листьев аронии Мичурина *in vitro* значительно достоверно проявляет биостимулирующее и мембранопротекторное действие. Впервые установлена антимикробная активность настойки и жидкого экстракта, полученных на основе листьев аронии Мичурина, в отношении *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*. Жидкий экстракт дополнительно показал активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и противогрибковую активность в отношении *Candida albicans*. Полученные данные позволяют предложить данное ЛРС для разработки препаратов на его основе, обладающих антиоксидантной, вазопротекторной, противовоспалительной, антимикробной и вяжущей активностью.

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведенных исследований получены новые данные о морфолого-анатомических признаках и химическом составе листьев аронии Мичурина, произрастающих в условиях Центрального Черноземья (на примере Тамбовской области). Они позволяют расширить и дополнить имеющиеся литературные одиночные данные. Исследования показали перспективность использования листьев аронии Мичурина в качестве источника БАВ наравне с плодами. На основе экспериментальных данных о динамике накопления комплекса БАВ полифенольной природы в сырье даны рекомендации по срокам заготовки листьев с точки зрения максимального их содержания и сохранения возможности сбора плодов растения, соответствующих требованиям ФС.2.5.0003.15 и ФС.2.5.0002.15 ГФ РФ XIV изд.

На основании полученных результатов был разработан проект ФС «Аронии Мичурина листья» для ГФ РФ, который зарегистрирован в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Теоретическую основу исследования составили труды российских (Виноградова Ю.К., Дейнека В.И., Куклина А.Г., Куркин В.А., Логвинова Е.Е., Скворцов А.К.) и зарубежных (Mark H.V., Szopa A., Cvetanović A., Lee J.E., Peter J.L., Persson-Novmalm H.A.) ученых, работы которых помогли правильно провести систематику аронии Мичурина как отдельного вида рода Арония. Методология исследования включала в себя проведение комплексного (морфолого-анатомического, химического, фармакологического) фармакогностического изучения листьев аронии Мичурина. В процессе выполнения диссертационной работы использовались методы сравнительного и документального анализа, а также комплекс физико-химических методов и технологических испытаний, методы математической статистики и обработки результатов анализа.

Личный вклад автора

При непосредственном участии автора были определены цели и задачи исследования, автором проведен анализ российской и зарубежной научной литературы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов исследования, написании публикаций по теме исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до

обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения их в практику. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования анатомо-диагностических и петиолярных признаков листьев аронии Мичурина с применением различных методов микроскопического анализа и их биометрические характеристики;
2. Результаты оценки экологической безопасности применения листьев аронии Мичурина с точки зрения накопления экотоксикантов;
3. Результаты комплексного качественного и количественного определения различных групп БАВ в листьях современными физико-химическими методами анализа, в т.ч. разработки и валидации спектрофотометрических методик анализа флавоноидов, дубильных веществ и антоциановых соединений, как целевых групп для стандартизации сырья;
4. Результаты стандартизации водно-спиртовых извлечений (настоя, настойки и жидкого экстракта) на основе листьев аронии Мичурина;
5. Результаты изучения динамики накопления основных групп БАВ и рекомендуемых оптимальных сроков заготовки листьев аронии Мичурина;
6. Результаты прогностической (*in silico*) и скрининговой доклинической (*in vitro*) оценки различных перспективных видов фармакологической активности комплекса БАВ листьев.

Достоверность научных положений и выводов

Оценка уровня достоверности полученных результатов и выводов определяется большим объемом проанализированной отечественной и иностранной информационной базы, проведением достаточного количества экспериментальных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа. В работе использовалось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке.

Апробация работы

Основные результаты исследования доложены на конференциях: VII научная конференция с международным участием «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2019), международная научная конференция «От биохимии растений к биохимии человека» (Москва, 2022), I Региональная научно-практическая конференция для ординаторов и аспирантов «Современные аспекты обращения лекарственных средств» (Воронеж, 2023), IX Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2023). Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральном заседании (протокол №1501-12 от 29.05.2024).

Внедрение результатов исследования

Полученные экспериментальные данные фармакогностического изучения аронии Мичурина листьев использованы при разработке проекта ФС «Аронии Мичурина листья» для ГФ РФ. Указанный проект принят ФГБУ «НЦЭСМП» к рассмотрению в установленном порядке. Материалы диссертационного исследования рекомендованы к внедрению для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации профессионального модуля ПМ.01 «Лекарствоведение» (МДК «Фармакогнозия») для студентов, обучающихся по специальности

33.02.01 «Фармация» (СПО), а также при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья (акт внедрения №1501-52 от 12.02.2024), при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по тематике фармакогностического анализа и проблем идентификации нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья (акт внедрения №1500-55 от 21.02.2024) на фармацевтическом факультете Воронежского госуниверситета, а также для проведения учебных занятий и проведения научно-исследовательских работ в области идентификации аронии Мичурина и ее сортов при реализации дисциплин (модулей) «Ботаника», «Лекарственные и эфиромасличные растения» для обучающихся Института фундаментальных и прикладных агробiotехнологий имени И.В. Мичурина ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ (акт внедрения №01-2024 от 04.04.2024).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности «3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 5, 6 и 7 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 10 статей в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, из которых 6 статей опубликовано в журналах, входящих в международные реферативные базы данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 224 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, выводов и библиографического указателя, включающего 224 источника, в т.ч. 70 на иностранном языке, и приложений (23 стр.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали листья аронии Мичурина сорта «Мулатка», самостоятельно заготовленные в мае-сентябре 2019-2023 гг. от растений, культивируемых на территории ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» (г. Мичуринск, Тамбовской области) на стадиях: цветение (май), массовое начало плодоношения (июнь), полная зрелость плодов (август), начало покраснения листьев (сентябрь). Растительное сырье высушивали воздушно-теневым способом до остаточной влажности не более 10%. Принадлежность образца к роду *Aronia*, виду *Aronia × Mitschurinii* A.K.Skvortsov & Maitul подтверждена сотрудниками научного центра имени И.В. Мичурина.

Макро- и микроскопический анализ осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV. Описание внешних характеристик листьев аронии проводили с помощью стереомикроскопического анализа на микроскопе Биомед-2 (РФ). Микроскопическое исследование сырья и изучение петиолярной анатомии проводили с помощью микроскопа Биомед 6.0 (РФ) с увеличением x40, x100, x400. Визуализация диагностических признаков, определение их биометрических характеристик и микрофотографии выполнялись с помощью цифровой видеокамеры «Levenhuk» C310 NG (КНР) с программным обеспечением Top View (x86). Люминесцентный анализ осуществляли с помощью микроскопа Микромед 3 ЛЮМ (Россия) с использованием голубого светофильтра. Исследования растительных объектов

методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) проводили с помощью растрового электронного микроскопа JSM-6380LV JEOL с системой микроанализа INCA 250 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Полный макро-, микро- и ультрамикрэлементный анализ состава изучаемого сырья (стадия начала покраснения листьев) в сравнении с почвой изучали методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) с индуктивно связанной плазмой («ELAN-DRC», США). Исследование содержания радионуклидов проводили на базе ФГБУ «Россельхозцентр» гамма-спектрометрическим методом.

Определение фармакопейных показателей качества таких, как зола общая и зола нерастворимая в 10%-ной хлористоводородной кислоте и влажность, экстрактивные вещества проводили в соответствии с методиками, изложенными в соответствующих ОФС ГФ РФ XIV издания гравиметрическими методами.

Качественный состав БАВ определяли на основании общепринятых качественных реакций. Дополнительное обнаружение флавоноидов и лейкоантоцианов (в форме собственно антоцианов) проводили методом ТСХ в системах растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3) и н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:5), детектирование зон – в УФ-свете после обработки 5% спиртовым раствором алюминия хлорида и в видимом свете по собственной окраске зон антоцианов соответственно.

Для определения качественного и количественного состава фракции летучих БАВ использовали метод ГХ-МС (Agilent 7890B/5977A, США) (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Количественное определение флавоноидов, дубильных веществ, пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) и антоцианов в сырье проводили по разработанным и валидированным методикам. УФ-спектры для изучаемых объектов были получены с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Россия) в требуемых диапазонах длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Определение витаминов группы В, аминокислотного состава и состава органических кислот проводили методом капиллярного электрофореза (КЭ) на базе испытательного лабораторного центра АНО «НТЦ Комбикорм» (Воронеж).

ИК-спектры сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм, были получены без предварительной пробоподготовки на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Прогноз основных видов фармакологической активности *in silico* проводили с использованием платформы PassOnline и Phyto4Health. Определение антиокислительной активности водных и водно-спиртовых извлечений проводили по методике, ранее запатентованной Максимовой Т.В. с соавторами.

Для выбора оптимальной лекарственной формы на основе изучаемого сырья получали настой, настойку и жидкий экстракт листьев аронии Мичурина в соответствии с требованиями к технологии, изложенными в ОФС ГФ РФ XIV изд. Стандартизацию полученных лекарственных форм проводили по показателям «Описание», «Сухой остаток», «Спирт этиловый», «Плотность», «рН» «Тяжелые металлы» на основании требований действующих ОФС. Количественное определение сумм флавоноидов, дубильных веществ и антоцианов в извлечениях проводили по разработанным и валидированным методикам.

Результаты исследования

1. Изучение анатомо-морфологических признаков листьев аронии Мичурина

Макроскопический анализ. Листья простые, черешковые, с прилистниками. Цвет верхней стороны листовой пластинки зеленый или коричневато-зеленый, с нижней стороны более светлые. Форма листовой пластинки эллиптическая или обратнояйцевидная, длиной $9,5 \pm 0,9$ см и шириной $5,6 \pm 0,4$ см. Форма верхушки листа заостренная, основание листа клиновидное или ширококлиновидное. Край листа пильчатый. Жилкование перистое. Листовая пластина опушена по нижней стороне, волоски располагаются главным образом вдоль жилок. На верхней стороне листовой пластины вдоль главной жилки расположены многочисленные темные (бурые) железистые волоски. Черешок длиной 10-15 мм, желобчатой формы, опушенный с нижней стороны. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вяжущий. Описаны также внешние признаки измельченного сырья и порошка.

Стереомикроскопический анализ. В качестве основных диагностических признаков сырья, полученных при стереомикроскопическом анализе, отмечены длинные волоски на нижней поверхности листа (преимущественно вдоль жилок) и железистые волоски вдоль главной жилки верхней поверхности листовой пластинки (рис. 1).

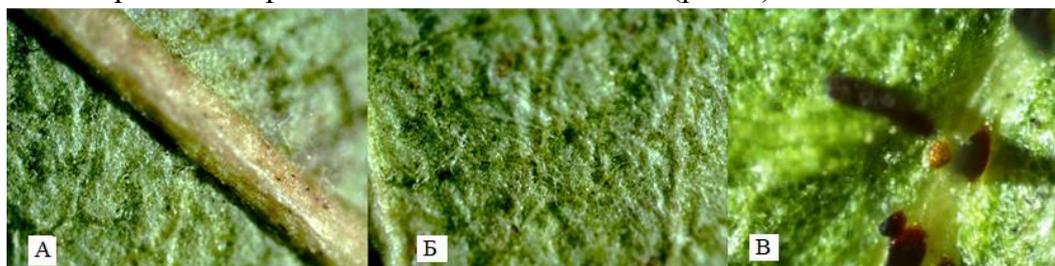


Рисунок 1 - Стереомикроскопическое исследование нижней поверхности листьев аронии Мичурина (x400): А – главная жилка, Б – поверхность листа, В - железистые волоски с многоклеточным основанием

Люминесцентный микроскопический анализ. Методом люминесцентной микроскопии установлены особенности морфологии листьев и локализации БАВ. Характерно яркое свечение трихом и их оснований, отдельных включений листа. Также люминесценцией обладает кутикула и проводящая система листа (рис. 2).

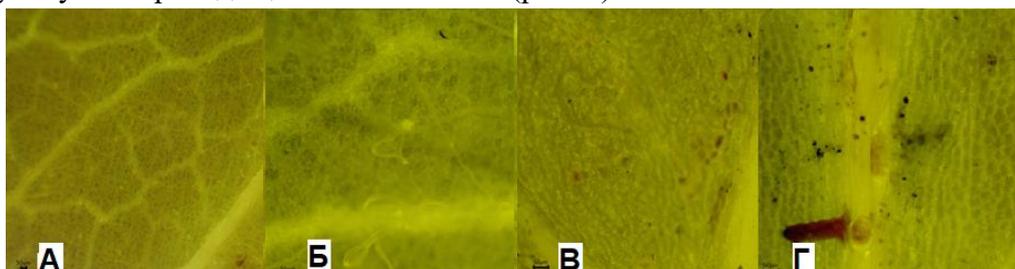


Рисунок 2 - Люминесцентная микроскопия: А – проводящая система нижней поверхности листовой пластинки (x100); Б – волосок с местом прикрепления (x100); В – верхняя поверхность (x100); Г – главная жилка с железистым волоском и основанием (x100)

Световая микроскопия. При рассмотрении листа с поверхности верхней части листовой пластинки можно отметить прямые, равномерные клетки эпидермиса пяти- или шестиугольной формы, заметна складчатость кутикулы. Нижний эпидермис имеет более извилистые стенки. В качестве характерных признаков выделены: многочисленные одноклеточные простые волоски на нижней поверхности листа, одноклеточные железистые волоски с многоклеточным основанием вдоль главной жилки по верхней поверхности листа, устьица анизокитного типа (рис. 3).

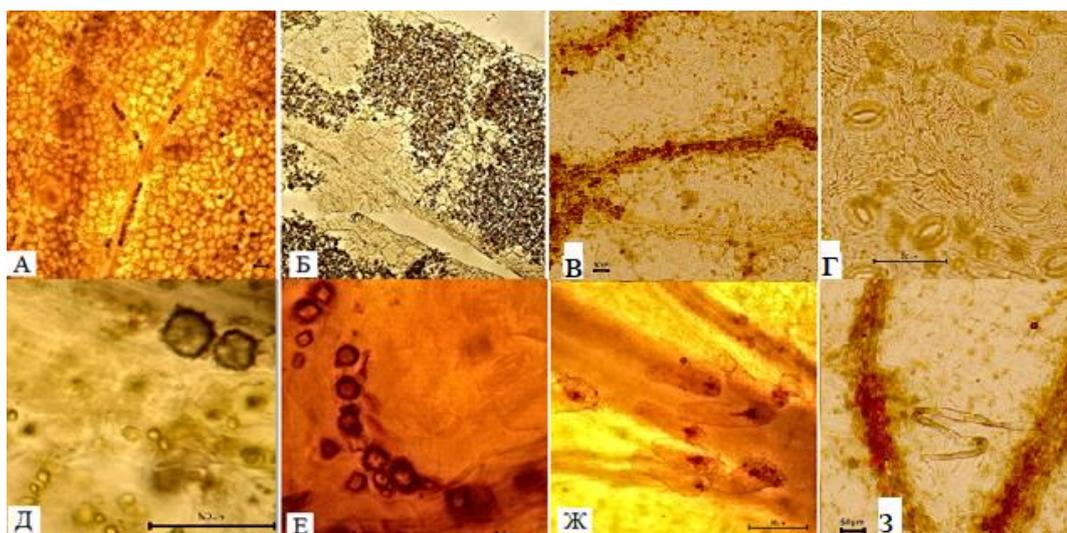


Рисунок 3 – Микроскопия листа: А – складчатость кутикулы верхнего эпидермиса (x100); Б – клетки верхнего эпидермиса (x100); В – кристаллоносная обкладка нижний эпидермис (x100); Г – устьица анизоцитного типа (x400); Д – друзы оксалата кальция (x400); Е – кристаллы оксалата кальция (x400); Ж – одноклеточные железистые волоски (x400); 3 – одноклеточный простой волосок (x100)

Растровая электронная микроскопия. Данный метод позволил лучше визуализировать все диагностические признаки листьев, отмеченные при проведении световой оптической микроскопии, а также получить их объемные изображения (рис. 4). Устьица многочисленные, стенки замыкающих клеток имеют выраженные утолщения. Устьичные щели сильно открыты. Многочисленные простые одноклеточные волоски на нижней поверхности листовой пластинки и черешке листа имеют гладкую поверхность, закручены вдоль своей оси. Железистые волоски вдоль жилки верхней поверхности листовой пластинки морщинистые, тупоконусовидные. Клеточные стенки верхней поверхности листа утолщены, покрыты плотным слоем кутикулы, что позволяет установить их многоугольную форму.

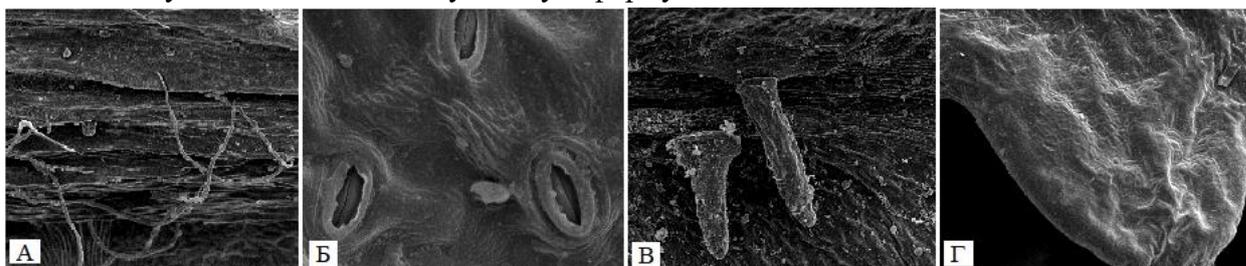


Рисунок 4 – РЭМ: А - волоски жилки нижней стороны листа (x100); Б - устьица (x1000); Б - б – одноклеточные железистые волоски (x200); Г - складчатость кутикулы (x300)

Петиолярная анатомия. Установлено строение черешка и выявлены основные анатомо-диагностические признаки: поперечный срез V-образный в базальном участке, медиальный и апикальный участки U-образные. На границе между адаксильной и латеральной сторонами имеются округлые лопасти; по поверхности черешка встречаются простые, нитевидные, многоклеточные, уплощенные, неравномерно спирально слабо закрученные волоски; проводящая система в апикальном и медиальном участках состоит из одного коллатерального пучка полулунной формы, а в базальном – из трех крупных коллатеральных пучков овальной формы. Пучки снаружи армированы склеренхимой (рис. 5).



Рисунок 5 – Поперечный срез черешка (x40): а – апикальный участок, б – медиальный участок, в, г – базальный участок.

2. Определение товароведческих показателей качества сырья

Определена вариабельность фармакопейных показателей качества, таких, как влажность, зола общая и зола, нерастворимая в растворе 10% хлористоводородной кислоты, органические и минеральные примеси в зависимости от стадии заготовки сырья (таблица 1). На основании полученных результатов рекомендованы нормативы данных показателей для включения в НД.

Таблица 1 – Показатели качества листьев аронии Мичурина

Стадия заготовки	Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в HCl, %
1 (май)	9,13±0,24	4,39±0,30	0,01±0,005
2 (июнь)	9,35±0,31	5,49±0,35	0,08±0,02
3 (август)	8,99±0,41	7,65±0,33	0,07±0,01
4 (сентябрь)	9,38±0,28	9,17±0,38	0,05±0,01
Рекомендуемый норматив для ФС	не более 10%	не более 10%	не более 0,1%

Присутствие минеральных и органических примесей определяли для сырья, собранного в июне (стадия 2), содержание которых составляло 0,21±0,02% и 0,56±0,03% соответственно. В связи с чем в качестве критериев качества предложены верхние значения для показателя «минеральные примеси» - не более 0,5 %, «органические примеси» - не более 1 %.

3. Изучение накопления экотоксикантов листьями аронии Мичурина

В ходе изучения элементного состава в сырье установлено наличие 61 химического элемента, в числе 12 из которых отнесены к эссенциальным и 5 - условно эссенциальным (рис. 6). Среди макроэлементов преобладают кальций, калий, фосфор и магний, среди микроэлементов - железо, цинк, натрий, марганец. Содержание токсичных элементов и радионуклидов соответствует требованиям ГФ РФ XV издания (таблица 2). Исходя из рассчитанных коэффициентов биологического поглощения (Кбп) видно, что накопление токсичных тяжелых металлов и мышьяка ограничено и при заготовке листьев аронии Мичурина на экологически благоприятных территориях они будут обнаруживаться в количествах, не превышающих ПДК.

Таблица 2 - Результаты изучения накопления экотоксикантов в листьях аронии Мичурина

Испытуемый показатель	Содержание в листья	ПДК для сырья	Кбп элементов	Способность к накоплению элемента
Токсичные элементы, мкг/кг				
Кадмий (Cd)	<0,0001	1,00	0,0002	Слабого накопления и очень слабого захвата

Ртуть (Hg)	0,008	0,10	0,80	Слабого накопления и среднего захвата
Мышьяк (As)	0,33	0,50	0,33	
Свинец (Pb)	2,47	6,00	0,18	
Удельная активность радионуклидов, Бк/кг				
Цезий-137	7,76±2,61	400		-
Стронций-90	Менее 1	200		-
$V \pm \Delta V$	0,019±0,001	$V + \Delta V \leq 1$		

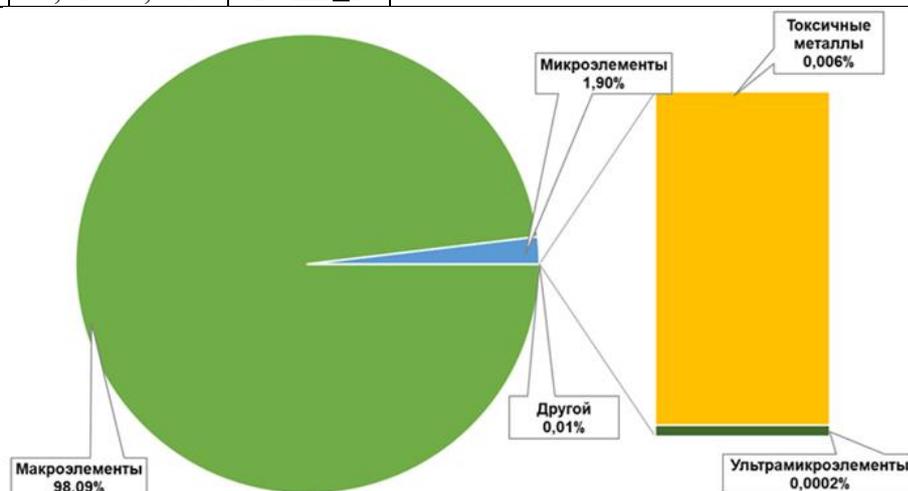


Рисунок 6 - Содержание элементов в листьях аронии Мичурина

4. Фитохимическое исследование и разработка подходов к стандартизации листьев аронии Мичурина

Исследование специфического профиля БАВ листьев. Проведено качественное определение состава БАВ изучаемого сырья, подтверждено наличие следующих групп веществ таблица 3.

Таблица 3 – Результаты качественного определения некоторых групп БАВ в исследуемых образцах (стадия заготовки сырья – сентябрь)

Группы БАВ в образцах	Вывод о присутствии
Алкалоиды	Отсутствуют
Сапонины	Присутствуют (спирто-растворимые)
Полисахариды (слизи)	Присутствуют
Дубильные вещества	Присутствуют
Витамины (Аскорбиновая кислота)	Присутствует
Флавоноиды	Присутствуют
Аминокислоты (АК)	Присутствуют
Антоциановые соединения	Присутствуют
Цианогенные гликозиды	Отсутствуют

Подобраны оптимальные условия разделения флавоноидов методом ТСХ, идентифицирован рутин. При нанесении 20 мкл извлечения на треке визуализировалось 6 зон. Одна из них была идентифицирована как рутин по значению R_f (рис. 7) с сравнении с достоверным СО. Неидентифицированные соединения имели характерные свечения в УФ-свете после обработки пластины 5% раствором алюминия хлорида, что говорит об их флавоноидной природе. Методом ТСХ установлено, что в составе комплекса лейкоантоцианов, выделяемых в форме антоциановых соединений, листьев аронии Мичурина, вне зависимости от стадии

заготовки, присутствуют 3 БАВ. Оптимальной элюирующей системой выбрана н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), при рекомендуемом объеме пробы – 20 мкл.

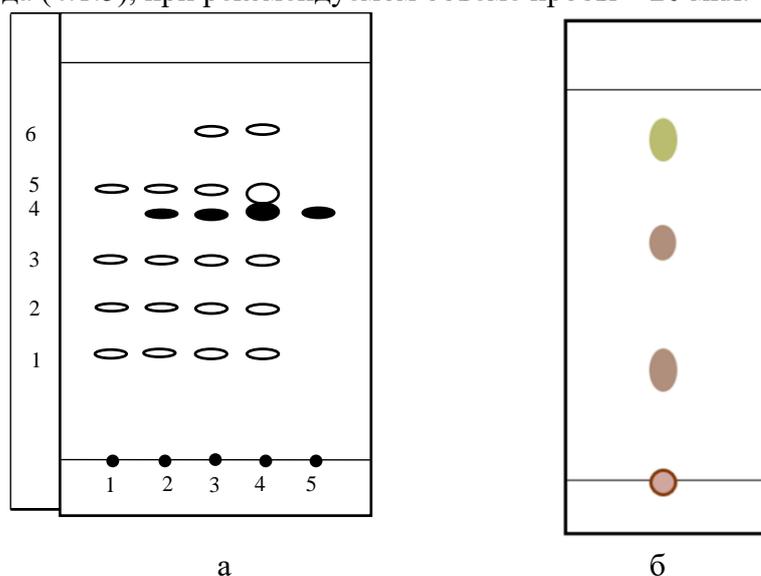


Рисунок 7 - Схема хроматограммы разделения БАВ извлечения из листьев аронии Мичурина (на примере сырья, заготовленного в сентябре): а – разделение флавоноидов (на линии старта точка 1 – 5 мкл извлечения; точка 2 – 10 мкл извлечения; точка 3 – 20 мкл извлечения; точка 4 – 50 мкл извлечения, точка 5 – 5 мкл 0,1% стандартного раствора рутина); б - разделения суммы антоцианов

Методом ГХ-МС установлен состав фракции стеринов, сахаров, многоатомных спиртов (таблица 4). Наибольшее количество соединений группы сахаров и стеринов характерно было для листьев фазы сбора III – фазы технической зрелости плодов, что обуславливается накоплением данных БАВ в процессе жизнедеятельности (рис. 8 и 9).

Таблица 4 - Результаты ГХ-МС анализа листьев аронии Мичурина, заготовленных на различных стадиях вегетации растения

№ п/п	Время удерживания	Площадь пика, %	Идентифицированное соединение
1	2	3	4
Стадия 1 (май)			
1	25,558	0,52	d-Манноза
2	29,081	3,9	1,2,3,5-Циклогексантетрол (1 α , 2 β , 3 α , 5 β)-
3	33,741	0,04	Z-(13,14-Эпоксид)тетрадек-11-ен-1-ол ацетат
4	36,383	3,21	d-Маннитол
5	48,897	0,29	γ -ситостерол
6	49,443	0,1	α -амирин
Стадия 2 (июнь)			
1	25,554	0,62	d-Манноза
2	29,083	3,34	1,2,3,5-Циклогексантетрол (1 α , 2 β , 3 α , 5 β)-
3	36,851	7,38	сорбитол
4	45,7	0,06	3,9-Эпоксипрегн-16-ен-20-он, 3-метокси-7,11,18-триацетокси-
Продолжение таблицы 4			
1	2	3	4
5	48,899	0,2	γ -ситостерол
6	49,446	0,13	α -амирин
Стадия 3 (август)			

1	25,538	0,53	d-Манноза
2	26,236	1,99	β - d-глюкопираноза
3	29,083	1,58	1,2,3,5-Циклогексантетрол (1 α , 2 β , 3 α , 5 β)-
4	29,912	0,03	2-Бутанон, 4-(2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-ил)-
5	37,002	6,04	Сорбитол
6	42,48	5,11	D-Амигдалин
7	45,706	0,07	3,9-Эпоксипрегн-16-ен-20-он, 3-метокси-7,11,18-триацетокси-
8	47,319	0,11	1H-Циклопропа[3,4]бенз[1,2-e]азулен-5,7b,9,9a-тетрол, 1a,1b,4,4a,5,7a,8,9-октигидро-3-(гидрокиметил)-1,1,6,8-тетраметил-, 5,9,9a-триацетат, [1aR-(1a. α .,1b. β .,4a. β .,5. β .,7a. α .,7b. α .,8. α .,9. β .,9a. α .)]-
9	48,899	0,58	γ -ситостерол
10	49,446	0,14	α -амирин
Стадия 4 (сентябрь)			
1	25,516	0,89	d-Манноза
2	26,242	0,21	β - d-глюкопираноза
3	29,056	1,98	1,2,3,5-Циклогексантетрол (1 α , 2 β , 3 α , 5 β)-
4	37,235	7,45	сорбитол
5	40,255	0,45	Бензил- β -D-глюкозид
6	42,561	1,75	D-Амигдалин
7	44,049	0,03	Этилизеоаллохолат
8	45,706	0,06	3,9-Эпоксипрегн-16-ен-20-он, 3-метокси-7,11,18-триацетокси-
9	47,324	0,1	1H-Циклопропа[3,4]бенз[1,2-e]азулен-5,7b,9,9a-тетрол, 1a,1b,4,4a,5,7a,8,9-октигидро-3-(гидрокиметил)-1,1,6,8-тетраметил-, 5,9,9a-триацетат, [1aR-(1a. α .,1b. β .,4a. β .,5. β .,7a. α .,7b. α .,8. α .,9. β .,9a. α .)]-
10	48,899	0,51	γ -ситостерол
11	49,446	0,1	α -амирин

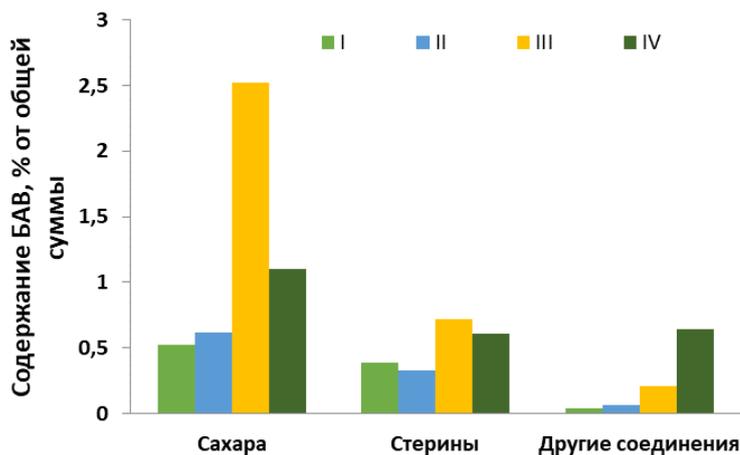


Рисунок 8 - Сравнительные данные по содержанию групп БАВ (%) в спиртовых извлечениях листьев аронии Мичурина различных фаз заготовки

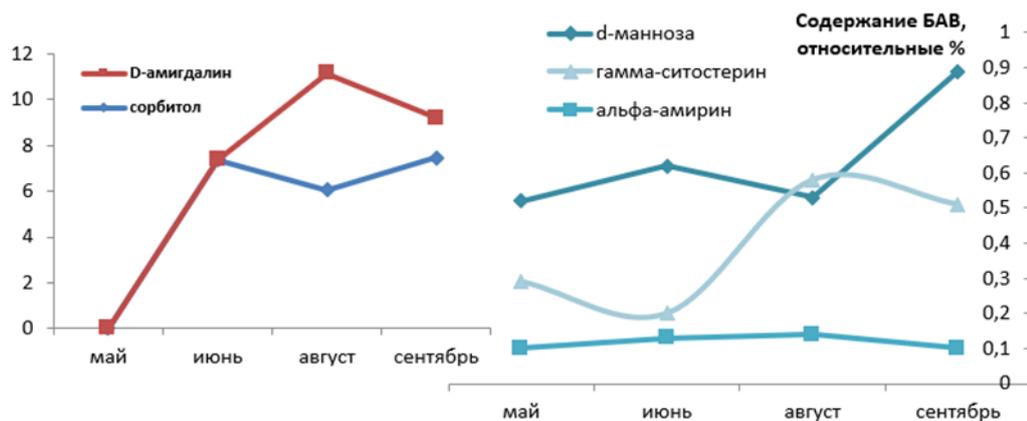


Рисунок 9 - Сравнительные данные по относительному содержанию отдельных БАВ (%) в спиртовых извлечениях листьев аронии Мичурина различных фаз заготовки

Максимальное количество стероидов установлено для периода сбора урожая (конец августа) и в сентябре (фаза покраснения листьев).

Методом капиллярного электрофореза исследован состав свободных и связанных аминокислот, свободных органических кислот и витаминов группы В (таблица 5). Суммарное содержание выявленных восьми органических кислот составляет 0,49%. Преобладающими кислотами являются лимонная, яблочная и сорбиновая. В листьях аронии Мичурина выявлено 17 аминокислот, 7 из них являются незаменимыми, что составляет 46% от общего количества. Содержание витаминов В₁, В₂, В₄ в листьях мало, что не позволяет рассматривать данное сырье в качестве источника витаминов группы В.

Таблица 5 – Профиль БАВ аронии Мичурина листьев (стадия заготовки сырья – сентябрь)

№ п/п	БАВ	Содержание	№ п/п	Аминокислоты, %	
Органическая кислота, %			1	цистин	0,04
1	щавелевая	0,02	2	метионин	0,05
2	муравьиная	Менее 0,15*	3	гистидин	0,11
3	фумаровая	Менее 0,005*	4	тирозин	0,23
4	янтарная	Менее 0,05*	5	валин	0,26
5	лимонная	0,21	6	серин	0,27
6	уксусная	0,02	7	треонин	0,28
7	пропионовая	0,04	8	лизин	0,33
8	молочная	0,03	9	фенилаланин	0,33
9	бензойная	0,01	10	пролин	0,33
10	сорбиновая	0,06	11	глицин	0,33
11	яблочная	0,10	12	аланин	0,36
12	винная	Менее 0,005*	13	аргинин	0,37
Витамины группы В, мг/кг			14	изолейцин	0,38
1	витамин В ₁ (тиамин)	0,99	15	аспарагиновая кислота	0,49
2	витамин В ₂ (рибофлавин)	0,43	16	глутаминовая кислота	0,64
3	витамин В ₄ (холин)	44,4	17	лейцин	1,08

*-нижний предел измерения

Разработка методик стандартизации листьев аронии Мичурина. Разработаны и валидированы методики определения флавоноидов (в пересчете на рутин), дубильных веществ (в пересчете на катехин), пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) и антоциановых соединений (в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид) в листьях. Результаты приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 – Оптимальные условия выделения изучаемых групп БАВ из листьев, установленные при разработке методик

Исследуемый параметр извлечения	Содержание суммы БАВ, %			
	Флавоноиды	Дубильные вещества	Антоциановые соединения	Пигменты
Экстрагент	60% спирт этиловый	вода очищенная	96% спирт этиловый, подкисленный HCl (с=1%)	70% спирт этиловый
Степень измельченности сырья, мм	1	2	0,5	0,5
Сырье: экстрагент	1:50	1:125	1:250	1:200
Время экстракции, мин	90	30	3,5 ч	45
Кратность экстракции	1-кратная	1-кратная	1-кратная	2-кратная

Таблица 7 – Валидационные характеристики методики определения БАВ в листьях аронии Мичурина

Валидационный показатель	Флавоноиды	Дубильные вещества	Антоциановые соединения	Пигменты	
				каротиноиды	хлорофиллы
Линейность	$y=5,0242x$ $R^2 = 0,999$	$y=1,146x$ $R^2 = 0,9999$	$y=0,3636x$ $R^2 = 0,9999$	$y=0,1018x-0,0001$ $R^2 = 1,0$	$y=0,0429x-0,0003$ $R^2 = 1,0$
Сходимость	RSD, % = 1,98 SD, % = 0,17	RSD, % = 1,59 SD, % = 0,17	RSD, % = 1,60 SD, % = 0,42	RSD, % = 2,89 SD, % = 0,217	RSD, % = 1,73 SD, % = 0,206
Правильность	R=100,63%	R=101,42%	$y=ax+b$ $b=0$	-	-
Область линейности по содержанию БАВ в извлечении), г/мл	$0,9-1,6 \cdot 10^{-3}$	$0,32-0,49 \cdot 10^{-2}$	$0,81-1,49 \cdot 10^{-2}$	$1,25-8,03 \cdot 10^{-6}$	$2,17-13,30 \cdot 10^{-6}$
Межлабораторная прецизионность	RSD, % = 2,85 SD, % = 0,33	RSD, % = 4,93 SD, % = 0,50	RSD, % = 2,90 SD, % = 0,92	-	-

Исследована динамика накопления полифенольных БАВ в листьях аронии Мичурина (таблица 8).

Таблица 8 – Содержание исследуемых групп БАВ в листьях аронии Мичурина

Стадия заготовки	Группа БАВ				
	Флавоноиды в пересчете на рутин, %	Дубильные вещества в пересчете на катехин, %	Антоцианы в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %	Каротиноиды в пересчете на неоксантин	Хлорофиллы в пересчете на хлорофилл а
Май	$3,94 \pm 0,33$	$14,20 \pm 0,91$	$10,71 \pm 1,33$	$0,072 \pm 0,002$	$0,131 \pm 0,003$
Июнь	$4,20 \pm 0,12$	$12,53 \pm 0,72$	$10,81 \pm 1,01$	$0,093 \pm 0,002$	$0,162 \pm 0,005$
Август	$3,48 \pm 0,21$	$8,63 \pm 0,32$	$11,62 \pm 0,69$	$0,075 \pm 0,002$	$0,119 \pm 0,002$
Сентябрь	$3,47 \pm 0,25$	$8,35 \pm 0,16$	$12,77 \pm 0,95$	$0,063 \pm 0,002$	$0,098 \pm 0,003$

Установлено, что наибольшее содержание флавоноидов наблюдается на ранних этапах развития, заготовленных в середине июня, снижаясь к концу августа – началу сентября. Содержание антоцианов достаточно высоко во все периоды заготовки, демонстрируя максимальные значения в сырье, заготовленном на стадии начала покраснения листьев в

сентябре. С точки зрения накопления дубильных веществ, максимальным оно является в сырье, заготовленном на стадии цветения растения.

Подобраны оптимальные экстрагенты для извлечения суммы экстрактивных веществ, а также для получения экстракционных фитопрепаратов – вода очищенная, этанол 40-70% (таблица 9), а также предложен количественный критерий показателя для стандартизации листьев аронии Мичурина (содержание не менее 25%).

Таблица 9 - Содержание экстрактивных веществ в листьях аронии Мичурина на разных стадиях развития

Экстрагент	Стадия заготовки			
	Май	Июнь	Август	Сентябрь
Вода	37,24±0,20	39,68±0,25	31,52±0,22	30,28±0,31
Этанол, %: 40	39,01±0,31	42,00±0,33	33,69±0,27	32,68±0,23
	70	41,68±0,31	33,46±0,29	31,51±0,23
	96	27,31±0,31	28,61±0,35	25,82±0,21
Раствор аммиака 0,25%	43,21±0,28	45,36±0,31	39,82±0,38	40,31±0,31
HCl разбавленная 0,83%	51,02±0,35	53,87±0,31	55,37±0,36	60,01±0,38
Гексан	0,97±0,14	1,64±0,20	4,11±0,16	4,38±0,18
Ацетон	5,60±0,17	7,63±0,15	12,16±0,22	14,28±0,19

Изучение комплекса БАВ методом ИК-спектроскопии. При сравнении спектров изучаемых образцов листьев на разных стадиях заготовки обнаружено их значительное сходство в области валентных и деформационных колебаний: полосы сильной и средней интенсивности при 2960-2850; 1750-1730; 1460-1410; 1380-1300 см⁻¹ (рис. 10), что указывает на присутствие в сырье различных групп БАВ, в т.ч. полисахаридов, карбонильных соединений (кислот и эфиров) и ароматических соединений.

Четко прослеживается тенденция к снижению величины светопропускания, а, следовательно, росту оптической плотности, на спектрах листьев от ранней к более поздней стадиям заготовки сырья, что может объясняться накоплением БАВ по мере жизни листовой пластинки. Вид спектров изучаемого сырья может быть использован для целей, дополнительного к морфологии и анатомии, подтверждающего способа идентификации сырья.

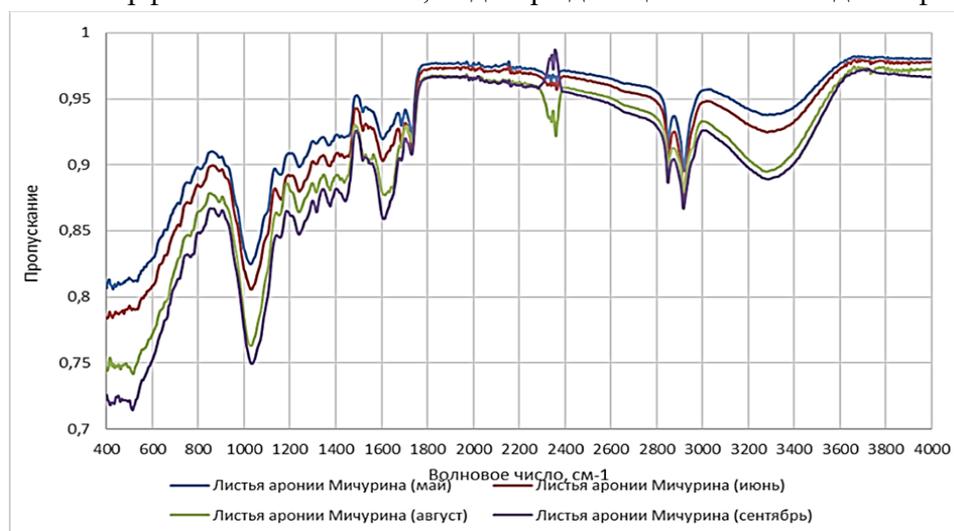


Рисунок 10 - Вид ИК-спектров изучаемых листьев

Оптимальным рекомендованным периодом для заготовки листьев аронии Мичурина является период технической спелости плодов и начала покраснения листьев, что позволит

сохранить ценные БАВ последних, широко используемых для промышленного производства ЛРП. Содержание же целевых групп БАВ фенольной природы для листьев аронии Мичурина, заготовленных на территории Центрального Черноземья (на примере Тамбовской области), на данном этапе также можно считать высоким (флавоноидов – не менее 2%; дубильных веществ – не менее 5%; антоциановых соединений – не менее 5%).

4. Первичная оценка видов фармакологической активности БАВ листьев и выбор оптимальных лекарственных форм на их основе

Прогноз видов фармакологической активности полифенольных БАВ листьев *in silico*. Согласно данным *in silico* оценки (программы PASS-online и Phyto4Health) основные БАВ листьев аронии Мичурина могут проявлять антиоксидантную, противовоспалительную и вазопротекторную активности, что открывает перспективы создания ЛРП на основе данного сырья.

Изучение биостимулирующего действия отвара листьев аронии Мичурина *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка». Установлено, что отвар листьев аронии Мичурина *in vitro* в разведении 1:10 во все сроки заготовки ЛРС снижает время выживаемости инфузорий при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида максимально при инкубации 24 ч не менее, чем на 43,5% по сравнению с контрольной пробой, что, возможно, свидетельствует о повышении проницаемости биологических мембран под влиянием дубильных веществ и стеринов. В разведениях 1:1000 и 1:10000, отвар проявляет наибольшее биостимулирующее и мембранопротекторное действие, что подтверждается значительным достоверным повышением времени выживаемости инфузорий при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида, максимально на 39,3% (рис. 11) по сравнению с контрольной пробой при инкубации 24 ч (в разведении 1:1000 при заготовке ЛРС в июне), что, вероятно, взаимосвязано с содержанием флавоноидов и антоцианов, близких к диапазонам терапевтических доз. Сводные данные приведены в таблице 10.

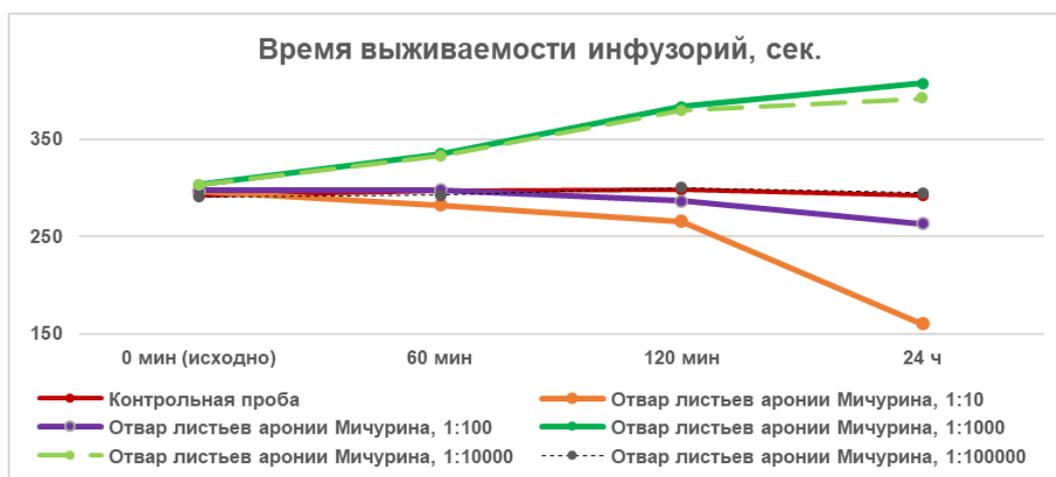


Рисунок - 11. Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина (заготовка ЛРС – июнь) на время выживаемости *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Определение антиокислительной активности *in vitro*. Оценена антиокислительная активность извлечений из листьев аронии Мичурина *in vitro*. Наиболее высокие значения

Таблица 10 - Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина на различных сроках заготовки на время выживаемости *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Проба	Время выживаемости инфузорий, сек.							
	май		июнь		август		сентябрь	
	0 мин (исходно)	24 ч	0 мин (исходно)	24 ч	0 мин (исходно)	24 ч	0 мин (исходно)	24 ч
Контрольная проба	304,67±5,239	306,67±2,906	292,33±2,333	292,67±7,356	295,00±7,211	294,00±6,557	300,67±2,333	297,33±3,283
Опытная проба, 1:10	296,67± 3,844	159,00± 9,644***,+++	296,33± 4,702	160,67± 15,301**,++	303,67± 4,177	159,67± 7,839***,+++	295,33± 4,177	150,00± 13,317***,***
разница с контролем, %	-2,6	-46,3	+1,4%	-45,1	2,9	-45,7	-1,8	-49,6
разница с исходным, %	–	-46,4	–	-45,8	–	-47,4	–	-49,2
Опытная проба, 1:100	301,33±5,239	265,33±11,667*,+	297,67±3,756	263,33±17,676	302,33±7,688	263,00±18,824	297,00±3,000	265,00±13,317*
разница с контролем, %	-1,1	-10,4	+1,8	-10,0	2,5	-10,5	-1,2	-10,9
разница с исходным, %	–	-11,9	–	-11,5	–	-13,0	–	-10,8
Опытная проба, 1:1000	300,00± 3,000	392,67± 7,356***,+++	303,33± 3,528*	407,67± 1,453***,+++	295,33± 6,766	315,33± 9,387	287,00± 7,024	399,67± 13,246**,++
разница с контролем, %	-1,5	+32,7	+3,8	+39,3	+0,1	+7,3	-4,5	+34,4
разница с исходным, %	–	+30,9	–	+34,4	–	+6,8	–	+39,3
Опытная проба, 1:10000	295,67± 3,756	397,33± 6,741***,+++	303,00± 2,646*	392,33± 4,372***,+++	290,67± 12,252	362,67± 10,333**,+	291,67± 6,489	376,00± 21,455*,+
разница с контролем, %	-3,0	+34,2	+3,6	+34,1	-1,5	+23,4	-3,0	+26,5
разница с исходным, %	–	+34,4	–	+29,5	–	+24,5	–	+28,9
Опытная проба, 1:100000	295,33±5,175	291,67±6,839	291,00±13,454	295,33±3,712	294,33±6,566	292,00±7,550	280,00±11,269	294,00±14,295
разница с контролем, %	-3,1	-1,5	-0,5	+0,9	-0,2	-0,7	-6,9	-1,1
разница с исходным, %	–	-1,5	–	+1,5	–	-0,8	–	+5,0

Примечание: * – P<0,05, ** – P<0,01, *** – P<0,001 – достоверность различий при сравнении показателей в опытной пробе с контрольной пробой, + – P<0,05, ++ – P<0,01, +++ – P<0,001 – достоверность различий при сравнении показателей с исходным значением по группе; опытная проба – отвар листьев аронии Мичурина

данного показателя были характерны для извлечений, полученных с применением 40-70% этилового спирта в качестве экстрагента.

Оценка антимикробной активности спиртосодержащих жидких ЛФ на основе листьев. Комплекс БАВ жидкого экстракта проявляет антимикробную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus* (таблица 11).

Выбор оптимальных лекарственных форм. На основе листьев аронии Мичурина получены лекарственные формы: отвар (1:10), настойка (1:5) и экстракт жидкий (1:1). По результатам стандартизации и оценке содержания целевых групп БАВ, а также по величине антиокислительной активности в качестве оптимальной лекарственной формы (ЛФ) из исследованных может быть рекомендован экстракт жидкий (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты стандартизации и количественного определения целевых БАВ в ЛФ на основе листьев аронии Мичурина

Показатель	Отвар 1:10	Настойка 1:5	Экстракт жидкий 1:1
Содержание спирта этилового, %	-	58,10	46,64
Плотность, г/см ³	-	0,9378±0,0012	1,0102±0,0009
Тяжелые металлы, %	-	Менее 0,001	Менее 0,01
Сухой остаток, %	4,80±0,45	5,30±0,31	6,03±0,25
Значение рН	6,01	5,26	5,09
Флавоноиды (в пересчете на рутин), %	0,10±0,021	0,32±0,10	1,04±0,05
Дубильные вещества (в пересчете на катехин), %	0,86±0,17	2,27±0,12	11,35±0,24
Антиокислительная активность (в пересчете на кверцетин), мг/мл	1,04±0,05	3,01±0,23	5,83±0,83

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате комплексного морфолого - анатомического анализа листьев аронии Мичурина впервые установлены диагностические признаки, позволяющие проводить идентификацию данного сырья: одноклеточные простые волоски на нижней поверхности листа, одноклеточные железистые волоски с многоклеточным основанием вдоль главной жилки по верхней поверхности листа, устьица анизоцитного типа;
2. Определены товароведческие показатели качества листьев аронии Мичурина и предложены их нормативы (влажность - не более 10%; золы общей - не более 10%; золы, нерастворимой в кислоте 10% хлористоводородной - не более 0,1%; минеральные примеси - не более 0,5%; органические примеси - не более 1 %);
3. С применением современных физико-химических методов (СФМ, ГХ-МС, капиллярный электрофорез, ТСХ и др.) изучен профиль БАВ (флавоноиды, дубильные вещества, антоцианы, пигменты, аминокислоты, органические кислоты и др.) листьев аронии Мичурина на разных сроках заготовки;
4. Методом масс-спектрометрии установлено присутствие 61 элемент в листьях аронии Мичурина, культивируемых на территории Тамбовской области. Результаты оценки способности листьев к накоплению токсичных элементов и радионуклидов показали, что изучаемое сырье может считаться экологически безопасным;
5. Впервые предложены целевые группы БАВ для стандартизации и оценки качества листьев аронии Мичурина, разработаны и валидированы спектрофотометрические методики их

Таблица 11 – Результаты определения собственной антимикробной активности комплекса БАВ спиртосодержащих лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	Положительный контроль	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Отрицательный контроль
Экстракт листьев аронии Мичурина жидкий (1:1)												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Escherichia coli</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Candida albicans</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Bacillus cereus</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Staphylococcus aureus</i>	Рост	Роста нет	<i>Роста нет</i>	Рост	Рост	Рост	Роста нет					
Настойка листьев Аронии Мичурина (1:5)												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рост	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Escherichia coli</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Candida albicans</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Bacillus cereus</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Staphylococcus aureus</i>	Рост	Роста нет	<i>Роста нет</i>	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет				

Жирным курсивом выделены разведения лекарственных форм, в которых не наблюдался рост микроорганизмов по сравнению с наличием роста при использовании чистого экстрагента (спирта этилового в концентрации 70 об.%)

определения, а также критерии содержания: суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 2%), суммы дубильных веществ в пересчете на катехин (не менее 5%) и суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид (не менее 5%). Жидкий экстракт листьев является наиболее перспективной ЛФ в виду наибольшего содержания данных групп БАВ;

6. Методом *in silico* проведена прогностическая оценка возможных фармакологических свойств комплекса БАВ полифенольной природы листьев и выбраны перспективные направления для дальнейшей разработки ЛРП (вяжущего, противовоспалительного, антиокислительного и капилляропротекторного действия);

7. Результаты оценки антиокислительной активности извлечений из листьев аронии Мичурина, полученных с применением 40-70% этилового спирта в качестве экстрагента, *in vitro* показали перспективность получения настойки и жидкого экстракта на основе изучаемого сырья. В то же время на модели тест-системы *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» достоверно доказано наличие биостимулирующего и мембранопротекторного действия отвара листьев аронии Мичурина. Жидкий экстракт листьев проявляет широкий спектр антимикробной активности в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*;

8. Научно обоснована перспективность применения листьев аронии Мичурина в качестве источника БАВ. В качестве оптимального установлен срок заготовки сырья на стадии созревания плодов растения. Разработаны критерии оценки качества листьев аронии Мичурина и проект современной нормативной документации (ФС) для их стандартизации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Валидация методики количественного определения дубильных веществ в листьях рябины черноплодной / О.В. Пугачева, О.Л. Свиридова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** - 2022. - №1. - С. 98-104.

2. Пугачева, О.В. Валидация методики количественного определения антоцианов в листьях аронии Мичурина / О.В. Пугачева, О.В. Тринева, К.Е. Панова // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии.** – 2023. – Т.22. - №4. – С. 214-222.

3. Пугачева, О.В. Выбор оптимальной лекарственной формы листьев аронии Мичурина / Пугачева О.В., Панова К.Е., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. // **Биофармацевтический журнал.** – 2023. - №5. – С.3-5.

4. Пугачева, О.В. Выбор условий определения антоцианов в листьях рябины черноплодной / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // **Инновационное развитие экономики: Материалы второго Крымского инновационного форума, Симферополь - Алушта, 25 июня – 18 2020 года / ФГБУН «НИИСХ Крыма», Научно-технический союз Крыма.** – Симферополь - Алушта: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2020. – С.96-98.

5. Пугачева, О.В. Изучение аминокислотного состава листьев аронии Мичурина / О.В. Пугачева // **Вестник Башкирского государственного медицинского университета.** - 2023. - №S6. - С. 877-880.

6. Пугачева, О.В. Изучение морфологии и анатомии листьев аронии Мичурина различными микроскопическими методами / О.В. Пугачева, О.В. Тринева // **Фармация.** - 2023. – Т.72. - №6. – С. 19-26.

7. Пугачева, О.В. Исследование состава листьев аронии Мичурина методом газовой хромато-масс-спектрометрии / О.В. Пугачева, О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // **Вестник Воронежского государственного университета: серия Химия. Биология. Фармация.** – 2024. – №1. – С. 114-124
8. Пугачева, О.В. Исследование элементного состава листьев аронии Мичурина (*Aronia Mitchurinii* Skvortsov & Maitulina) / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // **Химия растительного сырья.** – 2023. - №6. – С. 307-316.
9. Пугачева, О.В. Количественное определение антоцианов в листьях аронии Мичурина / О.В. Пугачева, О.В. Тринеева, К.Е. Панова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой, Н.А. Дьяковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2023. – С. 356-359.
10. Пугачева, О.В. Морфолого-анатомическое изучение листа аронии Мичурина (*Aronia Mitchurinii* Skvortsov & Maitulina) / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // От биохимии растений к биохимии человека международная научная конференция, Москва, 16–17 июня 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 2022. – С. 296-300.
11. Пугачева, О.В. Определение дубильных веществ в листьях рябины черноплодной различными аналитическими методами / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник трудов Седьмой научной конференции с международным участием, Москва, 19 декабря 2019 года. Том 12. - Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 2019 – С.292-298.
12. Пугачева, О.В. Определение дубильных веществ в листьях рябины черноплодной для выбора сроков заготовки сырья / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник материалов IX Международная научная конференция молодых учёных, Москва, 16–17 декабря 2021 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 2021. – С. 345-350.
13. Пугачева, О.В. Определение органических кислот в аронии Мичурина листьях / О.В. Пугачева, О.В. Тринеева // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения : Материалы XI Международной научно-практической конференции молодых ученых, Москва, 30 ноября – 01 декабря 2023 года. – Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, 2023. – С. 303-307.
14. Пугачева, О.В. Определение флавоноидов в листьях аронии Мичурина методом ТСХ / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2022. – С. 429-433.

15. Пугачева, О.В. Определение экстрактивных веществ в листьях аронии Мичурина / Пугачева О.В., Панова К.Е., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. // **Биофармацевтический журнал.** – 2023. - №4. – С.3-6.
16. Пугачева, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // **Вестник Воронежского государственного университета: серия Химия. Биология. Фармация.** – 2023. - №3. – С. 92-99.
17. Петиолярная анатомия листьев аронии Мичурина / О.В. Пугачева, О.В. Тринеева, В.В. Негроров, Н.В. Хромов // **Биофармацевтический журнал.** – 2024. – Т.16, №2. – С. 11-15.
18. Тринеева О.В. Профиль биологически активных веществ листьев аронии Мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья / Тринеева О.В., Пугачева О.В. // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2024. - Т.13, №2. – С. 33-43.

Практические рекомендации

Являющееся в настоящее время побочным продуктом при заготовке плодов аронии Мичурина листья могут быть использованы в качестве перспективного источника БАВ для разработки на их основе ЛРП вяжущего, противовоспалительного, антиокислительного и капилляропротекторного действия с дальнейшей оценкой *in vivo* на этапе доклинических исследований в рамках решения задач по разработке эффективных и безопасных лекарственных препаратов Российского производства. Результаты диссертационного исследования использованы при разработке проекта ФС «Аронии Мичурина листья» для ГФ РФ, который зарегистрирован в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Оптимальным рекомендованным периодом для заготовки листьев аронии Мичурина является период технической спелости плодов и начала покраснения листьев, что позволит сохранить ценные БАВ последних, широко используемых для промышленного производства ЛРП. Содержание же целевых групп БАВ фенольной природы для листьев аронии Мичурина, заготовленных на территории Центрального Черноземья (на примере Тамбовской области), на данном этапе также можно считать высоким.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Определены возможные перспективы разработки ЛРП на основе листьев аронии Мичурина вяжущего, противовоспалительного, антиокислительного и капилляропротекторного действия с дальнейшей оценкой *in vivo* на этапе доклинических исследований. Для выявления вариабельности в содержании комплекса БАВ изучаемого сырья необходимо исследование листьев, заготовленных от растений, произрастающих на других территориях, а также оценка многолетней динамики накопления БАВ в сырье изучаемого региона.

Список использованных сокращений

АОА – антиокислительная активность	ЛРС – лекарственное растительное сырье
БАВ – биологически активные вещества	ЛФ – лекарственная форма
ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации	НД – нормативная документация
ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором	ОФС – общая фармакопейная статья
ИКС – инфракрасная спектроскопия	РФ – Российская Федерация
КЭ – капиллярный электрофорез	СО – стандартный образец
ЛП – лекарственный препарат	СФМ – спектрофотометрия
ЛРП – лекарственный растительный препарат	ТСХ – тонкослойная хроматография
	ФС – фармакопейная статья