

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Пугачева Ольга Валериевна

Фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев

3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
Тринеева Ольга Валерьевна

Воронеж - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. РОД АРОНИЯ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ	12
1.1. Характеристика рода Арония (<i>Aronia</i>).....	12
1.2. Происхождение аронии Мичурина	16
1.3. Ботанико-фармакогностическая характеристика аронии Мичурина	19
1.4. Фитохимическая характеристика представителей рода Арония	22
1.4.1. Фитохимическая характеристика плодов	22
1.4.2. Фитохимическая характеристика листьев	26
1.5. Фармакологическая активность и медицинское применение представителей рода Арония	28
1.5.1. Фармакологическая активность и медицинское применение плодов	28
1.5.2. Фармакологическая активность и медицинское применение листьев	33
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	35
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ АРОНИИ МИЧУРИНА	49
3.1. Внешние признаки листьев аронии Мичурина	49
3.2. Микроскопические признаки листьев аронии Мичурина.....	54
3.2.1. Изучение анатомических признаков листа аронии Мичурина (препарат листа с поверхности).....	54
3.2.2. Изучение морфологических признаков поверхности листа с использованием растровой микроскопии	58
3.2.3. Петиолярная анатомия черешка листа.....	60
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.	65
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ЭКОТОКСИКАНТОВ ЛИСТЬЯМИ АРОНИИ МИЧУРИНА	67
4.1. Элементный состав листьев аронии Мичурина	67

4.2. Оценка радионуклидного загрязнения листьев аронии Мичурина	75
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	76
ГЛАВА 5. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ АРОНИИ МИЧУРИНА	77
5.1. Определение товароведческих показателей.....	77
5.2. Стандартизация листьев по содержанию суммы экстрактивных веществ	78
5.3 Качественный анализ биологически активных веществ листьев аронии Мичурина	82
5.3.1. Качественное определение некоторых групп биологически активных веществ в листьях аронии Мичурина.....	82
5.3.2. Хроматографическое исследование листьев аронии Мичурина.....	83
5.4. Исследование состава листьев аронии Мичурина методом газовой хромато-масс-спектрометрии	87
5.5. Количественное определение биологически активных веществ листьев аронии Мичурина	94
5.5.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии	94
5.5.2 Определение суммы дубильных веществ в пересчете на катехин методом УФ-спектрофотометрии.....	103
5.5.3. Разработка и валидация методики количественного определения антоцианов в аронии Мичурина листьях.....	111
5.5.4. Разработка и валидация методики определения пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев аронии Мичурина.....	120
5.5.5. Определение органических кислот в листьях аронии Мичурина	127
5.5.6. Анализ витаминов группы В в листьях аронии Мичурина	130
5.5.7. Анализ аминокислот в листьях аронии Мичурина.....	131
5.6. Изучение комплекса БАВ листьев аронии Мичурина методом ИК-спектроскопии	132
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	138
ГЛАВА 6. ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ВИДОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАВ ЛИСТЬЕВ АРОНИИ МИЧУРИНА И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ.....	140

6.1. Прогноз фармакологической активности биологически активных веществ листьев аронии Мичурина <i>in silico</i>	140
6.2. Определение антиокислительной активности <i>in vitro</i>	141
6.3. Изучение биостимулирующего действия отвара листьев аронии Мичурина <i>in vitro</i> с использованием тест-системы инфузорий <i>Paramecium caudatum</i> в тесте «функциональная нагрузка»	143
6.4. Оценка антимикробной активности лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина	153
6.5. Выбор оптимальных лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина	156
6.5.1. Стандартизация лекарственных форм	157
6.5.2. Количественное определение биологически активных веществ в лекарственных формах	158
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.	166
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	168
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	171
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	172
ПРИЛОЖЕНИЯ	202

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В современной медицине и фармации, несмотря на большой ассортимент синтетических препаратов, широко продолжают использоваться и лекарственные препараты (ЛП) растительного происхождения. Это связано с разными факторами, такими как приверженности пациентов к натуральным препаратам или более мягкое действие комплекса биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в растительном сырье. Кроме того, на данном этапе развития фармацевтической науки не разработаны методики получения синтетических аналогов некоторых групп БАВ, например антоцианов.

В связи с этим представляет интерес поиск новых перспективных видов лекарственного растительного сырья (ЛРС). Также в настоящее время актуален вопрос рационального использования растительных сырьевых источников, поэтому рассматривается возможность комплексного их применения и заготовка нефармакопейных видов сырья от фармакопейных лекарственных растений.

Арония Мичурина или рябина черноплодная – культигенный гибрид аронии черноплодной и рябины обыкновенной. Он широко распространен на территории Российской Федерации (РФ), в отличие от родительского вида – аронии черноплодной, что обеспечивает сырьевую базу для заготовки.

Плоды аронии находят свое применение в медицине, однако и другие части растения могут быть богатыми источниками БАВ. 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 зарубежом направлены на изучение плодов данного растения. Однако, в основном в зарубежных литературных источниках, встречаются исследования 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. В сравнительных исследованиях показано, что профиль флавоноидов и оксикоричных кислот плодов и листьев сходны между собой, при этом количественное содержание флавоноидов выше в листьях.

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 диагностические, в том числе петиолярные, признаки листьев аронии Мичурина. С учетом выявленных признаков разработаны показатели для определения подлинности листьев.

Установлены особенности накопления 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 для включения их в проект фармакопейной статьи (ФС).

Впервые методами капиллярного электрофореза (КЭ), газожидкостной хроматографии (ГХ МС), тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии (СФМ) установлена динамика накопления комплекса БАВ листьев аронии Мичурина. Получены инфракрасные (ИК) спектры листьев на разных сроках заготовки и выявлены специфические полосы поглощения.

Разработаны и валидированы методики определения целевых групп БАВ полифенольной природы (дубильных веществ, антоцианов и флавоноидов), а также пигментов в листьях аронии Мичурина.

Методом компьютерного моделирования *in silico* определены основные виды фармакологической активности и побочных действий комплекса БАВ листьев. Полученные данные по оценке потенциальных видов фармакологической активности позволяют предложить данное ЛРС для разработки препаратов на его основе, обладающих антиоксидантной, вазопротекторной, противовоспалительной и вяжущей активностью. Антиокислительная активность (АОА) извлечений на основе листьев подтверждена титриметрическим методом (*in vitro*).

С использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» впервые установлено, что отвар листьев аронии Мичурина *in vitro* значительно достоверно повышает время выживаемости инфузорий при повреждающем воздействии раствора натрия хлорида, максимально на 39,3% по сравнению с контрольной пробой при инкубации 24 ч (в разведении 1:1000 при заготовке ЛРС в июне), что свидетельствует о наличии биостимулирующего и мембранопротекторного действия.

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*.

Теоретическая и практическая значимость. В результате проведенных исследований получены новые данные о морфолого-анатомических признаках и химическом составе листьев аронии Мичурина. Они позволяют расширить имеющиеся литературные данные. Исследования показали перспективность использования листьев аронии Мичурина в качестве источника БАВ наравне с плодами. Даны рекомендации по срокам заготовки листьев с точки зрения максимального накопления БАВ полифенольной природы и сохранения возможности сбора плодов растения.

На основании полученных результатов был разработан проект ФС «Аронии Мичурина листья» для ГФ РФ.

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.B., Szopa A., Cvetanović A., Lee J.E., Peter J.L., Persson-Hovmalm 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 и их биометрические характеристики;
2. Результаты оценки накопления экотоксикантов листьями аронии Мичурина;
3. Результаты комплексного качественного и количественного определения различных групп БАВ в листьях современными физико-химическими методами анализа;
4. Результаты стандартизации водно-спиртовых извлечений 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 агrobiотехнологий 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.).

ГЛАВА 1. РОД АРОНИЯ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

1.1. Характеристика рода Арония (*Aronia*)

Род арония (*Aronia*) включает в себя лиственные кустарники, исторически произраставшие на территории Северной Америки во влажных местообитаниях. Естественный ареал произрастания данного рода находится в восточной части Северной Америки от острова Ньюфаундленд и южной части провинции Квебек на севере до полуострова Флорида на юге. Преимущественно данный род произрастает во влажной местности: на болотах, по берегам рек, озер, в низинных лесах. В естественном ареале растут небольшими колониями – клонами. Род входит в подсемейство *Maloideae*, семейства *Rosaceae* [14, 199].

Однако в некоторых зарубежных базах данных растений род арония отсутствует, а его представители включены в род *Photinia* [14].

Издавна представители данного рода применялись в народной медицине коренными жителями Северной Америки в виде чая при простуде. Плоды аронии черноплодной использовали для получения высокопитательного продукта – пеммикана – высушенное мясо бизонов с добавлением сушеных ягод, ягодного сока и специй. Прибывшие в Северную Америку в период ее колонизации поселенцы так же заметили полезные свойства представителей рода *Aronia*, используя плоды и кору как вяжущее средство [198].

Род *Aronia* включает следующие виды: арония черноплодная (*A. Melanocarpa*), арония древовидная (*A. arbutifolia*) и арония сливолистная (*A. prunifolia*). Последняя считается природным гибридом двух других видов. Кроме того, согласно современным данным к нему относят культурогенный вид арония Мичурина (*A. x mitschurinii*), являющийся гибридом аронии черноплодной и рябины обыкновенной [14, 58, 76, 157, 195].

Наиболее явным отличительным признаком основных представителей рода является цвет плодов: сливолистная имеет ягоды пурпурно-черного цвета, древовидная – красные, а черноплодная и Мичурина – черные [157, 224].

Арония черноплодная (Рисунок 1) представляет собой кустарник, высота которого составляет 0,5-1 м. Отличается голыми побегами, листья так же обычно голые, однако встречаются варианты и с опушенными листьями. По форме они могут быть эллиптическими или овально-ланцетными. Соцветия малоцветковые (4-6 штук). Черные матовые плоды небольшие, диаметром 6-8 мм, по форме варьируют от овальной до грушевидной, суховатые, малосъедобные. В целом морфологические признаки изменчивы [14, 58, 169].



Рисунок 1 – Куст аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa*)

Естественный ареал (Рисунок 2) аронии черноплодной расположен в восточной части Северной Америки. В США в XX веке считался мало декоративным кустарником, часто уничтожался как сорняк. Первые данные о появлении *Aronia melanocarpa* в России относятся к XIX веку [14].

Растет преимущественно во влажных местах: болота, пойменные леса, берега водных потоков. Но может расти и в более сухих местах обитания. Предпочитает хорошо освещенные места или слабую тень [168].

Арония древовидная или арония земляничниколистная (Рисунок 3) – кустарник высотой 1,8-3 м отличается опушенными, войлочными побегами. Листья могут быть эллиптическими, продолговатыми, обратнойцевидными, характеризуются очень яркой красной окраской. Соцветия опушенные, от 9 до 20 цветков. Плоды вишнево-красные, диаметром - 5-7 мм. Занимает более влажные места обитания [14].



Рисунок 2 – Естественный ареал распространения аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa*) (на территории США согласно данным <https://plants.usda.gov/>)



Рисунок 3 – Куст аронии древовидной (*Aronia arbutifolia*)

Встречаются разновидности с более крупными листьями, более крупными плодами и карликовые формы.

Ареал совпадает с ареалом аронии черноплодной (Рисунок 4). Данный вид культивируется, например, широко распространен сорт данного вида «Бриллиант» [58, 168].

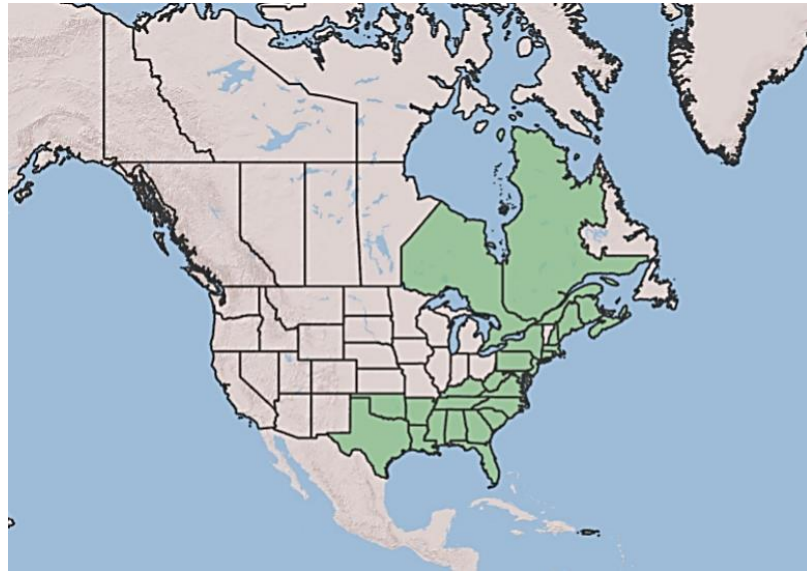


Рисунок 4 – Естественный ареал распространения аронии древовидной (*Aronia arbutifolia*) (на территории США согласно данным <https://plants.usda.gov/>)

Арония сливолистная (Рисунок 5) – наиболее крупный вид, вырастает в высоту до 4 м. Похож на аронию древовидную, но опушение развито слабее. Как правило, уровень и характер опушения, как и большинство других морфологических признаков, носит промежуточный характер между родительскими видами. Плоды пурпурно-черные, 9-10 мм в диаметре, блестящие.

Естественный ареал (Рисунок 6) произрастания перекрывается с ареалом аронии черноплодной. Данный вид начали культивировать, по данным литературы, с 1800 года [14, 58, 168].



Рисунок 5 – Куст аронии сливолистной (*Aronia prunifolia*)

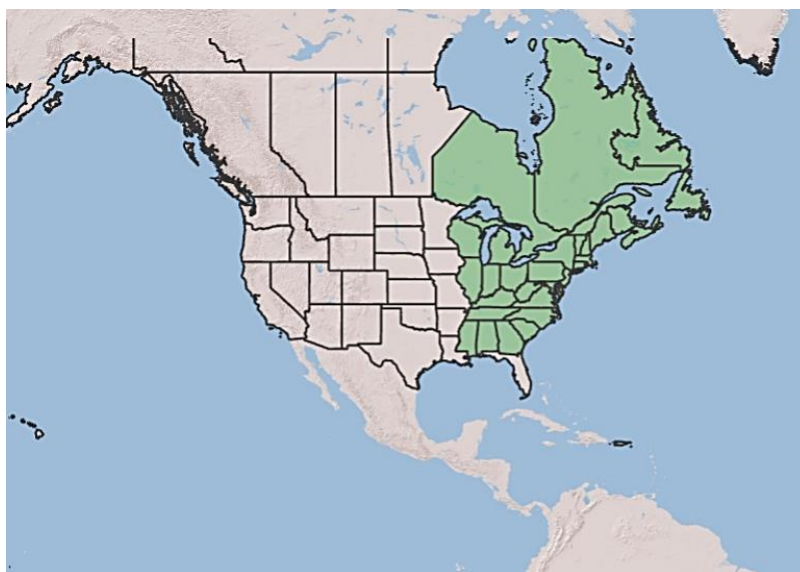


Рисунок 6 – Естественный ареал распространения аронии сливолистной (*Aronia prunifolia*) (на территории США согласно данным <https://plants.usda.gov/>)

1.2. Происхождение аронии Мичурина

Несмотря на то, что в научной литературе часто отсутствует разграничение между аронией черноплодной и аронией Мичурина, рядом исследований было доказано их фенотипические и генотипические различия, а происхождение вида связывают с селекционными работами И.В. Мичурина.

В конце 19 века И.В. Мичурин получил саженцы аронии черноплодной из Северной Америки и начал проводить селекционные работы по получению крупноплодных форм в г. Козлов (ныне г. Мичуринск). Он скрещивал *A. melanocarpa* с отдаленно родственными видами из рода рябины (*Sorbus*). Полученный вид был назван И.В. Мичуриным рябиной черноплодной.

Культивируемую аронию впервые предложили выделять как отдельный вид в 1982 г. советские ученые А.К. Скворцов и Ю.К. Майтулина. Они обратили внимание на различия формы и размера плодов, размеров листовых пластинок дикой североамериканской аронии черноплодной и тех растений, что культивировались на территории СССР. Одним из важных отличий является меньшая изменчивость морфологических признаков у аронии Мичурина в сравнении с аронией черноплодной. Также в целом рябина черноплодная крупнее по размерам самого кустарника, листья, цветки и плоды характеризуются также большими размерами. Кроме того, плоды аронии Мичурина съедобные, а аронии черноплодной – суховатые и малосъедобные. Были отмечены и различия в морозостойкости и степени изменчивости данных растений. Культивируемая в СССР рябина черноплодная характеризовалась чрезвычайной морозостойкостью, в то время как дикие растения США обладали умеренной морозостойкостью. На основании описанных различий культивируемую рябину черноплодную описали как новый вид, который был назван аронией Мичурина в честь ее создателя [14, 58, 122].

В опубликованной работе [210] в ходе RAPD-анализа был изучен генотип 8 североамериканских популяций, 5 новосибирских экземпляров и 4 культиваров аронии Мичурина: сорта «Неро», «Арон», «Викинг» и *Aronia melanocarpa* var. *elata*. Все культивируемые растения относились к тетраплоидам с низкой степенью изменчивости, а растения естественного происхождения были как диплоидами, так и тетраплоидами. При этом диплоидные растения отличались высокой изменчивостью. Был сделан вывод, что тетраплоидные формы – гибриды разных видов или родов, а арония черноплодная является одним из родительских

видов. При этом показано, что вид был получен не только как результат гибридизации, но и как результат макромутации.

В работе [157] с помощью AFLP-анализа были четко идентифицированы различные близкородственные виды подтрибы *Pyrinae* семейства *Rosaceae*, принадлежащие к родам *Aronia*, *Sorbus*, *Sorbaronia*. Сорты аронии Мичурина «Викинг» и «Неро» не имели различий при генетическом анализе, следовательно, все сорта являются апомиктными потомками одного предшественника. Показано, что рябина черноплодная содержит в своем генотипе участки, характерные как для рода *Aronia*, так и для рода *Sorbus*. Наиболее близкими к ней являются арония черноплодная и арония сливолистная, что позволяет предположить, что один из этих видов лег в основу создания крупноплодных форм аронии. Вероятнее всего И.В. Мичурин скрещивал его с рябиной вида *S. aucuparia*, так как он относительно просто скрещивается с представителями рода Арония. Генетически арония Мичурина в большей степени относится к роду *Aronia*. В целом анализ подтвердил, что культивируемая арония Мичурина – отдельный вид - гибрид растений близкородственных родов, являющийся на 75% аронией черноплодной и на 25% - рябиной обыкновенной

По этим причинам плоды аронии, которые анализируют в нашей стране, в том числе ФС изложенные в ГФ РФ XIV издания, правильнее называть «Аронии Мичурина плоды». При этом наиболее часто используемое название «рябина черноплодная» также правомерно [28, 29, 76].

Существует ряд номенклатурных проблем с разграничением аронии Мичурина и рода *Sorbaronia*. К этому роду относят гибриды различных видов *Sorbus* и *Aronia*. Характерным отличием его представителей является большое количество морфотипов с признаками, промежуточными между родительскими видами, кроме того, все они являются диплоидами или триплоидами. В свою очередь арония Мичурина не имеет внешних признаков, сходных с родом *Sorbus*, и, как отмечалось ранее, всегда является тетраплоидом [14, 199, 210].

1.3. Ботанико-фармакогностическая характеристика аронии Мичурина

Арония Мичурина не имела широкого распространения до 1930-х годов. Впервые она была завезена в 1935 г. в Горно-Алтайск, а начиная с 1940 г. стала культивироваться и в других регионах СССР. В Европе и Азии рябина черноплодная получила распространение только в середине 20 века. Так в Швецию рябину черноплодную завезли в 1986 г., а в Японию в 1976 г. В 1990-х годах арония Мичурина была интродуцирована в Северной Америке [14, 143, 198].

В настоящее время культигенный ареал включает страны бывшего СССР, Польшу, Германию, Чехию, Словакию, Румынию, Японию, Швецию, Венгрию, Финляндию, США, Канаду.

За годы существования вида было выведено множество сортов аронии Мичурина: «Hugin», «Aron» (Швеция), «Nero» (Чехия), «Viking», «Rubina», «Ahonnen», «Hakkija», «De Belder» (Финляндия), «Albigowa», «Darbrowice», «Egerta», «Kutno», «Nowa Wies», «Galicjanka» (Польша), «Zerina» (Германия), «Fertödi» (Венгрия), «Черноокая», «Мулатка», «Чернавка», «Алтайская крупноплодная», «Черноплодная» (Россия), «Вениса», «Надзея» (Беларусь). Сорта «McKenzie», «Autumn Magic», выведенные в Северной Америке, вероятно также относятся к виду *A. x Mitschurinii* [14].

Несмотря на то, что данный вид искусственно выведен и относится к культивируемым, с течением времени он стал проникать в естественные лесные массивы без участия человека. Особенно активно этот процесс начался в начале 21 века. Так натурализация аронии Мичурина произошла в Московской, Тверской, Рязанской, Ярославской, Калужской, Владимирской, Смоленской, Саратовской, Брянской, Нижегородской, Ульяновской областях и в Республике Башкортостан [58]. В некоторых регионах натурализация вида происходит настолько быстро, что может наносить вред биоразнообразию. По этой причине аронию Мичурина внесли, например, в Черные книги флоры Беларуси и Нижегородской области [72, 142].

Арония Мичурина (Рисунок 7) – листопадный кустарник высотой не более 3 м, как правило, 1-2,5 м в зависимости от возраста стволов, который не может превышать 8-9 лет. Диаметр взрослого кустарника может достигать 2 м. Корневая система сильно разветвленная, мочковатая, в основном залегающая на глубине 0-30 см от поверхности почвы. Тонкие однолетние побеги красно-бурого цвета, в то время как более взрослые – темно-серые. Листья черешковые, эллиптические или обратнояйцевидные. Нижняя поверхность листа и черешок опушены, по главной жилке расположены черноватые железки. Край листа мелкозубчатый с регулярно расположенными зубчиками. Цветки диаметром до 1,2 см, белые, собраны в щитковидные метелки 10-23 цветка, в среднем – 16. Тычинки с пурпурными пыльниками от 19 до 23 штук. Завязь пятигнездная. Плод – «яблоко», округлой формы, черного цвета с сизым налетом, всегда матовые. Плод съедобный, сладкого, слегка терпкого вкуса. Семена мелкие светло-коричневые от 4 до 8 в одном плоде [14, 40, 51, 57, 122, 139].

На рисунках 8-10 можно проследить, что внешний вид аронии Мичурина отличается от других видов аронии, в первую очередь аронии черноплодной, более крупными размерами плодов, листьев и всего куста в целом.



Рисунок 7 – Куст аронии Мичурина (*Aronia x mitchurini*)



Рисунок 8 - Сравнение внешнего вида аронии черноплодной (слева) и аронии Мичурина (справа)



Рисунок 9 - Сравнение морфологии листьев (слева направо): арония древовидная, арония черноплодная, арония сливолистная, арония Мичурина



Рисунок 10 - Сравнение морфологии плодов аронии Мичурина (слева) и аронии черноплодной (справа)

1.4. Фитохимическая характеристика представителей рода Арония

Анализ литературных данных по фитохимической характеристике аронии Мичурина был затруднен отсутствием разграничения между видами аронии в литературных источниках. Из-за данной неоднозначности анализ публикаций по составу БАВ и фармакологической активности проводился для всего рода Арония в целом.

1.4.1. Фитохимическая характеристика плодов

Качественный и количественный состав БАВ наиболее изучен для плодов представителей рода. Плоды аронии черноплодной являются официальным ЛРС в России [28, 29].

Большинство исследований направлены на определение веществ фенольной природы: антоцианов, флавоноидов, гидроксикоричных кислот. Антоцианы считаются основной группой БАВ, обуславливающей фармакологическую активность, и представляют собой производные цианидина: цианидин-3-О-глюкозид, цианидин-3-О-арабинозид, цианидин-3-О-галактозид и цианидин-3-О-ксилозид [35, 143, 180].

По данным группы американских ученых под руководством R.Taheri представители рода Арония, в том числе арония Мичурина сорта «Викинг», также рассматриваются как источники антоцианов, флавоноидов, гидроксикоричных кислот и проантоцианидинов, содержание которых определяли методом ВЭЖХ-МС. Анализу подвергались плоды аронии древовидной, аронии сливолистной и аронии черноплодной, а также арония Мичурина сорта «Викинг». Во всех проанализированных образцах были обнаружены хлорогеновая кислота (кофеилхинная), неохлорогеновая кислота, цианидин-3-галактозид, цианидин-3-арабинозид, кверцетин-3-галактозид, кверцетин-3-глюкозид, кверцетин-3-рутинозид. Меньше всего БАВ было выявлено в образцах аронии древовидной [224].

В методиках количественного спектрофотометрического определения, которые чаще всего используются для оценки суммы антоцианов, пересчет ведут на цианидин-3-глюкозид [70]. Согласно данным ученых СамГМУ В.А. Куркина и А.В. Егоровой она составляет 4,34-5,15 % в свежих плодах и 3,09-3,22 % в воздушно-сухих плодах рябины черноплодной [14, 59].

Однако сразу в нескольких исследованиях было показано, что преобладающим производным цианидина является цианидин-3-О-галактозид. По данным исследований (В.И. Дейнека и соавторы) доля гликозидов цианидина в представителях видов аронии уменьшается в ряду: галактозид (66-70%), арабинозид (22-28%), ксилозид (1-4%), глюкозид (0,5-3%). Сумма антоцианов в плодах разных видов уменьшается в ряду: арония черноплодная, Мичурина, сливолистная. Состав хлорогеновых кислот также варьируется, уменьшаясь в том же ряду. Соотношение 3-кофеилхинной (3CQA), 5-кофеилхинной (5CQA) и 4-кофеилхинной (4CQA) кислот определялось для представителей рода арония, а также для рябины обыкновенной. Было показано, что в аронии черноплодной преобладает 3CQA, в рябине обыкновенной - 5CQA, в то же время в аронии Мичурина содержание данных кислот примерно равно и составляет промежуточное значение между родительскими видами [76].

В словацко-польских исследованиях плодов аронии Мичурина сортов «Галичанка», «Худжин», «Неро» и «Викинг» преобладающим гликозидом цианидина также являлся цианидин-3-галактозид. Среди гликозидов кверцетина помимо перечисленных выше были выявлены робинобиозид и виканозид. В сортах «Галичанка», «Неро» и «Викинг» преобладал кверцетин-3-галактозид, а в сорте «Худжин» в наибольшем количестве содержалось сразу два вещества: глюкозид и робинобиозид кверцетина. В целом содержание всех веществ полифенольной природы в плодах аронии Мичурина сорта «Худжин» было максимальным [202].

В исследованиях американских ученых Xianli Wu с соавторами в плодах аронии качественно были обнаружены пеларгонидин-3-арабинозид и пеларгонидин-3-галактозид [171].

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для плодов аронии Мичурина сорта «Викинг», культивируемых в Финляндии, был выявлен следующий полифенольный профиль: кемпферол 0,8%, кверцетин 33,9%, мирицетин 0,9%, п-кумаровая кислота 9,2%, кофейная кислота 10,3%, феруловая кислота 41,7%, п-гидроксibenзойная кислота 0,3%, эллаговая кислота 2,8% [213].

При исследованиях состава БАВ плодов рябины черноплодной сортов «Викинг», «Вениса», «Алтайская крупноплодная», проводившихся в Воронежском Государственном университете Е.Е. Логвиновой с соавторами, было определено, что сумма органических кислот в свежесобранных и высушенных плодах составляет 5,00% и 1,67% соответственно. Методом капиллярного электрофореза были выявлены яблочная (1,188%), янтарная (0,015%), масляная (менее 0,05%), молочная (0,03%), фумаровая (0,006%), лимонная (0,309%), уксусная (0,036%), пропионовая (0,03%) и сорбиновая (0,042%) кислоты.

Доказано присутствие в плодах и дубильных веществ, например, галловой кислоты, что обуславливает вяжущий вкус плодов, количество которых варьирует в зависимости от сорта от 8,8% (сорт «Викинг») до 16,0% (сорт «Вениса») при перманганатометрическом определении и от 0,98% (сорт «Алтайская крупноплодная») до 1,53% (сорт «Вениса») при селективном спектрофотометрическом определении [11, 47, 62, 64, 77].

На примере плодов аронии Мичурина сорта «Черноокая» в сырье был обнаружен большой перечень витаминов. Не считая Р-витаминных веществ (катехинов, антоцианов, флавонолов), о которых упоминалось ранее, высоко содержание аскорбиновой кислоты (20,83 мг/100 г) и холина (37,70 мг/100 г). Содержание других витаминов и витаминоподобных веществ значительно меньше: сумма каротиноидов (2,03 мг/100 г), ниацин (1,67 мг/100г), фолиевая кислота (1,4 мг/100 г). Уровень таких веществ, как тиамин (0,006 мг/100 г), рибофлавин (0,011 мг/100 г), пиридоксин (0,034 мг/100 г), минимален. Авторы так же отмечают, что плоды рябины черноплодной богаты пищевыми волокнами [8, 9, 34, 35, 70].

В нескольких исследованиях в плодах рябины черноплодной определен состав микро- и макроэлементов. Методом нейронно-активационного анализа было обнаружено 30 элементов. В них содержатся эссенциальные элементы: кальций (80 мг/100 г), натрий (70 мг/100 г), калий (270 мг/100 г), железо (1,57 мг/100 г), кобальт (1,3 мкг/100 г), цинк (0,614 мг/100 г), селен (1,1 мкг/100 г), хром (124 мкг/100 г). Из условно-эссенциальных и токсичных элементов: серебро, барий, цезий, стронций, мышьяк, сурьма, селен. Количество токсичных элементов не превышало, норм, установленных в ОФС ГФ РФ XV издания «Определение содержания тяжёлых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [29]. Согласно другим исследованиям так же были обнаружены: фосфор (30 мг/100 г), магний (13 мг/100 г), медь (0,281 мг/100 г), марганец (0,433 мг/100 г), йод (3,1 мкг/100 г) [34, 47, 48, 70, 171].

Американскими учеными Bolling B.W. и соавторами было показано, что содержание кислот, сахаров и полифенолов в плодах аронии Мичурина сорта «Викинг» изменяется в процессе созревания. В исследовании сока аронии, полученного от плодов с первой по седьмую неделю созревания, было показано, что кислотность со временем практически не изменяется. В свою очередь количество кислот снижается, а содержание сахаров (фруктоза, глюкоза, сорбитол) растет. В процессе созревания общее количество фенолов и проантоцианов также растет. При этом суммарное содержание полифенолов минимально в первую неделю сбора, далее оно растет, достигая максимума к пятой неделе, а к седьмой неделе снижается. Содержание гидроксикоричных кислот, в свою очередь, в процессе созревания снижается. Качественный состав БАВ также изменяется. Так цианидин-3-ксилозид до второй недели не обнаруживался, в то время как цианидин-3-галактозид и цианидин-3-глюкозид присутствовали на каждой стадии [191].

В сравнительных исследованиях с плодами других растений – источников соединений фенольной природы, арония является одним из лидеров по содержанию данной группы БАВ. Так южнокорейскими учеными под руководством Dae-Woon Kim было показано, что по суммарному содержанию

фенолов (в пересчете на галловую кислоту) и флавоноидов (в пересчете на рутин) плоды аронии черноплодной находятся на первом месте, опережая голубику высокорослую, шелковицу белую, корейскую ежевику, ежевику кустистую и малину боярышничелистную, а по содержанию суммы антоцианов уступают только ежевике корейской. Однако содержание аскорбиновой кислоты было ниже, чем в других исследованных растениях [178].

По количеству витамина Р рябина черноплодная занимает первое место среди плодово-ягодных и овощных культур [23].

1.4.2. Фитохимическая характеристика листьев

Методами качественного химического анализа доказано, что и листья аронии содержат большой перечень БАВ, таких как таннины, флавоноиды, сапонины, антоцианы др. [37].

В соответствии с данными корейских ученых Nhuan Do Thi и Eun-Sun Hwang общее содержание полифенолов и флавоноидов в спиртовых экстрактах из молодых листьев рябины черноплодной составляло 250,8 мг/г в пересчете на галловую кислоту и 163,7 мг/г в пересчете на катехин. В экстрактах листьев, собранных на более поздних стадиях развития, а также в водных экстрактах, содержание полифенолов ниже. Методом ВЭЖХ были идентифицированы: хлорогеновая кислота (22,8 мг/г в «молодых» листьях, 10,8 мг/г - в «старых»), п-кумаровая кислота (0,3 мг/г и 0,1 мг/г), рутин (4,1 мг/г и 2,9 мг/г). Содержание хлорофиллов а и b и каротиноидов в более «взрослых» листьях незначительно выше и составляет для «молодых» листьев (спиртовой экстракт) 41,72 мг/г, 11,2 мг/г и 9,36 мг/г, соответственно, а для «старых» – 48,4 мг/г, 11,68 мг/г и 9,88 мг/г [223].

В листьях рябины черноплодной, собранных в Румынии, методом ВЭТСХ были обнаружены производные кверцетина, включая рутин, гиперозид, изокверцетин, кверцетин-3-О-арабиногликопиранозид; хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты, кемпферол [218].

Согласно исследованиям сербских ученых А. Szopa и соавторов методом ЖХ-ДАД-ESI-МС были выявлены цианидин-3-галактозид и цианидин-3-арабинозид, первый из которых находился в преобладающем количестве. Методом ЖХ-ДАД исследовали флавоноиды и фенольные кислоты, среди которых были найдены агликон кверцетин и два гликозида – кверцитрин и рутин, оксикоричные кислоты: хлорогеновая, 3,4-дигидроксифенилуксусная, неохлорогеновая и протокатеховая кислоты [176].

При исследовании методом ВЭЖХ-МС/МС экстрактов из листьев рябины черноплодной, собранных через 2 недели, 2 и 4 месяца после распускания, обнаружены 12 полифенолов: кофеилхинная кислота (2 изомера), апигенин 7,4-ди-О-рамнозид, кверцетин (вицианозид, глюкозид, рутинозид, рамнозилгексозид и дирамнозилгексозид), кемпферол, изорамнетин рамнозилгексозид (2 изомера), дикофеилхинная кислота. Содержание каждого компонента было максимальным в двухнедельных листьях, а на дальнейших стадиях снижалось [180].

Чешские ученые А. Svetanović и соавторы в сравнительных исследованиях плодов, стеблей и листьев аронии Мичурина сорта «Неро» показали, что содержание флавоноидов и фенолов выше в листьях: количество фенолов составляло 131,53 мг/г, 49,96 мг/г и 13,88 мг/г в пересчете на катехин, а флавоноидов – 88,64 мг/г, 25,10 мг/г и 10,00 мг/г в пересчете на рутин для листьев, стеблей и плодов соответственно. Полифенольный профиль листьев и плодов, определенный методом ВЭЖХ-ДАД, включал: гидроксibenзойную, кофейную, ванильную, хлорогеновую, сирийскую, п-кумаровую, феруловую, синаповую, розмариновую кислоты, рутин, кверцетин, лютеолин, нарингенин, кемпферол, апигенин. В стеблях присутствовала протокатехиновая кислота и отсутствовала ванильная [177].

Украинскими учеными В.А. Самойловой и В.М. Ковалевым определен аминокислотный состав листьев рябины черноплодной: в свободном и связанном виде в листьях аронии содержатся аминокислоты аспарагиновая и глутаминовая кислоты, 4-гидроксипролин, серин, глицин, треонин, аланин, цистеин, пролин, гамма-аминомасляная кислота, валин, метионин, изолейцин, лейцин,

фенилаланин, гистидин, лизин. Только в свободном виде были обнаружены аспарагин, глутамин, аргинин, цистин, а только в связанном – тирозин [117].

При исследовании летучих веществ, содержащихся в листьях и почках рябины черноплодной, а также в водном и спиртовом экстракте листьев, методом хромато-масс-спектрометрии было установлено, что наиболее богаты летучими веществами почки, которые содержат 34 компонента, из которых преобладающими являются душистые вещества, например, бензальдегид, бензилбензоат, эвгенол и др. На втором месте по количеству летучих веществ находился водный экстракт – 32 компонента, на третьем – листья (30 компонентов) и на четвертом – спиртовой экстракт (25 компонентов). Во всех образцах были обнаружены пальмитиновая, олеиновая, миристиновая, пальмитолеиновая, пентадекановая и лауриновая кислоты, сквален, эвгенол, нонаналь и 2-метокси-4-винилфенол [43].

Учеными Воронежского государственного университета качественно выявлено присутствие в листьях рябины черноплодной дубильных веществ, флавоноидов, в том числе, антоцианов, сапонинов, полисахаридов, аскорбиновой кислоты. Максимальное содержание антоцианов было обнаружено в начале цветения, а флавоноидов – до бутонизации [21, 37, 38].

1.5. Фармакологическая активность и медицинское применение представителей рода Арония

Согласно литературным данным, виды фармакологической активности и возможные направления медицинского применения листьев и плодов представителей рода аронии сходны.

1.5.1. Фармакологическая активность и медицинское применение плодов

В плане фармакологической активности плоды также наиболее изучены в сравнении с остальными частями растения. В различных исследованиях было

установлено наличие антимуtagenного, антиканцерогенного, кардиопротекторного, антиагрегантного, гепатопротекторного, гастропротекторного, антидиабетического, противовоспалительного, антибактериального, противовирусного, радиопротекторного, иммуномодулирующего действия, а также способность снижать уровень липидов и артериальное давление. При этом токсического действия при применении плодов аронии, а также сока и экстрактов из них не наблюдалось [13].

Не все результаты, полученные *in vitro* могут проявляться *in vivo*, так как антоцианы чувствительны к перевариванию в кишечнике, которое влияет на их биодоступность. Однако встречаются данные, что на самом деле биодоступность антоцианов, точнее их метаболитов, достаточно высокая, и именно эти метаболиты воздействуют на организм человека, но зафиксировать эти метаболиты в настоящее время так и не удалось [161, 198].

Наибольшее количество исследований направлено на изучение антиоксидантного действия плодов аронии. Исследования *in vitro* проводились методами с использованием радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH), 2,2'-азино-бис-[3-этилбензтиазолин сульфат] (ABTS), а также анализ, основанный на восстановлении трехвалентного железа (FRAP). В сравнительных исследованиях антиоксидантного действия экстракты рябины черноплодной проявляли более сильную активность, чем экстракты плодов черники, клюквы, брусники, черной и красной смородины, крыжовника, бузины, ежевики, малины, земляники. При исследованиях *in vivo* на крысах было показано, что часто антиоксидантное действие сочетается с другими видами фармакологической активности. Например, экстракты аронии снижают окислительный стресс [161, 176, 177, 198].

Немецкими учеными под руководством Т. Bakuradze было определено, что употребление пищевой добавки на основе сока аронии, соответствующей 80 мг общего количества антоцианов в день, в течение четырех или восьми недель оказывает антиоксидантное действие на организм, незначительно снижая количество разрывов цепи ДНК, индуцированных перекисью водорода [182].

За счет антиоксидантного действия гликозидов цианидина проявляется нефропротекторный эффект при острой почечной недостаточности [222].

Для плодов аронии и полученных из них препаратов отмечается противовоспалительная активность. Сок рябины черноплодной приводил к уменьшению отека лап крыс, вызванного гистамином и серотонином [198].

При *in vitro* исследовании влияния экстракта на линию клеток мышинных макрофагов RAW 264.7 было выявлено, что противовоспалительный эффект обусловлен прямым блокированием экспрессии генов синтазы оксида азота, циклооксигеназы-2 [161]. Так же было показано влияние на экспрессию генов интерлейкина-8. Эффективность экстракта рябины черноплодной была выше, чем у экстрактов других растений: брусника, малина, семена винограда, выжимка винограда, зеленый чай, женьшень, иван-чай, кофе [45]. Противовоспалительный эффект экстрактов усиливается при добавлении к ним селена [174].

Martin A. D. и соавторы показали, что влияние экстракта аронии на выделение интерлейкинов, вероятнее всего, связано с активностью кверцетина и цианидин-3-арабинозида, а не с действием основных полифенолов – рутина и цианидин-3-галактозида [160].

Положительное влияние аронии оказывает на сердечно-сосудистую систему, снижая риски сердечно-сосудистых заболеваний. Так при приеме экстракта плодов людьми с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний наблюдалось ингибирование агрегации тромбоцитов и снижение выделения супероксида [185].

Сок аронии Мичурина способен снижать артериальное давление. Данный эффект выражен недостаточно для использования сока при гипертензии, однако препараты аронии могут входить в состав диетического питания при артериальной гипертензии для профилактики кардиоваскулярных осложнений. Эффект наблюдается с первого дня приема препаратов [15, 179].

Экстракт плодов аронии способен вызывать дозозависимый вазодилатирующий эффект, причем он выше, чем у экстракта плодов черники. Так как оба вида растительного сырья богаты антоцианами и подбиралась

дозировка экстрактов с равным содержанием суммы антоцианов, предполагается, что данный эффект зависит от комбинации антоцианов, присутствующих в исследуемом материале [163, 166].

Рядом исследований показано, что применение сока плодов аронии у крыс приводит к снижению уровня общего холестерина, липопротеидов низкой плотности, триглицеридов, а также глюкозы, гомоцистеина и фибриногена, что приводит к снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний. Влияние сока на уровень липопротеидов высокой плотности однозначно не доказан, хотя встречаются данные о повышении их уровня в плазме крови [159, 167, 207, 217].

В работе M. Cіosoіu показано, что кардиопротективный эффект усиливается при комбинации полифенольного экстракта плодов аронии с алискиреном [206].

В работе китайских ученых Zhao Y. и др. обнаружена способность полисахаридов плодов аронии улучшать пространственное обучение и память стареющих мышей. Анализ 16 S рДНК показал, что экстракт плодов значительно замедляет процесс старения мозга путем ингибирования воспаления и регулирования состава кишечной микрофлоры [164].

Антоцианы из сока плодов аронии способны проявлять и гепатопротективное действие, ингибируя повышение уровня аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и перекисное окисление липидов. Эти эффекты непосредственно связаны с антиоксидантным действием антоцианов [192].

В *in vitro* и *in vivo* исследованиях показано, что смесь экстрактов аронии и амброзии способна защищать печень от алкоголь-индуцированных повреждений, повышая метаболизм алкоголя, активизируя антиоксидантную систему и снижая воспалительную реакцию [208].

В работе [183] показано, что сок аронии способен повышать уровень адипонектина, который в свою очередь улучшает чувствительность клеток к инсулину. Однако разницы в уровне глюкозы и инсулина в данном исследовании не наблюдалось.

В работе японских ученых показано, что антиоксидантное действие обеспечивает противоязвенный эффект от применения экстракта плодов рябины черноплодной, а также фракции из этого экстракта, содержащей только антоцианы. Предположительно эффект связан со способностью антоцианов поглощать активный кислород, который служил повреждающим фактором в проводимом исследовании. Влияние на секрецию соляной кислоты в желудке отсутствует [189].

Сок плодов рябины черноплодной оказывает гастропротективное действие у крыс при повреждении слизистой оболочки желудка нестероидными противовоспалительными средствами (индометацин) [184].

В работах [186, 190, 221] показано положительное влияние экстрактов аронии на формирование микрофлоры кишечника. Антоцианы аронии способствуют росту *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Faecalibacterium* и ингибируют рост *Prevotella*, *Megamonas*, *Escherichia/Shigella*. Этот эффект использовали, например, для лечения вызванных липополисахаридами заболеваний печени у крыс.

В различных исследованиях показано влияние продуктов, полученных из плодов аронии, на иммунитет, а также указывается на наличие антибактериального и противовирусного эффектов.

Пропиленгликолиевые экстракты плодов аронии способствуют повышению иммунитета, нормализуя количество лейкоцитов, улучшая показатели моноцитов и нейтрофилов [209].

В Германии запатентован экстракт из кожуры плодов разных видов аронии для лечения бактериальных, микотических и/или воспалительных заболеваний, для консервирования продуктов питания, а также для использования композиций, содержащих такой экстракт в качестве антибактериального и противогрибкового покрытия протезов и имплантов [204].

Употребление плодов рябины черноплодной повышает уровень интерлейкина-10 в толстом кишечнике у здоровых мышей. Было показано влияние экстракта аронии на увеличение образования Т-клеток при язвенном колите. Это обуславливает антиколитический эффект [162, 181]. Часто

встречается информация о проявлении у антоцианов антимуtagenного действия *in vitro*. Экстракт из плодов аронии способен ингибировать рост HT29 клеток колоректальной аденокарциномы, при этом обладают более выраженным химиопрофилактическим действием, чем другие источники антоцианов, такие как виноград и черника, фиолетовая морковь, бузина [214]. Значительно увеличилась выживаемость крыс с экспериментально вызванной лучевой болезнью, если их кормили экстрактом аронии. Было замечено, что антоцианы препятствуют снижению уровня лейкоцитов [215, 216]. Гели, содержащие антоцианы рябины черноплодной, защищали кожу от ультрафиолетового излучения, предотвращая рак кожи [165]. Изучалось влияние экстракта аронии у женщин, больных раком молочной железы, во время лучевой терапии. Прием экстрактов в сочетании с яблочным пектином приводил к увеличению количества CD4, CD8 и Т-клеток по сравнению с контрольной группой [188].

На Украине проводили ряд исследований фармакологической активности криоактивированного порошка, полученного из плодов рябины черноплодной. Испытания проводились на крысах *in vivo*. Показано, что применение такого порошка в дозе 258 мг/кг на протяжении 10 дней приводит к снижению перекисного окисления липидов при токсическом гепатите. Кроме того, при гепатите, вызванном CCl₄, криоактивированный порошок ингибирует апоптоз. В условиях гипокинетического стресса снижение уровня перекисного окисления белков и липидов наблюдалось при применении 149 мг/кг порошка аронии, длительность приема также составляла 10 дней [110, 115].

1.5.2. Фармакологическая активность и медицинское применение листьев

Листья, как и плоды, в первую очередь рассматривают в качестве антиоксидантов. Большинство существующих исследований направлены на подтверждение именно этого эффекта. Однако так же было показано наличие противомикробного, противогрибкового, противоракового действий.

Показано наличие у экстракта из листьев рябины черноплодной антиоксидантного действия. Особенности проявления этого эффекта позволяют предположить, что механизм его носит сложный характер [80].

Антиоксидантное действие обнаруживается как *in vitro*, так и *in vivo*. Среди методов *in vitro* использовали метод DPPH, ABTS связыванием радикалов, супероксид анионным связыванием, а также определением восстановительной способности, Fe^{3+} до Fe^{2+} . Для большинства методов анализа показана зависимость антиоксидантного действия от концентрации экстрактов [176].

Экстракт из листьев в концентрации 5 мг эквивалента галловой кислоты в 1 мл при использовании метода DPPH показал более высокую активность, чем стандарты – рутин и галловая кислота [218].

При сравнительном анализе антиоксидантной активности листьев и плодов рябины черноплодной методами DPPH и FRAP, активность листьев была выше и увеличивалась с возрастом листьев [180, 223].

Исследования *in vivo* при нанесении экстракта на поврежденную кожу кроликов показали хорошую переносимость экстракта и получение здорового, эластичного, реэпителизированного кожного покрова [218].

При сравнительном анализе антиоксидантной активности плодов, листьев и стеблей рябины черноплодной было показано, что при проведении исследования методом DPPH наиболее высокой активностью обладают листья, а при исследовании методом ABTS – плоды. При исследовании ингибирования перекисного окисления липидов активность уменьшалась в ряду стебли, листья, ягоды. Ингибирующее действие против ацетилхолинэстеразы выше у плодов, чем у листьев и стеблей, а против бутирилхолинэстеразы проявляется только у плодов. Экстракты из всех частей растения способны ингибировать эластазу. Активность уменьшалась в ряду плоды, стебли, листья.

Экстракты плодов и листьев проявляли цитотоксическую активность против злокачественных клеточных линий A-549, LS-174T и HeLa и нормальных легочных фибробластов MRC5, при этом наиболее высокую активность проявили листья. При исследовании экстрактов на антибактериальную и противогрибковую

активность было показано, что она проявляется против штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* и грибов *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Наиболее устойчивым оказался штамм *Klebsiella pneumonia*, а наиболее чувствительным - *Proteus mirabilis*. Наибольшая антимикробная активность была отмечена у экстракта стеблей [177].

Было показано, что экстракт листьев аронии черноплодной оказывает антибактериальное действие путем ингибирования синтеза ДНК в бактериальных клетках, а также путем повреждения клеточной стенки [158].

Предложено получение сухого экстракта из листьев, полученного путем экстракции криопорошка листьев кипящим 80% этиловым спиртом с последующим выделением проантоцианидинов и мономерных флавоноидов смесью этилацетат : этанол = 8:2. Такой экстракт обладает антиоксидантной активностью и способностью оказывать ингибирующее действие на все этапы перекисного окисления липидов в печени [83].

Была обнаружена антилейкемическая активность экстракта из листьев рябины черноплодной против чувствительной клеточной линии HL60, а также против множественно лекарственно устойчивых HL60/VINC и HL60/DOX. При этом активность не зависит от общего содержания фенолов, так как эффективность аронии была выше, чем у шелковицы, для которой было определено более высокое содержание фенольных соединений [194].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературы показал, что опубликованные на данный момент материалы по листьям аронии Мичурина недостаточны и отрывочны. В ряде источников перепутаны видовые названия и указан вид аронии черноплодной, хотя анализу подвергались сорта аронии Мичурина. Отмечено, что плоды аронии Мичурина более изучены.

2. Листья данного ценного лекарственного растения в настоящее время мало изучены и являются побочным продуктом при заготовке плодов. Однако могут

представлять собой, по данным литературы, перспективный источник фенольных соединений (флавоноидов и дубильных веществ). Данные БАВ могут быть выбраны в качестве целевых для стандартизации этого ЛРС и получаемых в перспективе ЛРП на его основе.

3. Обоснована перспективность дальнейших исследований листьев аронии Мичурина как источника фенольных соединений, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной, гепатопротекторной и другими видами активности.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Описание объекта исследования

В качестве объектов исследования использовали листья аронии Мичурина сорта «Мулатка», заготовленные в сухую погоду в мае-сентябре 2019-2023 гг. от растений, культивируемых на территории ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» (г. Мичуринск, Тамбовской области). Принадлежность образца к роду *Aronia*, виду *Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul подтверждена сотрудниками научного центра имени И.В. Мичурина (Приложение 5). В литературе не было найдено данных, четко разделяющих фенофазы аронии Мичурина. Стадии для заготовки сырья были выбраны по наиболее примечательным признакам изменения растения: цветение (май), массовое начало плодоношения (июнь), полная зрелость плодов (август), начало покраснения листьев (сентябрь). Заготовку проводили в сухую погоду. Растительное сырье высушивали воздушно-теневым способом, раскладывая его тонким слоем и часто переворачивая. Высушенные листья хранили в цельном виде в пергаментной бумаге не более 2 лет.

2.2. Макро- и микроскопическое исследование

Макро- и микроскопический анализ проводили по общепринятым методикам [5]. Изучение характеристик подлинности сырья (внешние и анатомические признаки) осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0003 «Листья» и ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ РФ XV [28, 29].

Описание внешних характеристик листьев аронии проводили с помощью стереомикроскопического анализа на микроскопе Биомед-2 (РФ). Люминесцентный анализ осуществляли с помощью микроскопа Микромед 3 ЛЮМ (Россия) с использованием голубого светофильтра. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (100 Вт). Пробоподготовка не использовалась.

Микроскопическое исследование сырья проводили с помощью микроскопа Биомед 6.0 (РФ) с увеличением $\times 40$, $\times 100$, $\times 400$. Визуализация диагностических признаков, определение их биометрических характеристик и микрофотографии выполнялись с помощью цифровой видеокамеры «Levenhuk» C310 NG (КНР) с программным обеспечением Top View ($\times 86$). Для проведения микроскопического исследования изучаемые объекты просветляли посредством кипячения на протяжении 3-5 минут в 5% растворе натрия гидроксида. Определение биометрических характеристик проводили для листьев с репродуктивных побегов с помощью окуляр-микрометра [28, 29].

Исследования растительных объектов методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) проводили после предварительного напыления тонкой металлической пленки золота на установке магнетронного типа с целью обеспечения проводимости. Исследование проводили с помощью растрового электронного микроскопа JSM-6380LV JEOL (Япония) с системой микроанализа INCA 250 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Для изучения петиолярной анатомии свежие черешки листьев аронии Мичурина консервировали в смеси «спирт этиловый 96% : вода очищенная : глицерин = 1:1:1». Исследование анатомо-диагностических признаков проводилось в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ РФ XV издания [28, 29]. Поперечный срез проводился в базальной, медиальной и апикальной части черешка. Петиолярная анатомия проводилась на микроскопе Биомед 6 (Россия) с применением видеокамеры Levenhuk C310 NG (КНР) и программным обеспечением Top View ($\times 86$). Срезы обрабатывались раствором флороглюцина и кислоты серной 25% для окрашивания проводящих пучков.

2.3. Определение элементного состава

Полный макро-, микро- и ультрамикроэлементный анализ состава изучаемого сырья (стадия начала покраснения листьев) проводили в сравнении с

почвой. Одновременно со сбором сырья проводился отбор почвы с места произрастания. Профильные образцы отбирались из четырех вертикальных колонок шириной 10 см, расположенных попарно на противоположных боковых стенках разреза таким образом, чтобы расстояние между ними составляло 1 м. Изучение элементного состава образцов проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) с индуктивно связанной плазмой («ELAN-DRC», США), для чего предварительно проводилась пробоподготовка - кислотное разложение образца с использованием микроволнового излучения. Рабочие стандартные растворы (контроль правильности измерений осуществлялся методом добавок) готовили путем смешивания нескольких опорных многоэлементных стандартных растворов для масс-спектрометрии («Perkin-Elmer») или аналогичные, содержащие разные группы элементов. Для анализа почв использовали следующие референс-стандарты: почва дерновоподзолистая ГСО 5360-90, ООКО-153, почва дерновоподзолистая супесчаная ГСО 2498-83-2500-83, СДПС-1, СДПС-2, СДПС-3. Для анализа измельченных высушенных листьев: ГСО состава травосмеси (Тр-1), ГСО 8922-2007, ГСО состава элодеи канадской (ЗК-1), ГСО 8921-2007, ГСО состава листа березы (ЛБ-1), ГСО 8923-2007 [74, 140].

2.4. Определение радионуклидов

Исследование содержания радионуклидов проводили на базе ФГБУ «Россельхозцентр» по методикам ГОСТ 32161-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия ^{137}Cs » и ГОСТ 32163-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция ^{90}Sr ».

2.5. Определение товароведческих показателей

Определение фармакопейных показателей качества таких, как зола общая и зола нерастворимая в 10%-ной хлористоводородной кислоте и влажность проводили в соответствии с методиками, изложенными в ГФ РФ XV: ОФС 1.5.3.0004 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая»; ОФС 1.5.3.0005 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»; ОФС 1.5.3.0007 «Определение влажности

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [28, 29].

2.6. Определение суммы экстрактивных веществ

Определение экстрактивных веществ проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [28, 29]. В качестве экстрагентов использовали растворители: вода очищенная, спирт этиловый 40%, 70% и 96%, гексан, ацетон, кислота хлористоводородная разведенная, раствор аммиака 0,25% (х.ч., ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург, Россия).

2.7. Качественный анализ БАВ

Для определения качественного состава готовили водные и водно-спиртовые извлечения из исследуемых образцов по общепринятым методикам.

Для получения водных извлечений 1,0 г измельченного в лабораторном измельчителе до размера частиц не более 2 мм воздушно-сухого сырья заливали 30 мл воды очищенной и настаивали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное водное извлечение фильтровали. Водные извлечения использовали для определения полисахаридов, водорастворимых сапонинов, алкалоидов, дубильных веществ и органических кислот. Водно-спиртовые извлечения получали в том же соотношении экстракцией 70% - ным этанолом. После охлаждения и фильтрования использовали для обнаружения спирторастворимых сапонинов, флавоноидов и антоцианов.

Качественное определение отдельных групп БАВ в листьях аронии Мичурина проводили с использованием общепринятых качественных реакций [142]. Обнаружение аскорбиновой кислоты проводили по реакциям с калия перманганатом и железа сульфатом (II). Наличие полисахаридов устанавливали с помощью реакции осаждения слизи этанолом, реакциям с раствором аммиака и с хлористоводородной кислотой. Дубильные вещества обнаруживали с помощью реакций с солями алкалоидов, калия бихроматом, железоаммонийными квасцами,

с ацетатом свинца в уксусно-кислой среде, с нитритом натрия, раствором ванилина и реакции Стиасни. Флавоноиды определяли с помощью цианидиновой пробы, реакции с хлоридом алюминия, хлоридом железа (III), раствором аммиака, ацетата свинца. Обнаружение сапонинов проводили с помощью реакций пенообразования, с растворами ацетата свинца и бария хлорида, а также с раствором концентрированной серной кислоты. Наличие алкалоидов устанавливали с помощью реактивов Драгендорфа и Марме, с раствором пикриновой кислоты.

Реакция на цианиды. Отфильтрованный водный настой (сутки настаивания) измельченных листьев перегоняли под вакуумом и использовали для проведения реакции. Качественную реакцию проводили с первыми порциями полученного дистиллята. Для этого к 5 мл полученного дистиллята прибавляли 2 капли насыщенного раствора сульфата железа (II) и раствор хлорид железа (III), затем две капли хлористоводородной кислоты. При этом не должно наблюдаться синего окрашивания в пробирке ни сразу, ни через 24 часа.

Дополнительное обнаружение флавоноидов и разделение комплекса антоцианов проводили методом тонкослойной хроматографии. Использовались пластины Sorbifil-ПТСХ-АФ-А-УФ и Sorbifil-ПТСХ-АФ-А (Россия).

Для получения хроматографических профилей флавоноидов использовали извлечение (соотношение 1:50), полученное путем настаивания с 70% этиловым спиртом в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Извлечение комплекса лейкоантоцианов в форме собственно антоцианов проводили по разработанной и описанной в работе методике.

В качестве стандарта использовали 0,1% стандартный раствор рутина (Acros Organics, Бельгия, степень чистоты $\geq 97\%$).

Для нанесения проб и получения хроматограмм использовали микрошприц МШ-10, пластины Sorbifil (Россия) нескольких типов и размеров, различные способы хроматографирования, элюенты и детектирующие реагенты, рекомендуемые литературными источниками [78, 79, 124].

2.8. Изучение профиля БАВ методом ГХ-МС

Для определения качественного и количественного состава летучих БАВ использовали ГХ-МС. Извлечение готовили по методике ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [28, 29]. Экстрагент – спирт этиловый 96%. Работу проводили на газовом хроматографе Agilent 7890B/5977A (США) (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

2.9. Количественное определение БАВ

УФ-спектры для изучаемых объектов были получены с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Россия) в требуемых диапазонах длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см относительно растворов сравнения.

Количественное определение флавоноидов, дубильных веществ и антоцианов проводили по разработанным и валидированным методикам (с учетом влияния таких параметров, как степень измельченности, время и кратность экстракции, соотношение сырья и экстрагента, оптимального объема добавляемых реактивов и их соотношения, а также времени измерения физико-химических величин извлечений и СО и т.д.).

Определение витаминов группы В проводили на базе испытательного лабораторного центра АНО «НТЦ Комбикорм» методом капиллярного электрофореза по методике, изложенной Н.К. Флоренской [138]. Определялось содержание витаминов В₁, В₂ и В₄.

Определение аминокислотного состава проводили на базе испытательного лабораторного центра АНО «НТЦ Комбикорм» методом капиллярного электрофореза по методике ГОСТ Р 55569-2013 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза» [26].

2.10. Изучение профиля ИК-спектров листьев аронии Мичурина

Изучение объектов исследования методом ИКС проведены с помощью научно-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ВГУ. ИК-спектры 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 (сам спектр (в шкале волновых чисел) получался после выполнения специальных математических расчетов над интерферограммой. Все функции по регистрации интерферограммы, преобразованию Фурье, управлению спектрометром и математической обработке спектров выполнялись программой OMNIC). Спектры НПВО получали на стандартной приставке с горизонтальным расположением элемента и устройством поджатия порошкообразных проб, что позволяло получать хорошо выраженные спектры при полном контакте образца со всей рабочей поверхностью кристалла. Кратность эксперимента для одной фазы заготовки каждого объекта исследования составляла не менее 3-х измерений.

2.11. Изучение фармакологического действия листьев аронии Мичурина

Прогноз основных видов фармакологической активности *in silico* проводили с использованием платформы PassOnline и Phyto4Health [219, 220]. Оценивали значения P_a – вероятность наличия фармакологической активности/побочного эффекта, считая результат значимым при показателе >0.7 ; P_i – вероятность отсутствия фармакологической активности/побочного эффекта. Если $P_a > P_i$ – оцениваемый эффект присутствует с большой долей вероятности. В качестве исследуемых БАВ были выбраны идентифицированные согласно литературным данным флавоноиды, входящие в состав листьев аронии Мичурина [177], а также катехин и цианидин.

Определение антиокислительной активности водных и спиртовых извлечений проводили по методике Максимовой Т.В. [82]. Извлечения готовили по методике ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»

[28, 29]. В качестве экстрагентов использовались: вода очищенная, спирт этиловый 40%, 60%, 70%, 96%.

Для изучения биостимулирующего действия отвара листьев аронии Мичурина использовали *in vitro* тест-систему инфузорий *Paramecium caudatum* в стационарной фазе роста, культивируемая согласно известной методике [123] на среде Лозина-Лозинского. При проведении исследований учитывали требования действующих руководств по доклиническим исследованиям [113]. Тест «функциональная нагрузка» с использованием *in vitro* тест-системы инфузорий вида инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum*) [123] предназначен для выявления влияния изучаемых веществ на выживаемость тест-системы при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида (NaCl), что позволяет оценить наличие биоцидного, биостимулирующего и/или мембранопротекторного действия. Культура инфузорий *Paramecium caudatum* получена на кафедре фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ВГУ. Средой для культивирования инфузорий являлся раствор Лозина-Лозинского следующего состава: NaCl, KCl, CaCl₂ 2-водный, MgCl₂ 6-водный, NaHCO₃. Рабочий раствор готовили путем разбавления в 10 раз (1:9) концентрированной среды дистиллированной водой [123]. Культивирование инфузорий осуществляли в термостате (ТС-1/80 СПУ, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 21±1°C при 10 часовом искусственном освещении. Для проведения эксперимента использовали 7-ми дневную культуру в стационарной фазе роста. Для нормирования начального состояния тест-системы культуру промывали раствором Лозина-Лозинского и затем проводили синхронизацию культуры инфузорий посредством метода тепловых шоков. Для этого культур нагревали на водяной бани до +35°C и быстро остужали в воде со льдом до +5°C, повторяя данную процедуру 3 раза. После этого инкубировали в течении двух суток в термостате в чистой среде. Для эксперимента использовали инфузорий, равномерно плавающих в объеме среды не осевших на дно пробирки [123]. В контрольные пробы никакие лекарственные вещества не вносили. В опытные пробы вносили изготовленный согласно требованиям ГФ [28, 29] отвар

листьев аронии Мичурина, заготовленных в различные периоды жизни листовой пластинки растения в течение 4 месяцев (май, июнь, август, сентябрь), для каждого из сроков заготовки ЛРС, отвар тестировали в 5 различных разведениях: 1:10, 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000. Для получения серии опытных проб, содержащих отвар листьев аронии Мичурина в различных разведениях, согласно известной методике, использовали метод последовательных разведений. Для этого брали 6 пробирок, в каждую вносили по 2,7 мл культуры инфузорий. В первую пробирку добавляли 0,3 мл отвара листьев аронии Мичурина, изготовленного согласно требованиям ГФ [28, 29]. Затем из нее отбирали 0,3 мл среды и вносили в следующую и так далее, достигая, таким образом, серийного разведения исследуемого объекта.

Оценку биостимулирующего и мембранопротекторного действия изучаемого отвара при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида проводили по известной методике [123]. Сначала опытным путем определяли количество раствора 10% натрия хлорида, которое вызывало гибель 100% инфузорий в течении 4 мин. Для этого 0,1 мл среды, содержащей инфузории, наносили на предметное стекло, добавляли натрия хлорид в определенном объеме и засекали время до момента гибели всех инфузорий в пробе (критерий оценки – время выживаемости инфузорий, сек.). Гибель инфузорий в пробе определяли визуально под микроскопом Levenhuk 5ST (Россия) при увеличении $\times 20$ по критерию полного прекращения движений. Изображение в режиме реального времени выводили на экран компьютера с помощью цифровой камеры для микроскопа Levenhuk M1000 PLUS (Россия) и программного обеспечения LevenhukLite (Россия).

Время выживаемости инфузорий (сек.) при повреждающем воздействии раствора натрия хлорида определяли сразу (0 мин, исходно) после добавления изучаемого отвара листьев аронии Мичурина в опытные пробы и затем при инкубации опытных проб с изучаемым отваром 60 мин, 120 мин и 24 ч.

Для получения статистически значимых результатов для каждой пробы в каждой серии опытов эксперимент повторяли трехкратно, математическую

обработку данных проводили общепринятыми методами медико-биологической статистики с определением средних значений, ошибки среднего и достоверности различий с использованием методов параметрической статистики.

2.12. Выбор оптимальных ЛФ

Для выбора оптимальной лекарственной формы получали настой, настойку и жидкий экстракт листьев аронии. Сырье измельчали до размеров частиц не более 2 мм. В качестве экстрагента при получении спиртосодержащих форм использовали спирт этиловый с концентрацией 60% как оптимальный для извлечения флавоноидов.

Отвар готовили в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары» для сырья, содержащего дубильные вещества в соотношении 1:10. Сырье с водой настаивали в инфундирке на водяной бане 30 мин при периодическом перемешивании. Готовое извлечение фильтровали через двойной слой марли с подложенным ватным тампоном без охлаждения, сырье отжимали. При необходимости объем доводили до требуемого водой очищенной. Коэффициент водопоглощения определяли на основании ОФС.1.5.3.0012 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья» [28, 29]. Коэффициент водопоглощения равен 2,2 мл/г.

Настойку готовили в соотношении 1:5. Настаивание проводили методом дробной мацерации в 4 этапа: на первом этапе настаивание проводили 48 часов, на втором и последующих – по 2 часа. Сырье отжимали, готовые извлечения объединяли и отстаивали в холодильнике 5 суток с последующей фильтрацией. При необходимости объем доводили до требуемого спиртом этиловым 60%.

Экстракт жидкий в соотношении 1:1 получали методом перколяции. Намачивание сырья проводили 4 часа, настаивание – 48 часов, перколяцию – 24 часа. Скорость перколяции 4 капли в минуту. Собирали две фракции извлечения: 85% от объема готового продукта и оставшееся извлечение. Вторую фракцию упаривали под вакуумом до недостающих 15% объема продукта. Готовый экстракт

отстаивали в холодильнике 5 суток с последующей фильтрацией. При необходимости объем доводили до требуемого спиртом этиловым 60%.

В готовых лекарственных формах проводили количественное определение флавоноидов и дубильных веществ, а также их выход по отношению к содержанию в растительном сырье по методикам. Проводили определение АОА лекарственных форм.

Стандартизацию лекарственных форм проводили по показателям «Описание», «Сухой остаток», «Спирт этиловый», «Плотность», «рН» «Тяжелые металлы» на основании требований ОФС.1.4.1.0019 «Настойки», ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты», ОФС.1.2.3.0034 «Определение спирта этилового в лекарственных средствах», ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия», ОФС.1.2.1.0014 «Плотность», ОФС.1.2.2.2.0012 «Тяжелые металлы» [28, 29].

2.13. Статистическая обработка результатов

Полученные результаты обрабатывали в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ XV изд. [28, 29] при использовании пакета прикладных программ обеспечения «Microsoft EXCEL» 2019 г. (компания-разработчик – Microsoft, США, версия 24.01).

2.14. Характеристика реактивов и материалов

В работе использованы реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

Для приготовления элюентов в ТСХ использовали растворители марки х.ч. и сорта «для хроматографии» (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

Приготовление реактивов, детектирующих реагентов, титрованных растворов проводили в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV-XV изданий из субстанций марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

2.15. Описание использованных стандартных образцов (СО)

В работе при идентификации и количественном определении различных групп БАВ изучаемого ЛРС использовали следующие СО, которые имели степень чистоты не менее 99%: Рутин (ЗАО «Вектон», СПб, Россия); -Катехин (Sigma-Aldrich, США).

2.16. Определение антимикробной активности спиртосодержащих лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина

Определение антимикробной активности образцов проводили в микробиологическом отделе КДЛ Клиник на базе ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ. Использованы тестовые культуры: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*. Исследование проводилось методом двойных серийных разведений в бульоне. 1 — разведение ЛФ в 2 раза, 2 — в 4 раза, 3 — в восемь раз, 4 — в шестнадцать, 5 - в тридцать два раза, 6 - в шестьдесят четыре раза, 7 - в сто двадцать восемь раз, 8 – в двести пятьдесят шесть раз, 9 – в пятьсот двенадцать раз, 10 – в одну тысячу двадцать четыре раза. Сравнение проводилось с данными по антимикробной активности использованного экстрагента, обладающего собственной антибактериальной активностью [27].

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛИСТЬЕВ АРОНИИ МИЧУРИНА

Важным этапом подтверждения подлинности растительного сырья является определение его анатомо-морфологических признаков. При изучении доступной отечественной и зарубежной литературы по теме настоящей работы подробных данных по исследованию анатомии и морфологии листьев не было найдено, в связи с чем определение подлинности листьев аронии Мичурина методами микроскопического анализа является актуальным. Кроме того, это является обязательной частью ФС на ЛРС.

3.1. Внешние признаки листьев аронии Мичурина

Определение внешних характеристик растительного сырья проводили на примере листьев фазы заготовки – сентябрь (так как именно она по результатам работы будет рекомендоваться к заготовке), посредством макроскопического анализа визуально, с помощью лупы (x10) и с помощью стереомикроскопа (x400) (Глава 2, п. 2). Также были определены биометрические показатели листовой пластинки (Рисунок 11).

Цельное сырье. 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.



Рисунок 11– Внешний вид листьев аронии Мичурина

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. При просматривании сквозь лупу (10х) измельченного сырья видны кусочки листовых пластинок с пильчатым краем и черешка, с волосками по нижней поверхности листа, бурыми железистыми волосками или их основаниями по жилке с верхней стороны листа. Цвет измельченного сырья от светло-зеленого до коричнево-зеленого. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вяжущий (Рисунок 12).



Рисунок 12 – Внешний вид измельченного сырья листьев аронии Мичурина

Порошок. Кусочки листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. При рассмотрении под лупой (10х) видны кусочки листовых пластинок и черешка с волосками по нижней поверхности листа. Цвет порошка от светло-зеленого до коричнево-зеленого. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вяжущий (Рисунок 13).



Рисунок 13 – Внешний вид порошка листьев аронии Мичурина

Более подробно изучение морфологии листа проводили с помощью стереомикроскопии, люминесцентной и растровой электронной микроскопии (Глава 2, п. 2) [97]. Анализу подвергали верхнюю и нижнюю стороны листа, а также черешки.

При стереомикроскопическом исследовании на нижней поверхности листа отмечены длинные тонкие волоски, преимущественно расположенные вдоль главной жилки (Рисунок 14). Люминесценция листовой пластинки в УФ-свете слабая, но отчетливо видна проводящая система (Рисунок 15). Очень яркое свечение имеют трихомы (Рисунок 16), в особенности места их прикрепления.

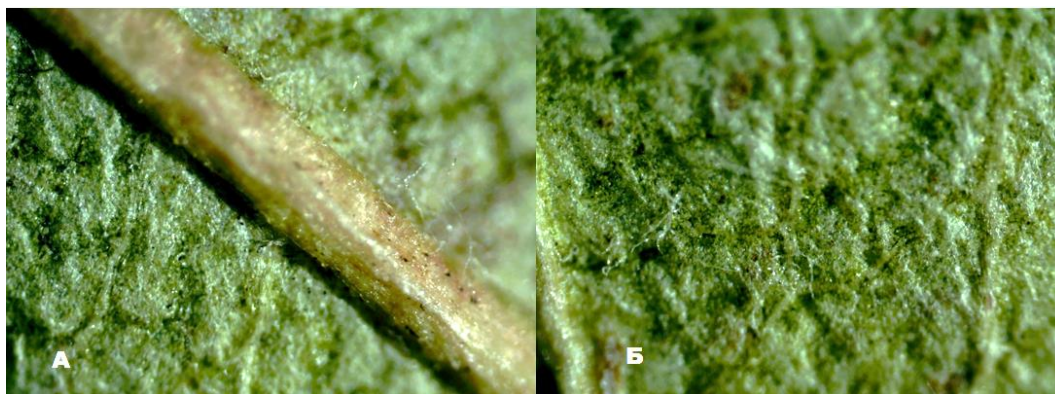


Рисунок 14 - Стереомикроскопическое исследование нижней поверхности листьев аронии Мичурина (x400): А – главная жилка, Б – поверхность листа

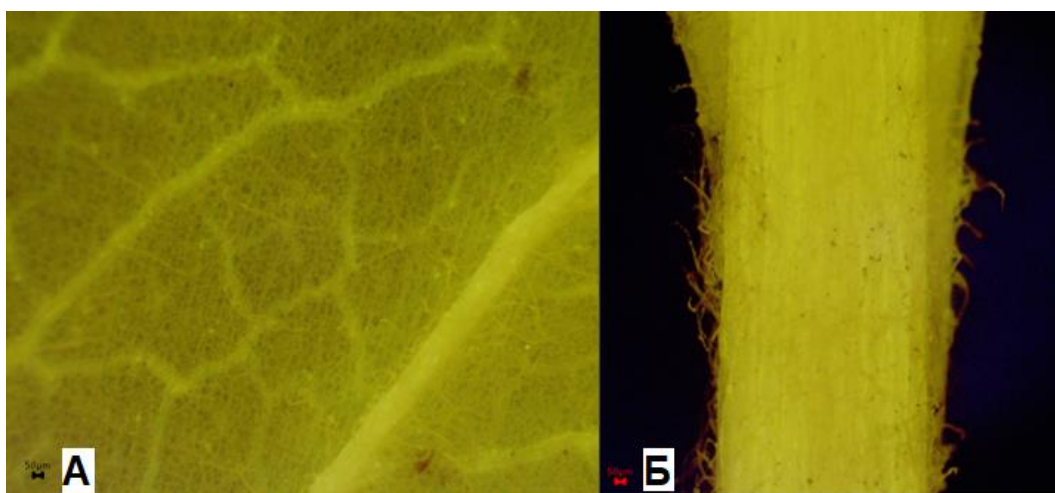


Рисунок 15 - Люминесцентная микроскопия нижней поверхности и черешка листа аронии Мичурина – А - проводящая система (x100), Б – черешок (x100)

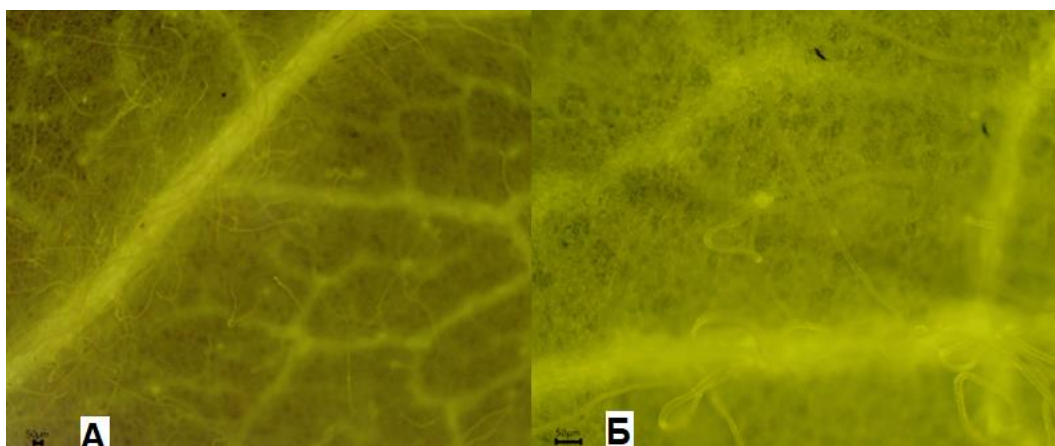


Рисунок 16 - Люминесцентная микроскопия нижней поверхности листа аронии Мичурина: А – волоски (x40), Б – волосок с местом прикрепления (x100)

На верхней поверхности листа вдоль главной жилки расположены темно-коричневые железистые волоски с многоклеточным светло-коричневым основанием (Рисунок 17).

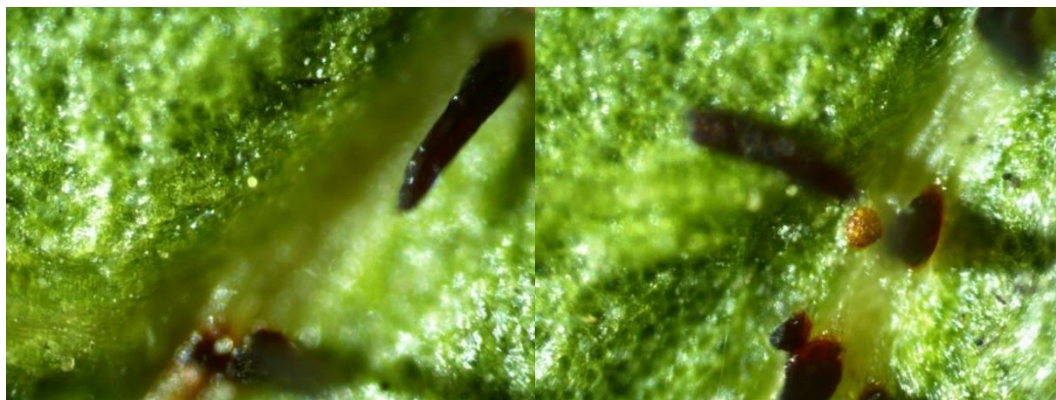


Рисунок 17 - Стереомикроскопическое исследование верхней поверхности листа вдоль главной жилки (x400): железистые волоски с многоклеточным основанием

На верхней поверхности листа люминесцируют кутикула и проводящая система. Наблюдаются отдельные ярко-люминесцирующие включения. Таким свечением могут обладать простые фенольные соединения, например, фрагменты дубильных веществ [65] (Рисунок 18). Места прикрепления трихом вдоль главной жилки и сами волоски не люминесцируют (Рисунок 19).

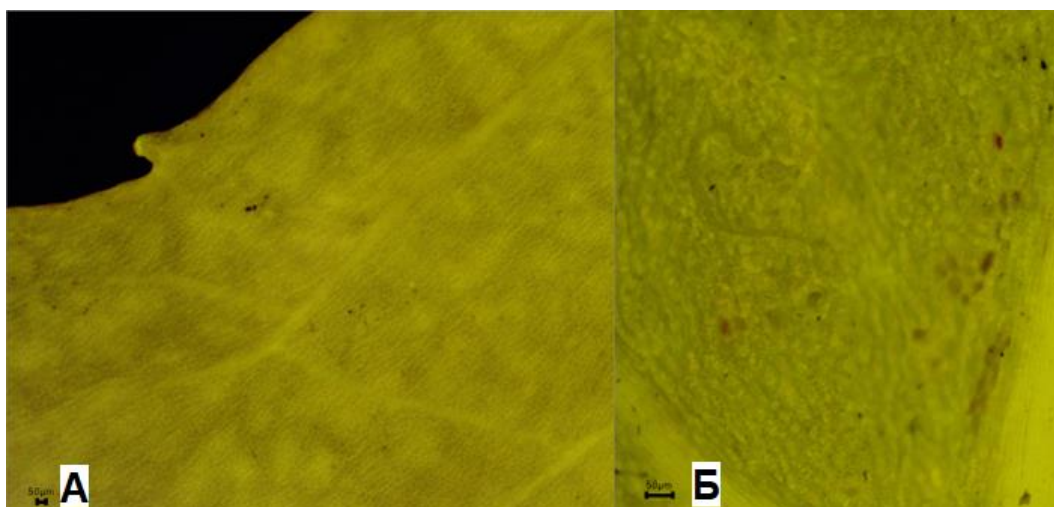


Рисунок 18 - Люминесцентная микроскопия верхней поверхности листа аронии Мичурина: А – край листовой пластинки (x40), Б – поверхность листовой пластинки (x100)

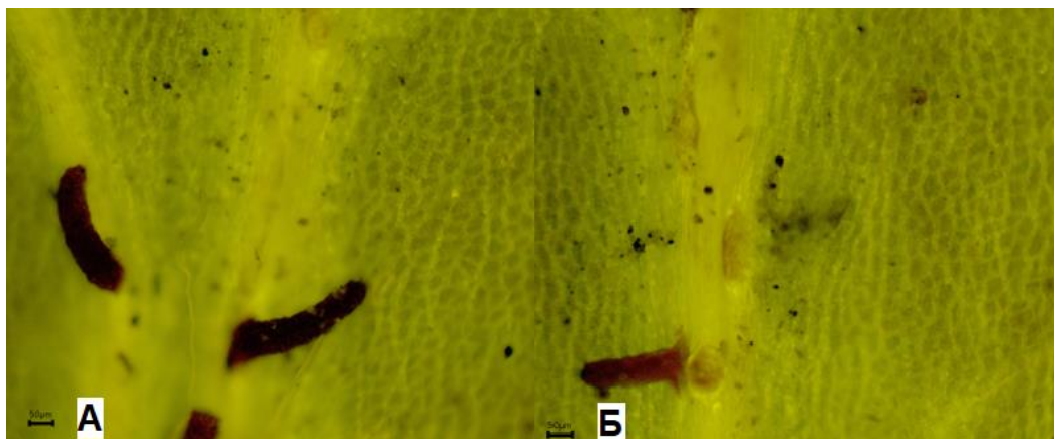


Рисунок 19 - Люминесцентная микроскопия верхней поверхности вдоль главной жилки листа аронии Мичурина (x100) – А – железистые волоски, Б – основания железистых волосков

3.2. Микроскопические признаки листьев аронии Мичурина

3.2.1. Изучение анатомических признаков листа аронии Мичурина (препарат листа с поверхности)

При проведении микроскопического исследования (Глава 2, п. 2) листьев аронии Мичурина были получены следующие результаты.

Цельное сырье, измельченное сырье. При рассмотрении листа с поверхности верхней части листовой пластинки можно отметить прямые, равномерные клетки эпидермиса пяти- или шестиугольной формы, заметна складчатость кутикулы (Рисунок 20).

Нижний эпидермис имеет более извилистые стенки. Устьица не погруженные, находятся в одной плоскости с эпидермисом, анизоцитного типа, окружены тремя околоустьичными клетками. Расположены на нижней стороне эпидермиса, овальные, средняя длина составляет $(36,58 \pm 2,16)$ мкм, средняя ширина – $(20,90 \pm 2,95)$ мкм. Количество устьиц на 1 мм^2 в среднем составляет 92,7 (Рисунок 21).

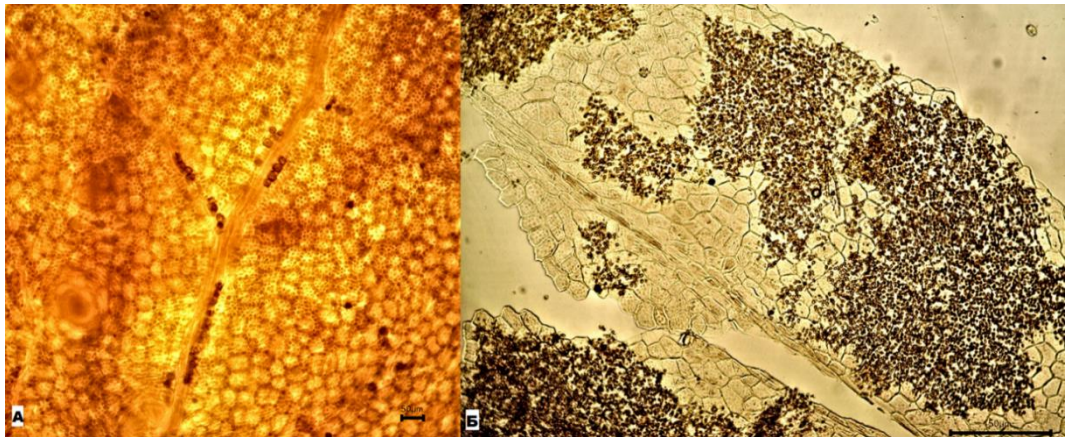


Рисунок 20 – Фрагменты верхнего эпидермиса листа: А – складчатость кутикулы эпидермиса (x100); Б – клетки эпидермиса (x400)

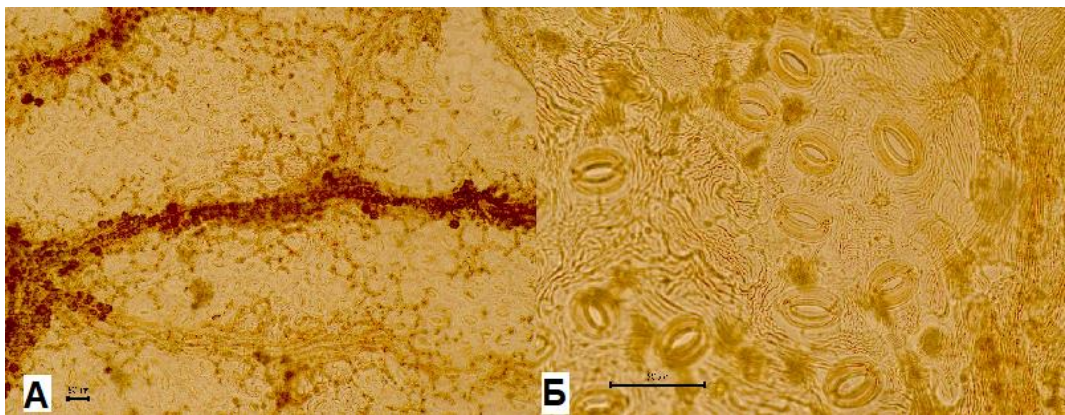


Рисунок 21 – Фрагменты нижнего эпидермиса листа: А – клетки эпидермиса с кристаллоносной обкладкой (x100); Б – устьица анизоцитного типа (x400)

Вдоль жилок хорошо заметна кристаллоносная обкладка. Кристаллы оксалата кальция ромбоэдрической формы, размером от 9,54 мкм до 21,50 мкм (Рисунок 21, А). В мезофилле листа видны отдельные друзы оксалата кальция. Друзы имеют шаровидную форму, диаметр их варьируется от 12,57 мкм до 25,98 мкм (Рисунок 22, А, Б). Частота встречаемости друз оксалата кальция в мезофилле листа – 25,5 на 1 мм².

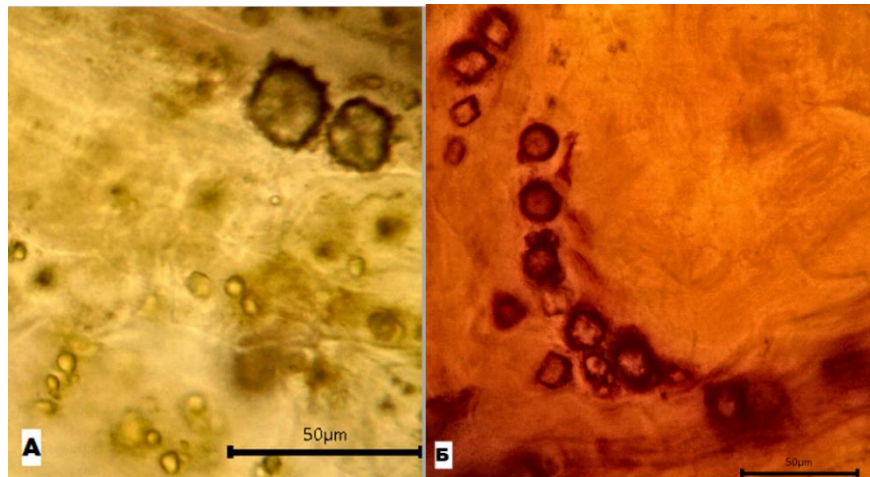


Рисунок 22 – Фрагменты эпидермиса листа: А, Б – друзы и кристаллы оксалата кальция (x400)

На нижней стороне листа встречаются простые одноклеточные конусовидные волоски, прямые или слегка изогнутые с гладкой поверхностью. Расположены также вдоль жилок, реже на остальной поверхности листовой пластинки. Длина одноклеточных волосков составляет около 172,33 мкм (Рисунок 23, А, Б) [101].

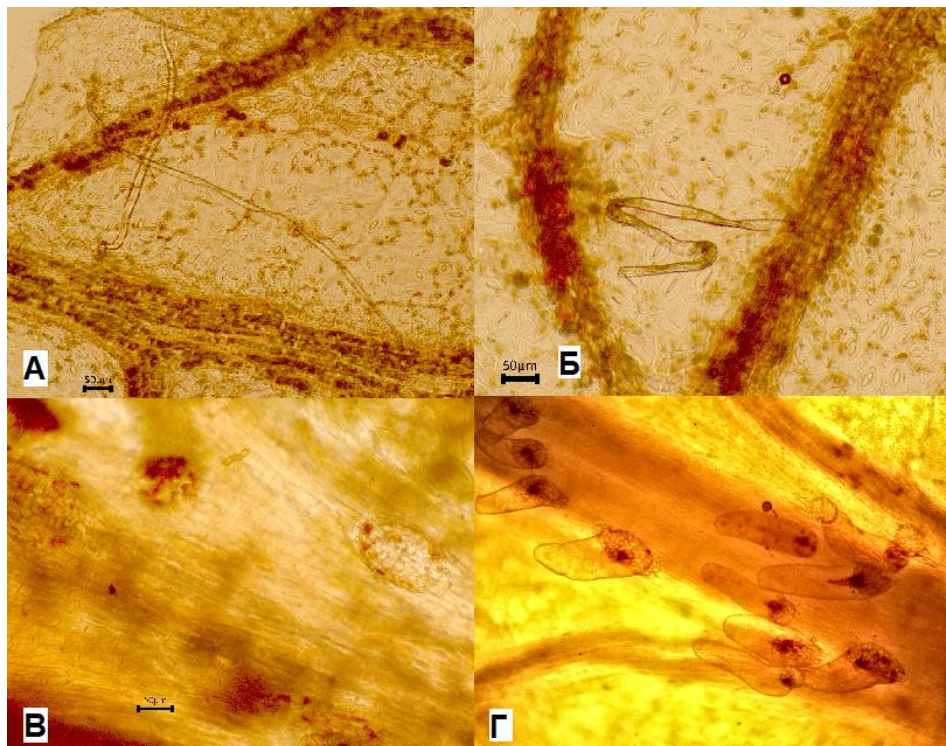


Рисунок 23 - Фрагменты эпидермиса листа: А, Б – простой одноклеточный волосок нижней поверхности листовой пластинки (x100), В – основание железистых волосков (x100), Г – одноклеточные железистые волоски с многоклеточным основанием (x100)

По верхней стороне листовой пластинки вдоль жилок расположены многочисленные железистые волоски, простые одноклеточные с многоклеточным основанием (подставкой из мелких эпидермальных клеток). У основания заметно красно-бурое окрашивание. Длина волосков от 190,68 мкм до 336,94 мкм (Рисунок 23, В, Г).

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка под микроскопом должны быть видны: фрагменты верхней поверхности листа с прямыми клетками пяти- или шестиугольной формы, фрагменты нижней поверхности листа с извилистыми клетками устьицами, фрагменты жилок с кристаллоносной обкладкой. На фрагментах нижней поверхности листа, а также отдельно встречаются простые одноклеточные волоски (Рисунок 24).

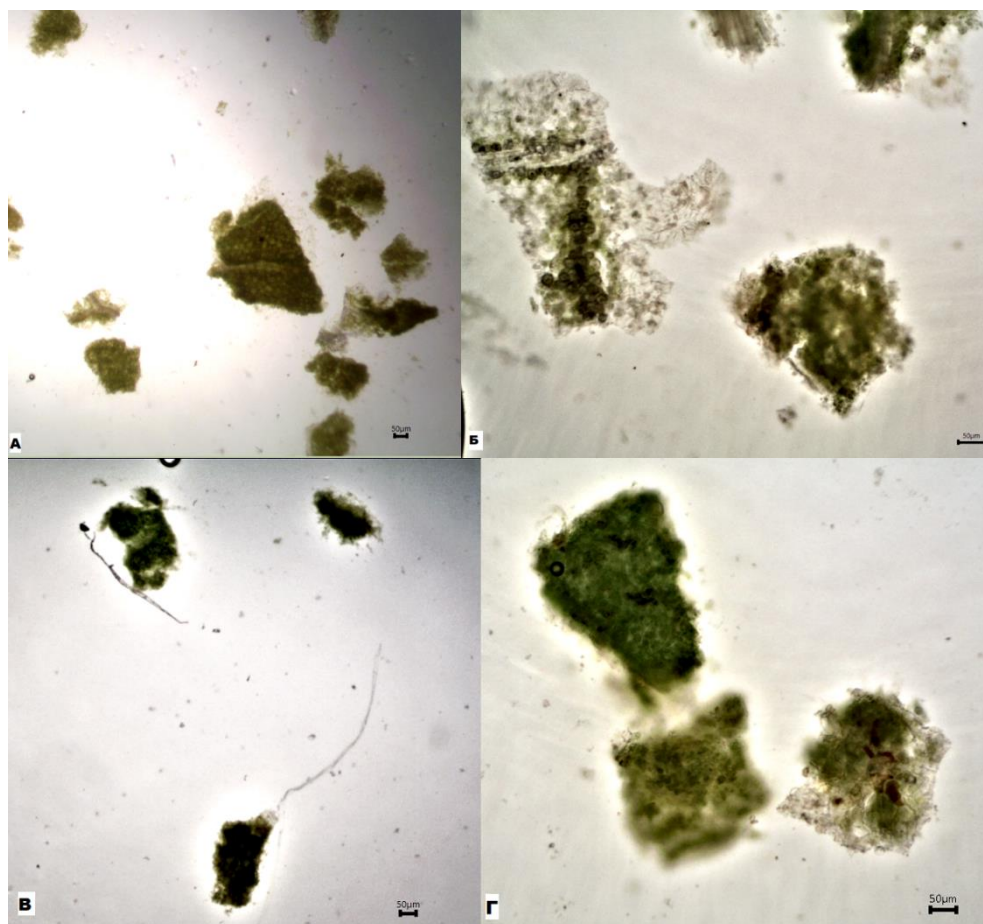


Рисунок 24– Порошок аронии Мичурина листьев: А – Фрагменты верхней поверхности листа (x40); Б – Фрагмент жилки с кристаллоносной обкладкой (x100); В – фрагменты листа с волосками (x40); Г – фрагменты нижней поверхности листа с устьицами (x100)

3.2.2. Изучение морфологических признаков поверхности листа с использованием растровой микроскопии

В качестве дополнительного уточняющего метода современного микроскопического анализа (Глава 2, п. 2) была использована в работе растровая электронная микроскопия (РЭМ). Данный метод позволил лучше визуализировать все признаки, отмеченные при проведении оптической микроскопии, а также получить их объемные изображения [97].

Так как лист не подвергался пробоподготовке в данном методе удалось зафиксировать многочисленность простых одноклеточных волосков на нижней поверхности листовой пластинки, а также на черешке листа. Волоски имеют гладкую поверхность, закручены вдоль своей оси (Рисунок 25).

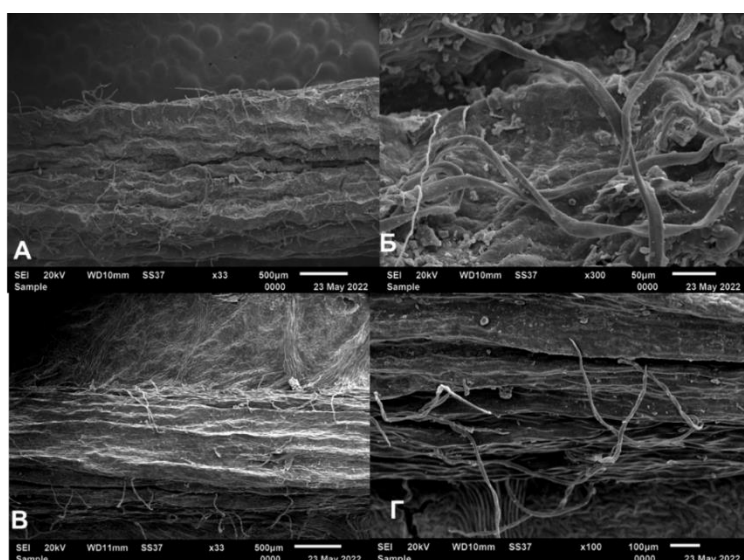


Рисунок 25 – Фрагменты листа аронии Мичурина (РЭМ): а – черешок листа (x33); б – волоски черешка листа (x300) в – жилка нижней стороны листа (x33); г – волоски жилки нижней стороны листа (x100)

Устьица были легко зафиксированы, при оптической микроскопии их обнаружение было затруднено. Устьица многочисленные, стенки замыкающих клеток имеют выраженные утолщения. Устьичные щели сильно открыты (Рисунок 26).

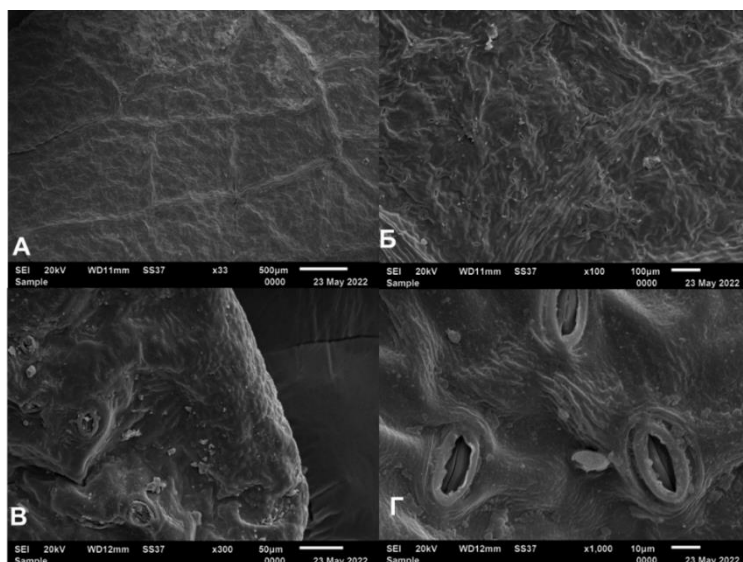


Рисунок 26 – Фрагменты листа аронии Мичурина (РЭМ): а, б – нижняя поверхность листа (а - x33, б – x100); в – край нижней стороны листа (x300); г – устьица (x1000)

Было выявлено, что клеточные стенки верхней поверхности листа утолщены, покрыты плотным слоем кутикулы, что позволяет установить их многоугольную форму. (Рисунок 27)

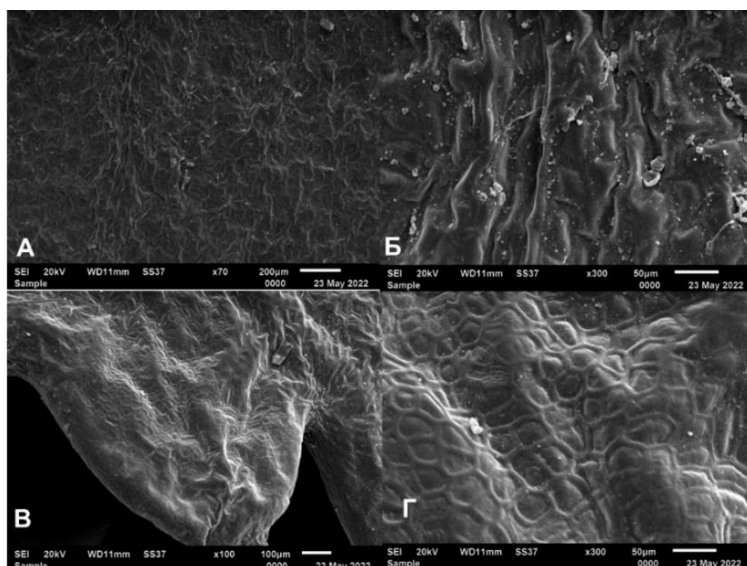


Рисунок 27 – Фрагменты листа аронии Мичурина (РЭМ): а - верхняя поверхность листа (x70); б, г – складчатость кутикулы (x300); в – край верхней поверхности листа (x100)

Железистые волоски вдоль жилки верхней поверхности листовой пластинки морщинистые, тупоконусовидные. Хорошо заметна многоклеточность места

прикрепления железистые волоски, которое состоит из относительно мелких многоугольных клеток (Рисунок 28).

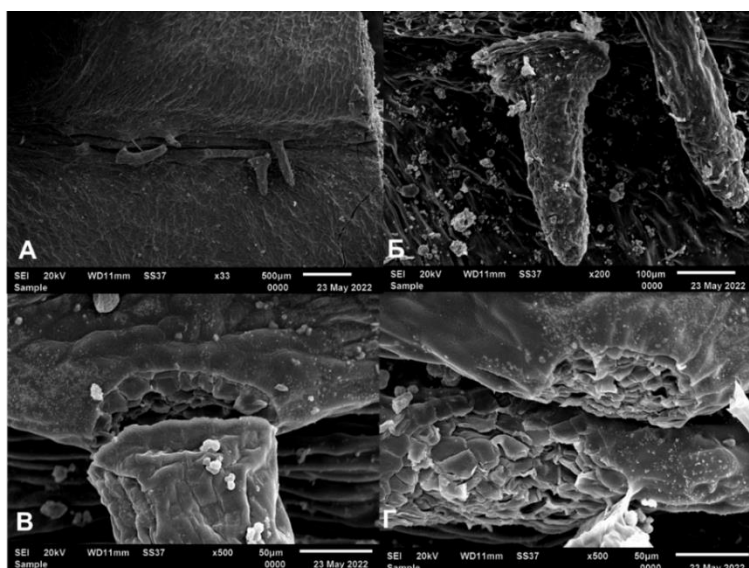


Рисунок 28 – Фрагменты листа аронии Мичурина (РЭМ): а – жилка верхней поверхности листа (x33); б – одноклеточные железистые волоски (x200); в – одноклеточная железка в месте прикрепления (x500); г – многоклеточное основание железистых волосков (x500)

3.2.3. Петиолярная анатомия черешка листа

Дополнительным современным методом исследования анатомо-диагностических признаков ЛРС является петиолярная анатомия. Диагностические признаки черешка стабильны в пределах вида, при этом они характеризуются видовой специфичностью, что позволяет использовать данный метод для установления подлинности растительного сырья [20, 22, 44, 55, 84, 86, 108, 109, 128].

Черешок листа короткий (10-15 мм), что составляет около 10% от длины пластинки. Тонкий, желобчатой формы, опушенный. Площадь его поперечного сечения в средней части ~2,7 мм². Прилистники листовидные, мелкие, приросшие к черешку, опадающие.

Получены микрофотографии черешка, подготовленного как описано в Главе 2, п. 2. Так как анатомически по длине черешок не однороден, был проведен

сравнительный анализ поперечных срезов черешка в трех участках: базальном, медиальном и апикальном.

На всех трех срезах тип строения черешка дорзивентральный. Профиль на поперечном разрезе V-образный в базальном участке (2,1x1,6 мм) и U-образный (полукруглый, плоско-выпуклый) в медиальном (1,4x1,6 мм) и апикальном (0,9x1,0 мм) участках (Рисунок 29). Адаксиальная сторона в базальном участке желобовидно углубленная, в медиальном и апикальном – уплощенная. Латеральные стороны при переходе к абаксиальной выпуклой стороне сужаются параболически (базальный участок) и гиперболически (медиальный и апикальный). На границе между адаксиальной и латеральной сторонами имеются округлые лопасти (ребра) [85].

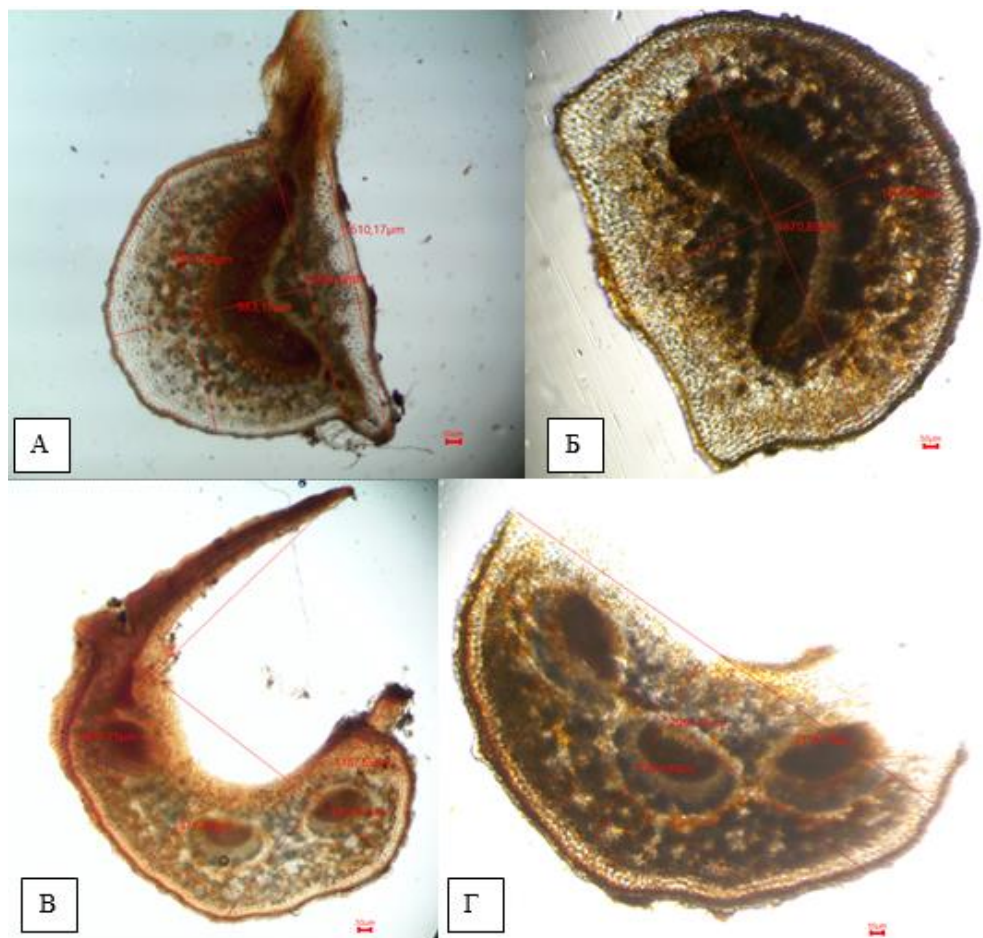


Рисунок 29 – Поперечный срез черешка (x40): а – апикальный участок, б – медиальный участок, в, г – базальный участок.

Эпидерма на всех срезах однослойная, кутинизированная. Состоит из основных клеток с утолщенными антиклинальными стенками, варьирующих по форме и очертанию. Форма эпидермальных клеток преимущественно многоугольная с прямолинейными, прямолинейно-округлыми, извилистыми, округло-извилистыми контурами (Рисунок 30) [85].

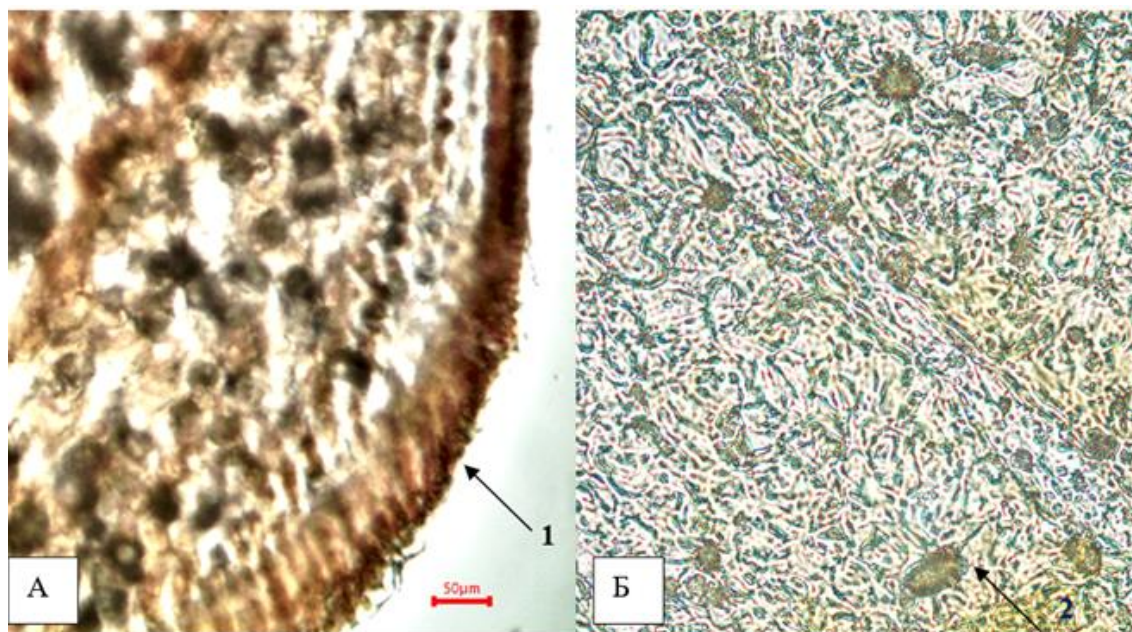


Рисунок 30 – Фрагмент эпидермы черешка: а – срез черешка (x100), б – срез эпидермы с поверхности (x400) 1 – эпидермис, 2 - устьица

Волоски простые, нитевидные, одноклеточные, длиной 600–700 мкм. В сухом состоянии легко опадающие, уплощенные, неравномерно спирально слабо закрученные (Рисунок 31).

Колленхима на срезах определяется как уголково-пластинчатая и кольцевая. Локализована в разных участках черешка неравномерно. Образует от 2-х до 6-ти слоев (в ребрах медиального и апикального участков) клеток (Рисунок 32). Мезофилл недифференцирован. Состоит из округлых плотно сомкнутых клеток с гетерогенной окраской [85].

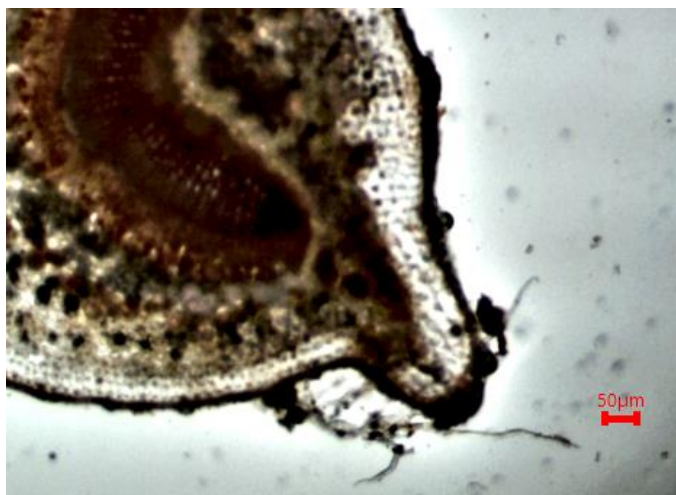


Рисунок 31 – Фрагмент черешка с волоском на примере медиального участка (x40)



Рисунок 32 – Фрагмент черешка с колленхимой на примере медиального участка (x40): 1 – колленхима, 2 – мезофилл

Проводящая система черешка неоднородна в его различных участках. В апикальном и медиальном участках присутствует закрытый коллатеральный пучок полулунной формы, а в базальном – три крупных коллатеральных пучка овальной формы. Ксилема в пучках по сравнению с флоэмой занимает больший объем (Рисунок 29, 33). В медиальной части толщина ксилемы варьирует от 87 мкм до 191 мкм, флоэмы – от 30 мкм до 81 мкм. В апикальном участке: ксилема от 94 мкм до 199 мкм, флоэма от 35 мкм до 74 мкм. В базальной части: ксилема от

70 мкм до 196 мкм, флоэма от 62 мкм до 138 мкм. Пучки снаружи армированы склеренхимой из нескольких слоев клеток образующей их обкладку.



Рисунок 33 – Проводящий пучок на примере медиального участка (x100): 1 – ксилема, 2 – флоэма

Таким образом, основными петиолярными признаками подлинности изучаемого сырья являются:

- поперечный срез V-образный в базальном участке с желобовидно углубленной адаксиальной стороной и параболически сужающейся латеральной. Медиальный и апикальный участки U-образные, уплощенные в адаксиальной части, гиперболически сужающиеся в латеральной части. На границе между адаксиальной 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 пучка овальной формы. Пучки снаружи армированы склеренхимой [85].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.

1. Впервые методами макро- и микроскопического анализа изучены идентификационные признаки, характеризующие подлинность листьев аронии Мичурина.

2. Впервые определены основные морфологические и анатомические признаки, которые могут быть использованы для определения подлинности и анализа данного сырья в цельном, измельченном и порошкованном виде. Установлены их биометрические характеристики.

3. В качестве характерных признаков выделены: многочисленные одноклеточные волоски на нижней поверхности листа, одноклеточные железистые волоски с многоклеточным основанием вдоль главной жилки по верхней поверхности листа, устьица анизоцитного типа.

4. Методом люминесцентной микроскопии установлены особенности морфологии листьев и локализации БАВ. Характерно яркое свечение трихом и отдельных включений. Также люминесценцией обладает кутикула и проводящая система листа.

5. Впервые использован метод РЭМ для визуализации и изучения морфологии поверхности листьев аронии Мичурина. Получены объемные изображения диагностически значимых структур: многочисленные простые одноклеточные закрученные вдоль своей оси волоски с гладкой поверхностью по нижней стороне листовой пластинки; многочисленные устьица с открытыми щелями; складчатость кутикулы; одноклеточные тупоконусовидные железистые волоски вдоль главной жилки с многоклеточным основанием.

6. Впервые проведена петиолярная анатомия аронии Мичурина листьев. Установлено строение черешка и выявлены основные анатомо-диагностические признаки: поперечный срез V-образный в базальном участке с желобовидно углубленной адаксиальной стороной и параболически сужающейся латеральной. Медиальный и апикальный участки U-образные, уплощенные в адаксиальной части, гиперболически сужающиеся в латеральной части. На границе между адаксиальной и латеральной сторонами имеются округлые лопасти; по

поверхности черешка встречаются простые, нитевидные, одноклеточные, 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 пучка овальной формы. Пучки снаружи армированы склеренхимой.

7. Результаты исследований легли в основу разделов «Внешние признаки» и «Микроскопия» подготовленного проекта ФС «Аронии Мичурина листья» (Приложение 1).

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ЭКОТОКСИКАНТОВ ЛИСТЬЯМИ АРОНИИ МИЧУРИНА

4.1. Элементный состав листьев аронии Мичурина

Исследование элементного состава (Глава 2, п. 3) листьев аронии представлялось интересным в силу возможности основных групп БАВ данного сырья образовывать соединения с поливалентными ионами металлов, что могло привести к повышенному их накапливанию в сырье. В зависимости от состава, количества и свойств накапливаемых веществ, данный процесс мог играть как положительную роль концентрирования эссенциальных элементов, так и приводить к повышенному накапливанию соединений токсичных металлов.

В листьях аронии Мичурина обнаружен 61 элемент (Таблица 1). Следует отметить высокое содержание в образцах кальция, калия, фосфора, магния, кремния, железа.

В исследуемом образце в соответствии с вышеприведенной классификацией определены 4 макроэлемента; 21 микроэлемент; 32 ультрамикроэлемента

Таблица 1 - Элементный состав листьев аронии Мичурина и почвы с места произрастания, мкг/г

№ п/п	Элемент	Содержание в листьях /ПДК	Содержание в Почве / ПДК и ОДК	Кбп
1	2	3	4	5
Макроэлементы				
1	Кальций (Ca)	21338,06	20180,00	1,06
2	Калий (K)	11187,57	10790,00	1,04
3	Фосфор (P)	9715,30	630,00	15,4
4	Магний (Mg)	1472,59	4600,00	0,32
Микроэлементы				
1	Кремний (Si)	439,04	371000,00	0,001
2	Железо (Fe)	119,64	18200,00	0,007
3	Алюминий (Al)	72,47	30400,00	0,002
4	Цинк (Zn)	64,32	60,10 / 110,00*	1,07
5	Стронций (Sr)	60,03	70,50	0,85

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
6	Натрий (Na)	38,26	3300,00	0,01
7	Марганец (Mn)	26,12	440,00 / 1500,00**	0,06
8	Барий (Ba)	11,58	240,00	0,05
9	Медь (Cu)	4,78	19,00 / 66,00*	0,25
10	Рубидий (Rb)	3,55	52,00	0,07
11	Хром (Cr)	2,71	35,00	0,08
12	Титан (Ti)	1,50	2300,00	0,0007
13	Литий (Li)	1,35	17,00	0,08
14	Молибден (Mo)	0,83	1,20	0,70
15	Селен (Se)	0,64	4,10	0,16
16	Никель (Ni)	0,40	22,00/40,00*	0,02
17	Ванадий (V)	0,25	31,00 / 150,00**	0,008
18	Кобальт (Co)	0,18	8,50	0,02
19	Галлий (Ga)	0,019	9,10	0,002
20	Сурьма (Sb)	0,015	0,47 / 4,50**	0,03
21	Неодим (Nd)	0,01	18,00	0,0006
Ультрамикроэлементы				
1	Диспрозий (Dy)	< 0,009	2,50	0,004
2	Иттрий (Y)	0,009	13,00	0,0007
3	Уран (U)	0,008	1,05	0,008
4	Теллур (Te)	< 0,007	< 0,10	0,07
5	Гадолиний (Gd)	< 0,007	3,40	0,002
6	Цезий (Cs)	0,006	2,30	0,003
7	Гольмий (Ho)	< 0,005	0,47	0,01
8	Эрбий (Er)	< 0,005	1,40	0,004
9	Иттербий (Yb)	< 0,005	1,20	0,004
10	Самарий (Sm)	< 0,004	3,30	0,001
11	Европий (Eu)	< 0,004	0,71	0,006
12	Тербий (Tb)	< 0,004	0,47	0,009
13	Тулий (Tm)	< 0,004	0,19	0,02
14	Серебро (Ag)	0,004	0,17	0,02
15	Таллий (Tl)	0,003	0,25	0,01
16	Торий (Th)	< 0,003	5,90	0,0005
17	Празеодим (Pr)	0,002	4,70	0,0005
18	Ниобий (Nb)	0,002	5,97	0,0004
19	Скандий (Sc)	< 0,002	< 3,00	0,0007
20	Лютеций (Lu)	< 0,002	0,19	0,01
21	Гафний (Hf)	< 0,002	2,30	0,0009
22	Висмут (Bi)	0,0015	0,07	0,02
23	Бериллий (Be)	<0,001	1,70	0,0006

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
24	Тантал (Ta)	<0,001	0,48	0,002
25	Вольфрам (W)	<0,001	0,45	0,002
26	Цирконий (Zr)	<0,0003	87,00	0,00003
27	Германий (Ge)	<0,0001	1,40	0,00007
28	Олово (Sn)	<0,0001	1,40	0,00007
29	Платина (Pt)	<0,0001	< 0,10	0,003
30	Золото (Au)	<0,0001	0,29	0,003
31	Лантан (La)	<0,00001	19,70	0,0000005
32	Церий (Ce)	<0,00001	41,00	0,0000002
33	Рений (Re)	-	< 0,01	-
34	Рутений (Ru)	-	< 0,01	-
35	Индий (In)	-	0,024	-
Токсичные элементы				
1	Кадмий (Cd)	< 0,0001 / 1,00	0,45 / 1,00*	0,0002
2	Ртуть (Hg)	0,008 / 0,10	<0,01 / 2,10**	0,80
3	Мышьяк (As)	0,33 / 0,50	< 1,00 / 5,00*	0,33
4	Свинец (Pb)	2,47 / 6,00	14,00 / 32,00*	0,18

*- ОДК – ориентировочно-допустимая концентрация; ** - ПДК (валовое содержание) – предельно-допустимая концентрация [111].

«-» - не обнаружен; < - ниже пределов обнаружения

Обнаружены эссенциальные элементы: Ca, K, P, Mg, Fe, Zn, Na, Mn, Cu, Mo, Se, Co. Среди условно эссенциальных элементов в количестве свыше 0,01 мкг/г выявлены: кремний, никель, ванадий, стронций, хром.

Преобладающее содержание в листьях аронии Мичурина кальция объясняется наличием кристаллоносной обкладки по жилкам листа, а также присутствием друз оксалата кальция в мезофилле, что описано в главе 3. Известно, что реутилизация кальция затруднена, так как он откладывается в виде нерастворимых солей, например, щавелевой кислоты. Данные соли накапливаются в органах и тканях на более поздних стадиях их развития, поэтому в представленном сырье они содержатся в большом количестве [53].

В соответствии с литературными данными фосфор, входящий в состав аденозинтрифосфорной кислоты, играет важную роль в энергетическом обмене в клетках. Данный элемент в наибольшем соотношении накапливается в листьях аронии из почвы (фосфатные удобрения в месте произрастания растения в почву

не вносились). Цинк играет роль кофактора многих ферментов, входит в состав инсулина, участвует в белковом обмене, укрепляет иммунную систему, участвует в кроветворении. При сравнении полученных данных с литературными для других растений [13, 31, 112, 121, 153, 154] было выявлено, что в листьях аронии Мичурина цинк накапливается в большем количестве (64,32 мкг/г), чем у других видов ЛРС. Роль таких макро- и микроэлементов, как марганец, железо, медь, кремний, хром, никель, селен и другие неоднократно обсуждалась в литературе [4, 19, 71, 121]. Все перечисленные элементы обнаружены в листьях аронии Мичурина в значительном количестве, что открывает перспективы использования изучаемого сырья в качестве источника данных макро- и микроэлементов.

Так как исследуемое нами сырье предположительно способно обладать антиоксидантным действием, интерес представляет содержание в листьях селена, как микроэлемента, обладающего свойствами антиоксиданта. Суточная потребность в селене составляет 50-200 мкг, при этом поступать в организм должно не менее 15-30 мкг в сутки во избежание развития гипоселеноза [4]. Содержание селена 0,64 мкг/г в листьях аронии Мичурина достаточно высоко и сопоставимо со многими источниками селена, например, его содержание в печени составляет 0,4-1,5 мкг/г сырой массы, в зерне и хлебе – 0,8 мкг/г и т.д. [4].

Можно предположить, что листья аронии Мичурина, в которых в большом количестве синтезируются фенольные соединения, в частности флавоноиды, способны аккумулировать комплекс элементов, основными компонентами которого являются железо, цинк, хром, медь, кобальт, марганец, и никель. В свою очередь, эти элементы могут влиять и на накопление БАВ в сырье, например, являясь кофакторами и активаторами ферментов при биосинтезе флавоноидов [6].

Около 98% элементного состава листьев приходится на макроэлементы (Рисунок 34), в то же время их содержание в почве составляет всего 7,82% (Рисунок 35). Содержание токсичных тяжёлых металлов и мышьяка не превышает допустимых для ЛРС пределов согласно ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [28, 29].

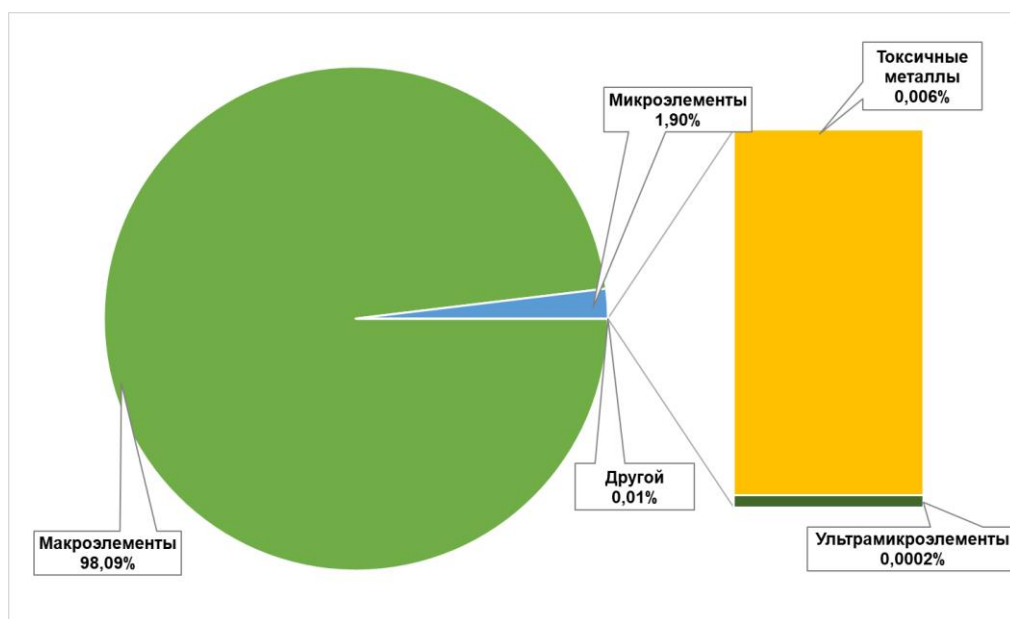


Рисунок 34 - Содержание элементов в листьях аронии Мичурина

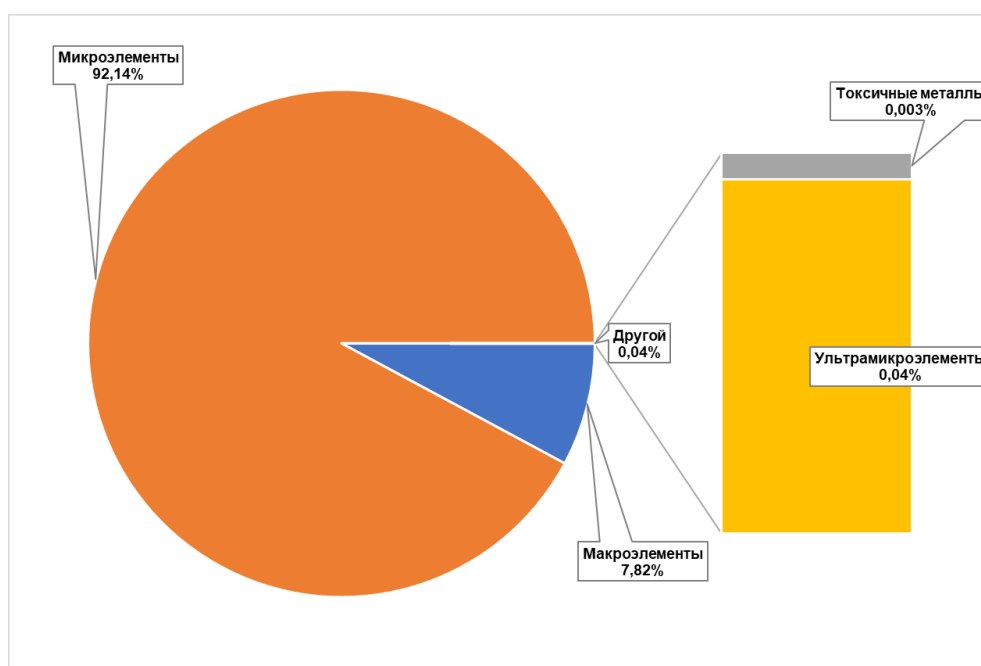


Рисунок 35 – Содержание элементов в почве с места произрастания аронии Мичурина

Предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) валового содержания элементов в почве в соответствии с требованиями СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания» для почв с кислым рН (рН=5,4) не превышены [92, 111].

Важной характеристикой избирательной аккумуляции элементов из почвы является коэффициент биологического поглощения (Кбп), введенный А.И. Перельманом. В зависимости от величины этого коэффициента элементы можно подразделить на пять групп: энергичного накопления ($K_{бп} = n \cdot 10^1 - n \cdot 10^2$), сильного накопления ($K_{бп} = n \cdot 10^0 - n \cdot 10^1$), слабого накопления и среднего захвата ($K_{бп} = n \cdot 10^{-1} - n \cdot 10^0$), слабого захвата ($K_{бп} = n \cdot 10^{-1}$), слабого накопления и очень слабого захвата ($K_{бп} = n \cdot 10^{-1} - n \cdot 10^{-2}$) [116].

В сырье обнаружены минеральные вещества всех пяти групп. Большая часть элементов, представленных в листьях аронии Мичурина, относятся к элементам слабого накопления и очень слабого захвата (Рисунок 36).

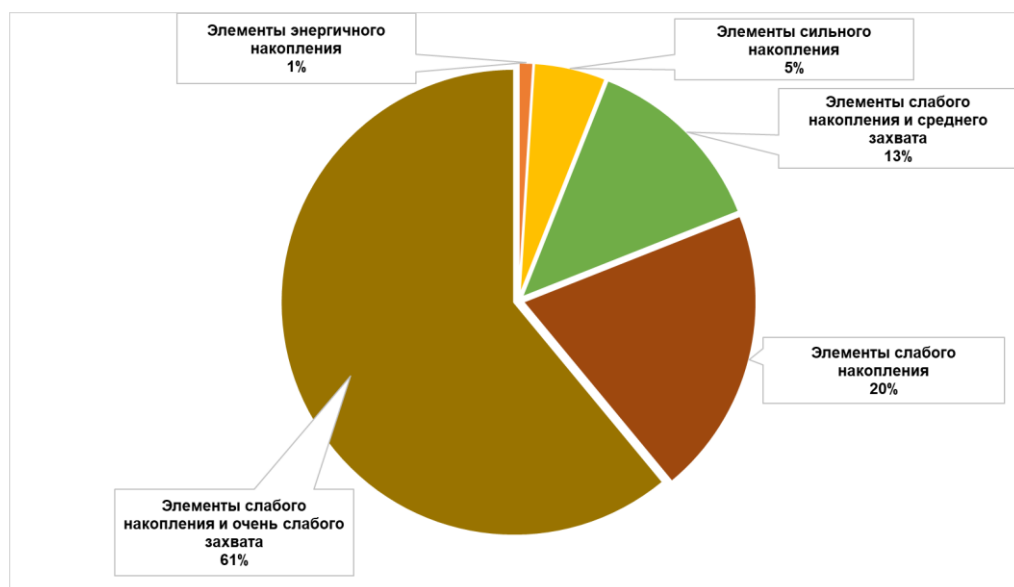


Рисунок 36 - Доля элементов по способности к накоплению из почвы (по А.И. Перельману)

Наибольшей способностью к аккумуляции в листьях аронии Мичурина обладают фосфор, кальций, калий, цинк. Распределение минеральных компонентов по группам представлено в Таблице 2. Исходя из представленных данных 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 - Распределение элементов по группам в листьях аронии Мичурина (по А.И. Перельману)

Группа	Элементы
Энергичного накопления	P
Сильного накопления	Ca, K, Zn
Слабого накопления и среднего захвата	Mg, Sr, Cu, Mo, Se, Hg, As, Pb
Слабого захвата	Bi, Ag, Co, Ni, Li, Cr, Ba, Mn, Na, Sb, Rb, Tl
Слабого накопления и очень слабого захвата	Cd , Si, Fe, Al, Ti, V, Ga, Nd, Dy, Y, U, Te, Gd, Cs, Ho, Er, Yb, Sm, Eu, Tb, Tm, Th, Pr, Nb, Se, Lu, Hf, Be, Ta, W, Zr, Ge, Sn, Pt, Au, La, Ce

Установлено, что соотношение элементов в почве с места произрастания и в сырье различаются. Рассчитаны коэффициенты биологического поглощения для каждого элемента, на основании которого все компоненты разделены на пять групп. К элементам энергичного накопления относится фосфор, а к элементам сильного накопления – кальций, калий и цинк. Способность листьев аронии накапливать цинк в большем количестве (64,32 мкг/г), чем другие виды ЛРС, позволяет рассматривать их как возможный природный источник этого элемента при гипоеlementозах, связанных с дефицитом цинка в организме.

В литературе отсутствуют данные по минеральному составу листьев аронии Мичурина. Так как известно, что арония Мичурина является гибридом, мы сравнивали соотношение накопления ряда элементов с литературными данными для видов, являющихся родительскими. Для получения более достоверных результатов сравнение проводили в процентных значениях (Таблица 3) [187, 197, 205]. Следует отметить, что процентное содержание всех обнаруженных элементов сопоставимо. Значительно отличается содержание магния в листьях аронии Мичурина, марганца и фосфора в листьях рябины обыкновенной. В среднем по составу микро- и макроэлементов листья аронии Мичурина ближе к листьям аронии черноплодной.

Также проводили сравнение минерального состава с литературными данными по плодам сорта «Черноокая», который относится к виду аронии Мичурина (Таблица 4) [34]. Можно проследить некоторые закономерности. Так в

листьях в большем процентном соотношении накапливаются кальций, фосфор, селен, а в плодах калий, натрий, марганец, медь, хром и никель. Содержание остальных компонентов сопоставимо.

Таблица 3. Сравнение содержания макро- и микроэлементов в листьях аронии Мичурина, аронии черноплодной и рябины обыкновенной

№ п/п	Название элемента	Листья аронии Мичурина сорта Мулатка	Листья аронии черноплодной [197, 205]	Листья рябины обыкновенной [187]
		%	%	%
1	Кальций	48,04	42,52	43,50
2	Фосфор	21,87	17,26	4,79
3	Магний	3,32	9,46	12,59
4	Натрий	0,09	0,22	0,17
5	Калий	25,19	29,86	34,4
6	Цинк	0,14	0,14	0,59
7	Медь	0,01	0,05	0,02
8	Железо	0,27	0,25	0,28
9	Марганец	0,06	0,07	3,58
10	Никель	0,0009	0,0011	0,006
11	Хром	0,006	0,006	0,003
12	Молибден	0,0019	0,0009	0,0005
13	Селен	0,0014	0,0057	Не обнаружен
14	Ванадий	0,0006	0,02	Не обнаружен
15	Кремний	0,99	0,07	Не обнаружен
16	Мышьяк	0,0007	0,003	Не обнаружен
17	Кадмий	0,000002	0,0002	0,0004
18	Свинец	0,006	0,0006	0,0017
19	Бор	Не обнаружен	0,06	0,06

Богатый общий минеральный состав листьев аронии Мичурина свидетельствует о возможности применения данного сырья как источника и других микро- и макроэлементов для корректировки и профилактики состояний, связанных с гипоелементозами. По этой причине листья аронии Мичурина могут рассматриваться как перспективное лекарственное сырье для дальнейшей разработки и получения ЛРП [99].

Таблица 4 - Сравнение содержания макро- и микроэлементов в листьях и плодах аронии Мичурина

Название элемента	Содержание в листьях, %	Содержание в плодах, %
Кальций	48,53	17,18
Фосфор	22,10	6,44
Магний	3,35	2,87
Натрий	0,09	15,02
Калий	25,44	57,83
Цинк	0,15	0,13
Медь	0,01	0,06
Железо	0,27	0,34
Кобальт	0,0004	0,0003
Марганец	0,06	0,09
Никель	0,0009	0,02
Хром	0,006	0,03
Селен	0,001	0,0002

4.2. Оценка радионуклидного загрязнения листьев аронии Мичурина

Согласно требованиям ГФ РФ XV изд., ЛРС, заготавливаемое на территории Российской Федерации, должно подвергаться контролю на радиационную безопасность. Нормируется удельная активность искусственных радионуклидов – цезия-137 и стронция-90.

Удельная активность радионуклидов в листьях аронии Мичурина (Глава 2, п. 4) не превышает норм, установленных ГФ РФ XV изд. (Таблица 5). Удельная активность стронция-90 не превышает пределов количественного определения используемой методики, а цезия-137 - в 38-78 раз ниже допустимых минимальных пределов.

Для оценки соответствия ЛРС требованиям радиационной безопасности рассчитан показатель В и погрешность его измерения ΔB , которые составляют $0,019 \pm 0,001$. Так как $(B + \Delta B) \leq 1$, листья аронии Мичурина можно назвать соответствующими критерию радиационной безопасности.

На территории Тамбовской области отсутствуют радиационно опасные объекты. Часть территорий, включая город Мичуринск, была подвергнута радиоактивному заражению в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Хотя в

настоящее время данный населенный пункт не относится к радиационно загрязненным, некоторое содержание цезия-137 может присутствовать в почве, откуда он попадает в растительное сырье [130].

Установлено, что листья аронии Мичурина экологически безопасны по содержанию радионуклидов.

Таблица 5 – Удельная активность радионуклидов в листьях аронии Мичурина

Радионуклиды	Удельная активность в сырье, Бк/кг	Допустимая удельная активность радионуклида, Бк/кг, не более
Цезий-137	7,76±2,61	400
Стронций-90	Менее 1	200

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой определен элементный состав листьев аронии Мичурина и почвы с места произрастания растения. В сырье обнаружен 61 химический элемент, в числе которых практически все эссенциальные: макроэлементы, с преобладанием кальция, калия, фосфора и магния и микроэлементы, с преобладанием железа, цинка, натрия, марганца.

2. В ходе анализа определено содержание токсичных элементов, нормируемых в растительном сырье. Их концентрация не превышает допустимых пределов, приведенных в нормативной документации. На основании рассчитанных значений Кбп можно сделать вывод, что все они относятся к веществам слабого накопления и среднего (Hg, As, Pb) или очень слабого (Cd) захвата, т.е. не будут накапливаться в сырье в превышающих значениях даже при сборе сырья на экологически неблагоприятных территориях.

3. По результатам исследований листья аронии Мичурина, заготовленные на территории Центрального Черноземья (на примере Тамбовской области), следует считать экологически безопасными с точки зрения нормируемых радионуклидов.

ГЛАВА 5. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ АРОНИИ МИЧУРИНА

Для обоснования выбора периода заготовки листьев с точки зрения совокупности факторов максимального накопления БАВ, а также учитывая важность сохранения БАВ в плодах данного растения, широко применяемых в медицине, исследования проведены на 4 фенологических фазах (Глава 2, п. 5-10). Кроме того, данная глава также посвящена обоснованию выбора целевых групп для стандартизации и оценки качества листьев аронии Мичурина и ЛРП на их основе.

5.1. Определение товароведческих показателей

Определение фармакопейных показателей качества, таких, как влажность, зола общая и зола, нерастворимая в растворе 10% хлористоводородной кислоты, органические и минеральные примеси, проводили в соответствии с методиками, изложенными в ГФ РФ XIV издания (Глава 2, п. 5).

Определена вариабельность показателей влажности, золы и золы, нерастворимой в 10% растворе HCl в зависимости от стадии заготовки сырья (Таблица 6)

Таблица 6 – 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

Под золой понимают несгораемый остаток неорганических веществ, оставшийся после сжигания и прокаливания сырья. Общая зола показывает общее

содержание минеральных веществ, свойственных сырью и посторонним минеральным примесям (земля, песок, пыль). Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, состоит в основном из оксида кремния и характеризует загрязненность сырья посторонними минеральными примесями, а также из мало или практически нерастворимых хлоридов тяжелых металлов, отражающих способность сырья к их аккумуляции, а, следовательно, косвенно взаимосвязаны с показателями безопасности применения.

Все представленные показатели сопоставимы с показателями для таких фармакопейных видов сырья как листья березы, листья брусники, листья гинкго, листья эвкалипта и т.д., а показатель золы, нерастворимой в 10%-ной HCl значительно ниже, что говорит о низком содержании минеральных примесей [28, 29].

На основании полученных результатов можно рекомендовать верхний предел влажности для листьев аронии Мичурина не более 10%, золы общей – не более 10%, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте – не более 0,1%.

Присутствие минеральных и органических примесей определяли для сырья, собранного в сентябре (стадия 4), содержание которых составляло $0,21 \pm 0,02\%$ и $0,56 \pm 0,03\%$ 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 % (Приложение 1).

5.2. Стандартизация листьев по содержанию суммы экстрактивных веществ

Экстрактивными веществами ЛРС может называться сумма извлекаемых экстрагентом веществ органической и неорганической природы, определяемых по сухому остатку. Этот показатель косвенно характеризует содержание БАВ в сырье и используется для его стандартизации.

При определении суммы экстрактивных веществ в листьях изучали влияние экстрагента на процесс извлечения. В качестве экстрагента были использованы

экстрагенты различной полярности: вода, спирт этиловый различных концентраций (40%, 70% и 96%), ацетон, гексан. Для определения влияния pH на степень экстракции также использовали раствор кислоты хлористоводородной 0,83% (pH=1-2) и раствор аммиака 0,25% (pH=10). Определение суммы экстрактивных веществ также проводили на разных стадиях заготовки сырья [106, 131].

В таблице 7 приведены данные по исследованию содержания суммы экстрактивных веществ, извлекаемых различными экстрагентами на разных стадиях развития сырья. Оптимальным экстрагентом могут быть выбраны вода очищенная и спирт этиловый в концентрации 40-70%.

Таблица 7 - Содержание экстрактивных веществ в листьях аронии Мичурина на разных стадиях развития

Экстрагент	Экстрактивные вещества, %			
	Стадия заготовки			
	1 (май)	2 (июнь)	3 (август)	4 (сентябрь)
Вода	37,24±0,20	39,68±0,25	31,52±0,22	30,28±0,31
Этанол, %: 40 70 96	39,01±0,31	42,00±0,33	33,69±0,27	32,68±0,23
	38,20±0,30	41,68±0,31	33,46±0,29	31,51±0,23
	27,31±0,31	28,61±0,35	25,82±0,21	26,48±0,28
Раствор аммиака 0,25%	43,21±0,28	45,36±0,31	39,82±0,38	40,31±0,31
Хлористоводородная кислота 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

Наибольший выход экстрактивных веществ при использовании 40% этанола наблюдается для сырья, собранного на стадии начала плодоношения. На более поздних стадиях развития содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, этиловым спиртом различной концентрации и раствором аммиака 0,25% снижается, в то же время содержание экстрактивных веществ, извлекаемых

раствором кислоты хлористоводородной разведенной, гексаном и ацетоном растёт.

Выбранные экстрагенты позволяют определить влияние рН и полярности экстрагента на выход экстрактивных веществ.

Полярность экстрагента влияет на выход экстрактивных веществ. Максимальный выход наблюдается при использовании этанола в концентрации 40-70%, так как спирт этиловый данных концентраций является универсальным экстрагентом, способным экстрагировать как полярные, так и неполярные вещества (Рисунок 37). Также высок выход экстрактивных веществ при экстрагировании водой очищенной, что связано с высоким содержанием гидрофильных веществ в листьях аронии Мичурина. Однако к более поздним срокам заготовки сумма экстрактивных веществ, извлекаемых полярными растворителями, снижается, а неполярными – гексаном и ацетоном – растёт. Этот факт может объясняться тем, что на ранних стадиях развития в растительном сырье преобладают по содержанию первичные метаболиты (аминокислоты, сахара, органические кислоты и т.д.), хорошо извлекаемые высокополярными экстрагентами. В процессе жизнедеятельности часть их расходуется на биосинтез вторичных метаболитов – основных ценных БАВ сырья, в том числе неполярной структуры, что, в целом, может приводить к снижению выхода суммы БАВ в полярные и росту извлечения в малополярные растворители.

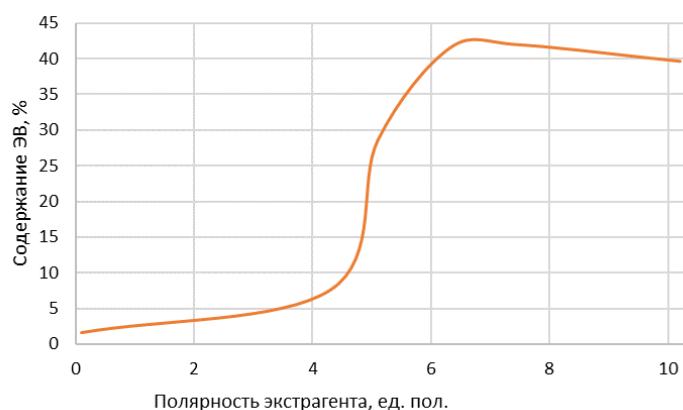


Рисунок 37- Влияние полярности экстрагента на выход экстрактивных веществ из листьев аронии Мичурина (на примере стадии заготовки 2)

При сравнении выхода веществ в интервале рН 2-10 установлено, что максимальный выход наблюдается в кислой среде с рН=2-3. В нейтральной среде выход экстрактивных веществ снижает, а затем вновь растет к рН=10-11 (Рисунок 38). Это может объясняться гидролизом БАВ в кислой и щелочной среде с повышением их растворимости и, как следствие, выхода [133].

Кроме того, наблюдается увеличение выхода экстрактивных веществ на более поздних стадиях развития при экстрагировании кислотой хлористоводородной разведенной. Это связано с присутствием в изучаемом объекте лейкоформ антоцианов, которые извлекаются при подкислении хлористоводородной кислотой вследствие перехода в, собственно, антоциановые соединения. Биосинтез антоцианов, согласно литературным данным, активируется в стареющих органах растений, а также под влиянием неблагоприятных стрессовых условий таких как, например, изменение длины светового дня осенью [28, 29, 68].

Так как в качестве экстрагента при определении суммы экстрактивных веществ, а также для получения экстракционных фитопрепаратов могут использоваться только экстрагенты без добавок, повышающих извлекаемость БАВ, для определения суммы экстрактивных веществ в изучаемом сырье могут быть рекомендованы вода очищенная и спирт этиловый 40-70% концентраций [3].

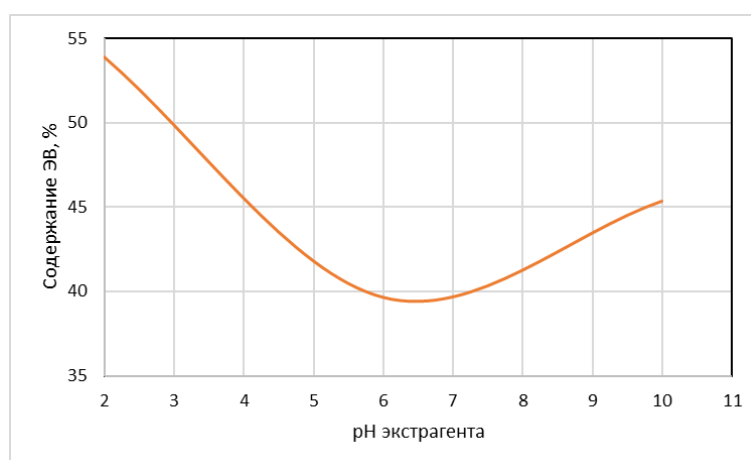


Рисунок 38 – Влияние рН экстрагента на выход экстрактивных веществ из листьев аронии Мичурина (на примере стадии заготовки 2)

Обобщая вышесказанное, а также учитывая необходимость сохранения возможности созревания плодов и накопления в них БАВ, можно рекомендовать для сбора листьев фазы плодоношения (август) и начала покраснения листьев (сентябрь), так как выход БАВ на данных стадиях также высок. В подготовленный проект ФС включен показатель «Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой очищенной с требованием к нему не менее 25%» (Приложение 1).

5.3 Качественный анализ биологически активных веществ листьев аронии Мичурина

Для проведения качественного анализа БАВ в листьях аронии Мичурина использовали качественные пробирочные реакции, а также хроматографические исследования методом ТСХ.

5.3.1. Качественное определение некоторых групп биологически активных веществ в листьях аронии Мичурина

С помощью групповых качественных реакций, приведенных в Главе 2 (п. 7), проводили качественное определение некоторых групп БАВ, результаты которого представлены в Таблице 8. Методики получения извлечений для проведения качественных реакций приведены в Главе 2 (п. 7).

Таблица 8 – 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 сапонины)
Полисахариды (слизи)	Присутствуют
Дубильные вещества	Присутствуют
Витамины (Аскорбиновая кислота)	Присутствует
Флавоноиды	Присутствуют
Аминокислоты (АК)	Присутствуют
Антоциановые соединения	Присутствуют
Цианогликозиды	Отсутствуют

В результате первичного скрининга на присутствие некоторых групп БАВ подтверждено наличие в листьях аронии Мичурина дубильных веществ, АК, флавоноидов, антоциановых соединений, спирторастворимых сапонинов, аскорбиновой кислоты и полисахаридов в форме слизей. При исследовании сырья на содержание цианогликозидов, как заготавливаемого от растения семейства Розоцветные, последние не были обнаружены, что также позволяет отнести листья аронии Мичурина к безопасному ЛРС.

5.3.2. Хроматографическое исследование листьев аронии Мичурина

Метод ТСХ использован в работе для разделения выделяемых суммы флавоноидов и лейкоантоцианов (в форме собственно антоцианов), а также исследования вариабельности их хроматографического профиля в листьях на различных стадиях их заготовки.

Разделение и идентификацию флавоноидов листьев проводили на примере сырья, заготовленного в сентябре. Высушенные листья измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм. Экстрагирование суммы флавоноидов проводили 70% этиловым спиртом в соотношении сырье – экстрагент (1:50). Полученное извлечение наносили на пластинку Sorbifil-ПТСХ-АФ-А-УФ в количестве 10 мкл. Одновременно на пластинку наносили раствор 0,1% стандартного образца рутина в количестве 5 мкл. Детектирование проводили в УФ-свете после обработки хроматограмм 5% раствором алюминия хлорида.

Предварительно также проводили выбор элюирующей системы. В качестве элюирующей системы использовали системы растворителей, рекомендованные в литературе для флавоноидов:

1. Амиловый спирт - ледяная уксусная кислота - вода (60:20:20)
2. Этилацетат - ледяная уксусная кислота - вода (7,5:1,5:1,5)
3. Этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3) [10, 11].

При использовании систем 1 и 2 заметного разделения хроматографических зон не наблюдалось, поэтому в дальнейших исследованиях использовали систему 3.

Для выбора оптимального объема пробы полученное извлечение наносили на пластинку в количестве 5 мкл, 10 мкл, 20 мкл и 50 мкл в сравнении с раствором стандартного образца рутина.

При нанесении 5 мкл наблюдали 4 хроматографические зоны, при 10 мкл – 5 зон, а при 20 мкл и 50 мкл - 6 зон. Одна из них была идентифицирована как рутин по значению R_f (Рисунок 39). Зона рутина при нанесении 5 мкл на хроматограмме извлечения отсутствовала. Неидентифицированные соединения имели характерные свечения в УФ-свете после обработки пластины 5% раствором алюминия хлорида, что говорит об их флавоноидной природе. Оптимальным объемом пробы было выбрано 20 мкл, так как при меньшем объеме наблюдается меньшее количество хроматографических зон, а при большем – недостаточное их разделение.

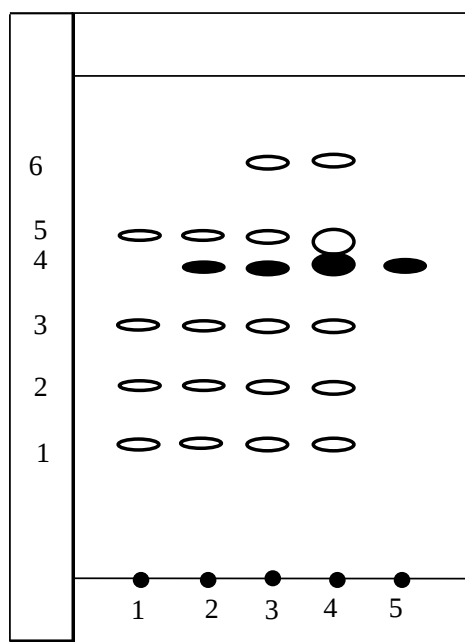


Рисунок 39 - Схема хроматограммы извлечения из листьев аронии Мичурина: на линии старта точка 1 – 5 мкл извлечения; точка 2 – 10 мкл извлечения; точка 3 – 20 мкл извлечения; точка 4 – 50 мкл извлечения, точка 5 – 5 мкл 0,1% стандартного раствора рутина

Таким образом, проведены разделение и идентификация флавоноидов в листьях аронии Мичурина. Оптимальной элюирующей системой выбрана система этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3), при рекомендуемом объеме пробы – 20 мкл. В растительном сырье установлено присутствие 6 веществ флавоноидной природы, среди которых идентифицирован рутин [105].

Изучение хроматографического профиля лейкоантоцианов (в форме собственно антоцианов) листьев проводили осуществляли также методом ТСХ. Выделение данной группы БАВ осуществляли путем нагревания сырья с подкисленным спиртом этиловым по методике, изложенной в п. 5.5.3 данной Главы. Полученное извлечение наносили на пластинку «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А в количестве 20 мкл. Детектирование проводили в видимом свете, т.к. зоны получаемых антоциановых соединений из лейкоформ, присутствующих в листьях в результате взаимодействия с кислотой при нагревании, имели собственное окрашивание.

Предварительно проводили выбор элюирующей системы и подбор оптимального объема наносимой пробы извлечения, т.к. ранее в литературе не было проведено подобных исследований для изучаемого ЛРС. В качестве элюирующей системы использовали системы растворителей типа н-бутанол-уксусная кислота-вода, наиболее часто рекомендованные в литературе для разделения суммы антоцианов в соотношениях (4:1:5) и (4:1:1).

При использовании второй системы заметного разделения хроматографических зон не наблюдалось, поэтому в дальнейших исследованиях использовали систему н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5).

Для выбора оптимального объема пробы полученное извлечение наносили на пластинку в количестве 10 мкл, 20 мкл, 30 мкл и 40 мкл. При нанесении 30 и 40 мкл наблюдался эффект нагрузки и зоны обнаруживались в виде длинных «свечек» с неудовлетворительными показателями разделения. В качестве рекомендуемого объема следует использовать 20 мкл, при нанесении которого на хроматограммах наблюдали разделение суммы антоцианов в виде 3-х зон красного и коричневатого цветов (Рисунок 40). Следует отметить, что вид

хроматографического профиля не отличался друг от друга на всех исследуемых стадиях заготовки сырья. Коэффициенты удержания зон антоцианов приведены в таблице 9.

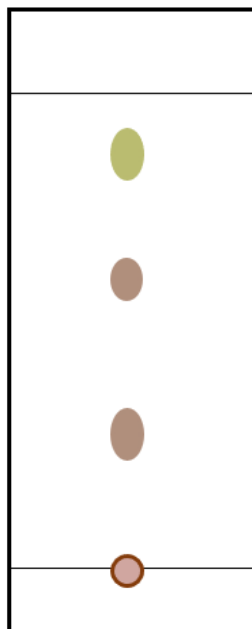


Рисунок 40 - Вид хроматограммы разделения суммы антоцианов листьев аронии Мичурина на примере сырья, заготовленного в сентябре

Таблица 9 - Результаты изучения ТСХ-профилей антоциановых соединений листьев аронии Мичурина изучаемых стадий заготовки

Стадия заготовки	Значение $R_f \pm 0,02$		
	0,30	0,64	0,82
Май	0,30	0,64	0,82
Июнь	0,31	0,64	0,81
Август	0,32	0,64	0,81
Сентябрь	0,32	0,62	0,81

Таким образом, методом ТСХ установлено, что в составе комплекса антоцианов, 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.

5.4. Исследование состава листьев аронии Мичурина методом газовой хромато-масс-спектрометрии

Метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором находит широкое применение для качественного и количественного анализа соединений в фармации, что обусловлено высокой селективностью и чувствительностью, а также возможностью разделять разные типы соединений в смеси с достаточной степенью разрешения [108]. В фармакогнозии в настоящее время в мировой практике все чаще данный метод используется для поиска маркерных соединений – уникальных компонентов, встречающихся только в данном виде ЛРС [18, 25, 41, 91, 203], присутствие которых может быть достаточным для идентификации сырья, его стандартизации и оценки качества. ГХ-МС может использоваться также при исследовании новых видов растительного сырья, играя важную роль в фитохимическом анализе и хемотаксономических исследованиях лекарственных растений. Так метод ГХ-МС перспективен для выявления характерных БАВ в листьях аронии Мичурина для их идентификации [46].

Данный раздел посвящен изучению компонентного состава листьев аронии Мичурина, как потенциального источника БАВ, а также динамики их накопления методом ГХ – МС.

Экстрагирование БАВ проводили по методике 1 ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [28, 29], экстрагент – спирт этиловый 96%, выбор которого обоснован ранее в работе (Глава 5, п. 2). Анализ осуществляли, как описано в Главе 2 (п. 8).

В результате исследования извлечений из листьев аронии были получены масс-спектры от 6 до 11 веществ органической природы. Все они были идентифицированы (Таблица 10). Масс-спектры основных идентифицированных компонентов представлены на Рисунке 41.

Таблица 10 - Результаты ГХ-МС анализа листьев аронии Мичурина, заготовленных на различных фенологических фазах

№ 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-Циклогексантиол (1α, 2β, 3α, 5β)-

Продолжение таблицы 10

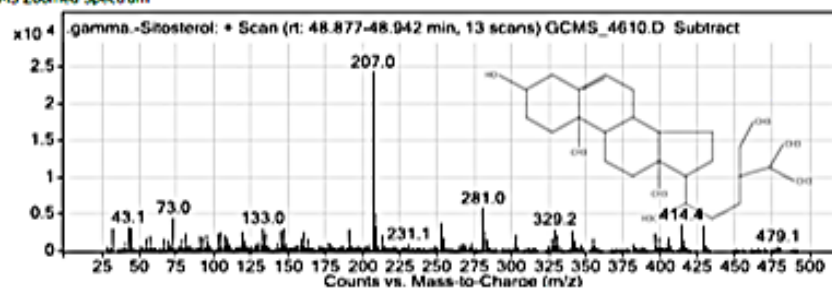
1	2	3	4
3	33,741	0,04	Z-(13,14-Эпоксид)тетрадек-11-ен-1-ол ацетат
4	36,383	3,21	d-Маннитол
5	48,897	0,29	γ-ситостерол
6	49,443	0,1	α-амирин
Стадия 2 (июнь)			
1	25,554	0,62	d-Манноза
2	29,083	3,34	1,2,3,5-Циклогексантиол (1α, 2β, 3α, 5β)-
3	36,851	7,38	сорбитол
4	45,7	0,06	3,9-Эпоксипрегн-16-ен-20-он, 3-метокси-7,11,18-триацетокси-
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-Циклогексантиол (1α, 2β, 3α, 5β)-
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-е]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-Циклогексантиол (1α, 2β, 3α, 5β)-

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
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	Этилизоаллохолат
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-е]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

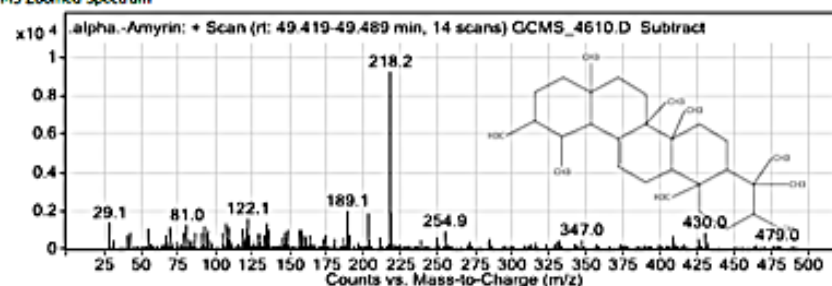
Следует отметить, что количество неполярных компонентов, извлекаемых 96% этиловым спиртом в листьях аронии Мичурина, мало. На всех этапах сбора в сырье присутствовали сахар d-манноза, многоатомный спирт - 1,2,3,5-циклогексантирол (1α, 2β, 3α, 5β)-, фитостерины γ-ситостерол и α-амирин. Прослеживается образование метаболитов в листьях аронии Мичурина на более поздних стадиях развития. Так многоатомный спирт d-маннитол, обнаруженный в листьях, собранных в мае, на последующих стадиях сбора сырья превращается в сорбитол. Сесквитерпеноид 2-Бутанон, 4-(2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-ил)-, вероятно, является наиболее уникальным соединением, так как нами не было найдено литературных данных о его присутствии в других видах растительного сырья. Однако данное соединение встречается только на стадии полной зрелости плодов, что не позволяет использовать его для идентификации листьев аронии Мичурина на других фазах развития растения. Горький гликозид - D-амигдалин также можно отнести к маркерным соединениям листьев. Однако, его появление в сырье характерно только для стадии зрелости плодов (август), сохраняясь на стадии начала покраснения листьев. По данным литературы остальные соединения, обнаруженные в этанольных экстрактах из листьев аронии Мичурина, присутствуют также и в других растительных источниках.

MS Zoomed Spectrum



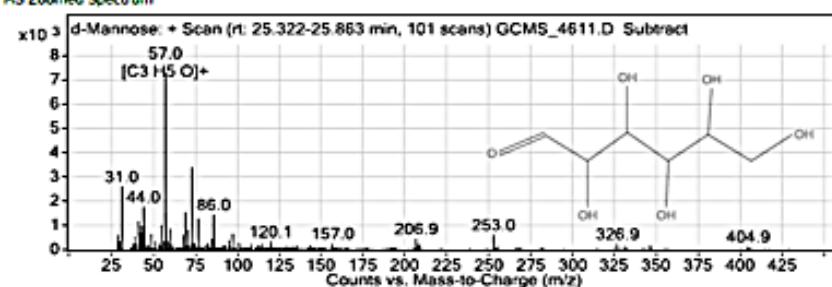
а

MS Zoomed Spectrum



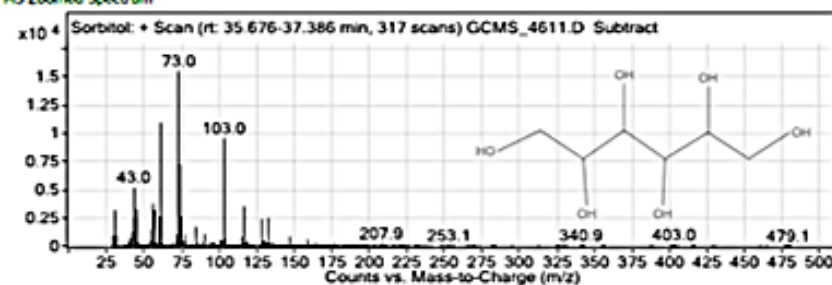
б

MS Zoomed Spectrum



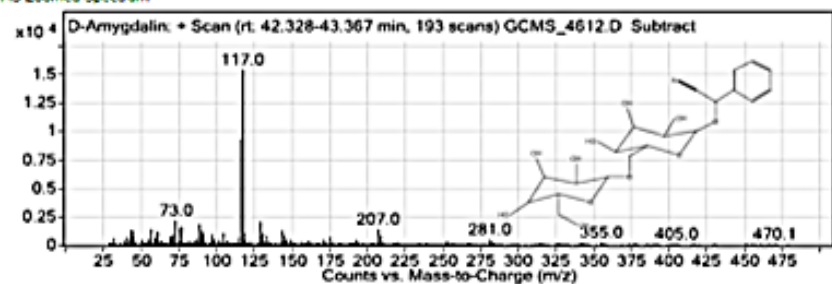
в

MS Zoomed Spectrum



г

MS Zoomed Spectrum



д

Рисунок 41 - Масс-спектры основных идентифицированных компонентов: а – γ-ситостерин, б – α-амирин, в – d-манноза, г – сорбитол, д – D-амигдалин

Наибольшее количество соединений группы сахаров и стеринам характерно было для листьев фазы сбора III – фазы технической зрелости плодов, что обуславливается накоплением данных БАВ в процессе жизнедеятельности (Рисунок 42 и 43). Максимальное количество стеринам установлено для периода сбора урожая (конец августа) и в сентябре (фаза покраснения листьев) [98].

Манноза – распространенный в растительном сырье моносахарид, впервые выделенный из ясеня манного [212]. Полисахариды, содержащие остатки маннозы, встречаются в зеленых кофейных бобах, в красных и зеленых морских водорослях, в лиственной и хвойной древесине, луковицах лилейных и т.д. [170, 201].

В соответствии с литературными данными 1,2,3,5-Циклогексантиол (1 α , 2 β , 3 α , 5 β)- содержится в траве стевии медовой [144], цветах каштана конского [126], плодах маклюры [88]. Z-(13,14-Эпоксид)тетрадекан-11-ен-1-ол ацетат ранее был обнаружен в корнях женьшеня обыкновенного [141]. 3,9-Эпоксипрегн-16-ен-20-он, 3-метокси-7,11,18-триацетокси- выявлен в метанольном экстракте цикламена персидского [196].

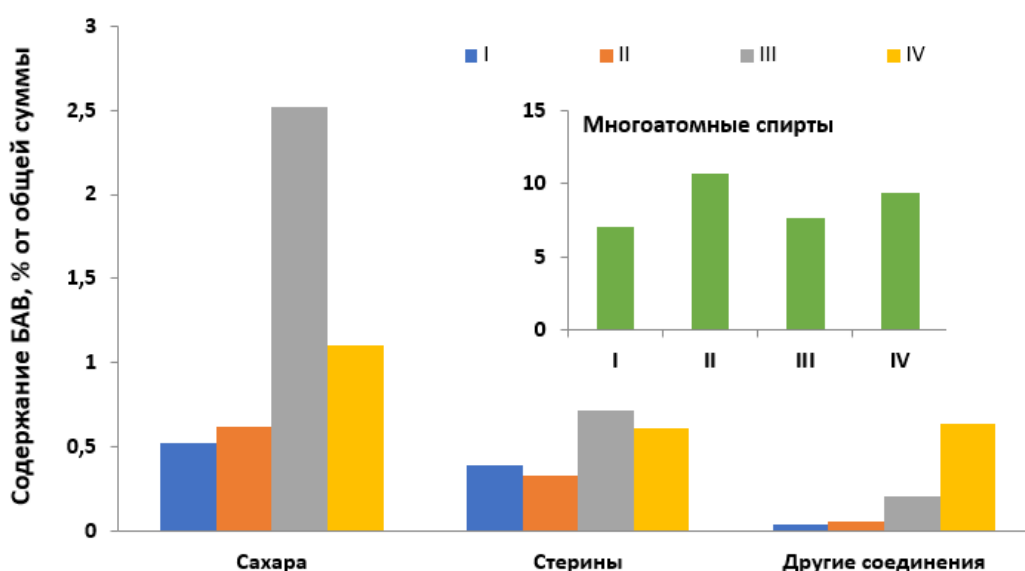


Рисунок 42 – Сравнительные данные по содержанию групп БАВ (%) в спиртовых извлечениях листьев аронии Мичурина различных фаз заготовки

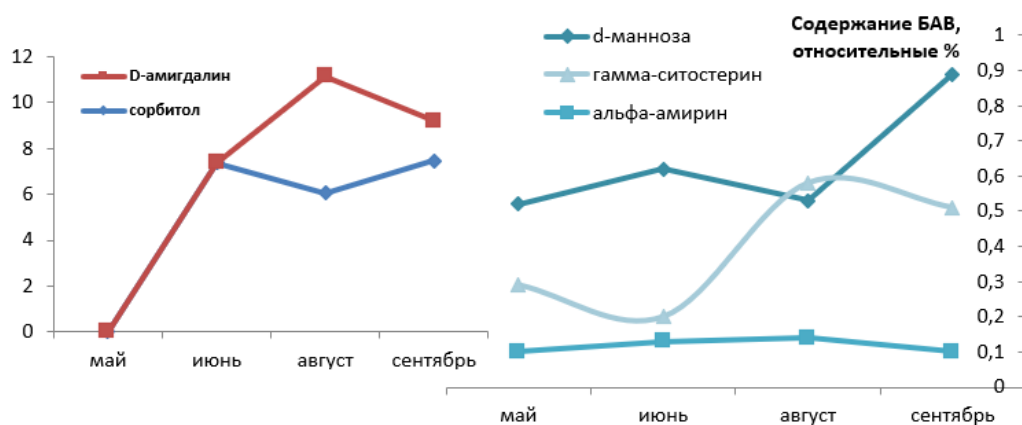


Рисунок 43 – Сравнительные данные по относительному содержанию отдельных БАВ (%) в спиртовых извлечениях листьев аронии Мичурина различных фаз заготовки

Лотос орехоносный [155], тис китайский [172] содержат в своем составе 1Н-Циклопропа[3,4]бенз[1,2-е]азулен-5,7b,9,9a-тетрол, 1a,1b,4,4a,5,7a,8,9-октигидро-3-(гидроксиметил)-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.)]-.

D-Амигдалин является типичным компонентом, характерным для представителей рода Розоцветные и, как правило, содержится только в семенах растений [66].

γ-Ситостерол – фитостерин, который встречается в таких видах сырья, как клопогон вонючий [42], представителях рода Очанка [56], семенах фасоли обыкновенной [119], семенах амаранта печального [145], цветках и коре каштана конского [126].

α-амирин – сапонин, также характерный для таких видов растительного сырья как володушка козелецелистная [87], кора березы [136], мискантус [69], татарник колючий [114]. Согласно литературным данным, в дурмане обыкновенном [193], рисе посевном [200], табернемонтане родственной [173] выявлен этилизоаллохолат. Такое вещество, как бензил-β-D-глюкозид выявлено, например, в цедронелле канарской [175].

Сорбитол является распространенным компонентом растительного сырья. Особенно им богаты плоды рябины обыкновенной [7]. Кроме того, он обнаружен и в плодах растений рябины черноплодной [35, 152].

d-Маннитол встречается в зеленых листьях, плодах, корнях, коре, семенах, соке древесных растений, например, в ясене обыкновенном [52]. Оба сахароспирта, согласно литературным данным, являются активными метаболитами углеводного обмена растений, могут принимать участие в дыхании и степень их накопления в органах растений зависит от стадии развития растения [137]. Как показывает наше исследование, в процессе развития растительных органов маннитол может превращаться в сорбитол.

На основании полученных результатов ГХ-МС анализа спиртового экстракта листьев аронии Мичурина как наиболее специфичные маркерные соединения, присутствующие в листьях на всем протяжении их развития, следует выделить 1,2,3,5-Циклогексантиол (1 α , 2 β , 3 α , 5 β)-, γ -ситостерол и α -амирин. Данные маркеры для нашего сырья не являются уникальными. Поэтому указанные вещества не могут быть рекомендованы для идентификации данного растительного сырья без использования дополнительных методов анализа.

Сесквитерпеноид 2-Бутанон, 4-(2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-ил)- и горький гликозид - D-амигдалин, вероятно, являются наиболее уникальными соединениями, так как нами не было найдено литературных данных об их присутствии в листьях других видов растительного сырья. Однако данные соединения встречается только на стадии полной зрелости плодов, что не позволяет использовать его для идентификации листьев аронии Мичурина на других фазах развития растения.

Присутствие малого числа специфичных маркеров при отсутствии уникальных на большинстве стадий заготовки сырья, свидетельствует о том, что ГХ-МС не может рассматриваться как единственный метод стандартизации листьев аронии Мичурина. Для получения достоверных результатов необходимы дополнительные методы исследования.

5.5. Количественное определение биологически активных веществ листьев аронии Мичурина

5.5.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии

В основу разработки легла стандартная фармакопейная методика определения суммы флавоноидов в ЛРС с применением дифференциальной спектрофотометрии, которая была адаптирована для изучаемого объекта исследования.

В ходе предварительно проведенных экспериментов было установлено, что наибольший выход суммы флавоноидов в пересчете на рутин (абсолютно сухое сырье) наблюдается в случае экстрагирования листьев аронии Мичурина спиртом этиловым с концентрацией 60%. При этом необходимо соблюдать соотношение «сырье : экстрагент» 1:50. Оптимальное время экстракции для извлечения флавоноидов из сырья 90 минут. При увеличении времени экстрагирования до 120 минут выход флавоноидов повышался незначительно, а дальнейшее увеличение времени приводило к его снижению. Экстракция происходила полнее при измельчении сырья до размеров частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 – 1,0 мм (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние условий экстрагирования на выход флавоноидов из листьев аронии Мичурина

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Концентрация спирта, %	
50	$2,73 \pm 0,52$
60	$3,67 \pm 0,24$
70	$2,30 \pm 0,28$
80	$2,01 \pm 0,36$
90	$1,91 \pm 0,42$
96	$1,49 \pm 0,23$

1	2
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:25	$3,35 \pm 0,25$
1:50	$3,40 \pm 0,34$
1:100	$3,39 \pm 0,41$
Время экстрагирования, мин	
30	$3,01 \pm 0,26$
60	$3,05 \pm 0,21$
90	$3,68 \pm 0,37$
120	$3,70 \pm 0,45$
150	$3,17 \pm 0,32$
180	$3,03 \pm 0,61$
Размер частиц сырья, мм	
0,2 – 0,5	$3,15 \pm 0,25$
0,5 – 1,0	$3,46 \pm 0,14$
1,0 – 2,0	$3,52 \pm 0,31$
2,0 - 3,0	$3,35 \pm 0,43$

Наличие максимума на спектре испытуемого извлечения с добавкой алюминия хлорида относительно раствора сравнения при 410 ± 2 нм подтвердило возможность пересчета суммы флавоноидов на рутин (Рисунок 44).

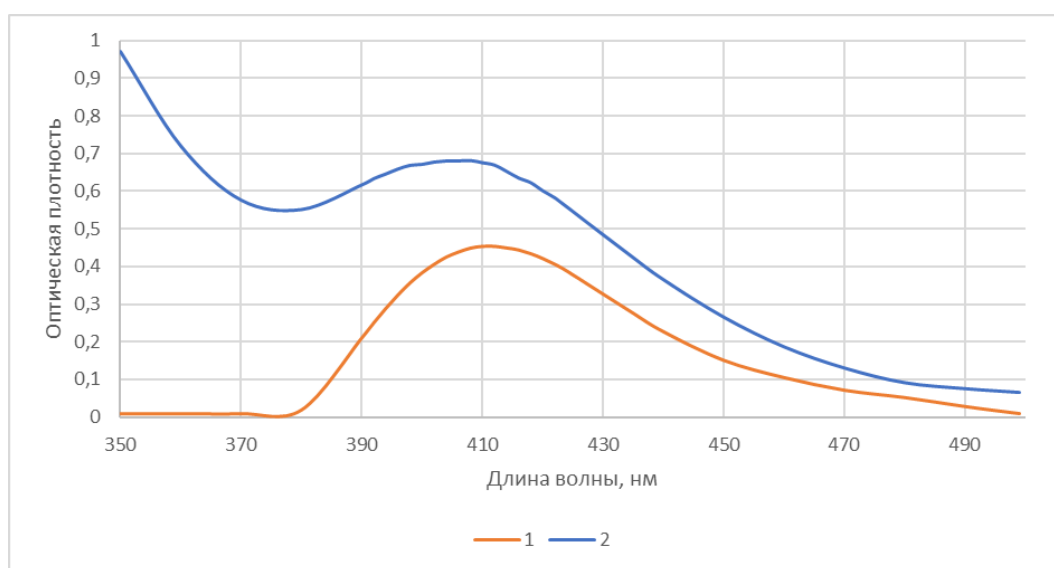


Рисунок 44 – Вид дифференциального спектра поглощения: 1 – 0,5% раствор СО рутин; 2 - извлечения из листьев аронии

На следующем этапе определяли оптимальные условия образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом. Наиболее устойчивая окраска наблюдалась при добавлении к извлечению 6% раствора алюминия хлорида в соотношении 1:3 при выдерживании раствора для созревания окраски в течение 60-80 мин (Таблица 12).

Таблица 12 – Выбор оптимальных условий образования комплекса флавоноидов листьев аронии Мичурина с алюминия хлоридом

Условие комплексообразования	Концентрация флавоноидов в образце, %
Концентрация раствора алюминия хлорида, %	
2	$2,36 \pm 0,19$
3	$2,44 \pm 0,21$
4	$2,79 \pm 0,17$
5	$3,10 \pm 0,05$
6	$3,45 \pm 0,13$
7	$3,36 \pm 0,23$
Соотношение «объем извлечения : объем 6% раствора алюминия хлорида»	
1:1	$3,15 \pm 0,19$
1:2	$3,57 \pm 0,26$
1:3	$3,63 \pm 0,27$
1:4	$3,64 \pm 0,31$
1:5	$3,63 \pm 0,52$
Время выдерживания образца с раствором алюминия хлорида, мин	
20	$3,69 \pm 0,27$
30	$3,79 \pm 0,43$
40	$3,81 \pm 0,31$
50	$3,80 \pm 0,24$
60	$3,88 \pm 0,17$
70	$3,92 \pm 0,17$
80	$4,00 \pm 0,19$
90	$3,80 \pm 0,23$
100	$3,79 \pm 0,38$
110	$3,77 \pm 0,22$

На основании полученных результатов была разработана методика [107, 131].

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60% спирта этилового и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 90 минут. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 60% спиртом этиловым. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора хлорида алюминия в 96% этиловом спирте, подкисляют 1 каплей раствора уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают (раствор Б). Через 80 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл раствора А, 1 каплю раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность СО рутина: около 0.025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до полного растворения рутина. Охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора до метки, перемешивают и оставляют на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: 1 мл раствора А, 1 капля раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 50 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – навеска сырья, г; a_0 – навеска СО рутина, г; W – влажность сырья, %; P – содержание основного вещества в СО рутина, %

Основные метрологические характеристики методики представлены в Таблице 13.

Таблица 13 - Метрологические характеристики спектрофотометрического определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина ($P=95\%$, $t(P, f)=2,57$)

$\bar{x}, \%$	n	f	s^2	s	$s_{\bar{0}}$	$S, \%$	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
3,52	6	5	0,0292	0,1710	0,0698	1,98	0,42	0,17	4,85

Специфичность, правильность, линейность, сходимость и межлабораторная прецизионность были доказаны в ходе валидации разработанной методики.

При добавлении к исследуемому извлечению 0,05% СО рутина дифференциальный спектр имеет значительное увеличение оптической плотности в максимуме поглощения, что подтверждает специфичность методики (Рисунок 45).

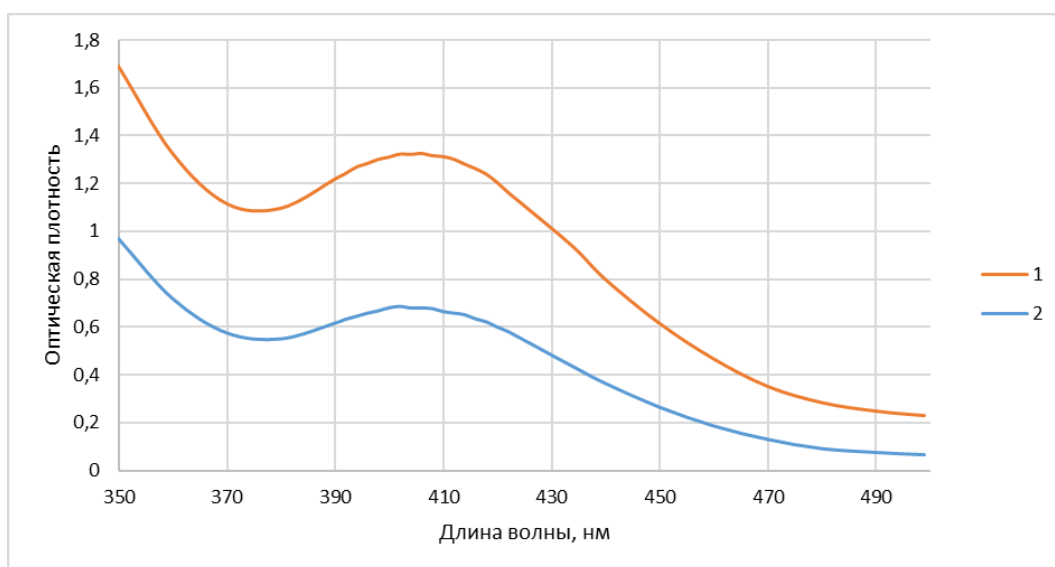


Рисунок 45 – Вид спектра поглощения извлечения из листьев аронии Мичурина: 1 – без добавки СО рутина, 2 – с добавкой СО рутина.

Определение правильности методики проводили методом добавок СО рутина к аликвоте полученного извлечения. Прибавляли по 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл 0,05% раствора СО в трех повторениях. Результаты определения правильности приведены в Таблице 14. Открываемость в среднем составила 100,63%, что соответствует критерию приемлемости $100\% \pm 5\%$.

Таблица 14 - Результаты определения правильности методики количественного определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина

Содержание флавоноидов в извлечении, мг/мл	Введено рутина, мг/мл	Рассчитанное количество, мг/мл	Найдено, мг/мл	Открываемость, %
0,005	0,250	0,255	0,257	100,86
			0,265	103,67
			0,262	102,58
	0,500	0,505	0,499	98,82
			0,528	104,53
			0,518	102,44
	0,750	0,755	0,131	99,84
			0,754	96,15
			0,726	96,77

Линейность подтверждали путем приготовления растворов, отбирая извлечение в диапазоне от 70 до 130% номинального значения (Таблица 15).

Таблица 15 – Схема разбавления извлечения для определения линейности методики

Концентрация	Объем извлечения, мл	Объем разведения, мл
70%	0,7	25
80%	0,8	25
90%	0,9	25
100%	1,0	25
110%	1,1	25
120%	1,2	25
130%	1,3	25

Зависимость оптической плотности от содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин линейна, что отражено на Рисунке 46.

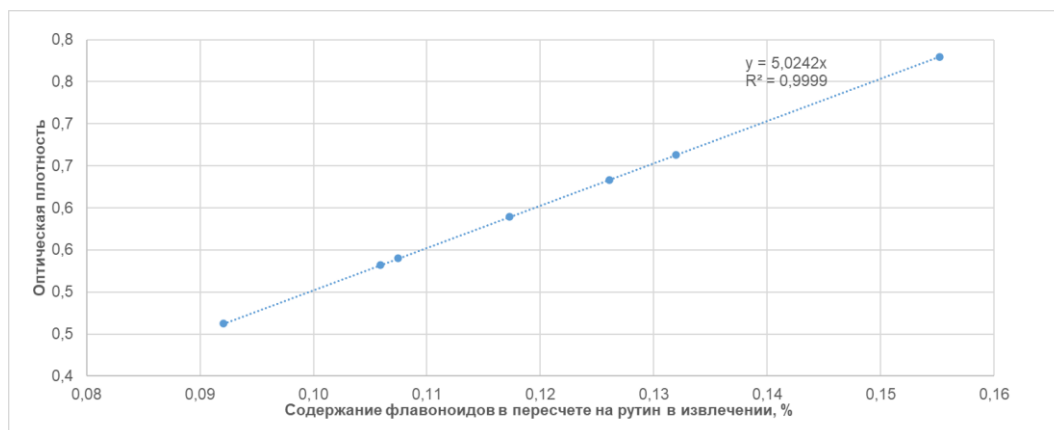


Рисунок 46 – График линейной зависимости оптической плотности от содержания флавоноидов в пересчете на рутин

Валидационные характеристики определения линейности методики приведены в Таблице 16. Линейность зависимости подтверждается коэффициентом корреляции $r \geq 0,99$.

Сходимость методики определялась в шести повторениях. Межлабораторную прецизионность подтверждали проведением измерения разными исполнителями также в шести повторениях. Результаты приведены в Таблице 16. Относительные стандартные отклонения не превысили критериев приемлемости 2% и 5%, соответственно.

Таблица 16 – Валидационные характеристики методики определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат
1	2	3
Линейность	Уравнение прямой	$y=5,0242x$
	Угловой коэффициент (a)	5,0242
	Свободный член b	0
	Коэффициент корреляции	0,9999

Продолжение таблицы 16

1	2	3	
Линейность	Область линейности (по содержанию флавоноидов в извлечении), г/мл	0,9-1,6·10 ⁻³	
Сходимость	Проба	Содержание суммы флавоноидов, %	
	1	3,35	
	2	3,36	
	3	3,48	
	4	3,55	
	5	3,64	
	6	3,79	
	Доверительный интервал (P=95%), %	3,53±0,17	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,98	
	Стандартное отклонение (SD), %	0,17	
Межлабораторная прецизионность	Проба	Исследователь 1	Исследователь 2
	1	3,35	2,79
	2	3,36	2,93
	3	3,48	3,10
	4	3,55	3,15
	5	3,64	3,88
	6	3,79	3,37
	Доверительный интервал (P=95%), %	3,37±0,51	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	2,85	
	Стандартное отклонение (SD), %	0,33	

Таким образом, было доказано, что разработанная методика валидна и, как следствие, может использоваться для определения содержания флавоноидов в листьях аронии Мичурина.

Содержание суммы флавоноидов в листьях рябины черноплодной достаточно высоко и сопоставимо, а в некоторых случаях превышает таковое в фармакопейных видах растительного сырья. Например, содержание суммы

флавоноидов в пересчете на рутин в цветках бузины черной должно быть не менее 2%, листьях вахты трехлистной – не менее 1%, листьях гинкго двулопастного – не менее 0.5% [28, 29].

С помощью полученной методики определяли динамику накопления флавоноидов в листьях аронии Мичурина (Таблица 17).

Таблица 17 –Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в листьях аронии Мичурина различных сроков заготовки

Фаза сбора	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
Цветение (май)	$3,94 \pm 0,33$
Начало плодоношения (июнь)	$4,20 \pm 0,12$
Техническая зрелость плодов (август)	$3,48 \pm 0,21$
Начало покраснения листьев (сентябрь)	$3,47 \pm 0,25$

Согласно табличным данным, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях рябины черноплодной достаточно высоко во все периоды заготовки. Максимальным оно является в сырье, заготовленном на стадии начала плодоношения (июнь) $4,20\% \pm 0,12\%$. Однако, проводить заготовку листьев в промышленных масштабах на данной стадии нецелесообразно ввиду необходимости сохранения БАВ в плодах растения. На дальнейших стадиях содержание флавоноидов снижается, но остается достаточно высоким. Разница между содержанием флавоноидов в листьях аронии Мичурина в августе и сентябре незначительна, поэтому этот период может быть рекомендован для сбора сырья.

В соответствии с литературными данными, содержание флавоноидов в плодах рябины черноплодной различных сортов варьирует от 1,5% до 2,2% [43]. Таким образом, суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин в плодах аронии ниже, чем в листьях.

5.5.2 Определение суммы дубильных веществ в пересчете на катехин методом УФ-спектрофотометрии

В предварительных исследованиях содержание дубильных веществ в листьях аронии Мичурина определяли с помощью перманганатометрической методики в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания, перманганатометрического титрования с осаждением дубильных веществ желатином, а также спектрофотометрической методики в пересчете на танин, катехин и пирогаллол в пересчете на абсолютно сухое сырье (Таблица 18) [102].

Таблица 18 – Определение суммы дубильных веществ в листьях аронии Мичурина различными методами

Метод количественного определения	Содержание дубильных веществ, %	$\bar{x}$, %
Перманганатометрический метод	11,03±0,49	4,47
Перманганатометрический метод с осаждением дубильных веществ желатином	9,21±0,94	10,19
Спектрофотометрический метод с использованием СО катехина	15,21±0,40	2,20
Спектрофотометрический метод с использованием СО пирогаллола	4,38±0,13	2,45
Спектрофотометрический метод с использованием СО танина	1,93±0,04	2,65

Для дальнейших исследований был выбран спектрофотометрический метод в пересчете на катехин, так как по результатам качественных определений, среди дубильных веществ листьев аронии преобладают относящиеся к группе конденсированных, являющихся производными катехина. Сравнивая величину относительного стандартного отклонения полученных результатов, приоритет так же должен быть отдан спектрофотометрическому методу определения. Вид спектра поглощения извлечения после добавки СО катехина показывал гиперхромное увеличение при 278 ± 2 нм (Рисунок 47), что свидетельствует о специфичности данной методики.

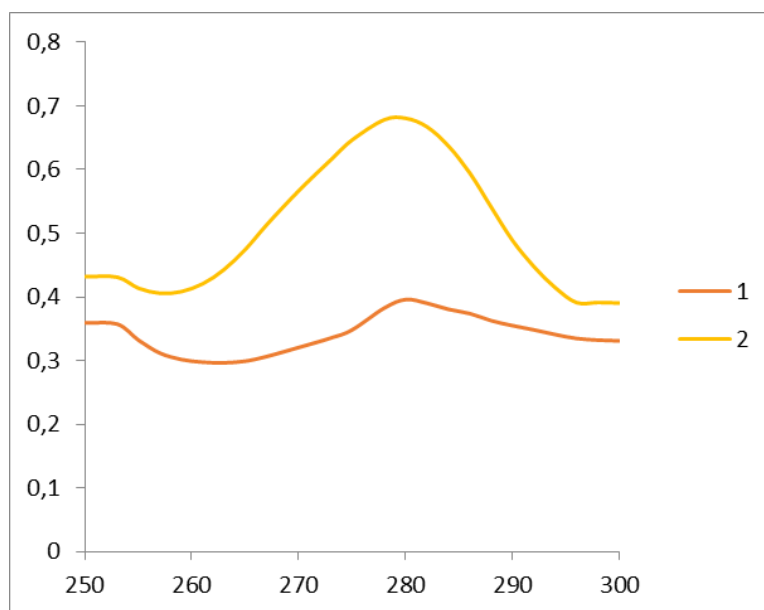


Рисунок 47 – Вид спектра поглощения извлечения из листьев аронии Мичурина: 1 – без добавки СО катехина, 2 – с добавкой СО катехина

В ходе предварительно проведенных исследований было установлено, что наибольший выход суммы дубильных веществ в пересчете на катехин (абсолютно сухое сырье) наблюдается в случае экстрагирования листьев аронии Мичурина водой очищенной в соотношении «сырье : экстрагент» 1:100. Оптимальное время извлечения составило 30 минут. При увеличении времени экстрагирования выход дубильных веществ повышался незначительно. Экстракция происходила полнее при измельчении сырья до размеров частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1,0– 2,0 мм (Таблица 19).

Таблица 19 – Влияние условий экстрагирования на выход дубильных веществ из листьев аронии Мичурина

Условия экстракции	Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин, %
1	2
Соотношение «сырье : экстрагент»	
1:25	9,45 ± 0,25
1:50	9,76 ± 0,34
1:100	10,05±0,26
1:125	9,91 ± 0,41
1:250	9,58 ± 0,56

Продолжение таблицы 19

1	2
Время экстрагирования, мин	
30	10,01±0,21
60	10,19 ± 0,18
90	10,24 ± 0,29
Размер частиц сырья, мм	
0,2 – 0,5	7,89 ± 0,54
0,5 – 1,0	9,04 ± 0,14
1,0 – 2,0	10,56 ± 0,25
2,0 - 3,0	9,98 ± 0,32

Методика количественного определения дубильных веществ в листьях аронии Мичурина в пересчете на катехин. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 2 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом, вместимостью 500 мл, прибавляют 250 мл воды очищенной и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы водой очищенной. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность СО катехина: около 0.05 г (точная навеска) катехина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл воды очищенной, растворяют при взбалтывании. Доводят объем раствора до метки водой очищенной (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем раствора до метки (раствор Б). Оптическую

плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: вода очищенная.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 250 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_{ct} \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100 - W)} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 250 \cdot P}{A_{ct} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; A_{ct} – оптическая плотность стандартного образца; a – навеска сырья, г; a_0 – навеска СО катехина, г; W – влажность сырья, %; P – содержание основного вещества в СО катехина, %

В результате использования модифицированной фармакопейной методики установлено, что содержание дубильных веществ в листьях составляет $10,61\% \pm 0,18\%$. Основные метрологические характеристики методики представлены в Таблице 20.

Таблица 20 - Метрологические характеристики спектрофотометрического определения дубильных веществ в листьях аронии Мичурина в пересчете на катехин ($P=95\%$, $t(P, f)=2,57$)

$\bar{x}, \%$	n	f	s^2	s	$s_{\bar{0}}$	S, %	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
10,61	6	5	0,0286	0,1690	0,0690	0,6501	0,43	0,18	1,67

Специфичность, правильность, линейность, сходимость и межлабораторная прецизионность были доказаны в ходе валидации модифицированной методики.

Специфичность можно считать доказанной, так как при добавлении раствора стандартного образца (СО) (+)-катехин гидрата спектр имеет аналогичный вид (Рисунок 47).

Правильность методики определяли методом добавок стандартного образца (+)-катехин гидрата. К аликвоте полученного извлечения прибавляли по 0,5, 1,0 и 1,5 мл 0,1% раствора СО в трех повторениях. Полученные модельные смеси анализировали по выбранной методике. Результаты определения правильности методики приведены в Таблице 21. Критерием приемлемости по показателю

правильности является открываемость, которая должна находиться в пределах $100\% \pm 5\%$ [28, 29].

Таблица 21 - Результаты определения правильности методики количественного определения дубильных веществ в листьях аронии Мичурина

Содержание дубильных веществ в извлечении, мг	Введено (+)-катехин, мг	Рассчитанное количество, мг	Найдено, мг	Открываемость, %
0,900	0,500	1,400	1,460	104,34
		1,400	1,449	103,52
		1,400	1,446	103,34
	1,000	1,900	1,976	104,04
		1,900	1,878	98,85
		1,900	1,977	104,09
	1,500	2,400	2,283	95,12
		2,400	2,339	97,48
		2,400	2,410	100,42

Согласно табличным данным, средний процент открываемости для трех добавленных концентраций (+)-катехин составляет $101,42\% \pm 2,63\%$.

Для подтверждения линейности методики отбирали 8 аликвот в пределах от 70% до 130% от номинального значения. Схема приготовления растворов для проведения анализа представлена в Таблице 22.

Таблица 22 – Схема приготовления растворов различных концентрация для определения линейности методики

Уровень концентрации	Объем аликвоты, мл	Объем разведения, мл
70%	0,7	25
80%	0,8	25
90%	0,9	25
100%	1,0	25
110%	1,1	25
120%	1,2	25
130%	1,3	25

График зависимости оптической плотности от содержания дубильных веществ в пересчете на (+)-катехин в извлечениях из листьев рябины черноплодной имеет линейный характер (Рисунок 48).



Рисунок 48– График линейной зависимости оптической плотности от содержания дубильных веществ в пересчете на (+)-катехин

Валидационные характеристики определения линейности методики приведены в таблице 23. Так как коэффициент корреляции $r \geq 0,99$, подтверждается наличие линейной зависимости оптической плотности от концентрации дубильных веществ в листьях аронии Мичурина.

Сходимость методики определялась в шести повторениях. Межлабораторную прецизионность подтверждали проведением измерения разными исполнителями также в шести повторениях. Результаты приведены в таблице 23. Относительные стандартные отклонения не превысили критериев приемлемости 2% и 5%, соответственно.

Исходя из результатов проведенных определений методика валидна и может использоваться для проведения определения дубильных веществ в листьях аронии Мичурина [12, 131].

Таблица 23 – Валидационные характеристики методики определения дубильных веществ в листьях аронии Мичурина

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат	
1	2	3	
Линейность	Уравнение прямой	$y=1,146x$	
	Угловой коэффициент (a)	1,146	
	Свободный член b	0	
	Коэффициент корреляции	0,9999	
	Область линейности (по содержанию дубильных веществ в извлечении), г/мл	$0,32-0,49 \cdot 10^{-2}$	
Сходимость	Проба	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	1	10,34	
	2	10,64	
	3	10,73	
	4	10,48	
	5	10,78	
	6	10,70	
Сходимость	Доверительный интервал (P=95%), %	$10,61 \pm 0,18$	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,59	
	Стандартное отклонение (SD), %	0,17	
Межлабораторная прецизионность	Проба	Исследователь 1	Исследователь 2
	1	9,50	10,34
	2	9,87	10,64
	3	10,09	10,73
	4	9,57	10,48
	5	10,01	10,78
	6	9,50	10,70
	Доверительный интервал (P=95%), %	$10,18 \pm 0,45$	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	4,93	
	Стандартное отклонение (SD), %	0,50	

Содержание танинов в листьях рябины черноплодной сопоставимо с таковым в фармакопейных видах сырья, а в ряде случаев и превышает это содержание (кора дуба, плоды черемухи обыкновенной) [28, 29]. Содержание дубильных веществ в плодах рябины черноплодной при определении их спектрофотометрической методикой в пересчете на танин значительно ниже и варьирует в диапазоне 0,98-1,53% в зависимости от сорта [47].

Результаты определения динамики накопления дубильных веществ в листьях приведены в Таблице 24.

Таблица 24 - Содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в листьях аронии Мичурина различных сроков заготовки

Фаза сбора	Содержание дубильных веществ в пересчете на (+)-катехин, %
Цветение (май)	14,20±0,91
Начало плодоношения (июнь)	12,53±0,72
Техническая зрелость плодов (август)	8,63±0,32
Начало покраснения листьев (сентябрь)	8,35±0,16

Согласно табличным данным, содержание дубильных веществ в листьях рябины черноплодной достаточно высоко во все периоды заготовки. Максимальным оно является в сырье, заготовленном на стадии цветения растения (май) (14,20±0,91) %. К стадии плодоношения (июнь) их содержание в сырье снижается и в начале образования плодов составляет (12,53±0,72) %. На дальнейших стадиях содержание таннинов снижается еще сильнее. Минимума оно достигает в сентябре, когда листья начинают краснеть. Однако, разница между содержанием таннинов в августе в период полного созревания плодов и в сентябре незначительна, (8,63±0,32) % и (8,35±0,16) %, соответственно [103].

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что оптимальным временем заготовки листьев рябины черноплодной является май в период цветения. Это позволит получать сырье с максимальным содержанием дубильных веществ. Однако сбор листьев на данной стадии может привести к

нарушению развития плодов. Кроме того, листья в мае имеют очень малый размер, поэтому их заготовка может оказаться нецелесообразной.

Так как содержание дубильных веществ высоко и на более поздних стадиях заготовки, эти стадии также могут быть рекомендованы для заготовки листьев.

5.5.3. Разработка и валидация методики количественного определения антоцианов в аронии Мичурина листьях

Антоцианы – полифенольные пигменты растений. В зеленых частях растения они могут встречаться в форме бесцветных предшественников — антоцианов. Переход антоцианов в антоцианы происходит при сезонном изменении природных условий, а также в присутствии хлористоводородной кислоты [21, 30].

Одним из источников антоциановых соединений является арония Мичурина. Антоцианы считаются основной группой БАВ плодов всех представителей рода Арония. Существуют данные о присутствии в листьях аронии цианидин-3-галактозида и цианидин-3-арабинозида с преобладанием первого [176], что обуславливает перспективность более глубокого изучения содержания в аронии Мичурина листьях антоциановых соединений, присутствующих в сырье в лейкоформе. Поэтому на следующем этапе проводили разработку и валидацию спектрофотометрической методики количественного определения суммы антоцианов в аронии Мичурина листьях для внедрения её в нормативную документацию.

На этапе предварительных исследований была разработана методика количественного спектрофотометрического определения антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в листьях аронии Мичурина [95, 100].

Результаты определения содержания антоцианов в извлечениях из листьев рябины черноплодной, полученных при разных условиях экстрагирования представлены в Таблице 25. Также определено оптимальное соотношение «сырье: экстрагент», в качестве экстрагента использовался спирт этиловый 96%, подкисленный кислотой хлористоводородной.

Таблица 25 – Результаты количественного определения антоцианов в листьях аронии Мичурина при разных условиях экстрагирования

Условие экстракции		Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %
Соотношение «сырье : экстрагент»		
1:250		9,47±0,78
1:100		7,38±0,80
1:50		8,01±0,64
1:10		7,86±1,71
Продолжительность экстрагирования, ч	Размер частиц, мм	
2	От 0,2 до 0,5	8,15±1,23
	От 0,5 до 1	7,11±1,34
	От 1 до 2	5,98±1,87
	От 2 до 3	4,84±1,38
3,5	От 0,2 до 0,5	13,20±0,67
	От 0,5 до 1	11,1±0,92
	От 1 до 2	8,6±1,75
	От 2 до 3	6,40±1,28
4,5	От 0,2 до 0,5	14,30±0,71
	От 0,5 до 1	12,27±0,89
	От 1 до 2	9,44±1,46
	От 2 до 3	7,04±1,17

Размер частиц сырья и время экстрагирования оказывают существенное влияние на количество антоцианов, переходящих в подкисленные спиртовые извлечения из листьев рябины черноплодной (Рисунок 49).

Наибольшее выход суммы антоцианов в форме собственно антоциановых соединений в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид наблюдается при проведении экстрагирования в течение 4,5 ч. Поскольку различие в количестве этих БАВ между временными интервалами 3,5 и 4,5 ч невелико, для дальнейших исследований может быть рекомендовано как время 3,5 ч, с целью сокращения общего времени пробоподготовки, так и время 4,5 ч, позволяющее несколько увеличить выход из сырья антоцианов в извлечение в виде антоциановых соединений.

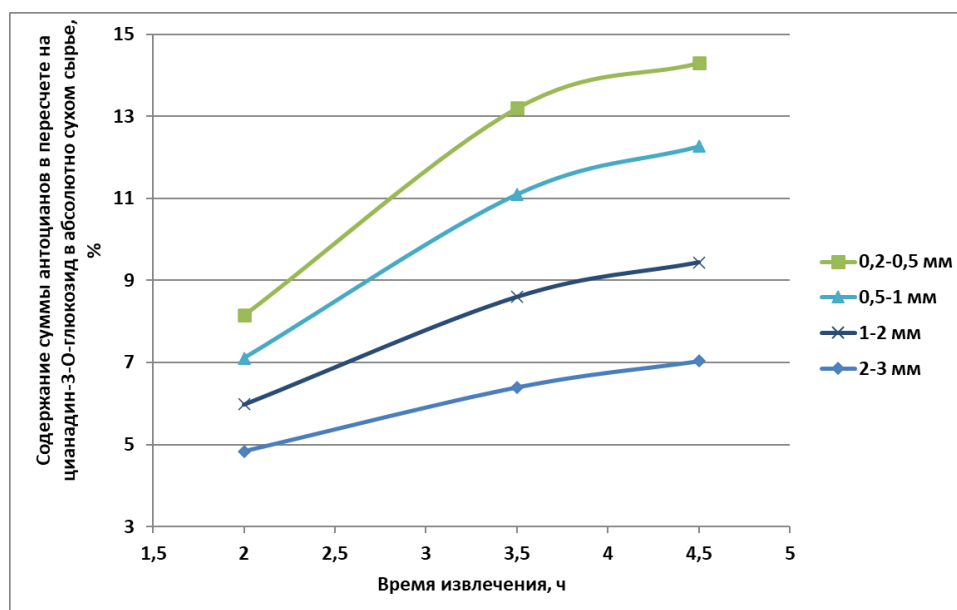


Рисунок 49 – График зависимости содержания суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид от времени извлечения

Оптимальным соотношением «сырье : экстрагент» может быть выбрано соотношение 1:250. При увеличении массы сырья содержание антоцианов снижалось, однако находилось приблизительно на одном уровне. Экстракция происходила полнее при измельчении сырья до размеров частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,2– 0,5 мм.

Исходя из вышесказанного была разработана следующая методика. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.

Около 0,2 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 96% спирта этилового, подкисленного кислотой хлористоводородной до концентрации 1% и взвешивают. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 3,5 часов. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы подкисленным 96% этиловым спиртом до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

3 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора экстрагентом до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 540 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 96% спирт этиловый, подкисленный кислотой хлористоводородной до концентрации 1%. (раствор В).

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A_x \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; a – навеска сырья, г; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 540 ± 2 нм, равный 100; W – влажность сырья, %.

Валидацию разработанной методики проводили по показателям специфичности, правильности, линейности, области линейности, сходимости, межлабораторной прецизионности [28, 29].

Основные метрологические характеристики методики представлены в Таблице 26. В качестве опорного значения при валидации принято содержание $9,82 \pm 0,4\%$ в сырье [93, 131].

Таблица 26 - Метрологические характеристики спектрофотометрического определения антоцианов в листьях аронии Мичурина ($P=95\%$, $t(P, f)=2,57$)

$\bar{x}, \%$	n	f	s^2	s	s_0	S, %	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
9,82	6	5	0,13	0,39	0,16	1,60	0,99	0,40	4,11

Специфичность методики оценивали по совпадению положения максимумов на спектрах поглощения индивидуального цианидин-3-О-глюкозида (литературные данные) и исследуемого извлечения (Рисунок 50). Для цианидин-3-О-глюкозида характерен широкий пологий максимум поглощения, расположенный при 540 ± 2 нм [28, 29].

Линейность подтверждали путем приготовления растворов, отбирая извлечение в диапазоне от 70 до 130% номинального значения (Таблица 27).

Зависимость оптической плотности от содержания суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид линейна, что отражено на рисунке 51 и подтверждается значением коэффициента корреляции, близким к 1,0.

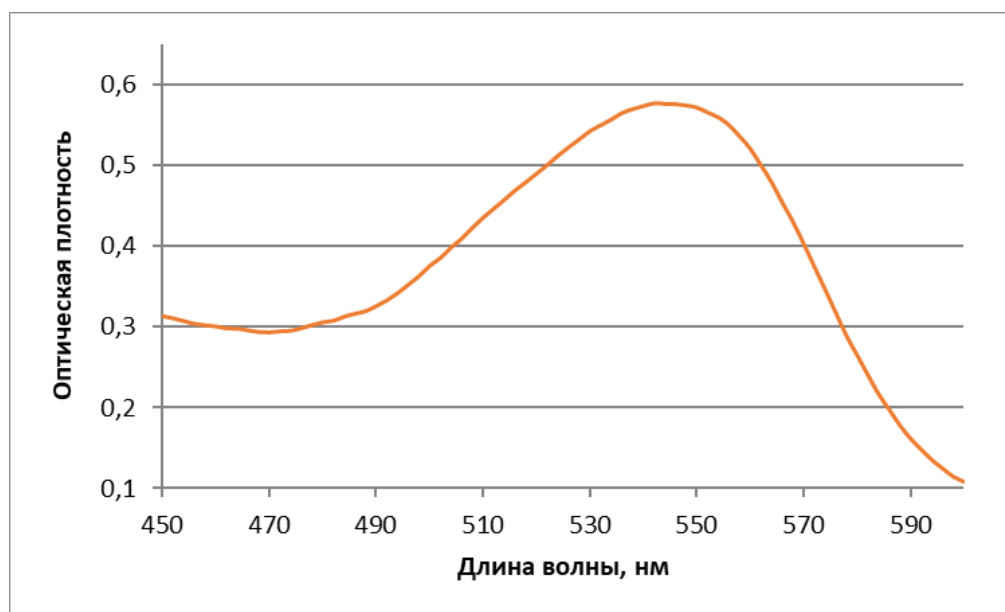


Рисунок 50 - Вид спектра поглощения извлечения из листьев аронии Мичурина, полученного с применением подкисленного спирта этилового 96%

Таблица 27 – Схема разбавления извлечения для определения линейности методики

Концентрация, % от исходного	Объем извлечения, мл	Объем разведения, мл
70%	2,1	25
80%	2,4	25
90%	2,7	25
100%	3,0	25
110%	3,3	25
120%	3,6	25
130%	3,9	25

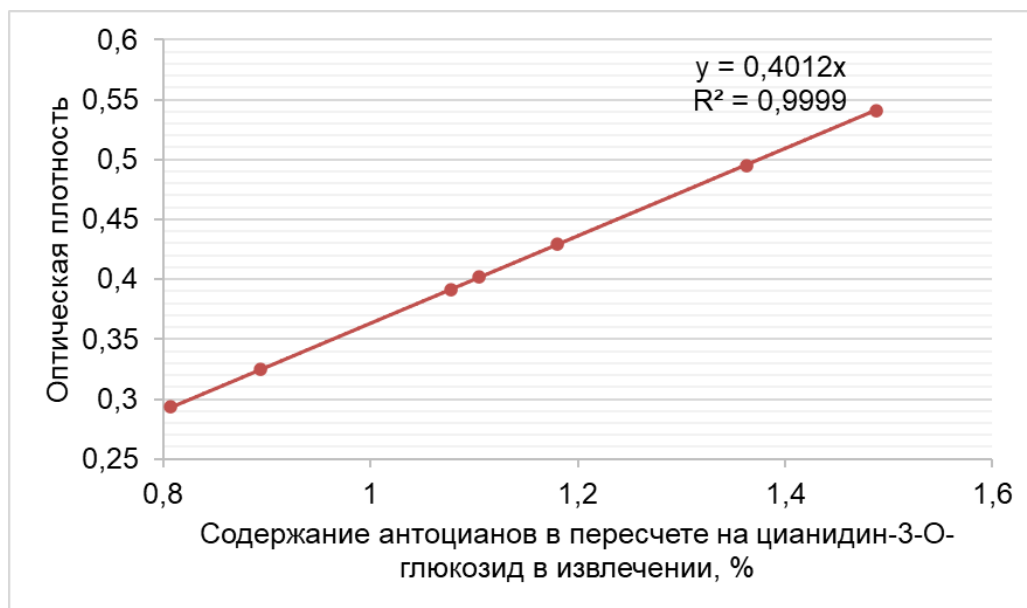


Рисунок 51 – График линейной зависимости оптической плотности от содержания собственно антоцианов в извлечении в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид

Сходимость методики определялась в шести повторениях одним исполнителем. Межлабораторную прецизионность подтверждали проведением измерения разными исполнителями в разные дни в шести повторениях каждый. Результаты приведены в Таблице 28. Относительные стандартные отклонения не превысили критериев приемлемости в 5%.

Таблица 28 – Валидационные характеристики методики определения антоцианов в аронии Мичурина листьях

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат
1	2	3
Сходимость	Проба	Содержание суммы антоцианов, %
	1	9,60
	2	9,72
	3	9,21
	4	10,16
	5	10,02
	6	10,20
	Доверительный интервал (P=95%), %	9,82±0,40

1	2	3	
Сходимость	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,60	
	Стандартное отклонение (SD), %	0,42	
Межлабораторная прецизионность	Проба	Исследователь 1 (день 1)	Исследователь 2 (день 2)
	1	9,21	8,01
	2	9,60	8,12
	3	9,72	8,18
	4	10,16	8,53
	5	10,02	8,93
	6	10,20	8,97
	Доверительный интервал (P=95%), %	9,17±1,42	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	2,90	
	Стандартное отклонение (SD), %	0,92	
Линейность	Уравнение прямой	$y=0,3636x$	
	Угловой коэффициент (a)	0,3636	
	Свободный член b	0	
	Коэффициент корреляции	0,9999	
	Область линейности (по содержанию антоцианов в извлечении), г/мл	$0,81-1,49 \cdot 10^{-2}$	

Правильность методики считается доказанной, если свободный член уравнения линейности меньше своего доверительного интервала. В нашем случае свободный член равен нулю.

Таким образом, было доказано, что разработанная методика валидна и, как следствие, может использоваться для определения содержания антоцианов в листьях аронии Мичурина для цели их стандартизации.

С помощью валидированной методики определяли динамику накопления БАВ в сырье, а также оптимальные сроки заготовки аронии Мичурина листьев, обеспечивающие максимальное содержание антоцианов в них (Таблица 29).

Таблица 29 – Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в листьях аронии Мичурина различных сроков заготовки

Фаза сбора	Содержание антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, %
май	10,71±1,33
июнь	10,81±1,01
август	11,62±0,69
сентябрь	12,77±0,95

Согласно полученным данным, содержание антоцианов в листьях аронии Мичурина достаточно высоко во все периоды заготовки. Максимальным оно является в сырье, заготовленном на стадии начала покраснения листьев в сентябре 12,77% ± 0,95% (фаза начала покраснения листьев). Литературные данные о результатах исследования содержания антоцианов в листьях рябины черноплодной также подтверждают, что при заготовке сырья в осенний период уровень антоцианов выше [21].

Известно, что на содержание антоциановых соединений в ЛРС значительно влияют регион произрастания, особенности культивирования, загрязненность почвы, а также совокупность погодных условий за период вегетации растения в разные годы [50, 68]. Для оценки влияния данных факторов на накопление изучаемых БАВ в листьях провели их определение в ЛРС 2022 и 2023 годов заготовки (Таблица 30). Результаты отражены на Рисунке 52. Информация о погодных условиях заимствована с официального сайта www.pogodaiklimat.ru (дата обращения октябрь 2023 г).

Накоплению антоцианов в листьях способствует увеличение количества солнечных дней за период вегетации. Снижение среднесуточной температуры и количества осадков, по всей видимости, оказывает стимулирующий эффект на процессы биосинтеза данной группы БАВ в качестве защитной реакции

растительного организма на ухудшающиеся факторы окружающей среды. Однако, данные результаты нуждаются в дополнительных подтверждающих исследованиях.

Таблица 30 – Содержание антоциановых соединений в листьях различных годов заготовки

№ п/п	Погодные условия	2022 г	2023 г
1	Количество осадков (суммарно с мая по сентябрь)	344 мм	183 мм
2	Средняя температура: Июнь; Июль; Август; За три месяца	19,5 20,8 23,0 21,1	17,0 19,8 21,0 19,3
3	Количество солнечных дней (суммарно с мая по сентябрь)	11	19
4	Тип почв	Чернозём	Чернозём

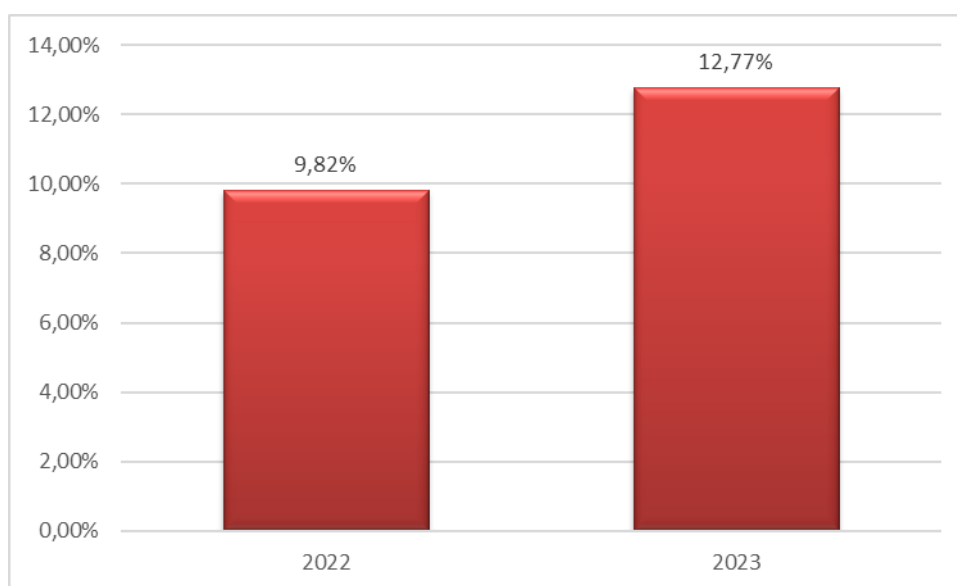


Рисунок 52 - Содержание антоциановых соединений в листьях аронии Мичурина (фаза заготовки – сентябрь)

Сравнительно с другими видами растительного сырья содержание антоцианов сопоставимо или выше (Таблица 31) [28, 29, 33, 36, 47, 146].

Таблица 31 – Результаты анализа литературных данных о содержании антоцианов в растительных источниках в пересчете на цианидин-3-глюкозид

№ п/п	Растительный источник	Содержание антоцианов, %	Ссылка на источник
1	Рябины черноплодной плоды	0,98-3,70	[47]
2	Аронии черноплодной плоды свежие	Не менее 4	[28, 29]
3	Аронии черноплодной плоды сухие	Не менее 3	[28, 29]
4	Черники обыкновенной плоды	Не менее 0,5	[28, 29]
5	Бузины канадской плоды	1,77-2,43	[36]
6	Черной смородины плоды	5,86-6,44	[33]
7	Черемухи виргинской плоды	7,30-10,40	[146]

С применением разработанной и валидированной методики определено, что оптимальными сроками заготовки сырья для обеспечения максимального выхода антоцианов являются август и сентябрь.

Изучение вариабельности накопления антоцианов в сырье свидетельствует о том, что в качестве числового значения показателя содержания антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид для ФС «Аронии Мичурина листья» можно рекомендовать норматив не менее 5%. Полученные результаты количественного содержания антоцианов в аронии Мичурина листьях показывает перспективность использования данного сырья как источника БАВ с целью дальнейшего получения ЛРП с АОА.

5.5.4. Разработка и валидация методики определения пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев аронии Мичурина

Кроме полифенольной фракции листа, участвую в процессе фотосинтеза, как известно, в составе липофильной фракции БАВ содержат пигменты (каротиноиды и хлорофиллы), однако в литературе эти данные практически не представлены. При этом, следует учитывать, что активно изучаемые на предмет выявления различных видов фармакологической активности спирто-водные

извлечения из листьев характеризуются многокомпонентным составом БАВ (в т.ч. присутствуют каротиноиды и хлорофиллы), а следовательно, и комплексным характером действия. Поэтому всестороннее изучение химического состава БАВ листьев аронии Мичурина является актуальной задачей.

При изучении спектральных характеристик спирто-водных извлечений из листьев в диапазоне волн 400-800 нм (Рисунок 53) наблюдали основные максимумы поглощения в диапазоне волн 414 ± 3 нм, 439 ± 2 нм и 467 ± 2 нм, характерные, согласно литературным данным [211], для неоксантина, а также при 667 ± 2 нм, свойственный хлорофиллам.

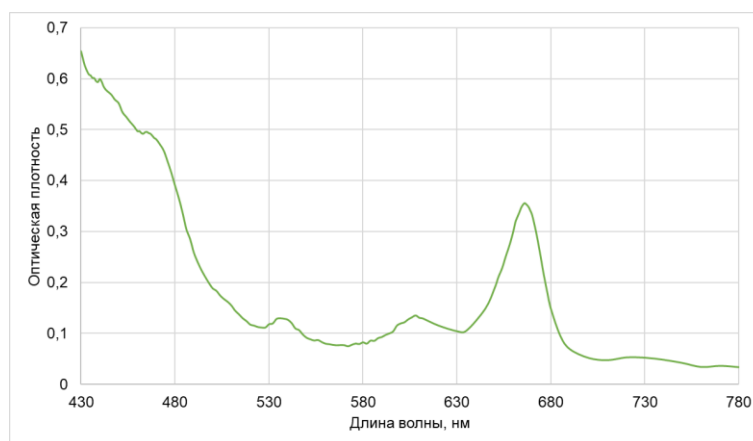


Рисунок 53 - Спектр поглощения спиртового извлечения листьев аронии Мичурина

На этапе выбора экстрагента проведен анализ содержания каротиноидов и хлорофиллов при извлечении спиртом этиловым 70% и 96%, а также гексаном, согласно рекомендациям литературы. Максимальный выход каротиноидов и хлорофиллов наблюдался при экстрагировании спиртом этиловым 70% (таблица 32) при использовании сырья со степенью измельчения от 0,5 до 1 мм (таблица 33).

При увеличении количества частей экстрагента на 1 часть сырья при получении извлечения выход каротиноидов и хлорофиллов из листьев аронии Мичурина увеличивался. Оптимальным выбрано соотношение сырье-экстрагент 1:200, так как в сравнении с соотношением 1:150 выход пигментов в извлечение

увеличивался незначительно, выходя на плато. Дальнейшее увеличение степени разведения экономически не рационально, так как потребовало значительного расхода экстрагента (таблица 34).

Таблица 32 - Влияние экстрагента на выход каротиноидов и хлорофиллов из листьев аронии Мичурина

Экстрагент	Длина волны максимума, нм	Выход каротиноидов, %	Выход хлорофиллов, %
Спирт этиловый 70%	439±2 667±3	0,056±0,005	0,073±0,003
Спирт этиловый 96%	439±2 667±3	0,026±0,005	0,046±0,004
Гексан	439±2 670±3	0,014±0,007	0,019±0,010

Таблица 33 - Влияние степени измельчения на выход каротиноидов и хлорофиллов из листьев аронии Мичурина

Степень измельчения, мм	Выход каротиноидов, %	Выход хлорофиллов, %
2,0-3,0	0,046±0,005	0,060±0,011
1,0-2,0	0,056±0,005	0,073±0,003
0,5-1,0	0,062±0,003	0,087±0,004
0,2-0,5	0,056±0,014	0,069±0,022

Таблица 34 - Влияние соотношения сырье-экстрагент на выход каротиноидов и хлорофиллов из листьев аронии Мичурина

Соотношение сырье-экстрагент	Выход каротиноидов, %	Выход хлорофиллов, %
1:25	0,051±0,003	0,097±0,013
1:50	0,062±0,003	0,087±0,004
1:100	0,065±0,009	0,096±0,021
1:150	0,074±0,003	0,111±0,004
1:200	0,078±0,001	0,115±0,004

Оптимальным временем получения извлечения выбраны 45 минут. При увеличении времени экстракции до 60 мин выход исследуемых БАВ снижался. Дальнейшее увеличение времени экстракции приводило к постепенному

снижению выхода каротиноидов, а выход хлорофиллов выходил на плато (Рисунок 54).

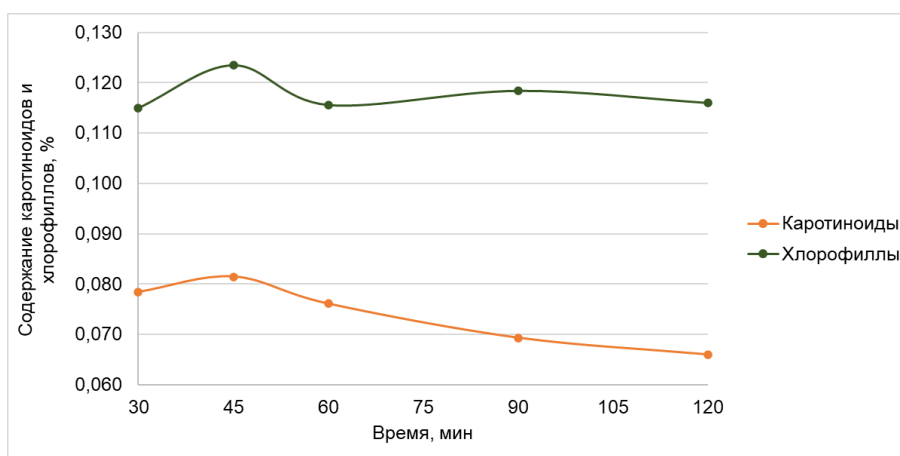


Рисунок 54 - График зависимости содержания каротиноидов и хлорофиллов в зависимости от времени извлечения

Выход каротиноидов и хлорофиллов максимален при использовании кратности экстракции равной 2 (таблица 35).

Таблица 35 - Влияние кратности экстракции на выход каротиноидов и хлорофиллов из листьев аронии Мичурина

Кратность	Выход каротиноидов, %	Выход хлорофиллов, %
1	0,075±0,012	0,115±0,016
2	0,095±0,005	0,146±0,016
3	0,073±0,004	0,115±0,010

На основании результатов исследования разработана методика количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях аронии Мичурина. Около 1,0 г (точная навеска) высушенных измельченных листьев аронии Мичурина, измельченных до размеров частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в коническую колбу, вместимостью 250 мл, заливают 100 мл спирта этилового 70%, взвешивают и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником 45 минут. По истечении времени колбу с извлечением быстро охлаждают, доводят по массе до первоначального значения и фильтруют через 10 слоев марли в колбу на 200 мл. Экстракцию повторяют второй

порцией растворителя. Фильтраты объединяют в колбе на 200 мл и доводят объем до метки (раствор А). 15 мл раствора А помещают в колбу на 25 мл, доводят объем до метки 70% этиловым спиртом (раствор Б). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при 439 ± 2 нм для каротиноидов и 667 ± 3 нм для хлорофиллов. Раствор сравнения – спирт этиловый 70%.

Расчет содержания каротиноидов (в пересчете на неоксантин) и хлорофиллов (в пересчете на хлорофилл а) в % в абсолютно сухом сырье проводили по формулам:

$$X \text{ (каротиноидов)} = \frac{A \cdot V_{K1} \cdot V_{K2} \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot V_a \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 2243 \cdot 100 \cdot 15 \cdot (100 - w)}$$

$$X \text{ (хлорофиллов)} = \frac{A \cdot V_{K1} \cdot V_{K2} \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot V_a \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 944,5 \cdot 100 \cdot 15 \cdot (100 - w)}$$

A – оптическая плотность раствора Б при 439 ± 2 нм для каротиноидов и при 667 ± 3 нм для хлорофиллов; V_{K1} и V_{K2} – объемы мерных колб, использованных для разведения, мл; m – масса сырья, г; $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения (2243 для каротиноидов в пересчете на неоксантин и 944,5 для хлорофиллов в пересчете на хлорофилл α); V_a – объем аликвоты, взятой на анализ, мл; w – потеря в массе при высушивании, %.

Проведена метрологическая оценка разработанной методики. Относительная ошибка определения составила 3,03% для каротиноидов и 1,81% для хлорофиллов, что свидетельствует о нахождении в пределах средней ошибки 5% (таблица 36).

Специфичность методики оценивали по совпадению положений максимумов на спектрах индивидуальных извлечений каротиноидов и хлорофиллов согласно литературным данным и исследуемого извлечения [211].

Таблица 36 - Метрологическая характеристика методики количественного определения каротиноидов (1) и хлорофиллов (2) в листьях аронии Мичурина ($P=95\%$, $n=6$)

БАВ	x_{cp}	S^2	S	Sx_{cp}	$Sx_{cp}, \%$	Δx	Δx_{cp}	$\varepsilon, \%$
1	0,075	0,00000474	0,00217	0,00089	2,89	0,0056	0,0023	3,032
2	0,119	0,00000426	0,00206	0,00084	1,73	0,0053	0,0021	1,813

Линейность методики определяли на 9 уровнях концентрации. Методика линейна, так как R^2 больше 0,99. Предел обнаружения 0,125 г/мл для каротиноидов и 0,072 г/мл для хлорофиллов (Рисунок 55).

Прецизионность на этапе сходимости методики оценивали путем проведения шести измерений в одной лаборатории, одним исследователем, по одной методике на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени (таблица 37).

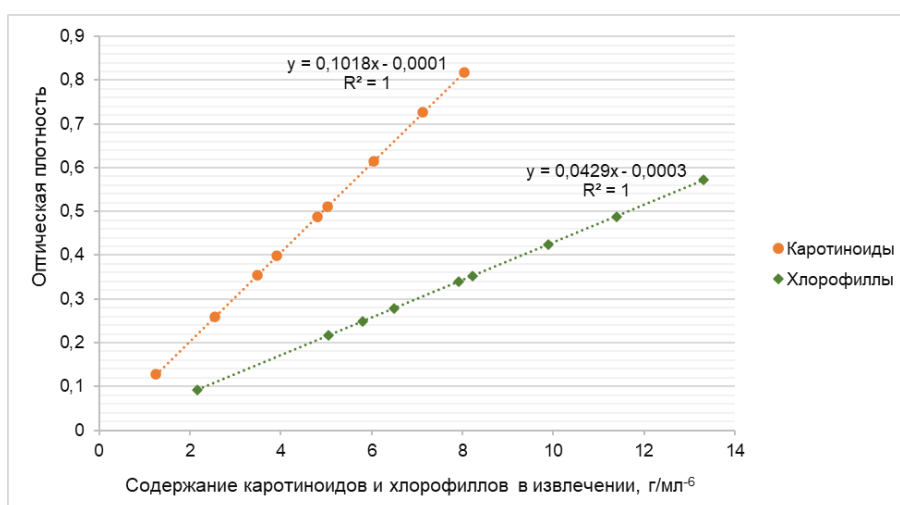


Рисунок 55 - График линейной зависимости оптической плотности от содержания каротиноидов и хлорофиллов в извлечении из листьев аронии Мичурина

Таблица 37 - Валидационные характеристики методики определения суммы каротиноидов и хлорофиллов в аронии Мичурина листьях

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат	
Сходимость	Проба	Содержание суммы каротиноидов, %	Содержание суммы хлорофиллов, %
	1	0,075	0,119
	2	0,075	0,120
	3	0,073	0,119
	4	0,077	0,122
	5	0,073	0,116
	6	0,078	0,120
	Доверительный интервал (P=95%), %	0,075±0,0023	0,119±0,0022

1	2	3	4
Сходимость	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	2,89	1,73
	Стандартное отклонение (SD), %	0,217	0,206
Линейность	Уравнение прямой	$y=0,1018x-0,0001$	$y=0,0429x-0,0003$
	Угловой коэффициент (a)	0,1018	0,0429
	Свободный член b	-0,0001	-0,0003
	Коэффициент корреляции	1	1
	Область линейности (по содержанию каротиноидов и хлорофиллов в извлечении), г/мл	$1,25-8,03 \cdot 10^{-6}$	$2,17-13,30 \cdot 10^{-6}$
Предел обнаружения, г/мл		0,125	0,072

С использованием разработанной и валидированной методики проводили оценку содержания каротиноидов и хлорофиллов в сырье разных фаз заготовки. Наибольшее содержание характерно для сырья, заготовленного на стадии начала плодоношения. К стадии начала покраснения листьев их содержание значительно снижается, что обусловлено разрушением хлоропластов и снижением процессов фотосинтеза (таблица 38).

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения суммы каротиноидов (в пересчёте на неоксантин) и хлорофиллов методом спектрофотометрии в листьях аронии Мичурина. Разработанная методика валидна и пригодна для спектрофотометрического определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях аронии Мичурина. Наибольшее

содержание определяемых соединений наблюдается в листьях на стадии начала плодоношения (период заготовки – июнь). Однако, даже на рекомендуемом сроке заготовки листьев в период массовой зрелости плодов (август) и начала покраснения листьев (сентябрь) изучаемое сырье следует считать также перспективным источником каротиноидов (до 75 мг%), которые также вносят свой вклад в антиоксидантное действие комплексных экстракционных препаратов.

Таблица 38 - Содержание каротиноидов и хлорофиллов в листьях аронии Мичурина на различных этапах заготовки

Фаза заготовки	Выход каротиноидов, %	Выход хлорофиллов, %
Начало цветения	0,072±0,002	0,131±0,003
Начало плодоношения	0,093±0,002	0,162±0,005
Массовая зрелость плодов	0,075±0,002	0,119±0,002
Начало покраснения листьев	0,063±0,002	0,098±0,003

5.5.5. Определение органических кислот в листьях аронии Мичурина

Полифенольный комплекс листьев представляет собой совокупность основных действующих групп БАВ. Однако, органические кислоты, в т.ч. аминокислоты, как первичные метаболиты, могут выступать в качестве стабилизаторов, к тому же именно профиль этих веществ, подобно «отпечаткам пальцев» может быть строго специфичным для сырья.

Данные о содержании органических кислот [104, 131] в листьях аронии Мичурина отсутствуют, поэтому в рамках комплексного фитохимического изучения сырья в работе провели определение качественного состава и количественного содержания свободных органических кислот, как описано в Главе 2 (п. 9). Исследования по определению состава органических кислот, аминокислот и витаминов группы В в листьях представлялось интересным провести на примере стадии заготовки в сентябре, т.к. по результатам

исследований период конца августа - начала сентября является наиболее предпочтительным для заготовки данного сырья.

В листьях аронии Мичурина установлено количественное содержание восьми органических кислот. Содержание муравьиной, фумаровой, янтарной и винной кислот не превышает нижних пределов измерения. Результаты определения органических кислот в аронии Мичурина листьях приведены в Таблице 39.

Суммарное содержание выявленных органических кислот составляет 0,49%. Преобладающими кислотами являются лимонная, яблочная и сорбиновая (Рисунок 56).

Таблица 39 – Содержание органических кислот в аронии Мичурина листьях

№ п/п	Органическая кислота	Содержание, %
1	щавеливая	0,02
2	муравьиная	Менее 0,15*
3	фумаровая	Менее 0,005*
4	янтарная	Менее 0,05*
5	лимонная	0,21
6	уксусная	0,02
7	пропионовая	0,04
8	молочная	0,03
9	бензойная	0,01
10	сорбиновая	0,06
11	яблочная	0,10
12	винная	Менее 0,005*

*-нижний предел измерения

Качественный и количественный состав органических кислот в листьях и плодах [64] аронии различаются. Суммарное содержание данной группы БАВ выше в плодах. В обеих частях растения преобладающими кислотами являются яблочная, лимонная и сорбиновая, однако содержание яблочной кислоты в плодах значительно выше, чем в листьях (Рисунок 57). В тоже время в листьях присутствуют бензойная и щавеливая кислоты, данные о содержании которых в

плодах отсутствуют. Выявленные различия могут быть объяснены особенностями накопления органических кислот в разных частях растения.

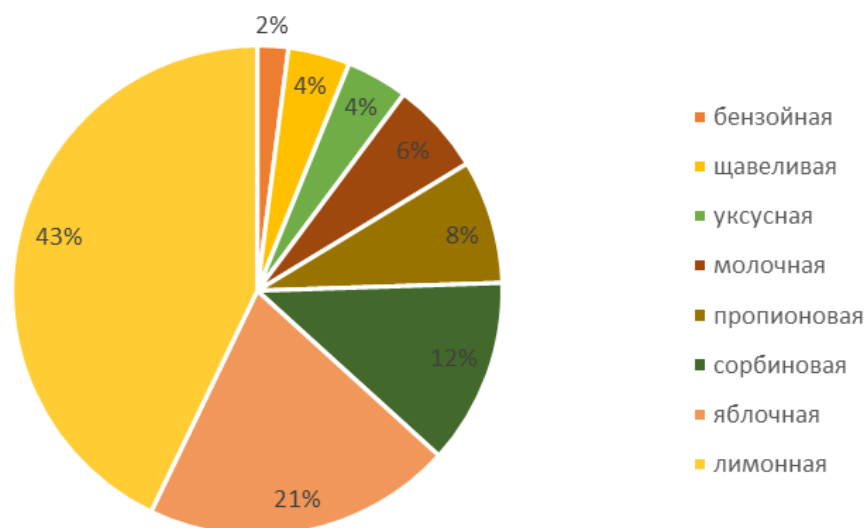
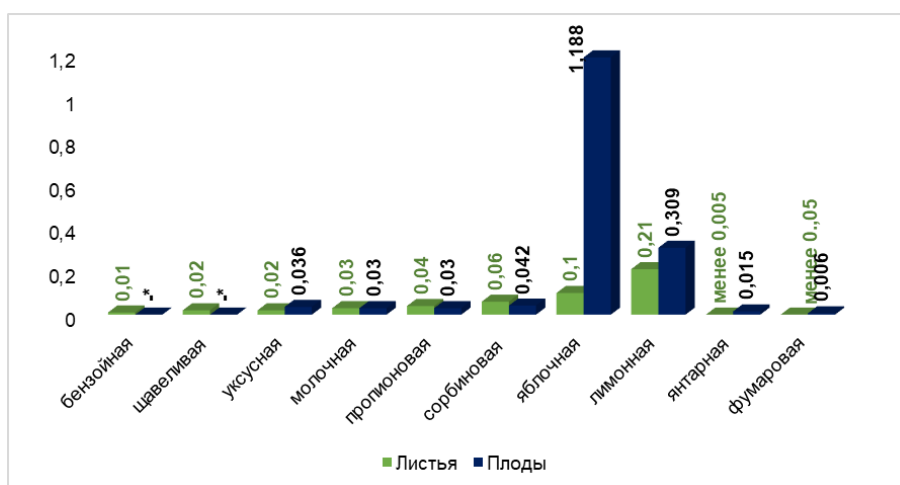


Рисунок 56 – Количественное распределение органических кислот в аронии Мичурина листьях



* - данные о содержании отсутствуют

Рисунок 57– Сравнительное содержание органических кислот в плодах и листьях аронии

В сравнении с литературными данными по другим видам растительного сырья [64, 118, 132, 149, 150] суммарное содержание органических кислот в листьях аронии Мичурина (Таблица 40).

Суммарное содержание органических кислот в листьях аронии Мичурина ниже, чем в других видах растительного сырья. По этой причине исследуемое

сырье не может быть рекомендовано как источник органических кислот, однако данная группа БАВ может оказывать свое положительное действие на организм в комплексных препаратах на основе листьев аронии Мичурина.

Таблица 40 – Данные о суммарном содержании органических кислот в различных видах растительного сырья (при определении методом капиллярного электрофореза)

№ п/п	Растительный источник	Сумма органических кислот, %	Ссылка на источник
1	Рябины черноплодной плоды	1,66	[64]
2	Горца почечуйного трава	3,56	[149]
3	Горца перечного трава	13,42	[149]
4	Облепихи крушиновидной плоды	13,13-17,07 *	[132]
5	Синюхи голубой корневища с корнями	1,02	[150]
6	Синюхи голубой трава	3,39	[150]
7	Скорцонеры испанской трава	6,63	[118]
8	Скорцонеры испанской корни	1,20	[118]

* диапазон значений для разных сортов

5.5.6. Анализ витаминов группы В в листьях аронии Мичурина

При проведении анализа листьев аронии Мичурина на содержание витаминов и витаминоподобных веществ группы В (Глава 2, п. 9) получены следующие результаты (Таблица 41).

Витамины способны накапливаться во всех растениях в тех или иных количествах. Как правило, содержание витаминов группы В в растительном сырье невелико. В листьях аронии Мичурина содержание витаминов В₁, В₂, В₄ также мало. В сравнении с суточной потребностью наиболее высоким можно назвать содержание тиамин. Однако и для него суточная норма потребления листьев аронии Мичурина высока.

Таким образом, листья аронии Мичурина не рекомендуются в качестве источника витаминов группы В, но они могут оказывать положительное действие на организм в комплексе с другими БАВ листьев рябины черноплодной.

Таблица 41 – Содержание витаминов группы В в листьях аронии Мичурина

Наименование витамина	Содержание, мг/кг	Нормы потребности, мг/сут*	Суточная норма потребления листьев, г
Витамин В ₁ (тиамин)	0,99	1,5	1515,15
Витамин В ₂ (рибофлавин)	0,43	1,8	4186,05
Витамин В ₄ (холин)	44,4	500	11261,26

*Рекомендуемая суточная потребность для взрослых в возрасте старше 18 лет [73]

5.5.7. Анализ аминокислот в листьях аронии Мичурина

При проведении анализа листьев аронии Мичурина на содержание аминокислот (свободных и связанных) получены (Глава 2, п. 9) следующие результаты (Таблица 42) [96, 131].

Таблица 42 – Содержание аминокислот в листьях аронии Мичурина

№ п/п	Наименование аминокислоты	Содержание, %
1	2	3
1	цистин	0,04
2	метионин	0,05
3	гистидин	0,11
4	тирозин	0,23
5	валин	0,26
6	серин	0,27
7	треонин	0,28
8	Лизин	0,33
9	фенилаланин	0,33
10	пролин	0,33
11	глицин	0,33
12	аланин	0,36
13	аргинин	0,37
14	изолейцин	0,38
15	аспарагиновая кислота	0,49
16	глутаминовая кислота	0,64
17	лейцин	1,08
	Сумма аминокислот	5,88

В листьях аронии Мичурина выявлено 17 аминокислот, 7 из них являются незаменимыми: изолейцин; лизин; лейцин; фенилаланин; валин; треонин; метионин. Суммарное содержание незаменимых аминокислот (свободных и связанных) - 2,71%, что составляет 46% от общего количества.

Присутствуют алифатические, ароматические и гетероциклические аминокислоты. Тринадцать соединений относятся к группе алифатических: две монодикарбоновые кислоты (аспарагиновая и глутаминовая), две диаминокрбиновые кислоты (аргинин и лизин), девять моноаминокрбиновых кислот (аланин, валин, глицин, изолейцин, лейцин, серин, треонин, метионин, цистин). Серин и треонин относятся к аминокислотам с оксигруппой, метионин и цистин – к серосодержащим. Ароматические аминокислоты представлены тирозином и фенилаланином, гетероциклические – пролином и гистидином.

Преобладающими аминокислотами являются лейцин и глутаминовая кислота – 18,37% и 10,88% от суммарного содержания аминокислот, соответственно.

Среди обнаруженных аминокислот присутствуют аминокислоты, способные оказывать антиоксидантное действие: аргинин, пролин, гистидин, фенилаланин, метионин, тирозин [151].

Достаточно высокое содержание аминокислот в листьях аронии Мичурина подтверждает перспективность сырья для создания новых лекарственных средств.

5.6. Изучение комплекса БАВ листьев аронии Мичурина методом ИК-спектроскопии

В настоящее время, уже в ГФ РФ XV издания [24] метод ИК-спектроскопии занимает первостепенное значение в анализе на подлинность фармацевтических субстанций, т.к. позволяет устанавливать структуру органических соединений с гораздо меньшими затратами времени по сравнению с традиционными химическими методами [49]. В последние годы метод находит применение в исследовании качества пищевого сырья и ЛРС. В частности, ИК-спектроскопия в

ближней ИК-области, в качестве неразрушающего метода анализа, используется для контроля накопления БАВ в растениях на площадках их культивирования [90]. Наличие специфических полос, обусловленных присутствием в сырье целевых групп БАВ, а также их интенсивность, позволяет научно обосновать готовность сырья к сбору. Это способствует получению стандартных партий ЛРС и ЛРП на его основе.

Все большее распространение в оценке доброкачественности ЛРС находит метод ИК-Фурье спектроскопии НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения). Инфракрасные спектры важны не только для изучения строения сложных БАВ растительного происхождения, но и для исследования характера взаимодействия между ними в сырье и ЛРП. В литературных источниках постепенно появляются и обобщаются сведения о возможности использования ИКС в оценке подлинности ЛРС [39, 54, 90, 129, 148]. Интерпретация спектров, продолжает оставаться в данном случае достаточно сложной задачей, т.к. ИК-спектр ЛРС, представляет собой суммарный спектр, в котором происходит наложение полос поглощения различных функциональных групп природных БАВ.

Согласно выдвинутой научной гипотезе, вид полученных ИК-спектров изучаемого ЛРС покажет наличие полос поглощения, характерных для основных групп БАВ листьев, а также позволит установить образование межмолекулярных комплексов БАВ и термодинамические характеристики их связей. Вид полученных спектров представлен на Рисунке 58.

Преобладающими группами БАВ, согласно литературным [37, 38, 47, 95, 100, 176] и собственным экспериментальным данным (Глава 5, п. 2), являются в листьях аронии Мичурина вещества полифенольной природы (дубильные вещества конденсированной группы; флавоноиды и лейкоантоциановые, а также антоциановые (на поздних сроках заготовки) соединения). Структурные формулы основных представителей обсуждаемых БАВ приведены на Рисунке 59.

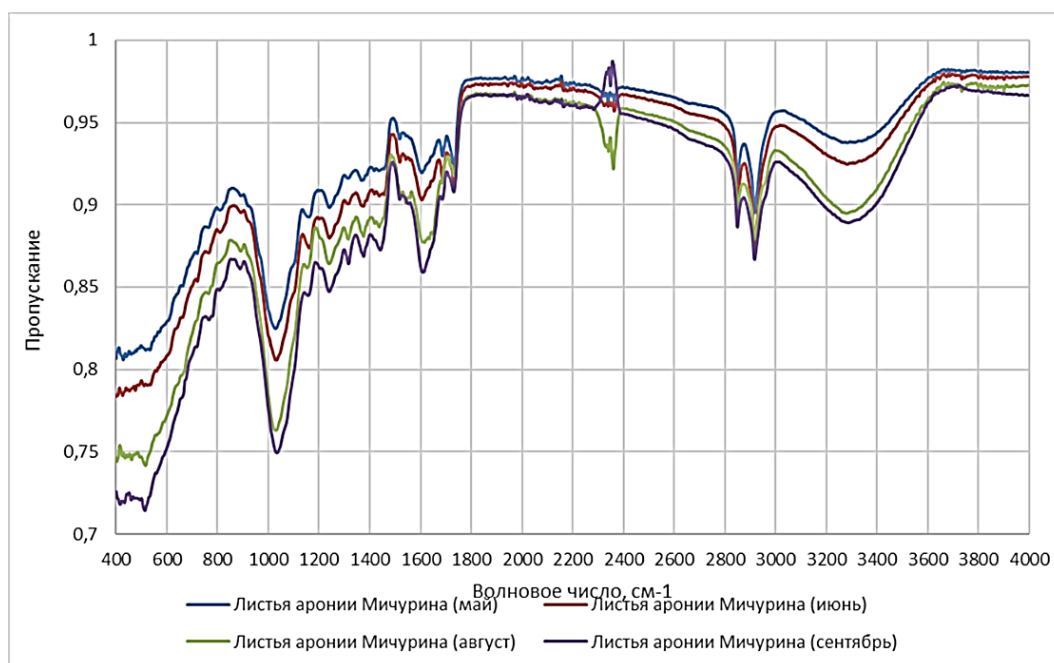


Рисунок 58 - Вид ИК-спектров листьев аронии Мичурина

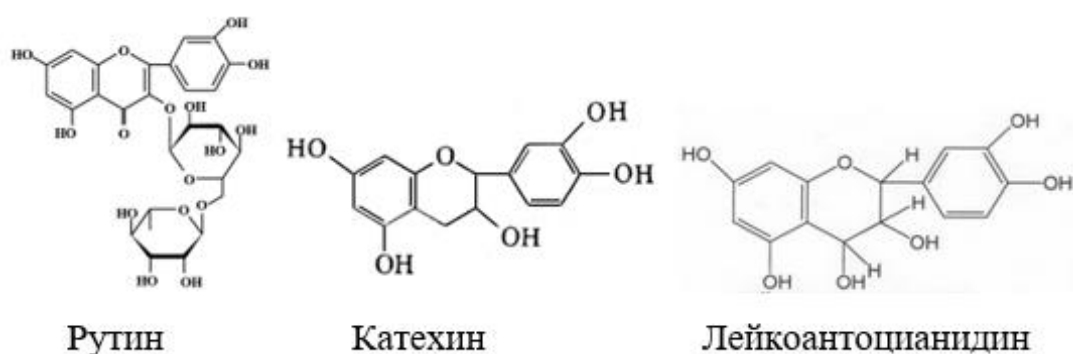


Рисунок 59 - Структурные формулы основных полифенольных БАВ листьев аронии Мичурина

При сравнении спектров изучаемых образцов листьев 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} (Таблица 43), что указывает на присутствие в сырье ароматических фенольных соединений. Симметрические и ассиметрические колебания валентных связей С-О-С-группы в составе гликозидов флавоноидов и антоцианов и галлотанинов представлены полосами поглощения в области частот 1280-1010 см^{-1} [17, 49, 61, 75, 81, 135]. Наличие многочисленных фенольных соединений в листьях, обуславливающих их биологическую ценность, подтверждается также не только полосой поглощения при 1174 - 1161 см^{-1} , характерной для

деформационных колебаний свободной ОН-группы фенола, но и одновременным присутствием двух полос при частотах 1270-1140 и 1410-1310 см^{-1} . ОН-группы, как спиртовые, так и фенольные определили на полученных спектрах частотол полос в интервале частот 995-890 см^{-1} . Анализ спектров показывает, что практически у всех исследуемых фаз заготовки сырья с различной степенью интенсивности присутствуют полосы поглощения в указанных диапазонах частот (Таблица 43, Рисунок 58; Рисунок 60).

Таблица 43 - Характеристические частоты поглощения в полученных ИК-спектрах изучаемых образцов листьев

Диапазон частот	Период заготовки				Интенсивность*	Функциональная группа	Тип колебаний
	Аронии Мичурина листья						
	май	июнь	август	сентябрь			
	ν, см ⁻¹ (на спектрах)						
1	2	3	4	5	6	7	8
3600-3200	3284	3284	3284	3290	С.	Фенольный гидроксил в межмолекулярных водородных связях	валентные колебания О-Н 3400-3200 (полиассоциаты)
2960-2850	2920-2850	2918-2850	2920-2852	2924-2852	С.	С-CH ₃ С-CH ₂	валентные колебания связей
1750-1730	1731	1734	1734	1735	Ср.	-HC=CH-	валентные колебания связи С=С ароматического ядра
1680-1600	1687-1606	16851-601	-1608	1689-1618	С.	(NH ₃ ⁺)	деформационные, аминокислотная полоса I
1556-1510	1517- -	1517- -	-1542	-1531	Ср.		деформационные, аминокислотная полоса II
1460-1410	-	1438	1436	1448	Ср.	С-CH ₃ С-CH ₂	асимметрические деформационные колебания групп

Продолжение таблицы 43

1	2	3	4	5	6	7	8
1380-1300	1315 1375	1317 1375	1321 1371	1321 1383	Ср.		симметрические деформационные колебания групп
1280-1010	1244 1164 1031	1242 1163 -	1240 1155 1031	1248 1164 1041	Ср. Ср. С.	С-ОН	симметрические и ассимметрические колебания валентных связей С-О
918-912	-	-	-	-	Сл.	-С-О-С-	эфир
840-800	812 -	817 -	887 -	896 821	Сл.	=СН -С=С- (цис-)	деформационное, =С-Н валентное, СН
750-720	759 719	767 719	- -	781 -	Сл.	С-Н	деформационное, - С-Н
-	530 426	474 424	515 -	522 436	С.	-	-

* - (С. – сильная; Ср. – средняя; Сл. – слабая).

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 в области «отпечатков пальцев» (менее 1500 см^{-1}) показывает наибольшее отличие между собой и может быть использован для целей, дополнительного к морфологии и анатомии, подтверждающего способа идентификации сырья (Рисунок 60).

Полифенольные соединения листьев (Рисунок 59), по данным ИК-спектров [16, 17], образуют межмолекулярные водородные связи, т.к. полосы поглощения расположены в интервале $3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$, что характерно для валентных колебаний группы –ОН в составе полиассоциатов. При обсчете данных спектров (Рисунок 58) вычислены термодинамические характеристики [16, 17, 39, 54, 148] выявленных связей, таких как энергия (E_H) и длина (R), которые представлены в таблице 44. Причем при заготовке листьев в период конца августа – начала

сентября, данная полоса также имеет наибольшую интенсивность. Сами связи в межмолекулярных комплексах полифенолов, согласно данным авторов [16, 17, 39, 54, 173], следует отнести к типу сильных, так как энергия их превышает 5 ккал/моль, а длина около $2,7 \text{ \AA}$.



Рисунок 60 - Вид ИК-спектров изучаемых листьев, заготовленных в конце периода наблюдения (сентябрь)

Таблица 44 - Термодинамические характеристики межмолекулярных водородных связей фенольных БАВ в листьях аронии Мичурина по данным ИКС

№ п/п	Объект	Частота, см ⁻¹	$\Delta \nu^*$, см ⁻¹	E _H		R, $\text{\AA}$
				кДж/моль	ккал/моль	
1	образец 1 – на стадии цветения, май	3284	416	27,43	7,03	2,746
2	образец 2 – на стадии начала плодоношения, июнь	3284	416	29,43	7,03	2,746
3	образец 3 – на стадии зрелости плодов, август	3284	416	29,43	7,03	2,746
4	образец 4 – на стадии начала покраснения листьев, сентябрь	3290	410	29,01	6,93	2,747

$\Delta \nu^*$ - смещение частоты поглощения

Таким образом, при сравнении спектров изучаемых образцов листьев на разных стадиях развития 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} , что указывает на присутствие в сырье ароматических соединений, в т.ч. фенольной структуры. Методом ИК – спектроскопии установлено, что молекулы БАВ полифенольной природы в изучаемом ЛРС взаимодействуют между собой с образованием полиассоциатов по средствам водородных связей.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Проведено качественное определение состава БАВ изучаемого сырья, подтверждено наличие следующих групп веществ: флавоноиды, дубильные вещества, аскорбиновая кислота, полисахариды (слизи), спирторастворимые сапонины, аминокислоты, органические кислоты, антоцианы, витамины группы В. Установлено отсутствие цианогликозидов в сырье растения – представителе семейства Розоцветных.

2. Подобраны оптимальные экстрагенты для извлечения суммы экстрактивных веществ – вода очищенная, этанол 40-70%, а также предложен количественный критерий показателя для стандартизации листьев аронии Мичурина (содержание не менее 30%).

3. С применением современных физико-химических методов анализа изучен качественный и количественный состав БАВ в сырье. Методом ГХ-МС – состав фракции стеринов, сахаров, многоатомных спиртов. Методом капиллярного электрофореза – состав свободных и связанных аминокислот, свободных органических кислот и витаминов группы В.

4. Разработаны и валидированы методики определения флавоноидов (в пересчете на рутин), дубильных веществ (в пересчете на катехин), пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) и антоциановых соединений в форме собственно антоцианов (в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид) в листьях. Подобраны оптимальные условия разделения флавоноидов и антоциановых соединений методом ТСХ, идентифицирован рутин.

5. Исследована динамика накопления полифенольных БАВ (флавоноидов, дубильных веществ и антоциановых соединений) и пигментов в листьях аронии

Мичурина. Установлено, что наибольшее содержание флавоноидов наблюдается в листьях изучаемых растений на ранних этапах их развития, заготовленных в середине июня ($4,20 \pm 0,12\%$), снижаясь к концу августа – началу сентября. Содержание антоцианов в листьях аронии Мичурина достаточно высоко во все периоды заготовки, демонстрируя максимальные значения в сырье, заготовленном на стадии начала покраснения листьев в сентябре $12,77\% \pm 0,95\%$ (сентябрь). С точки зрения накопления дубильных веществ, максимальным оно является в сырье, заготовленном на стадии цветения растения ($14,2 \pm 0,91\%$).

6. 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 8%; антоциановых соединений – не менее 5%).

7. Вид ИК-спектров изучаемого сырья, особенно в области «отпечатков пальцев» ($< 1500 \text{ см}^{-1}$), может быть использован для целей, дополнительного к морфологии и анатомии, подтверждающего способа идентификации листьев аронии Мичурина.

ГЛАВА 6. ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ВИДОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАВ ЛИСТЬЕВ АРОНИИ МИЧУРИНА И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ

6.1. Прогноз фармакологической активности биологически активных веществ листьев аронии Мичурина *in silico*

In silico оценка фармакологических свойств БАВ изучаемого сырья проводилась с помощью интернет-ресурсов PASS-online и Phyto4Health (Глава 2, п. 11). В качестве исследуемых БАВ были выбраны основные флавоноиды, входящие в состав листьев аронии, которыми, согласно литературным данным, являются рутин, кверцетин, кемпферол, лютеолин, апигенин, нарингенин [177]. В статье Cvetanović, A. указано латинское название исследуемого вида *A. melanocarpa*, а также указан сорт «Nero», который на самом деле относится к аронии Мичурина, по этой причине для анализа были выбраны соединения, приведенные в данной статье.

Согласно литературным данным по составу БАВ в листьях представителей рода Арония, а также результатам собственных исследований [12, 102, 131] в листьях аронии Мичурина содержится катехин – преобладающий компонент в сумме дубильных веществ и гликозиды цианидина. Поэтому данные соединения были выбраны для прогноза различных видов фармакологической активности, которую могут проявлять извлечения из листьев. Результаты представлены в Приложении 6 (Таблица 6.1). Всего было выявлено более 40 видов фармакологической активности с $P_a > 0,7$ и $P_a > P_i$.

Для всех флавоноидов, являющихся целевой группой БАВ, характерны следующие виды фармакологической активности: агонист целостности мембран, поглощение свободных радикалов, а также антиоксидантный, антимуtagenный, противоопухолевый эффекты. Антикancerогенное и противосеборейное действие характерны для всех флавоноидов, кроме рутина. Катехин и цианидин также

обладают антиоксидантным действием и способны поглощать свободные радикалы.

Результаты исследования *in silico* побочных эффектов приведенных БАВ представлены в приложении 6 (Таблица 6.2). Информация о побочном действии цианидина на платформах PassOnline и Phyto4Health не обнаружена.

Всего было найдено около 19 видов побочных и токсических эффектов, однако большинство из них характерны менее, чем для 50% исследованных БАВ, поэтому их проявление является маловероятным. Лишь токсическое действие на сосуды характерно для всех БАВ, а озноб – для всех, кроме рутина. Таким образом, применение листьев аронии Мичурина относительно безопасно, что требует дальнейшего подтверждения на этапе оценки токсичности *in vivo*.

Полученные *in silico* данные по оценке потенциальных видов фармакологической активности идентифицированных БАВ позволяют предложить данное ЛРС для разработки препаратов на его основе, обладающих антиоксидантной, вазопротекторной, противовоспалительной и вяжущей активностью.

6.2. Определение антиокислительной активности *in vitro*

На основании результатов прогноза фармакологической активности нами выявлено, что основные группы БАВ листьев аронии Мичурина: флавоноиды, дубильные вещества и антоцианы обладают антиоксидантной активностью. Кроме того, это действие проявляют селен, цинк и аминокислоты (аргинин, пролин, гистидин, фенилаланин, метионин, тирозин), также содержащиеся в исследуемом сырье. Поэтому интерес представляло изучение способности извлечений на основе листьев аронии Мичурина проявлять антиокислительную активность (АОА).

Для определения антиокислительной активности (Глава 2, п. 11) были приготовлены 5 извлечений с применением в качестве экстрагента водно-спиртовых растворов различной концентрации. Извлечение из листьев готовили

путем настаивания на водяной бане с обратным холодильником в соотношении 1:10 в течение 1 часа.

Установлено, что наибольшее содержание веществ - антиоксидантов в извлечениях наблюдается при использовании 60% этилового спирта в качестве экстрагента, а для 96% этанола оно минимально (Таблица 45).

Таблица 45 – Антиокислительная активность листьев аронии Мичурина

Экстрагент	АОА, мг/г		Содержание флавоноидов в извлечении в пересчете на рутин, %
	В пересчете на кверцетин	В пересчете на рутин	
Вода	10,45±0,89	22,33±1,92	0,40±0,11
40% этанол	17,75±1,04	37,91±2,22	2,53 ± 0,52
60% этанол	17,96±1,39	38,38±2,07	3,67 ± 0,24
70% этанол	17,27±0,85	36,91±1,83	2,30 ± 0,28
96% этанол	9,69±1,37	20,70±2,92	1,49 ± 0,23

АОА извлечений, полученных с использованием 40%-70% этанола различается незначительно, следовательно, спирт в данных концентрациях можно использовать для извлечения веществ - антиоксидантов. Полученные данные указывают на достаточно высокое содержание антиоксидантных веществ полифенольной структуры в данных извлечениях, что коррелирует с результатами количественного определения флавоноидов в них (Таблица 45).

АОА извлечений из листьев аронии Мичурина сопоставима с плодами черники, листьями крапивы двудомной, травой астрагала, плодами облепихи, плодами рябины черноплодной (Рисунок 61) [2, 60, 62, 89, 134].

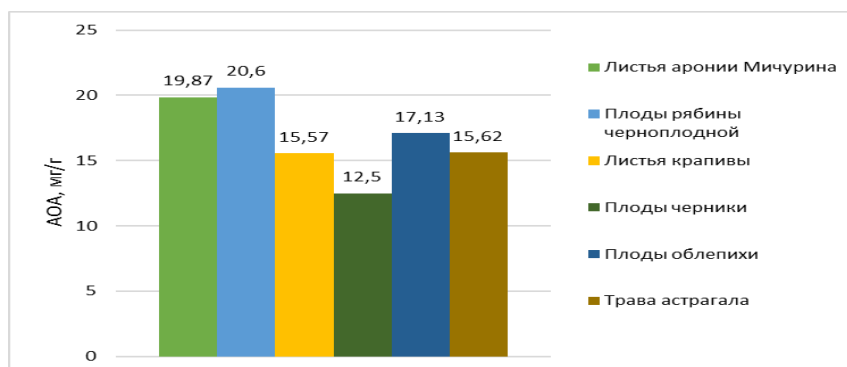


Рисунок 61 – Антиокислительная активность разных видов растительного сырья в пересчете на кверцетин

6.3. Изучение биостимулирующего действия отвара листьев аронии Мичурина *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Изучение биостимулирующего действия отвара листьев аронии Мичурина *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» проводили, как описано в Главе 2 (п. 2.11). Установлено, что в контрольных пробах время выживаемости инфузорий *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида составляло исходно (0 мин.) в среднем от $292,33 \pm 2,333$ сек до $304,67 \pm 5,239$ и не имело существенных отличий в дальнейшем при тестировании через 60 мин, 120 мин и 24 ч (Таблица 46). Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина при заготовке ЛРС в период мая месяца на время выживаемости инфузорий показало, что в опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:10, различий с контрольной пробой при исходном тестировании не выявлено, затем при инкубации 60 мин. наблюдалась тенденция к снижению времени выживаемости инфузорий на 6,9% по сравнению с контрольной пробой и на 7,1% по сравнению с исходным значением в опытной пробе. Через 120 мин. инкубации выраженность влияния на снижение времени выживаемости усиливалась, составив достоверно ниже на 13,5% по сравнению с контрольной пробой и на 13,7% в сравнении с исходным значением в опытной пробе. Наибольшая выраженность влияния на снижение времени выживаемости инфузорий выявлена при инкубации 24 ч, что являлось достоверным и составило на 46,3% меньше по сравнению с контрольной пробой и на 46,4% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Табл. 46). Ввиду того, что согласно проведенным исследованиям, накопление экотоксикантов листьями аронии Мичурина не превышает ПДК (Глава 4), снижение времени выживаемости инфузорий под влиянием изучаемого отвара в максимальной концентрации 1:10 вероятно следует связывать с выявленным в результате проведенных исследований (Глава 5, п. 5.5.2, таблица 24) высоким

содержанием дубильных веществ, которые, как известно, связываются с биологическими молекулами, регулируют активность ряда ферментов [32], денатурируют протоплазматические белки [127], обуславливая в высоких концентрациях известное противомикробное (биоцидное) действие. Важно подчеркнуть, что данный эффект проявляется в наибольшей степени в наиболее концентрированном разведении 1:10 при постоянной длительной инкубации 24 ч, что, вероятно, невозможно обеспечить в реальных условиях контакта клеток живого организма с тестируемым извлечением ЛРС вследствие колебаний концентрации в биологической среде.

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:100, различия с контрольной пробой при исходном тестировании и при инкубации 60 мин. и 120 мин. являлись незначительными. Через 24 ч инкубации выявлено достоверное снижение времени выживаемости инфузорий на 10,4% по сравнению с контрольной пробой на 11,9% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Таблица 46).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:1000, при инкубации 60 мин. выявлено достоверное повышение времени выживаемости инфузорий на 9,6% по сравнению с контрольной пробой и на 8,1% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 120 мин – на 30,3% по сравнению с контрольной пробой и на 28,6% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 24 ч инкубации – значительное достоверное увеличение времени выживаемости инфузорий на 32,7% по сравнению с контрольной пробой и на 30,9% по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 46).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина в разведении 1:10000, при инкубации 60 мин. выявлено достоверное повышение времени выживаемости инфузорий на 11,7% по сравнению с контрольной пробой и на 11,8% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 120 мин – на 30,2% по сравнению с контрольной пробой и на 30,3% по сравнению с исходным значением в опытной пробе. Через 24 ч инкубации

выявлено максимальное для данной серии достоверное увеличение времени выживаемости инфузорий на 34,2% по сравнению с контрольной пробой и на 34,4% достоверно больше по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 46).

Таблица 46 - Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина (заготовка ЛРС – май) на время выживаемости *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Проба	Время выживаемости, сек.			
	0 мин (исходно)	60 мин	120 мин	24 ч
Контрольная проба	304,67± 5,239	296,00± 4,509	298,33± 4,333	306,67± 2,906
Опытная проба, 1:10	296,67± 3,844	275,67± 5,696*, ⁺	256,00± 8,145*, ⁺	159,00± 9,644***, ⁺⁺
разница с контролем, %	-2,6	-6,9	-13,5	-46,3
разница с исходным, %	–	-7,1	-13,7	-46,4
Опытная проба, 1:100	301,33± 5,239	289,33± 9,905	293,33± 10,713	265,33± 11,667*, ⁺
разница с контролем, %	-1,1	-2,3	-0,9	-10,4
разница с исходным, %	–	-4,0	-2,7	-11,9
Опытная проба, 1:1000	300,00± 3,000	324,33± 5,207*, ⁺	385,67± 8,819***, ⁺⁺	392,67± 7,356***, ⁺⁺⁺
разница с контролем, %	-1,5	+9,6	+30,3	+32,7
разница с исходным, %	–	+8,1	+28,6	+30,9
Опытная проба, 1:10000	295,67± 3,756	330,67± 5,207***, ⁺⁺	385,33± 4,910***, +++	397,33± 6,741***, +++
разница с контролем, %	-3,0	+11,7	+30,2	+34,2
разница с исходным, %	–	+11,8	+30,3	+34,4
Опытная проба, 1:100000	295,33± 5,175	289,67± 8,988	297,67± 7,219	291,67± 6,839
разница с контролем, %	-3,1	-2,1	-0,6	-1,5
разница с исходным, %	–	-1,9	-0,8	-1,5

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

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина в разведении 1:100000, как и в предыдущей серии опытов, как при исходном тестировании 0 мин (исходно), так и при повторных тестированиях при инкубации 60 мин, 120 мин и 24 ч значимых различий с контрольной пробой и исходным значением не выявлено (Таблица 46).

Изучение влияния на время выживаемости инфузорий отвара листьев аронии Мичурина при заготовке ЛРС в июне месяце показало, что в опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:10, при исходном тестировании значимых различий с контрольной пробой не выявлено, как и в предыдущих сериях опытов. При инкубации 60 мин. и 120 мин. наблюдалась слабо выраженная тенденция к снижению времени выживаемости инфузорий соответственно на 4,6% и 10,7% по сравнению с контрольной пробой и на 4,7% и 10,2% по сравнению с исходным значением в опытной пробе. Аналогично предыдущей серии опытов, наибольшая выраженность влияния на снижение времени выживаемости инфузорий выявлена при инкубации 24 ч, что являлось достоверным и составило на 45,1% меньше по сравнению с контрольной пробой и на 45,8% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Таблица 47, Рисунок 62).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:100, различия с контрольной пробой при исходном тестировании и при инкубации 60 мин. и 120 мин. являлись незначительными. Через 24 ч инкубации выявлено снижение времени выживаемости инфузорий на 10,0% по сравнению с контрольной пробой на 11,5% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Таблица 47, Рисунок 62).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:1000 при инкубации 60 мин. выявлено достоверное повышение времени выживаемости инфузорий на 13,3% по сравнению с контрольной пробой и на 10,5% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 120 мин – на 28,7% по сравнению с контрольной пробой и на 26,5% по сравнению с исходным значением в опытной пробе. Через 24 ч инкубации

выявлено максимальное для данной серии и максимальное по всем сериям опытов, достоверное значительное увеличение времени выживаемости инфузорий на 39,3% по сравнению с контрольной пробой и на 34,4% по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 47, рис. 62). Указанный результат согласуется с установленным в данный период вегетации по результатам исследований высоким содержанием экстрактивных веществ, извлекаемых водой (Глава 5, п. 5.2, таблица 7) и свидетельствует о достаточно выраженном биостимулирующем действии изучаемого отвара листьев аронии Мичурина при повреждающем воздействии, что может быть связано с влиянием на проницаемость биологических мембран, в том числе за счет высокого, согласно полученным результатам (Глава 5, п. 5.5.1, таблица 17) в данный период содержания биофлавоноидов, проявляющих известные механизмы противовоспалительного и антиоксидантного действия, связанные с влиянием на структурно-функциональные свойства биологических мембран [1]. Достаточно высокое во все периоды заготовки согласно полученным данным (Глава 5, п. 5.5.3, таблица 29) содержание восстановленных форм флавоноидов - антоцианов вероятно усиливает антиоксидантный эффект [125] собственно биофлавоноидов, обеспечивая синергизм в реализации биостимулирующего и мембранопротекторного действия извлечения ЛРС в целом.

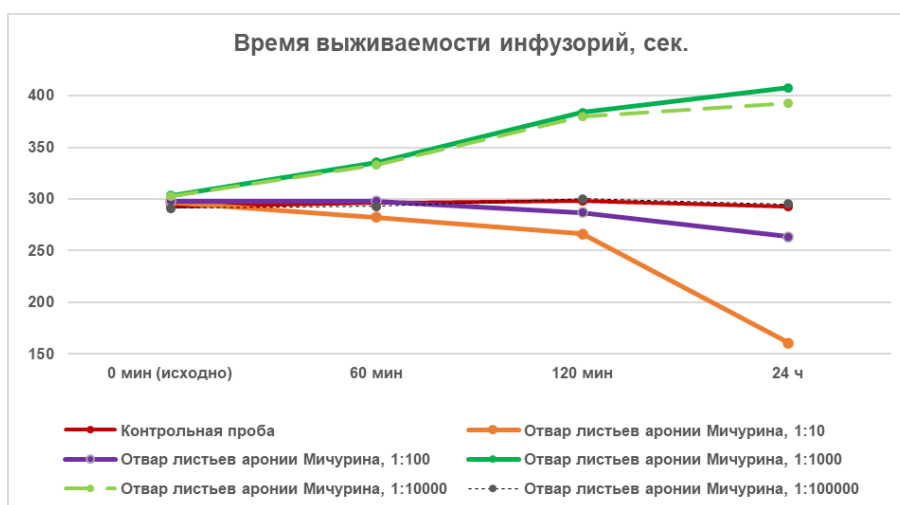


Рисунок 62 - Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина (заготовка ЛРС – июнь) на время выживаемости *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:10000 при инкубации 60 мин. выявлено достоверное повышение времени выживаемости инфузорий на 12,6% по сравнению с контрольной пробой и на 10,0% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 120 мин – на 27,4% по сравнению с контрольной пробой и на 25,3% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 24 ч – значительное повышение на 34,1% по сравнению с контрольной пробой и на 29,5% по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 47, Рисунок 62).

Таблица 47 - Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина (заготовка ЛРС – июнь) на время выживаемости *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Проба	Время выживаемости, сек.			
	0 мин	60 мин	120 мин	24 ч
Контрольная проба	292,33± 2,333	296,67± 3,930	298,00± 5,568	292,67± 7,356
Опытная проба, 1:10	296,33± 4,702	282,33± 7,965	266,00± 14,048	160,67± 15,301**,+
разница с контролем, %	+1,4%	-4,6	-10,7	-45,1
разница с исходным, %	—	-4,7	-10,2	-45,8
Опытная проба, 1:100	297,67± 3,756	298,00± 9,539	287,00± 15,695	263,33± 17,676
разница с контролем, %	+1,8	+0,7	-3,7	-10,0
разница с исходным, %	—	+0,1	-3,6	-11,5
Опытная проба, 1:1000	303,33± 3,528*	335,33± 7,753*,+	383,67± 10,682**,+	407,67± 1,453***,++
разница с контролем, %	+3,8	+13,3	+28,7	+39,3
разница с исходным, %	—	+10,5	+26,5	+34,4
Опытная проба, 1:10000	303,00± 2,646*	333,33± 4,096**,+	379,67± 13,094**,+	392,33± 4,372***,++
разница с контролем, %	+3,6	+12,6	+27,4	+34,1
разница с исходным, %	—	+10,0	+25,3	+29,5
Опытная проба, 1:100000	291,00± 13,454	293,00± 3,215	300,33± 5,239	295,33± 3,712
разница с контролем, %	-0,5	-1,0	+0,8	+0,9
разница с исходным, %	—	+0,7	+3,2	+1,5

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

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина в разведении 1:100000, как и в предыдущих сериях опытов, при исходном тестировании 0 мин (исходно) и при инкубации 60 мин, 120 мин и 24 ч значимых различий как с контрольной пробой, так и с исходным значением не выявлено (Таблица 47, Рисунок 62).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:100, различия с контрольной пробой при исходном тестировании и при инкубации 60 мин. и 120 мин. являлись незначительными с тенденцией к снижению времени выживаемости инфузорий. Через 24 ч инкубации выявлено снижение времени выживаемости инфузорий на 10,5% по сравнению с контрольной пробой на 13,0% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Таблица 48).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:1000 при инкубации 60 мин. выявлено повышение времени выживаемости инфузорий на 10,7% по сравнению с контрольной пробой и на 11,4% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 120 мин – на 19,8% по сравнению с контрольной пробой (достоверно) и на 22,0% по сравнению с исходным значением в опытной пробе. Через 24 ч инкубации сохранялась тенденция к повышению времени выживаемости инфузорий на 7,3% по сравнению с контрольной пробой и на 6,8% по сравнению с исходным значением в опытной пробе, однако достоверность отличий отсутствовала (Таблица 48).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:10000 при инкубации 60 мин. и 120 мин. наблюдалось повышение времени выживаемости инфузорий: на 4,8% и 17,8% (достоверно) по сравнению с контрольной пробой и на 7,2% и 21,9% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 24 ч – достоверное повышение на 23,4% по сравнению с контрольной пробой и на 24,5% по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 48).

Таблица 48 - Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина (заготовка ЛРС – август) на время выживаемости *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Проба	Время выживаемости, сек.			
	0 мин	60 мин	120 мин	24 ч
Контрольная проба	295,00± 7,211	297,33± 6,766	300,67± 1,764	294,00± 6,557
Опытная проба, 1:10	303,67± 4,177	285,33± 8,192	243,67± 14,723*, ⁺	159,67± 7,839***, ⁺⁺⁺
разница с контролем, %	2,9	-4,0	-19,0	-45,7
разница с исходным, %	–	-6,0	-19,8	-47,4
Опытная проба, 1:100	302,33± 7,688	287,33± 5,207	291,67± 15,059	263,00± 18,824
разница с контролем, %	2,5	-3,4	-3,0	-10,5
разница с исходным, %	–	-5,0	-3,5	-13,0
Опытная проба, 1:1000	295,33± 6,766	329,00± 14,503	360,33± 11,319**	315,33± 9,387
разница с контролем, %	+0,1	+10,7	+19,8	+7,3
разница с исходным, %	–	+11,4	+22,0	+6,8
Опытная проба, 1:10000	290,67± 12,252	311,67± 4,842	354,33± 11,795*, ⁺	362,67± 10,333**, ⁺
разница с контролем, %	-1,5	+4,8	+17,8	+23,4
разница с исходным, %	–	+7,2	+21,9	+24,5
Опытная проба, 1:100000	294,33± 6,566	297,00± 4,933	306,33± 2,186	292,00± 7,550
разница с контролем, %	-0,2	+0,1	+1,9	-0,7
разница с исходным, %	–	+0,9	+4,1	-0,8

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

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина в разведении 1:100000, как и в предыдущих сериях опытов, при исходном тестировании 0 мин (исходно) и при инкубации 60 мин, 120 мин и 24 ч значимых различий с контрольной пробой и исходным значением в опытной пробе не выявлено (Таблица 48).

Изучение влияния на время выживаемости инфузорий отвара листьев аронии Мичурина при заготовке ЛРС в сентябре месяце показало, что в опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение

1:10, при инкубации 60 мин. выявлено снижение времени выживаемости инфузорий на 8,5% по сравнению с контрольной пробой и на 5,4% по сравнению с исходным значением в опытной пробе; через 120 мин. – тенденция к снижению на 2,2% по сравнению с контрольной пробой и на 12,4% по сравнению с исходным значением в опытной пробе. При инкубации 24 ч выявлено наибольшее достоверное влияние на снижение времени выживаемости инфузорий – на 49,6% по сравнению с контрольной пробой и на 49,2% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Таблица 49), что являлось максимально выраженным снижением времени выживаемости по всем сериям опытов. Следует отметить, что данный результат незначительно превышает установленное для заготовленного в мае ЛРС (Таблица 49) снижение времени выживаемости инфузорий на 6,1%, что позволяет предположить влияние на повышение проницаемости биологических мембран не только за счет высокого содержания дубильных веществ, взаимодействующих преимущественно с белковыми структурами, но и, возможно, за счет максимального в данный период содержания стеринов (Глава 5, п. 5.4, рис. 42 и 43), известных способностью встраиваться в структуру мембраны и участвовать в регуляции текучести мембран клеток [120].

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:100, при инкубации 60 мин., 120 мин. и 24 ч выявлено снижение времени выживаемости инфузорий соответственно на 4,9%, 5,8% и 10,9% (достоверно) по сравнению с контрольной пробой и на 2,2%, 3,1% и 10,8% в сравнении с исходным значением в опытной пробе (Таблица 49).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:1000 при инкубации 60 мин., 120 мин. и 24 ч выявлено повышение времени выживаемости инфузорий на 2,9%, 16,0% (достоверно) и 34,4% (достоверно) по сравнению с контрольной пробой, достоверно на 9,5%, 23,5% и 39,3% по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 49).

Таблица 49 - Изучение влияния отвара листьев аронии Мичурина (заготовка ЛРС – сентябрь) на время выживаемости *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка»

Проба	Время выживаемости, сек.			
	0 мин	60 мин	120 мин	24 ч
Контрольная проба	300,67± 2,333	305,33± 5,207	298,67± 1,202	297,33± 3,283
Опытная проба, 1:10	295,33± 4,177	279,33± 9,333*	258,67± 15,720	150,00± 13,317 ^{+++,*}
разница с контролем, %	-1,8	-8,5	-2,2	-49,6
разница с исходным, %	–	-5,4	-12,4	-49,2
Опытная проба, 1:100	297,00± 3,000	290,33± 4,256	287,67± 8,647	265,00± 13,317*
разница с контролем, %	-1,2	-4,9	-5,8	-10,9
разница с исходным, %	–	-2,2	-3,1	-10,8
Опытная проба, 1:1000	287,00± 7,024	314,33± 4,256 ⁺	354,33± 5,044 ^{*,++}	399,67± 13,246 ^{*,++}
разница с контролем, %	-4,5	+2,9	+16,0	+34,4
разница с исходным, %		+9,5	+23,5	+39,3
Опытная проба, 1:10000	291,67± 6,489	317,33± 3,528 ⁺	345,67± 22,154	376,00± 21,455 ^{*,+}
разница с контролем, %	-3,0	+3,9	+13,2	+26,5
разница с исходным, %	–	+8,8	+18,5	+28,9
Опытная проба, 1:100000	280,00± 11,269	288,00± 10,263	292,67± 3,712	294,00± 14,295
разница с контролем, %	-6,9	-5,7	-4,1	-1,1
разница с исходным, %	–	+2,9	+4,5	+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

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина, разведение 1:10000, при инкубации 60 мин., 120 мин. и 24 ч так же сохранялось несколько менее выраженное повышение времени выживаемости инфузорий: на 3,9%, 13,2% и 26,5% (достоверно) по сравнению с контрольной пробой, на 8,8%, 18,5% и 28,9% (достоверно) по сравнению с исходным значением в опытной пробе (Таблица 49).

В опытной пробе с добавлением изучаемого отвара листьев аронии Мичурина в разведении 1:100000, как и в предыдущих сериях опытов, при исходном тестировании 0 мин (исходно), при инкубации 60 мин, 120 мин и 24 ч не

выявлено значимых различий с контрольной пробой и исходным значением в опытной пробе (Таблица 49).

Таким образом, в целом, с использованием тест-системы инфузорий *Parametium 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. Данное свойство может быть полезно при создании комбинированных ЛП антимикробного характера. 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% 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. Данное свойство может быть полезно при создании ЛРП и разработке режимов их дозирования, в т.ч. комбинированных, антиоксидантного действия, повышающих стабильность клеточной мембраны при повреждающем воздействии свободных радикалов.

6.4. Оценка антимикробной активности лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина

В связи с высокой потенциальной вяжущей и противовоспалительной активностями основных целевых групп БАВ изучаемого сырья, выявленных на этапе скрининга *in silico*, в т.ч. группы дубильных веществ, а также установленном биоцидном действии отвара *in vitro* в разведении 1:10 (п. 6.3. данной главы), провели оценку антимикробной активности (Глава 2, п. 2.16)

спиртосодержащих лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина (настойки и жидкого экстракта), как потенциальных будущих ЛРП. Сравнительное исследование проводили для настойки (1:5) и экстракта жидкого (1:1), приготовленных, как описано в Главе 2 (п. 12). Результаты приведены в таблице 50.

Таблица 50 – Результаты определения антимикробной активности 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	Роста нет	Роста нет	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	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Bacillus cereus</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Staphylococcus aureus</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	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	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Staphylococcus aureus</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Роста нет

В целом, анализируя данные таблицы 50, следует сделать вывод о более выраженной антимикробной активности жидкого экстракта листьев по сравнению с настойкой в отношении всех изученных видов патогенов несмотря на то, что для их получения использовался спирто-водный экстрагент с одинаковым объемным содержанием спирта этилового.

С учетом того, что экстрагент, примененный для получения исследуемых ЛФ, обладает собственной антимикробной активностью (таблица 51), можно

сделать следующее заключение о наличии антимикробной активности комплекса БАВ листьев аронии Мичурина (таблица 52).

Таблица 51 – Результаты определения антимикробной активности экстрагента, примененного для получения исследуемых ЛФ

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											Отрицательный контроль
	Положительный контроль	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	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	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Bacillus cereus</i>	Рост	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет
<i>Staphylococcus aureus</i>	Рост	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Роста нет

Таблица 52 – 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>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<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>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<i>Роста нет</i>	<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.%)

Комплекс БАВ жидкого экстракта листьев аронии Мичурина в отличие от настойки проявляет антимикробную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa* вплоть до 4-го разведения и противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* вплоть до 6-го разведения. По отношению к таким патогенам, как *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus* обе исследуемые ЛФ показали наличие антимикробной активности вплоть до 6-7-го разведения.

На основании проведенных исследований может быть рекомендован следующий способ приготовления растворов для полоскания или аппликаций из жидкого экстракта: 1 ч.л. на полстакана кипяченой воды (степень разведения ЛФ при этом соответствует 4-ому порядковому номеру разведения в таблице 52) 3-4 раза в день.

Таким образом, результаты оценки антимикробной активности полученных спиртосодержащих лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина (настойки и жидкого экстракта), подтвердили перспективность создания ЛРП, например, для наружного применения в комплексной терапии и профилактики заболеваний полости рта в виде полосканий или аппликаций. ЛФ с более широким спектром антимикробной активности является жидкий экстракт.

6.5. Выбор оптимальных лекарственных форм на основе листьев аронии Мичурина

Для исследования возможных путей внедрения изучаемого сырья в практическую фармацию, на следующем этапе работы был осуществлен поиск оптимальной ЛФ на основе листьев аронии Мичурина. Сравнительное исследование проводили для отвара (1:10), настойки (1:5) и экстракта жидкого (1:1), приготовленных, как описано в Главе 2 (п. 12). Для оценки полученных ЛФ для соблюдения принципа сквозной стандартизации в цепочке ЛРС – фармацевтическая субстанция растительного происхождения – ЛП, проводилось количественное определение основных групп БАВ: (флавоноидов и дубильных

веществ), а также рассчитывали их выход из растительного сырья в извлечениях [94].

Для настоя предварительно экспериментально определен коэффициент водопоглощения, который составил 2,2.

6.5.1. Стандартизация лекарственных форм

Полученные ЛФ подвергали стандартизации по показателям, изложенным в соответствующих ОФС ГФ РФ XIV изд. («Описание», «Сухой остаток» и значение pH). Для спиртосодержащих форм также определяли содержание спирта этилового. Проводили определение плотности и содержания тяжелых металлов в настояках и экстрактах, так как данные показатели регламентированы требованиями действующих ОФС.

Описание. Отвар листьев аронии Мичурина представляет собой прозрачную жидкость, светлого зелено-коричневого цвета с вяжущим вкусом.

Настойка листьев аронии – прозрачная жидкость зелено-коричневого цвета со слабым специфическим запахом. При хранении возможно образование осадка.

Экстракт листьев аронии жидкий – темно-коричневая густая жидкость, прозрачная в тонком слое со специфическим запахом.

Результаты стандартизации ЛФ приведены в Таблице 53.

Таблица 53 – Результаты стандартизации ЛФ на основе листьев аронии Мичурина

ЛФ	Содержание спирта этилового, %	Плотность, г/см ³	Тяжелые металлы, %	Сухой остаток, %	Значение pH
Отвар 1:10	-	-	-	4,80±0,45	6,01
Настойка 1:5	58,10	0,9378±0,0012	Менее 0,001	5,30±0,31	5,26
Экстракт жидкий 1:1	46,64	1,0102±0,0009	Менее 0,01	6,03±0,25	5,09

По показателям сухого остатка и плотности наибольшее количество экстрактивных веществ содержится в экстракте жидком, что свидетельствует о более высоком выходе БАВ при получении данной ЛФ. Однако выход БАВ для других ЛФ также высок.

Из спиртосодержащих извлечений большее содержание спирта в готовой ЛФ характерно для настойки, что может быть объяснено отсутствием стадии нагревания и выпаривания последних 15% извлечения, проводимых при получении экстракта методом перколяции.

Содержание тяжелых металлов не превышало допустимых НД показателей.

6.5.2. Количественное определение биологически активных веществ в лекарственных формах

В исследуемых ЛФ проводили количественное определение дубильных веществ и флавоноидов, а также оценивали АОА. Определение АОА проводили по методике Максимовой методом перманганатометрического титрования [82].

Методика определения флавоноидов в ЛФ в пересчете на рутин. Отвар: 1 мл отвара помещают в мерную колбу на 50 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора хлорида алюминия в 96% этиловом спирте, подкисляют 1 каплей раствора уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают (раствор А). Через 80 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл отвара, 1 каплю раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 50 мл (раствор Б).

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца рутина: около 0.05 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу объемом 100 мл, прибавляют 30 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до полного растворения рутина. Охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную

колбу объемом 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора до метки, перемешивают и оставляют на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: 1 мл раствора А, 1 капля раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в отваре (1:10) в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{A_{ст} \cdot a \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 2 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 100}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – объем отвара, взятый на анализ, мл; a_0 – навеска СО рутин, г; P – содержание основного вещества в СО рутин, %.

Вид дифференциального спектра поглощения отвара (1:10) из листьев аронии Мичурина при количественном определении флавоноидов представлен на рисунке 63.

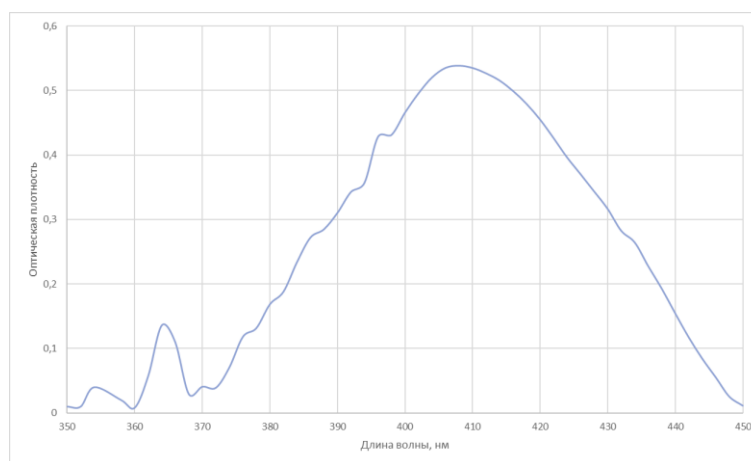


Рисунок 63 – Вид дифференциального спектра поглощения отвара при количественном определении флавоноидов в пересчете на рутин

Настойка: 5 мл настойки помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят спиртом этиловым 96% до метки и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в колбу на 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора хлорида алюминия в

96% этиловом спирте, подкисляют 1 каплей раствора уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают (раствор Б). Через 80 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл настойки, 1 каплю раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО рутина, приготовленного по описанной выше методике.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 100}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – объем настойки, взятый на анализ, мл; a_0 – навеска СО рутина, г; P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Вид дифференциального спектра поглощения настойки (1:5) из листьев аронии Мичурина при количественном определении флавоноидов представлен на рисунке 64.

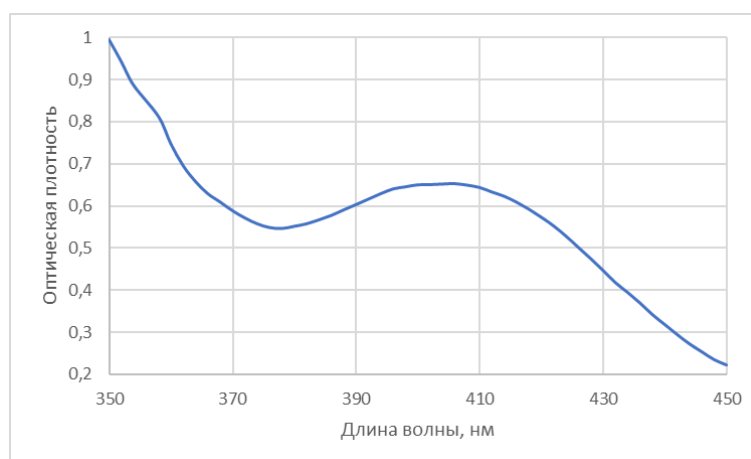


Рисунок 64 - Вид дифференциального спектра поглощения настойки при количественном определении флавоноидов в пересчете на рутин

Экстракт жидкий: 5 мл экстракта помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят спиртом этиловым 96% до метки и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в колбу на 50 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора хлорида алюминия в 96% этиловом спирте, подкисляют 1 каплей раствора уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают (раствор Б). Через 80 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл экстракта, 1 каплю раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 50 мл (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО рутина, приготовленного по описанной выше методике.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте жидком (1:1) в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot P}{A_{ст} \cdot a}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – объем экстракта жидкого, взятый на анализ, мл; a_0 – навеска СО рутина, г; P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

Вид дифференциального спектра поглощения экстракта жидкого (1:1) из листьев аронии Мичурина при количественном определении флавоноидов представлен на рисунке 65.

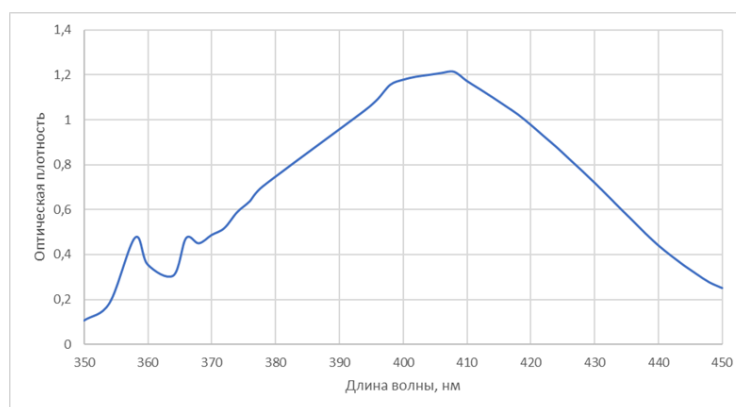


Рисунок 65 - Вид дифференциального спектра поглощения экстракта жидкого при количественном определении флавоноидов в пересчете на рутин

Методика количественного определения дубильных веществ в ЛФ, в пересчете на катехин.

Отвар: 5 мл отвара помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца катехина: около 0.05 г (точная навеска) катехина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл воды очищенной, растворяют при взбалтывании. Доводят объем раствора до метки водой очищенной (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем раствора до метки (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: вода очищенная.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в отваре в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot P}{A_{\text{ст}} \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 0,25 \cdot P}{A_{\text{ст}} \cdot a}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – объем отвара, мл; a_0 – навеска СО катехина, г; P – содержание основного вещества в СО катехина, %

Вид спектра поглощения отвара (1:10) из листьев аронии Мичурина при количественном определении дубильных веществ представлен на рисунке 66.

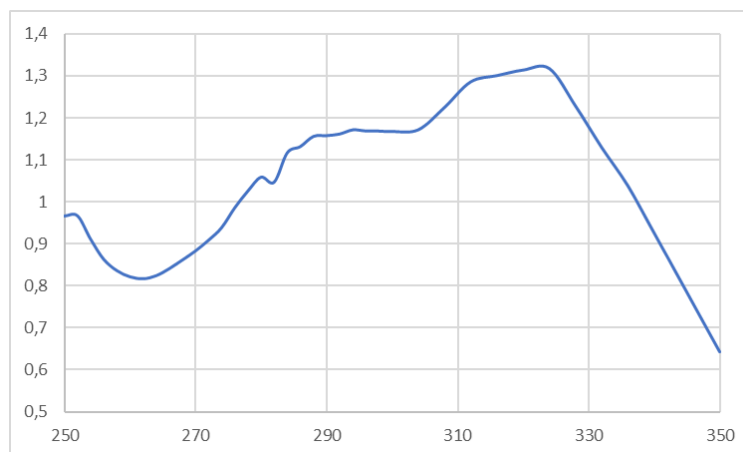


Рисунок 66 - Вид спектра поглощения отвара при количественном определении дубильных веществ в пересчете на катехин

Настойка: 5 мл настойки помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную (раствор В). Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО катехина, приготовленного по вышеописанной методике.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в настойке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot P}{A_{ст} \cdot a}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – объем настойки, мл; a_0 – навеска СО катехина, г; P – содержание основного вещества в СО катехина, %

Экстракт жидкий: 5 мл экстракта жидкого помещают в мерную колбу на 100 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине

волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную (раствор В). Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО катехина, приготовленного по вышеописанной методике.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в экстракте жидком в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 2 \cdot P}{A_{ст} \cdot a}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – объем экстракта жидкого, мл; a_0 – навеска СО катехина, г; P – содержание основного вещества в СО катехина, %

Результаты количественного определения целевых групп БАВ изучаемого сырья (флавоноидов и дубильных веществ) в полученных ЛФ приведены в Таблице 54.

Содержание флавоноидов максимально в ЛФ экстракт жидкий, минимально в настое. Содержание дубильных веществ максимально для ЛФ настойка и экстракт.

Таблица 54 – Результаты количественного определения БАВ в ЛФ на основе листьев аронии Мичурина

ЛФ	Флавоноиды (в пересчете на рутин), %	Дубильные вещества (в пересчете на катехин), %	Антиокислительная активность (в пересчете на кверцетин), мг/мл
Отвар 1:10	$0,10 \pm 0,021$	$0,86 \pm 0,17$	$1,04 \pm 0,05$
Настойка 1:5	$0,32 \pm 0,10$	$2,27 \pm 0,12$	$3,01 \pm 0,23$
Экстракт жидкий 1:1	$2,14 \pm 0,18$	$11,35 \pm 0,24$	$5,83 \pm 0,83$

Согласно проведенным исследованиям оценки содержания в отваре дубильных веществ и флавоноидов в соответствии с рекомендуемыми для взрослых величинами суточного потребления рутина и катехина для восполнения адекватного уровня могут быть рекомендованы следующие режимы дозирования данной лекарственной формы (таблица 55).

Таблица 55 – Рекомендации по режиму дозирования отвара листьев аронии Мичурина

Показатель	Содержание	Суточная потребность	Режим дозирования
Флавоноиды (в пересчете на рутин), %	0,10±0,021	30-100 мг	От 30 мл до 100 мл отвара (прием по 1-2 столовой ложке 2-3 раза в день)
Дубильные вещества (в пересчете на катехин), %	0,86±0,17	50-100 мг	6 мл – 12 мл отвара (прием по 1/3 - 1 столовой ложке 1 раз в день)

Был оценен выход БАВ из растительного сырья для разных ЛФ, результаты представлены в таблице 56. Для оценки выхода было проведено количественное определение флавоноидов и дубильных веществ в извлечениях по методикам, разработанным для определения данных групп БАВ в листьях аронии Мичурина (см. Глава 5).

Таблица 56 – Оценка выхода БАВ из листьев аронии Мичурина в ЛФ

ЛФ	Выход некоторых групп БАВ, %	
	Флавоноиды	Дубильные вещества
Отвар 1:10	36,3±12,29	60,6±1,19
Настойка 1:5	58,9±10,01	79,9±0,84
Экстракт жидкий 1:1	78,4±6,47	79,9±1,69

Наибольший выход флавоноидов наблюдался для ЛФ экстракт жидкий, а дубильных веществ для экстракта и настойки. В целом выход дубильных веществ для всех ЛФ выше по сравнению с флавоноидами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее высокой антиоксидантной активностью обладает ЛФ экстракт жидкий (1:1), что может быть объяснено более высоким содержанием веществ-антиоксидантов: флавоноидов и дубильных веществ.

По результатам проведенных исследований оптимальной жидкой ЛФ может быть признан экстракт жидкий (1:1), так как содержит наибольшее количество БАВ, определяющих фармакологическую активность, и проявляет более высокую антиокислительную активность. Установленные эффекты свидетельствует о

целесообразности разработки содержащих извлечения из листьев аронии Мичурина ЛРП, в т.ч. комбинированных, капилляропротекторного и антиоксидантного действия для курсового перорального применения в качестве венотонизирующих средств.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.

1. Согласно данным *in silico* оценки (программы PASS-online и Phyto4Health) основные БАВ листьев аронии Мичурина могут проявлять антиоксидантную, вяжущую, противовоспалительную и вазопротекторную активности, что открывает перспективы создания ЛФ на основе данного сырья определенного спектра действия для дальнейшей оценки *in vivo* на этапе доклинических исследований.

2. Оценена антиокислительная активность извлечений из листьев аронии Мичурина *in vitro*. Наиболее высокие значения данного показателя были характерны для извлечений, полученных с применением 40-70% этилового спирта в качестве экстрагента, что обуславливает перспективность получения жидкий спиртосодержащих ЛФ на основе изучаемого сырья.

3. С использованием тест-системы инфузорий *Parametium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» установлено, что отвар листьев аронии Мичурина *in vitro* значительно достоверно повышает время выживаемости инфузорий при повреждающем воздействии раствора натрия хлорида, максимально на 39,3% по сравнению с контрольной пробой при инкубации 24 ч (в разведении 1:1000 при заготовке ЛРС в июне), что свидетельствует о наличии биостимулирующего и мембранопротекторного действия.

4. Результаты оценки антимикробной активности настойки и жидкого экстракта, полученных на основе листьев аронии Мичурина, подтвердили перспективность создания ЛРП, например, для наружного применения в комплексной терапии и профилактики воспалительных заболеваний полости рта в виде полосканий или аппликаций. Жидкий экстракт показал более широкий спектр антимикробной активности.

5. Разработаны методики количественного определения основных групп БАВ (флавоноидов, дубильных веществ) в ЛФ (отвар, настойка, экстракт жидкий). Проведена их стандартизация по показателям, изложенным в НД.

6. Наиболее высокое содержание экстрактивных веществ и целевых групп БАВ (флавоноидов и дубильных веществ) отмечено для экстракта жидкого (1:1), что обеспечивает проявление максимальных антиокислительной и антимикробной активностей и позволяет рекомендовать данную форму в качестве оптимальной из исследованных жидких ЛФ на основе листьев аронии Мичурина.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате комплексного морфолого - анатомического анализа листьев аронии Мичурина впервые установлены диагностические признаки, позволяющие проводить идентификацию данного сырья: одноклеточные 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 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.

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

ЛП – лекарственный препарат

БАВ – биологически активные вещества

ЛРС – лекарственное растительное сырье

РФ – Российская Федерация

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ЛРП – лекарственный растительный препарат

НД – нормативная документация

ФС – фармакопейная статья

ОФС – общая фармакопейная статья

КЭ – капиллярный электрофорез

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором

ТСХ – тонкослойная хроматография

СФМ – спектрофотометрия

ИКС – инфракрасная спектроскопия

АОА – антиокислительная активность

ЛФ – лекарственная форма

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

МС – масс-спектрометрия

СО – стандартный образец

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарова, О. В. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия / О.В. Азарова, Л.П. Галактионова // Химия растительного сырья. – 2012. – № 4. – С. 61-78.
2. Антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной / О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин // Фармация. - 2013. - № 1. - С. 11-12.
3. Бабкин, В.А. Экстрактивные вещества древесины лиственницы: химический состав, биологическая активность, перспективы практического использования / В.А. Бабкин // Инноватика и экспертиза: научные труды. - 2017. – №2 (20). - С. 210-224.
4. Барабой, В.А. Селен: биологическая роль и антиоксидантная активность / В.А. Барабой, Е.Н. Шестакова // The Ukrainian Biochemical Journal. - 2004. - Т. 76, № 1. - С. 23-32.
5. Барыкина, Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина ; – Москва : МГУ имени М.В. Ломоносова, 2004. – 312 с. - ISBN 5-211-06103-9.
6. Баяндина, И.И. Взаимосвязь вторичного метаболизма и химических элементов в лекарственных растениях / И.И. Баяндина, Ю.В. Загурская // Сибирский медицинский журнал. - 2014. – Т.131, № 8. - С. 107-111.
7. Биохимический состав плодов некоторых представителей рода Sorbus L. коллекции южно-уральского ботанического сада / Р.Г. Абдуллина, К.А. Пупыкина, С.Г. Денисова, В.В. Пупыкина // Химия растительного сырья. - 2021. - №3. - С. 235-243.
8. Блинникова, О.М. Витаминная ценность плодов аронии черноплодной / О.М. Блинникова // Вестник МичГАУ. – 2013. - №2. – С. 56-59.
9. Блинникова, О.М. Пищевая ценности плодов аронии черноплодной и перспективы их использования в производстве пищевых продуктов для функционального питания / О.М. Блинникова // Инновационные технологии в АПК : материалы Международной научно-практической конференции ,

Мичуринск, 21–23 ноября 2018 года / Общ. ред. В.А. Бабушкин. – Мичуринск: Мичуринский государственный аграрный университет, 2018. – С. 294-298.

10. Бочкарева, И.И. Качественный анализ флавоноидов манжетки прямоволосой (*Alchemilla Ortotricha Rothm.*) / И.И. Бочкарева, В.В. Артемьева, И.Н. Дьякова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. - №1. – С. 143-147.

11. Брежнева, Т.А. Определение количественного содержания различных групп БАВ в плодах рябины черноплодной / Т.А. Брежнева, Е.Е. Логвинова, И.С. Берест // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине : материалы II-й научно-практической конференции сборник материалов 2-й научно-практической конференции. – Москва. Сеченовский вестник, №1 (15), 2014. - С. 118-119.

12. 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.

13. Валов, Р.И. Элементный состав *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов, М.А. Ханина, А.П. Родин // Сибирское медицинское обозрение. - 2010. - №5. - С. 44-47.

14. Виноградова, Ю.К. Арония Мичурина: от создания до натурализации / Ю.К. Виноградова, А.Г. Куклина. – Москва : ГЕОС, 2014 – с. 137.

15. Влияние сока аронии черноплодной на артериальное давление экспериментальных животных / М.Н. Макарова, А.И. Селезнева, В.Г. Макаров [и др.] // Профилактическая и клиническая медицина. – 2012. - №3 (44). – С. 45-49.

16. Водородная связь / под ред. В.М. Чулановского. - Москва: Мир, 1964. - 462 с.

17. Водородная связь / Сборник статей : под ред. Н.Д. Соколова, В.М. Чулановского. - Москва: Наука, 1964. - 340 с.

18. Возможность применения специфических маркеров определенных видов лекарственного растительного сырья при анализе многокомпонентных

растительных сборов и фиточаев / Разживин Р.В., Решетняк В.Ю., Кузьменко А.Н. [и др.] // Вестник Московского университета. Серия Химия. 2009. - Т.50. - №2. - С. 129-132.

19. Войнар, А.И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека / А.И. Войнар – Москва: Высшая школа, 1960. - 544 с.

20. Вопросы петиолярной анатомии листьев смородины черной (*Ribes nigrum* L.) / М.Д. Цулукидзе, В.М. Рыжов, В.А. Куркин [и др.]. // Молодой ученый. — 2016. — № 3 (107). — С. 373-378.

21. Выбор оптимальных условий извлечения антоциановых соединений листьев рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, Е.И. Недолужко // Вестник Воронежского государственного университета. Серия Химия. Биология. Фармация. – №4. – 2016. – С. 142-146.

22. Гавриленко, И.Г. Анатомическое строение черешка листа, стебля и семени *Aconitum coreanum* (Ranunculaceae) / И.Г. Гавриленко, Е.В. Новожилова / *Turczaninowia*. - 2017. - Т.20, №1. - С. 75-79.

23. Гареева, Г.М. Целебные свойства аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa*) / Г.М. Гареева, Л.А. Хасанова, З.М. Хасанова // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. – 2018. - №2 (46). – С. 36-38.

24. Генералов, Е.А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов / Е.А. Генералов // *Auditorium*. - 2015. - №4 (08). - С.38-54.

25. Гладилов, В.Д. Возможности применения метода ГХ-МС (обзор) / В.Д. Гладилов, Е.П. Подольская // Научное приборостроение. - 2010. - №4. - С. 36-49.

26. ГОСТ Р 55569-2013 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза : нац. стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие приказом Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 06 сент. 2013 г. N 841-ст : введен впервые : дата введения 2015-07-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой

и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200105562> (дата обращения: 24.01.2023).

27. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам : нац. стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие Федер. агентства по техн. регулированию и метрологии от 23 нояб. 2010 г. N 499-ст : введен впервые : дата введения 2012-03-01 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200083430> (дата обращения: 10.10.2024)

28. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издание : офиц. сайт. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 24.10.2023).

29. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV издание. — URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopoea.php> (дата обращения 10.09.2021).

30. Гребенникова, О.А. Влияние температуры воздуха и продолжительности солнечного освещения на накопление антоцианов в плодах сортов алычи различных сроков созревания / О.А. Гребенникова, А.А. Рихтер, В.М. Горина // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2018. – Т. 179, №1. – С. 23-31.

31. Дроздова, И.Л. Элементный состав травы короставника полевого *Knautia Arvensis* (L.) Coult. / И.Л. Дроздова, Н.Н. Денисова // Химия растительного сырья. - 2013. - №4. - С. 135-139.

32. Дубильные вещества растительного происхождения и некоторые механизмы их фармакологических свойств / Е. Д. Кубасова, И. А. Крылов, Г. В. Корельская, Р. В. Кубасов // Вестник Биомедицина и социология. – 2022. – Т. 7, № 4. – С. 5-11.

33. Егорова, А.В. Изучение возможностей комплексного использования плодов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) / А.В. Егорова, В.А. Куркин, А.М.

Каримова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т.14, №1(9). – С.2215-2217.

34. Елисеева, Л.Г. Пищевая ценность плодов аронии черноплодной, выращенной в ЦЧР России / Елисеева Л.Г., Блинникова О.М.// Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. - 2013. -№5-6 (335-336). - С. 111-112.

35. Елисеева, Л.Г. Плоды аронии черноплодной – источник витаминно-минеральных комплексов / Елисеева Л.Г., Блинникова О.М.// Пищевая промышленность. -2013. -№4. - С. 28-29.

36. Зульфугарова, М.Б. Состав и содержание антоцианов плодов *Sambucus ebulus* L / М.Б. Зульфугарова, Э.Н. Новзуров // Химия растительного сырья. – 2017. – №1. – С. 163-167.

37. Изучение биологически активных веществ листьев рябины черноплодной / Е.И. Недолужко, Т.А. Брежнева, Е.Е. Логвинова [и др.] // Университетская наука: взгляд в будущее. Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета. В 2-х томах, Курск, 02 февраля 2018 года / Под редакцией В.А. Лазаренко. Том II. – Курск: Курский государственный медицинский университет, 2018. – С. 74-77.

38. Изучение биологически активных веществ листьев рябины черноплодной / Т.А. Брежнева, Е.И. Недолужко, Е.Е. Логвинова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия Химия. Биология. Фармация. – №2. – 2018. – С. 306-311.

39. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сорта плодов облепихи крушиновидной (*Hipporhaes rhamnoides* L.) / О.В. Тринеева, М.А. Рудая, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Химия растительного сырья. - 2019. - №1. - С.301-308.

40. Ильина, И.В. О некоторых биологических особенностях черноплодной рябины в Карелии / И.В. Ильина, В.Г. Гуторов, А.Э. Рюнтю / Адаптация растений при интродукции на Севере. – 1985. – С. 50-53.

41. Исследование компонентного состава лекарственного растительного сырья методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / Жестовская Е.С., Антохин А.М., Таранченко В.Ф. [и др.] // Химия растительного сырья. - 2018. - №3. - С.149-157.

42. Исследование компонентного состава CO₂-экстрактов клопогона вонючего (*Cimicifuga Foetida* L.) методом хромато-масс-спектрометрии / А.В. Захарченко, Н.Г. Базарнова, Д.В. Минаков [и др.] // Материалы Международной научно-практической онлайн конференции «Увалиевские чтения-2020» на тему «Актуальные вопросы развития науки и образования», Казахстан, Усть-Каменогорск, 26 ноября 2020 года /Өскемен: С. Аманжолов атындағы ШҚУ "Берел" баспасы, 2020. – с. 329-333.

43. Исследование летучих веществ аронии черноплодной / В.А. Самойлова, В.Н. Ковалёв, О.В. Товчига [и др.] // Вестник фармации. – 2013. –№4 (62). – С.33-38.

44. Исследование петиолярной анатомии листьев каштана конского как перспективного источника биологически активных соединений / П.В. Белов, В.А. Куркин, В.М. Рыжов [и др.] // Аспирантский вестник Поволжья. - 2019. – Т.19, №1-2. - С. 6-12.

45. Исследование потенциальных антиканцерогенных и антиоксидантных эффектов экстрактов из растительного сырья / Н.Б. Еремеева, Н.В. Макарова, Д.Ф. Игнатова, В.В. Бахарев // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – Т. 10, №4 (35). – С.613-626.

46. Исследование состава травы горца почечуйного методом газовой хромато-масс-спектрометрии / Чистякова А.С., Гудкова А.А., Сорокина А.А., Сливкин А.И. // Научный результат. Медицина и фармация. - 2017. - Т.3, №4. - С. 61-69.

47. Исследование химического состава плодов аронии различных сортов / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, И.А. Самылина, А.И. Сливкин // Фармация. – 2015. – №6. - С. 22- 26.

48. Исследование элементного состава плодов аронии черноплодной / В.Ю. Андреева, Н.В. Исайкина, Е.А. Крюкова, Е.В. Павлова // Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке. - 2013. – Т. 15, №6. – С.1-3.
49. Казицына, Л.А. Применение УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии в органической химии / Л.А. Казицына, Н.Б. Куплетская. - Москва: Издательство «Высшая школа». - 1971. - 264 с.
50. Карпова, Е.А. Динамика содержания пигментов в листьях *Begonia grandis* Dryander subsp. *Grandis* при интродукции в Западной Сибири (г. Новосибирск) / Е.А. Карпова, Т.Д. Фершалова // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2016. – №1(33). – С. 140-158.
51. Кашин, В.И. Арония – перспективная плодовая культура / В.И. Кашин, А.С. Косякин, В.А. Латушкин // Садоводство и виноградарство. – 1994. - №2. – С.10-11.
52. Керимли, Э.Г. D-маннитол из *Fraxinus excelsior* / Э.Г. Керимли, С.В. Серкерев // Химия растительного сырья. - 2016. - №1. - С. 191–194.
53. Климентова, Е.Г. Физиология растений: учебное пособие для студентов / Е.Г. Климентова, Е.В. Рассадина, Ж.А. Антонова. – Ульяновск: УлГУ, 2014. – 170 с.
54. Колосова, О.А. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сырья валериан сомнительной и волжской / О.А. Колосова, О.В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2022. - Т.11, №3. - С. 162-172.
55. Коляда, Н.А. О перидермальных древесных растениях юга Приморья / Н.А. Коляда // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. - 2010. - №5. - С. 80-81.
56. Кроткова, О.А. Сравнительное изучение липофильных веществ растений рода *Euphrasia* L. / О.А. Кроткова, Т.В. Бомбела, В.М. Петриченко // Химия растительного сырья. -2014. - № 1. - С. 147-151.

57. Кузярін, О.Т. Про онтоморфогенез і життєву форму *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot (Rosaceae Juss.) у природних фітосистемах заходу України / О.Т. Кузярін // Біологічні студії. – Т.4, №2. – 2010, С. 106-114.
58. Куклина, А.Г. Натурализация аронии Мичурина в лесах европейской части России / А.Г. Куклина // Лесохозяйственная информация. – 2015. - №2. – С.46-56.
59. Куркин, В.А. Стандартизация плодов аронии черноплодной / В.А. Куркин, А.В. Егорова // Фармация. – 2012. - №7. – С.10-13.
60. Кутателадзе, Г.Р. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края / Г.Р. Кутателадзе, Л.М. Федосеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т.8, №2. – С. 80-86.
61. Литтл, Л. Инфракрасные спектры адсорбированных молекул / Л. Литтл; под ред. В.И. Лыгина. - Москва: Мир, 1969. - 514 с.
62. Логвинова, Е.Е. Исследование содержания биологически активных веществ - антиоксидантов в лекарственных формах плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Сеченовский вестник. – 2015. – №1. – С. 87-88.
63. Логвинова, Е.Е. Качественный анализ дубильных веществ в плодах рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ : материалы 6-й международной научно-методической конференции «Фармообразование - 2016», Воронеж, 21-23 апреля 2016 года / под общ. ред. А.С. Беленовой – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2016. – С. 366-368.
64. Логвинова, Е.Е. Определение органических кислот в плодах аронии черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2015. - №10. – С.190-195.

65. Люминесцентный анализ коры ореха грецкого (*Juglans regia* L.) / Н.И. Зименикина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // От растения до лекарственного препарата : материалы международной научной конференции, Москва, 04-05 июня 2020 года. – Москва: ВИЛАР, 2020. - С. 233-238.
66. Маняхин, А.Ю. Амигдалин в плодах растений семейства Rosaceae, произрастающих в Приморье / А.Ю. Маняхин, В.М. Колдаев // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2019. - №2 (76). – С. 62-64.
67. Мартынов, А.М. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве фиалки одноцветковой / А.М. Мартынов, Т.Д. Даргаева // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т.2, №1 (113). – С. 79-83.
68. Масленников, П.В. Экологические аспекты накопления антоциановых пигментов в растениях : специальность 03.00.16 «Экология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Масленников Павел Владимирович; Калининградский государственный университет. - Калининград, 2003. - 25 с.
69. Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии для таксономии мискантуса / Н.М. Слынько, Н.В. Бурмакина, О.М. Поцелуева [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. -2019. – Т.23, №8. – С.1076-1081.
70. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина, Н.Э. Коломиец, Н.В. Исайкина // Фармация. – 2013. - №3. – С. 19-21.
71. Микро-элементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.А. Строчкова. – Москва : Медицина, 1991. - 496 с. – ISBN 5-225-02128-X.
72. Мининзон, И.Л. Черная книга флоры Нижегородской области: чужеродные виды растений, заносные и культивируемые, активно натурализующиеся в условиях нижегородской области. Девятая электронная версия / И.Л. Мининзон, А.А. Соловьев, О.В. Тростина. – Нижний Новгород : 2020. – 70 с.

73. МР 2.3.1.2432—08 Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации : методические рекомендации : утвержден и введен в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко : дата введения 2018-12-18 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200076084> (дата обращения: 21.02.2023).

74. МУК 4.1.1483 – 03 Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной аргонной плазмой : методические указания : утвержден и введен в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г.Онищенко : введен впервые : дата введения 2003-06-30 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200032531> (дата обращения: 21.02.2023).

75. Наканиси К. Инфракрасная спектроскопия и строение органических соединений / К. Наканиси. - Москва: Мир, 1965. - 216 с.

76. Определение антоцианов и хлорогеновых кислот в плодах рода арония: опыт хемосистематики / В.И. Дейнека, М.Ю. Третьяков, Е.Ю. Олейниц [и др.] // Химия растительного сырья. - 2019. - №2. – С.161-167.

77. Определение дубильных веществ в плодах Рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сборник научных трудов. Том. Выпуск 70. – Пятигорск : Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2015. – С. 51-53.

78. Определение флавоноидов и исследование влияния условий хранения на их содержание в плодах облепихи методом ТСХ / О. В. Тринеева, И. И. Сафонова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12, № 5. – С. 806-813.

79. Оптимизация разделения некоторых флавоноидов методом ТСХ / Н.А. Беланова, С.И. Карпов, В.Ф. Селеменев [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т.11, №6. – С. 905-912.

80. Особенности проявления антиоксидантного действия экстракта листьев рябины черноплодной на головной мозг / И.Н. Суворова, В.В. Давыдов, В.Н. Прозоровский, В.Н. Швец // Биомедицинская химия. – 2005. – Т.51, №1. – С. 66-71.

81. Отто М. Современные методы аналитической химии / М. Отто. - Москва: Мир, 2003. - С.151-290.

82. Патент №2170930 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 (2006.01), G01N 33/52 (2006.01) Способ определения антиокислительной активности : №2000111126/14 : заявл. 05.05.2000 : опублик. 20.07.2001 / Максимова Т.В., Никулина И.Н., Пахомов В.П. [и др.] // FindPatent.RU. Патентный поиск, поиск патентов на изобретения. URL: <https://findpatent.ru/patent/217/2170930.html> (дата обращения: 01.12.2022).

83. Патент №2171111 Российская федерация, МПК А61К 35/78. Экстракт листьев аронии, обладающий биологической активностью, и способ его получения : № 2000111125/14 : заявл. 05.05.2000 : опублик. 27.07.2001 / Ипатова О.М., Прозоровская Н.Н., Прозоровский В.Н. [и др.] // FindPatent.RU. Патентный поиск, поиск патентов на изобретения. URL: <https://findpatent.ru/patent/217/2171111.html> (дата обращения: 23.10.2020).

84. Петтиолярная анатомия в рамках анатомо-морфологического исследования перспективного лекарственного сырья – травы женьшеня / В.А. Куркин, А.С. Акушская, В.М. Рыжов [и др.] // Фундаментальные исследования. - 2014. - №5-6. - С. 1274-1278.

85. Петиолярная анатомия листьев аронии Мичурина / О.В. Пугачева, О.В. Тринеева, В.В. Негробов, Н.В. Хромов // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т.16, №2. – С. 11-15.
86. Петиолярная анатомия листьев облепихи крушиновидной / Н.А. Ковалёва, О.В. Тринеева, В.В. Негробов [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2022. – Т.14, №6. – С. 10-15.
87. Петухова, С.А. Тритерпеновые соединения надземных органов володушки козелецелистной (*Bupleurum Scorzonerifolium* Willd.) флоры Прибайкалья / С.А. Петухова, Д.Н. Оленников, В.М. Мирovich // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 215-222.
88. Платонов, В.В. Хромато-масс-спектрометрия спиртового экстракта маклюры / В.В. Платонов, А.А. Хадарцев, Л.И. Белозерова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2017. – №2. – С.26-66.
89. Позднякова, Т.А. Изучение антиоксидантной активности травы астрагала солодколистного / Т.А. Позднякова, Р.А. Бубенчиков // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 1-2. – С. 27-32.
90. Применение ИК-спектроскопии в анализе лекарственного растительного сырья / О.В. Тринеева, М.А. Рудая, А.А. Гудкова, А.И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 4. – С. 187-194.
91. Применение хромато-масс-спектрометрии для изучения компонентного состава фармакопейных видов лекарственного растительного сырья / Р.В. Разживин, В.Ю. Решетняк, А.Н. Кузьменко [и др.] // Вестник Московского университета. Серия Химия. – 2009. – Т.50, №1. – С.67-70.
92. Пугачева, Г.М. Некоторые элементы технологии производства посадочного материала / Г.М. Пугачева // Современное состояние питомниководства и инновационные основы его развития: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения доктора с/х наук С.Н. Степанова, Мичуринск, 21-23 апреля 2015 года. – Мичуринск: Кварта, 2015. – С. 236-242.

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

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

95. 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.

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

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

98. 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.

99. Пугачева, О.В. Исследование элементного состава листьев аронии Мичурина (*Aronia Mitschurinii* Skvortsov & Maitulina) / О.В. Пугачева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Химия растительного сырья. – 2023. - №6. – С. 307-316.

100. 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.

101. Пугачева, О.В. Морфолого-анатомическое изучение листа аронии Мичурина (*Aronia Mitschurinii 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.

102. 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.

103. 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.

104. 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 2023 года. – Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, 2023. – С. 303-307.

105. 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.

106. Пугачева, О.В. Определение экстрактивных веществ в листьях аронии Мичурина / О.В. Пугачева, К.Е. Панова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Биофармацевтический журнал. – 2023. - №4. – С.3-6.

107. 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.

108. Пшенникова, Л.М. Анатомическое строение черешков листьев видов рода *Dasiphora* (Rosaceae) / Л.М. Пшенникова, С.А. Волкова / *Turczaninowia*. - 2013. - Т.16, №2. - С. 106-109.

109. Рамазанова, З.Р. Анатомическое строение листьев хурмы кавказской (*Diospyros lotus* L.) / З.Р. Рамазанова, З.М. Асадулаев // Ботанический вестник Северного Кавказа. - 2016. - №3. - С. 54-60.

110. Рокотянская, В.В. Влияние криоактивированного порошка аронии черноплодной на окислительную модификацию белка при токсическом гепатите / В.В. Рокотянская // Рецепт. – 2013. – №4(90). – С.112-117.

111. Российская Федерация. Главный государственный санитарный врач. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания : Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 г. № 2. // Гарант.ру. Информационно-правовой портал. URL: <https://base.garant.ru/400274954/> (дата обращения 04.06.2022).

112. Рудакова, Ю.Г. Элементный состав травы дубровника белого (*Teucrium polium* L.) / Ю.Г. Рудакова, О.И. Попова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=16108> (дата обращения: 13.12.2014).

113. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 ч. / под редакцией А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с.

114. Рыжов, В.М. Исследование перспективы комплексной переработки надземной части татарника колючего *Oporordumacantium* L. / В.М. Рыжов, А.С. Бельченко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16. - №1-3. – С. 812 – 816.

115. Савченкова, Л.В. Окислительный гомеостаз животных при гипокинетическом стрессе на фоне применения криоактивированного порошка аронии черноплодной / Л.В. Савченкова, М.С. Акимова // Рецепт. – 2013. – №4(90). – С.104-111.

116. Садовникова, Л.К. Экология и охрана окружающей среды при химическом загрязнении / Л.К. Садовникова, Д.С. Орлов, И.Н. Лозановская. - Москва: Высшая школа. - 2006. - 334с. - ISBN 5-06-005558-2.

117. Самойлова, В.А. Амінокислоти листя *Aronia melanocarpa* / В.А. Самойлова, В.М. Ковальов // Фармакогнозія та хімія природних сполук. – №3. - 2013. – С. 92-94.

118. Сампиев, А.М. Исследование флавоноидов, фенолкарбоновых и органических кислот скорцонеры испанской (*Scorzonera Hispanica* L.) / А.М.

Сампиев, А.И. Шевченко, М.Р. Хочава и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т.21, №1. – С. 25-29.

119. Самылина, И.А. Фасоль обыкновенная / И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская // Фарматека. – 2010. - №3. – С. 101-102.

120. Сатывалдеева, Ж.С. Характеристика основного химического состава и биологической активности некоторых стеринов высших растений // Ж.С. Сатывалдеева // Студенческий научный форум : Материалы XIII Международной студенческой научной конференции – Москва, 2021. - URL: <https://scienceforum.ru/2021/article/2018027306> (дата обращения: 27.08.2024).

121. Селиверстова, К.А. Элементный состав травы василька восточного (*Centaurea orientalis*) / К.А. Селиверстова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2006. - № 2. - С.366-367.

122. Скворцов, А. К. О месте, времени и возможном механизме возникновения культурной черноплодной аронии. / А.К. Скворцов, Ю.К. Майтулина, Ю.Н. Горбунов // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический: журнал. — 1983. — Т. 88, № 3. — С. 88—96.

123. Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты): методические рекомендации / Шабунин С.В., Бузлама В.С., Ермакова Т.И. [и др.]– Москва-Воронеж : Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, 2006. – 51 с.

124. Современные методы определения флавоноидов / Н.В. Калганова, Н.А. Полотнянко, Е.Д. Грибова, И.А. Стаханова // Студенческий научный форум : Материалы IX Международной студенческой научной конференции – Москва, 2017. - URL: <https://scienceforum.ru/2017/article/2017037327> (дата обращения: 01.03.2022).

125. Современные методы получения очищенных экстрактов антоцианов / М. А. Герасимов, А. С. Кошечкина, И. Б. Перова, К. И. Эллер // Фармация. – 2024. – Т. 73, № 4. – С. 5-13.

126. Состав биологически активных веществ каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) / В.П. Курченко, Н.В. Сушинская, К.И. Майорова [и др.] // Экобиотех. – 2021. – Т.4, № 1. - С. 33-39.
127. Справочник Видаль «Лекарственные препараты в России» : офиц.сайт. – Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/quercus_cortex__15895 (дата обращения: 27.08.2024).
128. Сравнительное анатомо-морфологическое исследование некоторых вегетативных органов эвкалипта прутовидного и эвкалипта серого / Куркин В.А., Авдеева Е.В., Тарасенко Л.В. [и др.] // Медицинский альманах. - 2013. - № 5 (28). - С. 191-196.
129. Съедин, А.В. Использование метода ИК-спектроскопии для экспресс – идентификации тиогликозидов в растительном сырье / А.В. Съедин, Т.В. Орловская, М.В. Гаврилин // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 1. - С. 367.
130. Тимкин, А.В. Оценка загрязнения почв и сельскохозяйственной продукции радионуклидами цезия-137 и стронция-90 в некоторых районах Тамбовской области / А.В. Тимкин // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. - 2017. - №1. – С.8-13.
131. Тринеева О.В. Профиль биологически активных веществ листьев арони Мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья / О.В. Тринеева, О.В. Пугачева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. - Т.13, №2. – С. 33-43
132. Тринеева, О.В. Исследование профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза / О.В. Тринеева, М.А. Рудая, А.И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. - №8. – С.38-42.
133. Тринеева, О.В. Определение экстрактивных веществ в некоторых видах лекарственного растительного сырья / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, П. М. Карлов // Вестник Воронежского государственного университета, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013. - №2. – С. 220-224.

134. Тринеева, О.В. Сравнительная характеристика определения антиоксидантной активности плодов облепихи крушиновидной различными методами / О.В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2019. - Т.8, №4. - С. 48-52.

135. Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами / под ред. Вайсбергера А. - Москва: Химия, 1967. - 532 с.

136. Фалеев, Д.И. Скрининг и определение пентациклических тритерпиноидов в растительном сырье хроматографическими и масс-спектрометрическими методами : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Фалеев Даниил Иванович; ФГАОУ ВО Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова. – Архангельск, 2020. –123с.

137. Федосеева, Г.П. О распространении, физиологической функции и биосинтезе сахароспиртов у высших растений (литературная справка) / Г.П. Федосеева, Н.И. Завадовская //Материалы по экологии и физиологии растений Уральской флоры. - 1976. - С.124-131.

138. Флоренская, Н.К. Технохимический контроль качества сырья и комбикормов / Н.К. Флоренская; – Москва: Колос,1968. - 120 с.

139. Формирование устойчивых интродукционных популяций: абрикос, черешня, черемуха, смородина, арония / А.К. Скворцов, Ю.К. Виноградова, А.Г. Кукина [и др.]. – Москва: Наука, 2005. – 187 с. - ISBN: 5-02-033677-7.

140. ФР.1.31.2010.06997 МВИ 002-ХМС-2009 Методика измерений массовых долей 62 элементов в почвах, донных отложениях, горных породах и сплавах цветных металлов методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой : дата введения 12.01.2015 // Томск : ООО «Химико-аналитический центр «Плазма». URL: <https://www.plasma-tomsk.ru/our-methods> (дата обращения: 02.08.2022).

141. Хадарцев, А.А. Хромато-масс-спектрометрия спиртового экстракта каланхоэ перистого / А.А. Хадарцев, В.В. Платонов, Л.И. Белозерова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. - 2017. - №4. – С. 11-24.

142. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Е.Я. Ладыгин, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова и [и др.] - Москва: Высшая школа, 1983. - 176 с.

143. Химический состав и анатомо-диагностические признаки плодов аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott.), культивируемой в Прибайкалье / В.М. Мирович, А.А. Посохина, Е.С. Костенко, Н.Г. Иванкина // Инновационные технологии в фармации : Сборник научных трудов, Иркутск, 14–15 июня 2019 года / Под общей редакцией Е. Г. Приваловой. Том Выпуск 6. – Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2019. – С. 274-277.

144. Химический состав этанольного экстракта стевии (*stevia rebaudiana* - медовая трава, семейство хризантемовых) / В. В. Платонов, А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2020. – Т.27, №1. – С. 92-99.

145. Хромато-масс-спектрометрический анализ компонентного состава этанольного извлечения семян сорта Воронежский амаранта печального до и после экстракции гексаном // Н.С. Фурса, А.А. Парфенов, Ю.А. Джурко, И.М. Коренская // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013. - №1. – С. 240-247.

146. Черемуха виргинская как источник биологически активных веществ / И.В. Михайлова, Н.В. Винокурова, Н.А. Кузьмичева [и др.] // Оренбургский медицинский вестник. – 2020. – Т.8, №3(31). – С. 40-45.

147. Черная книга флоры Беларуси: чужеродные вредоносные растения / Д.В. Дубровик, С.А. Дмитриева, Н.А. Ламан [и др.]. – Минск : Белорусская наука, 2020 - 409 с. - ISBN:978-985-08-2549-0.

148. Чечета, О.В. Исследование водородных связей α -токоферола методом ИК-спектроскопии / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2010. - № 2. - С. 164-167.

149. Чистякова, А.С. Изучение профиля органических кислот видов рода горец (*Persicaria* Mill.) / А.С. Чистякова, А.А. Гудкова, А.И. Сливкин, Е.Е. Чупандина // Фармация и фармакология. – 2022. - №10. – С. 44-54.
150. Шестакова, Г.Ю. Органические кислоты синюхи голубой / Г.Ю. Шестакова, А.А. Гудкова, А.С. Чистякова, В.А. Агафонов // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2021. – №138. – С.85-91.
151. Штаркман, И.Н. Антиоксидантные свойства аминокислот и образование долгоживущих радикалов белка под действием рентгеновского излучения : специальность 03.00.02 «Биофизика» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Штаркман Илья Николаевич ; Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН – Пущино, 2008. – 21 с.
152. Щетилина, И. П. Растительное сырье как источник физиологически функциональных пищевых ингредиентов: по материалам Воронежской области / И. П. Щетилина, Н. Н. Попова // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. - 2017. - №7 (67). - С. 243-251.
153. Экспериментальные исследования по изучению минерального состава листьев мяты длиннолистной и мяты водной / И. М. Коренская, А.А. Беляева, А.С. Чистякова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2020. - № 1. - С.67-74.
154. Элементный состав крапивы коноплевидной (*Urtica cannabina* L.) / М. А. Ханина., К.В. Губин, А.П. Родин, М.Г. Ханина // Медицинский вестник Башкортостана. - 2016. – Т.11, № 5. - С.83-86.
155. Abdelhamid, M.S. GC-MS analysis of phytocomponents in the ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* seeds from Russia / M.S. Abdelhamid, E.I. Kondratenko, N.A. Lomteva // Journal of Applied Pharmaceutical Science. - 2015. - Vol.5, №04. - P.115-118.
156. Andersen, M.Ø. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications / Ø. M. Andersen, R.M. Kenneth - Boca Raton: CRC Press, 2006. – 1197 p.

157. Anthocyanins, total phenolics, ORAC and moisture content of wild and cultivated dark-fruited *Aronia* species / H.B. Mark, A.C Bryan., H.L. Lanfang [et al.] // *Scientia Horticulturae*. – 2017. – Vol.224. - P. 332-342.
158. Antibacterial mechanisms of *Aronia melanocarpa* (Michx.), *Chaenomeles superba* Lindl. and *Cornus mas* L. leaf extracts / M. Efenberger-Szmechtyk, A. Nowak, A. Czyżowska [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol.350. – P.1-11.
159. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high cholesterol diet / S. Valcheva-Kuzmanova, K. Kuzmanov, V. Mihova [et al.] // *Plant Foods for Human Nutrition* – 2007. – Vol.62. – P.19–24.
160. Anti-inflammatory activity of aronia berry extracts in murine splenocytes / D. A. Martin, R. Taheri, M.H. Brand [et al.] // *Journal of Functional Foods*. - 2014. – Vol. 8. –P. 68-75.
161. Anti-inflammatory effects of *Aronia* extract on rat endotoxin-induced uveitis / K. Ohgami, I. Ilieva, K. Shiratori [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2005. – Vol.46. – P.275–281.
162. *Aronia* berry (*Aronia mitschurinii* ‘Viking’) inhibits colitis in mice and inhibits T cell tumor necrosis factor- α secretion / D.A. Martin, J.A. Smyth, Z. Liu, B.W. Bolling // *Journal of Functional Foods*. – 2018. – Vol. 44. – C. 48-57.
163. *Aronia melanocarpa* juice, a rich source of polyphenols, induces endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries via the redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase / J.H. Kim, C. Auger, I. Kurita [et al.] // *Nitric Oxide*. – 2013. – Vol.35. - P. 54-64.
164. *Aronia melanocarpa* polysaccharide ameliorates inflammation and aging in mice by modulating the AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway and gut microbiota / Y. Zhao, X. Liu, Y. Zheng [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol.11. - №1. – P.1-15.
165. Badania nad protekcyjnym wpływem _zelu antocyjaninowego na fototoksyczne działanie promieni UV / J. Niedworok, A. Gwardys, A. Jankowski [et al.] // *Ochr Srod Zas Nat*. – 1999. – Vol.18. – P.83–87.

166. Bell, D.R. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts / D.R. Bell, K. Gochenaur // *Journal of Applied Physiology*. - 2006. – Vol.100. – P.1164–1170.
167. Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Functional Beverages Increase HDL-Cholesterol Levels in Aging Rats / E. Daskalova, S. Delchev, L. Vladimirova-Kitova [et al.] // *Foods* [Electronic resource]. – 2021. – Vol.10, №7. – URL: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1641> (date of treatment: 08.02.2022).
168. Brand, M. *Aronia Native Shurbs With untapped potential* / M. Brand // *Arnoldia*. - 2010. - Vol. 67. - №3 - P.14-25.
169. Britton, N.L. *An illustrated Flora of Northeastern United States and Canada.* / N.L. Britton, H.A. Brown. – New York: Dover, 1970. - Vol. 2. - 735 p.
170. Characterisation of water-soluble galactoglucomannan from Norway spruce wood and thermomechanical pulp / S. Willför, R. Sjöholm, C. Laine [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. -2003. – Vol.52. – P. 175–187.
171. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity / X. Wu, L. Gu, L.P. Ronald [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol.52, №26. - P.7846-7856.
172. Chemical components and functions of *Taxus chinensis* extract / Z. Hu, J.-T. Chen, S.-C. Jiang [et al.] // *Journal of King Saud University – Science*. – 2020. – Vol. 32, №2. – P. 1562-1568.
173. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Leaves / A.A. Boligon, T. G. Schwanz, M. Piana [et al.] // *Natural Product Research*. – 2013. –Vol.27, №1. – P.68-71.
174. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- κ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages / K. Appel, P. Meiser, E. Millán [et al.] // *Fitoterapia*. – 2015. - Vol.105. – P.73-82.
175. Coen, M. Chavicol β -d-glucoside, a phenylpropanoid heteroside, benzyl- β -d-glucoside and glycosidically bound volatiles from subspecies of *Cedronella*

canariensis / M. Coen, R. Engel, A. Nahrstedt // *Phytochemistry*. - 1995. – Vol. 40, №1. –P. 149-155.

176. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. ×prunifolia* and their antioxidant activities / A. Szopa, A. Kokotkiewicz, P. Kubica [et al.] // *European Food Research and Technology*. – 2017. -Vol.243. – P.1645–1657.

177. Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction / A. Cvetanović, G. Zengin, Z. Zeković [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. - 2018. – №121. - P. 458-466.

178. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Berries Cultivated in Korea: Identification of Phenolic Compounds in *Aronia* by HPLC/Q-TOF MS / D.W. Kim, H.A. Han, J.K. Kim [et al.] // *Preventive Nutrition and Food Science*. - 2021. – Vol.26, №4. – P. 459-468.

179. Consumption of chokeberry (*Aronia mitschurinii*) products modestly lowered blood pressure and reduced low-grade inflammation in subjects with mildly elevated blood pressure / B.-M. Loo, I. Erlund, R. Koli [et al.] // *Nutrition Research*. – 2016. – Vol.36, №11. – P.1222-1230.

180. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity / J.E. Lee, G.S. Kim, S. Park [et al.] // *Food Chemistry*. - 2014.-Vol. 146.-P.1-5.

181. Dietary prevention of colitis by aronia berry is mediated through increased Th17 and Treg / R. Pei, D.A. Martin, C.J. Valdez [et al.] // *Molecular Nutrition & Food Research* [Electronic resource]. – 2019. – Vol.63, №5. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201800985> (date of treatment: 07.03.2020).

182. DNA Protection by an *Aronia* Juice-Based Food Supplement / T. Bakuradze, P. Meiser, J. Galan, E. Richling // *Antioxidants* (Basel) [Electronic

resource]. – 2021. - Vol.10, №6. – <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/6/857> (date of treatment: 09.03.2022).

183. Effect of Aronia Melanocarpa (Black Chokeberry) Supplementation on the Development of Obesity in Mice Fed a High-fat Diet / J.I. Baum, L.R. Howard, R.L. Prior, S.-O. Lee // *Journal of Berry Research*. – 2016. - Vol.6, №2. – P.203-212.

184. Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats / S. Valcheva-Kuzmanova, K. Marazova, I. Krasnaliev [et al.] // *Experimental and Toxicologic Pathology*. - 2005. – Vol.56. – P.385–392.

185. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis / A. Ryszawa, J. Kawczynska-Drozd, J. Pryjma [et al.] // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2006. – Vol.57. – P.611–626.

186. Effects of simulated digestion on black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) anthocyanins and intestinal flora / W. Yu, J. Gao, R. Hao [et al.] // *Journal of Food Science and Technology*. – 2021. – Vol.58, №4. – P.1511-1523.

187. Element contents in leaves of four plant species (birch, mountain ash, fern and spruce) along anthropogenic and geogenic concentration gradients / C. Reimann, A. Arnoldussen, R. Boyd [et al.] // *The Science of the total environment*. - 2007. - Vol.377. - P.416-433.

188. Evaluation of the immunomodulatory activity of Aronia in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy / M.P. Yaneva, A.D. Botushanova, L.A. Grigorov [et al.] // *Folia Medica*. – 2002. – Vol.44. – P.22–25.

189. Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats / M. Matsumoto, H. Hara, H. Chiji, T. Kasai // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol.52, №8. - P. 2226-2229.

190. Gut Microbiota Modulation by Polyphenols from *Aronia melanocarpa* of LPS-Induced Liver Diseases in Rats / Y. Kong, T. Yan, Y. Tong [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2021. – Vol.69, №11. – P.3312-3325.

191. Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability / B.W. Bolling, R. Taheri, R. Pei [et al.] // Food Chemistry. – 2015. – Vol.187. – P.189-196.

192. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats / S. Valcheva-Kuzmanova, P. Borisova, B. Galunska [et al.] // Experimental and Toxicologic Pathology. – 2004. – Vol.56. – P.195–201.

193. Huda, A. Analysis of alkaloid phytochemical compounds in the ethanolic extract of *Datura stramonium* and evaluation of antimicrobial activity / A. Huda, H. Imad, K. Muhanned // African journal of biotechnology. –2015. - №14. – P. 1668-1674.

194. In vitro antileukemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliot) and mulberry (*Morus alba* L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells / K. Skupien', D. Kostrzewa-Nowak, J. Oszmian'ski, J. Tarasiuk // Phytotherapy Research. – 2008. - №22. – P.689–694.

195. Investigation of the Origin of *Aronia mitschurinii* using Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis / J.L. Peter, H.B. Mark, A.C. Bryan [et al.] // HortScience. - 2019. – Vol.48, №5. – P. 520-524.

196. Israa, A. *Cyclamen persicum*: Methanolic Extract Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique / A. Israa, H. Imad., H. Haider // International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance. – 2017. – N8. - P.200-213.

197. Jurendić, T. *Aronia melanocarpa* Products and By-Products for Health and Nutrition: A Review / T. Jurendić, M. Ščetar // Antioxidants [Electronic resource]. - 2021. -Vol.10, №.7. - URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/7/1052> (date of treatment: 07.05.2022).

198. Kokotkiewicz, A. *Aronia* plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine / A. Kokotkiewicz, Z. Jaremicz, M. Luczkiewicz // Journal of Medicinal Food. - 2010. – Vol.13, №2. – P.55-69.

199. Leonard, P.J. *Aronia mitschurinii*: Solving a Horticultural Enigma: A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science / Peter James Leonard; University of Connecticut. – Connecticut, 2011. – 183p.
200. Malathi, K. Ethyl Iso-allocholate from a Medicinal Rice Karungkavuni Inhibits Dihydropteroate Synthase in *Escherichia coli*: A Molecular Docking and Dynamics Study / K. Malathi, A. Anand, S. Ramaiah // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – Vol.78, №6. – P. 780–788.
201. Moreira, L.R.S. An overview of mannan structure and mannandegrading enzyme systems / L.R.S. Moreira, E.X.F. Filho // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 79. – P. 165–178.
202. Ochmian, I. D. Comparison of Some Morphological Features, Quality and Chemical Content of Four Cultivars of Chokeberry Fruits (*Aronia melanocarpa*) / I. D. Ochmian, J. Grajkowski, M. Smolik // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. – 2012. – Vol.40, №1. – P. 253-260.
203. Olivia, N.U. Phytochemical profiling and GC-MS analysis of aqueous methanol fraction of *Hibiscus asper* leaves / N.U. Olivia, U.C. Goodness, O.M. Obinna // *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [Electronic resource]. - 2021. - Vol. 59. - №7. URL: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-021-00208-4> (date of treatment: 23.02.2023).
204. Patent № DE 10 2005 046 474 A1 Germany, A61K 36/73 (2006.01), A61K 131/00 (2006.01), A61P 31/00 (2006.01), A23L 3/3472 (2006.01), A23L 1/27 (2006.01) Verwendung eines Schalenextraktes aus *Aronia* sp. als antibakterielles, antimykotisches und entzündungshemmendes Mittel: № 10 2005 033 924.7: anmeldetag: 22.09.2005 : offenlegungstag: 18.01.2007 / Groth N, Fiedler B; assignee Anwaltskanzlei Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider. – 22c.
205. Pavlovic, A.N. Characterization of commercially available products of aronia according to their metal content / A.N. Pavlovic, J.M. Bracanovic, J.N. Veljkovic [et al.] // *Fruits*. – 2015. - Vol.70, №6. - P.385-393.

206. Polyphenolic extract association with renin inhibitors in experimental arterial hypertension / M. Ciocoiu, M. Badescu, O. Badulescu [et al.] // Journal of Biomedical Science and Engineering. – 2013. - Vol.6, №4. – P.493-497.

207. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells / B. Kim, Y. Park, C.J. Wegner [et al.] // The Journal of Nutritional Biochemistry. – 2013. – Vol.24, №9. - P.1564-1570.

208. Protective Effects of *Ligularia fischeri* and *Aronia melanocarpa* Extracts on Alcoholic Liver Disease (In Vitro and In Vivo Study) / C.W. Pyun, T.S. Seo, D.J. Kim [et al.] // BioMed Research International [Electronic resource]. – 2020. – Vol.2020. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/9720387/> (date of treatment: 11.11.2021).

209. Radical Scavenging Actions and Immunomodulatory Activity of *Aronia melanocarpa* Propylene Glycol Extracts / K. Bushmeleva, A. Vyshtakalyuk, D. Terenzhev [et al.] // Plants (Basel). – 2021. – Vol.10, №11. – P.1-21.

210. RAPD analysis of diploid and tetraploid populations of *Aronia* points to different reproductive strategies within the genus / H.A. Persson-Hovmalm, N. Jeppsson, I. V. Bartish [et al.] // Hereditas. - 2004. – Vol.141. – P.301–312.

211. Rodriguez-Amaya A guide to carotenoid analysis in foods / D. B. Rodriguez-Amaya – Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.

212. Rushforth, K. Trees of Britain and Europe. (Collins Wild Guide) / K. Rushforth. - Harpercollins Pub Ltd, 1999. - 1333p.

213. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries / S. Häkkinen, M. Heinonen, S. Kärenlampi, [et al.] // Food Research International. – 1999. – Vol.32, №5. – P.345-353.

214. Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon, cancer cell growth / P. Jing, J.A. Bomser, S.J. Schwartz [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol.56. – P.9391–9398.

215. The effect of natural anthocyanin dye on experimental radiation sickness / G. Andrykowski, J. Niedworok, Z. Maziarz, B. Małkowski // *Acta Poloniae Toxicologica*. – 1998. – Vol.6. – P.155-160.

216. The effect of natural anthocyanin dye on superoxide radical generation and chemiluminescence in animal after absorbed 4Gy dose of γ radiation / G. Andrykowski, J. Niedworok, Z. Maziarz, B. Małkowski // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 1998. -Vol.7. – P.357-361.

217. The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia / E. Kowalczyk, P. Fijałkowski, M. Kura [et al.] // *Polski Merkuriusz Lekarski*. – 2005. – Vol.113, №19. - P.651-653. [in Polish].

218. The leaves of *Aronia melanocarpa* L. and *Hippophae rhamnoides* L. as source of active ingredients for biopharmaceutical engineering / L. Pirvu, M. Panteli, I. Rasit [et al.] // *Agriculture and agricultural science Procedia*. – 2015.- №6. -P. 593-600.

219. The PASS : site Prediction of Activity Spectra for Substances. - URL: <http://way2drug.com/passonline/> (date of treatment: 30.01.2021).

220. The Phyto4Health: site by Database of Phytocomponents from Russian Pharmacopoeia Plants. - URL: <http://www.way2drug.com/p4h/index.php> (date of treatment: 30.04.2023).

221. The polyphenol-rich extract from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) modulates gut microbiota and improves lipid metabolism in diet-induced obese rats / Y. Zhu, J.Y. Zhang, Y.L. Wei [et al.] // *Nutrition & Metabolism* [Electronic resource]. - 2020. - №17. - URL: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-020-00473-9#citeas> (date of treatment: 30.06.2021).

222. The Protective Effect of Anthocyanins Extracted from *Aronia Melanocarpa* Berry in Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice / L. Li, J Li, H Xu [et al.] // *Mediators of Inflammation* [Electronic resource]. – 2021. - Vol. 2021. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2021/7372893/> (date of treatment: 15.04.2022).

223. Thi, N.D. Bioactive compound contents and antioxidant activity an Aronia (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages / N.D. Thi, E.-S. Hwang // Preventive Nutrition and Food Science. – 2014. - №19.– P.204-212.

224. Underutilized Chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) Accessions Are Rich Sources of Anthocyanins, Flavonoids, Hydroxycinnamic Acids, and Proanthocyanidins / R. Taheri, B. A. Connolly, M.H. Brand [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – Vol. 61, № 36. – P.8581-8588.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение
высшего образования
«Воронежский государственный
университет»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Университетская пл., 1, Воронеж, 394018.
Тел. (473) 220-75-21. Факс (473) 220-87-55.
E-mail: office@main.vsu.ru
<http://www.vsu.ru>
ОКПО 02068120, ОГРН 1023601560510
ИНН/КПП 3666029505/366601001

08.05.2024 № 1500-173
На № _____ от _____ 20__

И.о. генерального директора
ФГБУ «НЦЭСМП»
МИНЗДРАВА РОССИИ
кандидату фармацевтических наук
Косенко Валентине Владимировне

Фармацевтический факультет Воронежского государственного университета направляет для рассмотрения проект ФС «Аронии Мичурина листья», разработанный сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии в результате выполнения диссертационной работы.

Декан фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО ВГУ,
д.фарм.н., профессор



Е.Е. Чупандина

КАНЦЕЛЯРИЯ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
17.05.2024
Вх. № 10775

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Аронии Мичурина листья	ФС
<i>Aronia x mitschurinii</i> folia	Вводится впервые

Собранные в период технической зрелости плодов листья многолетнего культивируемого кустарника аронии Мичурина – *Aronia x mitschurinii* A.K.SKVORTSOV & MAITUL., сем. розоцветные – *Rosaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. 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) железки. Черешок длиной 10-15 мм, желобчатой формы, опушенный с нижней стороны. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вяжущий.

Измельченное сырье. При просматривании сквозь лупу (10х) измельченного сырья видны кусочки листовых пластинок с пильчатым краем и черешка, с волосками по нижней поверхности листа, бурыми железками или их основаниями по жилке с верхней стороны листа. Цвет измельченного сырья от светло-зеленого до коричнево-зеленого. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вяжущий.

Порошок. Кусочки листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. При рассмотрении под лупой (10х) видны кусочки листовых пластинок и черешка с волосками по нижней поверхности листа. Цвет порошка от светло-зеленого до коричнево-зеленого. Запах отсутствует, вкус водного извлечения вязущий.

Стереомикроскопические признаки

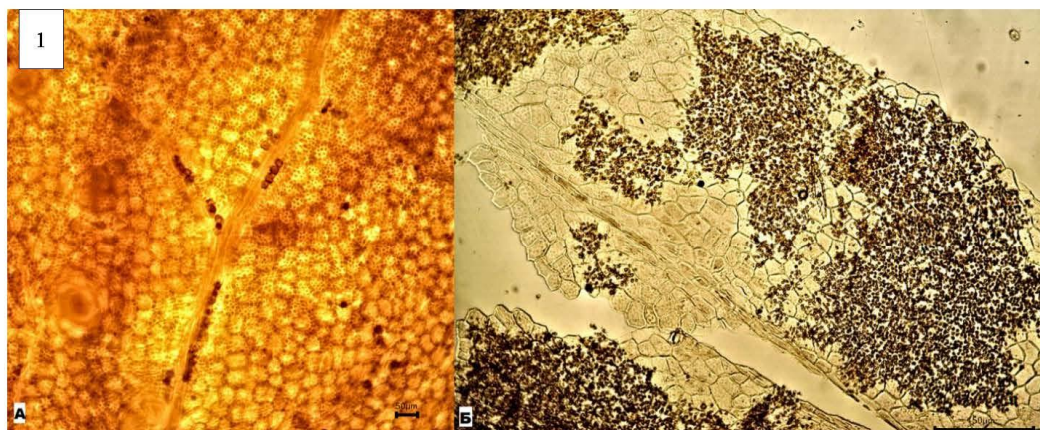
С нижней стороны листовой пластинки отмечены длинные тонкие прозрачные закрученные волоски, встречающиеся по всей поверхности листа, с преимущественным скоплением вдоль жилок. На верхней стороне листовой пластинки вдоль главной жилки расположены темно-бурые железки со светло-коричневым основанием.



Рисунок – Аронии Мичурина листья

1 – Вид нижней поверхности листа: А – главная жилка (x100), Б – волосок (x400); 2 - Вид верхней поверхности листа (x400): А – железка, Б – основание железки

Микроскопические признаки. *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности верхней части листовой пластинки можно отметить прямые, равномерные клетки пяти- или шестиугольной формы, заметна складчатость кутикулы. Нижний эпидермис имеет более извилистые стенки. Устьица непогруженные, находятся в одной плоскости с эпидермисом, анизоцитного типа, окружены тремя околоустьичными клетками, расположены на нижней стороне эпидермиса, овальные. Вдоль жилок хорошо заметна кристаллоносная обкладка. Кристаллы оксалата кальция ромбоэдрической формы. В мезофилле листа видны отдельные друзы оксалата кальция. По верхней стороне листовой пластинки вдоль жилок расположены многочисленные железки, простые одноклеточные с многоклеточным основанием (подставкой из мелких эпидермальных клеток). У основания заметно красно-бурое окрашивание. На нижней стороне листа встречаются простые многоклеточные конусовидные волоски, прямые или слегка изогнутые с гладкой поверхностью. Расположены также вдоль жилок, реже на остальной поверхности листовой пластинки.



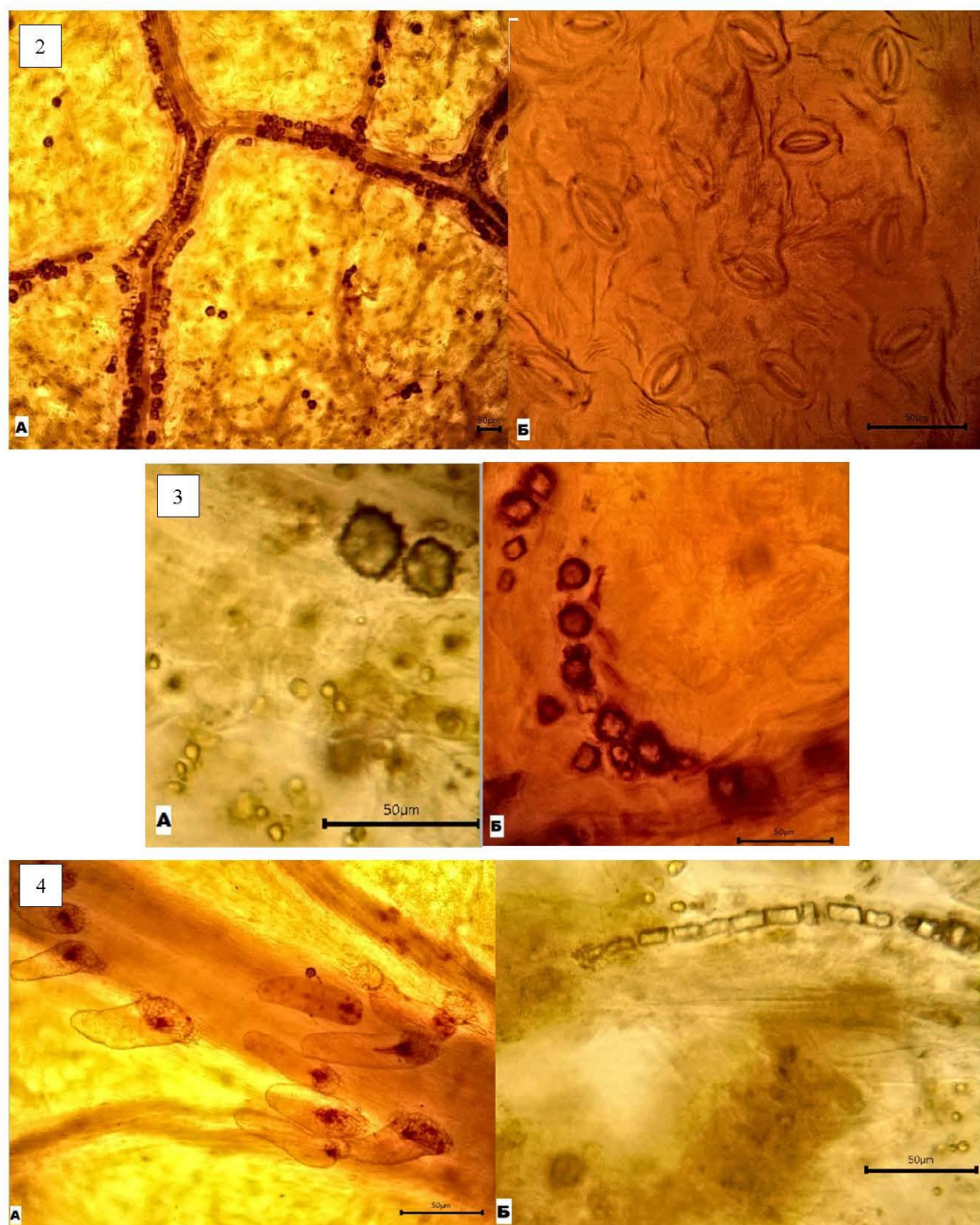


Рисунок – Аронии Мичурина листья

1 - Фрагменты верхнего эпидермиса листа: А – складчатость кутикулы эпидермиса (x100); Б – клетки эпидермиса (x400); 2 - Фрагменты нижнего эпидермиса листа: А – клетки эпидермиса с кристаллоносной обкладкой (x100); Б – устьица анизоцитного типа (x400); 3 - Фрагменты эпидермиса листа: А, Б – друзы и кристаллы оксалата кальция (x400); 4 - Фрагменты

эпидермиса листа: А – одноклеточные железки с многоклеточным основанием (x400); Б – многоклеточный простой волосок (x400).

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка под микроскопом должны быть видны: фрагменты верхней поверхности листа с прямыми клетками пяти- или шестиугольной формы, фрагменты нижней поверхности листа с извилистыми клетками устьицами, фрагменты жилок с кристаллоносной обкладкой. На фрагментах нижней поверхности листа, а также отдельно встречаются простые многоклеточные волоски.

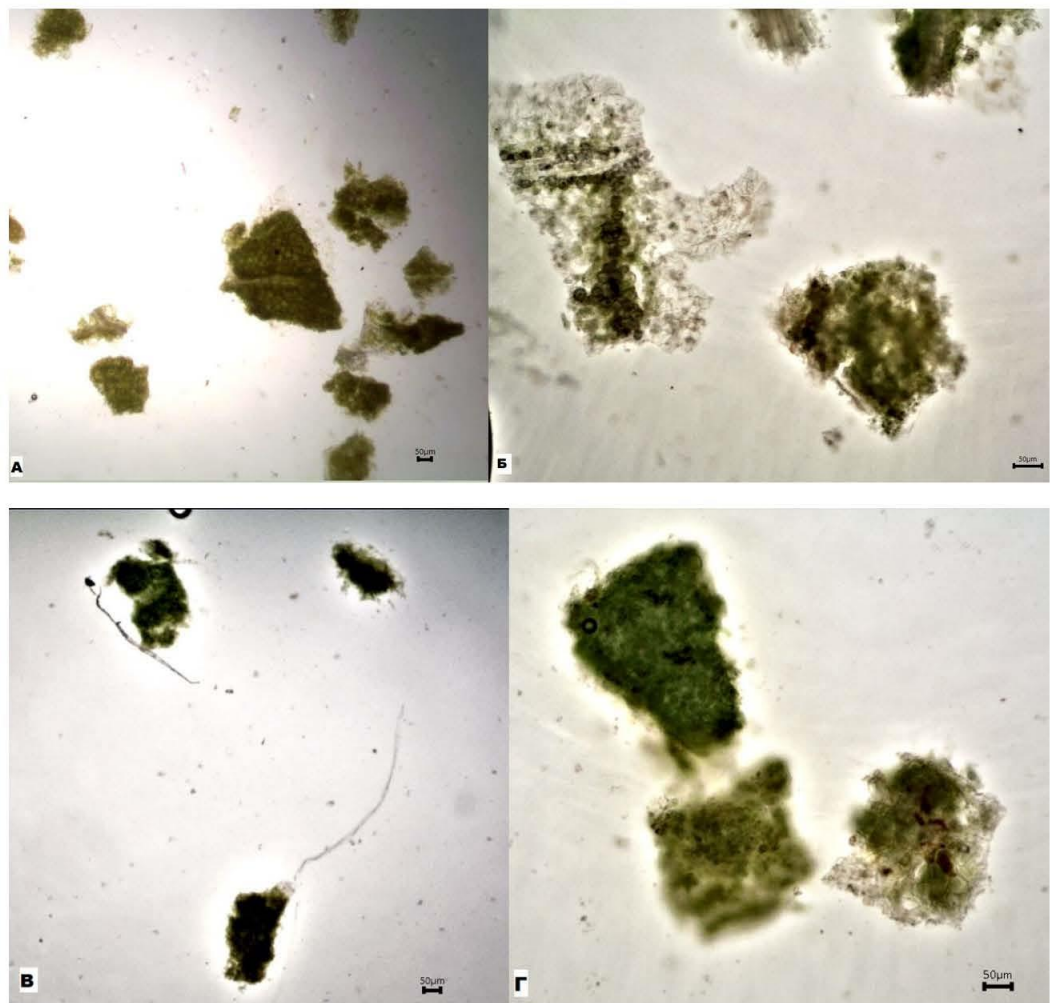


Рисунок – Порошок аронии Мичурина листьев

А – Фрагменты верхней поверхности листа (x40); Б – Фрагмент жилки с кристаллоносной обкладкой (x100); В – фрагменты листа с волосками (x40);
Г – фрагменты нижней поверхности листа с устьицами (x100)

Люминесцентная микроскопия. Люминесценция нижней стороны листа в УФ-свете слабая, с отчетливой визуализацией проводящей системы. Яркое свечение характерно для волосков. На верхней поверхности листа люминесцируют кутикула и проводящая система. Наблюдаются отдельные ярко-люминесцирующие включения. Места прикрепления трихом вдоль главной жилки и сами волоски люминесценцией не обладают.

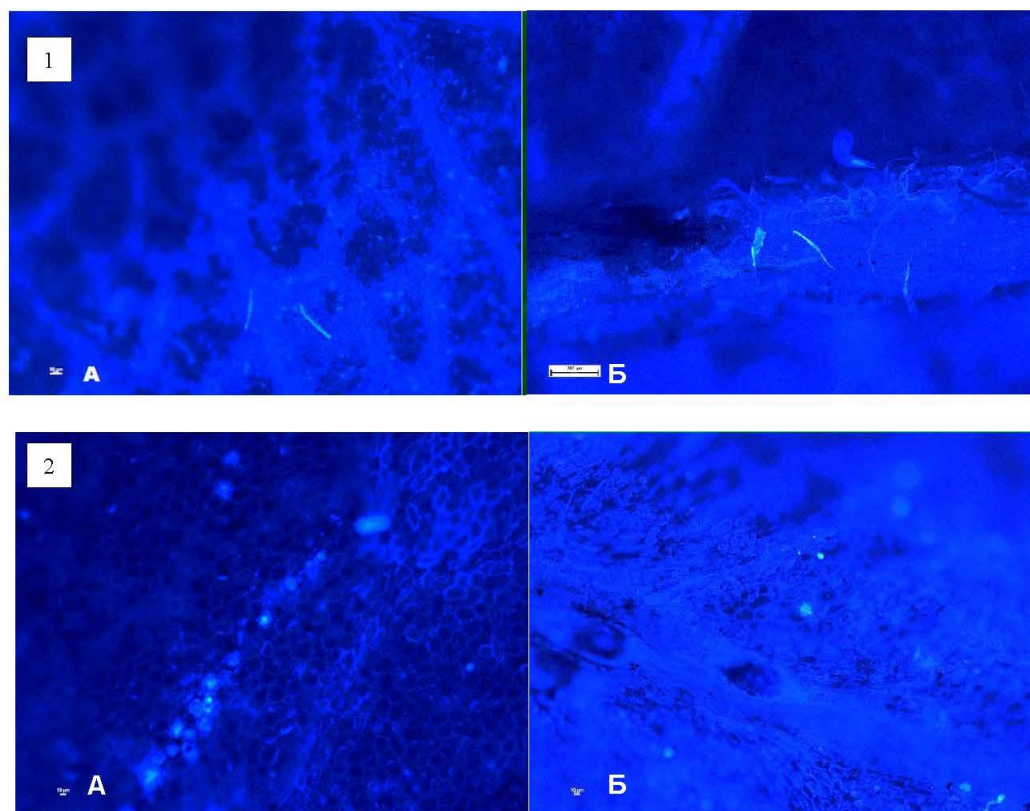
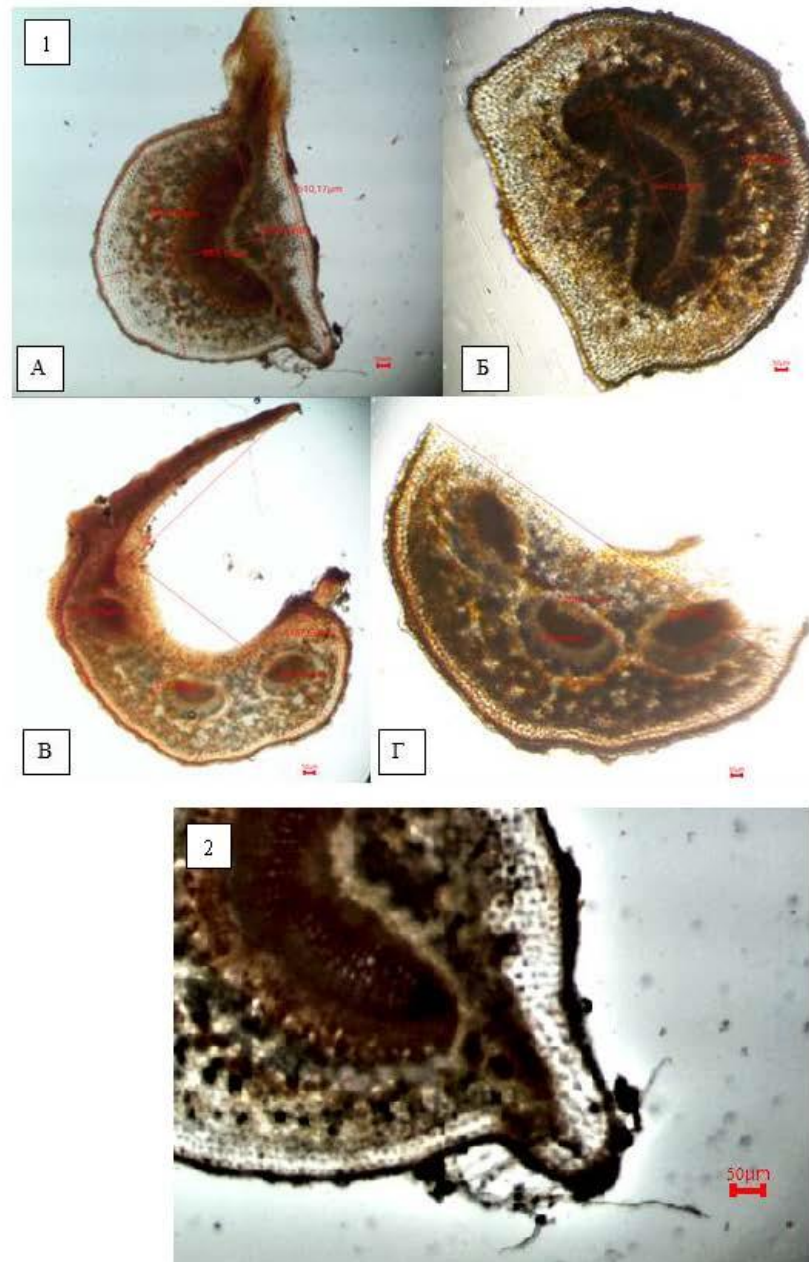


Рисунок – Аронии Мичурина листья

1 - Вид нижней поверхности листовой пластинки: А – поверхность листа (x50), Б – главная жилка (x200); 2 - Вид верхней поверхности листовой пластинки (x10): А - поверхность листа, Б – главная жилка листа.

Петиолярная анатомия. Поперечный срез V-образный в базальном участке с желобовидно углубленной адаксиальной стороной и параболически сужающейся латеральной. Медиальный и апикальный участки U-образные,

уплощенные в адаксиальной части, гиперболически сужающиеся в латеральной части. На границе между адаксиальной 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 пучка овальной формы. Пучки снаружи армированы склеренхимой.



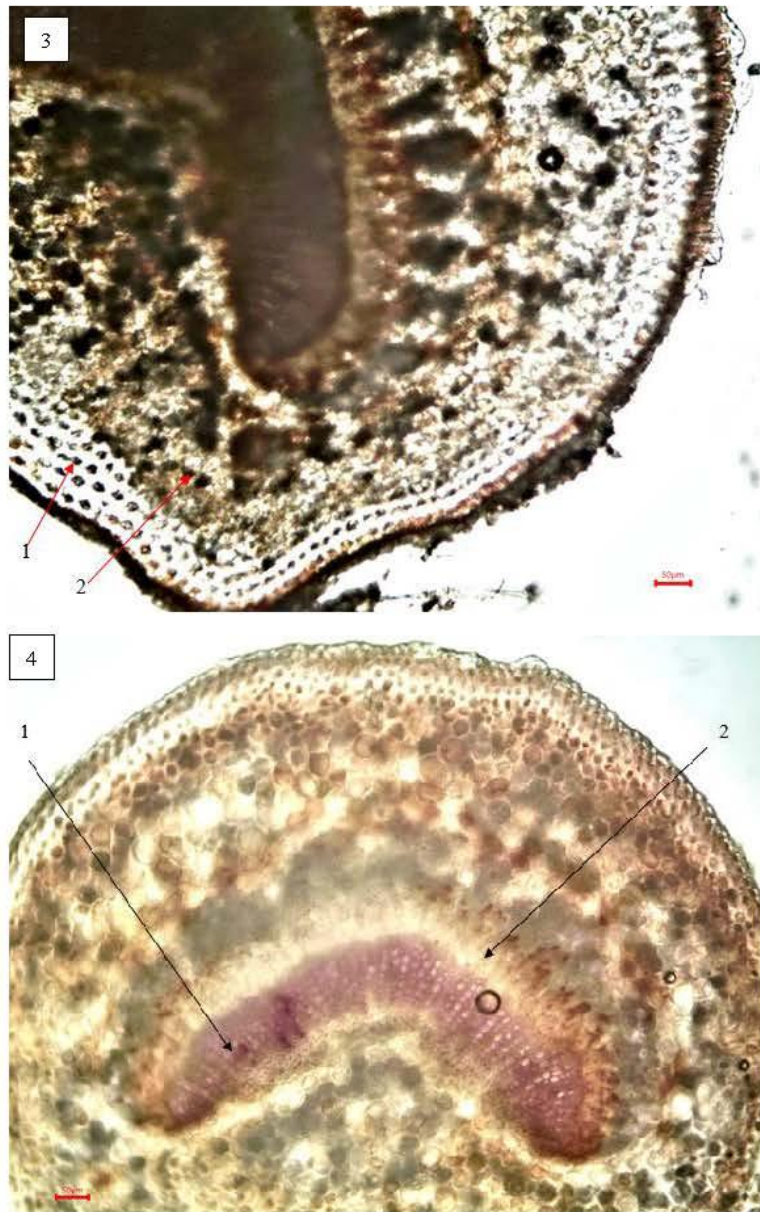


Рисунок – Поперечный срез черешка

1 – Общий план среза черешка (x40): а – апикальный участок, б – медиальный участок, в, г – базальный участок, 2 – Фрагмент черешка с волоском (x40); 3 - Фрагмент черешка с колленхимой на примере медиального участка (x40): 1 – колленхима, 2 – мезофилл; 4 - Проводящий пучок на примере медиального участка (x100): 1 – ксилема, 2 – флоэма

Определение основных групп биологически активных веществ

Спектрофотометрия

А) Спектр поглощения водного извлечения в диапазоне длин волн 250-300 нм, приготовленного для количественного определения дубильных веществ (раствор Б), должен иметь максимум при 278 ± 2 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор В.

Б) Спектр поглощения спиртового подкисленного извлечения в диапазоне длин волн 500-600 нм, приготовленного для количественного определения антоцианов (раствор Б), должен иметь максимум при 540 ± 2 нм.

Качественные реакции

Приготовление растворов.

Алюминия хлорида раствора 5 %: 5,0 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 95 % и доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Раствор стандартного образца (СО) рутина: около 0.025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до полного растворения рутина. Охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают

Тонкослойная хроматография.

Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Охлажденное до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке

размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора; рядом наносят растворы СО рутина в количестве 5 мкл.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2-3 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Затем пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 5%, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 2 – 3 мин и просматривают УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должно появиться не менее 4 зон адсорбции на белом фоне. Обнаруживается зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне стандартного образца рутина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 % (в соответствии с требованиями ОФС «Определение влажности в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 10 % (в соответствии с требованиями ОФС «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 % (в соответствии с требованиями ОФС «Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте»).

Посторонние примеси

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 1 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 1

%.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 0,5 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. 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», определение проводят на стадии производственного процесса.

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

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2%; сумма дубильных веществ в пересчете на катехин не менее 5%; сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид не менее 5%; экстрактивных веществ извлекаемых водой очищенной не менее 25 %.

Сумма флавоноидов в пересчете на рутин

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60% спирта этилового и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 90 минут. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 60% спиртом этиловым. Извлечение

фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора хлорида алюминия в 96% этиловом спирте, подкисляют 1 каплей раствора уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают (раствор Б). Через 80 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл препарата, 1 каплю раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца рутина: около 0.025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до полного растворения рутина. Охлаждают, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 3 мл 6% раствора алюминия хлорида в 96% этиловом спирте и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводят объем раствора до метки, перемешивают и оставляют на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: 1 мл раствора А, 1 капля раствора уксусной кислоты разведенной и 96% этиловый спирт до общего объема 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 50 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – навеска сырья, г; навеска СО рутина, г; W – влажность сырья, %; P – содержание основного вещества в СО рутина, %

Сумма дубильных веществ в пересчете на катехин

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Около 2 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом, вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы водой очищенной. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную (раствор В).

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца катехина: около 0.05 г (точная навеска) катехина помещают в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляют 30 мл воды очищенной, растворяют при взбалтывании. Доводят объем раствора до метки водой очищенной (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем раствора до метки (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения: вода очищенная.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 250 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100 - W) \cdot 100} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 250 \cdot P}{A_{ст} \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартного образца; a – навеска сырья, г; навеска СО катехина, г; W – влажность сырья, %; P – содержание основного вещества в СО катехина, %

Сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм.

Около 0,2 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом, вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 96% спирта этилового, подкисленного кислотой хлористоводородной до концентрации 1% и взвешивают. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 3,5 часов. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы подкисленным 96% этиловым спиртом до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

3 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора экстрагентом до метки и перемешивают (раствор Б). Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 540 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 96% спирт этиловый, подкисленный кислотой хлористоводородной до концентрации 1%. (раствор В).

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A_x \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; a – навеска сырья, г; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 540 ± 2 нм, равный 100; W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1; навеска сырья - 1,00 г, измельченного до размера частиц менее 1 мм; экстрагент – вода очищенная).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Маркировка вторичной упаковки должна включать указания «Продукция прошла радиационный контроль».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» в сухом, защищенной от света месте, отдельно от других групп сырья.

Срок годности 2 года.

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и
фармацевтической технологии фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО «Воронежский госуниверситет»,
д.фарм.н., профессор
Сливкин А. И.


АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 504.52

г. Воронеж

12 февраля 2024 г

1. Наименование для предложения:

Материалы диссертационного исследования «Фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:

Преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Пугачева О.В.

3. Где и когда внедрено:

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии.

4. Эффективность внедрения:

Внедряемые материалы будут использованы 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). Предлагаемое внедрение полезно также при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья.

Д.фарм.н., доцент
фармацевтического факультета ВГУ

К.фарм.н., доцент
фармацевтического факультета ВГУ



Гудкова А. А.

Коренская И.М.

«УТВЕРЖДАЮ»
 Декан фармацевтического факультета
 ФГБОУ ВО «Воронежский госуниверситет»,
 д.фарм.н., профессор
 Чупандина Е.Е.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1500-55

21 февраля 2024 года

г. Воронеж

1. Наименование для предложения:

Материалы диссертационного исследования «Фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:

Преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Пугачева О.В.

3. Где и когда внедрено:

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет.

4. Эффективность внедрения:

Предлагаемое внедрение используется 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.

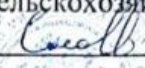
К.фарм.н., доцент
 фармацевтического факультета ВГУ

Беленова А.С.

К.фарм.н., доцент
 фармацевтического факультета ВГУ

Колосова О.А.



УТВЕРЖДАЮ
проректор по учебно-воспитательной
работе и молодежной политике
ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ,
доктор сельскохозяйственных наук,
 Соловьев С.В.
«__» _____ 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 01-2024

г. Мичуринск

«04» апреля 2024 года

1. Наименование для предложения:

Материалы диссертационного исследования на тему «Фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:

Преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Пугачева Ольга Валериевна.

3. Где и когда внедрено:

ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ, Институт фундаментальных и прикладных агrobiотехнологий имени И.В. Мичурина, кафедра садоводства, биотехнологий и селекции сельскохозяйственных культур.

4. Эффективность внедрения:

Предлагаемое внедрение полезно для проведения учебных занятий и научно-исследовательских работ в области идентификации аронии Мичурина и ее сортов, что может быть использовано в курсах дисциплин (модулей): «Ботаника», «Лекарственные и эфиромасличные растения», которые реализуются для обучающихся Института фундаментальных и прикладных агrobiотехнологий имени И.В. Мичурина ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ.

Заведующий кафедрой садоводства,
биотехнологий и селекции сельскохозяйственных
культур, к. с.х. н., доцент

 Кирина И.Б.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ России)



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина»
ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»

393774, Мичуринск, ул. Мичурина д.30
e-mail: info@fnc-mich.ru

Тел./факс: (47545) 2-07-61
Сайт: www.fnc-mich.ru

от 16.10.2023

№114

Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Воронежский государственный
университет»

Фармацевтический факультет

Справка

ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина» подтверждает, что исследуемые в рамках диссертационной работы сотрудника кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета Пугачевой О.В. образцы листьев заготовлены от культивируемого растения рода Арония (Aronia), вида Арония Мичурина (Aronia mitschurinii), сорта «Мулатка».

Директор
ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»

М.Ю. Акимов

Приложение 6

Таблица 6.1– Прогноз видов фармакологической активности некоторых флавоноидов (на основании литературных данных), катехина и цианидина содержащихся в листьях и извлечениях из листьев аронии Мичурина ($P_a > 0,7$) по данным PASS-online и Phyto4Health

Фармакологическая активность	Катехин		Цианидин		Нарингенин		Кемпферол		Апигенин		Лютеолин		Рутин		Кверцетин	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Агонист целостности мембран	0,983	0,001	-	-	0,964	0,003	0,974	0,002	0,967	0,002	0,965	0,003	0,984	0,001	0,973	0,002
Агонист апоптоза	-	-	0,792	0,018	0,726	0,015	0,881	0,005	0,847	0,005	0,866	0,005	0,747	0,011	0,887	0,005
Антигиперхолестеринемическое	-	-	-	-	0,816	0,005	-	-	-	-	-	-	0,900	0,003	-	-
Антиканцерогенный	0,795	0,005	-	-	0,724	0,008	0,715	0,008	-	-	-	-	0,983	0,001	0,757	0,007
Антимутагенный	-	-	0,894	0,002	0,857	0,003	0,948	0,001	0,921	0,002	0,940	0,001	-	-	0,940	0,001
Антиоксидантное	0,810	0,003	0,879	0,004	0,794	0,003	0,856	0,003	0,732	0,004	0,775	0,004	0,923	0,003	0,872	0,003
Антисептик	-	-	0,748	0,004	-	-	-	-	-	-	0,710	0,005	-	-	-	-
Вазопротектор	-	-	-	-	0,726	0,015	0,807	0,005	0,891	0,003	0,901	0,003	0,980	0,001	0,824	0,004
Вяжущее	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,729	0,002
Гемостатический	-	-	-	-	-	-	0,796	0,002	-	-	0,746	0,003	0,993	0,001	0,771	0,003
Гепатопротектор	-	-	-	-	0,721	0,006	-	-	-	-	-	-	0,968	0,001	0,706	0,007
Ингибитор перекисного окисления липидов	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,987	0,001	-	-
Ингибитор проницаемости мембран	-	-	-	-	-	-	-	-	0,946	0,002	-	-	0,990	0,000	-	-
Кардиопротективный	-	-	0,781	0,004	-	-	0,814	0,003	-	-	0,756	0,004	0,988	0,001	0,833	0,003
Лечение заболевание печени	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,704	0,005	-	-
Лечение ломкости капилляров	-	-	-	-	-	-	0,705	0,001	-	-	-	-	0,939	0,000	0,737	0,001
Лечение пролиферативных болезней	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,952	0,001	-	-
Мукомембранозный протектор	0,962	0,003	-	-	-	-	0,738	0,040	0,797	0,019	-	-	-	-	0,751	0,034
Отбеливающее кожу	-	-	0,715	0,004	0,794	0,003	-	-	-	-	-	-	0,755	0,002	-	-
Поглотитель свободных радикалов	0,842	0,002	0,889	0,003	0,794	0,003	0,771	0,003	0,719	0,004	0,755	0,003	0,988	0,001	0,811	0,003
Противовирусное (грипп)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,743	0,004	-	-
Противовоспалительное	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,728	0,013	-	-
Противогеморрагический	-	-	-	-	-	-	0,894	0,002	0,837	0,002	0,849	0,002	-	-	-	-
Противогрибковое	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,784	0,006	-	-

Продолжение таблицы 6.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Противоопухолевый	-	-	-	-	0,794	0,003	0,791	0,013	0,774	0,015	0,783	0,014	0,849	0,007	0,797	0,012
Противосеборейный	0,737	0,031	-	-	0,816	0,005	0,852	0,010	0,885	0,005	0,873	0,007	-	-	0,835	0,013
Противоядие	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,886	0,002	-	-
Протовапротозойное (Лейшмании)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,907	0,003	-	-
Радиопротектор	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,725	0,009	-	-
Радиосенсибилизирующее	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,742	0,004	-	-
Фибринолитическое	-	-	-	-	0,726	0,015	-	-	-	-	0,707	0,020	-	-	-	-
Химиопрофилактическое	0,788	0,004	0,736	0,008	0,794	0,003	-	-	-	-	-	-	0,968	0,001	0,717	0,006
Цитопротектор	-	-	-	-	0,794	0,003	-	-	-	-	0,706	0,005	-	-	-	-
Цитостатическое	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,711	0,009	-	-

Таблица 6.2 – Прогноз видов побочных и/или токсических эффектов некоторых флавоноидов (на основании литературных данных) и катехина, содержащихся в листьях аронии Мичурина ($P_a > 0,7$) по данным PASS-online

Побочный и/или токсический эффект	Катехин		Нарингенин		Кемферол		Апигенин		Лютеолин		Рутин		Кверцетин	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Абстиненция	-	-	0,766	0,051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Воспаление	0,810	0,014	0,770	0,018	0,702	0,024	-	-	-	-	0,952	0,004	-	-
Гематотоксичный	-	-	-	-	0,710	0,040	-	-	-	-	0,825	0,022	-	-
Генотоксический	-	-	-	-	0,843	0,003	0,757	0,004	0,824	0,004	-	-	-	-
Гипертензия	0,786	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Диарея	0,791	0,026	-	-	-	-	-	-	-	-	0,850	0,017	-	-
Изменение цвета мочи	-	-	-	-	-	-	0,758	0,014	0,752	0,014	-	-	-	-
Кровавая рвота	-	-	0,729	0,023	-	-	0,757	0,019	-	-	-	-	-	-
Нейротоксический	0,751	0,023	-	-	-	-	-	-	-	-	0,882	0,007	-	-
Нефротоксичный	0,740	0,022	0,708	0,027	-	-	-	-	-	-	0,761	0,019	-	-
Озноб, дрожание	0,740	0,022	0,766	0,051	0,783	0,044	0,835	0,024	0,823	0,028	-	-	0,766	0,052
Паника	0,769	0,011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подергивание, судороги	0,715	0,016	-	-	-	-	0,725	0,085	-	-	-	-	-	-

Продолжение Таблицы 6.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Потеря веса	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,702	0,022	-	-
Репродуктивная дисфункция	-	-	-	-	-	-	0,805	0,018	0,819	0,016	-	-	0,719	0,032
Токсический	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,851	0,019	-	-
Токсический, сосудистый	0,789	0,020	0,736	0,029	0,773	0,023	0,833	0,011	0,804	0,017	0,817	0,014	0,797	0,018
Эндокринный деструктор	-	-	-	-	-	-	-	-	0,734	0,012	-	-	0,706	0,014
Язвенная болезнь, афтозная язва	-	-	-	-	-	-	0,720	0,037	0,713	0,039	-	-	-	-