

Аврач Александра Сергеевна

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ (БОЯРЫШНИКА, РЯБИНЫ, ШИПОВНИКА,
МАЛИНЫ) РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ КОНСЕРВАЦИИ И
ЛЕКАРСВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2015

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Самылина Ирина Александровна – член-корр. РАН, доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Саканян Елена Ивановна – доктор фармацевтических наук, профессор, директор центра фармакопей и международного сотрудничества федерального государственного бюджетного учреждения "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России.

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, главный научный сотрудник отдела фитохимии государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации

Защита состоится «_____» _____ 2015 г. в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.040.09 при ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И. М. Сеченова» Минздрава России по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И. М. Сеченова» Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1, и на сайте <http://www.mma.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета Д 208.040.09,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время лекарственные препараты растительного происхождения составляют на фармацевтическом рынке около 40% всего ассортимента лекарственных средств. Широкий спектр фармакологических эффектов, выраженная эффективность и одновременно низкая токсичность, позволяют фитопрепаратам успешно конкурировать с синтетическими лекарственными препаратами.

Плоды - одна из морфологических групп лекарственного растительного сырья, которая широко используется в медицинской практике. Плоды поступают в аптеку в фасованном виде для безрецептурного отпуска и приготовления водных извлечений, входят в состав сборов, являются сырьем для получения настоек и экстрактов, применяются в гомеопатии.

Наиболее богатый состав биологически активных веществ (БАВ) имеют свежие плоды. Свежее лекарственное растительное сырье (ЛРС) содержит комплекс действующих веществ в нативном состоянии. Однако в связи с высоким содержанием влаги свежесобранные сочные плоды подвергаются быстрому воздействию ферментов и микроорганизмов, что существенно ограничивает их использование.

Традиционно лекарственное растительное сырье подвергают высушиванию. Этот метод основан на уменьшении содержания влаги в сырье, что приводит к ограничению роста микроорганизмов. Перспективным способом консервации является замораживание, обеспечивающее полное или частичное превращение клеточного сока в лед. Из-за отсутствия жидкой фазы прекращается деятельность ферментов, вследствие чего приостанавливаются биохимические процессы. Оба способа консервации имеют свои достоинства и недостатки, поскольку в ходе этих процессов содержание БАВ в сырье изменяется.

Актуальным является изучение вариативности химического состава БАВ плодов лекарственных растений в зависимости от метода консервации с целью выявления наиболее эффективного способа сохранения качества лекарственного растительного сырья. Также важным аспектом является расширение сырьевой базы за счет введения новых сырьевых источников (свежее, замороженное ЛРС) наряду с традиционными высушенными, что позволит увеличить объемы выпуска отечественных лекарственных растительных средств.

Степень изученности темы исследования. Замораживание широко применяется для консервации пищевого растительного сырья, но почти не используется в фармацевтической практике. Данное обстоятельство обусловлено отсутствием в настоящее время сведений по химическому составу БАВ большинства видов замороженного ЛРС, а также сравнительных исследований по содержанию БАВ в свежем, замороженном и высушенном сырье. Известны отдельные работы по изучению состава БАВ замороженных плодов барбариса, плодов лимонника, цветков календулы. Также недостаточно изучена возможность использования свежего и замороженного ЛРС для

изготовления водных и спиртовых экстракционных препаратов, применяемых в аллопатии и гомеопатии.

Целью исследования является сравнительное изучение состава биологически активных веществ свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины, а также стандартизация лекарственных препаратов на их основе.

Постановка задач и выбор средств для их решения:

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести информационно-аналитическое исследование по вопросам анализа, стандартизации и использования свежего, замороженного и высушенного лекарственного растительного сырья;
- провести сравнительное изучение химического состава БАВ свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины;
- изучить стабильность БАВ в свежем, замороженном и высушенном сырье при хранении;
- провести сравнительный анализ показателей качества водных и спиртовых экстракционных препаратов, полученных из плодов боярышника, шиповника, рябины и малины различных способов консервации;
- оценить возможность использования замороженного и высушенного лекарственного растительного сырья для изготовления гомеопатических препаратов на примере настойки матричной гомеопатической плодов боярышника;
- на основании полученных экспериментальных данных разработать проекты инструкций по заготовке и хранению свежих и замороженных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины.

Решение задач осуществлялось путем обобщения данных литературы и проведения экспериментальных исследований.

Научная новизна. Доказана идентичность качественного состава свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины. Выявлены закономерности изменения количественного содержания органических кислот, флавоноидов, дубильных веществ и полисахаридов в зависимости от способа консервации исследуемых видов лекарственного растительного сырья. Установлено, что замораживание не влияет на содержание свободных органических кислот в лекарственном растительном сырье, количество аскорбиновой кислоты снижается на 7 – 17%, флавоноидов - на 6 – 15%, дубильных веществ – на 10 – 20%, полисахаридов – на 17 – 29%. Сушка плодов боярышника, шиповника, рябины и малины при температуре 60 – 80 С° приводит к значительным потерям органических кислот, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ и антоцианов.

Изучена стабильность БАВ в свежих плодах боярышника, рябины, малины и шиповника в процессе хранения при температуре 0 - +1°С и +16 - +18°С. Также проведено исследование стабильности БАВ в замороженных и

высушенных плодах при хранении в течение 12 месяцев. Рекомендованы сроки годности для свежего и замороженного сырья.

Показана возможность получения водных и спиртовых извлечений из свежих и замороженных плодов, дана сравнительная характеристика содержания в них основных групп БАВ (флавоноиды, органические кислоты, дубильные вещества, полисахариды).

Показана возможность использования замороженных плодов боярышника наряду со свежим сырьем при изготовлении гомеопатических препаратов.

Теоретическая значимость работы. Использование современных физико-химических методов анализа позволило получить новые данные о качественном составе БАВ свежих и замороженных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины и дать количественную оценку их содержания. Экспериментально-практический материал, представленный в работе, может служить теоретической основой для разработки показателей качества указанных видов сырья и установления их норм, разработки инструкций по заготовке и хранению плодов, а также для получения и стандартизации лекарственных средств на их основе.

Практическая значимость результатов исследования. На основании проведенных исследований:

- разработаны проекты инструкций по заготовке и хранению свежих и замороженных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины;
- установлены сроки хранения свежих и замороженных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины;
- в работу испытательной лаборатории ЗАО Фирма «Здоровье» внедрены методики качественного определения органических кислот, флавоноидов и фенолкарбоновых кислот при анализе подлинности плодов рябины, шиповника и настойки матричной гомеопатической *Crataegus*;
- результаты исследований внедрены в учебный процесс кафедры фармакогнозии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды российских (Самылиной И. А., Киселевой Т. А., Исаевой Н. В., Степанова А. С., Терешинной Н. С., Чахировой А. А., Лякиной М. Н. и др.) и зарубежных ученых (Del Caro A., De Ancos B., Hakkinen, Kyureghian G.), касающиеся вопросов стандартизации плодов боярышника, рябины, шиповника и малины, а также возможности применения свежего и замороженного ЛРС в медицине и гомеопатии. Методология исследования построена на анализе и обобщении литературных данных, оценке степени разработанности и актуальности темы, постановки цели и задач исследования по изучению состава БАВ свежих, замороженных и высушенных плодов, сравнительном анализе качественного состава БАВ и их количественного содержания в свежем, замороженном и высушенном ЛРС, получении и анализе водных и водно-спиртовых извлечений из плодов различных способов консервации, формулировании выводов. В ходе исследования были

использованы следующие методы анализа: тонкослойная хроматография, УФ-спектрофотометрия, титриметрия, кулонометрия, гравиметрия, математические методы анализа и обработки результатов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 4 статьи – в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК.

Степень достоверности результатов. Экспериментальные исследования проводились на современном сертифицированном оборудовании в достаточном числе повторностей. Использованные автором аналитические методики информативны и современны. Достоверность первичных материалов подтверждена экспертной оценкой. Научные положения и выводы диссертации логично вытекают из содержания диссертационной работы, базируются на достаточных результатах исследований, обоснованы и логичны. Работа выполнена на современном методическом уровне.

Апробация диссертации. Основные положения диссертации доложены на Итоговой Всероссийской научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день» (Москва, 2011 г.), научно-методической конференции «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2011 г.), XIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012 г.), научной конференции НИИ Фармации «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2013-2014 г.г.), XXIV Московской международной гомеопатической конференции «Развитие гомеопатического метода в современной медицине» (Москва, 2014 г.), научно-методической конференции «II Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2014 г.).

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведен мониторинг основных параметров, аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. 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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 3 паспорта специальности фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Первого МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (№ государственной регистрации 01.2.006 06352.) по научной проблеме «Разработка современных технологий подготовки

специалистов с высшим медицинским и фармацевтическим образованием на основе достижений медико-биологических исследований».

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты сравнительного изучения химического состава биологически активных веществ (органических кислот, флавоноидов, дубильных веществ, полисахаридов) свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины;
- результаты исследования стабильности БАВ свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, шиповника, рябины и малины;
- результаты изучения показателей качества и химического состава БАВ лекарственных препаратов из свежих и замороженных плодов боярышника (отвар, настойка, жидкий экстракт, настойка матричная гомеопатическая), рябины (отвар), шиповника (отвар) и малины (настой).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 29 таблиц и 8 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, 4 экспериментальных глав, выводов, списка литературы из 149 наименований, из которых 29 на иностранных языках и 3 интернет ресурса, приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили образцы свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall), боярышника сглаженного (*Crataegus laevigata* (Poir.) DC), рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.), малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.) и шиповника коричневого (*Rosa cinnamomea* L.), собранные в 2010 – 2013 г.г. Заготовку образцов сырья боярышника проводили в Щелковском районе Московской области, рябины и малины – в Домодедовском районе Московской области, шиповника коричневого – в Ботаническом саду ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова».

Замораживание образцов сырья проводили согласно ГОСТ Р 53956-2010 «Фрукты быстрозамороженные». Плоды упаковывали в полиэтиленовые пакеты и хранили в морозильной камере при температуре -18 °С. Сушку исследуемых образцов проводили в сушильном шкафу при температуре 60 – 80°С.

Изготовление водных извлечений из высушенных образцов сырья проводили согласно общей фармакопейной статье ГФ XI изд., в.2 «Настои и отвары». Водные извлечения из свежих и замороженных плодов получали из измельченного сырья в соотношении сырье: экстрагент 1: 10, расчет навески сырья и объема экстрагента проводили с учетом влажности исходного сырья.

Спиртовые настойки из свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника получали методом дробной мацерации в соотношении сырье –

экстрагент 1:5. В качестве экстрагента при изготовлении настоек из свежего и замороженного сырья использовали 85% (об.) спирт, при изготовлении настоек из высушенных плодов – 70% (об.) спирт.

Жидкие экстракты из свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника изготавливали методом реперколяции в соотношении сырье – экстрагент 1:1. Концентрацию спирта подбирали так же, как и в настойках.

Настойки матричные гомеопатические из свежих и замороженных плодов боярышника сглаженного изготавливали по методу 2 ОФС 42-0027-05 «Настойки гомеопатические матричные». Настойку из высушенных плодов получали по методу 4 ОФС 42-0027-05 «Настойки гомеопатические матричные», в качестве экстрагента использовали 70% (об.) спирт.

Изучение качественного состава органических кислот и фенольных соединений в образцах сырья, а также в матричных настойках из плодов боярышника проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок с силикагелем «Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ». Для приготовления хроматографических систем использовали растворители марки «Ч.» и «Х.Ч.».

В качестве стандартных образцов в работе были использованы коммерчески доступные индивидуальные вещества: гиперозид («Fluka»), рутина тригидрат («Fluka»), кверцетин («Sigma-Aldrich»), лютеолин («Sigma-Aldrich»), хлорогеновая кислота («Sigma-Aldrich»), кофейная кислота («Sigma-Aldrich»), салициловая кислота («Sigma-Aldrich»), галловая кислота («Acros»), яблочная кислота («Fuso Chemical Co., Ltd.»), лимонная кислота («Fluka»), сорбиновая кислота («Sigma-Aldrich»), аскорбиновая кислота («Fluka»), янтарная кислота («Merck»).

Для количественной оценки содержания аскорбиновой кислоты и свободных органических кислот использовали метод гальваностатической кулонометрии. Исследования проводили на кулонометре «Эксперт-006» («Эконикс-Эксперт», Россия) при силе тока 5 мА.

Определение содержания суммы флавоноидов в плодах и извлечениях боярышника, рябины, шиповника, а также суммы антоцианов в плодах и извлечениях малины проводили методом дифференциальной спектрофотометрии. УФ-спектры регистрировали с помощью спектрофотометра Cary Varian 4000 ("Agilent Technologies", Австралия).

Количественное содержание дубильных веществ определяли перманганатометрическим титрованием, руководствуясь общей фармакопейной статьей ГФ XI издания, вып.1, стр.286 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье».

Определение содержания полисахаридов проводилось в соответствии с методикой, приведенной в статье 20 ГФ XI издания, вып.2, стр.264 «Листья подорожника большого».

Результаты исследования подвергались статистической обработке согласно общей статье ГФ XI, в.1, стр.199, объем выборки составлял 7 образцов.

Изучение химического состава биологически активных веществ свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника, рябины, шиповника, малины.

В соответствии с поставленными задачами было проведено сравнительное изучение состава и содержания БАВ (органических кислот, флавоноидов, дубильных веществ, полисахаридов) в свежих, замороженных и высушенных плодах боярышника, рябины, шиповника и малины.

Для качественного анализа БАВ исследуемых плодов был использован метод тонкослойной хроматографии. При анализе органических кислот во всех объектах идентифицированы лимонная, яблочная и аскорбиновая кислоты. Также в плодах малины установлено присутствие янтарной кислоты, а в плодах рябины – сорбиновой кислоты.

При изучении компонентного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот было показано присутствие в исследуемых объектах рутина, кверцетина (плоды боярышника, шиповника, рябины), гиперозида (плоды боярышника), лютеолина (плоды шиповника), хлорогеновой (плоды боярышника и рябины), кофейной (плоды боярышника и малины), галловой (все объекты) и салициловой (плоды малины) кислот.

Отличий в количестве зон на хроматограммах свежих, замороженных и высушенных плодов не наблюдали. При этом интенсивность зон яблочной, лимонной, аскорбиновой и галловой кислот на хроматограммах извлечений из высушенных плодов была визуально слабее, чем в замороженном и свежем сырье, что может свидетельствовать о различном количественном содержании данных компонентов в указанных образцах сырья.

Следующим этапом исследования было сравнительное изучение количественного содержания БАВ в свежих, замороженных и высушенных плодах боярышника, рябины, малины и шиповника. Результаты количественного определения представлены в таблице 1.

В ходе проведенного сравнительного анализа установлено следующее: при замораживании содержание органических кислот в плодах боярышника, рябины и шиповника практически не изменялось по сравнению со свежим сырьем, в плодах малины данный показатель снижался на 19%. Количество аскорбиновой кислоты в замороженных плодах составляло 82,8 - 93% от исходного содержания в зависимости от вида сырья. Количество флавоноидов при замораживании снижалось на 6-15%, дубильных веществ – на 10-20%, полисахаридов – на 17-29%.

Сушка плодов боярышника, шиповника, рябины и малины приводила к значительным потерям органических кислот, аскорбиновой кислоты (в плодах малины до 92%) и дубильных веществ. Содержание антоцианов в высушенных плодах малины снижалось практически в 10 раз по сравнению со свежим сырьем.

Таблица 1

Содержание биологически активных веществ в исследуемых плодах

Вид сырья		Сумма органических кислот, %	Аскорбиновая кислота, %	Сумма флавоноидов, %	Дубильные вещества, %	Полисахариды, %
Плоды боярышника	Свежие плоды	$2,61 \pm 0,02$	$0,087 \pm 0,002$	$0,192 \pm 0,008$	$2,13 \pm 0,08$	$5,69 \pm 0,12$
	Заморож. плоды	$2,57 \pm 0,03$	$0,072 \pm 0,002$	$0,164 \pm 0,006$	$1,78 \pm 0,08$	$4,07 \pm 0,08$
	Высушенные плоды	$0,90 \pm 0,02$	$0,027 \pm 0,001$	$0,152 \pm 0,006$	$1,36 \pm 0,06$	$3,88 \pm 0,15$
Плоды рябины	Свежие плоды	$5,90 \pm 0,03$	$0,314 \pm 0,002$	$0,242 \pm 0,006$	$4,27 \pm 0,12$	$4,43 \pm 0,09$
	Заморож. плоды	$5,78 \pm 0,04$	$0,292 \pm 0,006$	$0,218 \pm 0,009$	$3,66 \pm 0,09$	$3,60 \pm 0,10$
	Высушенные плоды	$3,35 \pm 0,03$	$0,121 \pm 0,003$	$0,193 \pm 0,004$	$2,35 \pm 0,07$	$3,32 \pm 0,08$
Плоды Малины*	Свежие плоды	$7,40 \pm 0,04$	$0,178 \pm 0,005$	$0,903 \pm 0,011$	$5,06 \pm 0,14$	$6,33 \pm 0,13$
	Заморож. плоды	$6,00 \pm 0,04$	$0,165 \pm 0,003$	$0,717 \pm 0,008$	$4,03 \pm 0,09$	$5,28 \pm 0,09$
	Высушенные плоды	$5,38 \pm 0,08$	$0,015 \pm 0,001$	$0,094 \pm 0,004$	$2,41 \pm 0,11$	$5,35 \pm 0,14$
Плоды шиповника	Свежие плоды	$4,62 \pm 0,04$	$1,310 \pm 0,012$	$0,207 \pm 0,004$	$7,12 \pm 0,13$	$9,32 \pm 0,15$
	Заморож. плоды	$4,77 \pm 0,06$	$1,162 \pm 0,008$	$0,195 \pm 0,005$	$6,41 \pm 0,07$	$7,71 \pm 0,16$
	Высушенные плоды	$2,15 \pm 0,03$	$0,319 \pm 0,006$	$0,182 \pm 0,007$	$3,24 \pm 0,08$	$7,52 \pm 0,18$

*Для плодов малины в столбце «сумма флавоноидов» указано содержание суммы антоцианов

Нами было проведено изучение стабильности БАВ в свежих плодах боярышника, рябины, малины и шиповника в процессе хранения при температуре $+16 - +18^{\circ}\text{C}$ и в холодильной камере ($t = 0 - +1^{\circ}\text{C}$). Результаты исследования представлены в таблицах 2 и 3.

Показано, что хранение плодов как при температуре +16 - +18°C, так и в холодильной камере, сопровождалось снижением содержания аскорбиновой кислоты, органических кислот и дубильных веществ во всех исследуемых объектах. При этом скорость деградации БАВ различалась в зависимости от вида сырья. Так, в плодах малины существенные изменения химического состава БАВ наблюдались уже через 1 сутки хранения при температуре +16 - +18°C и через 2 суток хранения в холодильной камере. В то же время в плодах рябины количественное содержание органических кислот, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ, флавоноидов и полисахаридов практически не изменялось в течение 3 суток хранения при температуре +16 - +18°C и 20 суток – в условиях холодильной камеры.

Таблица 2

Стабильность БАВ в свежих плодах при хранении (t = +16 - +18°C)

Вид сырья	Срок хранения	Влажность, %	Сумма органических кислот, %	Аскорбиновая кислота, %	Сумма флавоноидов, %	Дубильные вещества, %	Полисахариды, %
Плоды боярышника	6 ч	71,81	2,61	0,087	0,192	2,13	5,69
	12 ч	70,53	2,58	0,078	0,190	2,10	5,60
	24 ч	69,84	2,57	0,067	0,189	2,06	5,56
	48 ч	67,44	2,40	0,034	0,186	2,00	5,54
	72 ч	66,38	2,36	0,008	0,182	1,93	5,48
	96 ч	—	—	—	—	—	—
Плоды рябины	6 ч	73,04	5,90	0,314	0,242	4,27	4,43
	12 ч	72,81	5,90	0,306	0,242	4,25	4,42
	24 ч	72,01	5,87	0,292	0,240	4,25	4,40
	48 ч	70,27	5,85	0,280	0,240	4,20	4,40
	72 ч	69,55	5,72	0,271	0,240	4,12	4,38
	96 ч	68,35	5,60	0,243	0,238	4,03	4,37
Плоды малины	6 ч	79,12	7,40	0,178	0,903	5,06	6,33
	12 ч	78,07	7,28	0,157	0,876	5,01	6,24
	24 ч	76,69	7,02	0,105	0,849	4,95	6,18
	48 ч	—	—	—	—	—	—
	72 ч	—	—	—	—	—	—
	96 ч	—	—	—	—	—	—
Плоды шиповника	6 ч	69,21	4,62	1,310	0,207	7,12	9,32
	12 ч	69,03	4,59	1,268	0,205	7,08	9,30
	24 ч	68,26	4,58	1,211	0,205	7,03	9,28
	48 ч	67,37	4,47	0,958	0,202	6,83	9,25
	72 ч	67,15	4,40	0,915	0,200	6,77	9,20
	96 ч	66,93	4,36	0,807	0,200	6,71	9,18

Таблица 3

**Стабильность БАВ в свежих плодах при хранении в холодильной камере
(t = 0 - +1°C)**

Вид сырья	Срок хранения	Влажность, %	Сумма органических кислот, %	Аскорбиновая кислота, %	Сумма флавоноидов, %	Дубильные вещества, %	Полисахариды, %
Плоды боярышника	0 сут	71,81	2,61	0,087	0,192	2,13	5,69
	1 сут	72,27	2,61	0,081	0,191	2,11	5,70
	2 сут	71,82	2,58	0,074	0,190	2,07	5,68
	3 сут	71,54	2,53	0,070	0,190	2,05	5,68
	4 сут	71,12	2,48	0,042	0,188	2,03	5,66
	5 сут	70,83	2,42	0,025	0,183	1,97	5,60
Плоды рябины	0 сут	73,04	5,90	0,314	0,242	4,27	4,43
	1 сут	73,62	5,91	0,311	0,242	4,26	4,43
	2 сут	73,25	5,90	0,306	0,242	4,25	4,43
	3 сут	73,09	5,89	0,300	0,242	4,25	4,42
	4 сут	72,85	5,89	0,295	0,241	4,23	4,41
	5 сут	72,34	5,87	0,292	0,241	4,23	4,41
	10 сут	70,23	5,84	0,286	0,240	4,19	4,40
	15 сут	69,11	5,80	0,281	0,240	4,16	4,40
	20 сут	68,07	5,75	0,273	0,238	4,10	4,38
	25 сут	66,84	5,62	0,260	0,236	4,02	4,35
	30 сут	64,32	5,54	0,252	0,236	4,00	4,33
Плоды малины	0 сут	79,12	7,40	0,178	0,903	5,06	6,33
	1 сут	80,45	7,35	0,164	0,892	5,03	6,30
	2 сут	80,05	7,30	0,151	0,887	5,00	6,28
	3 сут	79,68	7,19	0,132	0,880	4,92	6,22
	4 сут	79,14	7,05	0,117	0,872	4,87	6,18
	5 сут	77,82	6,93	0,103	0,864	4,82	6,13
Плоды шиповника	0 сут	69,21	4,62	1,310	0,207	7,12	9,32
	1 сут	68,57	4,60	1,282	0,206	7,10	9,32
	2 сут	68,42	4,57	1,264	0,206	7,06	9,30
	3 сут	68,36	4,52	1,228	0,203	7,04	9,30
	4 сут	68,12	4,43	1,105	0,200	6,97	9,26
	5 сут	68,04	4,33	0,973	0,200	6,91	9,23

Установлено, что хранение свежих плодов в холодильной камере обеспечивает удовлетворительное качество сырья в течение более продолжительного срока, чем в условиях неотапливаемого помещения.

На основании проведенных исследований рекомендованы сроки хранения свежих плодов при температуре +16 - +18°C и в холодильной камере (0 - +1°C): для плодов боярышника - 2 и 4 суток, для плодов рябины – 3 и 20 суток, для плодов шиповника – 24 ч и 4 суток, для плодов малины – 12 ч и 2 суток (соответственно).

Также была изучена стабильность БАВ в замороженных и высушенных плодах боярышника, рябины, малины и шиповника при хранении в течение 1 года. Контроль проводили через 1, 3, 6, 9 и 12 мес. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

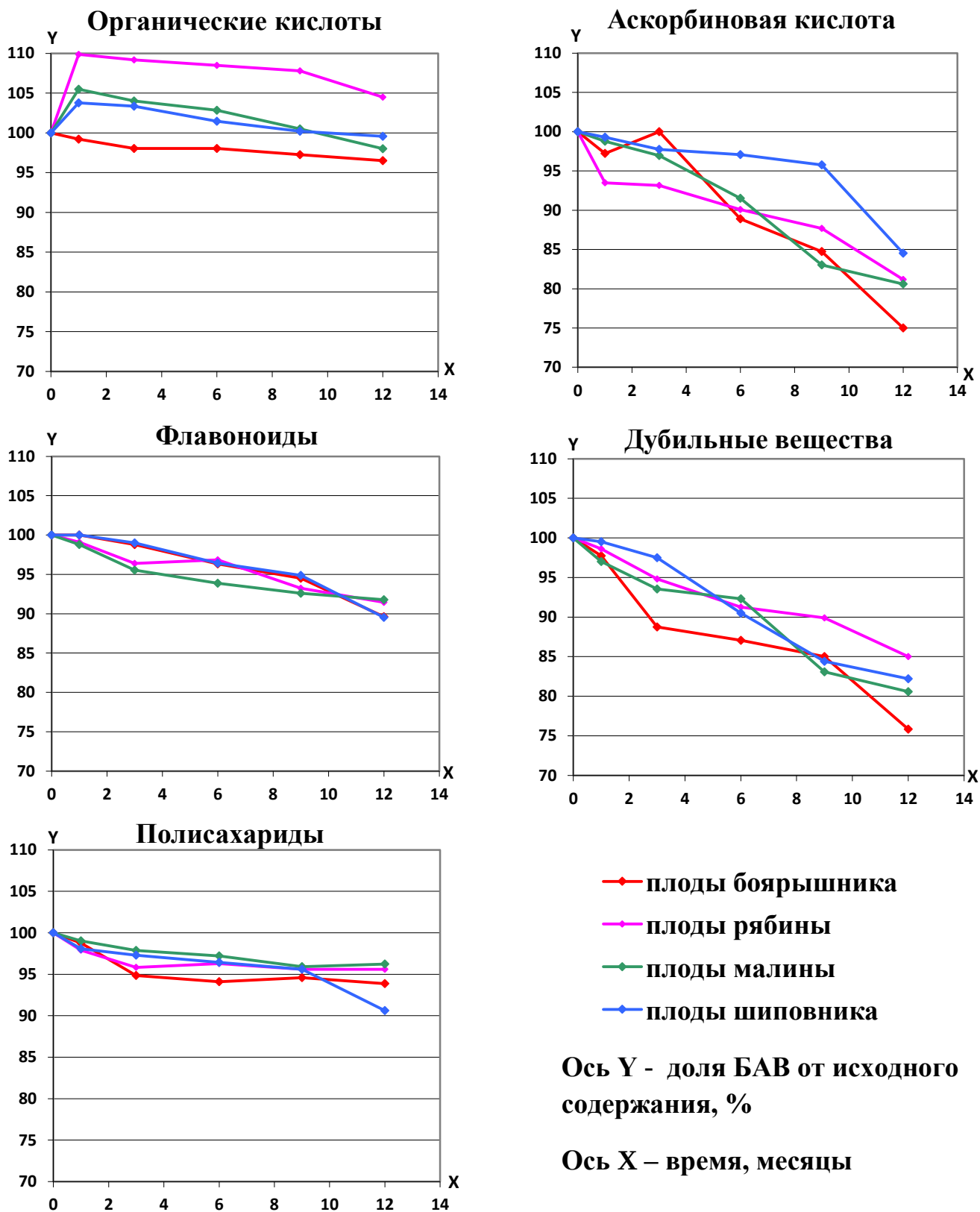


Рис. 1. Стабильность биологически активных веществ в замороженных плодах при хранении.

Показано, что при хранении исследуемых образцов в замороженном виде содержание флавоноидов и полисахаридов через 12 месяцев практически не изменялось, а содержание органических кислот даже незначительно возрастало. Количество аскорбиновой кислоты и дубильных веществ при хранении существенно снижалось, в среднем потери составляли 15 - 25 %.

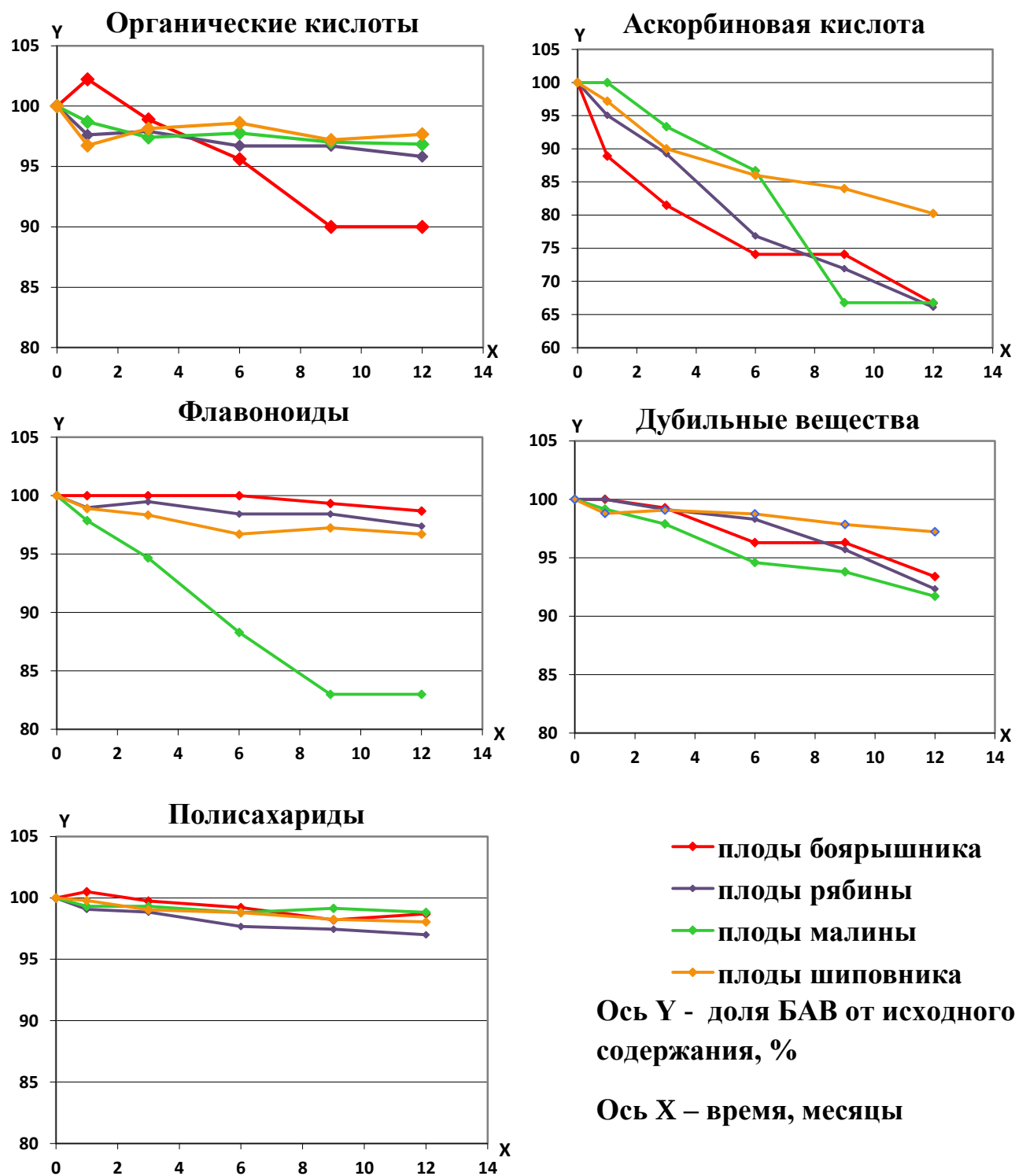


Рис. 2. Стабильность биологически активных веществ в высушенных плодах при хранении.

На основании экспериментальных данных рекомендованы сроки годности для замороженных плодов боярышника, рябины и шиповника – 9 месяцев, для плодов малины – 6 месяцев.

При хранении высушенного сырья существенные потери наблюдались в отношении аскорбиновой кислоты, ее содержание к 12 месяцу хранения снижалось в плодах боярышника, рябины и малины до 67%, в плодах шиповника – до 80% от исходного. Также к концу хранения в высушенных плодах малины было снижено количество антоцианов на 17%.

Содержание суммы флавоноидов в высушенных плодах боярышника, органических кислот в высушенных плодах рябины и аскорбиновой кислоты в высушенных плодах шиповника к 12 месяцу хранения удовлетворяло требованиям ГФ XI издания на данные виды ЛРС.

Сравнительный анализ экстракционных препаратов из свежего, замороженного и высушенного сырья.

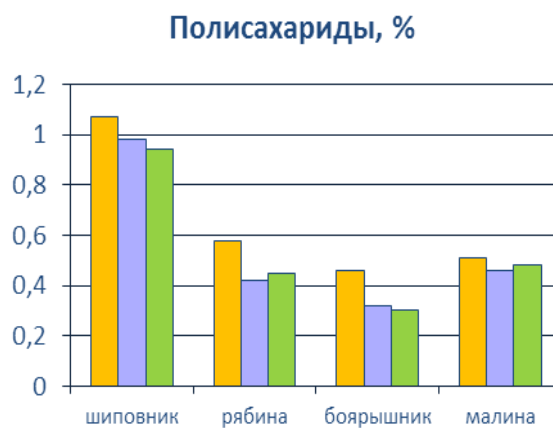
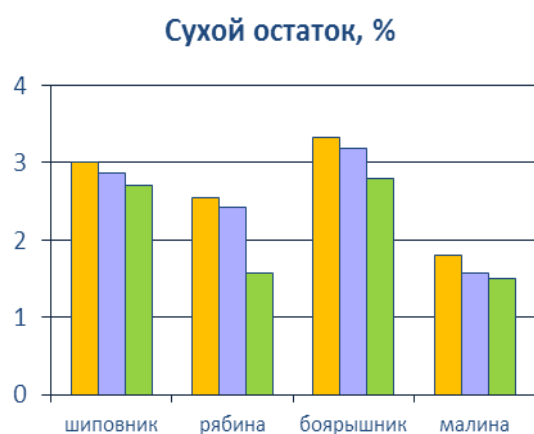
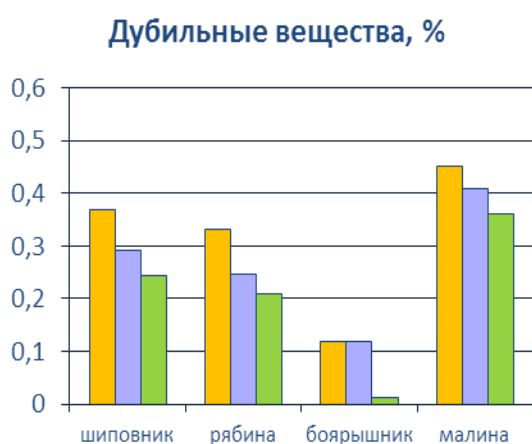
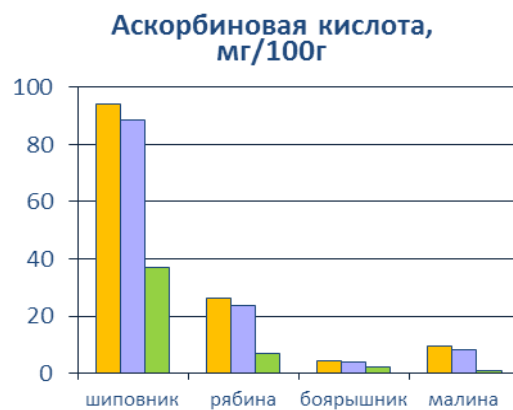
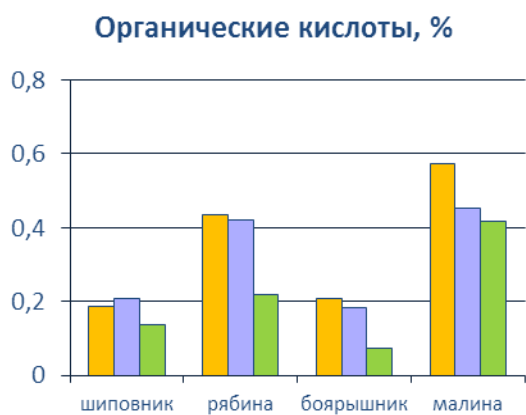
Нами были подобраны оптимальные условия изготовления водных извлечений из свежих и замороженных плодов: предварительное измельчение сырья до кашицеобразного состояния, соотношение сырье : экстрагент 1 : 10, получение из плодов боярышника, шиповника и рябины отваров, из плодов малины – настоев. В случае использования замороженного сырья необходимо предварительное размораживание сырья при комнатной температуре в течение 2 – 3 часов. При расчете навески сырья и объема экстрагента обязателен учет влажности исходных плодов.

Для сравнительного анализа были получены водные извлечения из высушенных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины согласно фармакопейной методике. Для изготовления отваров и настоев из свежего и замороженного сырья руководствовались вышеуказанными рекомендациями.

В полученных извлечениях определяли цвет, прозрачность, запах, pH. Анализируемые отвары и настои представляли собой окрашенные прозрачные или слабо опалесцирующие жидкости со специфическим запахом и кислой реакцией среды.

Принимая во внимание принцип системного анализа в изучении ЛРС, водные извлечения анализировали по содержанию тех же групп БАВ, что и исходное сырье (рис.3).

Установлено, что все изучаемые группы БАВ переходят в водные извлечения. Проведенные исследования показали, что по содержанию флавоноидов и полисахаридов водные извлечения из свежего сырья и плодов, подвергнутых консервации, различались незначительно. При этом отвары и настои, полученные из свежего и замороженного сырья, характеризовались большими количествами органических кислот, аскорбиновой кислоты и дубильных веществ, чем извлечения из высушенных плодов.



- свежие плоды
 - замороженные плоды
 - высушенные плоды

Рис.3.Содержание БАВ в водных извлечениях из свежих, замороженных и высушенных плодов

Сравнительное изучение водно-спиртовых извлечений, полученных с использованием свежего, замороженного и высушенного сырья, проводили на примере настойки и жидкого экстракта из плодов боярышника. Стандартизацию полученных извлечений проводили по следующим показателям: цвет, рН, сухой остаток, содержание действующих веществ. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Извлечения из свежих и замороженных плодов боярышника характеризовались большим содержанием органических кислот, аскорбиновой кислоты и дубильных веществ, чем экстракционные препараты из высушенного сырья. Указанная тенденция прослеживалась как в настойках, так и в экстрактах.

Таблица 4

Показатели качества водно-спиртовых извлечений из свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника.

Показатели качества	Настойки			Экстракты		
	Свежее сырье	Заморож. сырье	Высуш. сырье	Свежее сырье	Заморож. сырье	Высуш. сырье
Цвет	Красно-оранжевый	Красно-оранжевый	Темно-красный	Темно-красный	Красно-оранжевый	Темно-красный
рН	5,23	5,32	5,27	4,44	4,71	5,03
Сухой остаток, %	5,67±0,12	5,51±0,10	5,78±0,14	25,43±0,24	25,17±0,14	21,57±0,23
Сумма органических кислот, %	0,53±0,03	0,42±0,02	0,29±0,02	1,53±0,02	1,42±0,01	0,63±0,02
Аскорбиновая кислота, мг/100г	15,13±0,03	18,02±0,01	6,47±0,01	42,31±0,03	47,29±0,05	12,72±0,04
Сумма флавоноидов, мг/100г	11,74±0,07	10,14±0,03	8,03±0,06	62,02±0,02	57,12±0,04	49,31±0,02
Дубильные вещества, %	0,35±0,02	0,31±0,03	0,22±0,02	1,07±0,04	0,93±0,05	0,55±0,02
Полисахариды, %	0,22±0,07	0,25±0,05	0,39±0,10	0,58±0,12	0,44±0,10	0,84±0,11

По количественному содержанию флавоноидов настойки отличались незначительно, тогда как в экстрактах из высушенных плодов данный показатель был ниже, чем в экстрактах из свежего и замороженного сырья. В то же время полисахаридная фракция в настойках и экстрактах из высушенных

плодов боярышника была значительно выше, чем в извлечениях из свежих и замороженных плодов.

С целью изучения возможности использования лекарственного растительного сырья, подвергнутого консервации, для изготовления гомеопатических препаратов, нами были получены и исследованы настойки матричные гомеопатические из свежих, замороженных и высушенных плодов боярышника сглаженного. В исследуемых объектах определяли рН, плотность, сухой остаток по методикам ГФ XI изд. Установлено, что указанные показатели в настойках из свежих и замороженных плодов боярышника практически не различались. Матричная настойка из высушенного сырья характеризовалась более высокой реакцией среды (4,32), а также сниженным в 1,5 раза значением сухого остатка, по сравнению с матричной настойкой из свежего сырья.

С использованием ТСХ-анализа во всех исследуемых настойках идентифицированы гиперозид, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, галловая кислота, яблочная кислота и лимонная кислота. Зоны адсорбции гиперозида, хлорогеновой и яблочной кислот на хроматограммах настоек из высушенных плодов боярышника были менее интенсивными, чем на хроматограммах матричных настоек из свежего и замороженного сырья.

В ходе количественной оценки содержания БАВ в исследуемых настойках установлено, что матричные настойки из замороженных плодов боярышника по содержанию органических кислот, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ, флавоноидов и полисахаридов практически не отличались от настоек из свежего сырья (табл.5). Это свидетельствует о возможности использования замороженных плодов боярышника в качестве альтернативы свежему сырью при изготовлении настойки матричной гомеопатической. При этом матричная настойка из высушенных плодов по содержанию всех изучаемых групп БАВ значительно уступала настойке из свежего сырья.

Таблица 5

Количественное содержание БАВ в настойках матричных гомеопатических.

Объекты исследования	Органические кислоты, %	Аскорбиновая кислота, мг/100г	Флавоноиды, мг/100г	Дубильные вещества, %	Полисахариды, %
Настойка матричная из свежих плодов	0,45±0,01	23,17±0,05	15,40±0,04	0,48±0,03	0,43±0,05
Настойка матричная из замороженных плодов	0,40±0,03	21,09±0,02	13,74±0,02	0,46±0,02	0,46±0,03
Настойка матричная из высушенных плодов	0,12±0,01	4,21±0,03	7,23±0,02	0,14±0,02	0,23±0,05

ВЫВОДЫ

1. В ходе информационно-аналитического исследования установлено, что наряду с сушкой перспективным методом консервации свежего ЛРС является замораживание. Выбор способа консервации для каждого конкретного вида сырья требует индивидуального подхода, и должен быть основан на экспериментальных исследованиях.

2. Методом ТСХ установлено наличие в свежих, замороженных и высушенных плодах боярышника, шиповника, рябины и малины органических кислот, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот. Во всех исследуемых объектах обнаружены яблочная, лимонная, аскорбиновая кислоты. Также в плодах рябины идентифицирована сорбиновая кислота, а в плодах малины – янтарная кислота. Из флавоноидов в исследуемых объектах обнаружены рутин, кверцетин (плоды боярышника, рябины, шиповника), гиперозид (плоды боярышника), лютеолин (плоды шиповника). Среди фенолкарбоновых кислот во всех объектах идентифицирована галловая кислота, а также в плодах боярышника - хлорогеновая и кофейная кислоты, в плодах рябины – хлорогеновая кислота, в плодах малины – салициловая и кофейная кислоты. Показано, что способ консервации не изменяет компонентный состав БАВ исследуемых объектов.

3. Проведено определение содержания БАВ в плодах боярышника. Установлено, что в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья содержание свободных органических кислот составляет $2,61 \pm 0,02\%$; $2,57 \pm 0,03\%$; $0,90 \pm 0,02\%$; аскорбиновой кислоты - $0,087 \pm 0,002\%$; $0,072 \pm 0,002\%$; $0,027 \pm 0,001\%$; флавоноидов - $0,192 \pm 0,008\%$; $0,164 \pm 0,006\%$; $0,152 \pm 0,006\%$; дубильных веществ - $2,13 \pm 0,08\%$; $1,78 \pm 0,08\%$; $1,36 \pm 0,06\%$; полисахаридов - $5,69 \pm 0,12\%$; $4,07 \pm 0,08\%$; $3,88 \pm 0,15\%$ (соответственно). Замораживание не влияет на содержание в плодах боярышника свободных органических кислот, но сопровождается снижением количества аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ – на 15-17%, а полисахаридов – на 28%. Сушка плодов боярышника приводит к уменьшению содержания аскорбиновой кислоты и органических кислот в среднем на 70% по сравнению со свежим сырьем.

4. Проведено определение содержания БАВ в плодах рябины. Установлено, что в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья содержание свободных органических кислот составляет $5,90 \pm 0,03\%$; $5,78 \pm 0,04\%$; $3,35 \pm 0,03\%$; аскорбиновой кислоты - $0,314 \pm 0,002\%$; $0,292 \pm 0,006\%$; $0,121 \pm 0,003\%$; флавоноидов - $0,242 \pm 0,006\%$; $0,218 \pm 0,009\%$; $0,193 \pm 0,004\%$; дубильных веществ - $4,27 \pm 0,12\%$; $3,66 \pm 0,09\%$; $2,35 \pm 0,07\%$; полисахаридов - $4,43 \pm 0,09\%$; $3,60 \pm 0,10\%$; $3,32 \pm 0,08\%$ (соответственно). При замораживании плодов рябины наблюдается снижение содержания аскорбиновой кислоты и флавоноидов на 7 – 10%, дубильных веществ - на 14%, полисахаридов - на 19%. Высушивание плодов приводит к значительным потерям органических кислот, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты (до 45 – 60%).

Содержание флавоноидов и полисахаридов при сушке плодов рябины снижается на 20 – 25%.

5. Проведено определение содержания БАВ в плодах шиповника. Установлено, что в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья содержание свободных органических кислот составляет $4,62 \pm 0,04\%$; $4,77 \pm 0,06\%$; $2,15 \pm 0,03\%$; аскорбиновой кислоты - $1,310 \pm 0,012\%$; $1,162 \pm 0,008\%$; $0,319 \pm 0,006\%$; флавоноидов - $0,207 \pm 0,004\%$; $0,195 \pm 0,005\%$; $0,182 \pm 0,007\%$; дубильных веществ - $7,12 \pm 0,13\%$; $6,41 \pm 0,07\%$; $3,24 \pm 0,08\%$; полисахаридов - $9,32 \pm 0,15\%$; $7,71 \pm 0,16\%$; $7,52 \pm 0,18\%$ (соответственно). В ходе замораживания плодов шиповника наблюдается снижение содержания аскорбиновой кислоты и дубильных веществ на 10%, полисахаридов – на 17%. Содержание органических кислот и флавоноидов при замораживании изменяется незначительно. При сушке плодов шиповника наблюдаются существенные потери аскорбиновой кислоты (до 75%), органических кислот (до 54%) и дубильных веществ (до 55%).

6. Проведено определение содержания БАВ в плодах малины. Установлено, что в свежих, замороженных и высушенных образцах сырья содержание свободных органических кислот составляет $7,40 \pm 0,04\%$; $6,00 \pm 0,04\%$; $5,38 \pm 0,08\%$; аскорбиновой кислоты - $0,178 \pm 0,005\%$; $0,165 \pm 0,003\%$; $0,015 \pm 0,001\%$; антоцианов - $0,903 \pm 0,011\%$; $0,717 \pm 0,008\%$; $0,094 \pm 0,004\%$; дубильных веществ - $5,06 \pm 0,14\%$; $4,03 \pm 0,09\%$; $2,41 \pm 0,11\%$; полисахаридов - $6,33 \pm 0,13\%$; $5,28 \pm 0,09\%$; $5,35 \pm 0,14\%$ (соответственно). Замораживание плодов малины приводит к уменьшению содержания органических кислот, антоцианов, дубильных веществ и полисахаридов в среднем на 16 – 20% и аскорбиновой кислоты – на 7%. При сушке количество аскорбиновой кислоты и антоцианов в плодах малины снижается почти на 90%, дубильных веществ - на 52%.

7. Проведено изучение стабильности БАВ в свежем, замороженном и высушенном сырье. Рекомендованы сроки хранения свежих плодов при температуре $+16 - +18^{\circ}\text{C}$ и в холодильной камере ($0 - +1^{\circ}\text{C}$): для плодов боярышника - 2 и 4 суток, для плодов рябины – 3 и 20 суток, для плодов шиповника – 24 ч и 4 суток, для плодов малины – 12 ч и 2 суток (соответственно). Также рекомендованы сроки хранения для замороженных плодов боярышника, рябины и шиповника – 9 месяцев, для плодов малины – 6 месяцев.

8. Показана возможность получения водных извлечений из свежих и замороженных плодов боярышника, шиповника, рябины и малины. При сравнительном анализе установлено, что по органолептическим характеристикам и содержанию основных групп БАВ (флавоноидов, органических кислот, дубильных веществ, полисахаридов) водные извлечения из свежего и замороженного сырья не уступают извлечениям из высушенных плодов.

9. Изучено влияние способа консервации исходного сырья на качество водно-спиртовых экстракционных препаратов из плодов боярышника.

Показано, что настойки и экстракты из свежих и замороженных плодов по содержанию изучаемых групп БАВ отличаются незначительно. Водно-спиртовые извлечения из высушенных плодов характеризуются сниженным содержанием свободных органических кислот, аскорбиновой кислоты и дубильных веществ. По содержанию полисахаридов настойки и экстракты из высушенного сырья в 1,5 раза превосходят извлечения из свежих и замороженных плодов.

10. Показана возможность использования замороженного сырья для изготовления настоек матричных гомеопатических из плодов боярышника. Установлена идентичность качественного и количественного состава матричных настоек из свежих и замороженных плодов боярышника по изучаемым группам БАВ.

11. На основании полученных экспериментальных данных разработаны проекты инструкций по заготовке и хранению свежих и замороженных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Сергунова, Е. В. Изучение плодов боярышника различными способами консервации и водных извлечений / Е. В. Сергунова, А. А. Сорокина, А. С. Аврач // **Фармация**. – 2010. - № 5. – С. 16-18.
2. Аврач, А. С. Анализ плодов боярышника, подвергнутых консервированию различными способами, и их водных экстрактов / А. С. Аврач // Приложение к журналу «Сеченовский вестник»: тезисы итоговой всероссийской научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день». – М., 2011. – С.27.
3. Сергунова, Е. В. Стабильность дубильных веществ и способ консервации сырья / Е. В. Сергунова, А. А. Сорокина, А. С. Аврач // Сборник научных трудов научно-методической конференции «Гаммермановские чтения - 2011». – СПб., 2011. – С.8–9.
4. Аврач, А. С. Перспективы использования замороженного лекарственного растительного сырья в аллопатической медицине и гомеопатии / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // «Инновационные процессы в лекарствоведении»: сборник научных трудов. – Ярославль, 2012. – С.5 – 10.
5. Аврач, А. С. Хромато-масс-спектрометрическое определение флавоноидов в плодах боярышника / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // **Фармация**. – 2013. - №3. – С. 14-16.
6. Аврач, А. С. Изучение биологически активных веществ плодов боярышника – как сырья для приготовления настоек матричных гомеопатических / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // Сборник материалов XXIV Московской международной гомеопатической конференции «Развитие гомеопатического метода в современной медицине». – М., 2014. – С. 146 – 147.

7. Куксова, Я. В. Разработка показателей качества настоев плодов малины / Я. В. Куксова, **А. С. Аврач**, И. А. Самылина // Сборник научных трудов научно-методической конференции «II Гаммермановские чтения». – Спб., 2014. – С. 56 – 57.
8. **Аврач, А. С.** Изучение состава органических кислот плодов рябины обыкновенной различных способов консервации / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // Сборник научных трудов научно-методической конференции «II Гаммермановские чтения». – Спб., 2014. – С. 14 – 15.
9. **Аврач, А. С.** Изучение фенольных соединений плодов и настоев малины обыкновенной различных способов консервации / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // Сеченовский вестник. – 2014. - №1 (15). – С. 114 – 115.
10. **Аврач, А. С.** Биологически активные вещества плодов и водных извлечений малины обыкновенной / А. С. Аврач, Е. В. Сергунова, Я. В. Куксова // **Фармация**. – 2014. - №1. – С. 8 – 10.
11. **Аврач, А. С.** Тонкослойная хроматография в анализе плодов лекарственных растений семейства Розоцветные / А. С. Аврач, И. А. Самылина, Е. В. Сергунова // **Фармация**. – 2014. - №2. – С. 15 – 18.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЛРС – лекарственное растительное сырье

БАВ – биологически активные вещества

ГФ – государственная фармакопея

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолетовый