

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Воронежский государственный
университет»

На правах рукописи

Логвинова Елизавета Евгеньевна
ИССЛЕДОВАНИЕ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ПЛОДОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Сливкин Алексей Иванович

Воронеж – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Род Арония (<i>Aronia Pers.</i>)	15
1.1.1. Рябина черноплодная как лекарственное растение	15
1.1.2. Арония черноплодная Викинг – <i>Aronia melanocarpa</i>	
 <i>Viking</i> (гибрид аронии Мичурина)	17
1.1.3. Арония черноплодная Вениса – <i>Aronia melanocarpa Venisa</i>	17
1.1.4. Арония черноплодная Алтайская крупноплодная – <i>Aronia</i>	
 <i>melanocarpa</i>	18
1.1.5. Арония черноплодная Мичуринская – <i>Aronia melanocarpa</i>	19
1.1.6. Химический состав плодов аронии черноплодной	19
1.2. Флавоноиды	20
1.2.1. Физико-химические свойства флавоноидов	21
1.2.2. Выделение флавоноидов из растительного материала	22
1.2.3. Методы исследования флавоноидов	23
1.2.4. Количественное определение флавоноидов	24
1.3. Дубильные вещества	25
1.3.1. Физико-химические свойства дубильных веществ	27
1.3.2. Выделение, методы исследования дубильных веществ и их	
 применение в медицине	27
1.4. Органические кислоты	29
1.5. Аскорбиновая кислота	31
1.6. Антоцианы	33
1.6.1. Химическое строение и свойства антоцианов	34
1.6.2. Физико-химические свойства антоцианов	35

1.6.3. Фармакологическая активность антоцианов	38
1.6.4. Выделение антоцианов из растительного сырья	39
1.7. Методы определения антоцианов в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах	42
1.7.1. Химические методы идентификации	42
1.7.2. Хроматографические методы определения антоцианов	43
1.7.3. Газовая хроматография	44
1.7.4. Масс-спектрометрия	44
1.7.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография	45
1.7.6. Спектрофотометрия в УФ-, ИК- и видимой области спектра в анализе Антоцианов	45
1.8. Методы количественного определения антоцианов	48
1.9. Лекарственные препараты из лекарственного растительного сырья	49
1.9.1. Настой	49
1.9.2. Настойка	50
1.9.3. Экстракты. Жидкие экстракты	51
1.9.4. Биологическая активность фитопрепаратов плодов Рябины черноплодной	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1 Объекты исследования	55
2.2 Методы исследования	55
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2	58
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ	59
3.1. Изучение антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной хроматографическими методами	60
3.1.1. Изучение антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной	

методом тонкослойной хроматографии	61
3.1.2. Изучение антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной	
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.	62
3.2. Изучение флавоноидов плодов Рябины черноплодной методом	
тонкослойной хроматографии	64
3.3. Изучение органических кислот плодов Рябины черноплодной методом	
тонкослойной хроматографии	65
3.4. Изучение дубильных веществ плодов Рябины черноплодной методом	
тонкослойной хроматографии	67
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	70
ГЛАВА 4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП	
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ РЯБИНЫ	
ЧЕРНОПЛОДНОЙ	71
4.1. Определение суммы антоциановых соединений в плодах Рябины	
черноплодной	71
4.1.1. Подбор оптимальных условий извлечения антоцианов из	
растительного сырья	71
4.1.2. Определение суммы антоциановых соединений в плодах аронии	
черноплодной	76
4.1.3. Расчет основных параметров валидации	77
4.1.4. Исследование возможности интенсификации процесса	
экстрагирования суммы антоциановых соединений из плодов	
рябины черноплодной	81
4.2. Определение суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в	
растительном сырье Рябины черноплодной ...	86
4.3. Определение суммы органических кислот растительном сырье Рябины	
черноплодной	87
4.4. Определение суммы дубильных веществ растительном сырье Рябины	
черноплодной	90

4.5. Влияние различных способов консервации на содержание БАВ в сырье	91
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	95
ГЛАВА 5. АНАЛИЗ МИКРО- И МАКРОЭЛЕМЕНТОВ, ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ПЕСТИЦИДОВ И РАДИОНУКЛИДОВ В ПЛОДАХ ИССЛЕДУЕМЫХ СОРТОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ	97
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	101
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ СЫРЬЯ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ	102
6.1. Изучение характеристик подлинности плодов Рябины черноплодной.	102
6.1.1. Характеристика внешних признаков плодов Рябины черноплодной.	102
6.2. Изучение микроскопических признаков подов Рябины черноплодной	103
6.3. Определение некоторых числовых показателей сырья Рябины черноплодной	114
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	116
ГЛАВА 7. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПЛОДОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПОДНОЙ	118
7.1. Получение лекарственных форм и количественное определение некоторых групп БАВ	118
7.2. Стандартизация жидкого экстракта (1:1)	122
7.3. Изучение фармакологической активности препаратов Рябины черноплодной	124
7.3.1. Изучение мембранстабилизирующей активности лекарственных форм плодов Рябины черноплодной	124

7.3.2 Изучение антиоксидантной активности лекарственных форм на основе лекарственного растительного сырья Рябины черноплодной	129
7.3.3. Изучение антитоксического действия лекарственных форм на основе лекарственного растительного сырья Рябины черноплодной	130
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7	132
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	137
ПРИЛОЖЕНИЕ №1	156

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛРС- лекарственное растительное сырье

БАВ- биологически активные вещества

ГФ – государственная фармакопея

ТСХ- тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолетовый

АОА – антиоксидантная активность

I_{БА} – индекс биологической активности

СФ – спектрофотометрия

ВЭЖХ – высоко-эффективная жидкостная хроматография

МС – масс-спектрометрия

ФС – фармакопейная статья

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и практическая значимость. Известно, что природные биологически активные соединения имеют целый ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с субстанциями химического происхождения. В связи с этим особую актуальность представляет изучение лекарственных растений, содержащих комплексы природных БАВ с различной фармакологической активностью.

Одним из растений, содержащих богатейший комплекс различных биологически активных веществ, является Рябина черноплодная (*Aronia melanocarpa*). Это растение, плоды которого являются лекарственным сырьем, в то же время достаточно активно используется в пищевой промышленности.

В медицинских целях используют высушенные плоды Аронии, проявляющие спазмолитическую, сосудорасширяющую, гипотензивную, антиоксидантную, гемостатическую активность, обусловленную присутствием в составе флавоноидов, антоцианов, дубильных веществ и органических кислот.

В связи с этим, разработка методик и определение данных групп БАВ в плодах аронии является актуальной.

Благодаря своей неприхотливости и зимостойкости арония черноплодная интродуцирована почти во всех экологогеографических районах России, она дает стабильные урожаи в северных районах европейской части, в суровых условиях Западной и Восточной Сибири, Восточного Казахстана и Урала.

В разных регионах выращивают и заготавливают определенные районированные сорта аронии. В виду этого, перед разработкой НД на плоды рябины черноплодной, целесообразным являлось проведение сравнительного

анализа различных сортов аронии по микродиагностическим признакам, а также по качественному и количественному составу основных групп биологически активных веществ с целью выявления возможности унификации разрабатываемых методик стандартизации плодов аронии, а также их зависимости от места произрастания и сортовых особенностей.

Целью настоящего исследования является разработка методик стандартизации плодов аронии по доминирующим группам БАВ, получение и выбор рациональных лекарственных форм плодов аронии (получение аронии экстракта жидкого) и их стандартизация.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- провести аналитический обзор литературы по фитохимическим и фармакологическим исследованиям плодов рябины;
- провести поиск оптимальных условий микроскопического анализа свежесобранных и высушенных плодов аронии черноплодной;
- исследовать химический состав плодов рябины черноплодной и полученного из нее экстракта жидкого на наличие отдельных групп БАВ;
- разработать методики качественного и количественного анализа доминирующей группы БАВ плодов рябины черноплодной - антоциановых соединений в лекарственном растительном сырье;
- провести сравнительный анализ плодов различных сортов аронии по микродиагностическим признакам, а также по качественному и количественному составу основных групп биологически активных веществ
- изучить оптимальные условия экстракции БАВ плодов рябины черноплодной и разработать способ получения плодов аронии экстракта жидкого;
- провести стандартизацию полученной лекарственной формы по содержанию основных групп БАВ, физико-химическим, микробиологическим показателям;
- провести стандартизацию плодов аронии экстракта жидкого, установить оптимальные условия и сроки хранения плодов аронии экстракта жидкого;

Научная новизна результатов исследования.

Доказано различие качественного состава высушенных плодов аронии черноплодной различных сортов.

Установлены отличия в количественном содержании антоцианов, флавоноидов, дубильных веществ, органических кислот в плодах аронии различной сортовой принадлежности.

Показано, что сортовые особенности напрямую связаны с климатическими условиями и типом почв, на которых произрастает ЛРС. По содержанию доминирующих групп БАВ исследуемые плоды имеют отличия, причем наиболее богатым антоцианами является сорт «Мичуринская», флавоноидами - сорт «Викинг», хотя отличия от других сортов в данном случае невелики. Сорта «Мичуринская» и «Вениса» лидируют по содержанию дубильных веществ, органических кислот и аскорбиновой кислоты.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости контроля содержания в сырье доминирующих групп БАВ.

Теоретическая значимость работы. Использование современных

физико-химических методов анализа позволило получить новые данные о качественном составе БАВ высушенных плодов рябины черноплодной различных сортов и дать количественную оценку их содержания. Экспериментально-практический материал, представленный в работе, может служить теоретической основой для разработки показателей качества указанного вида сырья и установления их норм, а также для получения и стандартизации лекарственных средств на их основе.

Практическая значимость результатов исследования.

В виду того, что в настоящее время наибольшее предпочтение отдается фито препаратам на основе ЛРС, расширение сырьевой базы является весьма актуальным.

Так как рябина черноплодная обладает широким спектром фармакологической активности, данное ЛРС можно считать пригодным для медицинского применения.

Выявленные отличия в качественном и количественном составе БАВ плодов аронии различных сортов позволяют высказать предположение о возможных различиях в биохимических показателях растения в зависимости от сортовых особенностей и условий произрастания. Таким образом, исследования с целью выбора оптимального сорта для расширения сырьевой базы и создания новых фитопрепаратов с целью дальнейшего медицинского использования можно считать перспективными и актуальными.

Методология и методы исследования.

Методология исследования построена на анализе и обобщении литературных данных, оценке степени разработанности и актуальности темы, постановке цели и задачи исследования по изучению состава БАВ высушенных плодов рябины черноплодной различных сортов, сравнительном анализе качественного и количественного состава БАВ, получении и анализе водных и водно-спиртовых извлечений из плодов аронии различных сортов. В ходе исследования были использованы следующие методы анализа: тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-спектрофотометрия, титриметрия, капиллярный электрофорез, математические методы анализа и обработки результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты выбора оптимальных условий для проведения микродиагностического анализа высушенных плодов рябины черноплодной различных сортов;
- результаты сравнительного изучения химического состава биологически активных веществ высушенных плодов рябины черноплодной различных сортов (антоцианы, флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты);

- результаты изучения показателей качества и химического состава БАВ лекарственных препаратов из высушенных плодов рябины черноплодной (настой, настойка, жидкий экстракт);
- результаты изучения антиоксидантной активности водных и водно-спиртовых извлечений высушенных плодов рябины черноплодной.

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

Апробация диссертации. Результаты работы доложены на 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование – 2013 (Воронеж, 2013); Первой международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации»-2013 (Казахстан, г. Шымкет 2013); 2-й научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2014); Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина (г. Чебоксары, 2014); 4-й международной научно-практической конференции «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства» (г. Белгород, 2014); научно-практической конференции с международным участием «Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике» (г. Ярославль, 2014); XIV Конференции и Третьего Всероссийского симпозиума с международным участием (г. Воронеж, 2014); VI Международная научная конференция «Science4health» (г. Москва, 2015); 5-й международной научно-практической телеконференции

«Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства» (г. Белгород, 2015); 3-й научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2015); VII Всероссийской конференции «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах — ФАГРАН-2015» (г. Воронеж, 2015), 4-й научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2016); 6-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование – 2016 (Воронеж, 2016).

Апробация диссертации состоялась 6 апреля 2015 года на совместном заседании кафедр: управления и экономики фармации и фармакогнозии, фармакологии, фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведен мониторинг основных параметров качества лекарственного растительного сырья, аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения их в практику.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

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

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (протоколы заседания Ученого совета факультета за период с 2013 по 2016гг). Тема включена в планы научных исследований кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии «Фитохимический анализ лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов» (протокол заседаний кафедры за период с 2013 по 2016гг).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 35 таблиц и 32 рисунок. Работа состоит из введения, обзора литературы, 5 экспериментальных глав, выводов, списка литературы из 152 наименований, из которых 40 на иностранных языках.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 23 научных работы, из них 7 статей в журналах, входящих в перечень ВАК, 16 тезисов докладов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Род Арония (*Aronia Pers.*)

Название Рода арония исходит от древнегреческого наименования рябины арии, в свою очередь происходящего от греческого слова, означающего «польза», «помощь».

Род, близкий к роду Рябины (*Sorbus*). Отличается дельными, ланцетными, яйцевидными или обратно-яйцевидными, по краям городчатými, листьями, с черноватыми желёзками по центральной жилке, многочисленными тычинками в цветках и плодами без твердых стенок гнезд. Род содержит 15 видов, произрастающих преимущественно в умеренном поясе Северной Америки. В России в культуре 3 вида: *A. арбутолистная* — *A. arbutifolia* (L.) Elliot; *A. сливолистная* — *A. prunifolia* (March.) R e h d. и *A. черноплодная*—*A. melanocarpa* (M i s h x.) Elliot. Наибольшую ценность и наибольшее распространение имеет последний вид.

1.1.1 Рябина черноплодная как лекарственное растение

Арония – это растение с богатой историей, которое берет свое начало из североамериканских болот, песчаных равнин и крутых скал.

Родина аронии – Северная Америка, где она произрастает в диком виде. В начале XVIII века эта рябина была завезена в Европу, а через 100 лет попала в Россию, где ее районировали как декоративную культуру [152].

Как плодовую культуру первым высоко оценил черноплодную рябину И.В. Мичурин, который рекомендовал ее для северных районов плодоводства [152]. К 1946 г. рябины черноплодная была уже районирована в различных природно-климатических зонах Алтая. В 1975 г. данная рябина была районирована в 29 областях и автономных республиках европейской и сибирской частей СССР. В

настоящее время эта культура выращивается от берегов Балтийского моря до Тихого океана.

Основное отличие аронии, происходящей из Северной Америки, от аронии, окультуренной И.В. Мичуриным, заключается в более привлекательном виде, более высокой урожайности и вкусовых качествах, зимостойкости [152].

В настоящее время селекционная работа с черноплодной рябиной ведется в основном за рубежом. В нашей стране районированных сортов нет, хотя культура включена в сортимент Госреестра РФ.

Рябина черноплодная является лекарственным растением, обладающим обширным рядом фармакологических свойств [17].

Питательные и лечебные свойства черноплодной рябины во многом зависят от серии факторов, таких как зона произрастания, сорт, погодные условия и степень зрелости плодов .

Свежие плоды назначают для профилактики Р-витаминной недостаточности, лечения гипертонической болезни I и II стадии и других заболеваний, сопровождающихся повышением артериального давления. Принимают по 100 г 3 раза в день; курс лечения 10-30 дней. Сок аронии черноплодной применяют в начальной стадии гипертонической болезни, при кровотечениях различного происхождения, при атеросклерозе, антацидных гастритах. Плоды аронии принимают при гепатитах, аллергиях, отравлениях. Плоды противопоказаны больным с повышенной свертываемостью крови, а также при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и гиперацидном состоянии желудка [111,153].

Лечебные свойства плодов аронии сохраняются и при их переработке.

Сок несброженный – *Succus Aroniae melanocarpae recens*. Отжимают на прессах; выход до 60% [122]. Содержание витамина Р около 0,5%. По химическому составу и применению сок сходен со свежими плодами.

Таблетки, получаемые из высушенного измельченного жома плодов – *Tabulettae Vitamini P ex fructibus Aroniae melanocarpae 0,05*. В исходном сухом жоме содержание витамина Р до 20% [48].

1.1.2 Арония черноплодная Викинг – *Aronia melanocarpa Viking* (гибрид аронии Мичурина)

Арония Викинг является результатом финской селекции [152].

Кустарник с многочисленными прямостоящими побегами, которые с возрастом слегка свисают вниз, образует многочисленную корневую поросль.

Листорасположение очередное, листья от эллиптических до широкоэллиптических, длиной 3-5,5 см, листовой черешок 0,5-0,7 см, края равномерно и очень красиво зазубрены, при распускании красновато-зелёные, затем тёмно-зелёные, шелковистые, осенняя окраска от светло-красной до винно- и тёмно-красной, со слабым опушением и белесоватым оттенком снизу, опадают в октябре.

Плоды сочные, кисло-сладкие с вяжущим вкусом. Сначала красные, затем пурпурно-чёрные, плоско-округлые, сплющены с боков, длиной 0,8-0,9 см, диаметром 0,7-0,8 см, съедобные, сладкие, созревают в сентябре, опадают после первых заморозков.

Сорт цветет в мае, белые цветы соединены в соцветия по 10-20 штук. Среди почв наиболее подходящими для сорта Викинг считаются суглинки и дерново-подзолистые почвы со слабокислой или нейтральной средой.

Светолюбива, но выносит полутень.

На одном месте может расти более 30 лет.

Сорт «Viking» - сорт высокоурожайный. Место посадки должно хорошо освещаться солнцем, возможна полутень.

Морозоустойчивость до минус 30°C.

Устойчива к городским условиям, ветроустойчива, не болеет.

1.1.3 Арония черноплодная Бениса – *Aronia melanocarpa Venisa*

Сорт белорусской селекции, выведенный Институтом плодоводства НАН Белоруссии. Сорт универсального назначения. В Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь включен в 2008 г [152].

Сорт Вениса зимостойкий, среднего срока созревания, самоплодный, урожайный. Устойчив к основным болезням и вредителям.

Куст среднерослый, среднераскидистый. Период вегетации – 190 дней. Вступает в плодоношение на 3-4 год после посадки в сад. Плодоношение регулярное.

Ягоды крупные, (1,3г) яблоковидной формы, черные с сизым восковым налетом, приятного сладко-кислого, слегка вяжущего вкуса, отличаются высоким содержанием фенольных соединений. Расположение ягод в щитке среднее, количество в щитке – 18 шт., одномерные. Созревание одновременное. Висят долго, не осыпаясь, отличаются высоким содержанием фенольных соединений. Ягоды приятного сладко-кислого, несколько вяжущего вкуса. Сорт универсального назначения.

1.1.4 Арония черноплодная Алтайская крупноплодная – *Aronia melanocarpa*

Кустарник с многочисленными прямостоячими побегами образует многочисленную корневую поросль.

Листорасположение очередное, листья от эллиптических до широкоэллиптических, края равномерно зазубрены, при распускании красновато-зеленые, затем темно-зеленые, осенняя окраска от светло-красной до темно-красной, опадают в октябре.

Плоды сочные, кисло-сладкие со слегка вяжущим вкусом. Сначала красные, затем пурпурно-черные, округлой формы, сплюсненные с боков. Опадают после первых заморозков. Данный сорт цветет в мае, белые цветы собраны в соцветия по 10-20 штук.

Зимостойкий сорт, самоплодный, урожайный. Устойчив к основным болезням и вредителям. Выдерживает морозы до минус 30-35 градусов [152].

1.1.5 Арония черноплодная Мичуринская – *Aronia melanocarpa*

Арония черноплодная Мичуринская (лат. *Aronia melanocarpa* Mithurina) – крупный кустарник высотой до 3 м. Листья очередные, широкоовальные, длиной 6-9 см и шириной 5-6 см, цельнокрайные, с черешками, летом ярко-зеленые, осенью краснеющие, приобретающие ярко-пурпурную окраску. Цветки собраны по 10-35 в соцветия щитки. Венчик белый, реже розоватый, диаметром до 1 см. Плоды шарообразные, диаметром до 1,5 см, черные с сизым налетом, реже темно-красные, сочные, сладкого, немного терпкого вкуса, с сильно красящей мякотью. Масса одного в среде 1,3 г. Начинает плодоносить рано – с 3-5-го года жизни. Цветет в мае, после распускания листьев. Плоды созревают в августе-сентября и не осыпаются до глубокой осени. Культура зимостойка, успешно растет в районах с зимними морозами до -36 °С. Размножаются семенами, отпрысками и отводками.

Арония черноплодная – это искусственно созданный вид, обязанный своим появлением Ивану Владимировичу Мичурину [152].

Лекарственным сырьем являются плоды.

Сушат плоды при температуре 60°C.

1.1.6 Химический состав плодов аронии черноплодной

Плоды аронии содержат до 9% сахаров, витамины и органические кислоты антоцианы, флаваноиды и т.д. По содержанию последних она превосходит мандарины, землянику, малину и красную смородину; по количеству каротина (2,3-3,2 мг / 100 г) уступают рябине обыкновенной. Присутствуют дубильные вещества, витамины В1, В6, Е, РР, органические кислоты (0,8%) Никотиновой кислоты в них содержится 0,4-0,6 мг/100 г, аскорбиновой кислоты - от 15 до 167 мг/100 г. Очень много в ягодах аронии Р-витаминных биофлавоноидов - катехинов, флавонолов, антоцианов (в среднем 1,5-2 %, а в некоторых сортах даже до 4-5%. Такого количества Р-витаминных веществ нет ни в одной плодово-ягодной культуре [34,35,36].

Количество минеральных веществ (зола) в плодах аронии составляет 1,85-2,97 (в пересчете на сухое вещество). В ней содержится 78-92 мг/100 г фосфора, 4-8 мг/100 г железа, 0,3-0,8 мг/100 г меди, 2,6 мг/100 г марганца, 0,06 мг/100 г кобальта (в пересчете на сухое вещество целых плодов с семенами). Йода в аронии в 2-3 раза больше, чем в других плодах и ягодах (0,005-0,01 мг/100 г). Столько же йода имеют лишь хурма и красная смородина.

Особый интерес в изучении химического состава плодов аронии черноплодной представляют такие группы биологически активных веществ как антоцианы, флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты и аскорбиновая кислота.

1.2 Флавоноиды

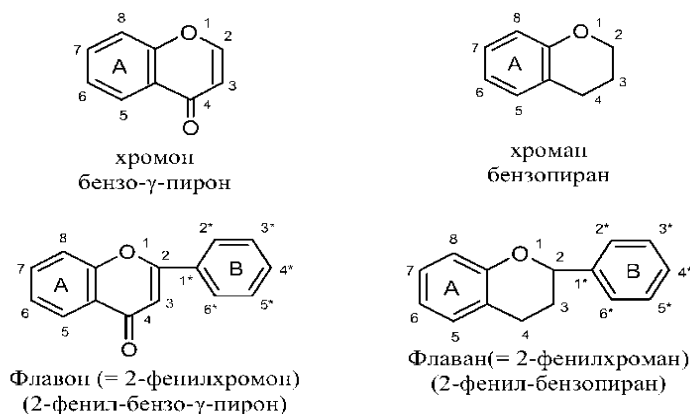
Изучение флавоноидов относится к началу XIX в., когда в 1814 г. Шевроле выделил из коры особого вида дуба кристаллическое вещество, названное кверцетрином. В настоящее время описано в литературе около 4000 соединений флавоноидов. Наиболее богаты ими растения семейства бобовых, астровых, розоцветных, гречишных, березовых, рутовых и другие.

В растениях флавоноиды локализуются главным образом в листьях и плодах, реже в корнях и стеблях, их содержание колеблется от 0,5 до 30 %.

Флавоноидные соединения - типичные растительные красители, они не образуются в животном организме, а находятся в растениях в свободном состоянии в виде гликозидов.

Флавоноиды - многочисленная группа природных биологически активных соединений, производных бензо-γ-пирона (хромона) или бензопирана (хромана), в которых атом водорода в α-положении замещен на фенильную группу. При этом образуется 2-фенилхромон (флавоон) или 2-фенилхроман (флаван). (Редко замещение происходит в β-положении - изофлавоон, изофлаван).

В основе соединений будет лежать фенилпропановый скелет, состоящий из С6-С3-С6 углеродных единиц.



Современная классификация флавоноидов основана

- на степени окисленности трехуглеродного фрагмента,
- положения бокового фенильного радикала,
- величине гетероцикла и других признаков [31].

Флавоны и флавонолы. Флавоны отличаются от флаванонов, а флаво-нолы соответственно от флаванололов наличием двойной связи в положении 2, 3.

Флавоноиды встречаются как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов. В качестве углеводной части могут быть моно-, ди- и трисаха-риды. Моносахаридами являются обычные для растений сахара: D-глюкоза; D-галактоза; D-ксилоза; L-рамноза; L-арабиноза. Может присоединяться также одна D-глюкуроновая кислота. Сахара, как правило, соединены р-связью с фенольными гидроксилами.

Из дисахаридов во флавоноидных гликозидах наиболее распространены рутиноза (рамноза 4-глюкоза); софороза (глюкоза + глюкоза); самбубиоза (ксилоза + глюкоза). В форме гликозидов не встречаются лишь катехины [48].

1.2.1 Физико-химические свойства флавоноидов

Флавоноиды - твердые кристаллические вещества, с четкой температурой плавления. Имеют горький вкус (самым горьким является нарингенин, он в 5 раз более горький, чем хинина гидрохлорид). Запах отсутствует. В зависимости от структуры имеют окраску от белой до желто-оранжевой и красной [79].

Агликоны хорошо растворяются в органических растворителях: диэтиловый эфир, ацетон, спирты, этилацетате, но почти не растворяются в хлороформе и бензоле. Гликозиды флавоноидов растворяются в спиртах и спирто-водных смесях. Монозиды лучше растворимы в концентрированном спирте, дигликозиды - в 50 % спирте, гликозиды с тремя и более сахарами - в разбавленном спирте и даже воде.

Оптически активные вещества.

Флавоноиды обладают способностью флюоресцировать в УФ-свете и характеризуются желтой, коричневой, красной флюоресценцией.

Катехины и лейкоантоцианидины легко окисляются в присутствии кислорода, под действием света и щелочей, превращаясь в окрашенные соединения - продукты конденсации, вплоть до высокомолекулярных полифенольных форм. Остальные флавоноиды более устойчивы к окислению. Наличие фенольных гидроксильных групп обуславливает кислые свойства флавоноидов, способность к образованию фенолятов в щелочной среде. Кислотность различных флавоноидов различна [31].

1.2.2 Выделение флавоноидов из растительного материала

Наиболее часто используются избирательная экстракция, осаждение с помощью солей тяжелых металлов и хроматографические методы.

Метод избирательной (селективной) экстракции заключается в извлечении флавоноидов из растительного материала различными растворителями в определенной последовательности.

Для отделения и очистки многих флавоноидов иногда используют их способность образовывать нерастворимые в воде и этаноле соли при взаимодействии с ионами тяжелых металлов, а также влияние pH на образование таких осадков. Осадки затем центрифугируют и после суспензирования в разбавленных спиртах разлагают с помощью сероводорода. Далее флавоноиды отделяют либо путем перекристаллизации, либо хроматографическими методами. При этом широко применяют адсорбционно-хроматографический метод с

использованием полиамидного сорбента - капрона. Элюирование с полиамида проводят растворителями - водой, этанолом, метанолом, ацетоном, раствором едкого натра, формамидом и диметилформамидом. При этом простые фенолы хорошо элюируются водой и этанолом, а полимерные соединения (дубильные вещества) - только ацетоном, едкими щелочами [31].

1.2.3 Методы исследования флавоноидов

Для доказательства наличия фенил-бенз-γ-пиронового ядра и идентификации отдельных типов флавоноидов используют реакции восстановления, хроматографические методы исследования, щелочную деструкцию. Применяя разные восстановители, получают различные производные флавоноидов.

Для идентификации и разделения флавоноидов широко используют хроматографические методы: на бумаге, в тонком слое (ТСХ) и газожидкостную хроматографию (ГЖХ).

Таблица 1. Окраска пятен флавоноидов на хроматограммах

Соединения	Окраска пятен в УФ-свете		
	До проявления	с раствором $AlCl_3$ с последующим нагреванием при 100- 105 °С в теч. 3-5 мин	с раствором КОН
Катехины	Не окрашены	Не окрашены	Бесцветная, переходящая желтоватую
Флавонолы	Желтая	Ярко-желтая	Желтая
Флавоны	Коричневая	Желтая, желто-зеленая	Желтая, желто- зеленая
Флаваноны	Не окрашены	Слабо-желтая	Желто-оранжевая
Халконы	Оттенки желтого	Желто-оранжевая	Оранжево-красная
Ауроны	Оттенки красного	Оранжево-красная	Оттенки красного

Реакции на подлинность:

- С реактивом Вильсона по характерной зелено-желтой флюоресценция флуорисценции в УФ-свете;

- С реактивом Мартини—Беттоло (окраска: жёлтая или жёлто-оранжевая окраска / красная или красно-фиолетовая);
- Реакция азосочетания (оранжево-красная окраска);
- Цианидиновая реакция (ярко-розовое, красное или оранжевое окрашивание);
- С алюминия хлоридом (раствор окрашивается в желтый цвет);
- С раствором аммиака, гидрокарбонатом натрия, щелочью (желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное / оранжевое или красное окрашивание);
- С солями железа (III) (окраски от зеленой до коричневой и красновато-бурой);
- С ацетатом свинца средним (осадки, окрашенные в ярко-желтый или красный цвета);
- С 1 % раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте (малиново-красное окрашивание);
- Хроматографическое исследование флавоноидов.

Хроматографирование проводят в чашках Петри, в качестве растворителя используют 15 % уксусную кислоту. После пробега растворителя хроматограмму вынимают, высушивают и просматривают в УФ-свете без предварительного проявления, а затем после проявления алюминия хлоридом или парами аммиака [31].

1.2.4 Количественное определение флавоноидов

Универсального метода количественного определения флавоноидов нет. В каждом конкретном случае подходят индивидуально.

Используют следующие методы:

- весовой;
- фотометрический;
- полярографический;

- потенциометрический и другие [31].

Потенциометрическое титрование относится к методу электрохимического анализа, основанному на измерении изменяющегося в процессе титрования электрохимического потенциала электрода, погруженного в изучаемый раствор [11].

В основу высокочувствительного полярографического метода анализа положено восстановление флавоноидов на ртутном капельном электроде. Метод позволяет анализировать сумму флавоноидов, в пересчете на одно из соединений, выбранное в качестве стандарта. Полярографический метод позволяет устанавливать наличие внутримолекулярных связей, проводить идентификацию по величине потенциала полуволны, оценивать реакционную способность отдельных групп в молекуле. К недостаткам метода можно отнести его малую избирательность из-за близких величин потенциалов полуволн, в связи, с чем требуется, как и при спектральных методах, предварительное разделение веществ [41].

Наибольшее распространение получили спектральные методы анализа.

Рабочими диапазонами длин волн служат как длинноволновые максимумы для флавоноидов – 330-370 нм, так и коротковолновые. Коротковолновые максимумы, хотя и более интенсивны, но в ряде случаев менее пригодны для аналитических целей из-за малой «площади» вершины пика, что приводит к большим ошибкам определения. Большей специфичностью обладают, хотя и не лишены недостатков, методики определения флавонолов по цветным комплексным соединениям с хлоридом алюминия, хлорокисью циркония (хлористым цирконилом), азотнокислым галлием [29].

1.3 Дубильные вещества

Дубильные вещества - называются высокомолекулярные, связанные между собой природные фенольные соединения, обладающие дубящими свойствами.

Они являются производными пирогаллола, пирокатехина, флороглюцина и имеют молекулярную массу от 1000 до 20000.

Препараты дубильных веществ применяются в качестве вяжущих и противовоспалительных средств. Вяжущее действие дубильных веществ основано на их способности связываться с белками с образованием плотных альбуминатов. Дубильные вещества благодаря способности образовывать осадки с алкалоидами, гликозидами и солями тяжелых металлов, применяют в качестве противоядий при пероральном отравлении этими веществами [48,73,80].

По существующей классификации, в основе которой лежат исследования зарубежных и отечественных ученых, все природные дубильные вещества делят на две большие группы:

1) конденсированные (представлены полимерами катехинов (флаванола-3) или лейкоцианидинов (флавандиола-3,4) или сополимерами этих двух типов флавоноидных соединений);

2) гидролизуемые (вещества, которые при обработке разбавленными кислотами распадаются с образованием более простых соединений фенольной и нефенольной природы.

О разделении растений по указанной классификации можно говорить только с некоторым приближением, так как лишь в очень немногих растениях имеется одна группа дубильных веществ. Значительно чаще в одном и том же объекте содержатся конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества совместно (2), обычно с преобладанием той или иной группы [80].

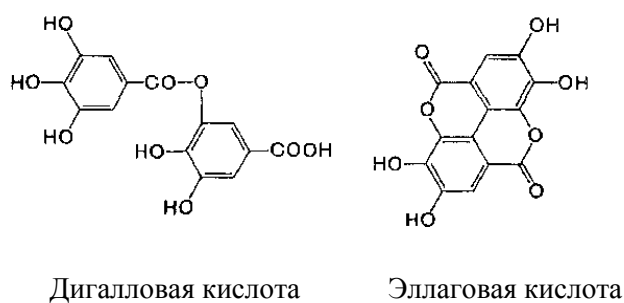


Рис 1. Строение дигалловой и эллаговой кислот

1.3.1 Физико-химические свойства дубильных веществ

Дубильные вещества представляют собой как правило, аморфные соединения, очень гигроскопические, образующие при растворении в воде коллоидные растворы, имеют вязущий вкус. Плохо растворимы в холодной воде. Из органических растворителей растворимы в ацетоне, этиловом спирте, смеси этилового спирта и этилового эфира, отчасти в этиловом эфире, этилацетате, пиридине, бутаноле. Нерастворимы в хлороформе, петролейном эфире, бензоле и сероуглероде.

Многие дубильные вещества оптически активны, легко окисляются на воздухе, приобретая более или менее темную окраску. В растворе дают слабокислую реакцию.

В кристаллическом состоянии известны только катехины, которые плохо растворимы в холодной воде, лучше - в горячей. Они легко окисляются при нагревании и на свету. Способны образовывать прочные молекулярные связи с белками и другими полимерами (пектиновые вещества, целлюлоза). Осаждаются растворами белка, алкалоидов, основного ацетата свинца, бихромата калия, сердечных гликозидов.

Как вещества фенольной природы, дубильные вещества легко окисляются перманганатом калия в кислой среде и другими окислителями, образуют окрашенные комплексы с солями тяжелых металлов, трехвалентного железа, бромной водой.

В лекарственных смесях их нельзя смешивать с солями тяжелых металлов, белковыми веществами и алкалоидами, из-за образования осадков [32].

1.3.2 Выделение, методы исследования дубильных веществ и их применение в медицине

Дубильные вещества легко извлекаются водой и водно-спиртовыми смесями; приемом экстракции (экстрагируют горячей водой в соотношении 1:30 или 1:10) их выделяют из растительного сырья, затем из полученных экстрактов - более чистые продукты и разделяют их.

Качественные реакции на дубильные вещества можно подразделить на 2 группы:

1) Общие реакции осаждения – для обнаружения дубильных веществ: реакция с желатином, реакция с солями алкалоидов, реакция с калия бихроматом, реакция со свинцом основным уксуснокислым, реакция с реактивом Фолина-Дениса.

2) Групповые – для установления принадлежности дубильных веществ к определенной группе: реакция с солями железа (III), реакция с бромной водой, реакция с ацетатом свинца средним в уксусной среде, реакция с формальдегидом и концентрированной хлористоводородной кислотой (реакция Стиасни), реакция с нитритом натрия в кислой среде.

Поскольку в основе гидролизуемых дубильных веществ лежат галловая и эллаговая кислоты, которые являются производными пирогаллола, то экстракты из растений, содержащих гидролизуемые дубильные вещества, с раствором железозаммиачных квасцов дают черно-синее окрашивание или осадки. В конденсированных дубильных веществах первичные звенья обладают функциями пирокатехина; поэтому с указанным реактивом получается темно-зеленое окрашивание или осадок.

Наиболее достоверной реакцией для отличия пирогалловых танидов от пирокатехиновых является реакция с нитрозометилуретаном. При кипячении растворов дубильных веществ с нитрозометилуретаном таниды пирокатехинового ряда осаждаются полностью; присутствие пирогалловых танидов можно обнаружить в фильтрате путем прибавления железозаммиачных квасцов и натрия ацетата - фильтрат окрашивается в фиолетовый цвет.

Для количественного определения дубильных веществ предложен ряд методов.

1. Гравиметрические или весовые методы - основаны на количественном осаждении дубильных веществ желатином, ионами тяжелых металлов или адсорбцией кожным (гольевым) порошком.

2. Официальным в дубильно-экстрактовой промышленности является весовой единый метод (ВЕМ): в водных вытяжках из растительного материала

вначале определяют общее количество растворимых веществ (сухой остаток) путем высушивания определенного объема вытяжки до постоянной массы; затем из вытяжки удаляют дубильные вещества, обрабатывая ее обезжиренным кожным порошком; после отделения осадка в фильтрате вновь устанавливают количество сухого остатка. Разность в массе сухого остатка до и после обработки вытяжки кожным порошком показывает количество подлинных танидов.

3. Наиболее широко используется перманганатометрический метод Левенталя (ГФ XI). Это фармакопейный метод, основан на легкой окисляемости перманганатом калия в кислой среде в присутствии индикатора и катализатора индигосульфокислоты, которая в точке эквивалентности раствора меняет цвет от синего до золотисто-желтого.

4. Желатиновый метод - Метод Якимова и Курницкой – основан на способности дубильных веществ образовывать нерастворимые комплексы с белками. Водные извлечения из сырья титруют 1 % раствором желатина, в точке эквивалентности комплексы желатино-таннаты растворяются в избытке реактива.

5. В промышленных условиях дубильные вещества извлекают из сырья путем выщелачивания горячей водой (50 °С и выше) в батарее диффузоров (перколяторов) по принципу противотока [32].

1.4 Органические кислоты

Органические кислоты - соединения алифатического или ароматического ряда, характеризующиеся наличием в молекуле одной или нескольких карбоксильных групп. Они широко распространены в растениях, накапливаются в значительных количествах, разнообразны по своей структуре и биологической роли.

Алифатические органические кислоты подразделяются на летучие (муравьиная, уксусная, масляная) и нелетучие (гликолевая, яблочная, лимонная, щавелевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, винная, фумаровая, изолимонная, цис-аконитовая, изовалериановая).

Ароматические кислоты - бензойная, салициловая, галловая, коричная, кофейная, кумаровая, хлорогеновая.

Органические кислоты находятся в растениях главным образом в виде солей, эфиров, димеров и тому подобное, а также в свободном виде, образуя буферные системы в клеточном соке растений [152].

В различных органах растений органические кислоты распределены неравномерно: в плодах и ягодах преобладают свободные кислоты, в листьях содержатся главным образом связанные кислоты.

Количественное содержание органических кислот в растениях подвержено суточным и сезонным изменениям, а также зависит от видовой и сортовой принадлежности растения. В незрелых плодах и стареющих листьях накапливаются главным образом яблочная, лимонная, винная кислоты. В старых листьях листовых овощей преобладает кислота щавелевая, в молодых — яблочная и лимонная [118,119].

Органические кислоты и их соли хорошо растворимы в воде, спирте или эфире. Для выделения органических кислот из растительного сырья с целью качественного исследования и количественного определения наиболее приемлемым способом является их экстракция эфиром при подкислении минеральными кислотами с последующим титриметрическим определением.

Многие органические кислоты являются фармакологически активными веществами (лимонная, никотиновая, аскорбиновая), некоторые используются благодаря их биологической активности (фитогормоны, ауксины, гетероауксины и др.).

Кислоты лимонная и яблочная широко используются в пищевой промышленности для изготовления фруктовых напитков и кондитерских изделий; натриевая соль кислоты лимонной, кроме того, в качестве консерванта при переливании крови. Кислота винная применяется в медицине, а также при производстве фруктовых вод, для изготовления химических разрыхлителей теста,

в текстильной промышленности при изготовлении протрав и красок, в радиотехнической промышленности [67].

1.5 Аскорбиновая кислота

Витамин С (Аскорбиновая кислота) - противощинготный витамин, который выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов, является антиоксидантом. Биологически активен только один из изомеров — *L*-аскорбиновая кислота, который называют витамином С. В химическом отношении является гексурановой кислотой, названной позже аскорбиновой. Аскорбиновая кислота широко распространена прежде всего в растениях [152]. Организм человека не способен синтезировать аскорбиновую кислоту и должен получать ее с пищей. Аскорбиновая кислота играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в организме. Этот витамин существует в двух формах - аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот. Первая легко окисляется, а вторая при восстановлении легко превращается в аскорбиновую кислоту.

Аскорбиновая кислота (рис. 2) является нестойким веществом - в водных растворах она легко разрушается; воздух, свет, следы железа и меди ускоряют ее окисление.

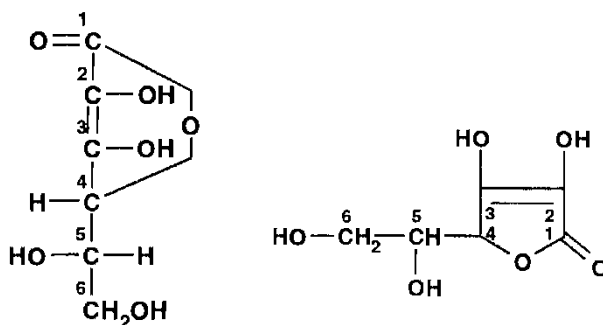


Рис. 2. Аскорбиновая кислота

По химическому строению кислота аскорбиновая представляет γ -лактон-2,3-дегидро-*L*-гулоновой кислоты. Ввиду наличия в молекуле двойной связи возможно существование геометрических цис- и трансизомеров кислоты

аскорбиновой. Однако пока известен только один из них - цис-изомер. Два асимметрических атома углерода обуславливают существование четырех оптических изомеров. Все они получены синтетически, однако только L-изомер является физиологически активным.

Кислоту аскорбиновую можно выделить из растительного сырья, в частности из плодов шиповника. Вначале получают водные экстракты, сгущают их до сиропов в вакууме, осаждают сопутствующие вещества (спиртом и эфиром), а остаток очищают хроматографическим методом и перекристаллизовывают [48].

Применяемую в качестве лекарственного вещества кислоту аскорбиновую идентифицируют по температуре плавления, удельному вращению. Она легко растворима в воде, медленно растворима в этаноле и практически нерастворима в эфире, бензоле и хлороформе.

Качественное определение аскорбиновой кислоты основано на ее высокой восстановительной способности [7].

Реакции на подлинность: реакция с калия перманганатом (обесцвечивание раствора перманганата калия), реакция с раствором йода (обесцвечивание раствора), реакция с солью железа (II) (образование аскорбината железа фиолетового цвета), реакция с раствором нитрата серебра (выпадает осадок металлического серебра) [126].

Количественно по ФС определяют кислоту аскорбиновую, используя в качестве титранта-окислителя 0,1 М раствор йодата калия в присутствии йодида калия. Так же проводят йодометрическое определение, титруя кислоту аскорбиновую 0,1 М раствором йода без индикатора до образования стойкого желтого окрашивания или используют крахмал, который добавляют в конце титрования, и прямое йодхлорометрическое определение.

Цериметрическое определение основано на том же процессе окисления кислоты аскорбиновой (в среде серной кислоты) 0,1 М раствором сульфата церия (IV), который восстанавливается до иона церия (III). Индикатором служит комплексное соединение железа (II) со-фенантролином [7].

1.6 Антоцианы

Одними из наиболее распространенных красящих веществ, придающими лепесткам цветов, плодам, листьям и стеблям окраску, являются антоцианы.

Антоцианы - природные полифенольные соединения, объединенные общим строением углеродного скелета C₆-C₃-C₆. Их молекулы построены по типу гликозидов, т.е. состоят из агликона и сахарных остатков. Антоцианы обладают разнообразными фармакологическими эффектами, которые до конца не изучены [8,12,16,138].

Антоцианы, выделяемые из растительного сырья вместе с другими веществами, повышают ценность окрашиваемого продукта, придают ему вкус и аромат. Привлекательность многих пищевых продуктов в значительной мере связана с подкрашиванием для придания цвета, близкого к естественной окраске плодов и овощей [28]. В настоящее время для этой цели используют дешевые синтетические красители [68,69,73]. Однако уже есть доказательства вредного, канцерогенного влияния некоторых искусственных красителей на организм человека, в связи, с чем ставится вопрос о запрещении амаранта, нафтаола желтого и др [107,108,109,110,111,117,121]. Эту проблему можно решить, используя натуральные безвредные антоцианидиновые красители - E163 [43,134,137].

Кроме этого, антоцианы могут применяться в медицине в качестве фитопрепаратов.

В связи с этим, ведутся исследования по возможности выделения антоцианов не только цветов и плодов, но и коры пихты, лиственницы, березы [83]. В них антоцианы находятся в виде бесцветных лейкоантоцианидинов, которые при определенных условиях приобретают различную окраску [43,128,63].

В настоящее время проводятся исследования окислительно-восстановительных свойств антоцианов, проантоцианидинов как по отдельности, так и в сумме. Это дает возможность использования суммарных вытяжек растений в качестве антиоксидантов.

Изучаемая антиоксидантная активность антоцианов может помочь не только в борьбе со свободными радикалами, но и повысить стабильность лекарственных форм, при использовании антоцианов как стабилизаторов [53]. Перспективным направлением технологии лекарственных средств может стать исследование возможности использования антоцианов как корригентов цвета, запаха и вкуса многих ЛФ, особенно применяемых в педиатрии [52,74,105].

1.6.1 Химическое строение и свойства антоцианов

Термин «антоциан» был впервые введен Маркартом в 1835 году и происходит от двух греческих слов anthos-цвет, окраска и kyanos – лазоревый [64].

Антоцианы – гликозиды антоцианидинов и производные одной и той же ароматической структуры - флавиевого катиона. Этот катион состоит из бензопирилиевого ядра и фенольного кольца (рис. 2).

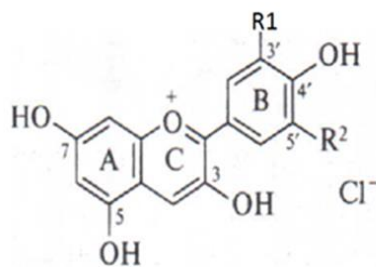


Рис. 3. Структура антоцианидинов

Все антоцианы имеют одинаковую модель гидроксизамещения:

- в положениях 5 и 7 кольца А,
- в положении 4, кольца В,
- в положении 3 кольца С

Оксониевая структура антоцианов установлена в 1913 году, а антоцианидинов в 1914 году.

Было предложено агликоны называть антоцианидинами, а их гликозиды антоцианами.

В результате исследований антоцианов была установлена структура 6 основных антоцианидинов, которые обеспечивают все многообразие окрасок листьев, цветов и плодов на планете (рис. 3).

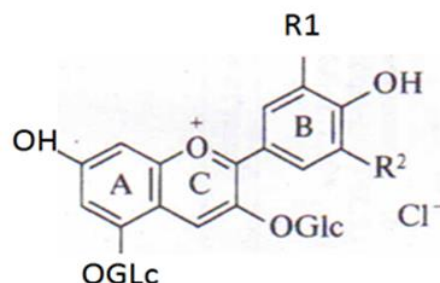


Рис. 4. Структура антоцианов

R1=R2=H	Пеларгонин	R1=OH; R2=OH	Дельфин
R1=OH; R2=H	Цианин	R1=OCH ₃ ; R2=OH	Петунин
R1=OCH ₃ ; R2=H	Пеонин	R1=R2=OCH ₃	Мальвин

АЦ бывают, как правило, 3-моноголикозидами или 3,5-дигликозидами и, чаще всего, содержат в качестве моносахаров остатки глюкозы, реже - остатки галактозы, рамнозы, арабинозы, из биоз – рутиноза, самбубиоза и продукты конденсации рутинозы с глюкозой и ксилозой.

В одном растении могут находиться как все 6 антоцианидинов, так и только некоторые из них. Их соотношение между собой, pH среды, а также способность этих полифенолов к комплексообразованию с различными металлами и копигментации обуславливает окраску растений от синей до ярко-бордовой с различными оттенками цветов [10,14,15,17,79,132].

1.6.2 Физико-химические свойства антоцианов

Выяснено, что все антоцианы - окрашенные кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде и других полярных растворителях, трудно - в спирте, бензоле.

В УФ-свете они флуоресцируют розовым или красным, после обработки аммиаком – синеватым цветом [54].

Современная электронная теория определяет флавиий как π -электронную структуру. Расчеты показывают различия в заряде отдельных атомов в пирилиевом ядре. Ионный заряд, который чаще всего отмечается (+) на одном из атомов (O, C2 или C4) ядра A, в большей степени сглаживается делокализацией, что является причиной существования антоцианов в различных формах - оксониевом катионе и карбониевом катионе.

Устойчивость оксониевых соединений пирилиевого типа в значительной степени приписывается большому положительному заряду. Замещение у C2 алифатическими группами ведет к образованию более устойчивых соединений в результате гиперконъюгации. С введением фенильного радикала положительный заряд уменьшается особенно у C2 и C4. Введение гидроксильных групп дает тот же эффект [64].

Величина электронного заряда отдельных атомов, как и величина суперделокализационной и локализационной энергии, показывает, что в флавиевой системе C2 и C4 больше всего поддаются нуклеофильным атакам, а C4 является более реакционноспособным местом. Электрон гетероциклического атома кислорода участвует в гетероароматической π -системе бензопирилиевого цикла, который и является хромофором, обуславливающим окраску этих соединений - в группе флавоноидов они являются наиболее глубоко окрашенными соединениями с наибольшим сдвигом максимума поглощения в длинноволновую область [64].

На настоящий момент установлено, что существенную роль в обеспечении всех окрасок и оттенков, которые дают антоцианы, играют следующие факторы: строение молекул индивидуальных антоцианов (особенно степень окисленности кольца B); состав индивидуальных антоцианов в данном растительном объекте; содержание антоцианов в данном объекте (концентрация в клетке); pH среды; комплексообразование с ионами металлов; копигментация [64].

Первые 3 фактора напрямую связаны с природой данного растительного объекта и могут подвергаться лишь небольшим колебаниям относительно неких

средних величин в зависимости от условий произрастания. Что касается комплексообразования с ионами металлов, было замечено, что голубизна обеспечивается комплексами антоцианов с Mg^{2+} и Al^{3+} . Четвертый и пятый фактор могут варьироваться по желанию исследователя.

В основе копигментации лежит образование нековалентных комплексов антоциана с копигментами, ответственными за интенсификацию и изменение цвета антоцианов. Копигменты сами по себе либо имеют очень слабое, либо совсем не имеют поглощения в видимой области, но при добавлении их к раствору антоциана вызывают сильное изменение цвета этого раствора (рис. 5).

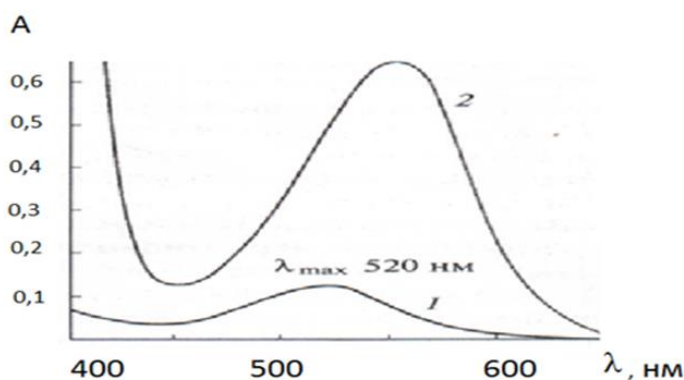


Рис. 5. Эффект копигментации: изменение спектра поглощения мальвин-хлорида (1) при добавлении гиперозида (2)

Копигментация приводит к увеличению интенсивности поглощения (гиперхромии) и положительному сдвигу длины волны максимального поглощения (батохромии) антоциана.

В роли копигментов могут выступать представители различных групп соединений. Наиболее часто ими являются флавоноиды или эфиры оксикоричных кислот, так и вещества, целенаправленно вносимые извне.

Углеводные остатки дают дополнительные возможности для модификации, обычно - за счет ацилирования их первичных спиртовых групп остатками фенолокислот в одном или нескольких углеводных остатках: парагидроксibenзойной или гидроксикоричными (паракумаровой, кофейной или феруловой (рис. 6).

п-гидроксibenзойная п-кумаровая кофейная

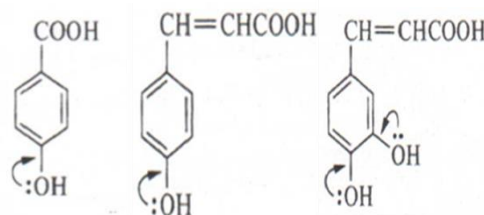


Рис.6. Строение фенолокислот

Такая молекула антоциана представляет собой на первый взгляд довольно громоздкое «сооружение», но в действительности за счет внутримолекулярной ассоциации происходит укладка в очень компактную пространственную структуру, обусловленную способностью ароматических ацильных групп образовывать внутримолекулярный «сэндвич» с антоцианидином.

Подобный вид внутримолекулярной укладки защищает антоцианидиновое ядро от атаки со стороны внешней среды, например, от взаимодействия с водой [64].

1.6.3 Фармакологическая активность антоцианов

Природные антоциановые красители, как и все полифенолы обладают высокой биологической активностью: спазмолитическая, противовоспалительная, противоаллергическая, мочегонная, кровоостанавливающая, противоотечная, капилляроукрепляющая, гипотензивный эффект, гипогликемической, снижение уровня холестерина и ЛПНП (липопротеинов низкой плотности), усиление остроты зрения и улучшение темновой адаптации (ускорение регенерации родопсина).

Последнее стало возможным, главным образом, из-за более высокого сродства к тканям глаза, что позволяет антоцианам более эффективно воздействовать на эти ткани.

Показана безвредность применения антоцианов различных ягод в диапазоне 150–2000 мг в день, результаты обычно свидетельствует об абсорбции 0,005-0,1% антоцианов, максимальная концентрация в плазме наблюдалась через 1,5-2 часа после приема. Известно, что при приеме вместе с пищей антоцианы черной

смородины обнаруживаются в плазме крови и тканях глаза. Уровень антоцианов в плазме достигал максимума через два часа и обнаруживался в течение 8 часов (у людей). В экспериментах на животных было показано, что концентрация антоцианов (черной смородины) в тканях глаза была выше, чем в плазме (т. е. накапливаются в глазах); антоцианы были обнаружены в таких тканях глаза как водянистая влага (внутриглазная жидкость), роговица, склера, сосудистая оболочка глаза, цилиарные тела, радужка и сетчатка[2,8,29,30]. В небольших количествах антоцианы были обнаружены в стекловидном теле и хрусталике [28,31,48].

1.6.4 Выделение антоцианов из растительного сырья

Антоциановые пигменты содержатся в таких растений как Черная смородина (*Rubusnigrum*), Черноплодная рябина (*Aroniamelanocarpa*), Каркаде (*HibiscusSabdariffa*), Виноград (*Vitisvinifera*), Скабиоза венечная (*Scabiosacjmosa*), Черника (*Centaurocyanus*), Василек синий (*Vacciniummyrtillus*), Фиалке (*Viola*), льне и многих других [4,9,65,114,124,130].

Первый химический синтез антоцианов был осуществлен в 1928 английским химиком Р. Робинсоном из полигидроксibenзальдегидов (рис. 7).

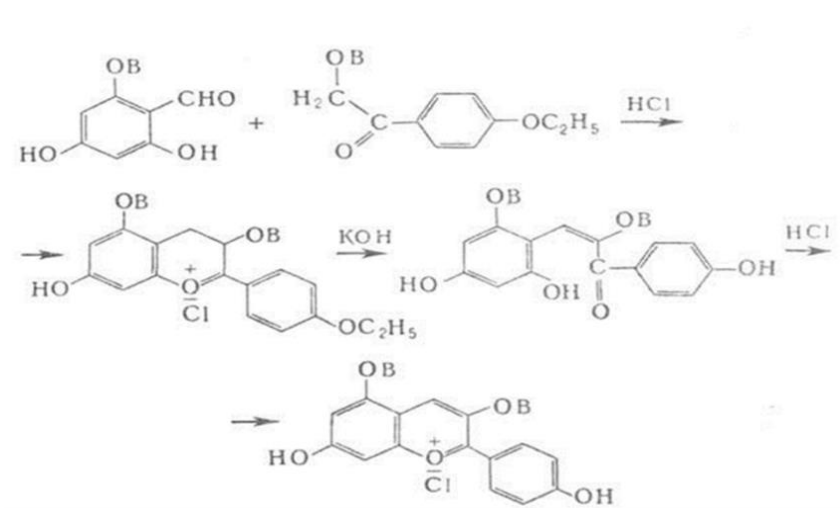


Рис. 7. Схема синтеза антоцианов. В - остаток тетраацетилглюкозы

Синтетическое производство не нашло широкого применения.

Наиболее широко используемым методом извлечения БАВ из состава растительного сырья является экстракция.

Систематическое исследование антоцианов в связи с определением их химического строения включает:

- экстракцию (получение первичного неочищенного извлечения);
- очистку от балластных веществ;

Очищенные суммарные фракции могут далее использоваться сами по себе или быть разделены на индивидуальные вещества, если это необходимо.

Вильштер и Эверст проводили экстракцию антоцианов, используя этиловый спирт с добавлением соляной кислоты. Экстрагированные антоцианы осаждали большим количеством эфира, прибавленного к экстракту. После многократного осаждения и растворения в спирте они получили чистый препарат цианидин-3,5-диглюкозида [60,64].

Для антоцианов нет специфического экстрагента, являющегося специфичным для всех видов антоцианосодержащего сырья.

Чаще всего экстракцию проводят охлажденным или неохлаждённым этанолом, или метанолом, содержащими соляную кислоту. Для предотвращения разрушения антоцианов ферментами и компенсации буферной способности отдельных видов сырья в некоторых случаях приходится работать с соляной кислотой высокой концентрации. Во избежание кислотного гидролиза неустойчивых видов антоцианов для экстракции используют 2 %-ную или 5%-ную уксусную кислоту вместо часто применяемой 1%-ой соляной кислоты в этаноле или метаноле. Однако в некоторых случаях в этой смеси возможно внезапное разрушение антоцианов. Для предотвращения этого явления рекомендуется добавить 0,05н хлороводородную кислоту к 2% или 5%-ным растворам уксусной кислоты.

Наиболее эффективным экстрагентом для получения антоцианов из ягод черной смородины, черноплодной рябины, каркаде является спирт этиловый 96%. При этом полученный экстракт содержит больше антоциановых и меньше сопутствующих соединений [61].

Есть методики экстракции антоцианов 1%-м раствором хлороводородной кислоты в воде. Хотя выход антоцианов достаточно высок, стабильность извлечений является значительно ниже, чем при использовании спиртовых растворов. Возможно также применение глицерина, а иногда и ацетона, а также смеси этилацетат- ацетон в различном соотношении [54].

Вытяжки из сырья могут быть получены разными способами: мацерацией; ремацерацией; перколяцией; реперколяцией; реперколяцией по Босину; циркуляционной экстракцией; интенсивными методами экстракции (виброэкстракция, экстракция с помощью ультразвука и др.) [5,49].

После получения вытяжки проводят ее очистку чаще путём отстаивания и фильтрации. Отстаивание вытяжки проводят при температуре не выше 100°С не менее 2-х суток. Фильтрование проводят с использованием различных фильтрующих материалов и фильтров.

После отстаивания и фильтрования, если это необходимо, проводят очистку [66].

В качестве метода очистки получаемого извлечения может быть использована обработка диэтиловым эфиром для удаления жиров или этилацетатом для удаления фенолов.

Возможно также применение адсорбции антоцианов на полиамидах. Для чего через заполненную колонку пропускают экстракт, но разделение антоцианов при этом не достигается [65].

При использовании смеси полиамида и поливинилпирролидона возможна не только очистка, но и получение большого числа чистых антоцианов.

Разработаны методики экстракции в системе жидкость-жидкость, а также из растительного сырья с применением гидрофильных полимеров. Для этого используют поливинилпирроллидон, поливинилкапролактан, полиэтиленгликоли. В качестве высаливателей применяются NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 . Экстракционная эффективность по отношению к антоцианам изменяется в ряду

ПВП>ПВК>ПЭГ. В качестве высаливателя наиболее эффективно применение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [69].

1.7. Методы определения антоцианов в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах

Первоначально идентификацию антоцианов проводили на основе их цвета и фракционного разделения в различных растворителях. Несмотря на несовершенство этих методов, с их помощью была сделана значительная исследовательская работа по определению антоцианов в различных растениях [67].

Современная точная идентификация основывается на использовании различных хроматографических методов, химических и спектральных методах анализа.

1.7.1. Химические методы идентификации

При воздействии многих химических реактивов антоцианы проявляют себя как нестабильные соединения. Их точка плавления трудно определяется, при высушивании они образуют гидратные комплексы и теряют хлороводород.

Оптимальными для определения антоцианов в извлечениях из сырья можно считать следующие методики.

1. В пробирку помещают 0,5 мл извлечения и добавляют 0,5 мл 10 % раствора ацетата свинца. При наличии антоцианов наблюдается синий аморфный осадок.
2. В пробирку помещают 0,5 мл извлечения и добавляют 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия. В присутствии антоцианов появляется окрашивание оливково-зеленого цвета [52].

Таблица 2. Результаты общегрупповых качественных реакций на антоцианы

Реактив	Результат реакции
10% раствор ацетата свинца основного	Синий аморфный осадок
10% раствор гидроксида натрия	Оливково-зеленое окрашивание

Для идентификации отдельных антоцианов были созданы специфические методы, позволяющие работать с микроколичествами.

Чаще всего для этого применяется:

1. Кислотный гидролиз (применяется для определения некоторых специфических особенностей структуры антоцианов. Имея положительный заряд, они при кислотном гидролизе более стабильны, чем гликозиды других флавоноидов):

- Полный кислотный гидролиз (проводится в 1 н. соляной кислоте при 100⁰ С в темноте с использованием обратного холодильника);

- Частичный кислотный гидролиз (используется для определения числа моносахаридов, участвующих в молекуле антоциана, путем установления числа и структуры полученных промежуточных продуктов);

- Селективный кислотный гидролиз (используется для определения вида гликозидного остатка, связанного с третьим атомом углеродного кольца А);

- Селективный гидролиз пероксидом водорода (метод аналогично методу селективного гидролиза 10 % -ной уксусной кислотой используется для определения остатка сахара, связанного в виде глюкозида с третьим атомом углерода в кольце А);

2. Щелочной гидролиз (позволяет гидролизовать у ацилированных антоцианов эфирную связь между сахаром и ацилирующей кислотой);

3. Ферментативный гидролиз (Для гидролиза связи агликон - сахар у третьего углерода кольца А используется антоцианаза, выделенная из плесени *Aspergillus niger*) [127].

1.7.2. Хроматографические методы определения антоцианов

Под хроматографией обычно подразумевают процесс разделения смесей веществ, происходящий при их перемещении в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента.

Разделение происходит благодаря различию тех или иных физико-химических свойств разделяемых веществ, приводящему к неодинаковому взаимодействию их

с веществом неподвижной фазы, а, следовательно, к различию во времени удерживания в слое сорбента.

Один из важнейших показателей при идентификации – величина R_f .

Наиболее часто применяемыми системами для антоцианов являются система Н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:5), н-бутанол: 2 н. хлороводородная кислота (1:1) [62,63].

Продукты, полученные при щелочном гидролизе, могут быть разделены с помощью следующих растворителей [63,66,69,]:

1. Н-бутанол: уксусная кислота : вода (4:1:5) – верхний слой
2. Этилацетат: уксусная кислота : вода (9:2:2)
3. Бензол: уксусная кислота : вода (2:2:1) – верхний слой
4. Изобутанол: бензол: муравьиная кислота : вода (100:19:10:25)

1.7.3. Газовая хроматография

В принципе газовую хроматографию трудно применить для качественной идентификации антоцианов, так как нелегко приготовить летучие стабильные и гомогенные производные этих соединений. Первые попытки идентификации указанных соединений с помощью газовой хроматографии были неудачными. В стремлении получить более точную характеристику антоцианидинов и их гликозидов начали превращать эти соединения в летучие производные путем реакции триметилхлорсилана и гексаметилдисилазана. Силанизированные соединения могут быть использованы с помощью газовой хроматографии или в сочетании с масс-спектрометрией [7,27].

Метод рекомендуется для получения препаратов и для идентификации. Недостатками его считаются небольшая производительность газохроматографической колонки и возможность разрушения антоцианов при высоких температурах (210-250 °C), которые применяются для приведения силанизированных антоцианов в летучее состояние.

1.7.4. Масс-спектрометрия

После гидролиза, охлажденную смесь антоцианов подкисляют соляной кислотой до $\text{pH}=3$ и экстрагируют этилацетатом. После отгонки этилацетата остаток анализируют на газовом хроматографе с масс-спектром (рис. 8).

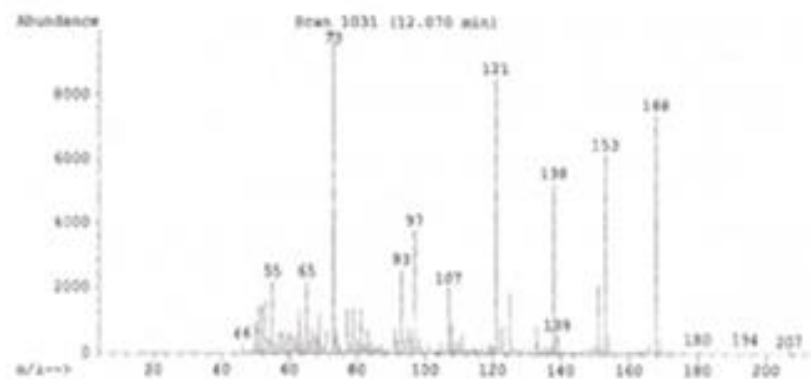


Рис. 8. Масс-спектры продуктов гидролиза антоцианов

1.7.5.Высокоэффективная жидкостная хроматография

В настоящее время исследование антоциановых пигментов методом ВЭЖХ является наиболее популярным. Наиболее часто применяемыми сорбентами являются : Сепарон SGX C18, Силасорб С 18, Диасфер-110-C18 и др. Для приготовления элюэнт используют ацетонитрил и воду, также к этой смеси возможно добавление муравьиной кислоты или кислоты уксусной. При увеличении содержания ацетонитрила в подвижных фазах удерживание антоцианов с двумя углеводными радикалами уменьшается быстрее, чем моногликозидов. При увеличении содержания ацетонитрила (более 11%) происходит уменьшение селективности их разделения вплоть до инверсии времен удерживания [21,22,,25,26,27,28,29].

Основной проблемой при анализе сложных смесей является необходимость идентификации каждого компонента, требующая либо больших затрат рабочего времени, либо использования труднодоступного оборудования. Применение стандартных веществ в этих случаях также проблематично по той же причине [25].

1.7.6. Спектрофотометрия в УФ-, ИК- и видимой области спектра в анализе антоцианов

Спектрофотометрические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения определяемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного анализа светопоглощающих соединений. В основе определений, связанных с измерением поглощения электромагнитного излучения, лежит закон Бугера-Ламберта-Бера, связывающий оптическую плотность (функция) с концентрацией вещества. В наиболее применяемой форме этот закон записывают в виде:

$$A = \epsilon lc,$$

где A - оптическая плотность; ϵ - удельный или молярный коэффициент поглощения; l - длина оптического пути; c - концентрация вещества.

Кривая зависимости поглощения (A или ϵ) от длины волны называется спектром поглощения вещества и является его специфической характеристикой.

Определение проводят на приборах - спектрофотометрах, позволяющих определять как окрашенные, так и бесцветные соединения по их избирательному поглощению.

Для анализа окрашенных соединений применяют более простые приборы - фотоэлектроколориметры.

Природа полос поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях связана с различными электронными переходами в поглощающих молекулах и ионах (электронные спектры поглощения).

Современная аппаратура позволяет получить УФ-спектры в области 190-380 нм, видимые – от 380 до 780 нм [9].

В качестве растворителя для определения подлинности и количественного содержания чаще используют подкисленный метанол. Максимумы поглощения при этом растворителе в ультрафиолетовой области около 275 нм, а в видимой – между 465 и 550 нм, в зависимости от вида антоциана [9].

Инфракрасная спектроскопия использована для подтверждения метильных и гидроксильных групп. Абсорбционная полоса ацильных групп ацилированных

антоцианов очень характерна. Поэтому большое значение этот метод имеет для ацилированных антоцианов, особенно для их отличия от неацилированных антоцианов. Присутствие карбоксильной группы характеризуется абсорбционным максимумом.

Спектры шести основных антоцианидинов исследованы в области от 4000 до 700 см^{-1} , при этом использовались бромид калия. Характерные пики получаются в области от 2000 до 1380 см^{-1} . Главная полоска при 1637 см^{-1} вызвана двойной связью кислородного цикла, который сопряжен с бензольным ядром. Некоторые полосы в этом диапазоне характерны для бензольного ядра. У всех антоцианов два абсорбционных максимума - около 1580 см^{-1} и 1520 см^{-1} , которые имеют большую или среднюю интенсивность. Абсорбция метильных групп пеоницина происходит при 1464 см^{-1} , петунидина - при 1460 см^{-1} и мальвидина - при 1464 см^{-1} . При некоторых исследованиях не установлена полоска, относящаяся к метильной группе. Абсорбция, полученная вне посредственной инфракрасной области, вызвана валентным вибрированием связи С-С в бензольном ядре.

В области 1650 см^{-1} у всех антоцианов есть полоска (минимум), обусловленная двойной связью бензольного ядра. Ацилированные антоцианы имеют характерный для этих соединений минимум при 1620 см^{-1} .

Ацилированные антоцианы легко отличаются в инфракрасном спектре от неацилированных по абсорбции валентных вибраций эфирной карбоксильной группы. Например, полоска находится при 1720 см^{-1} при ацилировании кофейной кислотой, при 1690 см^{-1} п-кумаровой кислотой.

Гликозидирование антоцианидинов приводит к получению сложных спектров, которые трудно интерпретируются. Спектры пепаргонидин-3,5-дигликозидов по сравнению с 3-гликозидами содержат дополнительные пики при 1440 см^{-1} , 1330 см^{-1} и 1271 см^{-1} [33].

Ядерно-магнитная резонансная спектроскопия

Ядерно-магнитный резонансный спектр был использован при идентификации мальвидин-3-(-6-н-кумароил)-гликозида, полученного из винограда, при

идентификации н-кумароил-глюкозидов и эфиров сахаров, полученных синтетическим путем, а также для определения места связи этерификации ацилированных антоцианов. Этот метод использован и для ацилированных уксусной кислотой антоцианов, а также для измерения химического смещения их протонов.

1.8 Методы количественного определения антоцианов

Методы количественного определения антоцианов представляют интерес при изучении динамики накопления антоцианов при созревании фруктов и овощей, и кинетики их разрушения при технологической переработке сырья и хранении готовой продукции [119]. С этой точки зрения созданные методы количественного определения антоцианов можно разделить на две группы:

- методы определения антоцианов в свежем сырье;
- методы определения антоцианов после переработки сырья и хранения полученного продукта.

Эти методы основываются на следующих фактах: антоцианы имеют абсорбционный максимум около 510-550 нм. Он очень удален от максимума других фенольных соединений, причем ближе всего расположен максимум флавонолов (350-380 нм). Во многих случаях на максимум антоцианов или соответствующего продукта количественно и позиционно могут влиять другие соединения, например, хлорофилл; абсорбция антоцианов во многом зависит от pH раствора; антоцианы обесцвечиваются сернистой кислотой; антоцианы быстро разрушаются перекисью водорода; на положение максимума влияют вид растворителя и образование комплексов с некоторыми металлами [61].

Определение антоцианов после обесцвечивания растворов

По методам, разработанным на основе этого принципа, берут две параллельные пробы, в одной из которых антоцианы обесцвечиваются диоксидом серы или разрушаются добавлением пероксида водорода.

Определение антоцианов на хроматограмме с помощью денситометра

Согласно этому методу антоцианы разделяются с помощью тонкослойной хроматографии и снимают денситограммы в проходящем или отраженном свете. Перед тем как помещать хроматограммы в денситометр, их обрабатывают парами соляной кислоты для перехода антоцианов в ионную форму.

Полярографическое определение антоцианов

Установлено, что антоцианы необратимо редуцируются на капающем ртутном электроде, давая катодные волны, интенсивность полуволны которых зависит от pH раствора. Число полученных волн в меньшей степени зависит от структуры, чем от концентрации антоцианов. Для растворов, у которых концентрация антоциана находится в интервале $1 \cdot 10^{-4}$ – $8 \cdot 10^{-4}$ М, зависимость между концентрацией антоциана и высотой полярографической волны является линейной.

Полярографический метод имеет преимущества при изучении комплексов антоцианов с металлами.

1.9 Лекарственные препараты из лекарственного растительного сырья

К экстракционным лекарственным средствам растительного происхождения, производство которых сосредоточено на крупных фармацевтических предприятиях, относятся настойки, экстракты, максимально очищенные препараты и препараты индивидуальных веществ. Основной стадией их получения является экстрагирование лекарственного растительного сырья. К лекарственным препаратам аптечного изготовления, имеющим малые сроки хранения, могут быть отнесены так же настои.

1.9.1 Настой

Настой — жидкая недозированная лекарственная форма, предназначенная для наружного и внутреннего применения, представляющая собой водное извлечение из мягких частей растений (листьев, травы, цветов и пр.) или водный раствор экстрактов-концентратов [49].

Реже настои готовят из плотных частей растений, в этом случае растительное сырье содержит летучие соединения (эфирные масла) или вещества, разрушающиеся при длительном нагревании. Настой содержит, кроме биологически активных веществ, примеси или балластные вещества (сахара, слизи, танин и пр.). Хранят настой в холодильнике или другом прохладном месте. При употреблении внутрь дозируют чайными, десертными или столовыми ложками [66].

Согласно проекту общей фармакопейной статьи, где рекомендовано внесение изменений в определение понятия «водные извлечения»: все водные извлечения, полученные настаиванием с водой на кипящей водяной бане, независимо от времени настаивания, называть настоями, убрав из общей статьи ГФ термин «отвар» [62].

Приготовление настоев: При изготовлении настоя ЛРС (измельченные и цельные плоды, семена, цветки, почки и пр.) помещают в инфундирку фарфоровую, заранее нагретую в течение 15 мин. на кипящей водяной бане, эмалированную или из нержавеющей стали, обливают водой очищенной комнатной температуры, взятой с учетом соответствующего коэффициента водопоглощения, закрывают крышкой и настаивают на кипящей водяной бане. Затем инфундирку снимают с водяной бани, выдерживают при комнатной температуре, после чего процеживают, отжимая остаток растительного сырья, и добавляют воду очищенную до предписанного объема извлечения [62].

1.9.2 Настойка

Настойки (Tincturae) представляют собой окрашенные жидкие спиртовые или водноспиртовые извлечения из лекарственного растительного сырья, получаемые без нагревания и удаления экстрагента [49].

При изготовлении настоек из одной весовой части растительного сырья получают 5 объемных частей готового продукта; из сильнодействующего сырья - 10 частей. В отдельных случаях, настойки готовят (1:10) из сырья, не

содержащего сильнодействующих веществ (настойка арники, календулы, боярышника) и в других соотношениях.

Настойки могут быть простыми, получаемыми из одного вида сырья, и сложными, представляющими смесь извлечений из нескольких растений, иногда с добавлением лекарственных веществ. Для получения настоек чаще используют высушенный растительный материал, в некоторых случаях - свежее сырье.

Для приготовления настоек используют способы:

- мацерация и ее разновидности;
- перколяция;
- растворение густых и сухих экстрактов.

Все простые настойки чаще получают способом перколяции. При получении настоек в соотношении 1:5 с целью достижения полноты истощения сырья экстрагирование проводят с применением циркуляционного перемешивания с помощью центробежных насосов [66].

1.9.3 Экстракты. Жидкие экстракты

Экстракты (от лат. *extractum* — вытяжка, извлечение) представляют собой концентрированные вытяжки из лекарственного растительного сырья (ЛРС) [49].

Данные извлечения могут быть классифицированы в зависимости от консистенции на экстракты жидкие (*Extractafluida*), экстракты густые (*Extractaspissa*) и экстракты сухие (*Extractasicca*); или от используемого экстрагента: водные (*Extractaaquosa*), спиртовые (*Extractaspirituosa*), эфирные (*Extractaaetherea*), масляные (*Extractaoleosa*) и полученные с помощью сжиженных газов. Кроме того, выделяют стандартизованные экстракты (*Extractastandardisata*) или экстракты-концентраты [49].

Жидкие экстракты бывают только спиртовыми; остальные могут быть спиртовыми, водными, эфирными и др.

Жидкие экстракты — это жидкие концентрированные водно-спиртовые извлечения из ЛРС, получаемые в соотношении 1:1. Жидкие экстракты нашли широкое распространение в фармацевтической промышленности, так как имеют

следующие преимущества: 1) одинаковые соотношения между действующими веществами, содержащимися в лекарственном сырье и в готовом препарате; 2) удобство в отмеривании в условиях аптек бюретками и пипетками; 3) возможность получения без применения выпаривания позволяет получить жидкие экстракты, содержащие летучие вещества (эфирные масла).

К недостаткам жидких экстрактов относятся: 1) насыщенность их сопутствующими веществами, извлеченными из растительного сырья; 2) появление осадков при незначительных понижениях температуры или частичном испарении спирта; 3) необходимость в герметической укупорке и хранении при температуре 15-20 °С; 4) жидкие экстракты содержат большие объемы экстрагента, ввиду чего являются малотранспортабельными препаратами.

Жидкие экстракты получают методами перколяции, реперколяции (в различных вариантах), дробной мацерации в различных модификациях, растворением густых и сухих, экстрактов. Лучшие по качеству жидкие экстракты получают при; использовании методов приготовления, исключающих упаривание [49].

1.9.4 Биологическая активность фитопрепаратов плодов Рябины черноплодной

Одной из основных причин снижения иммунитета организма, преждевременного старения, развития многих заболеваний является недостаток в организме антиоксидантов и избытка свободных радикалов (СР).

В организме человека СР образуются в качестве побочного продукта при всех ферментативных реакциях биологического окисления [1-4].

В настоящее время тема свободных радикалов и реакционноспособных кислородосодержащих частиц привлекает повышенное внимание современную медицину и фармацию. Это связано с условиями усиливающихся эколого-производственного прессинга и некачественного питания.

Регулирование процессов свободно радикального окисления и уровня накапливающихся перекисных радикалов осуществляет защитная

антиоксидантная система организма человека. Концентрация свободных радикалов в клетках организма может достичь уровня, при котором его собственная антиоксидантная система не справляется с дезактивацией повреждающих агентов. В этом случае возникает «окислительный стресс», который является одной из причин предотвращающей старение организма и развития патологического состояния [1].

Свободным радикалом считается химическое соединение, которое имеет одно или более неспаренных электронов образованное в результате потери или приобретения одного электрона. Неспаренными считается электрон, занимающий молекулярную или атомную орбиталь. Соединения, способные связывать неспаренные электроны, в результате чего образуются мало активные или неактивные радикалы, называются антиоксидантами [1,6].

В последние годы была показана роль антиоксидантов в защите растений от неблагоприятных климатических условий. Показано, что в растительных объектах под действием ультрафиолета накапливается большое количество антиоксидантов полифенольной природы, которые выступают как ловушка свободных радикалов [2]. Высказано предположение о том, что в частности, антоциановые соединения обеспечивают защитную функцию клеток растений от повреждающего действия климатических и других неблагоприятных факторов окружающей среды [3].

Поиск дезинтоксикационных лекарственных средств является актуальной задачей современной медицины. С каждым годом увеличивается перечень известных токсических соединений всех категорий, в том числе сохраняется высокая частота встречаемости интоксикации лекарственными веществами.

Следовательно, весьма актуальным становится поиск новых, легкодоступных и нетоксичных источников природных антиоксидантов и антитоксикантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных показывает, что плоды аронии черноплодной является ценным источником биологически активных веществ. Доминирующей группой БАВ, придающей темную окраску плодов, являются антоциановые

соединения. Кроме данной группы БАВ в плодах содержатся флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты и аскорбиновая кислота, которые, наравне с антоцианами, вносят вклад в формирование общего фармакологического эффекта исследуемых плодов.

С целью объективной оценки качества сырья необходима разработка и усовершенствование методик стандартизации по этим группам БАВ. В настоящее время на фармацевтическом рынке широко распространены БАДы, в состав которых входят плоды Рябины черноплодной.

Ввиду отсутствия промышленно выпускаемых лекарственных форм плодов аронии назрела насущная потребность в комплексных препаратах Аронии черноплодной, обеспечивающих весь спектр фармакологического действия ценного растительного сырья.

Собранный материал по химическому составу и фармакологическому действию плодов аронии позволяет рекомендовать данный вид сырья для получения экстракта жидкого и разработки методики «сквозной стандартизации» сырья и экстракта.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись: свежие, свежемороженые и высушенные плоды рябины черноплодной различных сортов, заготовленные на территории Воронежской области, Алтайского края, республики Адыгея и Калининградской области. Объекты заготавливались в сухую погоду в сентябре-октябре за один прием в течение 2013-2015 гг.

Сушку образцов осуществляли в естественных условиях (воздушно-теньевая сушка).

Образцы свежесобранных плодов хранили в замороженном состоянии при $T = -18^{\circ}\text{C}$. Высушенное сырье хранилось в бумажных пакетах в чистом, сухом, хорошо вентилируемом помещении в соответствии с требованиями ГФ XI, в. 1, ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья».

2.2. Методы исследования

Характеристику внешних признаков плодов рябины черноплодной проводили в соответствии с ОФС «Плоды» ГФ XI, в. 1, с. 258.

Для микроскопических исследований использовали методики приготовления микропрепаратов, указанные в общей статье ГФ XI, в.1, с. 277 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

Для свежесобранных плодов эпидермис отделяли от мякоти плода, с наружной поверхности, методом соскабливания снимали волоски. Семена аронии запаивали в парафиновые кубики и делали поперечные срезы. Из высушенных плодов были приготовлены поперечные срезы, из измельченного сырья и порошка – давленный препарат. Плоды предварительно кипятили в растворе натрия гидроксида 5%, с целью удаления антоцианового пигмента, мешающего проведению анализа.

Микроскопическое исследование проводилось с помощью микроскопа «Biomed 6» с объективами x40, x100, x400. Измерения проводились с помощью окуляра (WF10X) фирмы MYSCOPE 130M Digital Camera for microscope.

Определение влажности сырья проводили по методике, описанной в ГФ XI, в. 1, с. 285, ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья».

Сухой остаток определяли по методике, изложенной в ОФС «Экстракты», ГФ XI изд., в. 2, с. 160.

Исследования качественного состава антоцианов, флавоноидов, дубильных веществ, органических кислот проводились методом ТСХ. Сорбенты, подвижные фазы и детекторы указаны в третьей главе работы.

Метод титриметрии применялся для количественного определения суммы органических кислот (ГФ XI, в. 2, с. 294, в ст. №38 «Плоды шиповника»), дубильных веществ (ГФ XI, в. 1, с. 286, в ст. «Определение содержания дубильных веществ в ЛРС»).

Спектрофотометрический метод использовали для определения суммы флавоноидов [60] в изучаемых объектах исследования. Исследование проводили на спектрофотометре «Hitachi U-1900» ulvis spectrophotometer 200V модель 3Ю-0003 (Hitachi High-Technologies Corporation Tokyo Japan).

Спектрофотометрическое определение дубильных веществ проводили в извлечении, полученного путем экстрагирования 70% спиртом этиловым. Выполнив серию последовательных разведений, измеряли величину оптической плотности в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны от 274,5 до 277,5 нм относительно спирта этилового 70%. Параллельно измерили оптическую плотность раствора стандартного образца танина [114].

Для определения содержания ряда индивидуальных органических кислот, а также для определения макроэлементов использовали метод капиллярного электрофореза на приборе марки «Капель-105/105М». Детектирование компонентов проводили по косвенному поглощению при длине волны 267 нм [26].

Количественное содержания пестицидов, радионуклидов и тяжелых металлов осуществляли с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии. Подготовку образцов и определение проводили в соответствии с НД [56 - 59], а также руководствуясь методическими указаниями по атомно-абсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье [104].

В качестве стандартных образцов в работе были использованы коммерческие доступные индивидуальные вещества: DL-Яблочная кислота ИМП, D (-) – Фруктоза ИМП, коричная кислота Ч, кверцетин ЧДА, галловая кислота 99% РА – ACS, рутин 97%.

С помощью метода ВЭЖХ исследовали состав антоцианового комплекса плодов рябины черноплодной различных сортов. При определении профиля индивидуальных антоцианов использовалась система ВЭЖХ «Agilent 1100» с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (ДМД) и времяпролетным масс-спектрометрическим детектором «Agilent 6200 series» (ВЭЖХ-МС/TOF).

Неподвижная фаза: колонка Phenomenex Luna C18 250 x 4.6 мм, 5μm. Подвижная фаза: А - 1,0 %-ный водный раствор муравьиной кислоты и В - ацетонитрил. Ступенчатый градиент: 0 мин - 10% В, 10 мин – 12% В, 20 мин – 15% В, 30 мин – 20% В, 40 мин – 30% В, 50 мин – 40% В, 51-60 мин – 10% В. Общее время анализа 60 мин. Скорость потока подвижной фазы 0.5 мл/мин. Температура колонки 40°C, температура автосемплера 20°C. Объем вводимой пробы 20 мкл. Длины волн ДМД - 520 нм и 280 нм. Спектры снимали в диапазоне от 200 до 700 нм. Условия МС: напряжение на капилляре – 3.5 кВ, поток газа-осушителя (азот) – 9 л/мин, температура - 325°C, давление на распылителе – 0.27 МПа, сканирование масс – в режиме регистрации положительных ионов $[M]^+$ в диапазоне от 100 до 1500 m/z. [112].

Оценку биологической активности полученных лекарственных форм проводили по методике В.С. Бузламы [26]. Данный метод позволял определить характер действия изучаемых объектов на клетки при воздействии на них

внешних неблагоприятных факторов. Из нескольких имеющихся методик был выбран «Метод разрушающего воздействия» с использованием культуры инфузорий «*Paramecium caudatum*».

В работе была использована культура инфузорий, содержащая в экспоненциальной фазе не менее 2500 особей в 1 мл среды, а в стационарной фазе - не менее 7000 особей [52].

Определение антиоксидантной активности полученных лекарственных форм проводили титриметрически, используя в качестве титранта 0,01 М раствор перманганата калия [127]. Извлечение перед определением разбавляли до исчезновения розового окрашивания.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с общей фармакопейной статье ГФ XI (ГФ XIII), вып. 2, ОФС 42-0111-09.

В исследовании использовались следующие извлечения из сырья изучаемых сортов рябины черноплодной:

- 1) Спиртовые извлечения () из свежесобранных и высушенных плодов аронии, полученные в соотношении 1:40 (высушенные плоды), в соотношении 1:25 (свежесобранные плоды);
- 2) Водные извлечения из высушенных плодов аронии различных сортов, полученные в соотношении сырье-экстрагент 1:10;
- 3) Жидкий экстракт 1:1, полученный из высушенных плодов рябины черноплодной методом перколяции, ОФС «Экстракты», настойка 1:5, полученная из высушенных плодов рябины черноплодной методом дробной мацерации, ОФС «Настойки».

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2

1. Дана характеристика объектам исследования.
2. Приведено описание используемого оборудования, реактивов и стандартных образцов.
3. Охарактеризованы использованные в работе методы исследования.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПЛОДОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

Качественные реакции на основные группы биологически активных веществ проводили по известным методикам [71,76 -78,81,85,86]. Образцы плодов аронии исследовали на присутствие: флавоноидов, антоцианов, органических кислот и дубильных веществ.

Для проведения качественных реакций готовили водные и водно-спиртовые извлечения из образцов плодов рябины черноплодной. Для этого 2,0 г измельченного до размера частиц 1 -2 мм воздушно-сухого сырья заливали 20 мл воды очищенной и настаивали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное водное извлечение фильтровали. Водные извлечения использовали для дубильных веществ и органических кислот. Водно-спиртовые извлечения получали экстракцией спиртом в концентрации 70% по методике, описанной в НД, и использовали для обнаружения флавоноидов и антоцианов. Полученные данные представлены в табл.3.

Таблица 3. Результаты определения групп биологически активных веществ в водно-спиртовых извлечениях из плодов рябины черноплодной с помощью качественных химических реакций

Группа БАВ	Химическая реакция	Наблюдаемый эффект
Флавоноиды	1.Цианидиновая проба	+
	2.Реакция с 5% р-ом алюминия хлорида	+
	3.Реакция с 1% р-ом хлорида железа(III)	+
	4.Реакция с р-ом гидрокарбоната натрия	-
	5.Реакция с р-ом ацетата свинца	-
Дубильные вещества	1.Реакция с р-ом желатина	-
	2.Реакция с солями алкалоидов	-

	3.Реакция с дихроматом калия	+
	4. Реакция с р-ом ацетата свинца	-
	5.Реакция с реактивом Фолина-Дениса	-
Антоциановы е соединения	1.Реакция с 10% р-ом ацетата свинца	+
	2.Реакция с 10% р-ом гидроксида натрия	+
Органические кислоты	1. Реакция с калия перманганатом	+
	2.Реакция с раствором йода	+
	3.Реакция с солью железа (II)	-
	4.Реакция с раствором нитрата серебра	+

Ввиду того, что в химический состав плодов аронии входит большое количество полифенольных соединений и других классов, которые также взаимодействуют с возможными вещества, представленными в таблице, данные качественные реакции не является избирательными. Поэтому целесообразным было использование для идентификации данных групп БАВ метода тонкослойной хроматографии.

3.1.Изучение антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной хроматографическими методами

3.1.1. Изучение антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии

Основной группой БАВ, придающей плодам густую темную окраску, являются антоциановые соединения, поэтому на первом этапе исследований осуществили качественный анализ именно этой группы веществ плодов аронии с использованием тонкослойной хроматографии.

Для качественной идентификации антоцианов в плодах аронии использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках марки «Sorbifil». Элюирование проводили в системе: н-бутанол- кислота уксусная ледяная – вода (4:1:1), объем нанесения пробы 10мкл. Высота подъема фронта растворителя – 8 см. Зоны антоцианов на пластине обнаруживались в виде ярко окрашенных пятен, не требующих проявления [97]. Общий вид полученной хроматограммы представлен на рисунке 9:

Анализируя данные рисунка 1 можно сделать вывод о том, что на хроматограмме всех четырех образцов обнаружено по 4 зоны с окрашиванием, характерным для антоциновых соединений, ($R_f = 0,43; 0,51; 0,59; 0,85$).

На хроматограмме извлечения из образца, заготовленного на территории Воронежской области, наблюдается появление еще двух из 3 на рисунке пятен, имеющих характерную для антоциановых соединений окраску и не наблюдающихся у остальных анализируемых образцов ($R_f = 0,14; 0,27$), что свидетельствует о различии в качественном составе антоциановых соединений исследуемых образцов.

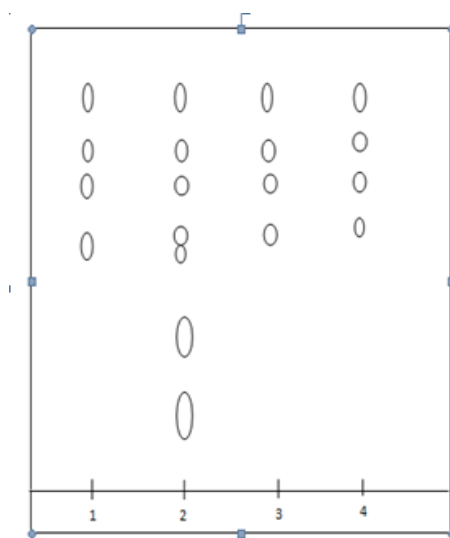


Рис.9. Результаты ТСХ-анализа антоцианов в спиртовых извлечениях из высушенных плодов Рябины черноплодной:

1- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Адыгеи; 2- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Воронежской области; 3- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Алтайского края; 4 –извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Калининградской области.

3.1.2. Изучение антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Одним из современных инструментальных методов, который используется для качественного и количественного анализа минорных биологически активных

веществ растительного происхождения является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Извлечение антоцианов из сырья проводили по следующей методике: к 2,0 г измельченных плодов рябины черноплодной добавляли 20 мл воды. Экстракцию проводили на УЗ бане при комнатной температуре в течение 15 минут. Аликвоту в 1,5-2 мл полученного экстракта центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин [117].

При определении профиля индивидуальных антоцианов использовалась система ВЭЖХ «Agilent 1100» с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (ДМД) и времяпролетным масс-спектрометрическим детектором «Agilent 6200 series» (ВЭЖХ-МС/TOF).

В качественном антоцианиновом составе всех исследуемых плодов не было найдено статистически значимых различий. Типичная хроматограмма одного из образцов представлена на рис.10.

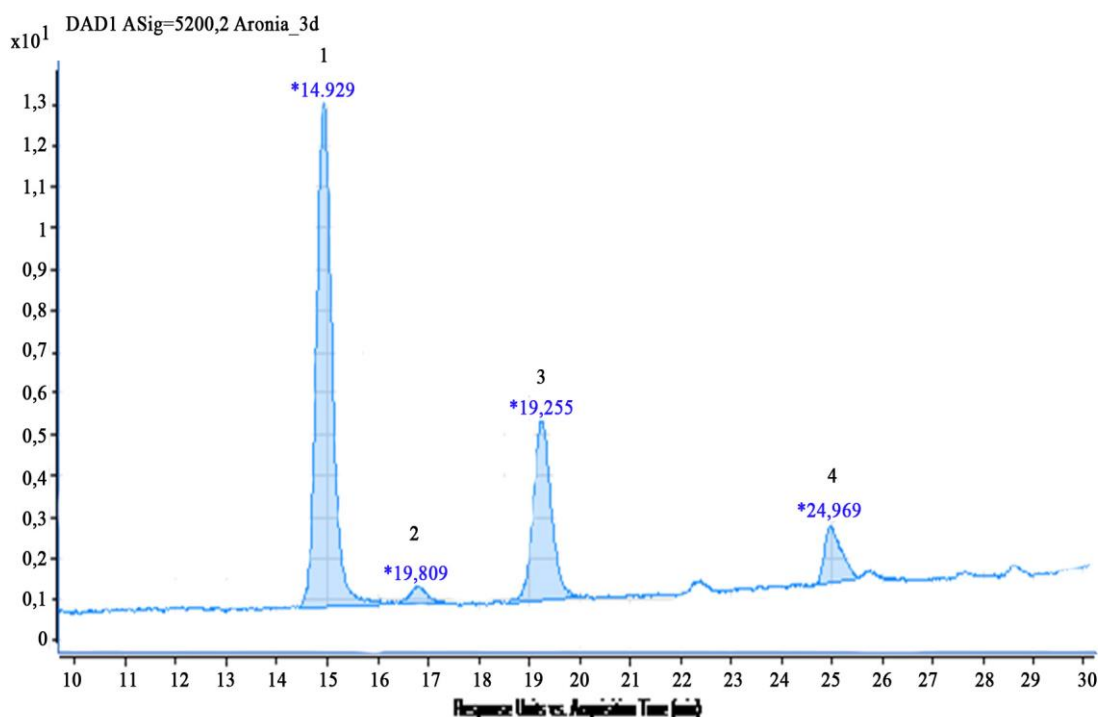


Рисунок 10. Хроматограмма извлечения из плодов аронии черноплодной сорта «Вениса» при $\lambda=520$ нм. 1 – Цианидин-3-галактозид, 2 – Цианидин-3-глюкозид, 3 – Цианидин-3-арабинозид, 4 – Цианидин-3-ксилозид.

Параметры удерживания, массы молекулярных ионов индивидуальных антоцианов и их фрагментов в плодах аронии различных сортов представлен в табл.4:

Таблица 4. Результаты ВЭЖХ-МС анализа индивидуальных антоциановых соединений плодов рябины черноплодной различных сортов

№	Антоцианин	K' [*]	ESI-MS ⁺	Детектируемый ион
1.	Цианидин-3-галактозид	3.03	449.10 287.05	[M] ⁺ [M – галактоза ^{**}] ⁺
2.	Цианидин-3-глюкозид	3.54	449.10 287.05	[M] ⁺ [M – глюкоза] ⁺
3.	Цианидин-3-арабинозид	4.19	419.09 287.05	[M] ⁺ [M – арабиноза] ⁺
4.	Цианидин-3-ксилозид	5.76	419.09 287.05	[M] ⁺ [M – ксилоза] ⁺

* K' – коэффициент емкости

^{**}Здесь и далее: молекулярная масса моносахарида минус 18 Да (молекула воды, теряющаяся при образовании гликозидной связи)

В масс-спектрах, идентифицированных нами индивидуальных антоцианинов аронии в различных соотношениях присутствовали фрагменты агликонов.

Профиль антоцианинов в анализируемых образцах (в % от суммы антоцианинов) представлен в таблице 5.

Таблица 5. Состав индивидуальных антоцианов в извлечениях из плодов рябины черноплодной различных сортов

Сорт плодов аронии	Состав индивидуальных антоцианинов (в % от суммы антоцианинов)			
	Цианидин-3-галактозид	Цианидин-3-глюкозид	Цианидин-3-арабинозид	Цианидин-3-ксилозид

«Викинг»	62.8	3.3	29.0	4.9
«Алтайская крупноплодная»	60.6	3.6	30.5	5.3
«Вениса»	63.8	2.3	26.3	7.6
«Мичуринская»	71.4	2.8	22.1	3.7

Все обнаруженные антоцианины являлись гликозидами цианидина. Во всех исследуемых сортах аронии преобладал цианидин-3-галактозид (60,6-71,4%). Относительное содержание цианидин-3-арабинозида было в 2-3 раза меньше, чем цианидин-3-галактозида. Относительное содержание остальных антоцианинов (3-ксилозида и 3-глюкозида цианидина) составило от 6.5 до 9.9%. Существенных различий в содержании индивидуальных антоцианинов (в % от суммы) между плодами аронии четырех изученных нами сортов выявлено не было.

3.2. Изучение флавоноидов плодов Рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии

Для качественной идентификации флавоноидов в плодах аронии использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках марки «Sorbifil». Элюирование проводили в системе: этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:3:2). Высота подъема фронта растворителя – 8 см. В качестве стандартных образцов использовали 0,05% растворы ГСО рутина, кверцетина, лютеолина-7-гликозида. Исследуемое спиртовое извлечение из сырья наносили на пластину в количестве 10 мкл. Детектирующим реагентом служил 2% спиртовой раствор алюминия хлорида, при обработке которым флавоноиды проявлялись в виде голубых пятен, свящихся в УФ-свете [100]. Полученные результаты представлены на рисунке 11:

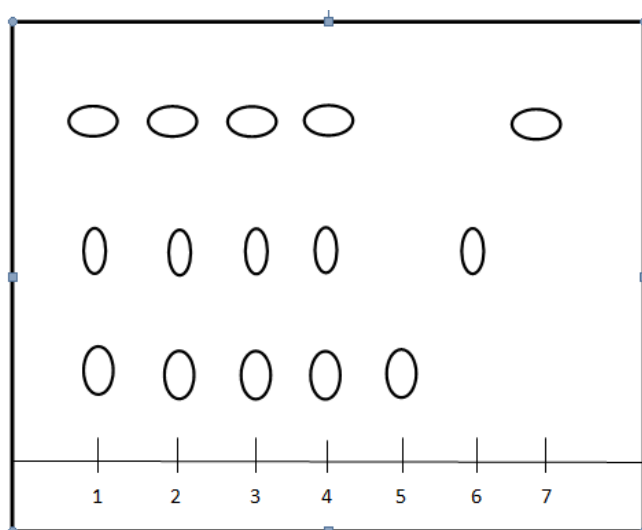


Рис.11. Результаты ТСХ-анализа флавоноидов в спиртовых извлечениях из высушенных плодов Рябины черноплодной:

1- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории республики Адыгея; 2- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Воронежской области; 3- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Алтайского края; 4 –извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Калининградской области; 5- 0,05% раствор РСО рутина; 6 - 0,05% раствор РСО лютеолин – 7- гликозида; 7- 0,05% раствор РСО кверцетина;

Анализируя данные рисунка 10, можно сделать вывод о том, что на хроматограмме извлечений из всех анализируемых образцов плодов аронии обнаруживается 3 зоны, дающих характерное для флавоноидов свечение в УФ-свете. Сравнение R_f зон флавоноидов в исследуемом и стандартных образцах позволило сделать вывод о наличии в плодах аронии рутина, кверцетина и лютеолин-7-гликозида. По качественному составу флавоноидов образцы, заготовленные в разных регионах, различий не имели.

3.3. Изучение дубильных веществ плодов Рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии

Следующей группой исследуемых БАВ являлись дубильные вещества. Дубильные вещества - высокомолекулярные, генетически связанные между собой природные фенольные соединения, обладающие дубящими свойствами.

Дубильные вещества широко распространены в растительном царстве, обладают вяжущим вкусом, характерным для плодов аронии.

Анализ проводили на пластинах марки «Sorbifil». Высота подъема растворителя 8 см. В качестве стандартных образцов использовали спиртовой раствор танина и галловой кислоты. Исследуемую вытяжку наносили в виде водного раствора (1:10) в количестве 10 мкл.

Элюирование проводили в системе: этилацетат- кислота муравьиная – вода (8:1:2). После элюирования пластины высушивали в сушильном шкафу до полного исчезновения запаха растворителя. В качестве детектирующего реагента использовали спиртовой 1% раствор железоаммонийных квасцов [95, 96,97]. Дубильные вещества проявлялись в виде пятен черно-синего цвета на желтом фоне пластины. Полученные данные представлены в табл.6 и на рис.12:

Таблица 6. Элюирующие системы, используемые для определения дубильных веществ плодов аронии

№ п/п	Состав элюента	Полярность
1	н-бутанол – кислота уксусная – вода (10:3:7)	6,42
2	н-бутанол – кислота уксусная – вода (4:1:2)	6,00
3	н-бутанол – кислота уксусная – вода (40:12:28)	6,42
4	Вода – кислота муравьиная – этилацетат (5:10:85)	4,55
5	Этилацетат – кислота муравьиная – вода (80:10:10)	5,14
6	Хлороформ – вода – спирт этиловый (60:30:20)	5,8
7	Диэтиловый эфир – кислота уксусная – гексан – этилацетат (20:20:20:40)	3,24
8	Этилацетат- кислота муравьиная – вода (8:1:2)	5,6
9	Этилацетат- кислота муравьиная – вода (8:1:1,5)	5,38
10	Этилацетат- кислота муравьиная – вода (8:1:1)	5,1
11	Этилацетат- кислота муравьиная – вода (8:1:0,5)	4,87

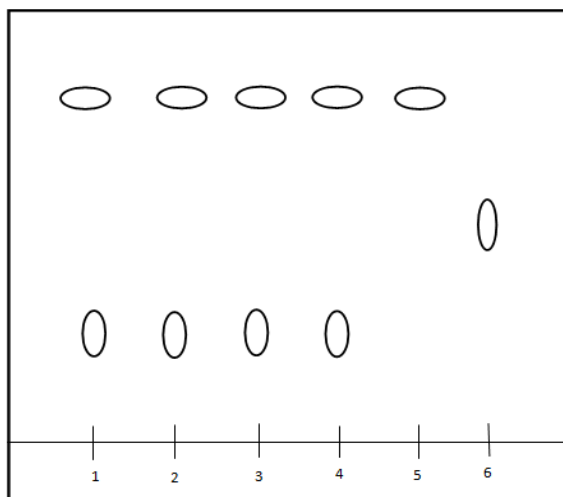


Рис.12. Результаты ТСХ-анализа дубильных веществ в водных извлечениях из высушенных плодов Рябины черноплодной:

1- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории республики Адыгея; 2- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Воронежской области; 3- извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Алтайского края; 4 – извлечение из плодов аронии, заготовленных на территории Калининградской области; 5- РСО кислоты галловой; 6- РСО танина;

В ходе анализа на пластине для всех четырех образцов были обнаружены два черно-синих пятна, одно из которых соответствовало по значению R_f кислоте галловой ($R_f=0,89$). Второе пятно идентифицировано не было.

3.4. Изучение органических кислот плодов Рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии

В различных органах растений органические кислоты содержатся в виде комплекса и распределены неравномерно: в плодах и ягодах преобладают свободные кислоты, в листьях содержатся главным образом связанные кислоты [55]. Именно поэтому на следующем этапе представлялось интересным провести определение и разделение суммы органических кислот плодов аронии на отдельные компоненты методом тонкослойной хроматографии.

Для качественной идентификации органических кислот в плодах аронии использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках марки «Sorbifil».

Элюирование проводили в системе: Этилацетат – кислота уксусная – кислота муравьиная – вода (100:11:11:25). Высота подъема фронта растворителя – 8 см. В качестве стандартных образцов использовали ГСО щавелевой, аскорбиновой, лимонной кислот. Исследуемое водное извлечение из сырья наносили на пластину в количестве 20 мкл. Детектирующим реагентом служил спиртовой раствор бромкрезолового зеленого 0,2% [95,97]. Пластины высушивали в сушильном шкафу до исчезновения запаха растворителя. При этом органические кислоты проявлялись в виде пятен желтого цвета на синем фоне пластинки. Общий вид полученной хроматограммы представлен на рисунке 13:

Таблица 7. Элюирующие системы

№ п/п	Состав элюента	Полярность
1	н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (5:0,5:2)	5,72
2	н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:5)	7,26
3	н-бутанол – кислота муравьиная (3:1)	4,43
4	н-бутанол – кислота муравьиная – вода (250:25:297)	7,25
5	Этилацетат – кислота муравьиная (4:1)	4,72
6	Этилацетат – кислота муравьиная - вода (3:1:1)	5,88
7	Этилацетат – кислота уксусная – кислота муравьиная – вода (100:11:11:25)	5,62
8	Гексан – диэтиловый эфир (8:2)	0,34
9	Хлороформ – спирт этиловый (9:1)	4,12

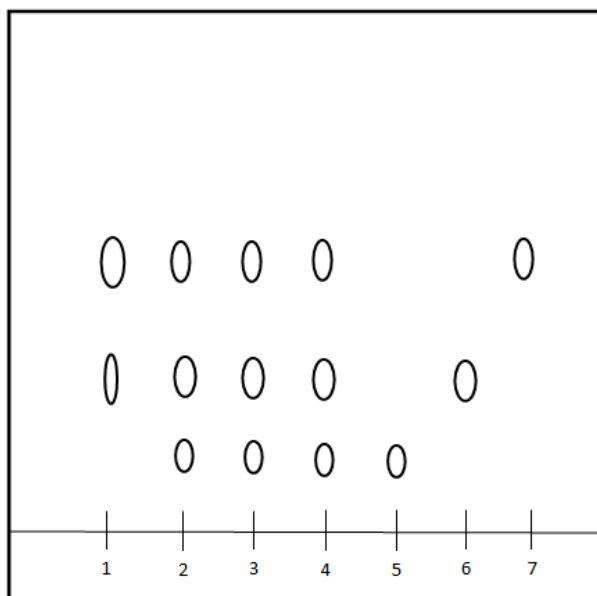


Рис.13. Результаты ТСХ-анализа органических кислот в водных извлечениях из высушенных плодов Рябины черноплодной:

1- извлечение из плодов, заготовленных на территории Воронежской области; 2 - извлечение из плодов, заготовленных на территории республики Адыгея; 3 - извлечение из плодов, заготовленных на территории Алтайского края; 4 - извлечение из плодов, заготовленных на территории Калининградской области; 5 – РСО щавелевой кислоты; 6 - РСО лимонной кислоты; 7 – РСО аскорбиновой кислоты;

Анализируя данные рисунка 13, можно сделать вывод о том, что состав органических кислот в извлечениях из высушенных плодов аронии, заготовленных в различных местах произрастания, несколько отличен. Так, в извлечении, из плодов, заготовленных на территории Воронежской области обнаружены 2 зоны, соответствующие по величине R_f ГСО кислоты лимонной, аскорбиновой ($R_f = 0,28; 0,56$, соответственно). Для остальных образцов наблюдалось три зоны, соответствующих по величине R_f ГСО щавелевой, лимонной, аскорбиновой кислот.

Таким образом, на основании данных проведенного исследования, можно сделать вывод о том, что качественный состав флавоноидов и дубильных веществ не зависит от места произрастания. На качественный состав антоциановых

соединений и органических кислот оказывает влияние место произрастание, а, предположительно, тип почв, на котором произрастало растение.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В результате исследований были подобраны оптимальные условия для хроматографического разделения антоциановых соединений, дубильных веществ и органических кислот высушенных плодов рябины черноплодной.

2. Методом ТСХ проведено определение антоцианов, флавоноидов, дубильных веществ и органических кислот плодов *Aronia melanocarpa*, заготовленных на территории Воронежской, Калининградской области, республики Адыгея и Алтайского края.

3. Проведена идентификация ряда индивидуальных веществ исследуемых классов БАВ аронии.

4. Установлена взаимосвязь качественного состава органических кислот и антоциановых соединений плодов рябины черноплодной от места произрастания, а, предположительно, от типа почвы и климатических условий.

5. В результате проведенного исследования методом ВЭЖХ были идентифицированы основные и минорные антоцианины в плодах рябины черноплодной сортов «Викинг», «Алтайская крупноплодная», «Вениса» и «Мичуринская».

6. Показано, что плоды рябины черноплодной различной сортовой принадлежности имеют одинаковый профиль антоцианинов. Основным компонентом антоцианов плодов аронии всех сортов является цианидин-3-галактозид (от 60,6 до 71,4% от суммы антоцианинов).

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ ARONIA MELANOCARPA

4.1. Определение суммы антоциановых соединений в плодах Рябины черноплодной

4.1.1. Подбор оптимальных условий извлечения антоцианов из растительного сырья

При изучении литературы нами не обнаружены данные по количественному анализу антоцианов высушенных и свежесобранных плодов Аронии черноплодной. Для количественного определения суммы антоцианов в высушенных и свежесобранных плодах аронии мы использовали спектрофотометрический метод. Данный метод ГФ XI (ГФ XIII) издания рекомендует для количественного определения антоцианов цветков василька, (пересчет ведется на цианидин-3,5-диглюкозид).

Для наиболее точного определения количества антоцианов в плодах необходимо установить условия для полного их извлечения из сырья для чего изучали влияние таких факторов, как измельченность сырья, температура, продолжительность экстракции и соотношение сырье-экстрагент.

На первом этапе работы были проведены исследования по подбору оптимального экстрагента для свежих и высушенных плодов. В качестве экстрагентов были использованы вода, водно-спиртовые смеси с различной концентрацией (40%, 60%, 70%, 95%), а также водно-спиртовые смеси тех же концентраций с добавкой кислоты хлороводородной до содержания 1%, по данным литературы, позволяющей стабилизировать окраску антоцианов. Содержание антоцианов в извлечении определяли спектрофотометрически по

величине оптической плотности в максимуме их поглощения в диапазоне $\lambda = 510\text{--}540$ нм.

Около 1 г (т.н.) измельченного и высушенного сырья помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл экстрагента. Навеску свежего сырья отбирали из гомогенизированной массы, полученной при измельчении свежих плодов в мельнице – «волчке». Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане 90 минут. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры, извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл. После соответствующих разведений (для высушенного сырья 1:15; для свежего – 1:50) пробу анализировали на спектрофотометре «Hitachi U-1900». О количестве антоцианов, перешедших из сырья в извлечение, судили по величине оптической плотности в характерном для антоцианов максимуме поглощения [90,91]. Результаты определений представлены в таблице 8:

Таблица 8. Оптическая плотность извлечений из плодов аронии, полученных с применением различных экстрагентов

Концентрация этанола, %	Оптическая плотность извлечения из высушенного сырья*	Оптическая плотность извлечения из свежего сырья**
40	0.68	0.43
60	0.43	0.35
70	0.35	0.31
95	0.16	0.21
Вода	0.51	0.16
40+1%НСІ	0.86	2.10
60+1%НСІ	0.83	2.09
70+1%НСІ	0.84	2.10
95+1%НСІ	0.17	2.11
Вода+1%НСІ	0.86	2.12

Перед спектрофотометрированием пробу разбавляли:

** - в 15 раз; ** - в 50 раз.*

На основании результатов данного этапа исследования было установлено, что экстрагирующая способность нейтральных спирто-водных смесей снижается с увеличением концентрации спирта в экстрагенте. Закономерность сохраняется при переходе от высушенного к свежему сырью, несмотря на существенные отличия в механизме извлечения, связанные со структурой измельченного растительного материала. Максимальной извлекающей способностью среди нейтральных экстрагентов и для свежего, и для высушенного растительного сырья обладает спирт этиловый с концентрацией 40% [94,122].

Извлечение не подкисленной водой достаточно эффективно для высушенного сырья, но наименее эффективно – для свежего.

При одинаковых условиях экстракции одним и тем же нейтральным экстрагентом из свежего сырья извлекается примерно в 2 – 3 раза больше антоцианов, чем из высушенного.

При экстрагировании антоцианов из сырья подкисленными экстрагентами можно отметить отсутствие зависимости эффективности извлечения от концентрации спирта в экстрагенте (исключением является результат, полученный при экстракции 95%-ным подкисленным этанолом из высушенного сырья). Можно предположить, что на извлечение антоцианов в большей степени влияет кислотное составляющее экстрагента. Высказанное предположение подтверждается данными по извлечению антоцианов из сырья подкисленной водой.

Надо отметить, что и в случае подкисленных экстрагентов из свежего сырья извлекается антоцианов значительно (в 8-10 раз) больше, чем из высушенного. Подобные отличия могут быть связаны с разным механизмом извлечения антоцианов из сырья. Из высушенного измельченного сырья они извлекаются за счет десорбции и диализа через клеточные мембраны; из свежего – по облегченному механизму - за счет вымывания из разрушенных при измельчении клеток.

В следующей серии экспериментов была исследована эта зависимость влияние степени измельчения высушенного растительного сырья на процесс извлечения из него антоцианов.

В работе использовали три различных фракции высушенных измельченных плодов аронии с размером частиц 0.1 – 0.25 мм; 0.25 – 0.5 мм и 0.5 – 1.0 мм. Результаты извлечения из них антоцианов представлены в табл 9:

Таблица 9. Зависимость оптической плотности извлечений из плодов аронии от степени измельченности растительного сырья

Фракция измельченных высушенных плодов аронии, мм	Оптическая плотность извлечения	
	Этанол 40%*	Этанол 40% подкисленный**
0.5-1.0	0.68	0.43
0.2-0.5	0.52	0.84
0.1-0.2	0.53	0.98

Перед спектрофотометрированием пробу разбавляли:

** - в 15 раз; ** - в 50 раз.*

На основании данных таблицы можно сделать вывод о том, что оптимальной степенью измельчения при использовании нейтрального этанола является фракция 0.5-1.0 мм. Дальнейшее измельчение нецелесообразно.

В случае использования подкисленного экстрагента с уменьшением размера частиц сырья степень извлечения возрастает. Оптимальный результат получен для фракции 0.1-0.2 мм.

На следующем этапе было подобрано оптимальное время экстрагирования 40 % этанолом для высушенного и свежего сырья Аронии черноплодной. Анализ проводили с использованием следующих временных интервалов: 5мин., 10мин., 30мин., 60мин., 90мин. Результаты исследования представлены на рис.14, по которым можно сделать вывод о том, что оптимальным временем экстрагирования в случае высушенного и свежего сырья является время 60 мин.

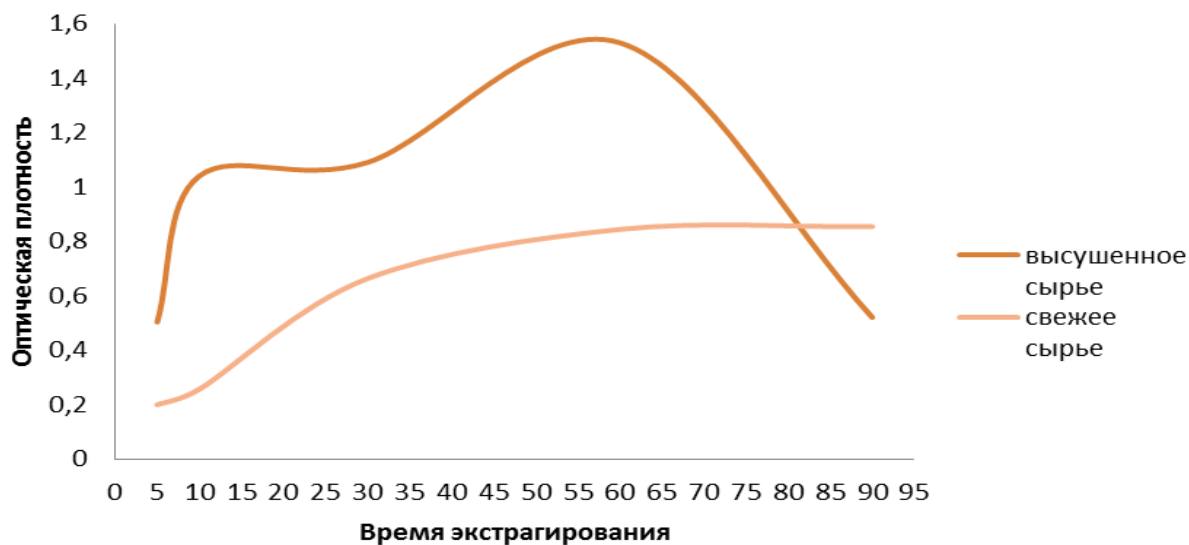


Рис14. Изменение оптической плотности 40% спиртовых извлечений из плодов аронии в зависимости от времени экстрагирования антоцианов из высушенного и свежего сыра.

На основании выбранных параметров экстрагирования устанавливали оптимальное соотношение сырье - экстрагент при проведении извлечения. Результаты определения антоциановых соединений в извлечениях из высушенного и свежего сыра представлены на рис. 15:

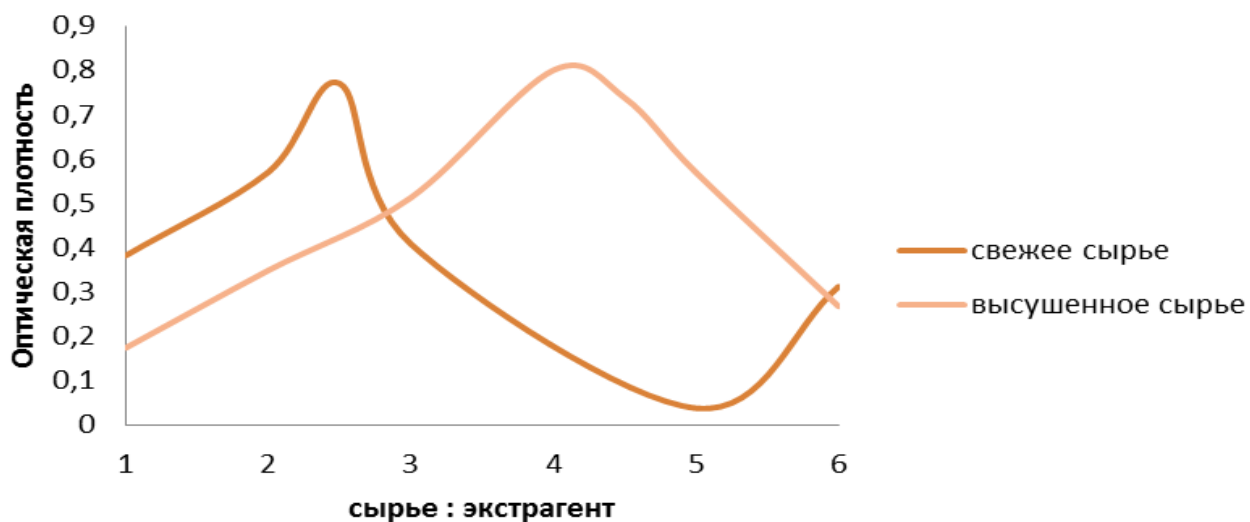


Рис.15. Результаты определения оптической плотности 40% спиртовых извлечений из высушенного и свежего сыра при различном соотношении сырье – экстрагент. 1 – 1:10, 2 – 1:20; 3 – 1:30; 4 – 1:40; 5 – 1:50; 6 – 1:60

Следовательно, максимальный выход антоцианов в извлечение наблюдается при следующих соотношениях сырье – экстрагент: для высушенного сырья - 1:40, для свежего – 1:25.

4.1.2 Определение суммы антоциановых соединений в плодах аронии

Сравнивая между собой плоды аронии разных сортов, можно сделать вывод о различиях в количестве (а, скорее всего, и в качественном составе) извлекаемых в аналогичных условиях экстрактивных веществ. Этот факт, предположительно, можно связать с действием таких факторов как: сортовые особенности, различные условия произрастания (влажность, температура, освещенность, тип почв и т.д.) [88].

На следующем этапе было проведено количественное определение содержания суммы антоциановых соединений в плодах аронии различных сортов [90].

Объектами изучения служили образцы свежесобранных и высушенных плодов рябины черноплодной, заготовленных на территории Воронежской области, Алтайского края, республики Адыгея и Калининградской области в период сентябрь - октябрь 2014г.

Полученные результаты представлены в таблице 10:

Таблица 10. Количественное содержание антоцианов в плодах
Рябины черноплодной

Группа БАВ	Содержание БАВ, %				
	Свежесобранные плоды, сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Викинг» Республика Адыгея	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Вениса» Калининград-ская область
Антоцианы	4,60±0,015	3,7±0,011	1,3±0,011	0,98±0,003	1,53±0,034

Анализируя данные таблицы 10, можно сделать вывод о том, что наибольшее количество антоцианов содержат свежесобранные плоды аронии. Сушка незначительно снижает содержание антоциановых соединений в плодах. Образцы сорта «Мичуринская» лидируют по содержанию данной группы соединений (содержание антоцианов в нем превышает более, чем в 2 раза содержание в других образцах).

4.1.3. Расчет основных параметров валидации используемых методик

Согласно ОФС «Валидация фармакопейных методов», каждая разрабатываемая методика подлежит валидации. Валидация аналитического метода - это процесс лабораторного изучения его пригодности для получения результата с достаточной точностью и прецизионностью. Валидация фармакопейных методов проводится на этапе подготовки НД на новые лекарственные средства или при пересмотре их в дальнейшем. Основная цель валидации - подтверждение обоснованности выбора метода для определения показателей и норм качества фармацевтической продукции по каждому разделу НД [60].

Для методик определения количественного содержания действующих веществ в качестве основных валидационных характеристик выступают: подлинность, прецизионность (сходимость, воспроизводимость), специфичность, линейность, аналитическая область методики.

Нами была определена и рассчитана прецизионность (сходимость, воспроизводимость) методик количественного определения антоцианов в плодах рябины черноплодной следующими методами: спектрофотометрией с расчетом содержания по величине удельного показателя поглощения (ϵ) и спектрофотометрией с применением в качестве стандартного образца кобальта сернокислого. Кроме того, был установлен предел количественного определения.

Определение прецизионности аналитических методов

Прецизионность аналитического метода характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Прецизионность зависит только от случайных факторов

и требует знания истинного значения измеряемой величины. Она выражается величиной относительного стандартного отклонения (коэффициентом вариации), доверительным интервалом или относительной ошибкой определения. Экспериментальные показатели прецизионности - повторяемость (сходимость) и воспроизводимость.

Повторяемость (сходимость) характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных одним и тем же методом, на идентичных образцах, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, на одном и том же оборудовании, в пределах короткого промежутка времени.

При определении сходимости выполняли 6 параллельных определений в одних условиях на одном и том же оборудовании. Полученные данные представлены в таблице 11:

Таблица 11. Результаты определения показателя сходимости при анализе АЦ в плодах рябины черноплодной

Спектрофотометрия с расчетом содержания по величине ϵ		Спектрофотометрия с применением в качестве стандартного образца кобальта сернокислого	
Соотношение сырье:экстрагент	Относительное стандартное отклонение, %	Соотношение сырье:экстрагент	Относительное стандартное отклонение, %
1:250	1,5	1:250	2,4

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что величина относительного стандартного отклонения для всех выполненных измерений не более 3%, что соответствует требованию к методикам количественного определения.

Воспроизводимость характеризует меру совпадения результатов измерений, полученных одним и тем же методом на идентичных образцах, в разных лабораториях, разными операторами, на разном оборудовании.

При определении показателя воспроизводимости для спектрофотометрической методики исследования проводили на разных приборах – СФ-2000 и спектрофотометре Hitach U1900.

Для этого проводили 6 параллельных определений при анализе 100% концентрации, позволяющей статистически рассчитать эти параметры. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12. Результаты определения показателя воспроизводимости при анализе антоцианов плодов рябины черноплодной

Спектрофотометрия с расчетом содержания по величине ϵ		Спектрофотометрия с применением в качестве стандартного образца кобальта сернокислого	
Hitachi U1900	СФ-2000	Hitachi U1900	СФ-2000
1,5	1,6	2,4	2,5

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что при определении сходимости и воспроизводимости результатов величина относительного стандартного отклонения для спектрофотометрии не превышает 2 % при расчете содержания по величине ϵ и 3% соответственно при использовании в качестве стандартного образца кобальта сернокислого.

Установление предела количественного определения

Кроме основных валидационных параметров был установлен такой показатель, как предел количественного определения.

Предел количественного определения - параметр количественного определения для низших уровней содержания веществ в пробе образцов. Это минимальная концентрация аналита в образце, которая может быть определена с приемлемой точностью в условиях анализа. Выражается концентрацией аналита в образце.

Согласно требованиям НД [60] предел количественного определения не относится к параметрам, подлежащим определению при проведении валидации метода количественного определения действующих веществ.

Согласно проекту ОФС «Валидация фармакопейных методов» [60] для инструментальных методов нижней границей определения является концентрация, дающая сигнал в 10 раз превышающий фоновый (соотношение сигнал - помеха 10:1). Фоновый сигнал измеряют, анализируя контрольные пробы, не содержащие действующих веществ (например, раствор плацебо в том же разведении).

Для этого эксперимент проводили в 6 параллельных пробах с минимальной концентрацией. В качестве плацебо использовали тот экстрагент (этанол), которым проводили извлечение антоцианов из сырья. Результаты определения приведены в таблице 13.

Таблица 13. Результаты установления предела количественного определения антоцианов плодов рябины черноплодной методом

Спектрофотометрия с расчетом содержания по величине ϵ			Спектрофотометрия с применением в качестве стандартного образца кобальта сернокислого		
Фон	Оптическая плотность	Соотношение сырьё:экстрагент	Фон	Оптическая плотность	Соотношение сырьё:экстрагент
0,002	0,02	1:20	0,002	0,02	1:20

По данным таблицы, антоцианы СФ методом можно определить в растворах с концентрацией 1:20.

Таким образом, в результате проведенных исследований было проведено сравнение спектрофотометрических методик с расчетом содержания по величине удельного показателя поглощения и с применением в качестве стандартного образца кобальта сернокислого. Показано, что обе методики могут быть использованы для анализа содержания АЦ в растительных объектах. Установлено, что спектрофотометрическая методика расчета содержания по удельному показателю преломления обладает более высокой чувствительностью и равнозначным пределом количественного определения АЦ, т.е. может быть использована для количественного содержания антоцианов в плодах аронии.

4.1.4 Исследование возможности интенсификации процесса экстрагирования суммы антоциановых соединений из плодов рябины черноплодной

К настоящему времени накоплен большой опыт по использованию микроволнового излучения в различных отраслях промышленности, в науке, технике, медицине и быту [70,72]. Однако в отечественной литературе этому вопросу посвящено не так много работ, в то время как за рубежом аспекты применения микроволн обсуждаются достаточно активно. При этом в ряде работ убедительно показано, что микроволновое электромагнитное излучение является наиболее эффективным методом, позволяющим существенно интенсифицировать извлечение ряда биологически активных веществ из природных материалов, сохраняя их свойства, что гарантирует получение безопасной в экологическом отношении продукции [117,120].

Поскольку антоцианы относятся к полифенольным соединениям, которые могут окисляться под действием разных факторов, необходимо было исследовать устойчивость антоцианов при их извлечении в разных условиях.

Контроль содержания антоцианов в извлечениях проводили спектральным методом в характерной для них области поглощения ($\lambda=510-550$ нм).

В качестве основных способов, которые могут повлиять на степень извлечения антоцианов из высушенных плодов рябины черноплодной были выбраны:

1. Нагревание на кипящей водяной бане, $t=90^{\circ}\text{C}$);
2. Воздействие СВЧ-излучения;

Извлечение антоцианов из плодов аронии проводили с использованием ранее разработанной нами методике [87]. Воздействие СВЧ-излучения обеспечивали выдерживанием экстракционной емкости в бытовой микроволновой печи в течение различных отрезков времени. Полученные водно-спиртовые вытяжки анализировали на содержание антоцианов спектрофотометрическим методом, предварительно разбавляя их до слабо-розового окрашивания раствора. Полученные кинетические кривые извлечения антоцианов из сырья представлена на рис.16,17:

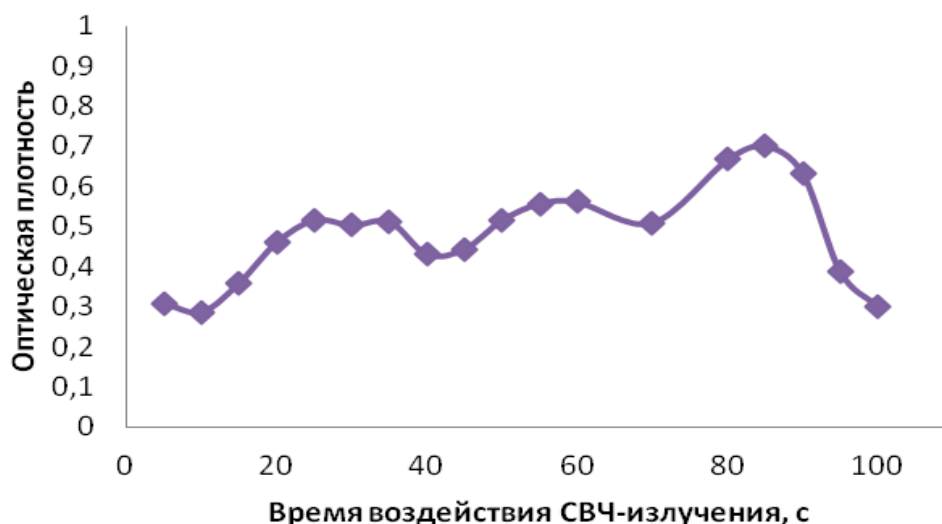


Рис.16. Изменение оптической плотности 40% спиртовых извлечений из высушенных плодов аронии в зависимости от времени экстрагирования при воздействии СВЧ-излучения.

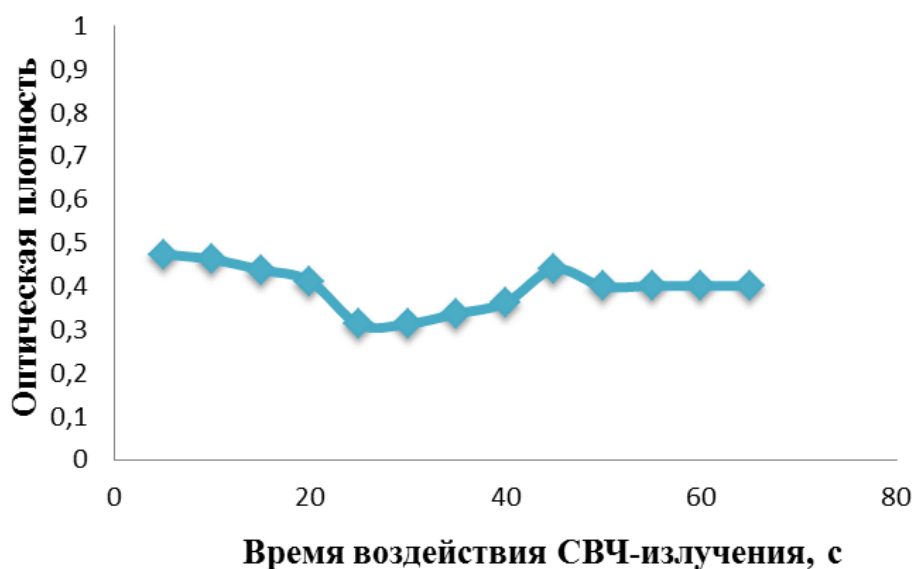


Рис.17. Изменение оптической плотности 40% спиртовых извлечений из свежесобранных плодов аронии в зависимости от времени экстрагирования при воздействии СВЧ-излучения.

Из рисунка 16 видно, что кривая извлечения антоцианового комплекса имеет волнообразный вид, что может быть связано со ступенчатым чередованием воздействия излучения на выход данной группы биологически активных веществ. Данный эффект может объясняться цикличностью магнетрона, лежащего в основе работы СВЧ-печи. После 85 секунды воздействия наблюдается резкое снижение

оптической плотности, что свидетельствует о снижении содержания антоциановых соединений в извлечении из высушенных плодов аронии. Данное снижение может объясняться как частичным разрушением антоцианов под воздействием излучения, так и изменением состояния растительного сырья (например, его переизмельчением под действием СВЧ-колебаний) с образованием новой развитой поверхности, на которой возможна вторичная адсорбция уже вышедших в извлечение антоцианов.

Анализируя рисунок 17, необходимо отметить, что кривая извлечения антоцианового комплекса имеет вид прямой с 5 по 20 секунду. К 25 секунде наблюдается снижение содержания антоциановых соединений в полученном извлечении, связанное, вероятно, затруднениями, касающимися выхода антоцианов из вакуолей клеточного сока, в которых содержится данная группа БАВ. К 30 секунде наблюдается постепенное увеличение выхода антоцианового комплекса, что может быть связано с разрывом вакуолей клеточного сока под действием СВЧ-излучения.

Максимальный выход антоцианов наблюдается к 45 секунде воздействия СВЧ-излучения. После 45 секунду воздействия наблюдается постоянство оптической плотности, что свидетельствует об одинаковом содержании антоциановых соединений в извлечении из свежесобранных плодов. Данный факт может объясняться, вероятно, полным истощением лекарственного растительного сырья в отношении антоцианового комплекса.

Таким образом, оптимальным временем воздействия используемого излучения, приводящего к максимальному выходу антоцианов из высушенных плодов аронии, можно считать время, равное 85 секундам, для свежесобранных – 45 секунд.

В таблице 14 представлены сравнительные данные по максимальному извлечению антоцианов из высушенных и свежесобранных плодов аронии в наиболее часто рекомендуемых условиях (длительное нагревание на водяной

бане) и в условиях интенсификации процесса СВЧ-обработкой экстракционной смеси.

Таблица 14. Зависимость эффективности процесса извлечения антоциановых соединений из высушенных и свежесобранных плодов рябины черноплодной от метода экстрагирования

Способ извлечения	Время достижения максимального содержания антоцианов в извлечении, t, сек	Высушенные плоды рябины черноплодной *	Свежесобранные плоды **
		Значение оптической плотности извлечения в максимуме поглощения антоцианов при $\lambda=520$ нм, А	
Экстрагирование на кипящей водяной бане	3600	0,680	0,430
Экстрагирование при воздействии СВЧ-излучения	85	0,701	0,440

Перед спектрофотометрированием пробу разбавляли:

** - в 15 раз извлечение, полученное из высушенных плодов;*

*** - в 50 раз извлечение, полученное из свежесобранных плодов;*

На основании данных, представленных в таблице 14, можно сделать вывод о том, что воздействие СВЧ-излучения позволяет значительно повысить эффективность процесса извлечения антоцианов из высушенных и свежесобранных плодов рябины черноплодной.

Применение СВЧ- излучения позволяет интенсифицировать процесс, сократив время экстрагирования с 60 минут до 1 минуты, 25 секунд, несколько повысив при этом и полноту извлечения антоцианов из высушенного сырья и с 60 минут

до 45 секунд в случае свежесобранных плодов, о чем свидетельствуют значения оптических плотностей извлечений (табл.14).

Таким образом, оптимальным временем воздействия анализируемого излучения, приводящего к максимальному выходу антоцианов из высушенных плодов аронии, можно считать время, равное 85 секундам, из свежесобранных плодов – 45 секунд.

Изучили возможность интенсификации процесса экстрагирования суммы антоциановых соединений из ЛРС с применением СВЧ-излучения; Установили, что СВЧ-излучение позволяет сократить время, затрачиваемое на выделение антоцианов из ЛРС, повысив полноту их извлечения. Следовательно, СВЧ-излучение может быть рекомендован в качестве альтернативного способа экстрагирования суммы антоциановых соединений из ЛРС.

4.2. Определение суммы флавоноидов методом УФ-спектрофотометрии в растительном сырье Рябины черноплодной

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин осуществляли спектрофотометрически при $\lambda = 410\text{ нм}$ по величине оптической плотности в максимуме поглощения комплекса флавоноидов со спиртовым раствором алюминия хлорида [60].

Данный метод позволяет проводить количественное определение флавоноидов в присутствии полисахаридов, танина, хлорофилла, каротиноидов, фенолкарбоновых кислот, сапонинов и других классов соединений, содержащихся в исходном сырье.

В качестве стандартного вещества использовали 0,1% спиртовой раствор рутина, спектр поглощения которого с алюминия хлоридом в предлагаемых условиях близок со спектром поглощения комплекса флавоноидов плодов аронии [90].

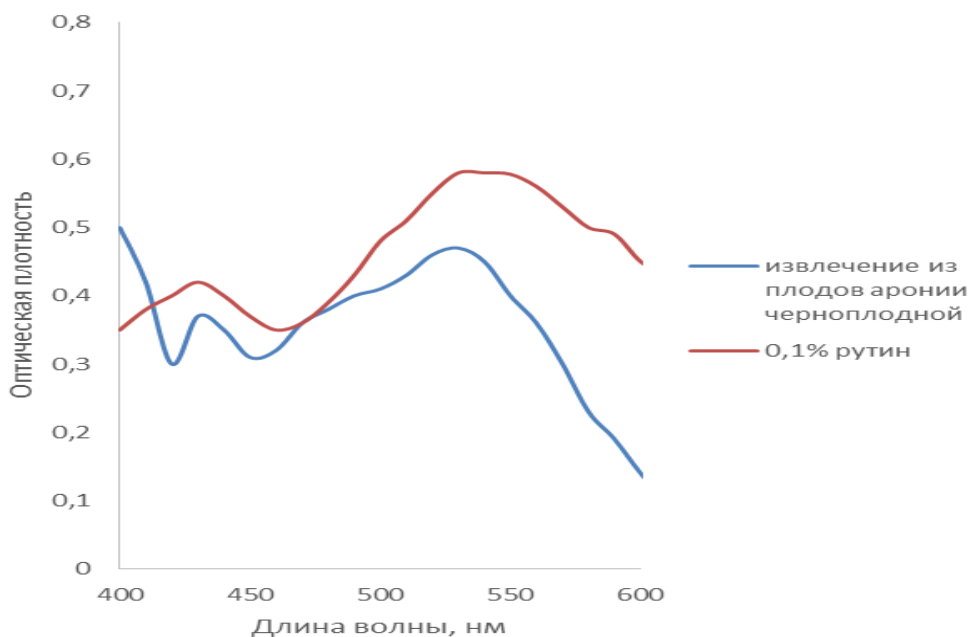


Рис.18. Спектры поглощения комплексов с алюминия хлоридом флавоноидов извлечения из плодов рябины черноплодной и стандартного раствора рутина

На рис. 18 представлен спектр поглощения извлечения из плодов рябины черноплодной и спектр стандартного раствора рутина, полученные после добавления к ним раствора алюминия хлорида. Совпадение максимумов в спектрах подтверждает возможность проведения соответствующих определений.

Таблица 15. Количественное содержание флавоноидов в плодах

Рябины черноплодной

Группа БАВ	Содержание БАВ, %				
	плоды, сорт «Мичуринская» Воронежская	Сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Викинг» Республика Адыгея	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Вениса» Калининградская область
Флавоноиды	2,7±0,010	1,8±0,097	2,2±0,021	1,5±0,023	1,6±0,080

Анализируя данные таблицы 15, можно сделать вывод о том, что наибольшее количество флавоноидов содержится в свежесобранных плодах сорта «Мичуринская», заготовленных на территории Воронежской области.

Сушка сырья приводит к снижению содержания всех имеющихся групп БАВ, в том числе флавоноидов.

4.3. Определение суммы органических кислот растительном сырье Рябины черноплодной

Органические кислоты содержатся почти во всех плодах и овощах, придавая им приятный вкус, задерживают рост бактерий, оказывают положительное влияние на работу желудочно-кишечного тракта и другие системы организма. Поэтому актуальным является их количественное определение.

Количественное содержание суммы органических кислот устанавливали с применением алкаиметрического титрования по стандартной методике [90,114]. Полученные данные представлены в табл. 16:

Таблица 16. Количественное содержание органических кислот в плодах *Aronia melanocarpa*.

Группа БАВ	Содержание БАВ, %				
	Свежесобранные плоды, сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Викинг» Республика Адыгея	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Вениса» Калининград-ская область
Органические кислоты	5,3±0,01	1,66±0,091	1,52±0,025	1,53±0,026	1,71±0,085

На основании данных, представленных в таблице, можно сделать вывод о том, что максимальное содержание органических кислот обнаружено в

свежесобранных плодах сорта «Мичуринская». В высушенных плодах содержание кислот значительно меньше. Это может быть связано с тем, что свежие плоды содержат в своем составе как свободные органические кислоты, так и связанные. При высушивании при температуре 60°C в клеточном соке лекарственного растительного сырья протекают процессы гидролиза (ферментативного и не ферментативного), которые могут сопровождаться изменением состава органических кислот в сырье и приводит к снижению их суммы в целом.

Ввиду того, что аскорбиновая кислота вносит огромный вклад в формирование фармакологического эффекта плодов аронии, количественное определение данного биологически активного вещества можно считать актуальным.

Количественное определение аскорбиновой кислоты в плодах аронии проводили титриметрическим методом. Данный метод ГФ XI (ГФ XIII) издания рекомендует для количественного определения аскорбиновой кислоты плодов шиповника [60]. Полученные данные представлены в табл. 17:

Таблица 17. Количественное содержание кислоты аскорбиновой в плодах Рябины черноплодной

Группа БАВ	Содержание БАВ, %				
	Свежесобранные плоды, сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Викинг» Республика Адыгея	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Венуса» Калининград-ская область

Кислота аскорбиновая	4,30±0,010	1,6±0,070	0,03±0,071	0,032±0,013	1,53±0,024
---------------------------------	-------------------	------------------	------------	-------------	------------

Анализ табличных данных позволяет сделать вывод о том, что преобладающее количество кислоты аскорбиновой содержится в свежесобранных плодах аронии. Сушка сырья приводит к особенно резкому снижению содержания для кислоты аскорбиновой. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты обнаружено в плодах сорта «Мичуринская», что может быть связано с наиболее благоприятными климатическими условиями.

На следующем этапе исследования было проведено определение в плодах аронии качественного состава и количественного содержания ряда индивидуальных органических кислот. Для определения использовали метод капиллярного электрофореза на приборе марки «Капель-105/105М». Полученные данные представлены в табл. 18:

Таблица 18. Содержание органических кислот (%) в плодах рябины черноплодной (метод капиллярного электрофореза).

Наименование показателей	НД на методы испытания	Сорт «Мичуринская» Воронежская обл.	Сорт «Викинг», Республика Адыгея	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Вениса» Калининградская область
Яблочная	М 04-74-2012	1,188	1,302	1,287	1,312
Янтарная		0,015	0,008	0,007	0,010
Масляная		Менее 0,05*	Менее 0,05*	Менее 0,05*	Менее 0,05*
Фумаровая		0,006	0,003	0,002	0,004
Лимонная		0,309	0,113	0,125	0,275
Уксусная		0,036	0,027	0,026	0,03
Пропионовая		0,03	0,015	0,027	0,02
Сорбиновая		0,042	0,038	0,039	0,032

*нижний предел измерения

Анализируя полученные данные, представленные в таблице 18, можно сделать заключение, что во всех анализируемых образцах содержатся следующие органические кислоты: яблочная, янтарная, масляная, молочная, фумаровая, лимонная, уксусная, пропионовая и сорбиновая. Образец, заготовленный на территории Воронежской области, лидирует по количественному содержанию таких органических кислот, как: янтарная, молочная, фумаровая, лимонная, уксусная, пропионовая и сорбиновая кислоты. Приблизительно одинаковое количество яблочной кислоты обнаружено в образцах, заготовленных на территории республики Адыгея и Калининградской области. В двух других образцах содержание этой кислоты несколько меньше. Содержание масляной кислоты во всех четырех образцах одинаково.

4.4. Определение суммы дубильных веществ растительном сырье Рябины черноплодной

На первом этапе исследований содержание дубильных веществ определяли по методикам ГФ XI (ГФ XIII) [60,19].

В виду того, что в химическом составе плодов аронии большое число других полифенольных соединений, которые способны легко окислять под действием раствора 0,1М KMnO_4 , фактически данным методом определяется сумма полифенольных соединений, целесообразно использовать альтернативный метод количественного определения.

Поэтому для количественного определения дубильных веществ использовали метод спектрофотометрии при длине волны $\lambda = 274,5\text{-}277,5\text{ нм}$ с использованием стандартного образца танина по методике [89,121]. Полученные данные представлены в табл. 19:

Таблица 19. Количественное содержание дубильных веществ в плодах *Aronia melanocarpa*.

Группа БАВ	Содержание БАВ, %				
	Свежесобранные плоды, сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Викинг» Республика Адыгея	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Вениса» Калининградская область
Дубильные вещества	*1,49±0,024	1,49±0,024	1,30±0,010	0,98±0,003	1,53±0,034
	**16,90±0,033	16,00±0,033	8,8±0,005	11,7±0,035	16,00±0,029

** Количество дубильных веществ определялось перманганатометрическим методом (0,1М KMnO₄)

* Количество дубильных веществ определялось спектрофотометрическим методом (СФ - УФ)

Анализируя данные таблицы 19, можно сделать вывод о том, что наибольшее количество дубильных веществ содержат свежесобранные плоды аронии. Содержание дубильных веществ в плодах сорта «Мичуринская» и сорта «Вениса» одинаково. Значительно меньшее количество данной группы БАВ обнаружено в плодах сорта «Алтайская крупноплодная» и «Викинг». Наиболее предпочтительным методом количественного определения дубильных веществ является метод спектрофотометрии.

4.5. Влияние различных способов консервации на содержание БАВ в сырье

На следующем этапе исследования было изучено влияние различных способов консервации на количественное содержание БАВ в сырье. С этой целью определяли содержание БАВ в высушенных и свежесобранных плодах аронии после их хранения в течение 3 и 6 месяцев от момента заготовки [129,130,131].

Объектом исследования служили образцы свежих и высушенных плодов рябины черноплодной, заготовленные на территории Воронежской области в период сентябрь - октябрь 2013 г, а также образцы свежезаготовленных и высушенных плодов, хранившиеся в течение 3 и 6 месяцев (свежие – в замороженном состоянии при $T = - 18^{\circ}\text{C}$). Лекарственное растительное сырье было стандартизовано по ГФ XI (ГФ XIII) [60,19].

На первом этапе работы был проведен количественный анализ групп БАВ в свежесобранных и высушенных плодах аронии [83].

Содержание антоцианов в извлечении определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «Hitachi U-1900» по величине оптической плотности в максимуме их поглощения в диапазоне $\lambda = 510\text{-}540\text{ нм}$. В расчетах использовали значение удельного коэффициента поглощения антоцианов 100, приведенное в работе [80].

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин осуществляли спектрофотометрически при $\lambda = 410\text{ нм}$ по величине оптической плотности в максимуме поглощения комплекса флавоноидов со спиртовым раствором алюминия хлорида [60].

Количественное содержание дубильных веществ определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 274,5\text{-}277,5\text{ нм}$ с использованием стандартного образца танина по методике [121].

Количественное содержание аскорбиновой кислоты определяли титриметрически согласно методике ГФ XI (ГФ XIII) [60,19].

Результаты определений в пересчете на абсолютно сухое сырье представлены в табл.20:

Таблица 20. Количественное содержание различных групп БАВ в плодах Рябины черноплодной

Группы БАВ	Содержание групп БАВ, %	
	Свежесобранные плоды	Высушенные измельченные плоды
Антоцианы	4,60±0,012	3,70±0,011
Флавоноиды	0,37±0,011	0,11±0,009
Дубильные вещества	1,49 ±0,015	1,02±0,010
Аскорбиновая кислота	4,30±0,010	1,62±0,013

Анализ табличных данных позволяет сделать вывод о том, что преобладающими группами БАВ в плодах аронии являются кислота аскорбиновая и антоцианы. Сушка сырья приводит к снижению содержания всех исследуемых групп БАВ, особенно резкому для кислоты аскорбиновой. В высушенном сырье доминирующую группу представляют антоцианы.

Поскольку интенсивную окраску плодам придают антоцианы, и они же упоминаются в ряде источников как доминирующая группа БАВ, а флавоноиды обеспечивают широкий спектр фармакологической активности плодов Аронии, свое дальнейшее исследование мы продолжили именно с этими группами БАВ.

На втором этапе исследования было изучено влияние различных способов консервации на количественное содержание БАВ в сырье. С этой целью определяли содержание антоцианов и флавоноидов в высушенных и свежесобранных плодах аронии после их хранения в течение 3 и 6 месяцев от момента заготовки.

Свежие цельные плоды хранили в морозильной камере при $T = -18^{\circ}\text{C}$. Высушенные, цельные и измельченные плоды хранили в полиэтиленовых пакетах в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Полученные данные в пересчете на абсолютно сухое сырье представлены в табл.21 и 22.

Таблица 21. Изменение содержания антоцианов в высушенных и свежих плодах Рябины черноплодной в процессе их хранения с использованием различных способов консервации

Сроки хранения	Содержание антоцианов, %		
	Свежесобранные плоды	Высушенные измельченные плоды	Высушенные цельные плоды
Свежезаготовленные	4,60±0,012	3,70±0,011	3,72±0,011
3 месяца	1,30±0,015	3,25±0,010	3,24±0,012
6 месяцев	0,36±0,010	3,17±0,020	3,22±0,015
9 месяцев	0,081±0,009	0,034±0,001	0,03±0,007
12 месяцев	0,031±0,001	0,028±0,009	0,027±0,002

Таблица 22. Изменение содержания флавоноидов в высушенных и свежих плодах Рябины черноплодной в процессе их хранения с использованием различных способов консервации

Сроки хранения	Содержание флавоноидов, %		
	Свежесобранные плоды	Высушенные измельченные плоды	Высушенные цельные плоды
Свежезаготовленные	0,37±0,009	0,11±0,010	0,13±0,010
3 месяца	0,20±0,010	0,10±0,009	0,12±0,009
6 месяцев	0,20±0,011	0,08±0,009	0,10±0,008
9 месяцев	0,15±0,012	0,07±0,007	0,08±0,001
12 месяцев	0,092±0,003	0,031±0,005	0,03±0,002

На основании полученных данных можно сделать вывод об устойчивости антоцианов в высушенном сырье в течение исследуемых сроков хранения. Заморозка плодов приводит к резкому снижению в них содержания антоцианов.

Значительно более устойчивы к заморозке флавоноиды, хотя и их содержание в замороженном сырье снижается почти вдвое уже через 3 месяца хранения.

Содержание флавоноидов в высушенном сырье остается почти без изменений, лишь чуть снижаясь к 6 месяцу хранения.

Существенной разницы в устойчивости БАВ при хранении сырья цельного и измельченного не выявлено.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные условия извлечения антоцианов на примере плодов, заготовленных на территории Воронежской области;

2. Проведено количественное определение комплекса антоциановых соединений плодов аронии с различных мест произрастания;

3. В результате проведенных исследований были изучены способы интенсификации процесса экстрагирования комплекса антоциановых соединений из плодов рябины черноплодной. Показано, что извлечения, полученные с применением СВЧ-излучения, содержат максимальное количество антоцианов по сравнению с другими способами интенсификации. Извлечение с помощью СВЧ-излучения можно рекомендовать в качестве альтернативного способа экстрагирования антоциановых соединений из лекарственного растительного сырья, способствующего интенсификации процесса;

4. Проведено количественное определение суммы флавоноидов, дубильных веществ и органических кислот в плодах аронии, заготовленных на территории Воронежской области, Калининградской области, республики Адыгея и Алтайского края;

5. Проведено определение антоцианов, флавоноидов, дубильных веществ и кислоты аскорбиновой в свежих и высушенных плодах рябины черноплодной;

6. Показано, что доминирующей группой БАВ в свежезаготовленных плодах аронии являются антоцианы и кислота аскорбиновая; в высушенных – антоцианы;

7. Получены данные об устойчивости антоцианов в высушенном сырье в течение исследуемых сроков хранения. Заморозка плодов приводит к резкому снижению в них содержания антоцианов;

8. Показано, что содержание флавоноидов в высушенном сырье остается почти без изменений, лишь чуть снижаясь к 6 месяцу хранения;

9. Содержание флавоноидов в замороженном сырье снижается почти вдвое уже через 3 месяца хранения.

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ МИКРО- И МАКРОЭЛЕМЕНТОВ, ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ПЕСТИЦИДОВ И РАДИОНУКЛИДОВ В ПЛОДАХ ИССЛЕДУЕМЫХ СОРТОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

Урбанизация – одна из основных социально-экологических проблем нашего времени. Нарастающее техногенное воздействие на урбосистемы со стороны промышленных комплексов, а также ТЭЦ, автотранспорта приводит к сильному загрязнению почв вредными веществами, снижению способности к самовосстановлению почв и деградации растительности. Токсиканты сравнительно быстро накапливаются в почвах городов и близлежащих районов и крайне медленно из них выводятся.

Мигрируя по пищевым цепям, микроэлементы могут накапливаться в органах и тканях растительных и животных организмов в токсичных концентрациях. Этот факт необходимо учитывать, так как в урбосистемах конечным звеном трофической цепи является человек.

В связи с этим целью дальнейших исследований являлся сравнительный анализ качественного состава микро- и макроэлементов, а также изучение содержания и динамики накопления тяжелых металлов, пестицидов и радионуклидов в плодах исследуемых сортов рябины черноплодной, заготовленных на различных территориях.

Подготовку образцов и определение микроэлементов проводили в соответствии с ГОСТ 26929-94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов», ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов» [56,57], а также руководствуясь методическими указаниями по атомно-абсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье [58].

Определение мышьяка в исследуемых объектах проводили по ГОСТ Р 51766-2001 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка» [59] на ААС С-115-М1.

Для определения макроэлементов использовали метод капиллярного электрофореза на приборе марки «Капель-105/105М». Метод основан на кислотном разложении проб, дальнейшем разделении и количественном определении катионов. Детектирование компонентов проводили по косвенному поглощению при длине волны 267 нм [75].

Определение фосфора проводили по ГОСТ 26657-97 «Методы определения содержания фосфора» титриметрическим методом [56].

Полученные результаты представлены в табл. 23,24,25:

Таблица 23. Количественное содержания пестицидов и радионуклидов в плодах Рябины черноплодной

Определяемые показатели, единицы измерения	«Мичуринская» Воронежская область	«Викинг» Республика Адыгея	«Алтайская крупноплодная» Алтайский край	«Вениса» Калининградская область
ДДТ и его метаболиты, мг/кг	<0,007	<0,007	<0,007	<0,007
ГХЦГ, мг/кг	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Цезий-137, Бк/кг	0±24,5	1,8±26,3	3,6±26,3	0±24,3
Стронций-90, Бк/кг	0±10,0	1,3±10,0	1,2±9,9	1,2±8,8

Таблица 24. Содержание микроэлементов в плодах Рябины черноплодной

Наименование показателей	НД на методы испытаний	Значение показателей			
		«Мичу-ринская» Воронеж-ская обл.	«Викинг» Республика Адыгея	«Алтайская крупноплодная» Алтайский край	«Вениса» Калинин-градская область
Содержание железа, мг/кг	ГОСТ 26928 от 01.07.1988	5,08	4,69	1,52	4,63
Содержание меди, мг/кг	ГОСТ 26931 от 01.12.1986	2,09	3,07	4,01	2,41
Содержание цинка, мг/кг	ГОСТ 30178 от 01.01.1998	9,33	15,02	14,73	2,43
Содержание марганца, мг/кг	ГОСТ Р 51637	4,94	3,21	2,64	3,65
Содержание кобальта, мг/кг	-	0,03	0,02	0,03	0,01
Содержание никеля, мг/кг	ГОСТ 28414 от 01.01.1991	2,09	1,73	0,51	0,97
Содержание хрома, мг/кг	МУ 01-19/47-11-92	2,78	0,21	0,5	0,34
Содержание свинца, мг/кг	ГОСТ 26929-94 от 01.01.1996	0,44	0,58	1,57	0,37
Содержание кадмия, мг/кг	ГОСТ 26929-94 от 01.01.1996	0,026	0,042	0,027	0,046
Содержание ртути, мг/кг	ГОСТ 26929-94 от 01.01.1996	0,018	0,003	0,003	0,003
Содержание мышьяка, мг/кг	ГОСТ Р 51766-2001 от 01.07.2002	0,07	0,06	0,06	0,07

Таблица 25. Сравнительная характеристика содержания макроэлементов в плодах Рябины черноплодной

Наименование показателей	НД на методы испытаний	«Мичурин-ская» Воронежс-кая область	«Викинг» Республика Адыгея	«крупноплодная» Алтайский край	Калинин-градская область
Массовая доля фосфора, %	ГОСТ 26657 от 01.01.1999	0,1	0,1	0,1	0,1
Массовая доля кальция, %	М 04-65-2010	0,17	0,29	0,24	0,23
Массовая доля натрия, %	-	0,14	0,12	0,18	0,14
Массовая доля калия, %	-	9,56	7,6	8,24	7,32
Массовая доля магния, %	М 04-74-2012	0,81	1,06	0,94	0,85

Проведенный анализ показал, что плоды рябины содержат широкий спектр микроэлементов, включающих Zn, Ni, Cr, Cu, Mn, Co, Mg [93]. Необходимо отметить высокое содержание железа, марганца и хрома в плодах сорта «Мичуринская», заготовленных на территории Воронежской области. Содержание других микроэлементов в данном образце находятся в пределах ПДК. Содержание цинка в плодах сорта «Викинг», произрастающих и заготовленных на территории республики Адыгея, превышает рекомендованные нормативы. Приблизительно равное содержание этого микроэлемента обнаружено в плодах сорта «Алтайская крупноплодная». Кроме данного микроэлемента отмечено высокое содержание меди.

Содержание токсичных тяжелых металлов (ртуть, мышьяк, кадмий, свинец) во всех исследуемых образцах не превышает рекомендованных нормативов.

Анализируя полученные данные, представленные в таблице 25, можно сделать вывод о том, что содержание фосфора находится на одном уровне во всех анализируемых образцах. В то же время, отмечено высокое содержание калия в плодах сорта «Мичуринская». Это можно связать с тем, что эти элементы играют важную роль в процессе биосинтеза продуктов первичного и вторичного метаболизма. Содержание остальных макроэлементов в анализируемых образцах находится практически на одном уровне.

Из данных таблиц 23,24 и 25 можно сделать заключение о значительной зависимости элементного состава от сорта, экологической обстановки и места произрастания растения, используемого в качестве лекарственного растительного сырья.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. В ходе проведенных исследований было отмечено высокое содержание железа, марганца и хрома в плодах сорта «Мичуринская»; высокое содержание цинка - в плодах сорта «Викинг» и «Алтайская крупноплодная»; меди - в плодах сорта «Алтайская крупноплодная».

2. Содержание токсичных тяжелых металлов (ртуть, мышьяк, кадмий, свинец) во всех исследуемых образцах не превышает рекомендованных нормативов.

3. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости контроля содержания в сырье как отдельных групп, доминирующих БАВ и тяжелых металлов, так и других эссенциальных микроэлементов.

Данный факт должен особенно учитываться при использовании ЛРС, заготавливаемого от растений различных сортов, произрастающих на различных территориях.

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ СЫРЬЯ РЯБИНЫ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

6.1. Изучение характеристик подлинности плодов Рябины черноплодной

6.1.1. Характеристика внешних признаков плодов Рябины

Арония черноплодная (*Aronia melanocarpa*) это небольшое листопадное дерево или кустарник, высотой до 3 метров, основной вид рода *Aronia*, семейства розоцветные (*Rosaceae*) [153].

Однолетние побеги красно-бурые, побеги старшего возраста темно-серые. Корневая система мощная, поверхностная, мочковатая, состоит из вертикально и горизонтально расположенных корней. В качестве лекарственного растительного сырья аронии используются плоды (*Fructus Aroniae melanocarpaе*).

Родина - Северная Америка; в России широко культивируется Их заготавливают от культивируемых растений в период сентябрь - первой половине октября [153].

Листья очередные, широкоовальные или обратно-яйцевидные, длиной 4-8 см и шириной 3-5 см, простые, цельные, летом ярко-зеленые, осенью красные; верхняя сторона листьев кожистая, глянцевая, гладкая, темно-зеленая, нижняя - слабоопушенная с беловато-матовым оттенком.

Цветки собраны по 12-35 шт. в плотных щитовидных соцветиях; лепестки белые или чуть розоватые.

Цветет арония в мае-июне, примерно через 2 недели после распускания листьев, цветение продолжается 12-15 дней. Позднее цветение аронии исключает возможность повреждения цветков весенними заморозками, что обеспечивает ежегодное плодоношение этого растения. Арония - самоопыляемое растение.

Плоды шаровидные или чуть вытянутые, яблокообразные, до 1,5 см в диаметре, голые, черные, блестящие, иногда с сизым налетом, реже темно-красные, сочные, кисловато-сладкие с вяжущим привкусом. Плоды созревают в августе-сентябре, не осыпаются до заморозков.



1



2

Рис.20. Общий вид плодов Рябины черноплодной

1- Свежесобранные плоды аронии

2- Высушенные плоды аронии

6.2. Изучение микроскопических признаков подов Рябины черноплодной

Одним из самых достоверных методов, позволяющих определить подлинность растительного сырья различными способами подготовки, является микроскопический анализ. При этом способ подготовки сырья зависит от ряда факторов.

На первом этапе исследования изучались анатомические признаки свежееизготовленного сырья аронии. При этом анализ проводился без предварительной подготовки плодов.

Для проведения эксперимента эпидермис отделяли от мякоти плода, с наружной поверхности, методом соскабливания снимали волоски.

Необходимо отметить наличие плотного эпидермиса с крупными, плотно прилегающими клетками почти правильной 5-и угольной формы. Оболочки клеток четкие с утолщением.

**А****Б**

Рис.21. Свежесобранные плоды Рябины черноплодной. Фрагмент мякоти плода. А - простые тонкостенные одноклеточные волоски (x400); Б - клетки эпидермиса с четкими утолщениями (x100)

На поверхности плода при соскабливании на месте остатка от чашечки найдены длинные тонкие одноклеточные волоски толщиной 20,9 мкм, длиной 0,47 мкм (рис.19.)

Мякоть тёмно-красного цвета, клетки располагаются рыхло, при этом в мякоти одиночно или группами располагаются каменистые клетки, друзы оксалата кальция и единичные кристаллы оксалата кальция, имеющие диаметр равный 11,76 мкм (рис.20.)

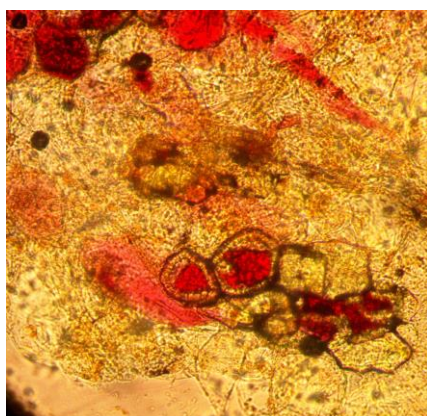
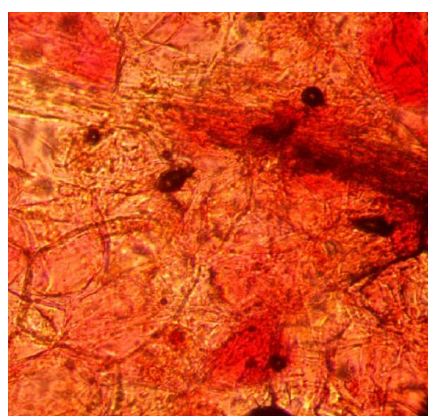
**А****Б**

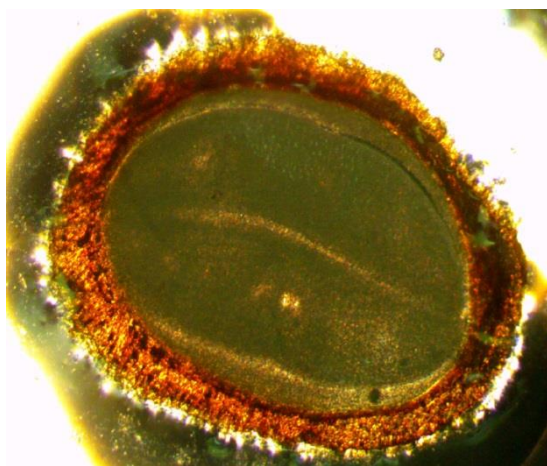
Рис.22. Свежесобранные плоды Рябины черноплодной. Фрагмент мякоти плода. А- каменистые клетки (x100); Б - клетки мякоти с друзами оксалата кальция (x100)

Семена аронии мелкие (толщина - 63,7 мкм, длина - 34,3 мкм, диаметр-16,7 мкм), поэтому для проведения анализа их запаивали в парафиновые кубики и делали поперечные срезы (рис.23.)

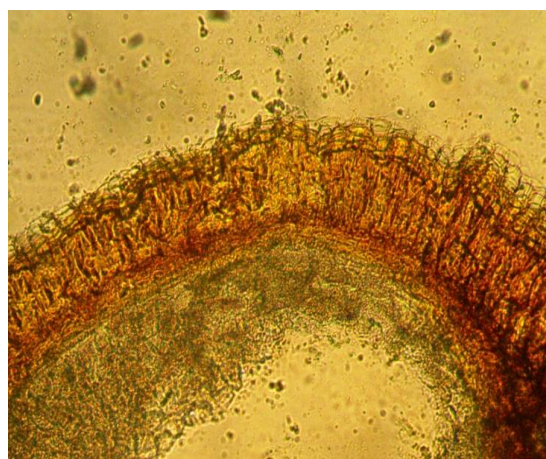


Рис.23. Семя, запаянное в парафиновый кубик

Анализируя поперечный срез семени обнаружили, что эпидермис семенной кожуры состоит из тонкостенных клеток, далее находится слой склеренхимы. В эндосперме и зародыше содержится жирное масло и алейроновые зерна. Семя представлено крупными семядолями, окруженными слоем ровных клеток. Полученные данные представлены на рис.24:



А



Б

Рис.24. Свежесобранные плоды Рябины черноплодной. Поперечный срез семени А - (x100), Б – (x400)

В связи с тем, что работ, касающихся изучения анатомических признаков высушенного сырья в литературе найдено не было представлялось интересным на

следующем этапе исследований проанализировать именно высушенные плоды рябины черноплодной.

Высушенные плоды аронии предварительно измельчали и подвергали микроскопическому анализу. Полученные данные представлены на рис.25.

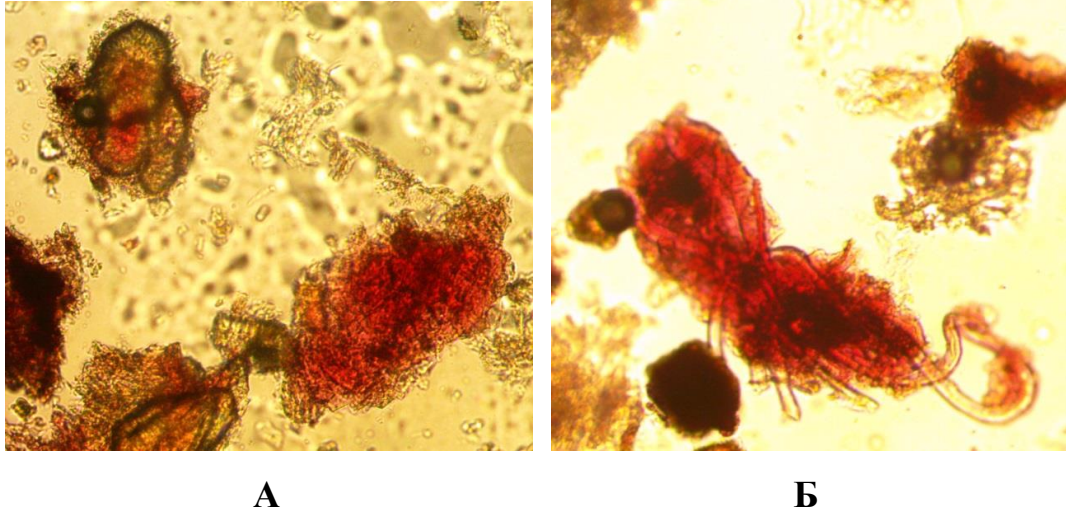


Рис.25. Высушенные плоды Рябины черноплодной. Поперечный срез плода без дополнительной обработки. А - клетки мякоти с друзами оксалата кальция и каменистые клетки (x100); Б - простые одноклеточные волоски (x100)

Исходя из полученных данных необходимо отметить, что определению анатомических признаков мешают пигменты и антоциановые соединения, присутствующие в сырье и окрашивающие основные диагностические элементы в темно-красный цвет.

Самылина с соавторами предлагает для анализа подобных окрашенных объектов применение кипячения сырья в 5% растворе щёлочи, с целью их обесцвечивания. Данная методика подготовки сырья была применена при изучении плодов аронии.

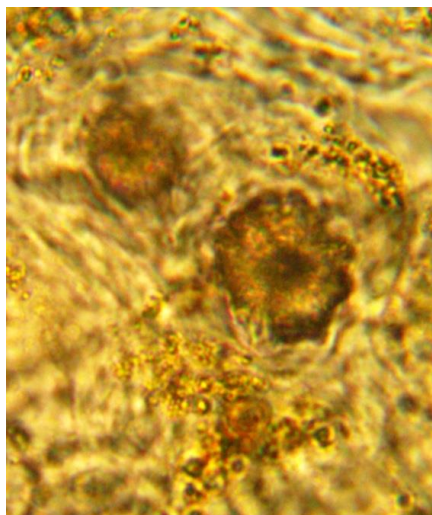
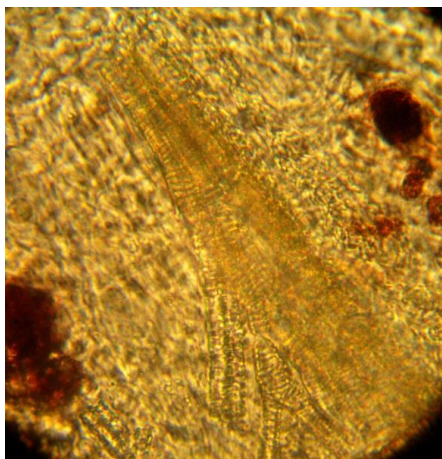
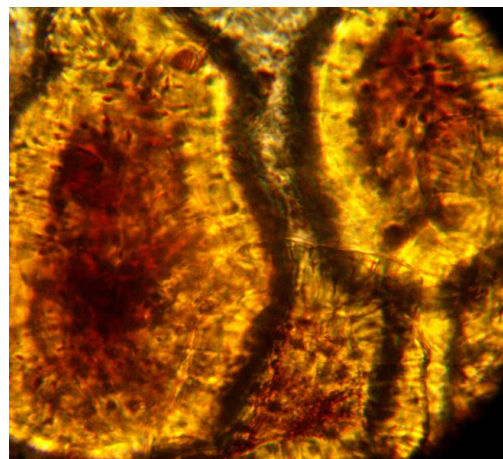
**А****Б****В****Г**

Рис.26. Высушенные плоды Рябины черноплодной. Поперечный срез плода после кипячения в 5% р-ре щелочи. А - друзы оксалата кальция (x400); Б - каменистые клетки (x100); В -сосуды проводящего пучка (x400); Г - каменистые клетки (x400)

После проведения подобной пробоподготовки наблюдалось отсутствие антоцианов в сырье (рис.26.). Однако данный способ имеет несколько недостатков: увеличение времени проведения анализа и необходимость использования едкого и опасного реагента, при этом в процессе кипячения сырья наблюдается деформация диагностически значимых элементов.

Учитывая способность антоцианов растворяться в воде, на следующем этапе исследований изучалась возможность использования данного растворителя для просветления плодов аронии. Полученные данные представлены на рис. 27:

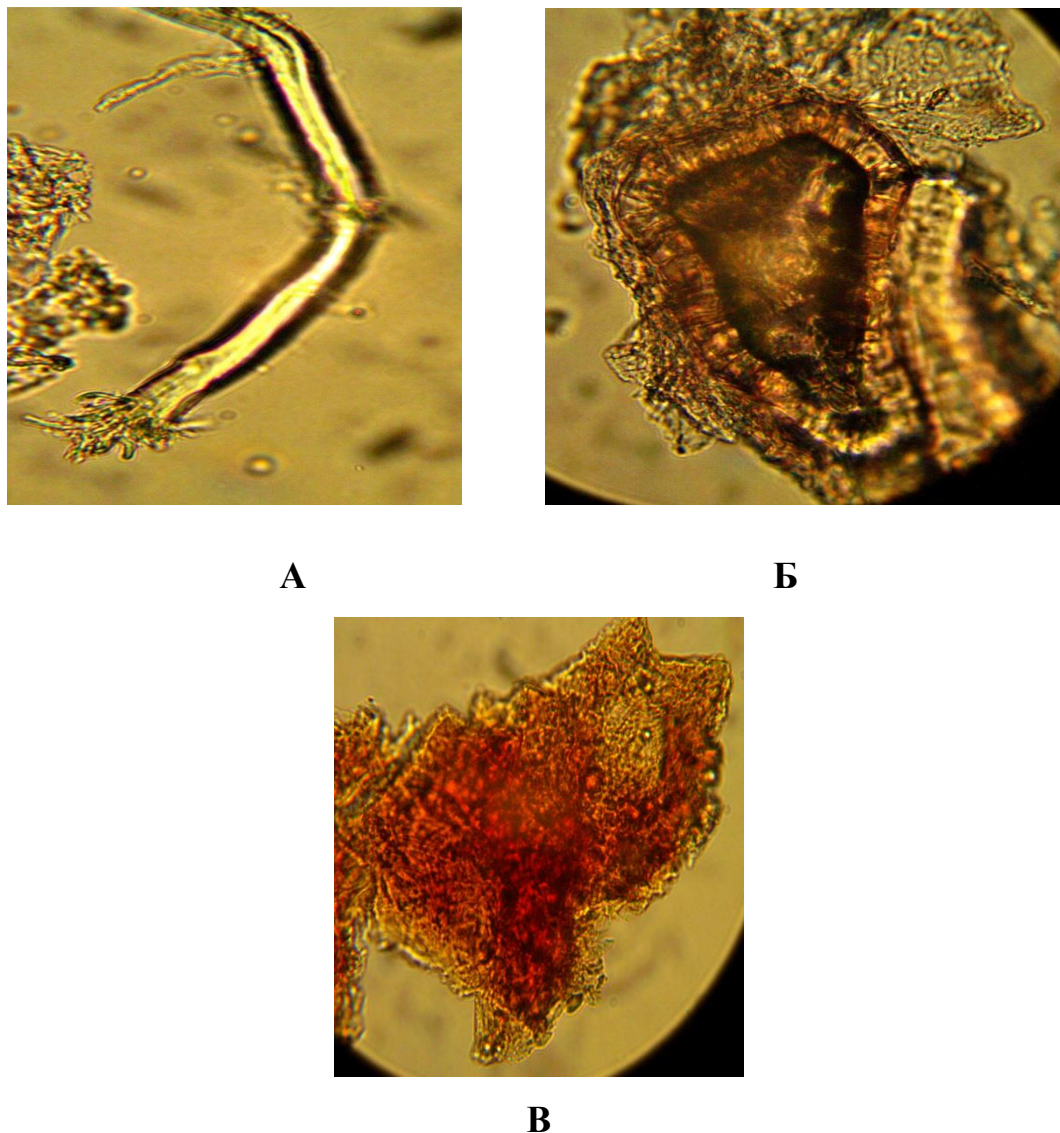


Рис.27. Высушенные плоды Рябины черноплодной. Поперечный срез плода после многократной экстракции водой. А - простой одноклеточный волосок (x400); Б - каменистые клетки (x400); В – мякоть (x400)

Представленные фотоснимки говорят о том, что часть антоцианов все же остается в сырье после многократной экстракции водой.

По данным литературных источников лучшим просветляющим реагентом в анализе подобных окрашенных объектов считается хлоралгидрат.

В связи с этим на заключительном этапе исследования плоды аронии, предварительно обработанные водой, помещали на сутки в раствор хлоралгидрата и затем анализировали. Полученные результаты представлены на рис. 28:

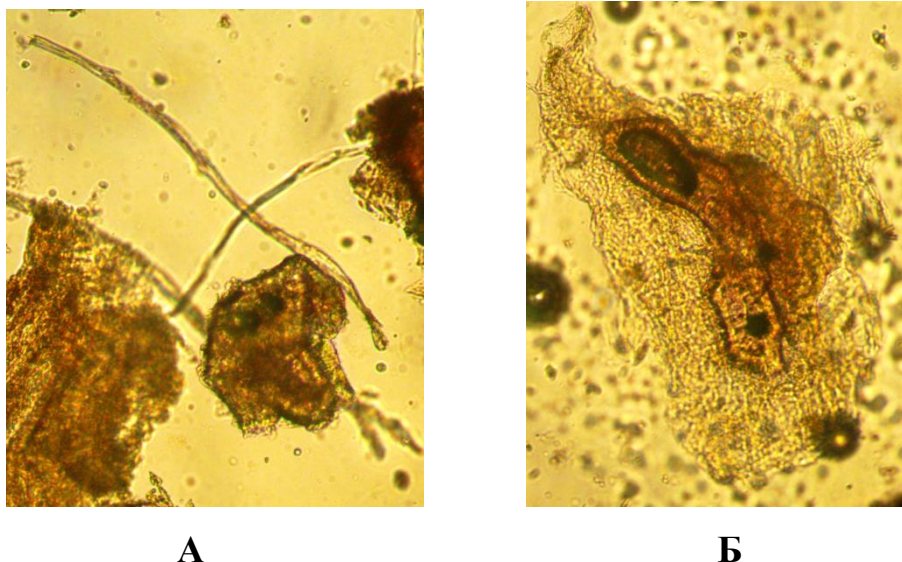


Рис. 28. Высушенные плоды Рябины черноплодной. Поперечный срез плода после обработки хлоралгидратом. А - простой одноклеточный волосок (x100); Б - каменистые клетки в мякоти плода (x100)

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что предварительная экстракция водой обеспечивает наиболее полное удаление антоциановых соединений из анализируемого объекта, а последующее замачивание в растворе хлоралгидрата дает более четкое представление о анатомо-диагностических признаках без их повреждения [104].

На следующем этапе представилось интересным изучение изменчивости микродиагностических особенностей плодов рябины черноплодной в зависимости от сорта и места ее произрастания.

Объектами исследования служили образцы высушенных плодов рябины черноплодной, заготовленных на территории Воронежской области, Алтайского края, республики Адыгея и Калининградской области в период сентябрь - октябрь 2014г.

Начальным этапом определения подлинности любого вида растительного сырья является изучение его внешних характеристик.

Плоды сорта «Мичуринская» диаметром до 7 мм, бесформенные, сильно сморщенные, шаровидные, сплюснутые на верхушке. Плодолистики внутри плода образуют 5 гнезд, в которых расположены семена. Мякоть образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке имеются малозаметные чашелистики, под ними, внутри плода, заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Семена в очертании удлинено обратнойцевидные, красновато-коричневые, до 3 мм длиной. Плоды черного цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, вяжущий.

Отличительной чертой сорта «Алтайская крупноплодная» являлась матовость плодов и более темная, фиолетового оттенка мякоть.

Плоды сорта «Вениса» отличались более крупными размерами, а также более выраженным опушением.

Сорт «Викинг» представлен плодами плоскоокруглыми, сплюснутыми с боков, мякоть красноватая.

В настоящее время отсутствует информация, касающаяся изучения анатомических признаков плодов аронии разной сортовой принадлежности, в связи с этим, представилось интересным проведение сравнительного микроскопического анализа данных объектов. Для проведения эксперимента сырье подвергали сверхтонкому измельчению.

В результате проведенной нами ранее работы по поиску оптимального способа подготовки плодов аронии к микроскопическому анализу, было показано, что наиболее оптимальным является многократная экстракция плодов водой с последующим выдерживанием в хлоралгидрате. При использовании данного способа пробоподготовки обеспечивается максимальное обесцвечивание сырья.

На основании проведенного микроскопического анализа было установлено, что все исследуемые объекты имеют сходное анатомическое строение, но для них можно отметить и ряд отличительных признаков (рис.29 – 32, табл.26).

Клетки эпидермиса аронии сорта «Мичуринская» крупные, многоугольные, почти правильной формы, в поле зрения микроскопа имеются длинные

тонкостенные одноклеточные волоски. Мякоть после проведения пробоподготовки желтовато – бурого цвета, в клетках имеется большое количество друз оксалата кальция и редкие призматические кристаллы. Каменистые клетки встречаются группами и одиночно, имеют вытянутую или округлую формы. Полученные данные представлены на рис.29:

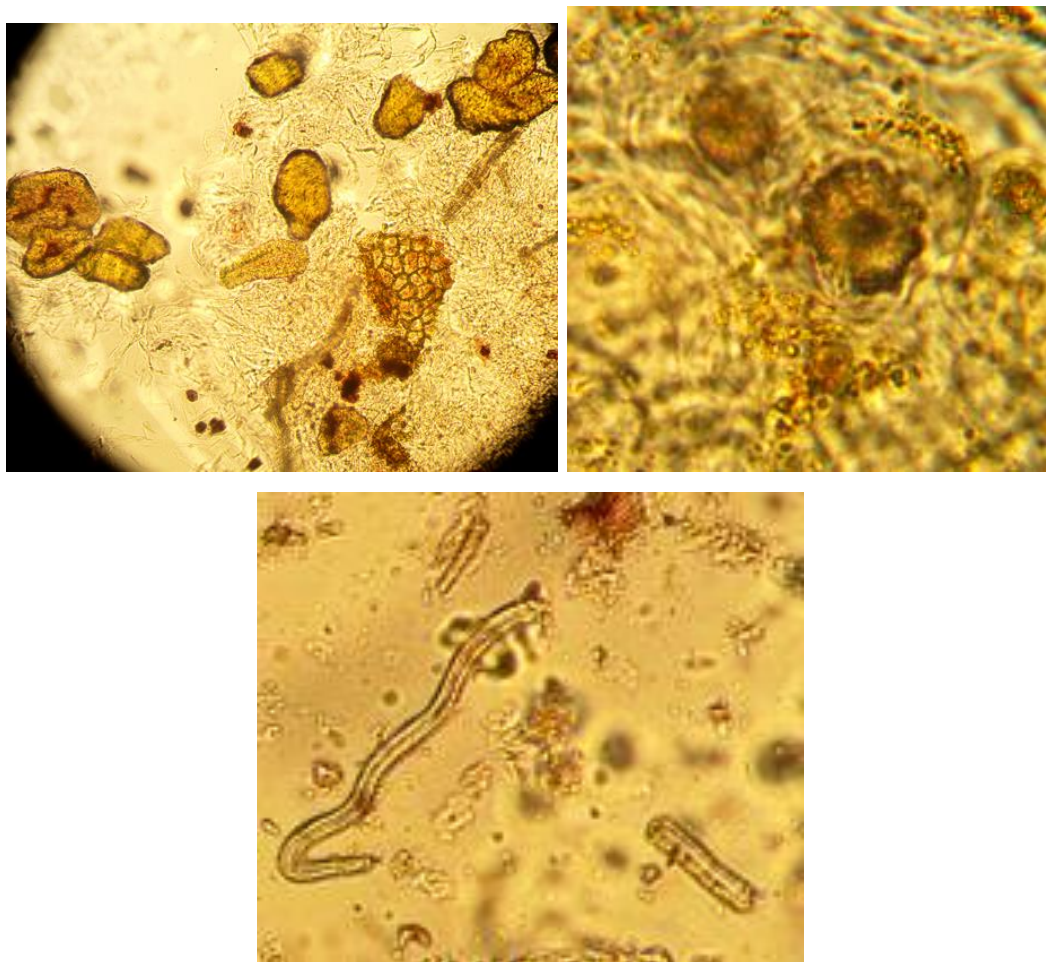


Рис.29. Анатомические признаки плодов аронии сорта «Мичуринская»

Отличительной особенностью сорта «Алтайская крупноплодная» является наличие меньшего количества волосков, мякоть темно – бурого цвета, монокристаллы отсутствуют. Полученные данные представлены на рис.30:

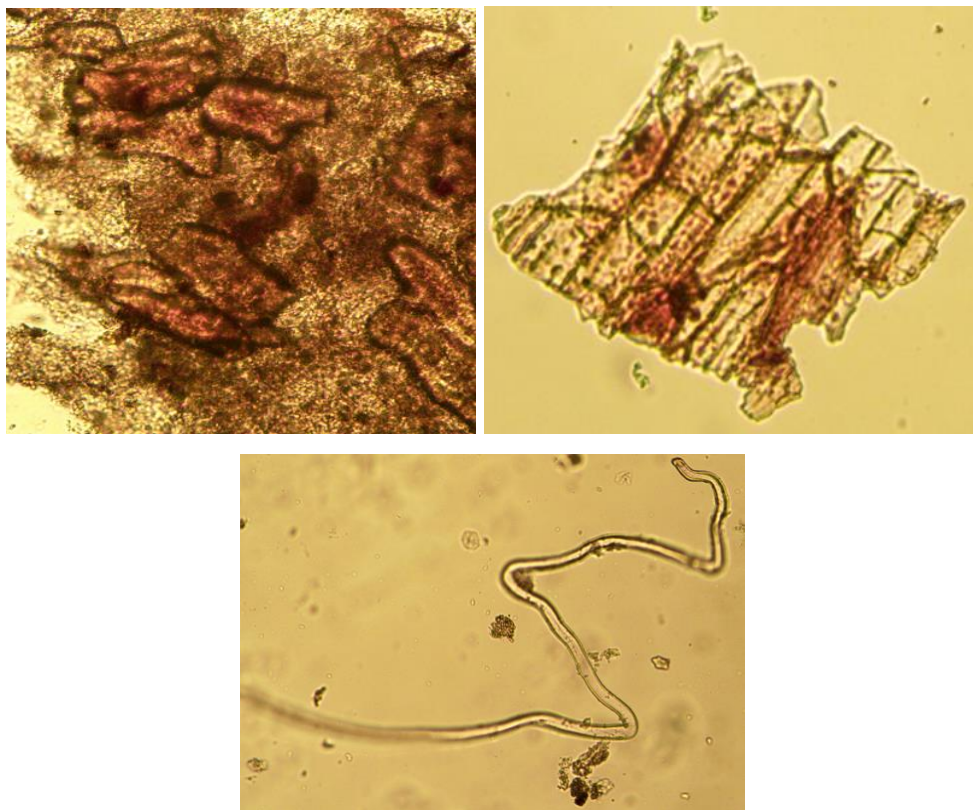
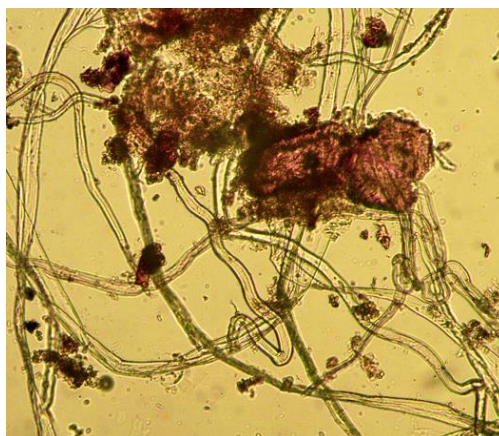


Рис.30. Анатомические признаки плодов аронии сорта «Алтайская крупноплодная»

Сорт «Вениса» имеет своей особенностью присутствие большого количества волосков, которые намного длиннее, чем у остальных сортов, мякоть фиолетово красная, друзы крупные, многочисленные, отчетливо видны монокристаллы. Полученные данные представлены на рис.31:



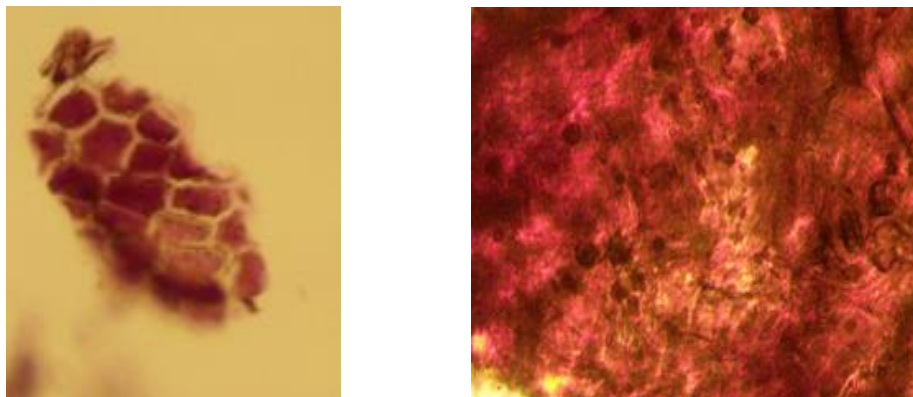


Рис.31. Анатомические признаки плодов аронии сорта «Вениса»

Плоды аронии сорта «Викинг» имеют довольно крупные клетки эпидермиса, мякоть фиолетовая, имеется большое количество мелких друз оксалата кальция, редкие монокристаллы, каменистые клетки крупные, вытянутые. Полученные данные представлены на рис.32:

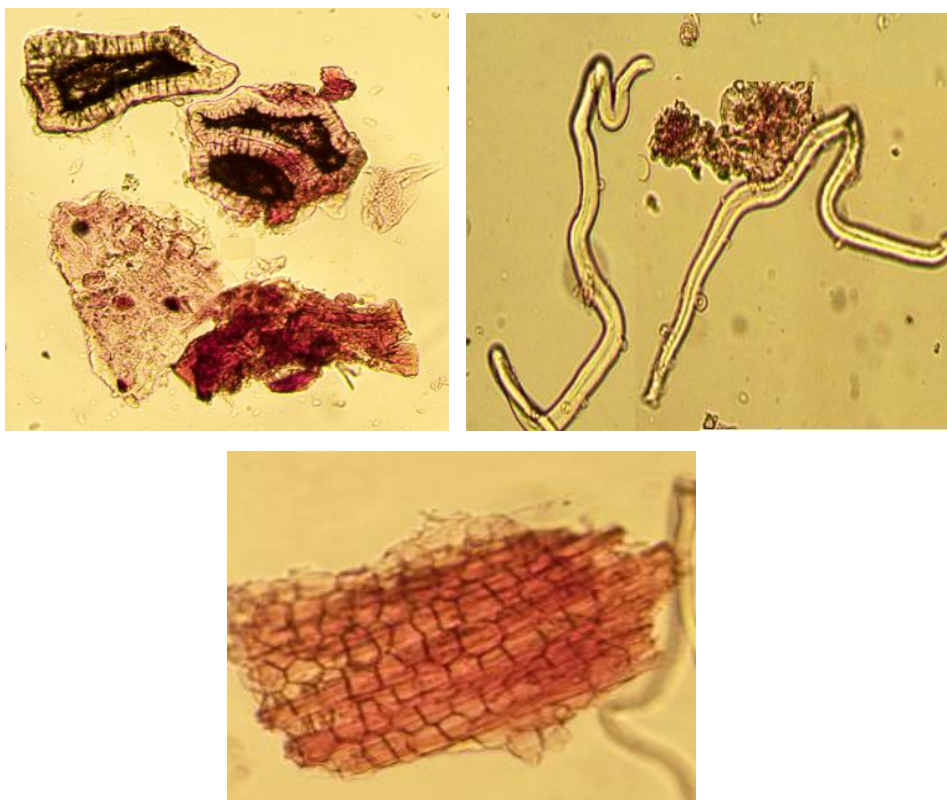


Рис.32. Анатомические признаки плодов аронии сорта «Викинг»

Полученные результаты приведены в таблице 26:

Таблица 26. Сравнительная характеристика микродиагностических особенностей плодов аронии различных сортов

Исследуемый признак	Сорта аронии черноплодной			
	«Мичуринская»	«Алтайская крупноплодная»	«Вениса»	«Викинг»
Клетки эпидермиса	4.6x1.75мкм	4.9x1.96мкм	2.94x2.98мкм	8.82x8.82 мкм
Одноклеточные волоски	8.82x8.82 мкм	117.6x2.94 мкм	176.4x3.92 мкм	107.8x1.96 мкм
Друзы	11.76 мкм	11.76 мкм	12.74мкм	0.98-8.82 мкм
Монокристаллы	4.3x8.7 мкм	-	4.9x9.8 мкм	3.7x8.5 мкм
Каменистые клетки	13.72x4.9, 14.54x11.78 мкм	13.72x8.82 мкм	13.72x8.82 мкм	15.68x5.88 мкм

Таким образом, наблюдается вариабельность практически всех исследуемых микродиагностических признаков в зависимости от сорта и места произрастания растения.

6.3. Определение некоторых числовых показателей сырья Рябины черноплодной

Определение влажности, общей золы проводили по ГФ XI (ГФ XIII) издания, вып.1.

Определение содержания экстрактивных веществ в плодах рябины черноплодной проводили по методике ГФ XI, вып. 1 (ГФ XIII) [60,19]. В качестве растворителей использовали вода, водно-спиртовые смеси с различной концентрацией (40%, 60%, 70%, 95%), а также водно-спиртовые смеси тех же концентраций с добавкой кислоты хлороводородной до содержания 1%. Полученные результаты представлены в таблице 27:

Таблица 27. Содержание экстрактивных веществ в высушенных плодах рябины черноплодной различных сортов.

Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %			
	Сорт «Мичуринская» Воронежская область	Сорт «Викинг», Республика Адыгея,	Сорт «Алтайская крупноплодная» Алтайский край	Сорт «Вениса» Калинин- градская область
Этанол 40 %	49,20±0,062	21,10±0,01	28,71±0,012	30,53±0,073
Этанол 60 %	46,69±0,017	20,90±0,014	29,28±0,011	31,84±0,013
Этанол 70 %	38,27±0,043	20,55±0,016	26,99±0,023	32,48±0,062
Этанол 95 %	33,3±0,011	18,11±0,086	16,82±0,021	28,31±0,013
H ₂ O	35,69±0,050	18,62±0,039	23,73±0,053	30,00±0,004
Этанол 40 % (к)	36,2±0,028	21,12±0,024	66,9±0,031	36,83±0,011
Этанол 60 % (к)	32,91±0,011	29,59±0,024	29,45±0,012	35,04±0,069
Этанол 70 % (к)	31,55±0,040	29,24±0,011	26,93±0,020	33,77±0,012
Этанол 95 % (к)	22,95±0,062	25,03±0,055	23,13±0,051	34,22±0,051
H ₂ O(к)	29,31±0,012	27,81±0,010	16,14±0,091	36,07±0,013

Примечание: (к) обозначает, что для извлечения использовали экстрагент, подкисленный кислотой хлороводородной до концентрации 1%.

Анализ данных таблицы 27 показывает, что все исследуемые экстрагенты извлекают достаточно большое количество экстрактивных веществ из плодов аронии всех сортов. Максимальной извлекающей способностью при работе с сортом «Мичуринская» обладают водно-спиртовые смеси с концентрацией спирта этилового 40%, нейтральные и подкисленные. Для остальных сортов подобная закономерность не просматривается. Анализируя весь массив данных, можно отметить, что наибольшее количество экстрактивных веществ извлекается этанолом в концентрации 40 -70 %. Подкисление этанола позволяет в большинстве случаев несколько повысить его извлекающую способность.

Минимальное количество экстрактивных веществ извлекается менее полярным экстрагентом – этанолом 95 %, хотя отличия не слишком велики. Использование в качестве экстрагента воды так же возможно, т.к. по количеству извлекаемых веществ вода занимает промежуточное значение между этанолом 40 – 70 % и 95 %.

Сравнивая между собой плоды аронии разных сортов, можно сделать вывод о различиях в количестве (а, скорее всего, и в качественном составе) извлекаемых в аналогичных условиях экстрактивных веществ. Этот факт можно связать с действием таких факторов как: сортовые особенности, различные условия произрастания (влажность, температура, освещенность, тип почв и т.д.).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Провели определение влажности, общей золы согласно методикам ГФ XI (ГФ XIII). Влажность высушенных плодов аронии составила $7,21\% \pm 0,11$; зола общая – $2,13\% \pm 0,11$.

2. Были проведены исследования по выбору оптимального экстрагента для извлечения антоциановых соединений плодов Рябины черноплодной различных сортов.

3. Были изучены основные диагностически значимые структуры свежих плодов аронии.

4. Было проведено определение главных анатомических признаков высушенных плодов аронии и проведен их анализ по основным анатомическим признакам с применением различных условий подготовки сырья к анализу.

5. Было установлено, что оптимальным способом подготовки плодов аронии является предварительная многократная экстракция из них антоцианов водой с последующим замачиванием в растворе хлоралгидрата.

6. В ходе исследований охарактеризованы морфологические особенности плодов аронии черноплодной сортов «Мичуринская», «Алтайская крупноплодная», «Викинг», «Вениса».

7. Проанализированы основные анатомические признаки высушенных плодов аронии разной сортовой принадлежности, визуализированы основные диагностические признаки. Показано, что вариабильности анатомических признаков плодов аронии в зависимости от сорта и климатического фактора подвергаются кристаллические включения, трихомы и клетки мякоти.

ГЛАВА 7. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПЛОДОВ РЯБИНЫ ЧЕРНОПОДНОЙ

К экстракционным лекарственным средствам растительного происхождения, производство которых сосредоточено на крупных фармацевтических предприятиях, относятся настойки, экстракты, максимально очищенные препараты и препараты индивидуальных веществ. Основной стадией их получения является экстрагирование лекарственного растительного сырья. К лекарственным препаратам аптечного изготовления, имеющим малые сроки хранения, могут быть отнесены так же настои.

7.1. Получение лекарственных форм и количественное определение некоторых групп БАВ

На данном этапе исследования провели анализ полученных лекарственных форм и определили количественное содержание основных групп биологически активных веществ в полученных извлечениях.

Перед экстрагированием сырье измельчали [131]. Для получения лекарственных форм использовали фракции с размером частиц 1,0 – 0,5 мм. Были получены следующие лекарственные формы: жидкий экстракт в соотношении 1:1; настойка в соотношении 1:5 и настой в соотношении 1:10 [5]. Настой готовили из цельных и измельченных плодов согласно литературным данным [134,135].

В качестве экстрагента для получения спиртосодержащих извлечений использовали этанол 40%, имеющий максимальную извлекающую способность согласно данным предварительных исследований. Для изготовления жидкого экстракта использовали метод перколяции; для изготовления настойки – метод дробной мацерации. Настой получали настаиванием на кипящей водяной бане в течение 15 минут с последующим охлаждением до комнатной температуры в течение 45 минут [84].

На следующем этапе исследований определялось количественное содержание некоторых групп БАВ плодов Рябины черноплодной.

Содержание антоцианов в извлечении после соответствующих разведений определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности в максимуме их поглощения в диапазоне $\lambda = 510-540$ нм. Для расчетов использовали значение удельного коэффициента поглощения антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, приведенное в работе [80].

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности комплекса полученного извлечения с алюминия хлоридом при длине волны $\lambda = 410$ нм [60].

Для определения количественного содержания дубильных веществ был так же применен метод спектрофотометрии с использованием стандартного образца танина [121]. О количестве дубильных веществ в полученном извлечении судили по величине оптической плотности при длине волны $\lambda = 274,5-277,5$ нм. Полученные данные представлены в табл.28.

Определение антиоксидантной активности полученных лекарственных форм проводили титриметрически, используя в качестве титранта 0,01 М раствор перманганата калия [85,126]. Извлечение перед определением разбавляли до исчезновения розового окрашивания. Полученные данные приведены в табл.26:

Таблица 28. Результаты определения некоторых групп БАВ - антиоксидантов в лекарственных формах плодов рябины черноплодной

Лекарственная форма	Антоцианы, %	Флавоноиды, %	Дубильные вещества, %	АОА, %
Жидкий экстракт (1:1)	0,62	1,15	0,1	2,06
Настойка (1:5)	0,18	0,24	0,02	0,59

Настой (1:10) (измельченные плоды)	0,06	0,05	0,008	0,72
Настой (1:10) (цельные плоды)	0,002	0,03	0,004	0,02

На основании результатов, представленных в таблице, можно сделать вывод о том, что по количественному содержанию БАВ – антиоксидантов, наиболее предпочтительной лекарственной формой является жидкий экстракт как наиболее концентрированное извлечение. Наименее рационально получение настоя из цельных плодов.

Важной характеристикой эффективности процесса извлечения БАВ из сырья является их выход. Данные представлены в таблице 29.

Таблица 29. Сравнительная оценка выхода отдельных групп БАВ при получении различных лекарственных форм плодов Рябины черноплодной

Анализируемая лекарственная форма	Выход некоторых групп БАВ при получении различных лекарственных форм, %		
	Антоцианы	Флавоноиды	Дубильные вещества
Жидкий экстракт (1:1)	16,8	63,8	9,8
Настойка (1:5)	24,3	66,7	9,8
Настой (1:10) (измельченные плоды)	16,2	27,7	7,8
Настой (1:10) (цельные плоды)	0,54	16,7	3,9

На основании данных таблицы 28 можно сделать вывод о том, что при получении изучаемых лекарственных форм происходит наиболее полное истощение сырья по флавоноидам. Выход их в случае спиртовых извлечений (настоек и экстрактов) составляет порядка 60 -70 %. Выход антоцианов ниже для всех лекарственных форм. Хуже всего извлекаются дубильные вещества,

большая часть которых остается в сырье при получении всех изучаемых лекарственных форм. Тем не менее антиоксидантная активность настоя из измельченных плодов достаточно высока, что может свидетельствовать о переходе в него из сырья других групп БАВ-антиоксидантов, не являвшихся объектом настоящего исследования.

Таким образом, показано, что по количественному содержанию БАВ – антиоксидантов, наиболее предпочтительной лекарственной формой является жидкий экстракт 1:1.

Таблица 30. Величина сухого остатка водных и водно-спиртовых извлечений плодов рябины черноплодной различных сортов

Показатели качества		Сорт «Мичуринская»	Сорт «Викинг»	Сорт «Вениса»	Сорт «Алтайская крупноплодная»
Величина сухого остатка, %	рН	6,0-7,0	5,0	5,0	5,0
	Водное извлечение по типу настоя (цельные плоды)	1,83	10,2	2,92	3,48
	Водное извлечение по типу настоя (измельченные плоды)	46, 03	33,13	40,6	36,7
	рН	6,0-7,0	5,0	5,0	5,0
	Жидкий экстракт	28,4	23,3	39,9	31,7

Анализируя данные, представленные в таблице, можно сделать вывод о том, что величина сухого остатка водных извлечений больше, чем спиртовых. Это

может быть связано с тем обстоятельством, что в воду переходят большее количество групп биологически активных веществ по сравнению с водно-спиртовым раствором.

Показано, что величина сухого остатка для водного извлечения измельченных плодов больше по сравнению с водным извлечением, полученным из цельных плодов для всех анализируемых сортов. Водное извлечение, приготовленное по типу «настоя» для сорта «Мичуринская», полученное из измельченных плодов, занимает лидирующее положение. Немного меньше составляет величина сухого остатка для извлечения, приготовленного по типу «настоя» из измельченных плодов сорта «Вениса». Лидирующее положение среди водно-спиртовых извлечений занимает жидкий экстракт, полученный из плодов сорта «Вениса» и «Алтайская крупноплодная».

В связи с тем, что водно-спиртовые извлечения имеют ряд преимуществ по сравнению с водными (более длительный срок хранения, отсутствие стабилизаторов для продления срока годности) в заводских условиях преимущественно предпочтение отдается именно водно-спиртовым извлечениям. Именно эта лекарственная форма была рекомендована для дальнейшего исследования.

7.2. Стандартизация жидкого экстракта (1:1)

В ранее проведенных нами исследованиях был проведен выбор оптимальной лекарственной формы плодов Рябины черноплодной. Показано, что наиболее предпочтительной лекарственной формой является жидкий экстракт 1:1 [72].

Жидкий экстракт плодов рябины черноплодной получали методом перколяции.

50,0 г. высушенного измельченного растительного сырья намачивали и настаивали с 50мл 40% спиртом этиловым в течение суток. Затем намоченное растительное сырье помещали в перколятор и подавали чистый экстрагент до состояния «зеркала». Оставляли заполненный перколятор на 24 часа. После этого 15% от заданного объема упаривают под вакуумом до 7,5 мл. Остальной объем сливают в приемник. Упаренный объем объединяют с оставшемся объемом.

Полученную вытяжку фильтровали через двойной слой марли (для удаления балластных веществ).

В итоге было получено извлечение темно-фиолетового цвета с характерным сладковатым запахом.

На следующем этапе нами была проведена стандартизация 3 серий экстракта жидкого (1:1) согласно проекту ОФС «Экстракты» согласно ГФ по показателям: описание, содержание спирта, тяжелые металлы, сухой остаток, содержание действующих веществ. Полученные результаты представлены в таблице 31:

Таблица 31. Характеристика жидкого экстракта плодов Рябины черноплодной и показатели для оценки качества согласно ГФ

Показатель	Жидкий экстракт (1:1)
Прозрачность	Прозрачная жидкость
Цвет	Темно-фиолетовый
Запах	Специфический, сладковатый
Вкус	Горьковатый
рН	4,42
Содержание спирта	38%
Тяжелые металлы	Не более 0,01%
Сухой остаток	0,64%

Таблица 32. Условия получения жидкого экстракта плодов рябины черноплодной (1:1)

Степень измельченности сырья	Тип экстрагента	Концентрация экстрагента	Соотношение сырье : экстрагент	Продолжительность экстракции
1,0-0,5 мм	Спирт этиловый	40%	1:1	72 часа

7.3. Изучение фармакологической активности препаратов Рябины черноплодной

7.3.1. Изучение мембранстабилизирующей активности лекарственных форм плодов Рябины черноплодной

В последнее время повышенное внимание уделяется разработке и изучению фитопрепаратов, полученных из различного лекарственного растительного сырья. Причина - целый ряд преимуществ растительных препаратов по сравнению с их синтетическими аналогами.

В связи с этим особое значение приобретает первичная оценка фармакологического эффекта вновь создаваемых препаратов.

Для первичной оценки и скрининга новых лекарственных форм из лекарственного растительного сырья в последнее время часто применяют испытание «*in vivo*» с применением культуры инфузорий *Paramecium caudatum*.

Именно этот простейший одноклеточный организм рекомендован рядом исследователей в качестве биообъекта для оценки антиоксидантной, мембранстабилизирующей и адаптогенной активности различных препаратов.

Плоды аронии содержат в своем составе богатейший комплекс БАВ, в связи с чем создание лекарственных форм на их основе может рассматриваться как перспективное.

Цель настоящего исследования - сравнительный анализ мембранстабилизирующего действия новых жидких лекарственных форм плодов *Aronia melanocarpa*.

Объектами исследования выступали настой (1:10) и жидкий экстракт (1:1), полученные из высушенных цельных и измельченных плодов аронии черноплодной, заготовленных на территории Воронежской области в период сентябрь- октябрь 2014 года. Лекарственное растительное сырье было стандартизовано в соответствии с требованиями ГФ.

Настой из плодов аронии (1:10) готовили по общепринятой методике с учетом коэффициента водопоглощения, который был установлен в ранее проведенных

экспериментах [106]. Для цельных плодов аронии $K_v = 1.5$, для измельченных плодов - $K_v = 2.0$.

Жидкий экстракт (1:1) плодов рябины черноплодной готовили методом перколяции. В качестве экстрагента выступал спирт этиловый в концентрации 40% [73].

Так как спирт этиловый в концентрации 40% влияет на жизнедеятельность культуры инфузорий, вызывая их гибель, перед началом эксперимента его отгоняли под вакуумом, а полученный сухой остаток растворяли в воде очищенной при слабом нагревании на водяной бане.

Оценку мембранстабилизирующего действия полученных лекарственных форм проводили по методике В.С. Бузламы. Данный метод позволял определить характер действия изучаемых объектов на клетки при воздействии на них внешних неблагоприятных факторов. Из нескольких имеющихся методик был выбран «Метод разрушающего воздействия» с использованием культуры инфузорий «*Paramecium caudatum*».

В работе нами была использована культура инфузорий, содержащая в экспоненциальной фазе не менее 2500 особей в 1 мл среды, а в стационарной фазе - не менее 7000 особей.

В ходе исследования была приготовлена серия последовательных разведений изучаемых лекарственных форм. Перед началом эксперимента проводили термостатирование культуры инфузорий совместно с изучаемым объектом в течение суток. В качестве контрольного опыта выступала культура инфузорий без добавления объекта исследования, термостатированная в течение суток.

В качестве повреждающего фактора выступал 10% раствор хлорида натрия, который вызывает повреждение мембраны культуры инфузорий и дальнейшую гибель одноклеточного организма.

На первом этапе устанавливали объем 10% раствора натрия хлорида, приводящий к гибели 100% клеток культуры инфузорий в течение 5 минут. Для этого из контрольной пробирки отбирали по 1 мл культуры инфузорий и

добавляли 10% раствор натрия хлорида (от 0.1 до 0.5мл). При добавлении в пробирку с культурой раствора хлорида натрия вначале наблюдали ускорение движения инфузорий, затем их съезживание и в дальнейшем прекращение движения в течение 2.5 минут. Контроль времени гибели клеток осуществляли под микроскопом с помощью секундомера.

В ходе проведенного эксперимента был установлен относительный объем хлористого натрия, приводящий к гибели 100% клеток в течение 2.5 минут – 0.25мл [100].

На следующем этапе исследования провели оценку мембранстабилизирующего действия исследуемых жидких лекарственных форм. Для этого перед началом исследования в 18 пробирок помещали по 9 мл культуры инфузорий в стационарной фазе роста. В первую пробирку добавляли 1мл воды очищенной, перемешивали. Во вторую - 1мл исследуемого препарата, перемешивали. Далее готовили последовательные разведения препарата, перенося по 1 мл жидкости из второй пробирки в третью, из третьей в четвертую и т.д. Штатив с пробирками термостатировали сутки при 25°C.

По окончании термостатирования отбирали по 1мл жидкости из опытных пробирок, добавляли туда оттестированное количество 10% раствора хлористого натрия, выполняющего роль неблагоприятного фактора, и измеряли продолжительность жизни клеток культуры инфузорий, общее количество которых принимали за 100%. Испытание проводили не менее 3 раз. Для дальнейших расчётов использовали среднюю величину.

Оценку мембранстабилизирующего действия исследуемых объектов проводили в сравнении с данными, полученными в аналогичных условиях, для известных адаптогенов - настойки аралии и экстракта элеутерококка [107].

На основании полученных данных был рассчитан индекс биологической активности исследуемых препаратов $I_{БА}$ (если его значение больше 1, то препарат обладает мембранстабилизирующим действием, тем большим, чем выше значение индекса). Полученные значения $I_{БА}$ позволили сделать вывод о том, что настой

измельченных плодов аронии проявляет высокую мембранстабилизирующую активность в концентрациях от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-19}$. В более высоких концентрациях $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$ наблюдалась гибель клеток, которая может быть связана с повышенной кислотностью неразбавленных извлечений из плодов, губительной для культуры инфузорий.

Индекс биологической активности настоя из цельных плодов составил в среднем $I_{БА}=1.1$, а в некоторых разведениях оказался меньше, чем $I_{БА}<1.1$. На основании этого был сделан вывод о том, что данное извлечение биологически не активно, а в некоторых разведениях и снижает жизнеспособность клеток инфузорий.

Мембранстабилизирующая активность жидкого экстракта проявлялась в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-14}$, $1 \cdot 10^{-15}$, $1 \cdot 10^{-17}$, $1 \cdot 10^{-18}$, в остальных разведениях активность снижалась.

Проводя сравнение мембранстабилизирующей активности исследуемых объектов с литературными данными, можно сделать вывод о том, что активность жидких лекарственных форм плодов аронии, как водных, так и спиртовых, не уступает известным адаптогенам (табл.33, рис.33).

Таблица 33. Индекс биологической активности препаратов плодов рябины черноплодной

$I_{БА}$	Мембранстабилизирующая активность			АОА			Антитоксическая активность		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
$1 \cdot 10^{-2}$	-	-	-	0,89	1,26	1,39	-	0,95	-
$1 \cdot 10^{-3}$	-	1.23	1.94	0,62	1,1	1,41	0,99	0,78	-
$1 \cdot 10^{-4}$	1.37	1.04	1.27	0,8	1,1	1,18	1,11	0,67	-
$1 \cdot 10^{-5}$	0.96	1.07	1.03	0,74	-	0,94	0,69	0,51	0,63
$1 \cdot 10^{-6}$	1.19	1.18	1.04	0,65	1,29	0,92	0,5	0,74	0,45
$1 \cdot 10^{-7}$	1.68	1.07	1.09	0,68	1,19	0,89	0,62	0,69	0,55

$1 \cdot 10^{-8}$	1.85	0.88	1.08	0,67	1,16	0,94	0,43	0,95	0,5
$1 \cdot 10^{-9}$	1.12	0.98	0.98	0,6	1,16	0,95	0,4	1,08	0,92
$1 \cdot 10^{-10}$	1.29	1.1	0.98	0,71	1,1	0,86	0,5	1,27	0,68
$1 \cdot 10^{-11}$	1.51	0.93	0.93	0,56	1,32	0,68	0,64	1,03	0,81
$1 \cdot 10^{-12}$	1.73	0.93	0.75	0,67	1,27	0,78	0,76	1,2	0,46
$1 \cdot 10^{-13}$	1.68	0.94	0.88	0,65	1,19	0,69	0,54	1,11	0,53
$1 \cdot 10^{-14}$	1.88	1.05	1.15	0,67	1,32	0,72	0,71	0,53	0,56
$1 \cdot 10^{-15}$	1.43	1.07	1.2	0,65	1,38	0,67	0,61	0,68	0,55
$1 \cdot 10^{-16}$	1.49	0.98	0.85	0,6	1,45	0,59	0,6	0,41	0,52
$1 \cdot 10^{-17}$	1.42	1.05	1.13	0,77	1,49	0,71	0,51	1,03	0,95
$1 \cdot 10^{-18}$	1.55	0.85	1.12	0,67	1,31	0,65	0,54	1,4	0,26
$1 \cdot 10^{-19}$	1.55	0.82	1.07	0,69	1,09	0,67	0,53	0,86	-

1- Настой измельченных плодов аронии

2- Настой цельных плодов аронии

3- Жидкий экстракт (1:1) плодов аронии

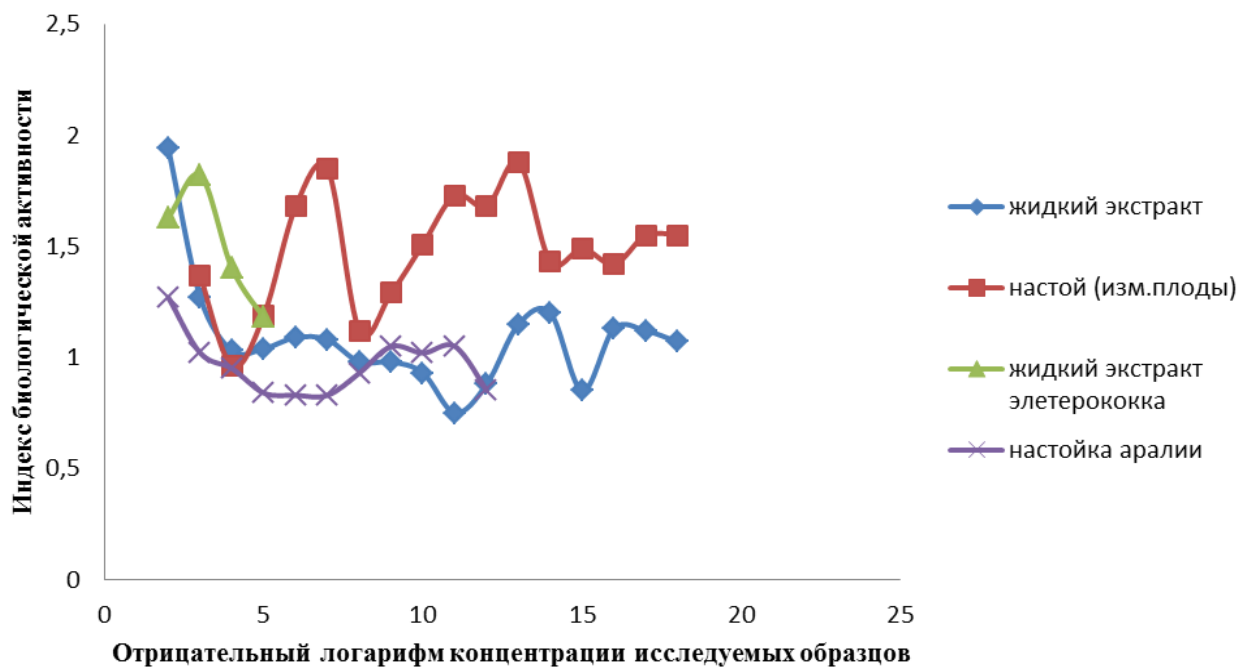


Рис. 33. Мембраностабилизирующая активность извлечений плодов Рябины черноплодной

7.3.2. Изучение антиоксидантной активности лекарственных форм на основе лекарственного растительного сырья Рябины черноплодной

В настоящее время тема свободных радикалов и реакционноспособных кислородосодержащих частиц привлекает повышенное внимание современную медицину и фармацию. Это связано с условиями усиливающихся эколого-производственного прессинга и некачественного питания [23,24].

Регулирование процессов свободно радикального окисления и уровня накапливающихся перекисных радикалов осуществляет защитная антиоксидантная система организма человека. Концентрация свободных радикалов в клетках организма может достичь уровня, при котором его собственная антиоксидантная система не справляется с дезактивацией повреждающих агентов. В этом случае возникает «окислительный стресс», который является одной из причин старения организма и развития патологического состояния [6,12,13,18-20].

Таким образом, весьма актуальным становится поиск новых, легкодоступных и нетоксичных источников природных антиоксидантов.

На следующем этапе исследования проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности полученных лекарственных форм плодов Рябины черноплодной.

Для определения антиоксидантной активности использовалась методика, приведенная выше.

В работе нами была использована культура инфузорий, содержащая в экспоненциальной фазе не менее 2500 особей в 1 мл среды, а в стационарной фазе - не менее 7000 особей.

В качестве повреждающего фактора выступал 3% раствор перекиси водорода.

Полученные результаты представлены в табл. 33 и на рис.34.

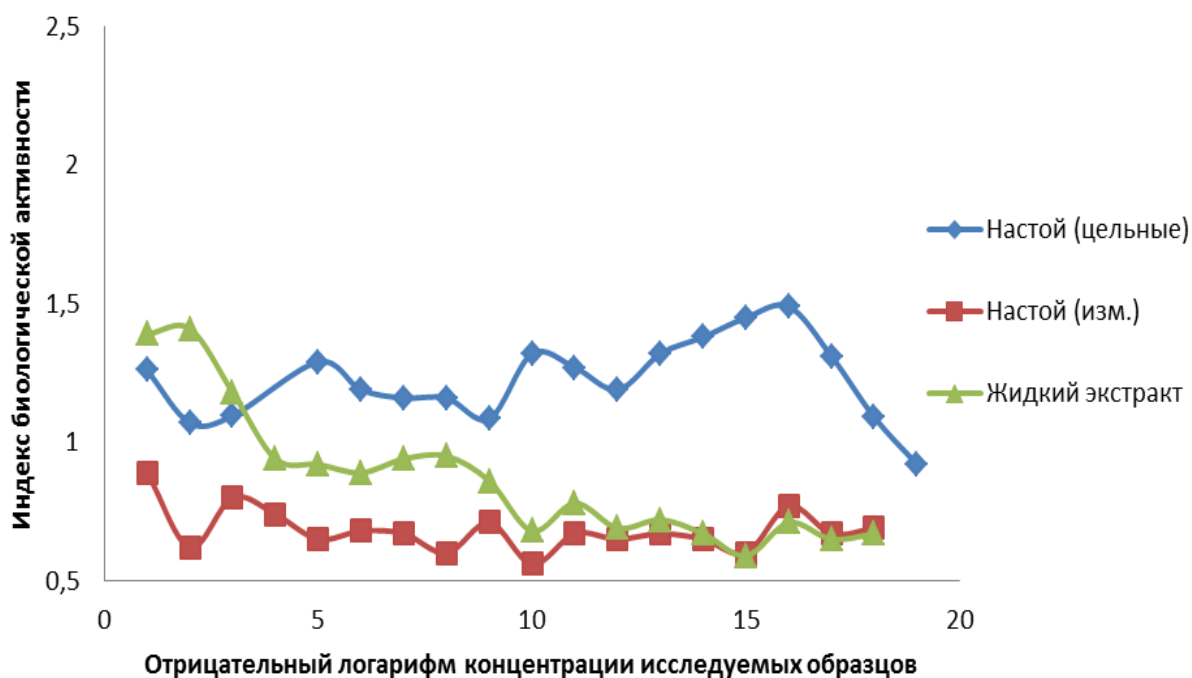


Рис.34. Антиоксидантная активность извлечений плодов Рябины черноплодной

Для настоя, полученного из цельных плодов, прослеживается высокая антиоксидантная активность ($I_{\text{БА}} > 1,1$) для всей серии разведений по сравнению с другими анализируемым образцами. У настоя, полученного из измельченного лекарственного растительного сырья, индекс биологической активности составил менее 1,1, что говорит о том, что данный образец снижает жизнеспособность клеток инфузорий. Это может быть связано, предположительно, с тем, что при измельчении плодов разрушаются группы биологически активных веществ, которые вносят вклад в формирование общей антиоксидантной активности. Жидкий экстракт проявляет данный вид активности только в первых трех разведениях ($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$), что, вероятно, связано с наибольшей концентрацией анализируемого образца в этих разведениях. В результате эксперимента в качестве мощного антиоксиданта можно рекомендовать настой из цельного сырья.

7.3.3. Изучение антитоксического действия лекарственных форм на основе лекарственного растительного сырья Рябины черноплодной

Поиск новых дезинтоксикационных лекарственных средств является актуальной задачей современной медицины. С каждым годом увеличивается перечень известных токсических соединений всех категорий, в том числе сохраняется высокая частота встречаемости интоксикаций лекарственными веществами [36-39,43]. В связи с этим оценка дезинтоксикационной активности лекарственных форм плодов Рябины черноплодной можно считать актуальной.

Для определения дезинтоксикационной активности использовали методику, приведенную выше.

В работе нами была использована культура инфузорий, содержащая в экспоненциальной фазе не менее 2500 особей в 1 мл среды, а в стационарной фазе - не менее 7000 особей.

В качестве повреждающего фактора выступал 14% раствор спирта этилового.

Полученные результаты представлены в табл.33.и на рис.35

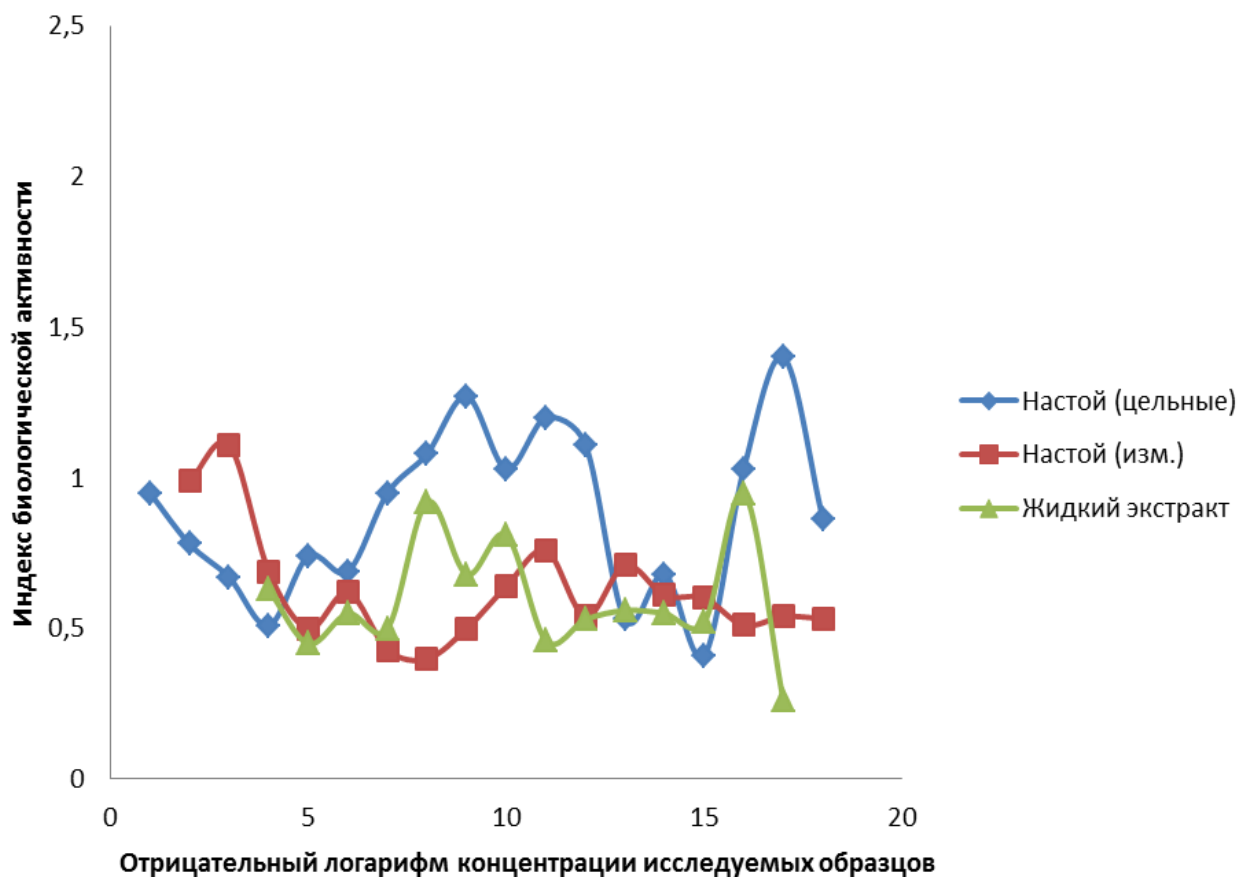


Рис.35. Антитоксическая активность извлечений плодов Рябины черноплодной

Небольшая антиоксидантная активность прослеживается у настоя (цельные плоды) в разведениях 10^{-9} - 10^{-13} . Для остальных исследуемых фитопрепаратов индекс биологической активности меньше 1,1 ($I_{БА} < 1,1$), следовательно, они не проявляют антиоксидантной активности.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

1. Получены и проанализированы водные и спиртовые лекарственные формы плодов рябины черноплодной. В качестве оптимальной лекарственной формы был выбран жидкий экстракт (1:1)

2. Проведен анализ жидкого экстракта по показателям, рекомендованным Государственной Фармакопеей: описание, содержание спирта, тяжелые металлы, сухой остаток, содержание действующих веществ.

3. Проведенными экспериментами была установлена высокая мембранстабилизирующая активность фитопрепаратов аронии черноплодной в низких разведениях. На основании полученных данных наиболее рациональной лекарственной формой можно считать настой, полученный из измельченных плодов аронии. Жидкий экстракт плодов аронии проявляет аналогичную активность в более узком концентрационном диапазоне.

4. Показано, что антиоксидантной активностью обладает настой из цельного растительного сырья аронии для всей серии разведений. Жидкий экстракт проявляет данный вид активности только в первых трех разведениях (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).

4. Небольшая антиоксидантная активность прослеживается только у настоя (цельные плоды) в разведениях 10^{-9} - 10^{-13} . Для всех остальных анализируемых образцов такой активности выявлено не было.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ научной литературы и нормативной документации на изучаемые сорта рябины черноплодной и препараты из его сырья (жидкий экстракт). Было установлено, что род арония является ценным источником БАВ. Однако сравнительного изучения состава и содержания БАВ в плодах рябины черноплодной различных сортов ранее не проводилось. Нормативная документация на жидкий экстракт плодов аронии отсутствует.

2. Проведено сравнительное изучение внешних признаков свежих и высушенных плодов рябины черноплодной. Проведено определение главных анатомических признаков высушенных плодов аронии и проведен их анализ по основным анатомическим признакам с применением различных условий подготовки сырья к анализу. Проанализированы основные анатомические признаки высушенных плодов аронии разной сортовой принадлежности, визуализированы основные диагностические признаки. Показано, что вариативности анатомических признаков плодов аронии в зависимости от сорта и климатического фактора подвергаются кристаллические включения, трихомы и клетки мякоти.

3. Изучен качественный состав БАВ в плодах рябины черноплодной различных сортов с помощью качественных реакций, ТСХ и ВЭЖХ. В результате качественных реакций было установлено наличие флавоноидов, дубильных веществ, антоциановых соединений и органических кислот. Методом тонкослойной хроматографии были обнаружены флавоноиды, дубильные вещества, антоциановые соединения и органические кислоты.

Состав флавоноидов и дубильных веществ плодов аронии различной сортовой принадлежности был идентичен. Среди органических кислот была

обнаружена лимонная и аскорбиновая кислоты у образца сорта «Мичуринская», щавелевая, лимонная и аскорбиновая - у трех оставшихся образцов.

Для всех четырех образцов обнаружено по 4 зоны с окрашиванием, характерным для антоциновых соединений. В образце сорта «Мичуринская» наблюдается появление еще двух пятен, имеющих характерную для антоциановых соединений окраску и не наблюдающихся у остальных анализируемых образцов, что свидетельствует о различии в качественном составе антоциановых соединений исследуемых образцов.

ВЭЖХ-анализ антоциановых соединений показал, что плоды рябины черноплодной различной сортовой принадлежности имеют одинаковый профиль антоцианинов. Основным компонентом антоцианов плодов аронии всех сортов является цианидин-3-галактозид.

4. Проведено определение экстрактивных веществ с использованием различных экстрагентов. Наибольшее количество экстрактивных веществ извлекается этанолом в концентрации 40 -70 %. Подкисление этанола позволяет в большинстве случаев несколько повысить его извлекающую способность. Минимальное количество экстрактивных веществ извлекается менее полярным экстрагентом – этанолом 95 %, хотя отличия не слишком велики.

5. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы антоциановых соединений в пересчете на цианидин-3-О-гликозид в высушенных плодах рябины черноплодной различных сортов методом спектрофотометрии. Подобраны условия экстрагирования антоциановых соединений. Валидация проводилась по параметрам прецизионность (повторяемость, воспроизводимость) и предел количественного обнаружения.

6. Определено количественное содержание основных классов БАВ в плодах рябины черноплодной различных сортов. Содержание антоциановых соединений составляет: сорт «Мичуринская» - $3,70 \pm 0,011$, сорт «Викинг» - $1,30 \pm 0,011$, сорт «Вениса» - $1,53 \pm 0,034$, сорт «Алтайская крупноплодная» - $0,98 \pm 0,003$. Таким образом, только сорт «Мичуринская» соответствует ФС по содержанию

антоцианов. Содержание флавоноидов составляет: сорт «Мичуринская» - $1,80 \pm 0,097$, сорт «Викинг» - **$2,20 \pm 0,021$** , сорт «Вениса» - $1,60 \pm 0,080$, сорт «Алтайская крупноплодная» - $1,50 \pm 0,023$. По содержанию флавоноидов лидирует сорт «Викинг». Содержание свободных органических кислот составляет: сорт «Мичуринская» - $1,66 \pm 0,091$, сорт «Викинг» - $1,52 \pm 0,025$, сорт «Вениса» - $1,53 \pm 0,026$, сорт «Алтайская крупноплодная» - **$1,71 \pm 0,085$** . Наибольшее количество органических кислот обнаружено в плодах сорта «Алтайская крупноплодная». Содержание кислоты аскорбиновой составляет: сорт «Мичуринская» - **$1,60 \pm 0,070$** , сорт «Викинг» - $0,03 \pm 0,071$, сорт «Вениса» - $1,53 \pm 0,024$, сорт «Алтайская крупноплодная» - $0,032 \pm 0,013$. Наибольшее количество кислоты аскорбиновой содержится в высушенных плодах рябины черноплодной сорта «Мичуринская». Установлено, что в исследуемых образцах содержание дубильных веществ составляет: сорт «Мичуринская» - $1,49 \pm 0,024$, сорт «Викинг» - $1,30 \pm 0,010$, сорт «Вениса» - **$1,53 \pm 0,034$** , сорт «Алтайская крупноплодная» - $0,98 \pm 0,003$. В плодах сорта «Вениса» содержится наибольшее количество дубильных веществ.

7. Были получены водные и водно-спиртовые извлечений высушенных плодов рябины черноплодной различных сортов. Был установлен качественный состав и количественное содержание флавоноидов, антоцианов, дубильных веществ, определена антиоксидантная активность в полученных извлечениях. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что по количественному содержанию БАВ – антиоксидантов, наиболее предпочтительной лекарственной формой является жидкий экстракт как наиболее концентрированное извлечение. Наименее рационально получение настоя из цельных плодов. Установлено, что в качестве лекарственной формы, обладающей максимальной антиоксидантной активностью, можно рекомендовать настой из цельных плодов сорта «Мичуринская», настой из измельченных плодов аронии сорта «Викинг», «Алтайская крупноплодная».

8. Был проведен сравнительный анализ мембранстабилизирующего, антиоксидантного и антитоксического действия новых жидких лекарственных форм плодов *Aronia melanocarpa*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aljadi A.M., Kamaruddin M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys / A.M. Aljadi, M.Y. Kamaruddin // Food Chemistry. – 2004. – V. 85., № 4. – 513-518 P.
2. Antal D.-S., Garban G., Wang Z.G. [et al.] The anthocyanins: biologically active substance of food and pharmaceutical interest / D.-S. Antal, Garban G., Z.G. Wang [et al.] // The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology. 2003: 106-115 P.
3. Antal D.-S., Garban G., Wang Z.G. et al. The anthocyanins: biologically active substances of food and pharmaceutical interest. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology. 2003: 106-115 P.
4. Baraboi, VA Antioxidants and health / VA Baraboi // Valeology: diagnostics, tools and practices for health: Sat. scientific. Tr. - St. Petersburg Institute of Medical Problems of formation of Health, 1993. - Vol. 1.- 107-115 P.
5. Bobylev RV Technology dosage forms / RV Bobylev, GP Gryadunova, LA Ivanov et al., Eds. LA Ivanova. - M.: Medicine, 1991.- 544 P.
6. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxydant Activity / W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset // Food Science and Technology – Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie. – 1995. – V. 28, № 1:25-30 P.
7. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity / J.E. Lee, G.S. Kim, S. Park [et al.] // Food Chem. – 2014. – Vol. 146. – P. 1-5. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.029.
8. Frank J., Kamal-Eldin A., Lundh T., Maatta K., Torronen R., Vessby B. Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats / J. Frank, A. Kamal-Eldin, T.

Lundh, K. Maatta, R. Torronen, B. Vessby // *Agric Food Chem.* 2002;50(25): 7226-7230 P.

9. Giusti M., Ronald E., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / M. Giusti, E. Ronald, R.E. Wrolstad // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001) F1.2.1-F1.2.13.

10. Goto T. Structure, stability and color variation of natural anthocyanins / T. Goto // *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.* – 1987. – V. 52. – 113-158 P.

11. Grould K.S. Nature's swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves // *J. Biomed. Biotechnol.* 2004. Vol. 5. 314-320 P.

12. Guerrero J.C., Ciampi L.P., Castilla A.C., Medel F.S., Schalchli H.S., Hormazabal E.H., Bensch E.T., Alberdi M.L. Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile // *Chilean J. Agric. Res.* - 2010. - V.70. - 537-544 P.

13. Gutteridge V., Westermarck T., Halliwell B. Oxygen damage in biological systems / V. Gutteridge, T. Westermarck, B. Halliwell // *Free radical, Aging and Degenerative Disease*. Ed. By Yohson Y. New York, 1986. – 221-224 P.

14. Halbwirth H., Martens S., Wienand U., Forkmann G., Stich K., Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays* / H. Halbwirth, S. Martens, U. Wienand // *Plant Science* 2003. V. 164. 489-495 P.

15. Hale K.L. Anthocyanins facilitate tungsten accumulation in *Brassica* / K.L. Hale [et al.] // *Plant Physiology.* - 2002. - Vol. 116, N 3. - 351-358 P.

16. Harborne J.B. Anthocyanins and other flavonoids / J.B. Harborne, C.A. Williams // *J. Natural Product Reports.* – 1998. – 631-652 P.

17. Horbowicz M., Kosson R., Gizesluk A., Anthocyanins of fruits and vegetables – their occurrence analysis and role in human nutrition / M. Horbowicz, R. Kosson, A. Gizesluk // *Vegetable Crops Research Bulletin.* 2008. V. 68. 5-22 P.

18. Hou D.X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins / D.X. Hou // *Curr Mol Med.* 2003;3(2): 149-159 P.

19. <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey>.

20. Jakobek L. Antioxidant activity and polyphenols of Aronia in comparison to other berry species / L. Jakobek, M. Seruga, M. Medvedovic – Kosanovic, I. Novak // *Agr. Consp.* – 2007. – Vol. 72, № 4. – 301-306 P.

21. Jakobek L., Seruga M., Medvidovic-Kosanovic M., Novak I. Antioxidant activity and polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species / L. Jakobek, M. Seruga, M. Medvidovic-Kosanovic, I. Novak // *Agriculturae Conspectus Scientificus.* – 2007. – V. 72. - № 4. – 301-306 P.

22. Jankowski A., Jankowska B., Niedworok J. The influence of *Aronia melanocarpa* in experimental pancreatitis / A. Jankowski, B. Jankowska, J. Niedworok // *Pol Merkurisz Lek.* 2000;8(48):395-398 P.

23. Kirakosyan A., Seymour E.M., Urcuyolanes D.E., Kaufman P.B., Bolling S.F. Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products / A. Kirakosyan , E.M. Seymour , Urcuyolanes D.E. [et al.] // *Food Chemistry.* – 2009. – V. 115, № 5. – 20-25 P.

24. Kokotkiewicz A., Jaremicz Z., Luczkiewicz M. Aronia Plants: A Review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine / A. Kokotkiewicz, Z. Jaremicz, M. Luczkiewicz // *J. Med. Food.* – 2010. – Vol. 13, № 2. – 255-269 P.

25. Kowalczyk E., Krzesinski P., Kura M., Szmigiel B., Blaszczyk J. Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol.* 2003; 55: 699-702 P.

26. Kulling S. Eed., Rawel H.M. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – a review on the characteristics components and potential health effects /S. Kulling Eed., H.M. Rawel // *Planta Med.* – 2008. – Vol. 74. – 1625-1634 P.

27. Lee J.E. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity / J.E. Lee, G.S. Kim, S. Park [et al.] // *Food Chem.* – 2014. – Vol. 146. – P. 1-5. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.029.

28. Lila M.A. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach / M.A. Lila // *J. Biomed. Biotechnol.* 2004. V. 5. 306-313 P.
29. Lister C.E. Pigments: Not just a pretty face / C.E. Lister, H.J. Simmonds // *Proc. Nutr. Soc. N.Z.* – 199. №24. – 34-39 P.
30. Matsumoto H., Inaba H., Kishi M., Tominaga S, Hirayama M., Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms / H. Matsumoto, H. Inaba, M. Kishi [et al.] // *J Agric Food Chem.* 2001;49(3):1546-1551 P.
31. Matsumoto H., Nakamura Y., Hirayama M., Yoshiki Y., Okubo K. Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma / H. Matsumoto, Y. Nakamura, M. Hirayama [et al.] // *J Agric Food Chem.* 2002;50(18):5034-5037 P.
32. Matsumoto H., Nakamura Y., Tachibanaki S., Kawamura S., Hirayama M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin / H. Matsumoto, Y. Nakamura, S. Tachibanaki [et al.] // *J Agric Food Chem.* 2003;51(12):3560-3563 P.
33. McGhie T., Ainge G., Barnett L., Cooney J., Jensen D. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats / T. McGhie, G. Ainge, L. Barnett, [et al.] // *J Agric Food Chem.* 2003;51(16): 4539-4548 P.
34. Ochmian I., Grajkowski J., Smolik M. Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*) / I. Ochmian , J. Grajkowski, M. Smolik // *Not Bot Horti Agrobo.* – 2012. – V.40, № 1. – 253-260 P.
35. Ochmian I., Oszmianski J., Skupien K. Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits / I. Ochmian , J. Oszmianski, K. Skupien // *Journal of Applied Botany and Food Quality.* – 2009. – V. 83. – 64-69 P.

36. Skerget, M. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities / M. Skerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. Rizner Hras, M. Simonic, Z. Knez // Food Chemistry. – 2005. – V. 89, №2. – 191-198 P.

37. Stoner D.G., Wang. L.S., Zikri N., Chen T., Hecht S.S., Huang C.S., Sardo C., Frechner J. Cancer prevention with Freeze-dried Berries and Berry Components // Semin Cancer Biol. - 2007. – V. 5, №17. – 403-410 P.

38. Sun, T. Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors / T. Sun, P.W. Simon, S.A. Tanumihardjo // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2009. – V.57, №10. 4142-4147 P.

39. Viskelis P., Rubinskiene M., Bobinaite R., Dambrauskiene E. Bioactive compounds and antioxidant activity of small fruits in Lithuania / P. Viskelis, M. Rubinskiene, R. Bobinaite [et al.] // Journal of Food, Agriculture and Environment. – 2010. – V. 8. - №3. – 259-263 P.

40. Wu L.C., Hsu H.W., Chen Y.C., Chiu C.C., Lin Y.I., Annie Ho J.A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya / L.C. Wu, H.W. Hsu, Y.C. Chen [et al.] // Food Chemistry. – 2009. – V.95, № 5. – 319-327 P.

41. А.с. 9901189 СССР, МПК А 61 В 10/00. Способ отбора веществ – адаптогенов / Бузлама В.С. – 2195776I30-15; заявлено 01.12.75; опубл. 28.01.83, Бюл. 3. – 4 С.

42. Анхазарова С. Л. Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии / С. Л. Ахназарова, В. В. Кафаров. – М.: Высш. Школа, 1978.-319 С.

43. Артюхова О.В. Индивидуальные составляющие фенольных соединений в биотканях льна / О.В. Артюхова, Г.П Лагина // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология». - 2008. -№ 8. – 110-113 С.

44. Багхи Д. Антиангиогенные, антиоксидантные и антиканцерогенные свойства нового, богатого антоцианом препарата из экстракта ягод /Д. Бахти, К. К. Сен, М. Багхи, М. Алатай // Биохимия.-2004.-Т.69, вып.1. – 95-1021С.

45. Багхи Д. Антиангиогенные, антиоксидантные и антиканцерогенные свойства нового, богатого антоцианом препарата из экстракта ягод /Д. Бахти, К. К. Сен, М. Багхи, М. Алатай // Биохимия.-2004.-Т.69, вып.1. – 95-102 С.

46. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия / В.Г. Беликов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс- информ, 2007.- 624 С.

47. Берест И.С. Выбор оптимальных условий извлечения антоциановых соединений из плодов рябины / И.С. Берест, Т.А. Брежнева, Е.Е. Логвинова // Science4health 2015. Клинические и теоретические аспекты современной медицины: материалы VI Международной научной конференции. Москва, РУДН, 14–18 апреля 2015 г. – Москва : РУДН, 2015.- 70 С.

48. Блажей А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый; перевод со словацк. А.Н. Сергеева; под ред. И. Селищева.- М.: «Мир», 1997.-239 С.

49. Бобылев Р.В. Технология лекарственных форм / Р. В. Бобылев, Г. П. Грядунова, Л. А. Иванова и др., под ред. Л. А. Ивановой. - М.: Медицина, 1991. - 544 С.

50. Брежнева Т.А. Определение количественного содержания различных групп БАВ в плодах рябины черноплодной / Т.А. Брежнева, Е.Е. Логвинова, И.С. Берест // «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», сборник материалов 2-й научно-практической конференции, г. Москва, 27 февраля, 2014.- 119-120 С.

51. Брежнева Т.А. Спектральные характеристики антоциановых соединений плодов рябины черноплодной / Т.А. Брежнева, Е.Е. Логвинова, А.И. Сливкин // Вестник ВГУ, серия химия, биология, фармация, 2013, №2-169-172 С.

52. Брежнева Т.А. Сравнительный анализ антиоксидантной активности плодов *Aronia melanocarpa* / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства»,

сборник материалов 5-й международной научно-практической телеконференции, г. Белгород, 17 апреля, 2015. – 131- 133 С.

53. Бузлама В.С. Способ отбора веществ – адаптогенов: Авт. свид. СССР. – 9901189 от 21.09.82. – 1982

54. Бузук Г.Н. Определение продуктов деструкции проантоцианидинов в корневищах с корнями сабельника болотного / Г.Н. Бузук, О.А. Ёршик // химико-фармацевтический журнал. - 2009. - № 7. - 32-33 С.

55. Васильев В. П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец. / В.П. Васильев. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Дрофа, 2002. - 384 С.

56. Георгиевский В.П. Биологические активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука СО РАН. 1990. – 333 С.

57. ГОСТ 26657-97. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания фосфора.

58. ГОСТ 26929-94 Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов.

59. ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов.

60. ГОСТ Р 51766-2001 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка.

61. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1989. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырьё. – 400 С.

62. Дейнека В.И. ВЭЖХ в анализе антоцианов: исследование цианидиновых гликозидов плодов растений рода *Prunus* / В. И. Дейнека и др. // Хим.-фарм. ж. - 2004. - Т. 38.- № 8. - 29-34 С.

63. Дейнека В.И. Исследование антоцианов черники в плодах и препаратах на ее основе / В.И. Дейнека и др. // Зав. лаб. - 2006. - № 3. - 16-20 С.

64. Дейнека В.И. Исследование удерживания антоцианов в элюентах системы ацетонитрил – муравьиная кислота – вода / В.И. Дейнека, А.М. Григорьев // Ж. физ. химии. - 2005. - Т. 79. - № 5. - 900-903 С.

65. Дейнека В.И. Определение антоцианов методом ВЭЖХ. Некоторые закономерности удерживания / В.И. Дейнека, А.М. Григорьев // Ж. аналит. химии. - 2004. - Т. 59. - № 3. - 305-309 С.

66. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Исследование удерживания антоцианов в элюентах системы ацетонитрил – муравьиная кислота – вода / В.И. Дейнека, А.М. Григорьев // Ж. физ. химии. -2005.- Т.79. -№5.- 900-903 С.

67. Дейнека В.И., Григорьев А.М. Определение антоцианов методом ВЭЖХ. Некоторые закономерности удерживания / В.И. Дейнека, А.М. Григорьев // Ж. аналит. химии. -2004.- Т.59. -№3.- 305-309 С.

68. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Борзенко О.Н., Староверов В.М., Трубицын М.А. ВЭЖХ в анализе антоцианов: исследование цианидиновых гликозидов плодов растений рода Prunus / В.И. Дейнека, А.М. Григорьев, О.Н. Борзенко [и др.] // Хим.-фарм. ж. -2004.- Т.38.- №8. - 29- 34 С.

69. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Староверов В.М. Исследование антоцианов черники в плодах и препаратах на ее основе // Зав. лаб. -2006.- №3.- 16-20 С. Способ получения биологически активных веществ из коры березы: пат. 36/185(2006.01).заявл.04.06.2008, опубл. 10.08.2009.

70. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Сорокопудов В.Н. Сиротин А.А. Антоцианы черной смородины: экстракция и сушка / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, Е.И. Шапошник и др. // Известия Вузов. Сер. Химия и химическая технология. -2006.- Т.49. -№11.- 77-80 С.

71. Дейнека Л.А., Сорокопудов В.Н., Дейнека Л.А., Сиротин А.А., Шапошник Е.И., Головков А.В. Антоцианы плодов растений: опыт экстракции и сушки / Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов, Л.А. Дейнека [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. -2006.- №4.- 28-31 С.

72. Дроздова В.И.; Пацюк Л.К.; Крейндель Л.Н.; Касьянов Г.И.; Борченкова. Способ получения пищевого красителя из растительного сырья. Патент РФ № 2057774, 1996.

73. Журавская-Скалова Д. В., Квасенков О. И. Активные методы интенсификации экстрагирования биологического сырья / Д.В. Журавская-Скалова, О.И. Квасенков // Хранение и переработка сельхозсырья. - №12. - 2009. – 23-24 С.

74. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов. – М.: Высшая школа, 2002. – 494 с.

75. Исмаилов Э. Ш., Шихалиев С.С., Кулиева Р. Г. Использование микроволн в пищевом производстве / Э.Ш. Исмаилов, С.С. Шихалиев, Р.Г. Кулиева // Известия вузов. Пищевая технология. - №2-3. – 2010. – 37-38 С.

76. Касьянов Г.И., Квасенков О.И. Производство пищевого красителя из растительного сырья. Патент РФ № 2086590, 1997.

77. Кожухов А.А. К вопросу о механизмах воздействия антоцианозидов экстракта черники на зрительный анализатор / А.А. Кожухов // Рефракционная хирургия и офтальмология. - 2005. - № 3.- 63-64 С.

78. Комарова Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» / Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев // СПб.: ООО «Веда», 2006. — 212 С.

79. Коренская И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие флавоноиды, кумарины, хромоны / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова. – Воронеж.: ИПЦ ВГУ, 2007. – 80 С.

80. Коренская И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие антраценпроизводные простые фенолы, лигнаны, дубильные вещества / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова. – Воронеж.: ИПЦ ВГУ, 2007. – 87 С.

81. Коренская И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие витамины, полисахариды, жирные масла / И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е. Измалкова. – Воронеж.: ИПЦ ВГУ, 2008. – 86 С.
82. Крупенникова В.Г. Антоцианы скабиозы венечной / В.Г. Крупенникова, Г.М. Федосеева // Сибирский медицинский журнал. - 2008. - № 2. - 78-85 С.
83. Куркин В.А. Стандартизация плодов аронии черноплодной / В.А. куркин, А.В. Егорова // Фармация. – 2012. - № 7. – 10-13 С.
84. Куркин В.А. Фармакогнозия учебник для фармацевтических вузов и факультетов, Самара: СамГМУ, 2004. – 277 С.
85. Лебедева М.И. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учеб. пособие/ М.И. Лебедева. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 216 С.
86. Левандовский В.А. Оптимизация процесса получения антоцианидиновых красителей из коры пихты и лиственницы / В.А. Левандовский, А.И. Бутылкина // Химия растительного сырья. - 2008. - № 4. - 51-54 С.
87. Левандовский В.А., Бутылкина А.И. Оптимизация процесса получения антоцианидиновых красителей из коры пихты и лиственницы / В.А. левандовский, А.И. Бутылкина // Химия растительного сырья. -2008.-№4.- 51-54 С.
88. Логвинова Е.Е. Выбор оптимальной лекарственной формы плодов Рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, А.С. Верещагина, И.С. Берест // Вестник ВГУ, серия химия, биология, фармация, 2015, №2-117-119 С.
89. Логвинова Е.Е. Изучение влияния различных способов консервации на содержание некоторых групп БАВ в плодах рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева И.С. Берест // «Состояние и перспективы, оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике», сборник материалов научно-практической конференции с международным участием, г. Ярославль, 2014.- 122-124 С.

90. Логвинова Е.Е. Исследование содержания биологически активных веществ – антиоксидантов в лекарственных формах плодов рябины / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Материалы конференции «Современные требования к лекарственному растительному сырью и лекарственным растительным препаратам». - Москва, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 19 февраля 2015 г. – 30-31 С.

91. Логвинова Е.Е. Выбор оптимальных условий извлечения антоциановых соединений из свежесобранных плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева И.С. Берест // «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции», сборник научных трудов, выпуск 69, г. Пятигорск, 2014. – 55-57 С.

92. Логвинова Е.Е. Выбор оптимальных условий извлечения антоциановых соединений из высушенных и свежесобранных плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, И.А. Самылина // Вестник ВГУ, серия химия, биология, фармация, 2014, №1-122-125 С.

93. Логвинова Е.Е. Изучение влияния различных способов консервации на содержание некоторых групп БАВ в плодах Рябины / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, И.С. Берест // Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике. – Ярославль, 2014. – 122-124 С.

94. Логвинова Е.Е. Изучение комплекса БАВ плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, В.Н. Тарабрина // «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ», сборник материалов 5-й международной научно-методической конференции «Фармобразование - 2013», г. Воронеж, 16-18 апреля, 2013.-382-385 С.

95. Логвинова Е.Е. Исследование влияния pH среды на спектральные характеристики антоциановых соединений плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, В.Н. Тарабрина , Т.А. Брежнева // «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», материалы Первой международной научной

конференции молодых ученых и студентов, республика Казахстан, г. Шымкет, 10-11 декабря, 2013.-43-45 С.

96. Логвинова Е.Е. Исследование качественного состава БАВ плодов рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // VII Всероссийская конференция «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах», г. Воронеж, 10-13 ноября 2015. – 508-512 С.

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

98. Логвинова Е.Е. Качественный анализ дубильных веществ в плодах рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ», сборник материалов 6-й международной научно-методической конференции «Фармобразование - 2016», г. Воронеж, 21-23 апреля, 2016.-366-368 С.

99. Логвинова Е.Е. Качественный и количественный анализ дубильных веществ плодов аронии черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, И.С. Берест // «Современные проблемы химической науки и фармации», сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина, г. Чебоксары, 3-4 апреля, 2014.-170-171 С.

100. Логвинова Е.Е. Определение антоциановых соединений плодов *Aronia melanocarpa* методом тонкослойной хроматографии / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Сборник материалов XIV Конференции и Третьего Всероссийского симпозиума с международным участием, г. Воронеж, 9-14 октября, 2014.-210-212 С.

101. Логвинова Е.Е. Определение дубильных веществ в плодах Рябины черноплодной методом тонкослойной хроматографии / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, И.С. Берест, А.С. Верещагина // «Разработка,

исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции», сборник научных трудов, выпуск 70, г. Пятигорск, 2015.- 50-53 С.

102. Логвинова Е.Е. Определение органических кислот в плодах аронии черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Научные ведомости Белгородского государственного университета, серия химия, биология, фармация, 2015, №10, выпуск 30.-190-195 С.

103. Логвинова Е.Е. Определение флавоноидов в плодах Рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2015, № 8. – 47-48 С.

104. Логвинова Е.Е. Совершенствование методики микроскопического анализа плодов аронии черноплодной / Е.Е. Логвинова, И.А. Самылина, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, Е.В. Блошицина // Фармация, 2016, №2.- 11-14 С.

105. Логвинова Е.Е. Сравнительный анализ мембранстабилизирующего действия препаратов плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, И.С. Трубенева, В.Н. Тарабрина // Вестник ВГУ, серия химия, биология, фармация, 2015, №4 - 126-129 С.

106. Логвинова Е.Е., Брежнева Т.А., Сливкин А.И. Определение коэффициента водопоглощения плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // «Сеченовский вестник» тезисы докладов IV научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», Москва, 2016. - .25 С.

107. Логвинова Е.Е.. Выбор оптимальной лекарственной формы плодов Рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова и др. // Вестник ВГУ, серия : химия, биология, фармация, 2014, № 1. - 122-125 С.

108. Мальцева А.А. Исследование комплекса биологически активных веществ растения *Polemonium coeruleum* L.: дис...канд. фарм. Наук / А.А. Мальцева. – Москва, 2011. – 184 С.

109. Методические указания по атомно-абсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье. Москва, 1992г. – 76С.

110. Миленская Т.М. Эффективность применения антоцианозидов в лечении больных с непролиферативной диабетической ретинопатией / Т.М. Миленская // клиническая офтальмология (Б-ка РМЖ). - 2008. - № 1.- С. 24-26.

111. Носов А. М. Лекарственные растения официальной и народной медицины / А. М. Носов, А.Д. Хайрутдинова: автореф. дисс. на соиск. учен. степ.канд. техических наук. – Воронеж. ВГТА,2003. – 7 С.

112. Пат. 2057774 Российская Федерация, МПК С 09 В 61/00. Способ получения пищевого красителя из растительного сырья / В.И. Дроздова; Л.К. Пацюк; Л.Н. Крейндель; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт консервной и овощесушильной промышленности. - № 93037202/13; Заяв. 19.07.1993; Оpubл. 10.04.1996, Бюл. № 10. - 2 С.

113. Пат. 2086590 Российская Федерация, МПК С 09 В 61/00. Производство пищевого красителя из растительного сырья / Г.И. Касьянов, О.И. Квасенков; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт консервной и овощесушильной промышленности. - № 95116202/13; Заяв. 19.09.1995; Оpubл. 10.08.1997, Бюл. № 22. - 4 С.

114. Пат. 2170930 Российская Федерация, МПК 7 G 01 N 33/50. Способ определения антиокислительной активности / Т.В. Максимова; заявитель и патентообладатель Московск. мед. акад. им. И.М. Сеченова. - № 2000111126/14; Заяв. 05.05.2000; Оpubл. 20.07.2001. - 6 С.

115. Пат. 2177015 Российская Федерация, МПК С 09 В 61/00. Получение натурального антоцианового красного красителя / В.А. Смирнов, В.В. Сидоров, В.В. Смирнова; заявитель и патентообладатель В.А. Смирнов, В.В. Сидоров, В.В. Смирнова. - № 2001101588/13; Заяв. 18.01.2001; Оpubл. 20.12.2001, Бюл. № 12. - 6 С.

116. Пат. 2363486 Российская Федерация, МПК А 61 К 36/185, С 07 J 63/00, С 07 J 53/00. Способ получения биологически активных веществ из коры березы / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов; заявитель и патентообладатель ИХХТ СО РАН. - № 2008122689/15; Заяв. 04.06.2008; Оpubл. 10.08.2009, Бюл. № 22. - 6 С.

117. Перова И.Б. Исследование содержания и специфического профиля антоцианинов лекарственного растительного сырья: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. фарм. наук (14.04.02) / Перова Ирина Борисовна; ГБОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет имени И.И. Сеченова. – Москва, 2015. - 25 С.

118. Причко Т.Г. Выявление закономерностей формирования биохимического состава плодов в зависимости от действия экзогенных факторов среды / Т.Г. Причко, Л.Д. Чалая, М.В. Карпушина // Наука Кубани. - 2010. - №2. – С. 32-34.

119. Причко Т.Г. Закономерности накопления витаминов и полифенолов в плодах и ягодах / Т.Г. Причко, Л.Д. Чалая, М.В. Карпушина // Плодоводство: Научные труды / Национальная академия наук Беларуси, РУП «Институт плодоводства . - 2009, Т.21. – С. 365-373.

120. Птицин А.В. Выделение и очистка антоцианов винограда сорта изабелла / А.В. Птицин, А.П. Калпун // Биотехнология. - 2007. -№ 2. - С. 22-28.

121. Разаренова К.Н. Сравнительная оценка содержания дубильных веществ в некоторых видах рода *Geranium* L. флоры северо-запада / К.Н. Разаренова, Е.В. Жохова // Химия растительного сырья. – 2011. - №4. – 187-192 С.

122. Разработка технологии и методик анализа сока из плодов аронии черноплодной / О. М. Маркова, Н. А. Романцова, А.О.Зеленова // Исследование и стандартизация биологически активных соединений.-2010.-№1.- 253-255 С.

123. Райхард К. Растворители и эффекты среды в органической химии / К. Райхард. – М.: Мир, 1991. – 763 С.

124. Рахманкулов Д. Л., Шавшукова С. Ю. История науки и техники , 2008, т. 3, № 1.
125. Рахманкулов Д.Л., Шавшукова С.Ю. История науки и техники, 2007, т. 12, № 3, 3—8, 92-98 С.
126. Саввин П.Н. Получение, свойства и применение антоциановых красителей в производстве сахарных кондитерских изделий: автореф. дисс. на соиск. учен. степ.канд. технических наук. / П.Н. Саввин. – Воронеж. - 2009. – 9 С.
127. СВЧ-энергетика. Т. 2. Применение энергии сверхвысоких частот в промышленности. Под. ред. Э. Окресса. М.: Мир, 1971, 272 С.
128. СВЧ-энергетика. Т. 3. Применение энергии сверхвысоких частот в медицине, науке и технике. Под. ред. Э. Окресса. М.: Мир, 1971, 250 С.
129. Сергунова Е.В., Зайцева Н.А., Самылина И.А. Влияние способа консервации на качество плодов и водных извлечений калины обыкновенной / Е.В. Сергунова, Н.А. Зайцева, И.А. Самылина // Фармация.-2009.-№5.- 16-18 С.
130. Сергунова Е.В., Капустина Д.Г. Способы консервации плодов аронии черноплодной и состав биологически активных веществ / Е.В. Сергунова, Д.Г. Капустина // Фармация. -2014.- №8. - 3-6 С.
131. Сергунова Е.В., Марахова А.И., Аврач А.С. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях /Е.В. Сергунова, А.И. Марахова, А.С. Аврач // Фармация. -2013. - № 4. - 8-11 С.
132. Сергунова Е.В., Сорокина А.А. Изучение фенольных соединений плодов и лекарственных форм шиповника методом ВЭЖХ / Е.В. Сергунова, А.А. Сорокина // Фармация.- 2012. - №5.- 11-13 С.
133. Сергунова Е.В., Сорокина А.А., Аврач А.С. Изучение плодов боярышника различных способов консервации и водных извлечений / Е.В. Сергунова, А.А. Сорокина, А.С. Аврач // Фармация. – 2010. - №5. - 16-18 С.
134. Сластья Е.А. Новый экспресс-метод полуколичественного определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в винограде и вине / Е.А.

Сластья и др. // Вісник Харківського національного університету. -2005. - № 669. - Хімія. Вип.13 (36). - 119-124 С.

135. Сластья Е.А., Жиякова Т.А., Аристова Н.И., Ткачѳв И.Ф., Пилипенко Д.С. Новый экспресс-метод полуколичественного определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в винограде и вине / Е.А. Сластья, Т.А. Жиякова, Н.И. Аристова, И.Ф. Ткачѳв, Д.С. Пилипенко // Вісник Харківського національного університету. -2005. -№669. -Хімія. Вип.13(36)119-124 С.

136. Смирнов В.А., Сидоров В.В., Смирнова В.В. Получение натурального антоцианового красного красителя, Номер патента: 2177015,2001.

137. Сорокина А.А. Разработка проекта общей фармакопейной статьи «Настои» / А.А. Сорокина, И.П. Рудакова, И.А. Самылина // Фармация. – 2010. - № 4. – 3-6 С.

138. Сосипатрова А.А. Влияние факторов экстрагирования на эффективность извлечения биологически активных веществ из листьев березы повислой / А.А. Сосипатрова, Н.Б. Демина // Фармация. - 2011. - № 1. - С. 25-27.

139. Сосипатрова А.А., Демина Н.Б. Влияние факторов экстрагирования на эффективность извлечения биологически активных веществ из листьев березы повислой.// А.А. Сосипатрова, Н.Б. Демина // Фармация.-2011.-№1.- 25-27 С.

140. Способ определения антиокислительной активности : пат. 2170930 Рос. Федерация, МПК⁷ G01N33/50, G01N33/52 / Т.В. Максимова ; заявитель и патентообладатель Московск. мед. акад. им. И.М. Сеченова. – 2000111126/14 ; заявл. 05.05.2000 ; опубл. 20.07.2001. – 6 с.

141. Способ получения биологически активных веществ из коры березы: пат. 36/185(2006.01).заявл.04.06.2008, опубл. 10.08.2009.

142. Тарабрина В.Н. Спектральные характеристики антоциановых соединений плодов аронии / В.Н. Тарабрина, Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.А. Титова // «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ», сборник материалов 5-й

международной научно-методической конференции «Фармобразование - 2013», г. Воронеж, 16-18 апреля, 2013.-540-542 С.

143. Ткачев С.С. Антоцианы в плодах и овощах / С.С. Ткачев. – М.: Пищевая промыш-ть. - 1980. - 10-17 С.

144. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки/А. С. Кони́чев [и др.]/// Вестник МГОУ. Серия естественные науки.- 2011.-№3.- 49-54 С.

145. Трубенева И.С. Исследование возможности применения СВЧ-излучения с целью интенсификации процесса экстрагирования антоциановых соединений из лекарственного растительного сырья / И.С. Трубенева, Е.Е. Логвинова, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин // «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ», сборник материалов 6-й международной научно-методической конференции «Фармобразование - 2016», г. Воронеж, 21-23 апреля, 2016.-552-556 С.

146. Федюлин А.С. Особенности измельчения плодов аронии черноплодной / А.С. Федюлин, Т.В. Борисова, Б.Д. Левин // Химия растительного сырья. - 2006. - № 4. - 55-58 С.

147. Фурса Н.С. Выявление и определение состава отдельных классов веществ первичного и вторичного обмена голубики / Н.С. Фурса, А.А. Красильщиков // Вестник пермской государственной фармацевтической академии. - 2007. - № 2. - 255-256 С.

148. Хайрутдинова А.Д. Разработка технологии антоциановых красителей из ЛРС: автореф. дисс. на соиск. учен. степ.канд. техических наук. / А.Д. Хайрутдинова. – Воронеж. ВГТА, 2003. – 7 С.

149. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация / Н.В. Дубашинская, О.М. Хишова, О.М. Шимко//Вестник фармации.-2007.-№2.-1-10 С.

150. Чурилина Е.В. Извлечение натуральных красителей гидрофильными полимерами / Е.В. Чурилина и др. // Химия растительного сырья. -2010. -№ 2. - 153-158 С.

151. Чурилина Е.В., Коренман Я.И., Суханов П.Т., Болотов В.М., Шаталов Г.В. Извлечение натуральных красителей гидрофильными полимерами / Е.В. Чурилина, Я.И. Коренман, П.Т. Суханов, В.М. Болотов , Г.В. Шаталов // Химия растительного сырья. -2010.-№ 2.- 153-158 С.

152. Щепетков Н.Г. Плодоовощеводство / Н.Г. Щепетков // Учебное пособие. — Астана: Каз. гос. агротехн. ун-т им. С. Сейфуллина, 2007. —417С.

ПРИЛОЖЕНИЕ №1
ПРОЕКТ ОБЩЕЙ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ
«АРОНИЯ ЧЕРНОПЛОДНАЯ ПЛОДЫ»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Арония черноплодная плоды

ФС

Aroniae melanocarpae fructus

Вводится впервые

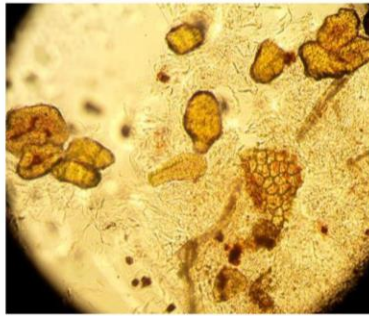
Зрелые, высушенные плоды многолетнего культивируемого кустарника или небольшого дерева аронии черноплодной – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott., сем.розоцветных – Rosaceae.

Подлинность

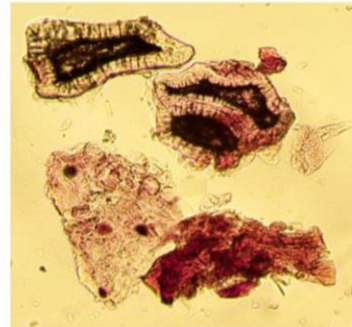
Внешние признаки. *Цельное сырье.* Плоды сорта «Мичуринская» диаметром до 7 мм, бесформенные, сильно сморщенные, от шаровидных до плоскоокруглых, сплюснутые на верхушке, с выраженным опушением или матовые. Плодолистики внутри плода образуют 5 гнезд, в которых расположены семена. Мякоть от красноватого до фиолетового оттенка, образована сильно разросшимся гипантием, на верхушке имеются малозаметные чашелистики, под ними, внутри плода, заметно скопление большого числа волосков, похожее на паутину. Семена в очертании удлинено обратнойцевидные, красновато-коричневые, до 3 мм длиной. Плоды черного цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения кисловато-сладкий, вяжущий.

Микроскопические признаки. Клетки эпидермиса плодов аронии крупные, многоугольные, почти правильной формы, в поле зрения микроскопа имеются длинные тонкостенные одноклеточные волоски. Мякоть от желтовато – бурого до фиолетового-красного цвета, в клетках имеется большое количество друз оксалата кальция и редкие призматические кри-

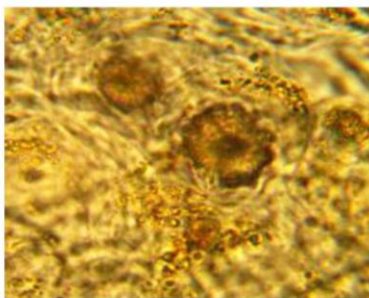
сталлы. Каменистые клетки встречаются группами и одиночно, имеют вытянутую или округлую формы.



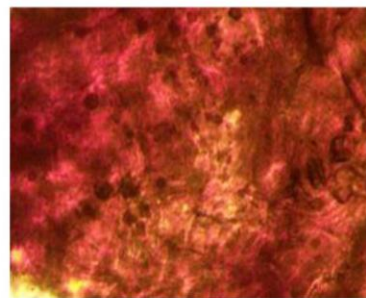
Каменистые клетки (ув. $\times 100$)



Каменистые клетки (ув. $\times 100$)



Друзы (ув. $\times 400$)



*Мякоть с друзами оксалата
кальция (ув. $\times 100$)*



Клетки эпидермиса (ув. $\times 100$)



Одноклочные волоски (ув. $\times 100$)



Каменистые клетки и

одноклеточные волоски (ув. $\times 100$)

Рис. 1. Анатомические признаки плодов аронии

Семена аронии мелкие (толщина – 63,7 мкм, длина – 34,3 мкм, диаметр – 16,7 мкм). Эпидермис семенной кожуры состоит из тонкостенных клеток, далее находится слой склеренхимы. В эндосперме и зародыше содержится жирное масло и алейроновые зерна. Семя представлено крупными семядолями, окруженными слоем ровных клеток.

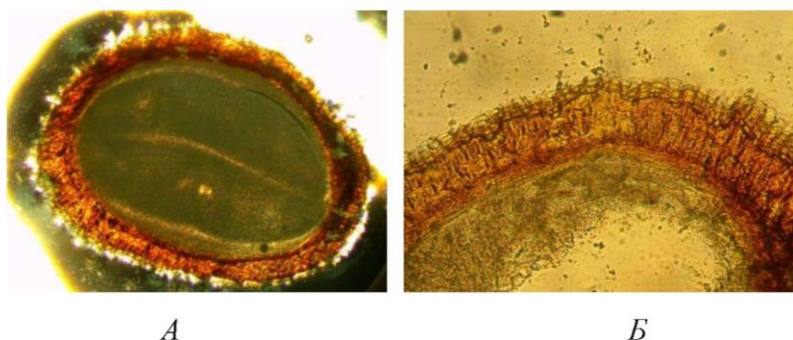


Рис. 2. Поперечный срез семени (А – ув. $\times 100$), Б – ув. $\times 400$)

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 10 мкл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Сумма антоцианов»). Пластинку с нанесенными пробами высушивают, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью н-бутанол: «ледяная» уксусная кислота : вода (4:1:1) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронта растворителя около 80-90% высоты пластинки от линии старта пластинку сушат на воздухе до удаления запаха растворителя и просматривают при дневном свете. На хроматограмме анализируемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции фиолетового цвета.

2. К 5 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Сумма антоцианов») прибавляют 5 мл 10% раствора свинца ацетата основного, появляется синий аморфный осадок (антоцианы).

3. К 5 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение. Сумма антоцианов») прибавляют 5 мл 10% раствора натрия гидроксида, появляется оливково-зеленое окрашивание (антоцианы).

4. 2,5 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл кипящей воды и кипятят на плитке в течение 5 минут, полученное извлечение фильтруют через складчатый фильтр. К 1-3 мл фильтрата прибавляют 1 мл железа (III) аммония сульфата 1 % раствора, должно наблюдаться черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

5. Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через бумажный фильтр. К 5 мл фильтрата прибавляют 3 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %, раствор окрашивается в желто-зеленый цвет (флавоноиды).

Приготовление растворов.

10% раствор натрия гидроксида. 10 г натра едкого безводного (ГОСТ 4328-77) растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают. Хранят в стеклянных сосудах с резиновыми пробками.

10% раствор свинца ацетата. 10 г свинца ацетата (ГОСТ 1027-67) растворяют в воде, прибавляют уксусной кислоты до получения прозрачного раствора и разбавляют водой до 100 мл.

5% раствор алюминия хлорида. 5 г алюминия хлорида А-1 – безводного х.ч. (ТУ 6-01-2-88) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, при-

бавляют 50 мл спирта 95%, взбалтывают до растворения, доводят объем раствора спиртом 95% до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 месяца.

Железа (III) аммония сульфата раствор 1 %. 1,0 г железа (III) аммония сульфата растворяют в воде очищенной и доводят тем же растворителем до 100 мл.

Испытания

Влажность. *Цельное сырье* - не более 17 %;

Зола общая. *Цельное сырье* - не более 3 %;

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* - не более 0,5 %;

Посторонние примеси

Недозрелые плоды. *Цельное сырье* – не более 1%;

Ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе). *Цельное сырье* – не более 0,5%.

Органическая примесь. *Цельное сырье* - не более 2 %;

Минеральная примесь. *Цельное сырье* - не более 0,5 %;

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье.* Сумма антоцианов в пересчете цианидин – 3 – О- глюкозид не менее 3 %; экстрактивных веществ извлекаемых 40% спиртом этиловым не менее 20,0%;

Приготовление растворов.

Спирт 40%, содержащий хлористоводородную кислоту. К 100мл спирта 40% осторожно приливают по каплям 1,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Раствор используют свежеприготовленным.

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

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100мл, прибавляют 40мл 40% спирта с добавкой кислоты хлороводородной до содержания 1%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в коническую колбу на 100мл.

5мл полученного после фильтрования раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

5мл раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны $\lambda=530$ нм в кювете с толщиной слоя 10мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 40%, содержащий хлористоводородную кислоту.

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

$$X = A \cdot 40 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 / E \cdot a \cdot 5 \cdot 5 \cdot (100 - W),$$

где: *A* – оптическая плотность испытуемого раствора;

a – навеска сырья, г;

$A_{1\%}^{1\text{nm}}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 530 нм, равный 100;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1 из навески 1,00 г сырья, измельченного до размера частиц 1 мм, экстрагент спирт 40 %).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Срок годности. 2 года.