

На правах рукописи

Нестерова Надежда Викторовна

Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья
Malus sylvestris Mill.
(Яблони лесной)

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва - 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

Бубенчикова Валентина Николаевна – доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармакогнозии и ботаники, заведующий кафедрой

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», главный научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН) Минобрнауки России, Центр научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра)

Защита состоится «__»_____ 2019 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: <http://sechenov.ru/>

Автореферат разослан «____»_____2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного
совета Д **208.040.09**
доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Согласно Указу Президента Российской Федерации В.В. Путина от 7 мая 2018 г. №204 «О Национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года», одной из основных задач развития фармацевтической промышленности является обеспечение фармацевтической отрасли отечественным сырьем, в том числе растительного происхождения. Значительный интерес исследователей привлекают лекарственные растения, традиционно применяемые в народной медицине, включенные в издания Фармакопей прошлых лет, но незаслуженно забытые. Зачастую, к такому сырью относятся растительные объекты, не только обладающие фармакологическим действием, но и применяемые в качестве пищевых, что позволяет предположить безопасность их применения. К такому сырью, на наш взгляд, относятся плоды и листья яблони лесной, применение которых в качестве пищевого и лекарственного сырья насчитывает не одно тысячелетие. В последние годы в научной литературе появилось значительное количество работ, посвященных как изучению состава биологически активных веществ (БАВ) плодов и листьев яблони, так и их разнообразному фармакологическому действию. Было установлено наличие в сырье разнообразных веществ флавоноидной природы, витаминов, дубильных веществ, пектинов, гидроксикоричных и органических кислот, фенологликозидов, микроэлементов, тритерпеновых сапонинов. Показано наличие у экстрактов плодов и листьев яблони антиоксидантной и противовоспалительной активности, способности значительно снижать окислительный стресс путем ингибирования выработки цитокина Th2. Доказано наличие профилактического эффекта на вызванный действием морфина запор у лабораторных животных, за счет увеличения подвижности эпителия толстой кишки, антидиабетической активности, фунгицидного действия. Однако, несмотря на широкий спектр фармакологического действия, обеспеченность дикорастущим сырьем, а также возможность широкого введения в культуру, плоды и листья яблони лесной не признаны лекарственными и не включены в Государственную Фармакопею, что

можно объяснить несистематизированностью данных по изучению фитохимического состава, и как следствие, отсутствием чувствительных и воспроизводимых методик качественного и количественного анализа данного сырья. Комплексное фармакогностическое изучение листьев и плодов яблони лесной, экстракта и настоек гомеопатических матричных (НГМ) на их основе позволит обосновать возможность использования данного перспективного сырья, расширяя ассортимент лекарственного растительного сырья (ЛРС), что является актуальной и перспективной проблемой современной фармации.

Степень разработки темы исследования

Фармакопейная статья на плоды яблони лесной *Malus sylvestris* Mill. (*Prunus malus*) включена в Pharmacopoea Francais. Плоды яблони лесной включены в номенклатуру однокомпонентных (простых) гомеопатических лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в РФ (Приложение № 2 к приказу №335 Минздравмедпрома России от 28.11.1995). Стандартизация предусмотрена для плодов яблони домашней в соответствии с требованиями ГОСТ 27572-87, 21122-75, 16270-70, применяемых в пищевой промышленности. В отечественной и зарубежной литературе присутствуют сведения об изучении химического состава листьев, плодов яблони. Установлено наличие желчегонной, гепатопротекторной и гипохолестеринемической активности. Анализ листьев яблони домашней и лесной позволил выявить в них в значительных количествах флоридзина, обеспечивающий антидиабетическую активность (Masumoto S., Akimoto O. 2009).

Цель и задачи исследования

Целью исследования является фармакогностическое изучение и научное обоснование характеристик подлинности и показателей качества нового лекарственного растительного сырья – листьев, плоды яблони лесной, а также разработка и стандартизация лекарственных препаратов на их основе.

Для достижения поставленной нами цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Осуществить анализ отечественной и зарубежной научной литературы, характеризующих современное состояние проблемы исследований состава, фармакологического действия и особенностей стандартизации плодов, листьев яблони лесной, а также перспектив создания на их основе лекарственных препаратов;
2. Провести анализ анатомо-морфологического строения двух видов нового лекарственного растительного сырья - листьев яблони лесной (*Folia Mali*) и плоды (*Fructus Mali*) (цельных и измельченных) и установить основные диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию и разработать критерии подлинности данного сырья;
3. Изучить качественный состав и количественное содержания БАВ (флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, арбутина, полисахаридов) для двух видов сырья: листья, плоды яблони лесной в свежем, замороженном и высушенном сырье и провести их сравнительную оценку. Разработать показатели качества, характеризующее содержание БАВ, а также методы и нормы их определения;
4. Провести определение показателей качества плодов и листьев яблони лесной, а также установить их нормы для включения в разрабатываемую НД;
5. Осуществить сравнительный анализ показателей качества свежего, замороженного и высушенного сырья, а также оценить возможность использования их для получения экстракционных препаратов;
6. Изучить состав БАВ экстракта и настойки гомеопатической матричной (НГМ) листьев, плодов яблони лесной. Провести определение показателей качества экстракционных препаратов и установить их нормы для включения в разрабатываемую НД;
7. Провести изучение антимикробного действия исследуемого сырья, экстракта и НГМ плодов и листьев яблони лесной.

Научная новизна

Получены новые данные в ходе исследования внешних и микроскопических признаков плодов и листьев яблони лесной, установлены диагностические значимые признаки, для включения в соответствующие разделы, разрабатываемой НД.

С применением современных инструментальных физико-химических методов (ВЭЖХ-УФ, спектрофотометрия, ТСХ и др.) проведено изучение качественного состава и определено содержание изучаемых БАВ: флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, аминокислот, полисахаридов, дубильных веществ, фенольного гликозида – арбутина. Доказана идентичность качественного состава БАВ свежих, замороженных и высушенных листьев и плодов яблони лесной. По результатам количественного анализа выявлены закономерности изменения содержания БАВ в исследуемом сырье в зависимости от способа консервации, проявляющиеся в существенном снижении БАВ при использовании теплового режима сушки и незначительном – при замораживании. Подтверждена возможность получения экстракционных препаратов из свежего, замороженного и высушенного сырья листьев, плодов яблони лесной и проведена сравнительная оценка содержания в них органических кислот, флавоноидов, полисахаридов и дубильных веществ.

По результатам изучения антимикробной активности выявлено наличие антимикробного действия экстракционных препаратов из сырья на 8 штаммах микроорганизмов.

Приоритет проведенных исследований защищен патентом РФ № 2639119 на изобретение «Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью». дата Гос. Регистрации 19.12.2017

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты проведенных нами экспериментальных исследований позволяют значительно расширить представления о химическом составе БАВ,

анатоμο-морфологических признаках и биологической активности нового ЛРС – листья, плоды яблони лесной. Научно обоснованы характеристики подлинности и показатели качества фармацевтических субстанций растительного происхождения – ЛРС, НГМ, экстракта плодов и листьев яблони лесной. Предложены методики качественного и количественного анализа основных БАВ в новом ЛРС - плоды и листья яблони лесной, а также экстракте и НМГ, которые включены в проекты НД.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты морфолого-анатомического изучения листьев, плодов яблони лесной;
- результаты сравнительного исследования состава БАВ свежих, замороженных, высушенных листьев, плодов яблони лесной;
- результаты по изучению состава БАВ экстракционных препаратов (НГМ, сухой экстракт) из свежих, замороженных и высушенных листьев, плодов яблони лесной;
- результаты разработки показателей качества листьев и плодов яблони лесной, экстракционных препаратов методов их определения и норм;
- результаты экспериментальных исследований по определению антимикробной активности исследуемого сырья.

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на проведении информационно-аналитического поиска данных научной литературы, охватывающих фармакогностическое и фармакологическое изучение листьев, плодов яблони лесной, характеристику изученности и актуальности темы, совокупность методов фармакогностического анализа, результаты которого могут быть положены в основу разрабатываемой нормативной документации на новые виды сырья - листья (*Folia Mali*), плоды (*Fructus Mali*) яблони лесной.

В работе нами использовался комплекс методов, среди которых тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, спектрофотометрия, гравиметрический и титриметрический анализ, биологические (макро- и микроскопический анализ,

оценка антимикробной активности), фармакопейные методики ГФ XIV изд. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV изд. с применением программного обеспечения «Statistica 8,0»; «Microsoft Excel 2016»

Достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов анализа листьев, плодов яблони лесной подтверждена проведением достаточного количества экспериментальных исследований с использованием традиционных и современных аналитических методов. Экспертная оценка подтвердила достоверность первичных материалов. В работе также исследован максимально доступный объём литературных научных источников, как зарубежных, так и отечественных авторов.

Апробация результатов исследования

Апробация состоялась на научной межкафедральной конференции кафедр фармацевтического естествознания, химии и фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). (10 декабря 2018 г.)

Основные положения диссертации доложены: на республиканской научно-практической конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы образования науки и производства в фармации» (Ташкент, ноябрь, 2015); (Ташкент, 2016.); (Ташкент, 2017.); на VI и VII конференции «Инновационные технологии в науке и образовании.». (Чебоксары. 2016); (Чебоксары 2017); на Московской международной гомеопатической конференции 2016, 2017, 2018; на V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва 2016); на IX Международной научно-практической конференции, 2018; на международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования науки в 21 веке. Шаг в будущее» (Санкт-Петербург; 6-7

июля 2017); доклад на XVIII международном конгрессе «Здоровье и образование в 21 веке»; Глобальная интеграция современных исследований и технологий в медицину и образовательное пространство» (Москва, 14-17 декабря 2016) удостоен Диплома Первой степени; доклад на II международно-практическом конкурсе «Преподаватель года 2018» за доклад «Формирование естественно-научного мышления учащихся на примере открытого урока «Сравнительный анализ плодов яблони лесной и домашней» удостоен диплома победителя I степени. (Пенза, 20 сентября, 2018)

Личный вклад автора

Автору принадлежит основополагающая роль в проведении экспериментальных анализов, интерпретации, критическом изучении и обобщении полученных данных. На всех этапах исследования, начиная от информационно-аналитического поиска, охватывающего проработку научной литературы, постановки задач, их экспериментальной реализации, теоретического обобщения и анализа до обсуждения результатов, в представленных докладах и научных публикациях – вклад автора является основным.

Внедрение результатов исследования

Результаты проведенного исследования использованы в учебном процессе кафедры фармацевтического естествознания Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 12.02.2019), кафедры фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института (акт внедрения от 17.01.2019), кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» (акт внедрения от 10.04.2018), кафедры фармации Института медико-социальных технологий ФГБОУ ВО «МГУПП» Минобрнауки России (акт внедрения от 29.10.2018), а также в элективный курс Ресурсного центра «Медицинский Сеченовский

Предуниверсарий» (РЦ МСП) (акт внедрения от 13.03.2019), подготовлены проекты ФС на новые виды сырья листья, плоды яблони лесной.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты выполненного автором исследования полностью соответствуют направлению научных изысканий специальности, в том числе пунктам 2,3 указанного паспорта специальности «фармацевтическая химия; фармакогнозия»

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Выполнение диссертационной работы проводилось в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 208 страницах машинописного текста, содержит 61 таблицу и 49 рисунков, состоит из введения, обзора научной литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, списка литературы, включающего 252 источника, в том числе 122 иностранных, а также приложений.

Во введении приводится обоснование актуальности выбранного направления исследования, сформулирована цель работы и предложены конкретные задачи для достижения цели исследования, научная и практическая значимость проделанной работы, методология исследования, положения, выносимые на защиту, доклады и публикации по теме диссертационного исследования, отражен личный вклад автора.

В первой главе (обзор литературы) систематизированы и проанализированы

данные научной литературы, характеризующие современное состояние изученности химического состава, фармакологического действия нового ЛРС - листья, плоды яблони лесной. *Во второй главе* приведены данные, характеризующие объекты исследования, применяемые в ходе анализа методы и приборы, а также данные методического характера. *Третья глава* содержит данные морфолого-анатомического изучения листьев, плодов яблони лесной, определенные для свежего, замороженного и высушенного сырья, в ходе которого предложены маркеры анатомического строения. *В четвертой главе* приведены результаты исследований по изучению состава и количественной оценки БАВ различных групп в анализируемом сырье. *Пятая глава* содержит данные по стандартизации исследуемого сырья. *В шестой главе* приводятся результаты исследований по анализу БАВ экстракционных препаратов из листьев, плодов яблони лесной, в том числе НГМ, а также результаты их стандартизации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ, из них 8 опубликовано в журналах, включенных в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, 2- в журналах, входящих в международные базы данных (индексируемых в Scopus), имеется 1 патент на изобретение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служили листья, плоды яблони лесной, заготовленные от дикорастущих растений в Подмоскowie, анализ которых осуществляли в свежем, замороженном и высушенном виде. Отбор проб и исследования проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV. В ходе экспериментальных исследований были использованы методики, реактивы, растворители, стандарты, соответствующие требованиям ГФ XIV. В качестве стандартных образцов применяли коммерчески доступные индивидуальные вещества-стандарты «Sigma-aldrich» и «Fluska». Обнаружение БАВ в исследуемом сырье осуществляли с

помощью качественных реакций, методами тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSON». Содержание полисахаридного комплекса и пектинов осуществляли гравиметрическим методом после соответствующей пробоподготовки. Изучение антимикробной активности проводили в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов методом двукратных серийных разведений.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, ГОСТ Р ИСО 5725-1-02, ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002, ОФС 42-01113-09 «Валидация аналитических методик» с применением программного обеспечения «Statistica 8.0» «Microsoft Excel 2016». Результаты считали достоверными при вероятности 95% ($p < 0,05$).

МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ И МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ

Нами было проведено изучение морфологических и анатомо-диагностических признаков цельных и измельченных листьев, плодов яблони лесной, включенных в разрабатываемую нормативную документацию (НД). В результате проведенных исследований для цельных листьев, плодов яблони лесной были установлены признаки, характеризующие внешний вид сырья: для плодов, форму околоплодника, характер поверхности, размеры, цвет, вкус, запах, для листьев – размер и форма листовой пластинки, опушение по жилке, характер края листа и жилкования, цвет, запах, вкус. Установлено, что для плодов и листьев внешний вид сырья, свежего, высушенного и замороженного отличается по форме и размерам. Измельченное сырье и порошок отличаются размерами частиц для измельченных, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, а для порошка проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При определении анатомо-диагностических признаков листьев, плодов яблони лесной микропрепараты готовили в соответствии с общепринятыми методиками (ГФ XIII). Эпидерма плода представлена окончатými клетками, длина

которых составляет 15-50 мкм, ширина не превышает 30 мкм. На эпидермисе редко располагаются устьица аномоцитного типа. В районе расположения черешка и отпавшего цветка изредка можно обнаружить одиночные простые волоски. Колленхима плодов представлена 2-3 рядами клеток. Клетки мезокарпия имеют выраженную неправильную форму и заметно разрастаются к середине плода. Эндокарпий представлен несколькими слоями волокон, часто собранных в пучки и располагающихся в разных направлениях, содержит друзы и призматические кристаллы.

Эпидермис верхней стороны листа представлен довольно крупными многоугольными клетками, антиклинальные стенки которых обладают четковидными утолщениями. Над жилками клетки эпидермиса имеют более вытянутую форму, основная масса изодиаметрические. Клетки нижнего эпидермиса более мелкие извилистые. На верхней стороне листа устьица встречаются изредка и окружены 4-5 околоустьичными клетками. Устьица крупные, овальной формы, сильно приподнятые, аномоцитного типа. На нижней стороне листа они многочисленны, кутикула образует вокруг устьиц радиальную складчатость. Верхняя сторона листа почти голая, нижняя покрыта многочисленными простыми извилистыми многоклеточными волосками, заостренными на конце, слегка расширенными у основания с тонкими стенками и гладкой поверхностью. Основание волоска прикрепляется к небольшой по размерам, несколько приподнятой клетке эпидермиса, расположенной на стыке нескольких эпидермальных клеток, ориентированных вокруг места прикрепления по радиусу и покрытых кутикулой, обладающей радиальной складчатостью. Мезофилл листа рыхлый, изредка встречаются друзы кальция оксалата. Проводящая система листа образует развитую сеть жилок, снабженных кристаллоносной обкладкой.



Рис. 1
Фрагмент верхнего
эпидермиса
Ув×400

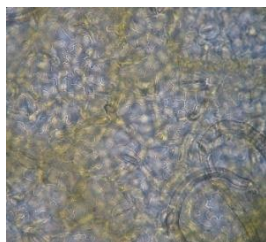


Рис.2 Фрагмент нижнего
эпидермиса
Ув×400

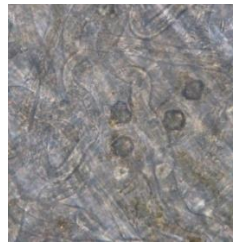


Рис.3. Друзы
оксалата кальция
Ув×1000

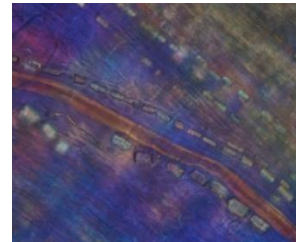


Рис. 4
Кристаллоносная обкладка
по жилке листа в
поляризованном свете
Ув×400



Рис. 5.
Фрагмент
проводящего
пучка.

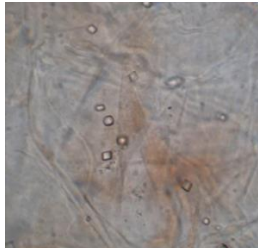


Рис.6.
Клетки мезокарпия.
Кубические кристаллы
оксалата кальция. Ув×1000



Рис. 7.
Эндокарпий.
Механические
волокна. Ув×400

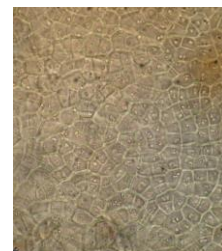


Рис. 8. Эндокарпий с
поверхности. Ув×400

Анализ данных микроскопического исследования листьев яблони лесной свежих, высушенных и замороженных показал идентичность выявленных признаков, среди которых диагностическое значение имеют: размер и форма клеток эпидермиса, тип устьичного комплекса, расположение и строение волосков, наличие друз кальция оксалата в мезофилле и кристаллоносная обкладка по жилке листа. Аналогичная ситуация наблюдается при анализе плодов. В измельченном и порошоканном сырье – листья, плоды яблони лесной наблюдаются отдельные разрозненные диагностические признаки, в своей совокупности, позволяющие идентифицировать сырье.

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ

Для проведения исследований химического состава плодов и листьев яблони лесной мы получали водные и водно-спиртовые извлечения. С полученными извлечениями проводились качественные реакции для идентификации основных

групп БАВ (флавоноидов, дубильных веществ, полисахаридов, аскорбиновой кислоты, фенолкарбоновых кислот, арбутина и аминокислот).

Качественный анализ извлечений из листьев и плодов яблони лесной, проводимый методом ТСХ в экспериментально отобранных системах растворителей позволил осуществить идентификацию арбутина, флавоноидов, органических кислот, фенолкарбоновых кислот и аскорбиновой кислоты. Отличий в количестве зон адсорбции БАВ на хроматограммах свежих, замороженных и высушенных листьев и плодов не наблюдали. Присутствие арбутина и флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ было подтверждено также методом ВЭЖХ, в ходе которого были определены следующие соединения при 280 нм (арбутин, изорамнетин-3-галактозид, кверцитин-3-глюкозид, кверцитин-3-рутинозид, флоридзин, флоретин, кверцитин) и 370 нм (кофейная кислота, галловая кислота, цикоревая кислота, катехин, эпикатехин, хлорогеновая кислота, виценин, неохлорогеновая кислота, рутин, кумарин, эллаговая кислота, кверцитин, флоретин, флоридзин, коричная кислота, апигенин. Общий вид хроматограмм представлен на рисунках 9,10. Условия анализа: Колонка Kromasil C18 размером 4,6 x 250 мм, размер частиц 5 мкм, используемая подвижная фаза метанол-вода-кислота фосфорная концентрированная (400:600:5) в условиях изократического элюирования. Анализ осуществляли при комнатной температуре при скорости подачи элюента 0,8 мл/ мин. Продолжительность анализа 70 мин. Детектирование проводилось с использованием УФ-детектора «GILSTON» UV/VIS МОДЕЛЬ 151

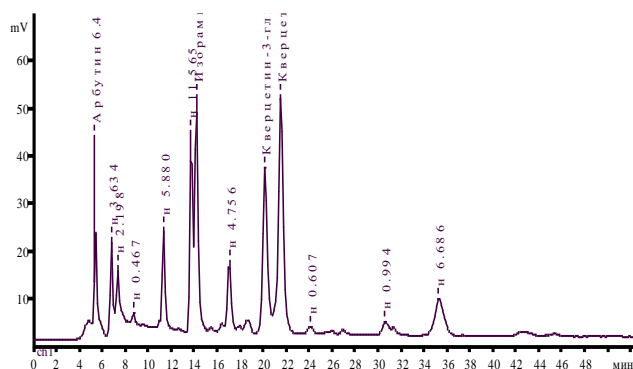


Рис 9. – Хроматограмма спиртового извлечения из листьев яблони лесной методом ВЭЖХ. При 280 нм. Времена удерживания (мин): арбутин (5,27); изорамнетин-3-гал(14,09); кверцитин-3-глюк(20,07); кверцитин-3-рутинозид (21,45); флоридзин (24,09); флоретин (30,53); кверцитин (35,22)

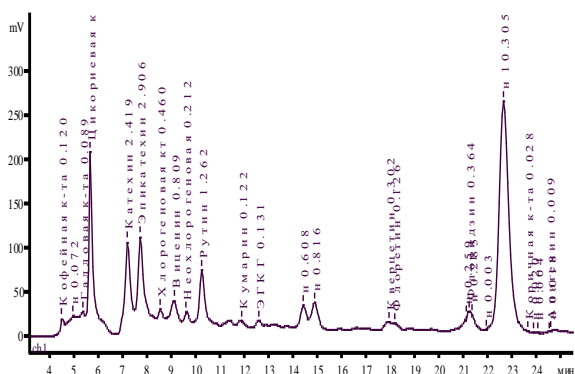


Рис. 10– Хроматограмма спиртового извлечения из листьев яблони лесной методом ВЭЖХ при 370 нм. Времена удерживания (мин): кофейная кислота (4,46); галловая кислота (5,317); цикоревая кислота (5,62); катехин (7,16); эпикатехин (7,69); хлорогеновая кислота (8,51); виценин (9,06); неохлорогеновая кислота (9,59); рутин (10,22); кумарин (11,84); эллаговая (12,56); кверцитин (17,90); флоретин (18,14); флоридзин (21,22); коричная кислота (23,65); апигенин (24,49)

С использованием аминокислотного анализа был установлен состав аминокислот листьев и плодов яблони лесной, представленный глутаминовой, аспарагиновой кислотами, глицином, пролином, серином, аланином, лизином, лейцином, валином, треонином, аргинином, изолейцином, гистидином, метионином, тирозином, фенилаланином. При изучении состава полисахаридного комплекса нами установлено присутствие в нем пектина.

Анализ основных групп БАВ в сырье проводили по фармакопейным методикам. Определение данных групп БАВ осуществляли для свежих, замороженных и высушенных образцов сырья. Результаты количественного определения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание БАВ в исследуемых листьях и плодах яблони лесной

Исследуемое ЛРС		Содержание %					Аскорбиновая кислота
		Полисахариды	Органические кислоты	Арбутин	Дубильные вещества	Флавоноиды	
Листья Яблони Лесной (Инстринский район)	свежие	5,34	1,51	3,89	9,57	2,51	0,12
	Замороженные	5,20	1,35	3,54	9,23	2,31	0,10
	Высушенные	4,87	0,98	2,38	7,25	1,15	0,07
Листья Яблони Лесной (Чеховский район)	свежие	5,22	1,48	4,02	9,64	2,48	0,11
	Замороженные	5,15	1,29	3,68	9,37	2,15	0,10
	Высушенные	4,77	0,96	2,51	7,40	1,05	0,06

Плоды Яблони Лесной (Инстринский район)	свежие	12,68	6,71	1,16	5,01	0,94	0,32
	Замороженные	12,38	5,45	1,07	4,67	0,71	0,30
	Высушенные	11,78	4,30	0,85	3,98	0,21	0,11
Плоды Яблони Лесной (Чеховский район)	свежие	12,55	6,34	1,09	4,74	0,92	0,30
	Замороженные	12,15	5,21	0,93	4,20	0,68	0,29
	Высушенные	11,65	4,15	0,76	3,78	0,20	0,12

Анализируя экспериментальные данные по содержанию полисахаридов, органических кислот, дубильных веществ, арбутина, флавоноидов, аскорбиновой кислоты в свежих, высушенных и замороженных листьях и плодах яблони лесной, следует отметить, что максимальное содержание изучаемых групп БАВ в свежем сырье. Так, замораживание листьев яблони лесной привело к снижению суммарного содержания полисахаридов, составившему 1,3-2,6 %, снижение содержания органических кислот составило 10,6-12,8%, потеря содержания дубильных веществ составила 2,8- 3,5%, флавоноидов 8,0-13,3%, арбутина 8,4-9,0%. Анализ замороженных плодов яблони лесной показал также снижение содержания полисахаридов, составившему 2,4-3,2 %, снижение содержания органических кислот составило 17,8-18,9%, потеря содержания дубильных веществ составила 6,8-11,4%, флавоноидов 24,4-26,1%, арбутина 7,8%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ПЛОДОВ И ЛИСТЬЕВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ

Для стандартизации и оценки качества плодов и листьев яблони лесной были определены следующие показатели: влажность, зола общая, зола, нерастворимая в 10% HCl, экстрактивные вещества, извлекаемые водой, экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом, определение содержания флавоноидов и проведена оценка микробиологической чистоты. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Определение числовых показателей и микробиологической частоты в плодах и листьях яблони лесной

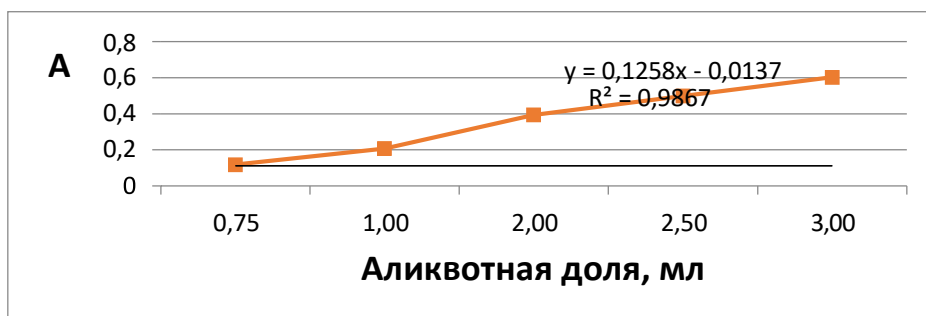
Анализ	Показатели	Содержание	
		Листья яблони лесной, %	Плоды яблони лесной, %
Числовые показатели	Влажность	9,70 – 10,80	14,2 – 15,9
	Зола общая	2,80 – 3,10	3,50 – 3,80
	Зола, нерастворимая в 10% HCl	0,80 – 1,10	1,5 – 1,9
	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	17,40 – 18,10	32,8 – 34,5
	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом	19,82 – 21,40	23,3 – 25,3
	Содержание флавоноидов	1,05-2,51	0,20 – 0,94
Микробиологическая чистота	Аэробные бактерии	$1,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
	Дрожжевые и плесневые грибы	$0,9 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
	<i>Escherichia coli</i>	Отсутствует	Отсутствует
	Семейства Enterobacteriaceae	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Salmonella</i>	Отсутствует	Отсутствует

Полученные данные были использованы для нормирования числовых показателей в разрабатываемой нормативной документации на исходное лекарственное растительное сырье.

Учитывая данные о широком спектре фармакологического действия веществ флавоноидной природы, а также учитывая их достаточно высокое содержание в исследуемых объектах, стандартизацию листьев и плодов яблони лесной, на наш взгляд целесообразно проводить по суммарному содержанию флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом с применением общеизвестной реакции комплексообразования с алюминия хлоридом. В качестве стандарта применялся ГСО рутин (ФС 42-2508-87), максимум в спектре поглощения которого совпадал с максимумом в спектре извлечения из сырья. Линейность методики проверяли на пяти отобранных экспериментальных точках (значениях концентрации). Значение коэффициента корреляции, который

представляет собой критерий приемлемости линейности, составил 0,9867 (рис.11)

Рис. 11 Результат проверки линейности методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин



При выявлении повторяемости нами проводилось шесть параллельных измерений, после чего рассчитывалась величина стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения. Относительное стандартное отклонение составило 0,96% (не более 10%), что подтверждает прецизионность предлагаемой методики в условиях повторяемости эксперимента. Воспроизводимость методики проверяли два аналитика на трех исследуемых образцах в трех повторностях.

Правильность методики оценивали методом добавок путем добавления СО рутина, при этом относительное стандартное отклонение не превышает 5%, что подтверждает отсутствие систематической ошибки.

Данные по определению влажности, золы общей, золы, нерастворимой в 10% HCl, экстрактивных веществ, извлекаемых водой, экстрактивных веществ, извлекаемых 70% этиловым спиртом, проводились по известным фармакопейным методикам.

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА БАВ ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ И ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИХ КАЧЕСТВА

Проведенные исследования доказывают перспективность получения экстракционных препаратов из сырья яблони лесной. Анализ водных извлечений, полученных по фармакопейной методике, осуществляли по содержанию тех же групп БАВ, которые оценивались при изучении листьев и плодов яблони лесной. В

ходе исследования выявлено, что все отобранные группы веществ переходят в водные извлечения из листьев и плодов. НГМ из листьев, плодов яблони лесной получали в соответствии с требованиями ОФС42-0008-02 «Настойки гомеопатические матричные», показатели качества которых представлены в таблице 3.

Таблица 3. Количественное содержание БАВ в настойках матричных гомеопатических из листьев и плодов яблони лесной.

Объекты исследования	Органические кислоты, %	Аскорбиновая кислота, мг/100г	Флавоноиды, мг/100г	Дубильные вещества, %	Полисахариды, %
Настойка матричная из свежих плодов	0,45±0,06	23,17±0,05	15,40±0,04	0,48±0,03	0,43±0,05
Настойка матричная из замороженных плодов	0,40±0,04	21,09±0,02	13,74±0,02	0,46±0,02	0,46±0,03
Настойка матричная из высушенных	0,11±0,03	4,21±0,03	7,23±0,02	0,14±0,02	0,23±0,05
Настойка матричная из свежих листьев	0,31±0,04	6,15±0,03	17,32±0,02	1,24±0,03	0,30±0,06
Настойка матричная из замороженных листьев	0,27±0,07	4,25±0,01	15,34±0,05	1,23±0,02	0,33±0,04
Настойка матричная из высушенных	0,05±0,02	0,25±0,05	10,45±0,04	0,87±0,04	0,16±0,05

Учитывая литературные данные, а также опыт применения НГМ плодов яблони лесной в Европе, нами были проведены исследования антимикробной активности сырья и НГМ методом диффузии в агар на плотной питательной среде. Результаты анализа были использованы при оформлении патента на изобретение (Патент №2639119 Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью. Нестерова Н.В, Самылина И.А., дата Гос. Регистрации 19.12.2017)

Общие выводы

1. Проведено информационно-аналитическое изучение научной литературы и патентной документации, необходимой для создания современных требований к качеству листьев, плодов яблони лесной разных видов консервации.
2. Проведен анализ анатомо-морфологического строения цельного и измельченного ЛРС - плоды и листья яблони лесной свежих, замороженных и высушенных, на основании

которого установлены основные диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию данного сырья и подготовлены рекомендации для включения в раздел «Определение подлинности», планируемой НД.

3. Проведено определение качественного состава и количественного содержания основных БАВ (флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, суммарного содержания полисахаридов и пектинов, арбутина) в листьях и плодах яблони лесной свежих, замороженных и высушенных; разработаны и апробированы методики подтверждения подлинности и оценки количественного содержания флавоноидов, содержание которых составило в свежих листьях до 2,51%, в замороженных листьях до 2,31%, в высушенных листьях до 1,15%, в свежих плодах до 0,94%, в замороженных плодах до 0,71%, в высушенных плодах до 0,21% и арбутина в свежих листьях до 4,02%, в замороженных листьях до 3,68%, в высушенных листьях до 2,51%, в свежих плодах до 1,16%, в замороженных плодах до 1,07 %, в высушенных плодах до 0,85%.
4. Проведено определение показателей качества плодов и листьев яблони лесной, установлены их нормы для включения в разрабатываемую НД. Учитывая подходы к анализу качества пищевого сырья, для плодов яблони лесной определен ряд технических характеристик, включая количественную оценку содержания пектина в сырье, а также определены показатели качества полученного нами пектина в сравнении с пектином яблочным, пищевым.
5. Изучено влияние используемого способа консервации листьев и плодов яблони лесной на показатели качества экстракционных препаратов на их основе. Выявлено, что содержание действующих веществ снижается незначительно при использовании высушенного сырья по сравнению с аналогичными показателями экстракционных препаратов из свежих и замороженных плодов и листьев.
6. Проведен анализ НГМ, полученных из свежих, замороженных, высушенных листьев и плодов яблони лесной, в ходе которого было подтверждено соответствие качественного состава НГМ и исходного сырья, а также осуществлено количественное определение органических кислот, аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ и полисахаридов.
7. Изучена антимикробная активность извлечений (настой, настойка и жидкий экстракт) из листьев, плодов яблони лесной. Установлено, что все изучаемые извлечения из листьев и плодов яблони лесной проявляют антимикробное действие в отношении 8 штаммов микроорганизмов. При этом, все исследуемые извлечения из листьев яблони лесной показывают достоверно более высокие результаты антимикробной активности, по сравнению с аналогичными извлечениями из плодов. На основании проведенных

исследований получен Патент №2639119 Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью.

Практические рекомендации

Результаты исследования расширяют спектр представлений о представителях рода *Malus* и позволяют эффективно и рационально использовать в медицине и фармацевтической практике новое ЛРС – листья и плоды яблони лесной. Разработанные в ходе исследований подходы к стандартизации сырья могут быть использованы в учебном процессе по курсу «Фармакогнозия» для высших учебных заведений, в элективном курсе естественно-научных дисциплин в РЦ «МСП». Особо важным представляется, приводимое автором научное обоснование введения в отечественную номенклатуру листьев, плодов яблони лесной, что позволит расширить ассортимент российского ЛРС.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенные исследования могут использоваться для последующего совершенствования методов определения подлинности и доброкачественности листьев, плодов яблони лесной и разрабатываемых препаратов на их основе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Нестерова, Н.В.** Изучение антиокислительной активности липидного комплекса семян яблони [Текст] / **Н.В. Нестерова, И.А. Самылина, А.А. Матюшин** // Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации: сб. мат. республиканской науч.-практ. конф. (с международным участием) (Ташкент, 10 ноября) / редкол.: Н.Т.Фарманова [и др.] – Ташкент, 2013. – С.116-118.
2. **Нестерова, Н.В.,** Абизов Е.А. Изучение сорбционной способности и фитохимический анализ жома плодов яблони лесной и домашней [Текст] / **Н.В. Нестерова, Е.А. Абизов** // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2015. – №4. – С.40-47.
3. Самылина И.А., **Нестерова Н.В.** Исторический опыт и перспективы использования сырья яблони в медицине и фармации [Текст] / И.А. Самылина, **Н.В. Нестерова** // **Здоровье и образование в XXI веке.** – 2015. – №4(17). – С. 251-258.
4. **Нестерова, Н.В.** Фитохимическое обоснование перспектив использования порошка жома плодов яблони домашней зимних сортов созревания [Текст] / **Н.В. Нестерова, Е.А. Абизов** // **Здоровье и образование в XXI веке.** – 2015. – Т.17. – №1. – С. 90-94.
5. **Нестерова, Н.В.** Разработка показателей подлинности и доброкачественности жома плодов яблони [Текст] / **Н.В. Нестерова** // Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации: сб. мат. республиканской науч.-практ. конф. (с международным участием) (Ташкент, 12 ноября) / редкол.: Н.Т.Фарманова [и др.] – Ташкент, – 2015. – С. 56-58.
6. **Нестерова, Н.В.** Изучение качественного состава и показателей качества листьев яблони лесной и домашней [Текст] / **Н.В. Нестерова, И.А. Самылина.** // **Здоровье и образование в XXI веке.** – 2016. – №5. – Т. 18. – С. 251-258.
7. **Нестерова, Н.В.** Перспективы использования лекарственного растительного сырья

- Malus Sylvestris* в гомеопатии [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Развитие гомеопатического метода в современной медицине: сб. мат. XXVI Московской международной гомеопатической конференции. – Новосибирск: «Гомеопатическая книга», 2016. – С.159-160.
8. **Нестерова, Н.В.** Изучение адсорбционной способности и возможности совершенствованная рецептуры коктейлей для здорового питания Magic of life [Текст] / **Н.В. Нестерова** // Инновационные технологии в науке и образовании: сб. мат. VII Междунар. науч.-практ. конф. (Чебоксары, 24 июля 2016 г.) / редкол.: О.Н. Широков [и др.] – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2016. – С. 27-31.
9. **Нестерова, Н.В.** Анатомо-диагностические признаки жома и порошка жома плодов яблони лесной *Malus Sylvestris L.* и домашней *Malus Domestica Borkh* [Текст] / **Н.В. Нестерова** // Инновационные технологии в науке и образовании: сб. мат. VI Междунар. науч.-практ. конф. (Чебоксары, 19 июня 2016 г.) / редкол.: О.Н. Широков [и др.] – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2016. – С. 92-95.
10. **Нестерова, Н.В.** Идентификация арбутина в листьях яблони домашней и лесной [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации: сб. мат. республиканской науч.-практ. конф. (с международным участием) (Ташкент, 16 ноября) / редкол.: Н.Т. Фарманова [и др.] – Ташкент, 2017. – С. 64-65.
11. **Нестерова, Н.В.** Изучение зависимости количественного содержания биологически активных веществ листьев яблони лесной и домашней от способов консервации [Текст] // **Здоровье и образование в XXI веке.** – 2017. – Т. 19. – №8. – С.206-209.
12. Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью [Текст]: пат. №2639119 РФ, МПК А61 К 36/73. / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. - №2017111502; заявл. 05.04.2017; опубл. 19.12.2017, Патент. – 2017. – №35.
13. **Нестерова, Н.В.** Разработка показателей качества настойки гомеопатической матричной плодов яблони лесной [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Развитие гомеопатического метода в современно медицине: сб. мат. XXVII Московской международной гомеопатической конференции. – Новосибирск: «Гомеопатическая книга», 2017. – С.130-131.
14. **Нестерова, Н.В.** Влияние способа консервации на содержание биологически-активных веществ плодов яблони [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // **Фармация.** – 2017. – Т.66. – №3. – С.24-26.
15. **Нестерова, Н.В.** Идентификация фенольных соединений в листьях яблони лесной (*Malus sylvestris Mill.*) [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: сб. мат. V науч.-практ. конф. (Москва, 15 марта 2017) / под ред. чл.-корр. РАН, проф. И.А. Самылиной, доц. А.Н. Луферова; Ин-т фармации и трансляционной медицины, Первый Мос. гос. мед. ун-т им. И.М. Сеченова. – М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2017. – С.158-161.
16. **Нестерова, Н.В.** Сравнительная оценка суммарного содержания дубильных веществ в листьях яблони лесной и домашней зимних сортов [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Научные исследования: теория, методика и практика: материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Чебоксары, 21 мая 2017 г.). В 2 т. Т. 1 / редкол.: О.Н. Широков [и др.] – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2017. – С. 94-96.
17. **Нестерова, Н.В.** Влияние условий экстракции на выход фенольных соединений листьев яблони лесной и домашней [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Научные исследования: векторы развития: материалы Междунар. науч.–практ. конф. (Чебоксары, 24 июня 2017 г.) / редкол.: О.Н. Широков [и др.] – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2017. – С. 11-14.
18. **Нестерова, Н.В.** Идентификация арбутина в листьях яблони разных сортов [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // **Фундаментальные и прикладные исследования науки XXI века. Шаг в будущее: сборник научных статей по итогам междунар. науч.-практ. конф.** (Санкт-Петербург, 06-07 июля 2017 г.). - СПб.: Культ-Информ-пресс, 2017. – С. 174-175
19. **Нестерова, Н.В.** Определение арбутина в лекарственном растительном сырье [Текст]

- / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // **Фармация**. – 2018. – Т. 67. – №3. – С. 21-25.
20. **Нестерова, Н.В.** Разработка потенциометрического метода определения дубильных веществ настойки матричной гомеопатической плодов яблони лесной [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина // Развитие гомеопатического метода в современной медицине: сб. мат. XXVIII Московской международной гомеопатической конференции. – Новосибирск: «Гомеопатическая книга», 2018. – С.149-150.
21. **Нестерова, Н.В.** Формирование естественно-научного мышления учащихся на примере открытого урока «Сравнительный анализ плодов яблони лесной и домашней [Текст] / **Н.В. Нестерова**, А.В. Аглушевич, Н.В. Бирюкова // Сб. науч. статей «Признание года 2018». – Пенза: «Наука и Просвещение», 2018. – С. 83-87.
22. **Нестерова, Н.В.** Сравнительный анализ содержания пектина в плодах яблони ягодной, яблони лесной и рябины черноплодной [Текст] / **Н.В. Нестерова**, П.Р. Полковников // World science: problems and innovations: сб. статей XXIII Междунар. науч.-практ. конф. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2018. – С. 268-271.
23. **Нестерова, Н.В.** Идентификация ионов железа в фармакопейной прописи «Экстракт железа яблочнокислое», полученного из плодов яблони лесной и домашней [Текст] / **Н.В. Нестерова**, О.В. Нестерова, А.В. Аглушевич // Наука, образование, общество: тенденции и перспективы развития: материалы IX Междунар. науч.-практ. конф. (Чебоксары, 12 февр. 2018 г.) / редкол.: О.Н. Широков [и др.] – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2018. – С. 61-63.
24. Рогачкова Е.И. Анализ современного состояния методов контроля качества нитритов и нитратов в плодах яблони разных сортов [Текст] / Е.И. Рогачкова, **Н.В. Нестерова**, А.В. Аглушевич, Н.В. Бирюкова // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации: сб. статей XVI Междунар. науч.-практ. конф. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2018. – С. 237-241.
25. **Нестерова, Н.В.** Количественное определение гидроксикоричных кислот и анализ динамики их накопления в листьях яблони лесной [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина, Бобкова Н.В., Кузьменко А.Н., И.И. Краснюк (мл.) // **Вестник московского университета. серия 2: химия ИФ**. – 2019. – Т. 60. – № 1. – С.60-64.
26. **Нестерова, Н.В.** Количественное определение арбутина в листьях яблони лесной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина, А.Н. Кузьменко, И.А. Кузьменко, И.И. Краснюк (мл.), А.А. Евграфов // **Вестник московского университета. серия 2: химия ИФ**. – 2019. – Т. 60. – № 1. – С.55-59.
27. **Нестерова, Н.В.** Сравнительный анализ микроэлементного состава яблони лесной и домашней методом рентгенофлуоресцентного анализа [Текст] / **Н.В. Нестерова**, И.А. Самылина, С.В. Кондрашев // **Здоровье и образование в XXI веке**. – 2019. – Т. 21. – № 1. – С. 80-85.