

На правах рукописи

Рудая Маргарита Александровна

**Сравнительное фармакогностическое изучение плодов облепихи
крушиновидной различных сортов**

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва –2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования Воронежский государственный университет Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент

Тринеева Ольга Валерьевна

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович, доктор фармацевтических наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБНУ ВИЛАР), отдел фитохимии и стандартизации, главный научный сотрудник

Саканян Елена Ивановна, доктор фармацевтических наук, профессор, Акционерное общество «Научно-производственное объединение по иммунобиологическим препаратам» «Микроген», директор по науке

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «15» сентября 2021 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая д.8, стр.2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.01

доктор фармацевтических наук, профессор  Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Растительное сырье является уникальным источником биологически активных веществ (БАВ), которые представляют особую ценность в терапии различных заболеваний. Облепиха крушиновидная (ОК) – одно из наиболее известных и широко распространенных лекарственных растений, повсеместно выращиваемых на территории РФ. Сведения о фитохимическом составе плодов достаточно полно освещены в научной литературе.

Однако, стандартизация плодов ОК до настоящего времени проводится в соответствии с устаревшей НД (ВФС 42-1741-87 на свежие плоды и ТУ 64-472-88 на высушенные плоды). В ГФ РФ XIV изд. отсутствует ФС на облепихи крушиновидной плоды, также как и в ведущих фармакопеех мира (Международная, Европейская Фармакопея, Фармакопея США), за исключением ГФ Респ. Беларусь.

В ГФ включают ФС преимущественно на виды, используемые для промышленного производства лекарственных растительных препаратов (ЛРП). Плоды облепихи - сырье для получения фармакопейного препарата - облепихового масла и большого количества препаратов на его основе. Следовательно, в данном случае не прослеживается принцип сквозной стандартизации от исходного ЛРС до ЛРП, что не соответствует современным подходам к оценке качества фитопрепаратов.

В России уже более полувека ведется активная селекционная работа по созданию сортов данного растения, большинство из которых выведено и изучено в НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко: «Новость Алтая», «Витаминная», «Золотой початок», «Дар Катуня», «Масличная», «Чуйская», «Оранжевая», «Обильная», «Золотистая», «Превосходная», «Великан», «Самородок», «Янтарная», «Обская». Сортная вариабельность фитохимического состава характерна для различных видов лекарственных растений, в т.ч. и для плодов ОК.

В настоящее время известно уже более ста сортов. Однако закономерности накопления метаболома в сортах, адаптированных для произрастания в условиях средней полосы Европейской части России, изучены мало.

Поэтому особенную актуальность приобретает комплексное фармакогностическое исследование плодов ОК различных сортов для выявления наиболее богатых из них по составу БАВ для разработки различных лекарственных форм (ЛФ) на их основе и дальнейшего составления современной унифицированной нормативной документации (НД) представляют одну из важных задач современной фармакогнозии и фитохимии.

Степень разработанности темы исследования

Россия - одна из первых и единственных стран мира, в которой более полувека ведется обширная селекционная работа на севере (НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко) и в

европейской части (Ботанический сад МГУ им. М.В. Ломоносова). Наибольшая изученность характерна для сортов, культивируемых в Сибири, так как именно Сибирь считается родиной данного растения (облепиха характерна для флоры Алтая). В настоящее время выведено уже более ста сортов облепихи, плоды растения активно используются в фармацевтической промышленности. В последние десятилетия облепиха привлекает к себе внимание все большего количества ученых по всему миру. Ее изучению посвящены труды известных ученых, таких как Е.И. Пантелеева, А.Я. Земцова, Н.А. Ховалыг, Г.А. Бережная (Россия), Томас Ли (Канада), Вирендра Сингх (Индия), Коки Канахама (Япония). Стандартизация плодов ОК проводится по содержанию суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин в соответствии с устаревшей НД.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является сравнительное фармакогностическое изучение плодов облепихи крушиновидной различной сортовой принадлежности для обоснования выбора наиболее ценных сортов по составу БАВ.

Задачи исследования

1. Провести товароведческий анализ плодов ОК различных сортов, а также исследовать сортовую вариабельность макро- и микродиагностических признаков плодов ОК;
2. Провести сравнительный анализ минерального состава плодов, с оценкой способности различных сортов аккумулировать токсические элементы;
3. Количественно оценить различные группы БАВ в плодах и выявить сортовые закономерности их накопления;
4. С применением современных физико-химических методов изучить профиль БАВ плодов ОК исследуемых сортов и выявить БАВ-маркеры сортовой принадлежности плодов;
5. Дать рекомендации по получению различных ЛФ на основе изучаемого сырья с учётом выявленного состава БАВ и сортовых особенностей;
6. На основе проведенных исследований разработать критерии для составления современной НД по стандартизации и оценке качества плодов ОК.

Научная новизна исследования

С применением различных современных методов микроскопических исследований установлены отличительные анатомо-диагностические признаки плодов ОК изучаемых сортов, впервые проведена оценка их вариабельности. Впервые проведено изучение диагностических признаков плодов ОК с применением люминесцентной и стереомикроскопии. Разработана новая методика пробоподготовки жирномасличного сырья к проведению микроскопических исследований.

На примере сортов, адаптированных для произрастания в условиях средней полосы Европейской части России, впервые выявлены сортовые закономерности накопления

различных групп БАВ (флавоноиды, каротиноиды, аминокислот (АК), антоцианов (АЦ), аскорбиновой кислоты (АсК), сахара, органические кислоты, антиоксидантная активность (АОА), экстрактивные вещества(ЭВ), жирное масло(ЖМ) и даны рекомендации по получению различных ЛФ на основе сортов изучаемого сырья. Установлено, что изученные сорта не являются концентраторами тяжелых металлов и других токсичных элементов.

Впервые получены индивидуальные ИК-спектры измельченных плодов десяти сортов ОК без специальной пробоподготовки и выявлены специфические полосы поглощения, характеризующие видовую и сортовую принадлежность.

Методами КЭ, ВЭЖХ-ДМД-МС и ТСХ впервые установлен комплекс различных групп БАВ. Предложены методики «отпечатков пальцев» по ТСХ-профилю для идентификации различных сортов ОК, позволяющие определять ценные БАВ в плодах без использования труднодоступных стандартных образцов. ТСХ-профили каротиноидов, флавоноидов и органических кислот имеют значительную вариабельность для изученных сортов.

Разработана методика количественного определения суммы БАВ-антиоксидантов (АО) методом дифференциальной спектрофотометрии в ЛРС. Новизна проведенных исследований подтверждается получением двух патентов РФ на изобретения (№2712069 от 24.01.20, №2740945 от 21.01.21).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Собран уникальный материал по фармакогностическому и химическому описанию различных сортов ОК. Проведенные исследования позволяют дополнить и расширить уже имеющиеся в литературе сведения, а также могут служить основой для дальнейшего исследования сортового разнообразия плодов ОК и разработки единых современных нормативных требования для оценки качества данного вида ЛРС. В работе предложен новый методический подход, позволяющий проводить идентификацию сортовой принадлежности плодов ОК, который может в дальнейшем быть дополнен новыми исследованиями других сортов. Методом ИК-спектроскопии изучен характер образования водородных связей между молекулами БАВ в ЛРС и их термодинамические характеристики.

В результате комплексного фитохимического исследования установлены наиболее сбалансированные сорта для производства различных ЛФ на их основе, в т.ч. для получения жирного масла. Проведенные исследования позволили разработать унифицированные критерии для оценки качества плодов и составить проект НД (ФС «Облепихи крушиновидной плоды»), который зарегистрирован в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Теоретическую основу исследования составили труды российских (И.А. Самылина, А.А. Сорокина, В.А. Куркин, Д.А. Муравьева, Г.И. Молчанов, В.И. Дейнека) и зарубежных (V.Singh, T.S.C.Li, R. Kr. Gupta, B. Olas et al.) исследователей, развивающих системный подход в стандартизации ЛРС и ЛРП; международная и российская НД на ЛРС. Методология исследования заключалась в проведении комплексной оценки качества изучаемого ЛРС плодов ОК десяти различных сортов в сравнительном изучении химического состава. При выполнении работы были использованы методы сравнительного, документированного анализа; комплекс физико-химических методов, технологических испытаний; математические методы анализа и обработки результатов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты изучения вариабельности основных анатомо-диагностических признаков плодов ОК различных сортов с применением различных методов микроскопии и их биометрические характеристики.
2. Результаты исследования способности аккумуляции плодами ОК различных сортов токсичных элементов.
3. Результаты комплексного качественного и количественного определения различных групп БАВ современными физико-химическими методами (СФМ, КЭ, ВЭЖХ-ДМД-МС, ТСХ).
4. Результаты исследования АОА методом дифференциальной СФМ с помощью разработанной методики определения.
5. Результаты возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сортовой принадлежности плодов ОК.

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 Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств (Фармобразование-2018)» (Воронеж, 2018), Международная научная конференция «Перспективы лекарственного растениеводства» (Москва, 2018), II Международная научная

конференция «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства» (Москва, 2019), 9-я Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2019), Международная научная конференция «Проблемы ботаники: история и современность» (Воронеж, 2020).

Диссертационная работа была апробирована 24 февраля 2021 года на межкафедральном заседании фармацевтического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Воронежский государственный университет (ФГБОУ ВО ВГУ).

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. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Внедрение результатов исследования

Полученные экспериментальные данные по составу БАВ в высушенных плодах десяти сортов облепихи крушиновидной использованы при разработке проекта ФС «Облепихи крушиновидной плоды» для ГФ РФ. Указанные проекты приняты ФГБУ «НЦЭСМП» к рассмотрению в установленном порядке. Проведено внедрение разработанной методики по определению суммарной антиоксидантной активности в пересчете на кислоту аскорбиновую в ЛРС и ЛРП на его основе методом дифференциальной СФМ при проведении учебных и научно-исследовательских работ для обучающихся в курсах «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», «Фармакогнозия», «Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья», «Особенности фитохимического анализа лекарственного сырья растительного происхождения» и «Методология изучения химического состава лекарственного растительного сырья, установление структуры действующих веществ, разработка методов стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе» (акт внедрения №1500-402 от 20.11.2020), результатов сравнительного стереомикроскопического и люминесцентного исследований микродиагностических признаков плодов ОК десяти различных сортов при проведении учебных и научно-исследовательских работ для обучающихся в курсах «Фармакогнозия» (акт внедрения №1502-02 от 07.10.2020) на фармацевтическом факультете Воронежского госуниверситета.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности 14.04.02 - «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 5,6 и 7 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 277 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех экспериментальных глав, выводов и библиографического указателя, включающего 171 источник, в т.ч. 44 на иностранном языке, и приложений (64 стр.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 21 печатная работа, в том числе 15 статей в журналах, входящих в список ВАК, 3 статьи в журналах, входящих в базу научного цитирования Scopus и 2 патента на изобретения РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись высушенные плоды ОК наименее изученных сортов («Ботаническая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая ароматная», «Галерит», «Краснокарминовая», «Рябиновая», «Нивелена», «Столичная», «Студенческая», «Трофимовская»), широко культивируемых на Европейской части РФ, заготовленные в Ботаническом саду при ФГБОУ ВО «Московский государственный университет» им. М.В. Ломоносова. Сбор плодов осуществляли в период полного созревания в сентябре 2016 – 2019 гг согласно правилам заготовки этого вида ЛРС. Высушенные плоды хранили в цельном виде в пергаментной бумаге не более 2 лет.

Сушку плодов проводили в сушильных шкафах при температуре не выше 60°C до остаточной влажности не более 14%.

Объектом исследования для проведения микроскопии и стереомикроскопии являлись свежие и замороженные плоды. В период проведения эксперимента их хранили в замороженном виде в морозильной камере при температуре не выше -18 С°.

Определение золы общей проводили по методике ОФС.1.2.2.2.0013.15, золы, нерастворимой в хлороводородной кислоте по методике ОФС.1.5.3.0005.15. Влажность исследуемого ЛРС анализировали по методике ОФС.1.5.3.0007.15 ГФ РФ XIV изд.

Микроскопическое исследование плодов осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0003.15 ГФ РФ XIV изд. Использовался микроскоп Биомед-6 (Россия), имеющий

прикреплённую цифровую камеру Levenhuk (КНР) с программным обеспечением для обработки снимков.

Люминесцентный анализ тканей плодов ОК осуществляли с использованием люминесцентного микроскопа марки Микромед – 3 Люм (Россия), оснащённом корпусом люминесцентной насадки с четырьмя люминесцентными блоками «В»; «G»; «V» и «UV» LED (Россия). Источник света - высоковольтная ртутная лампа (100 Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр - 410-490 нм, наблюдение в диапазоне 515 – 700 нм (Лаборатория Фитониринга ФГБОУ ВО ВГУ). Визуализацию диагностических признаков при всех видах микроскопических исследований осуществляли с помощью видеокамеры Livenhuk C310 NG (КНР) и программным обеспечением TopView (x86).

Стереомикроскопический анализ проводили с использованием микроскопа «Биомед-2М» (Россия) с объективами x40, x100.

Определение элементного состава осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе «ELAN-DRC» (США). Для контроля правильности определения использовали метод добавок нескольких опорных многоэлементных стандартных растворов для масс-спектрометрии (Perkin-Elmer) или аналогичные, содержащие разные группы элементов.

Сумму каротиноидов определяли методом прямой СФМ в пересчете на β -каротин, сумму АЦ - в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид, сумму флавоноидов - в пересчете на рутин, сумму АК - нингидриновым методом в пересчете на кислоту глутаминовую, сумму сахаров - пикриновым методом в пересчете на глюкозу определяли методом дифференциальной СФМ. Сумму органических кислот - титриметрически в пересчете на кислоту яблочную по методикам ГФ, АсК - титриметрически, АОА - титриметрически в пересчете на кверцетин. УФ-спектры для изучаемых объектов были получены с помощью спектрофотометра Hitachi U1900 (Япония) в требуемых диапазонах длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см относительно растворов сравнения.

Содержание ЖМ определяли путем многократной экстракции сырья н-гексаном в аппарате Сокслета с последующим выпариванием полученного извлечения до получения чистого ЖМ. Содержание экстрактивных веществ (ЭВ) - в соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.006.15 ГФ XIV изд. по методике 1(экстрагент – спирт этиловый 95%).

Индивидуальные свободные сахара, АК и органические кислоты определяли также методом КЭ на приборе «Капель-105/105М» («Люмэкс», Россия).

Анализ методом ТСХ проводили на пластинках «Sorbfil» (Россия) ПТСХ-АФ-А 10x10 см (ЖРВ, АЦ, органические кислоты, каротиноиды), ПТСХ-П-А размером 10x15 см (АК), «Silicagel» (Германия) 60 F254 10x10 см на алюминиевой подложке (флавоноиды). Перед

началом хроматографирования насыщали камеры в течение 30-40 мин соответствующей системой растворителей. На линию старта с помощью микрошприца (МШ-1,10, Россия) наносили оптимальный подобранный объем пробы анализируемого извлечения из плодов ОК и растворы СО.

В работе использованы реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия). Субстанции стандартных образцов имели степень чистоты не менее 99% (ЗАО «Вектон», Россия).

Исследование плодов методом инфракрасной спектроскопии с нарушенным полным внутренним отражением (ИК НПВО) проводили без предварительной пробоподготовки (ЛРС измельчалось до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 0,5 мм) на приборе ИК-Фурье спектрометр Bruker VERTEX 70 (Германия) с последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32.

Изучение профиля флавоноидов методом ВЭЖХ-ДМД-МС проводили с использованием системы жидкостной хроматографии Ultimate 3000, оснащенной дегазатором, трехканальным насосом, термостатом колонок, термостатируемым автосамплером, ДМД и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Endura (США).

Результаты исследования

1. Изучение сортовой вариабельности диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной

Макроскопический анализ. Проведена сравнительная оценка плодов десяти сортов ОК по внешним признакам. Запах всех исследуемых плодов можно охарактеризовать как ароматный, специфический. Плоды исследуемых сортов ОК отличались по следующим основным признакам: окраске, форме и размеру плода; вкусу; длине плодоножки; окраске и форме семени. Обобщение и систематизация результатов проведенного сравнительного исследования внешних признаков позволила выявить основные характерные черты данного ЛРС, позволяющие предложить новый методический подход к идентификации сорта.

Микроскопический анализ. В связи с тем, что работ, касающихся изучения сортовой вариации анатомических признаков сырья ОК в литературе не обнаружено, проведенный анализ показал наличие следующих морфолого-анатомических особенностей сортов. Обобщенные данные представлены в табл. 1.

Люминесцентный микроскопический анализ. В настоящее время люминесцентный и стереомикроскопический анализы включены в ГФ РФ XIV издания. При проведении люминесцентного анализа порошка высушенных плодов ОК установлено наличие автофлуоресценции всех фрагментов, имеющих в поле зрения (исключение - кожура семени).

Таблица 1– Морфолого-анатомические признаки плодов ОК изученных сортов

Объект	Признак	Изученные сорта									
		«Трофимовская»	«Студенческая»	«Ботаническая ароматная»	«Краснокарминовая»	«Нивелена»	«Столичная»	«Галерит»	«Рябиновая»	«Ботаническая любительская»	«Ботаническая»
Плод	Эпидермис (Д* х Ш, мкм)	25,63-53,59 × 23,3-41,94	39,61-53,59 × 25,63-41,94	34,95-60,58 × 25,63-32,62	46,6-67,57 × 25,63-41,94	30,29-48,93 × 23,3-34,95	27,9-46,6 × 23,3-27,9	23,3-58,2 × 23,3-46,6	37,2-58,2 × 23,3-37,2	27,9-46,6 × 20,9-37,2	27,96-48,93 × 23,2-37,28
	Щитковидные волоски (d, мкм)	274,4-588	303,8-597,8	392-509,6	294-686	401,8-558,6	323,4-686	313,6-401,8	333,2-431,2	392-597,8	313,6-588
	Встречаемость	в п.з. на 2,46 мм ²									
		6-9	4-8	6-8	4-6	5-8	1-5	4-8	5-30	4-13	2-9
	Место прикрепления (ножки) (d, мкм)	46,6-69	39,61-109,51	37,28-51,26	48,93-93,2	46,6-81,55	58,8-68,6	46,6-67,5	27,9-46,6	39,6-53,6	58,25-104,85
	Встречаемость (в п.з. на 2,46 мм ²)	в п.з. на 2,46 мм ²									
		14-32	9-27	2-12	7-9	6-16	5-7	7-14	4-33	4-8	2-11
	Звездчатые волоски (Д х Ш, мкм)	784-1176 × 9,8	441-1274 × 9,8	490-1176 × 9,8	490-1176 × 9,8	539-1470 × 9,8	490-588 × 9,8-19,6	343-637 × 9,8	245-686 × 9,8	539-1372 × 9,8	441-509,6 × 9,8
Капли масла (d, мкм)	16,31-58,25	18,64-44,27	16,31-48,93	23,3-46,6	11,65-46,6	9,8-68,6	16,3-34,9	16,3-34,9	18,6-46,6	20,97-58,25	
Семя	Околоплодная стенка Наружный слой (Д х Ш, мкм)	81,55-144,46 × 23,3-30,29	107,18-174,75 × 20,97-27,96	93,2-144,46 × 18,64-27,96	104,85-149,12 × 20,97-30,29	104,85-139,8 × 20,97-23,3	58-111,8 × 9,32-23,3	74,5-104,8 × 13,9-23,3	76,8-121,1 × 11,6-20,9	97,8 - 130,48 × 18,6-23,3	104,85-144,46 × 16,31 - 27,96
	Промежуточный слой (Д х Ш, мкм)	34,95-58,25 × 23,3-34,95	25,63-48,93 × 23,3-41,94	30,29-46,6 × 23,3-34,95	34,95-51,26 × 16,31-37,38	34,95-44,27 × 23,3-30,29	23,3-58 × 23-25	23,3-58 × 23-25	34,9-46,6 × 18,6-34,9	18,64-58,25 × 13,98-27,9	32,62-51,26 × 20,97 - 46,6
Эпидермис семени	Палисадная ткань (Ш, мкм)	116,5-139,8	102,52-139,8	116,5-165,43	107,18-163,1	116,5-142,13	92-115	34,95-46,6	102,5-151,4	111,8-139,8	116,5-128,15
	Пигментный слой (Ш, мкм)	53,59-139,8	34,95-69,9	58,25-116,5	23,3-93,2	46,6-83,88	46,6-70	116,5	81,5-116,5	88,54-163,1	46,6-49,9
	Зародыш (Д х Ш, мкм)	1708-2879,2 × 1390,8-1732,2	2008,8-2440 × 1317,6 - 1952	2008,8-2440 × 1342-1721,2	2464,4-2684 × 1708-2196	2318-2806 × 1854,4-2074	2562-2928 × 1830-2000,8	2976,8-3050 × 2220,4-2318	2074-3074 × 1830-2318	1830-2684 × 1398- 2196	2562-3172 × 2196-2440

* Примечание: П.з. – поле зрения; d – диаметр; Д – длина; Ш – ширина.

Наблюдается ярковыраженное свечение желтого цвета тканей мякоти и эпидермиса плода. Группа фенольных соединений (флавоноиды, АЦ) придает объекту исследования зеленоватый оттенок, конденсированные танины - коричневатый оттенок. Щитковидные волоски состоят из пластинок, не обладающих яркой люминисценцией, наблюдается небольшое свечение в местах сочленения пластинок волоска. Слабое зеленоватое свечение характерно для стенок звездчатых волосков. «Мешочек» собственно плода коричневатого цвета, собственной люминисценции не имеет, так же как и кожура семени. Благодаря наличию ЖМ и белковых соединений зародыш обладает собственной зеленоватой люминисценцией. Визуализация и отнесение фрагментов к морфологической части улучшается после удаления ЖМ. Усиливается люминисценция звездчатых и щитковидных волосков, собственно плода, улучшается процесс дифференцирования фрагментов эпидермиса гипантия и тканей мякоти.

Стереомикроскопический анализ. Установлено, что все объекты исследования имеют сходное анатомическое строение. Стереомикроскопический метод анализа позволяет обнаружить и установить локализацию основных микродиагностических признаков без проведения специальной пробоподготовки, а также получать объемные изображения с большой глубиной резкости за короткий промежуток времени.

Таким образом проведена сравнительная оценка variability макро- и микродиагностических признаков плодов ОК по сортам с применением различных видов микроскопического анализа. Выявленные отличия в биометрических характеристиках могут служить для первичной идентификации сорта.

2. Сравнительный анализ минерального состава плодов облепихи крушиновидной различных сортов

Для оценки возможности аккумуляции плодами токсичных элементов, на следующем этапе работы было проведено сравнительное исследование элементного состава плодов и почвы с места произрастания. На анализ выбирались сорта («Столичная» и «Ботаническая ароматная») с наибольшими значениями показателей золы общей (3,92 и 3,58% соответственно) и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте (0,75 и 0,59% соответственно), которые тесно связаны со способностью растения накапливать тяжелые металлы. В ходе определения было установлено наличие в изучаемых объектах обширного спектра элементов - 65 наименований. Определено наличие 13 эссенциальных элементов (из 15).

Проведенный анализ свидетельствует о том, что изученные сорта имеют незначительные различия количественного содержания элементов. Принадлежность к тому или иному сорту не влияет на возможность накапливать тот или иной элемент плодами, данный процесс определяется видовыми биохимическими характеристиками. В процессе своей вегетации плоды данного растения практически не накапливают токсичные элементы, т.к. их содержание в изучаемых плодах в 337 раз меньше, чем в почве с места произрастания (табл. 2). Содержание в плодах тяжелых металлов и мышьяка не превышает допустимых нормативов, установленных ОФС.1.5.3.0009.15 ГФ РФ XIV изд.

Таблица 2 – Результаты определения токсичных элементов высушенных плодов ОК сорта «Столичная» и «Ботаническая ароматная» в пересчете на абсолютно сухое сырье, мг/кг

№ п/п	Элемент	Сорт плодов		Почва	Норма по ГФ РФ XIV изд, мг/кг	Кбп
		«Ботаническая ароматная»	«Столичная»			
Токсичные элементы						
1	Pb	0,00017	0,00018	75,00	6,0	0,0025
2	Hg	0,0000021	0,0000017	0,30	1,0	0,0058
3	As	0,000068	0,000057	13,00	0,1	0,0044
4	Cd	0,000025	0,000024	0,42	0,5	0,0570

Таким образом, основываясь на величинах Кбп токсичных элементов в исследуемых образцах, следует сделать вывод о том, что плоды ОК, вне зависимости от сорта, не являются биологическими концентраторами экотоксикантов (тяжелых металлов и мышьяка).

3. Изучение профиля некоторых групп БАВ облепихи крушиновидной изученных сортов

Количественное определение различных групп БАВ. С целью выявления наиболее перспективных сортов в качестве источников разнообразных групп БАВ, проведена оценка их количественного содержания (табл. 3).

Установлено, что для получения водных ЛФ могут быть рекомендованы сорта «Нивелена», «Столичная» и «Трофимовская», накапливающие в большей степени гидрофильные группы БАВ, такие как аминокислоты, сахара и органические кислоты. Настойки и экстракты рационально получать из сортов «Рябиновая», «Столичная», «Галерит», показавшие значительное содержание БАВ, извлекаемых этанолом (флавоноиды, каротиноиды, антоцианы). Наибольший выход ЖМ отмечен у сортов «Столичная», «Ботаническая любительская», «Краснокарминовая».

Таблица 3– Содержание суммы БАВ в плодах ОК различных сортов в пересчёте на абсолютно сухое сырьё, %

№	Сорт	Сумма каротиноидов, мг%	Сумма АЦ	Сумма флавоноидов	Сумма АК	Сумма сахаров	Сумма органических кислот	АсК	АОА, мг/г	ЖМ	ЭВ
1	Столичная	83,69 ±4,53	0,55 ±0,01	0,47 ±0,08	1,4 ±0,14	19,89 ±5,44	11,42 ±0,03	0,049 ±0,003	4,82 ±0,29	25,78 ± 0,52	34,87 ± 2,03
2	Галерит	29,22 ±0,59	1,208 ±0,01	0,91 ±0,09	1,90 ±0,22	12,37 ±1,16	11,44 ±0,07	0,037 ±0,002	4,78 ±0,34	13,59 ± 0,08	30,79 ± 3,15
3	Рябиновая	176,54 ±3,87	1,09 ±0,01	0,70 ±0,07	1,18 ±0,13	12,60 ±0,99	9,31 ±0,15	0,038 ±0,001	5,11 ±0,94	21,09 ± 0,86	26,95 ± 1,81
4	Ботаническая любительская	37,84 ±0,38	0,68 ±0,01	0,24 ±0,01	1,80 ±0,37	12,39 ±2,20	13,36 ±0,07	0,041 ±0,001	4,71 ±0,55	17,27 ± 0,21	31,27 ± 1,51
5	Ботаническая	32,07 ±1,05	0,89 ±0,06	0,25 ±0,01	1,51 ±0,03	21,11 ±0,62	11,62 ±0,04	0,028 ±0,001	4,35 ±0,65	26,17 ± 0,52	39,42 ± 1,41
6	Трофимовская	51,45 ±1,62	0,36 ±0,01	0,29 ±0,01	0,85 ±0,02	24,27 ±1,52	12,10 ±0,08	0,055 ±0,001	7,86 ±0,83	18,76 ± 0,93	30,48 ± 2,28
7	Студенческая	24,98 ±1,70	0,94 ±0,02	0,45 ±0,01	1,21 ±0,23	14,51 ±0,31	16,08 ±0,19	0,020 ±0,002	6,21 ±0,69	17,42 ± 0,45	45,38 ± 1,18
8	Ботаническая ароматная	89,98 ±0,66	0,21 ±0,01	0,47 ±0,02	1,46 ±0,02	21,84 ±1,98	12,37 ±0,07	0,023 ±0,001	6,94 ±0,38	17,42 ± 0,36	40,74 ± 2,64
9	Краснокарминовая	127,78 ±3,79	0,10 ±0,01	0,37 ±0,01	1,94 ±0,03	14,58 ±2,67	12,78 ±0,07	0,019 ±0,001	8,93 ±0,638	24,18 ± 0,73	29,72 ± 2,44
10	Нивелена	36,50 ±0,60	0,31 ±0,02	0,51 ±0,06	2,00 ±0,24	18,27 ±1,06	18,09 ±0,07	0,037 ±0,002	8,76 ±0,61	14,64 ± 0,21	25,47 ± 1,08

Разработка методики определения антиоксидантной активности (АОА) плодов ОК методом дифференциальной спектрофотометрии. В процессе исследования была разработана и запатентована методика спектрофотометрического определения АОА для различных объектов, основанная на взаимодействии восстановителя (антиоксидантов - АО,

содержащихся в ЛРС) с медиаторной парой $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Уменьшение оптической плотности в максимуме поглощения (420 ± 2 нм) при добавлении к системе исследуемого извлечения свидетельствует о том, что анализируемый раствор обладает восстановительными свойствами (рис. 1). По уравнению калибровочного графика (рис. 2), построенного с применением серии стандартных растворов аскорбиновой кислоты (АсК), добавляемых к раствору медиаторной пары, вычисляют АОА извлечения в пересчете на АсК в г/мл раствора.

Результаты апробации разработанной методики определения АОА на извлечении из плодов ОК различных сортов в пересчете на АсК и расчет содержания суммы БАВ-АО представлены в табл. 4. Статистическая обработка результатов представлена в табл. 5.

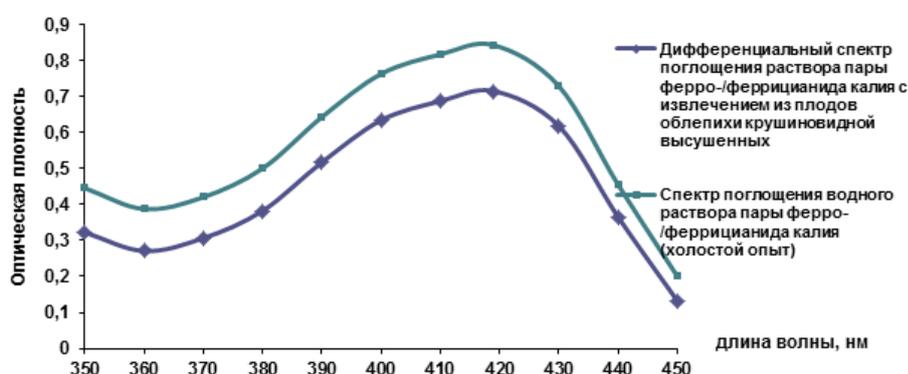


Рисунок 1. Вид спектра поглощения водного раствора медиаторной пары и дифференциального спектра водного раствора медиаторной пары в присутствии извлечения из плодов ОК высушенных

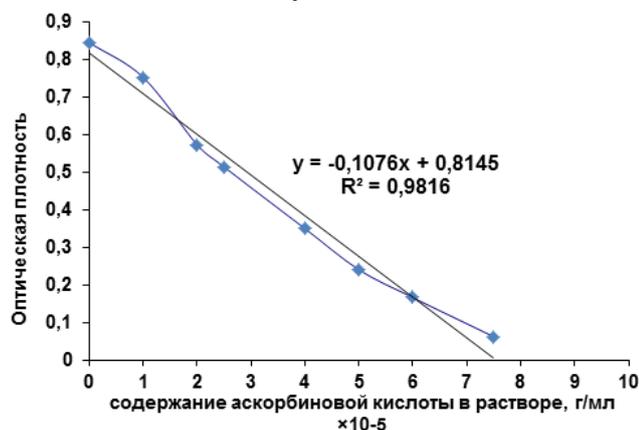


Рисунок 2. Зависимость величины оптической плотности растворов при $\lambda=420$ нм, содержащих медиаторную пару, от концентрации АсК

Таблица 3–Результаты определения содержания суммы БАВ, обладающих АОА (в пересчете на АсК и абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Сорт	Антиоксидантная активность (в пересчете на кислоту аскорбиновую), $\times 10^{-5}$ г/мл извлечения	Содержание суммы БАВ, обладающих АОА, %
1	Столичная	0,246	0,040 \pm 0,004
2	Галерит	0,005	0,001 \pm 0,0001
3	Рябиновая	0,595	0,096 \pm 0,010

4	Ботаническая любительская	Менее 1×10^{-5}	-
5	Ботаническая	Менее 1×10^{-5}	-
6	Трофимовская	0,823	0,138±0,014
7	Студенческая	1,271	0,209±0,021
8	Ботаническая ароматная	1,184	0,196±0,020
9	Краснокарминовая	1,544	0,251±0,025
10	Нивелена	1,191	0,196±0,020

Данные табл. 3 показывают, что лидером по содержанию БАВ-АО является сорт «Краснокарминовая». Следует отметить, что предложенный способ выгодно отличается экономичностью от других спектрофотометрических методик, так как не требует дорогостоящих реактивов и материалов, а также дает более достоверные результаты в виду отсутствия субъективности при определении конечной точки титрования для окрашенных извлечений из ЛРС.

Таблица 4– Метрологическая характеристика методики определения ($P = 95\%$; $n = 5$)

$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
0,1959	0,00029	0,01715	0,00767	0,0441	0,01971	10,06

Исследование специфического профиля БАВ различных сортов. Для углубленного изучения специфического профиля БАВ, а также установления количественного содержания отдельных компонентов в плодах применен комплекс различных современных физико-химических методов анализа.

В эксперименте впервые проведена сравнительная оценка и частичная идентификация ТСХ-профилей для таких групп БАВ, как каротиноиды, флавоноиды, антоцианы (АЦ), жирорастворимые витамины (ЖРВ), аминокислоты (АК), органические кислоты. Были экспериментально подобраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографического разделения и идентификации зон БАВ (табл. 5). Анализ полученных данных свидетельствует о том, что состав плодов ОК различных сортов неодинаков.

В процессе исследования были установлены специфические зоны БАВ, присутствующие на хроматограммах всех сортообразцов, характеризующие их видовую принадлежность. Также были выявлены специфические зоны-маркеры в ТСХ-профиле каротиноидов (наблюдалось от 4 до 11 зон), флавоноидов (обнаружено от 10 до 13 зон) и органических кислот (визуализировалось от 2 до 4 зон), которые могут служить для определения принадлежности плодов к тому или иному сорту.

Таблица 5– Результатов ТСХ-анализа сортовых особенностей накопления различных групп
БАВ плодов ОК

№	БАВ	Условия анализа				
		Элюент	Объем пробы, мкл	Детектирующий реагент	Количество определяемых зон	Идентифицированные зоны
1	Каротиноиды	Гексан – н-пропанол – вода (10:1:0,2)	13	-	4-11*	β-каротин
2	Аминокислоты	н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:1)	5	1% спиртовой раствор нингидрина	7	Arg, Val, Phe, Pro, Glu, Gly, Lys
3	Флавоноиды	Этилацетат – ледяная уксусная кислота – вода (7,5:1,5:1,5)	7	10% спиртовой раствор NaOH, УФ свет 365 нм	10-13*	Рутин, кверцетин
4	Антоцианы	н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5)	10	-	4	-
5	Жирорастворимые витамины	Гексан – хлороформ (3:1)	30	5% спиртовой раствор ФМК	6	Эргокальциферол, токоферола ацетат
6	Органические кислоты	Этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (100:11:11:25)	10	0,2% спиртовой раствор бромкрезолового зеленого	2-4*	Яблочная, янтарная, винная, щавелевая кислоты

* - количество зон варьируется в зависимости от сорта

Методом капиллярного электрофореза (КЭ) был исследован состав свободных органических кислот, сахаров и аминокислот изучаемого ЛРС (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты исследования профиля свободных сахаров, аминокислот, органических кислот в плодах ОК методом КЭ

№ п/п	Содержание органических кислот, %		
	Органическая кислота	Сорт «Нивелена»	Сорт «Рябиновая»
1	Бензойная	0,0110	0,1076
2	Винная	1,3333	Менее 0,005
3	Лимонная	0,4408	0,2906
4	Масляная	Менее 0,05	Менее 0,05
5	Молочная	Менее 0,12	Менее 0,12
6	Муравьиная	Менее 0,15	Менее 0,15
7	Пропионовая	Менее 0,1	Менее 0,1
8	Сорбиновая	0,0992	0,2584
9	Уксусная	Менее 0,1	Менее 0,1
10	Фумаровая	Менее 0,005	Менее 0,005*
11	Щавелевая	0,4077	0,0646
12	Яблочная	14,7762	12,4116
13	Янтарная	Менее 0,05	Менее 0,05
Всего		17,0682	13,1328
Содержание сахара, %			
№ п/п	Сахар	Сорт «Трофимовская»	Сорт «Галерит»

1	Глюкоза	0,0450	0,1093
2	Сахароза	0,5511	0,3606
3	Фруктоза	0,4724	0,2513
Всего		1,0685	0,7212
Содержание аминокислот, %			
№ п/п	Аминокислота	Сорт «Трофимовская»	Сорт «Нивелена»
1	Аланин	0,5623	0,5950
2	Аргинин	0,9785	1,0798
3	Аспарагиновая кислота	2,3843	3,0522
4	Валин**	0,5623	0,6721
5	Гистидин	0,2587	0,2755
6	Глицин	0,3824	0,4297
7	Глутаминовая кислота	2,2944	2,6335
8	Лейцин*+ Изолейцин**	0,8885	1,0248
9	Лизин**	0,3487	0,4518
10	Метионин**	0,1125	0,0882
11	Пролин	0,4386	0,5509
12	Серин	0,4161	0,4958
13	Тирозин	0,2024	0,2314
14	Треонин**	0,4274	0,4738
15	Фенилаланин**	0,6073	0,6501
16	Цистин	0,5398	0,2645
Всего		11,4042	12,9691

* - предел обнаружения ** - незаменимая АК

Установлены различия в количественном содержании некоторых компонентов. Для сорта «Нивелена» характерно появление винной кислоты с ростом общей суммы органических кислот, тогда как в менее кислом сорте «Рябиновая» винная кислота практически отсутствует. Однако, в сорте «Рябиновая» установлено повышенное содержание бензойной и сорбиновой кислот относительно сорта «Нивелена», обратная зависимость наблюдается в отношении щавелевой кислоты.

Сорта «Трофимовская» и «Нивелена» показывают сходный профиль аминокислот в качественном и количественном соотношении, что может объясняться их общим генотипом. В сортах «Трофимовская» и «Галерит» присутствуют все свободные сахара, такие как сахароза, глюкоза, фруктоза, однако их содержание различно.

Исследование содержания и состава фенольной фракции БАВ в изучаемом ЛРС проводилось с помощью метода ВЭЖХ-ДМД-МС (рис. 3). В исследуемых плодах ОК было установлено наличие флавонолгликозидов – производных кемпферола, кверцетина и изорамнетина. Среди них основным соединением выступал изорамнетин-3-рутинозид (18,2-21,0% от суммы всех флавоноидов), а также изорамнетин-3-софорозид-7-рамнозид (13,1%) и изорамнетин-3-глюкозид-7-рамнозид (9,0-13,0%). Общее содержание флавоноидов в плодах ОК было практически идентично и варьировало в диапазоне от 2,25 до 2,61 мг/г (табл. 7).

В следовых количествах были идентифицированы такие флавонолгликозиды, как рутин, 3-глюкозид-7-рамнозид кверцетина, кемпферол-3-софорозид, изорамнетин-3-рамнозид, 3-рутинозид-7-рамнозид и изомер изорамнетин-3-рутинозид-7-рамнозида, а также флавонолы: кверцетин, изокверцитрин и изорамнетин.

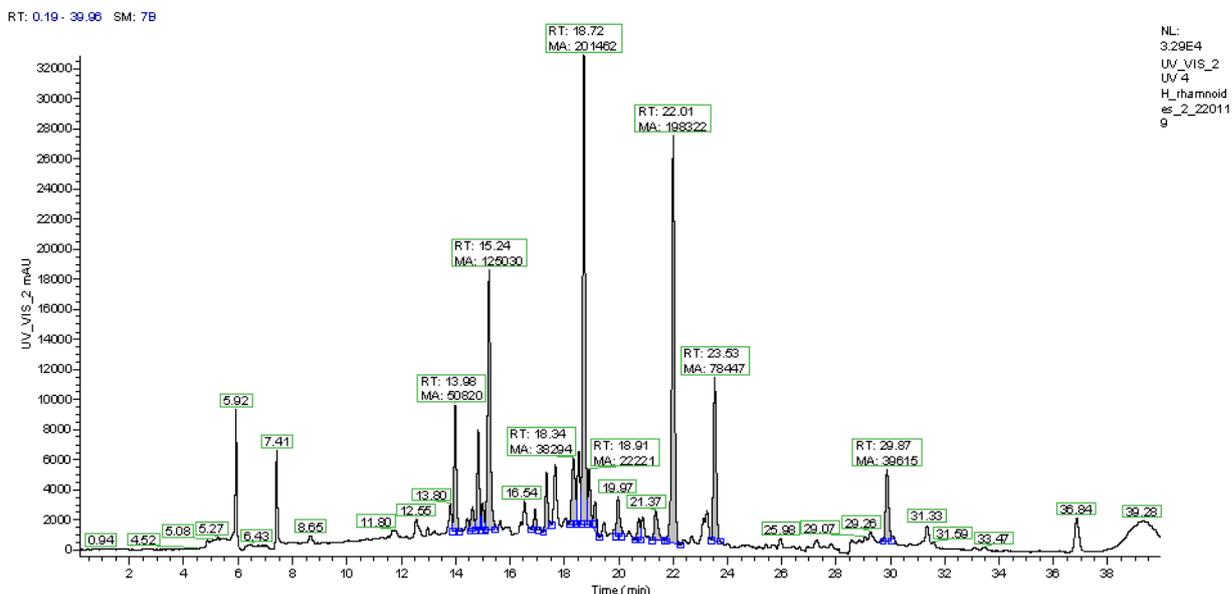


Рисунок 3. Хроматограмма извлечения из плодов ОК сорта «Краснокарминовая» при длине волны 350 нм (флавонолгликозиды)

Таблица 7 – Результаты ВЭЖХ-ДМД-МС анализа профиля флавоноидов в плодах ОК различных сортов (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№	Флавоноид	Содержание, мг/г	
		«Краснокарминовая»	«Рябиновая»
1	Изокверцитрин	0,04	0,08
2	Изорамнетин	0,04	0,06
3	Изорамнетин-3-глюкозид	0,19	0,20
4	Изорамнетин-3-глюкозид-7-рамнозид	0,03	0,03
5	Изорамнетин-3-рамнозид	0,11	0,06
6	Изорамнетин-3-рутинозид	0,54	0,51
7	Изорамнетин-3-рутинозид-7-рамнозид	0,55	0,45
8	Изорамнетин-3-рутинозид-7-рамнозид (изомер)	0,10	0,08
9	Изорамнетин-3-софорозид-7-рамнозид	0,34	0,22
10	Кверцетин	0,01	0,01
11	Кверцетин-3-глюкозид-7-рамнозид	0,06	0,11
12	Кверцетин-3-рутинозид-7-глюкуронид	0,03	0,10
13	Кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид	0,03	0,02
14	Кверцетин-3-софорозид-7-рамнозид	0,14	0,12
15	Кемпферол-3-софорозид	0,03	0,05
16	Кемпферол-3-софорозид-7-рамнозид	0,13	0,12
17	Неидентифицированный флавонолгликозид	0,06	0,06
18	Неидентифицированный флавонолгликозид	0,03	0,05
19	Рутин	0,06	0,10
Сумма флавоноидов		2,61	2,43

Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации плодов и установления сортовой принадлежности. Анализ ИК-спектров (рис. 4), полученных в диапазоне средних частот, показал, что каждый сорт имеет различия, как в положении, так и в степени интенсивности полос поглощения, что, вероятнее всего, определяется особенностями фитохимического состава исследуемого сырья.

Для ИК-спектров плодов ОК различных сортов установлено наличие специфических полос поглощения: «Краснокарминовая», «Галерит», «Трофимовская», «Ботаническая» в диапазонах 3009-3006; 1456-1443 и 1379-1375 см^{-1} ; «Студенческая», «Рябиновая», «Ботаническая любительская» в диапазоне 1338-1321 см^{-1} ; «Краснокарминовая», «Рябиновая», «Ботаническая ароматная» в интервале 1155-1146 см^{-1} ; «Краснокарминовая» и «Рябиновая» область 914 см^{-1} ; «Краснокарминовая», «Галерит», «Ботаническая» в интервале 609-592 см^{-1} ; «Краснокарминовая», «Трофимовская» область 814-812 см^{-1} ; «Рябиновая» область 424 см^{-1} и «Трофимовская» область 771 см^{-1} . Также стоит отметить, что ИК-спектр плодов ОК сорта «Нивелена» отличался небольшим количеством полос, а также интенсивностью их поглощения, что может быть использовано в качестве характеристического признака. Максимальная величина интенсивности поглощения в максимумах присуща для ИК-спектров плодов ОК сортов «Рябиновая», «Студенческая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая ароматная». Специфические частоты, выявленные в спектрах, возможно, считать характеристическими для конкретного сорта и использовать их в качестве маркеров при анализе подлинности, а также сортовой принадлежности плодов.

Характерные полосы поглощения в области 3310-3279 см^{-1} на ИК-спектрах плодов ОК различных сортов (рис. 4) вызваны валентными колебаниями фенольного гидроксила в межмолекулярных водородных связях. Полученные данные были использованы для расчета таких термодинамических характеристик, как энергия (E_H) и длина (R) (табл. 8). Обнаруженные межмолекулярные водородные связи принадлежат к типу сильных связей, т.е. их энергия превышает 5 ккал/моль, а длина около 2,7 Å. Данные связи в случае фенолов могут приводить к образованию димеров, цепей, колец или пространственных сеток. Полифенольные БАВ в плодах ОК, по данным ИК-спектроскопии, образуют полиассоциаты с типичными частотами поглощения при 3400-3200 см^{-1} , в то время как образование димеров с участием фенольных гидроксильных групп БАВ способствует появлению полосы в области 3650-3450 см^{-1} . Полученные индивидуальные ИК-спектры и их спектральные характеристики (положение полосы поглощения, её интенсивность) строго специфичны для каждого сорта плодов ОК и обусловлены, по всей видимости, особенностями их фитохимического состава.

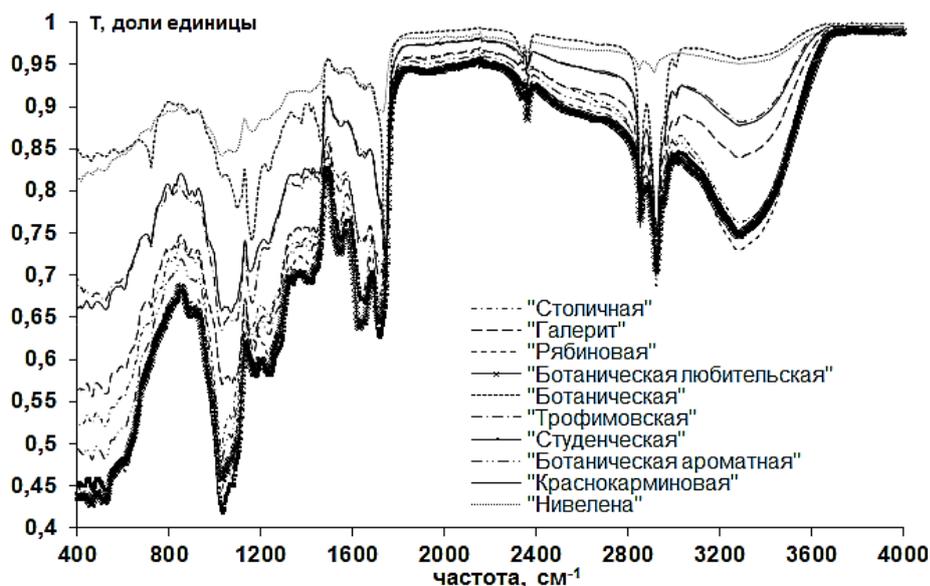


Рисунок 4. Вид полученных ИК-спектров плодов ОК исследуемых сортов

Таблица 8– Термодинамические характеристики межмолекулярных водородных связей БАВ в плодах ОК исследуемых сортов по данным ИК-спектроскопии

№ п/п	Наименование сорта	ν , см ⁻¹	$\Delta \nu$,* см ⁻¹	E_H		R , Å
				кДж/моль	ккал/моль	
1	«Галерит»	3279	421	29,77	7,11	2,74
2	«Столичная»	3310	390	27,59	6,59	2,75
3	«Ботаническая любительская»	3279	421	29,77	7,11	2,74
4	«Рябиновая»	3286	414	29,27	6,99	2,75
5	«Трофимовская»	3286	414	29,27	6,99	2,75
6	«Ботаническая»	3290	410	29,01	6,93	2,75
7	«Ботаническая ароматная»	3285	415	29,35	7,01	2,75
8	«Студенческая»	3283	417	29,48	7,04	2,75
9	«Краснокарминовая»	3279	421	29,77	7,11	2,74
10	«Нивелена»	-	-	-	-	-

$\Delta \nu$ * - смещение частоты поглощения

Таким образом, проведенные исследования открывают возможности выращивания сортов с прогнозируемым составом метаболома для продуктивного и практически безотходного использования сырьевой базы данного растения, а также позволили предложить критерии оценки качества плодов ОК для дальнейшей разработки унифицированной НД, учитывающей сортовую вариабельность.

Следует отметить, что ОК обладает широким размахом изменчивости, поэтому колебания температуры, влажности, освещенности могут по-разному влиять на накопление БАВ различными сортами. Данные исследования проведены на материале сортов, выращенных в условиях климата Европейской части России, поэтому целесообразным является продолжение исследований на образцах этих же сортов, но, выращенных в других регионах страны.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. С применением различных методов микроскопического анализа (световая, люминесцентная и стерео- микроскопии) впервые установлена вариабельность биометрических характеристик диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной изучаемых сортов. Предложен методический подход к определению сортовой принадлежности плодов по биологическим маркерам (анатомическим признакам).

2. Сравнительный анализ минерального состава плодов изученных сортов с оценкой коэффициентов биологического поглощения показал, что они не являются концентраторами мышьяка и тяжелых металлов.

3. Проведено сравнительное изучение фитохимического состава высушенных плодов облепихи крушиновидной различных сортов, культивируемых на Европейской территории России (каротиноидов, антоцианов, флавоноидов, аминокислот, сахаров, органических кислот и аскорбиновой кислоты). Выявлены сорта с наибольшим количественным содержанием БАВ (суммы каротиноидов - у сортов «Рябиновая», «Ботаническая ароматная» и «Краснокарминовая», антоциановых соединений - у сортов «Галерит», «Рябиновая», «Студенческая», суммы флавоноидов - для сортов «Галерит» и «Рябиновая», суммы свободных аминокислот - для сортов «Галерит», «Краснокарминовая» и «Нивелена», суммы полисахаридов и сахаров - для сортов «Трофимовская», «Ботаническая» и «Ботаническая ароматная», суммы свободных органических кислот - у сортов «Ботаническая любительская», «Студенческая» и «Нивелена», аскорбиновой кислоты - сорта «Столичная», «Ботаническая любительская» и «Трофимовская», суммы БАВ восстанавливающего характера - для сортов «Трофимовская», «Краснокарминовая» и «Нивелена»).

4. Методами капиллярного электрофореза, ВЭЖХ-ДМД-МС и ТСХ установлен специфический профиль БАВ плодов ОК исследуемых сортов. Установлено, что ТСХ-профиль каротиноидов, флавоноидов и органических кислот плодов ОК имеет значительную вариабельность для различных сортов, что позволяет его применять для идентификации сорта методом «отпечатков пальцев». Методом ИКС впервые выявлены специфичные полосы поглощения, что может быть использовано для идентификации данного сырья и установления сортовой принадлежности.

5. Разработана методика количественного определения суммы антиоксидантов методом дифференциальной спектрофотометрии в лекарственном растительном сырье.

6. Для получения водных лекарственных форм наиболее сбалансированными сортами по составу водорастворимых групп БАВ являются сорта «Нивелена», «Столичная», «Трофимовская», спиртосодержащих - «Рябиновая», «Столичная», «Галерит». Для

получения жирного мала - «Столичная», «Ботаническая любительская» и «Краснокарминовая».

7. Проведенные исследования легли в основу разработки критериев для стандартизации и оценки качества данного ЛРС, учитывающих сортовые вариации, и составления проекта современной НД для ГФ РФ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Рудая М.А. Изучение диагностических признаков плодов облепихи различных сортов / М.А. Рудая [и др.] // **Фармация**. – 2017. – №7. – С.11-15.
2. Рудая М.А. Применение стереомикроскопии для экспресс идентификации плодов облепихи крушиновидной / М.А. Рудая [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : материалы 7-й междунар. науч. - метод. конф. «Фармообразование-2018», Воронеж, 28-30 марта 2018г. – Воронеж, 2018. – С. 303-307.
3. Рудая М.А. Плоды облепихи крушиновидной: морфолого-анатомические признаки различных сортов / М.А. Рудая [и др.] // **Фармация**. – 2018. – Т.67, №2. – С. 21-26.
4. Рудая М.А. Определение антоциановых соединений в плодах облепихи крушиновидной различных сортов / М.А. Рудая [и др.] // Материалы 8-й Всероссийской конф. с междунар. участием Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах. ФАГРАН – 2018, Воронеж, 8-11 октября 2018 г. – Воронеж, 2018. – С.563-565.
5. Рудая М.А. Исследование элементного состава плодов облепихи крушиновидной (*Hipporhaerhamnoides* L.) различных сортов / М.А. Рудая, О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // **Микроэлементы в медицине**. – 2018. – Т.19, №3. – С. 49-59.
6. Рудая М.А. Определение суммы каротиноидов в плодах облепихи крушиновидной различных сортов / М.А. Рудая, О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Перспективы лекарственного растениеводства: материалы Междунар. науч. конф., М., 1-2 ноября 2018 г. – М., 2018. – С.282-285.
7. Рудая М.А. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сорта плодов облепихи крушиновидной (*Hipporhaes rhamnoides* L.) / О.В. Тринеева, М.А. Рудая [и др.] // **Химия растительного сырья**. 2019. №1. – С. 301-308. [Scopus]
8. Рудая М.А. Применение ИК-спектроскопии в анализе лекарственного растительного сырья / О.В. Тринеева, М.А. Рудая [и др.] // **Вестник Воронежского гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация**. – 2018. – №4. – С.187-194.
9. Рудая М.А. Исследование фитохимического состава плодов облепихи крушиновидной (*Hipporhaes rhamnoides* L.) различных сортов / О.В. Тринеева, М.А. Рудая [и др.] // **Химия растительного сырья**. – 2019. – №1. – С. 139-146. [Scopus]
10. Рудая М.А. 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. – Т.8, №1. – С. 38-42.
11. Рудая М.А. Определение жирного масла в плодах облепихи крушиновидной различных сортов / М.А. Рудая [и др.] // **Фармация**. – Санкт-Петербург, 2019. – Специальный выпуск: сборник материалов 9-й Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего». – С. 784-786.

12. **Рудая М.А.** Определение экстрактивных веществ в плодах облепихи крушиновидной различных сортов / **М. А. Рудая** [и др.] // Проблемы ботаники: история и современность материалы : материалы междунар. науч. конф., посвященной 130-летию со дня рождения проф. Б.М. Козо-Полянского, 80-летию со дня рождения проф. К.Ф. Хмелева, 9-го научного совещания «Флора Средней России», Воронеж, 3-7 февраля 2020 г. – Воронеж, 2020. – С. 324-327.
13. **Рудая М.А.** Методический подход к определению сортовой принадлежности плодов облепихи крушиновидной на основе анатомо-диагностических маркеров / О.В. Тринеева, **М.А. Рудая**, А.И. Сливкин / **Вестник Воронежского гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация.** – 2019. – №3. – С. 87-93.
14. **Рудая М.А.** ТСХ-профиль антоциановых соединений плодов облепихи крушиновидной различных сортов / **М.А. Рудая** [и др.] // Сборник трудов II международной научной конференции «Роль метаболизма в совершенствовании биотехнологических средств производства», Москва, 6-7 июня ФГБНУ ВИЛАР. – 2019. – С. 527-530.
15. **Рудая М.А.** Применение люминесцентной микроскопии в анализе анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной / О.В. Тринеева, А.А. Гудкова, **М.А. Рудая** // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2020. – Т.9, №1. – С. 40-45.[Scopus]
16. **Рудая М.А.** Исследование каротиноидного состава плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии / О.В. Тринеева, **М.А. Рудая**, А.И. Сливкин // **Химия растительного сырья.** – 2020. – №. 1. – С. 223-228.
17. **Рудая М.А.** Исследование профиля флавоноидов плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии / О.В. Тринеева, **М.А. Рудая**, А.И. Сливкин // **Сорбционные и хроматографические процессы.** – 2020. – Т.20, №1. – С. 79-86.
18. **Рудая М.А.** Исследование профиля свободных аминокислот плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом тонкослойной хроматографии / О.В. Тринеева, **М.А. Рудая**[и др.] // **Сорбционные и хроматографические процессы.** – 2020. – Т.20, №2. – С.277-283.
19. **Рудая М.А.** Сравнительная характеристика различных методов исследования микроскопических признаков плодов облепихи крушиновидной / О.В. Тринеева, **М.А. Рудая**, А.А. Гудкова // **Фармация.** – 2021. –Т 70, №1. – С. 5-10.
20. **Патент** Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов методом дифференциальной спектрофотометрии: пат. 2712069 Рос. Федерация: МПК G01N 33/15, G01N 33/52, G01N 21/75 Тринеева О.В., **Рудая М.А.**, Сливкин А.И.; заявитель и патентообладатель Воронежский государственный университет. – № 2018120667; заявл. 04.06.18; опубл. 24.01.20, Бюл. №3. – 14с.
21. **Патент** Способ подготовки жирномасличного лекарственного растительного сырья для определения подлинности микроскопическим исследованием: пат. 2740945 Рос. Федерация: МПК А61К 127/00, А61К 133/00, А61К 135/00, А61К 36/72, А61К 36/73 Гудкова А.А., Тринеева О.В., **Рудая М.А.**, Чистякова А.С.; заявитель и патентообладатель Воронежский государственный университет. – 2020119696; заявл. 08.06.20; опубл. 21.01.21, Бюл. №3. – 11с.

Список использованных сокращений

АК – аминокислота;	Pro - пролин;
АО – антиоксидант;	Val – валин.
АОА – антиоксидантная активность;	
АсК – аскорбиновая кислота;	
АЦ – антоциановые соединения;	
БАВ – биологически активные вещества;	
ВФС – временная фармакопейная статья;	
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;	
ВЭЖХ-ДМД-МС - ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-селективным детекторами;	
ГФ – государственная фармакопея;	
ДВ – дубильные вещества;	
ЖМ – жирное масло;	
ЖРВ – жирорастворимые витамины;	
ИК НПВО – инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения;	
Кбп - коэффициент биологического поглощения;	
КЭ – капиллярный электрофорез;	
ЛРС – лекарственное растительное сырье;	
ЛРП – лекарственный растительный препарат;	
ЛФ – лекарственная форма;	
НД – нормативная документация;	
ОК – облепиха крушиновидная;	
ОФС – общая фармакопейная статья;	
ПДК – предельно допустимая концентрация;	
СО – стандартный образец;	
СФМ – спектрофотометрия;	
ТСХ – тонкослойная хроматография;	
ТУ – технические условия;	
ФМК – фосфорномолибденовая кислота;	
ФС – фармакопейная статья;	
ЭВ – экстрактивные вещества;	
Arg - аргинин;	
Glu - глутаминовая кислота;	
Gly - глицин;	
Lys – лизин;	
Phe – фенилаланин;	