

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

---

*На правах рукописи*

НЕСТЕРОВА НАДЕЖДА ВИКТОРОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ  
СЫРЬЯ MALUS SYLVESTRIS (ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ)**

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**

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

МОСКВА – 2019

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	17
1.1. Анализ исторических тенденций медицинского применения листьев и плодов разных видов яблони в медицине.....	17
1.2. Краткая ботанико-фармакогностическая характеристика особенностей семейства Rosaceae и рода Malus.....	22
1.2.1. Особенности семейства Розоцветные (Rosaceae).....	22
1.2.2. Особенности рода Яблоня (Malus) .....	24
1.3. Характеристика мест обитания, ареала распространения, районов возделывания и особенностей заготовки сырья яблони.....	27
1.4. Краткая характеристика современного состояния изученности химического состава листьев и плодов яблони лесной и яблони домашней.....	28
1.5. Фармакологическое действие извлечений из листьев и плодов яблони лесной и домашней и перспективы использования в медицинской практике.....	34
1.6. Современное состояние стандартизации листьев, плодов яблони лесной и яблони домашней.....	37
1.7. Современное состояние методов анализа фармакопейных видов ЛРС, заготавливаемого от представителей семейства Розоцветные.....	38
<b>ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1</b> .....	48
<b>ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	50
2.1. Краткое описание объектов исследования, особенностей их заготовки и консервации.....	50

2.2. Краткая характеристика аналитических методов и лабораторного оборудования, используемых при изучении исследуемого сырья.....	52
2.2.1. Анализ арбутина в листьях, плодах яблони лесной.....	52
2.2.2. Изучение состава и оценка суммарного содержания флавоноидов.....	54
2.2.3. Изучение состава и оценка суммарного содержания гидроксикоричных кислот .....	56
2.2.4. Изучение состава и оценка суммарного содержания органических кислот.....	58
2.2.5. Определение аминокислотного состава листьев, плодов яблони лесной .....	59
2.2.6. Определение дубильных веществ.....	60
2.2.7. Определение полисахаридов.....	62
2.2.8. Определение товароведческих показателей исследуемого сырья .....	64
2.2.9. Определение антимикробной активности исследуемого сырья.....	64
2.3. Валидация методов, обработка полученных результатов.....	65
2.4. Разработка методического подхода к анализу плодов, листьев яблони лесной на основе системного анализа нормативной документации и научной литературы.....	66

<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЛИСТЬЕВ, ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ И ЯБЛОНИ ДОМАШНЕЙ.....</b>	<b>68</b>
3.1. Изучение внешних признаков сырья яблони лесной и домашней.....	68
3.2. Изучение микроскопических признаков сырья яблони лесной и домашней.....	72

3.2.1. Изучение диагностических признаков при микроскопическом изучении свежих, высушенных и замороженных плодов яблони лесной и яблони домашней.....	73
3.2.2. Изучение микродиагностических признаков свежих, высушенных и замороженных листьев яблони лесной и яблони домашней.....	74
<b>ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3 .....</b>	<b>80</b>

<b>ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ, ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ С УЧЕТОМ ИСПОЛЬЗУЕМОГО МЕТОДА КОНСЕРВАЦИИ СЫРЬЯ.....</b>	<b>82</b>
4.1 Результаты предварительного качественного группового анализа биологически активных веществ листьев, плодов яблони лесной свежих, высушенных, замороженных.....	82
4.2. Идентификация и количественная оценка флавоноидов и фенолкарбоновых кислот листьев, плодов яблони лесной.....	87
4.4. Идентификация и количественная оценка органических кислот листьев, плодов яблони лесной.....	102
4.5. Результаты аминокислотного анализа листьев, плодов яблони лесной .....	110
4.6. Результаты оценки содержания полисахаридов, включая пектиновую фракцию.....	112
4.7 Идентификация и количественная оценка содержания арбутина в исследуемом сырье .....	115

4.8. Количественная оценка дубильных веществ в исследуемом сырье.....	125
4.9. Общая оценка влияния способа консервации на состав БАВ листьев и плодов яблони лесной свежих, высушенных и замороженных.....	129
<b>ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....</b>	<b>133</b>
<b>ГЛАВА 5. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТЬЕВ, ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ.....</b>	
<b>ЛЕСНОЙ.....</b>	<b>135</b>
5.1. Разработка показателей качества нового лекарственного растительного сырья – листья, плоды яблони лесной.....	135
5.2. Разработка технологических показателей плодов, характеризующих качество сырья в пищевой промышленности.....	140
5.3. Сравнительный анализ различных технологических способов выделения пектинов из плодов яблони лесной и домашней.....	142
5.4. Разработка некоторых показателей качества пектина плодов яблони лесной.....	145
5.5. Изучение адсорбционной способности измельченных плодов и пектина яблони лесной.....	146
5.6. Определение антимикробной активности извлечений из плодов и листьев яблони лесной.....	148
<b>ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....</b>	<b>151</b>
<b>ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ .....</b>	
<b>.....</b>	<b>152</b>
6.1. Оптимизация параметров получения водных извлечений из листьев и плодов яблони лесной разных способов консервации.....	152

6.2. Сравнительный анализ некоторых показателей качества водных извлечений из листьев и плодов яблони лесной разных способов консервации.....	153
6.3. Оценка количественного содержания биологически активных веществ в водных извлечениях из листьев и плодов яблони лесной.....	155
6.4. Особенности получения и оценка показателей качества НМГ из листьев, плодов яблони лесной.....	156
6.5. Получение и стандартизация сухого экстракта листьев и плодов яблони лесной.....	169
6.5.1. Изучение возможности получения сухих экстрактов из листьев и плодов яблони лесной.....	170
6.5.2. Разработка метода стандартизации сухих экстрактов из листьев, плодов яблони лесной .....	171
6.6. Изучение возможности создания сиропа плодов яблони лесной.....	173
<b>ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....</b>	<b>179</b>
<b>ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....</b>	<b>180</b>
<b>Практические рекомендации и предложения.....</b>	<b>181</b>
<b>Перспективы дальнейшей разработки темы.....</b>	<b>182</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>183</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>212</b>
Приложение 1. Краткая характеристика видов яблони.....	212
Приложение 2. Соединения фенольной природы, идентифицированные в разном сырье растений рода яблоня.....	215
Приложение 3. Классификация плодов яблони в зависимости от из размерных характеристик (По данным Чижиковой О.Г. и соавт. «Товароведение и экспертиза плодоовощных и вкусовых товаров»).....	218
Приложение 4. Показатели качества плодов яблони, определяемые согласно требованиям ГОСТ пищевой промышленности.....	219

Приложение 5. Результаты качественных реакций на арбутин, проводимых до и после осаждения полифенольного комплекса, с водными извлечениями из листьев яблони лесной и домашней.....	222
Приложение. 6. Проект ФС «Яблони лесной листья – <i>Mali sylvestris</i> folia».....	223
Приложение. 7.Проект ФС «Яблони лесной листья – <i>Mali sylvestris</i> folia».....	232
Приложение 8. Патент №2639119. Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью.....	239
Приложение 9. Акт внедрения.....	241
Приложение 10. Акт внедрения.....	242
Приложение 11. Акт внедрения.....	243
Приложение 12. Акт внедрения.....	244
Приложение 13. Акт внедрения.....	245
Приложение 14. Акт внедрения .....	246

## Введение

### Актуальность темы исследования

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

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

### **Степень разработки темы исследования**

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

### **Цель и задачи исследования**

Целью исследования является фармакогностическое изучение и научное обоснование характеристик подлинности и показателей качества нового

лекарственного растительного сырья – листья, плоды яблони лесной, а также разработка и стандартизация лекарственных препаратов на их основе.

Для достижения поставленной нами цели необходимо было решить следующие задачи:

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

качества экстракционных препаратов и установить их нормы для включения в разрабатываемую НД;

7. Провести изучение антимикробного действия исследуемого сырья, экстракта и НГМ плодов и листьев яблони лесной.

### **Научная новизна**

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

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

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Полученные результаты проведенных нами экспериментальных исследований позволяют значительно расширить представления о химическом составе БАВ, анатомо-морфологических признаках и биологической активности нового ЛРС – листья, плоды яблони лесной. Научно обоснованы характеристики подлинности и показатели качества фармацевтических субстанций растительного происхождения – ЛРС, НГМ, экстракта плодов и листьев яблони лесной. Предложены методики качественного и количественного анализа основных БАВ в новом ЛРС - плоды и листья яблони лесной, а также экстракте и НМГ, которые включены в проекты НД.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

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

## **Методология и методы исследования**

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

В работе нами использовался комплекс методов, среди которых тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, спектрофотометрия, гравиметрический и титриметрический анализ, биологические (макро- и микроскопический анализ, оценка антимикробной активности), фармакопейные методики ГФ XIV изд. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV изд. с применением программного обеспечения «Statistica 8,0»; «Microsoft Excel 2016»

## **Достоверность научных положений и выводов**

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

## **Апробация результатов исследования**

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

Основные положения диссертации доложены: на республиканской научно-практической конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы образования науки и производства в фармации» (Ташкент, ноябрь, 2015); (Ташкент, 2016.); (Ташкент, 2017.); на VI и VII конференции «Инновационные технологии в науке и образовании.». (Чебоксары. 2016); (Чебоксары 2017); на Московской международной гомеопатической конференции 2016, 2017, 2018; на V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва 2016); на IX Международной научно-практической конференции, 2018; на международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования науки в 21 веке. Шаг в будущее» (Санкт-Петербург; 6-7 июля 2017); доклад на XVIII международном конгрессе «Здоровье и образование в 21 веке»; Глобальная интеграция современных исследований и технологий в медицину и образовательное пространство» (Москва, 14-17 декабря 2016) удостоен Диплома Первой степени; доклад на II международно-практическом конкурсе «Преподаватель года 2018» за доклад «Формирование естественно-научного мышления учащихся на примере открытого урока «Сравнительный анализ плодов яблони лесной и домашней» удостоен диплома победителя I степени. (Пенза, 20 сентября, 2018)

### **Личный вклад автора**

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

## **Внедрение результатов исследования**

Результаты проведенного исследования использованы в учебном процессе кафедры фармацевтического естествознания Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 12.02.2019), кафедры фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института (акт внедрения от 17.01.2019), кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» (акт внедрения от 10.04.2018), кафедры фармации Института медико-социальных технологий ФГБОУ ВО «МГУПП» Минобрнауки России (акт внедрения от 29.10.2018), а также в элективный курс Ресурсного центра «Медицинский Сеченовский Предуниверсарий» (РЦ МСП) (акт внедрения от 13.03.2019), подготовлены проекты ФС на новые виды сырья листья, плоды яблони лесной.

## **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

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

## **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки**

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

## Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 211 страницах машинописного текста, содержит 61 таблицу и 49 рисунков, состоит из введения, обзора научной литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, списка литературы, включающего 252 источника, в том числе 122 иностранных, а также приложений.

**Во введении** приводится обоснование актуальности выбранного направления исследования, сформулирована цель работы и предложены конкретные задачи для достижения цели исследования, научная и практическая значимость проделанной работы, методология исследования, положения, выносимые на защиту, доклады и публикации по теме диссертационного исследования, отражен личный вклад автора. **В первой главе** (обзор литературы) систематизированы и проанализированы данные научной литературы, характеризующие современное состояние изученности химического состава, фармакологического действия нового ЛРС - листья, плоды яблони лесной. **Во второй главе** приведены данные, характеризующие объекты исследования, применяемые в ходе анализа методы и приборы, а также данные методического характера. **Третья глава** содержит данные морфолого-анатомического изучения листьев, плодов яблони лесной, определенные для свежего, замороженного и высушенного сырья, в ходе которого предложены маркеры анатомического строения. **В четвертой главе** приведены результаты исследований по изучению состава и количественной оценки БАВ различных групп в анализируемом сырье. **Пятая глава** содержит данные по стандартизации исследуемого сырья. **В шестой главе** приводятся результаты исследований по анализу БАВ экстракционных препаратов из листьев, плодов яблони лесной, в том числе НГМ, а также результаты их стандартизации.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ, из них 8 опубликовано в журналах, включенных в перечень ВАК Министерства

образования и науки РФ, 2- в журналах, входящих в международные базы данных (индексируемых в Scopus), имеется 1 патент на изобретение.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Анализ исторических тенденций медицинского применения листьев и плодов разных видов яблони в медицине.

Род яблоня (*Malus*) представлен 25 видами, приуроченными к зоне умеренного климата северного полушария. Археологические находки свидетельствуют, что плоды дикорастущих яблонь использовались уже в первобытном обществе. Значение яблони в жизни человека древних времен подтверждается дошедшими до нас многочисленными легендами и мифами, в которых подчеркиваются польза плодов, приносящих людям здоровье и долголетие. С развитием общества происходит введение дикорастущих яблонь в культуру, а само растение начинает привлекать внимание ученых. Так, Теофраст (370-286) в своем основополагающем труде «*Historia plantarum*» описал морфологические признаки дикорастущих и культурных виды яблони. В дальнейшем плоды яблони начинают рассматриваться не только в качестве пищевого продукта, но и как лечебное средство. Многие выдающиеся врачи Древнего мира и Средневековья широко использовали в своей терапевтической практике и с целью профилактики различных заболеваний свежие и переработанные плоды и листья яблони многих видов. Сохранившиеся до наших дней труды таких ученых-энциклопедистов как Гиппократ, Авл Корнелий Цельс, Махзан-Ул-Авдия, Авиценна и многих других содержат упоминания о использовании плодов или листьев яблони при лечении лихорадочных состояний, воспалений, расстройствах пищеварения, заболеваниях сердца и в составе многокомпонентных противоядий и других, известных в то время лекарственных прописей. [110, 40, 38, 3, 4, 14].

Данные по преимущественному использованию плодов или листьев яблони лесной и домашней выдающимися учеными Древнего мира и Средневековья представлены на схеме 1.



*Схема 1. Выдающиеся ученые древности, спользующие в своей терапевтической практике листья, плоды яблони лесной и домашней*

Позднее Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм (Парацельс) использовал свежий яблочный сок и отвар листьев и цветков яблони при различных воспалениях, а яблоки, обладающие в зрелом состоянии насыщенными оттенками красного цвета, при болезнях сердца, что объяснялось авторским учением о сигнатурах (*signa natura* – знаки природы). Благодаря широкому распространению данного учения в Европе, использование красных плодов яблочек прочно вошло в терапевтическую практику врачей-сигнатуристов. Оствальд Кроль, создавший трактат «*Tractatus novus de signaturis*» (1634), описывал несомненный эффект применения красных сортов яблочек при болезнях крови, сердца, а также при кровавом поносе. (Ковнер С.Р. История медицины средних веков.1883,50-55. с.). Интересно отметить факт

распространенности учения о сигнатурах в медицинской практике Европейских стран вплоть до конца 19 в. Так, сигнатурист Радемахер (1792-1850), по мнению которого существовало три «главенствующих страдания»: селитрянная, медная и железная болезнь, в лечении последней широко применял мякоть плодов красных яблок, причем яблоки других сортов были незаслуженно забыты. Но если плоды яблони в Европе использовались в практике известных врачей, листьями яблони лечили травники-зеленцы.

В Риге уже в 1291 г. существовала аптека, в которой можно было приобрести пряности, лекарственные травы и сборы. В качестве потогонного средства для лечения лихорадочных состояний предлагался сбор, включающий цветки липы и листья яблони-дички. (Васильев Г.К., Григораш Ф.Ф. Очерки истории медицины и здравоохранения Латвии. М., 1964)

Культура яблони в России относится ко времени Киевской Руси, а появление садов связано с деятельностью монастырей. В дошедших до наших дней летописях есть описание яблоневого сада при Киево-Печерском монастыре, основанного еще при Ярославе Мудром. Ефросинья Полоцкая, по свидетельству историков, для исцеления многочисленных хворей пользовалась взвар яблочный [38]. Подробный перечень недугов, при которых могут использоваться плоды и листья яблони дан в рукописной книге XVII в., лечебник «Прохладный Вертоград». [14]

Во второй половине XVII века в Москве располагались три Аптекарских огорода, описания которых содержатся в исторических исследованиях В. Рихтера и Н. Загоскина [20, 36]. Следует отметить, что в Московских Аптекарских огородах наряду с лекарственными растениями возделывались различные сорта яблони, от которых помимо плодов заготавливались также и листья. В период создания Российских Фармакопей плоды яблони стали рассматриваться как лекарственное растительное сырье. Так, в российских фармакопеех с первого по восьмое издания, есть статья *Fructus Mali Recentis*

и статья Extractum Ferri Pomatum (Extractum Martis Pomatum s. Malatis Ferri) - экстракт яблочнокислого железа, используемый для лечения анемичных состояний.

Позднее, вплоть до фармакопеи 8-го издания, применение находили указанный выше экстракт и настойка яблочнокислого железа - Tinctura ferri pomati, производимые на основе сброженного сока наиболее кислых, лучше всего диких яблок, содержащих яблочную и лимонные кислоты. Интересно отметить, что данные фармакопейные статьи включали не только детальное описание оптимальных технологических приемов получения Extractum Ferri Pomatum и Tinctura ferri pomati, но и описания ряда испытаний, призванных обеспечить подлинность и доброкачественность этих средств, включая отсутствие примесей. В частных статьях содержались требования к подлинности сырья, доказывающие отсутствие в прописи сока рябины, а также анализ ионов железа методом титрования. (таблица 1) [27, 70]

*Таблица 1. Анализ структуры частных статей на магистральные прописи, включающие извлечения плодов яблони. (РФ V изд., С.-Петербург, 1906)*

Название частной статьи	Extractum Ferri Pomatum (Extractum Martis Pomatum s. Malatis Ferri) (экстракт яблочнокислого железа)	Tinctura ferri pomati (настойка яблочнокислого железа)
Рецептура	<p>Пятьдесят ч. Pomorum acidorum.....50</p> <p>Одну ч. Ferri pulverati.....1</p>	<p>Одну ч. Extracti Ferri pomati.....1</p> <p>Одну ч. Spiritus Vini 90% .....1</p> <p>Восемь ч. Aquae Cinnamomi simplicis.....8</p>
Технологические приемы получения	Кислые яблоки превращают в кашцеобразную массу, которая затем сильно выжимается. К яблочному соку прибавляется	Экстракт яблочнокислого железа растворяют в воде корицы, прибавляют спирт,

лекарственного средства	порошок железа, смесь нагревается на водяной бане, при частом помешивании. До тех пор , пока не будет заметно выделения газа. К остывшей массе прибавляют столько воды, чтобы получить 50 ч. жидкости, которую отстаивают в продолжение нескольких дней, процеживают сквозь бумагу и выпаривают до консистенции густого экстракта	раствор отстаивают и процеживают сквозь бумагу
Описание	Экстракт зеленовато-черного цвета и сладковато-вяжущего вкуса, растворяется в воде , образуя почти прозрачный раствор	Настойка яблочнокислого железа буровато-черного цвета и вяжущего вкуса
Характеристики качества	Титрометрическое определение ионов железа. Содержание регламентируется не менее 5%	Раздел отсутствует

Плода и свежий сок яблони *Malus Pallasiana* Jus. широко использовались в традиционной тибетской медицине и применяются до сих пор в качестве средства улучшающего состав крови и противовоспалительного. [8,111]. Частная статья на плоды яблони лесной *Malus silvestris* Mill. (*Prunus malus* L.) была включена в *Pharmacopée Française*. Также плоды *Malus silvestris* представлены в номенклатуре однокомпонентных (простых) гомеопатических лекарственных средств, допущенных к медицинскому применению на территории РФ. [93] Плоды яблони многих видов включают в состав различных биологически активных добавок. Так, экстракт плодов яблони сибирской включен в многокомпонентную пропись эликсира "Амрита" (ТУ 407 - 750 - 95 пищевая добавка «Elixir Amrita»), используемого в качестве общеукрепляющего средства в комплексной терапии при астенических состояниях, повышенных физических и умственных нагрузках. На фармацевтическом рынке РФ представлены БАД «Лайтслим», содержащий линолевую кислоту, экстракт

зеленого чая и экстракт яблока, производимый Natiris S.A. (Португалия) и рекомендуемый для коррекции обменных процессов и повышения иммунитета, «Витрефор Витаминно-минеральный комплекс», содержащий экстракт яблока в составе сложной растительной композиции, обогащенной витаминами, представленный компанией «Фарматера» и др. Однако, в настоящее время в качестве источника официального сырья в РФ плоды и листья яблони разных видов не находят применения.

На сегодняшний день плоды яблони рассматриваются как продукт здорового питания и в качестве компонента некоторых диет. [122] Научные исследования последних лет ведутся, в основном, в различных пищевых отраслях, использующих как свежие плоды, так и продукты их переработки.

## **1.2. Краткая ботанико-фармакогностическая характеристика особенностей семейства Rosaceae и рода Malus**

### **1.2.1. Особенности семейства Розоцветные (Rosaceae)**

К семейству Rosaceae, согласно современным данным, относится до ста родов и около трех тысяч видов растений, ареал обитания которых, охватывает практически всю территорию Земли, однако чаще всего представители данного семейства приурочены к зонам Северного полушария- от субтропиков до Арктики. Среди представителей Rosaceae встречаются деревья, представленные листопадными и вечнозелеными формами, кустарники, полукустарники, травы, как однолетние, так и многолетние, что характеризует широкое разнообразие жизненных форм, присущих семейству. У Розоцветных чаще всего встречается очередное листорасположение, однако для отдельных представителей очень редко описано супротивное. По строению листья бывают простые или сложные, снабженные прилистниками, свободными или прирастающими к черешку, иногда - без прилистников. Встречается большое разнообразие соцветий, а также для многих видов типичны одиночные цветки. У Розоцветных развит

двойной околоцветник, отмечаются редкие случаи редуцированных венчиков. В цветке число чашелистиков и лепестков составляет, как правило, пять, изредка 4. Чашечка достаточно часто имеет подчашие, формирующее как бы наружный круг чашелистиков. Интересной особенностью семейства является большее в 2-4 раза число тычинок по сравнению с числом лепестков, причем тычинки образуют несколько кругов. Гинецей встречается апокарпный или ценокарпный, число плодолистиков может быть, как неопределенное, так и четко фиксированное, известны случаи, когда плодолистик всего один (монокарпный гинецей). Завязь у представителей семейства Розоцветные может быть, как нижней, так и верхней.

Для представителей семейства Розоцветных характерно разнообразное строение плодов. Особенности строения цветков и плодов положены в основу классификации семейства Розоцветных на подсемейства *Spiraeoideae*, *Rosoidae*, *Maloidae* и *Prunonoidae*, характеристика которых представлена в таблице 2.1.

*Таблица 2.1. Характеристика подсемейств семейства Rosaceae - Розоцветные.*

<b>Признак</b>	<b>Спирейные - Spiraeoideae</b>	<b>Розовые - Rosoidae</b>	<b>Яблоневые- Maloidae</b>	<b>Сливовые- Prunonoidae</b>
Гинецей	Апокарпный	Апокарпный, редко монокарпный	Ценкарпный	Монокарпный
Число плодолистиков в гинецее	(1) 5-8	(редко 1)	2-5	1
Завязь	Верхняя	Верхняя	Нижняя	Верхняя
Подчашие	Не характерно	Характерно для трав	Не характерно	Не характерно

Тип плода	Многолистовка, иногда сочная	Многоорешек, многокостянка, земляничина, цинародий	Яблоко	Однокостянка
Соцветие	Метелка, щиток, зонтик	Кисть, щиток, цимозные	Зонтик, щиток	Зонтик, одиночные цветки
Формула цветка	*Ca5Co5AG5	*Ca5Co5AG  *Ca5+5Co5AG  *Ca4+4Co4AG	*Ca5Co5AG(3- 5)	*Cf5Co5AG1

### 1.2.2. Особенности рода Яблоня (Malus)

Род яблоня *Malus* Mill.

Род *Malus* включает около тридцати видов, объединяющих значительное число сортов. Яблони чаще всего являются небольшими деревьями или достаточно крупными кустарниками, побеги которых иногда могут быть покрыты колючками. Листовые пластинки яблонь обычно простые, могут иметь удлинённые, часто опадающие прилистники. Характерны обоеполые цветки, собранные в полузонтиках и щитках, расцветающие вскоре после распускания листьев. По данным Седов Е.Н. систематика рода *Malus* требует совершенствования, поскольку нельзя сделать вывод о ее однозначности. Известно, что для многих видов дикорастущих яблонь, произрастающих в горной местности типично явление полиморфизма. Значительное количество видов яблони распространены как культивируемое растение разнообразных сортов, причем для многих культурных сортов описана в литературе гибридизация с дикорастущими видами. Размножаются яблони с помощью семян, порослью от пня, некоторые виды способны формировать корневые отпрыски. Яблони хорошо поддаются стрижке и обрезке. Предельный возраст дикорастущих видов яблонь составляет не менее 300 лет.

Распространение естественных массивов дикорастущих видов яблони по некоторым регионам представлены на схеме 2.

*Схема 2. Приуроченность естественных массивов дикорастущих видов яблони к регионам*



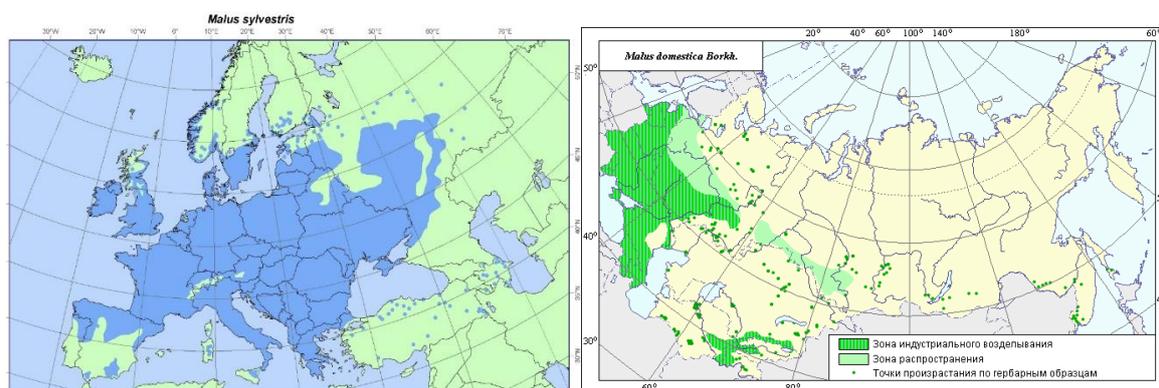
Таблица 2.1. Характеристика растений рода Яблоня

Характеристика растения	Признак рода яблоня
Жизненная форма	Листопадные и вечнозелёные деревья и кустарники, обладающие удлинёнными ростовыми побегами и укороченными, на которых располагаются листья, цветки и плоды
Строение листа	Листья растений рода Яблоня, как правило, простые или непарноперистосложные, эллиптические или округлые, окраска верхней стороны листа темнозеленая, нижняя сторона листа серо-зеленая, возможно опушение. Жилкование перистонервное. Прилистники сохраняются достаточно редко
Строение цветков	Цветки встречаются как одиночные, так и в соцветиях, представленных щитками, метёлками, окраска цветков встречается белая или красная, распускаются они, как правило, после, реже до листьев. Цветки характерны обоеполые, основания чашелистиков, лепестков и тычинок сращены в цветочную трубку, 5 чашелистиков, 5 лепестков, число тычинок варьирует от 5 до 20, пестик состоит из 2—5 плодолистиков, сросшихся с цветочной трубкой, завязь нижняя. Цветоложе для Яблоневых характерно вогнутое.
Плоды	Плод- яблоко, шаровидной или яйцевидной формы, разной окраски

Краткая характеристика видов яблони представлена в приложении №1.

### 1.3. Характеристика мест обитания, ареала распространения, районов возделывания и особенностей заготовки сырья яблони.

Яблоня лесная широко представлена на Европейской территории РФ, распространена в широколиственных и смешанных лесах, среди кустарников, предпочитает поляны и опушки леса. Яблоня домашняя, яблоня культурная растет во всех странах с умеренно теплым климатом. В РФ граница северного распространения проходит по побережью Онежского озера по линии между 60 и 65 градусом северной широты, по островам, расположенным в Ладожском озере, через Вологодскую область, Котлас, Пермь, далее через Урал (Екатеринбург, Челябинск) – Омск, Томск, Новосибирск, Красноярск, Иркутск, Горно-Алтайск, юг Амурской области, юг Хабаровского края, на Сахалин (Александровск). Зоны распространности яблони лесной и домашней представлены на рисунке 1.



а)

б)

Рис.1. Зона распространения яблони лесной (а) и яблони домашней (б)

#### 1.4. Краткая характеристика современного состояния изученности химического состава листьев и плодов яблони лесной и яблони домашней

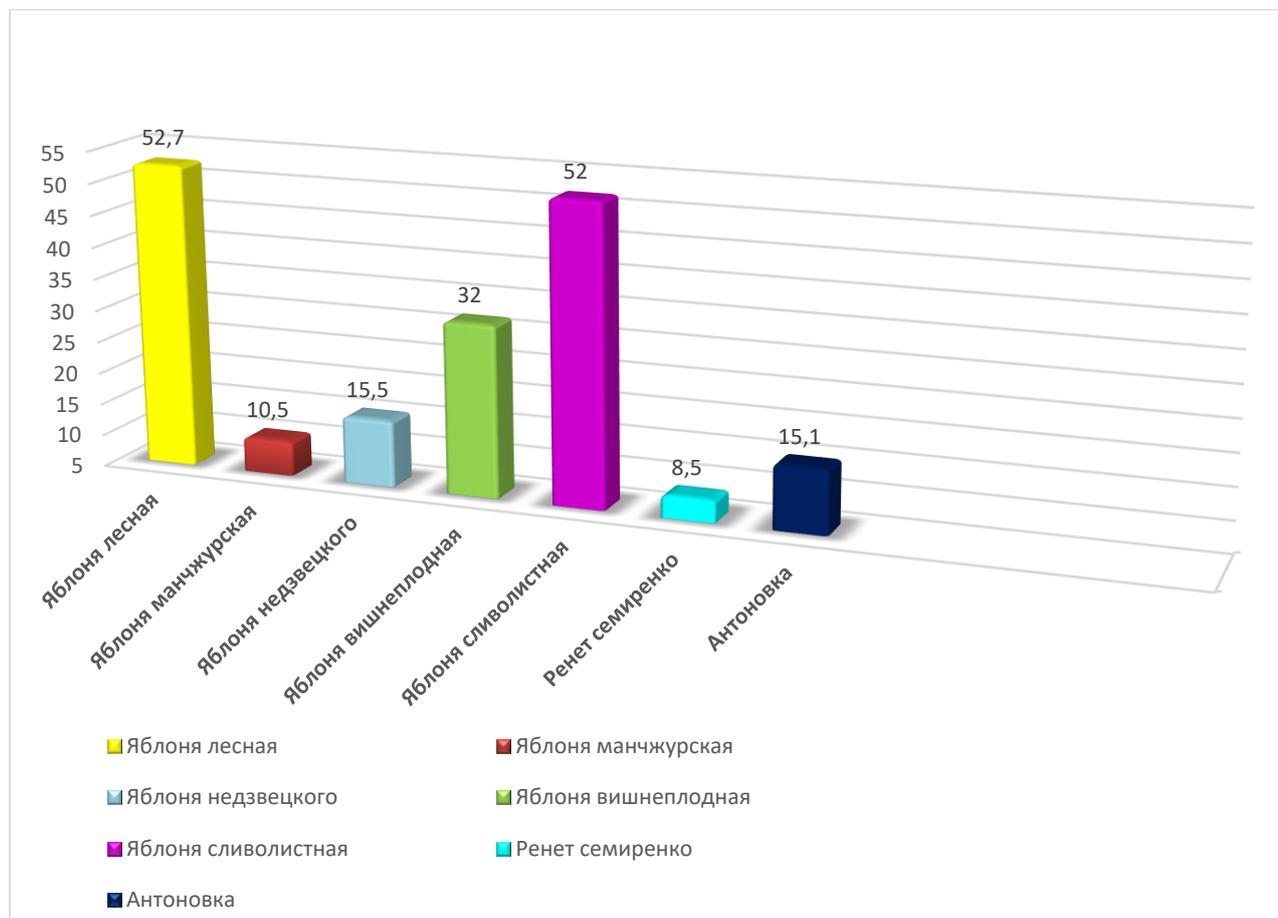
В настоящее время, согласно литературным данным, сформировалась тенденция роста интереса ученых к всестороннему исследованию плодовых растений, по содержанию биологически активных веществ, не уступающих официальным лекарственным растениям, к которым, на наш взгляд, относятся листья и плоды яблони различных видов. Так, в исследованиях дикорастущих видов яблони *Malus sylvestris* Mill., *Malus purpurea* Rehd., *Malus cerasifera* Spach., *Malus prunifolia*



Рис.2. Вид коллекционного образца яблони лесной (обыкновенной) в Ботаническом саду МГУ им. М.В. Ломоносова

*Borkh.* и др. установлено содержание сахара от 0,47 мг% до 8,5 мг% в зависимости от вида. Содержание ионов железа в плодах указанных видов колебалось в интервалах от 1,5 г/мл до 0,12г/мл, причем наиболее высокие показатели были отмечены для плодов яблони лесной, вишнеплодной, ранней. Результаты определения содержания аскорбиновой кислоты в плодах яблони дикорастущих видов и некоторых сортов яблони домашней представлены на рис.3.

*Рис.3. Схема содержания аскорбиновой кислоты в плодах яблони дикорастущих видов, а также некоторых сортах яблони домашней.*



Достаточно подробно исследован химический состав плодов и листьев яблони ягодной *Malus baccata* (L.) Borkh, для которых проведено сравнительное изучение состава макро- и микроэлементов, сахаров и органических кислот [11]. Состав макро- и микроэлементов определен и для сырья яблони лесной [84]. Для плодов яблони лесной было определено суммарное содержание фософлипидов [73].

Внимание исследователей привлекло как определение антиоксидантной активности плодов, так и изучение количественного содержания гидроксикислот и флавоноидов. [103, 149, 150, 155] Хроматографическими методами в плодах яблони различных сортов было установлено наличие гидроксикоричных кислот (кофейной, хлорогеновой, кумариновой,

феруловой. сиреневой) [18]. Анализируя проведенные исследования, которые были направлены на изучение веществ флавоноидной природы, специфичных для различных органов яблони, стало известно, что установлено наличие флавоноидов (кверцитин, кверцитрин, апигенин, 7-глюкозид апигенина, лютеолин, 3-О-глюкозид аромадендрина, гиперин, изокверцитрин, рутин, нарингенин) в древесине и листьях [193], проантоцианидины в древесине, листьях и плодах [152].

В исследованиях сортовых плодов яблони было проведено определение суммарного содержания антиоксидантов, составившее от 21 до 64 мг/100 г для сортов Жигулевское, Антоновка, Ред Чиф, Декабренок, Ренет Симиренко, Мартовское, Бреберн. [9]. В ходе исследования сербских ученых была установлена корреляция между содержанием веществ полифенольной природы и наличием и степенью антиоксидантной активности плодов яблони лесной, произрастающих в горных районах Сербии [150]

В исследованиях Beuerle и соав. в листьях и плодах яблони лесной установлено наличие алициклического соединения в-D-глюкопиранозида вомифолиола, а также алифатических спиртов и их производных: (R)-3-гидрокси-5-(Z)-октенил-в-D-глюкопиранозида, (R)-3-гидрокси-5-(Z)октил-в-D-глюкопиранозида и др..[139] .

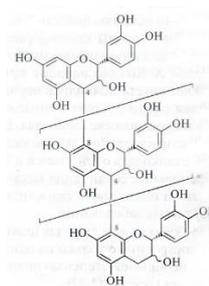
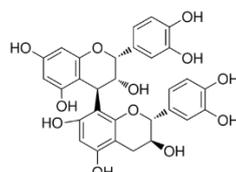
Несомненный интерес исследователей вызывает проблема рационального использования жома плодов яблони, являющегося отходом пищевой промышленности при переработке плодов яблони домашней для получения сока, пюре и т.д. При производстве соков из плодов яблони на предприятиях пищевой промышленности, как известно, в значительных количествах накапливаются отходы, частично используемые для производства пищевого пектина, частично утилизируемые. Вместе с тем, анализ данных по хроматографическому определению веществ фенольной природы убедительно доказывает необходимость дальнейших исследований

отходов яблони домашней с целью создания на их основе новых лекарственных средств. [107]. Для жома плодов яблони домашней зимних сортов (Антоновка, Ренет Семеринко и др.) установлено достаточное для промышленной переработки содержание дубильных веществ и флавоноидов, а также наличие адсорбционной способности, позволяющей рассматривать сырье в качестве перспективного природного энтеросорбента.

Результаты количественного определения содержания веществ фенольной природы в выжимках яблок сортов Jonagold и Elstar, подвергшихся воздушной и лиофильной сушке составляет от 7,8 мг/% для катехина до 400 мг/% для флоридзина. При этом также были идентифицированы и количественно определены хлорогеновая и кумариновая кислоты, процианидин, эпикатехин, кверцетин-3-галактозид, кверцитин-3-глюкозид, кверцитин-3-ксилозид, кверцетин-3-рамнозид, кверцитин и флоретин. [142, 219] Многие авторы отмечают наличие в плодах яблони домашней (-)-эпикатехина и его димера – процианидина В-2. Также характерно наличие три- и тетрамеров, основу структуры которых помимо (-)-эпикатехина составляют мономерные звенья (+)-катехина. (Вигоров Л.И. Катехины яблок//Фенольные соединения и их биологические функции.М.1968 С.202-208)

Причем, плоды некоторых сортов могут накапливать процианадины с еще большей степенью поликонденсации. Так, в водно-спиртовом извлечении из плодов яблони домашней летнего сорта Red Delisios установлено наличие процианидинов, степень конденсации мономерных звеньев в которых составляет не менее двенадцати. (рис.3)

Рис. 4. Структура важнейших процианидинов, выделенных из плодов яблони.



(-) – эпикатехин

Тримеры (n = 1)

Тетрамеры (n = 2)

Так же известно, что антоцианы окрашенных плодов яблони представлены производными цианидина, что указывает на отсутствие (или неактивность) в цепи биосинтеза флавоноид-3',5'-гидроксилазы F3',5'H и метилтрансферазы (MT) при более значительной активности фермента UDP-Gal: антоцианидин 3-0-галактозилтрансферазы по сравнению с UDP-Glc антоцианидин 3-0-глюкозилтрансферазой [31].

Промышленные отходы яблок ОАО НПП "Сады Придонья" подробно изучались в работах Саламатова А.А. с соавторами [105,106,112]. Авторами была разработана и апробирована лекарственная субстанция випом, в состав которой входил комплекс аминокислот, вещества фенольной природы и пектиновые вещества. Так же авторами была установлена антирадикальная активность субстанции випом, превосходящая активность дибунола и кислоты аскорбиновой, рассматриваемых в качестве стандартных антиоксидантов, в опытах *in vitro* на модели гашения хемилюминесценции. Было доказано, что после экстрагирования веществ полифенольной и пектиновой природы, а также аминокислотного комплекса в исследуемом шроте яблок находится не менее 5% тритерпеноидов пентациклической природы, представленных в основном урсоловой кислотой, которые обуславливают наличие гиполипедемического,

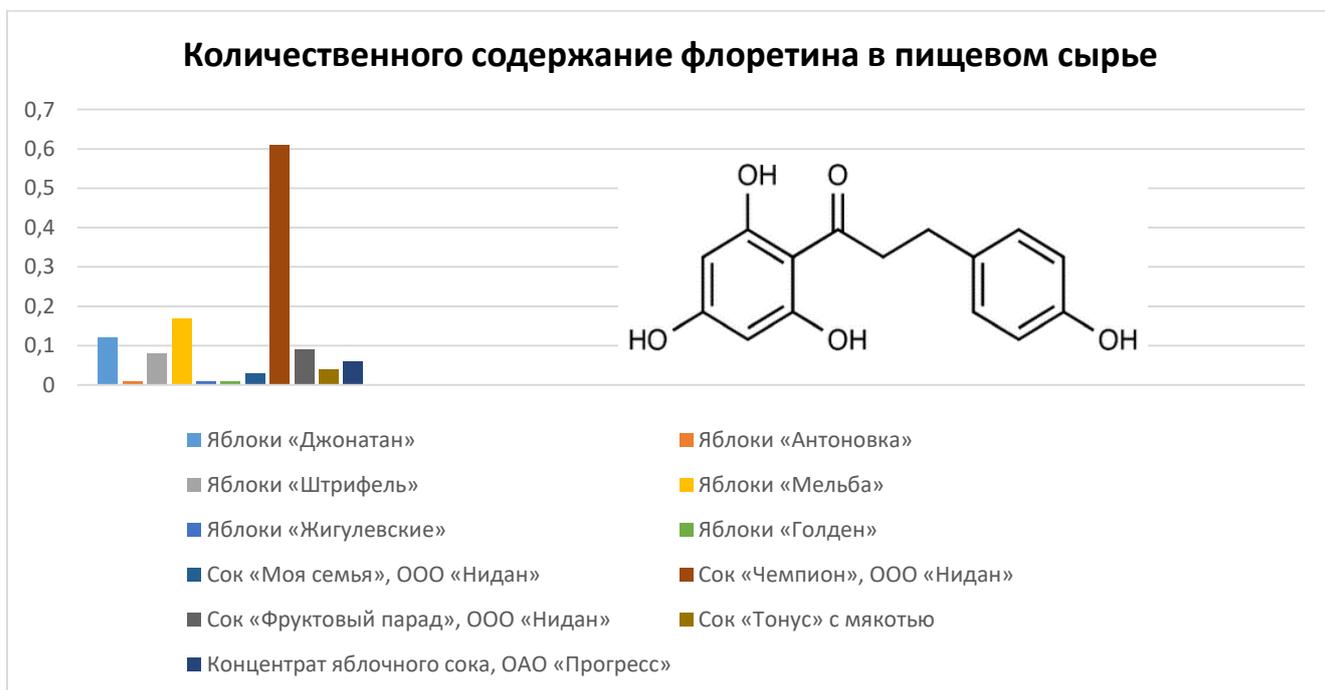
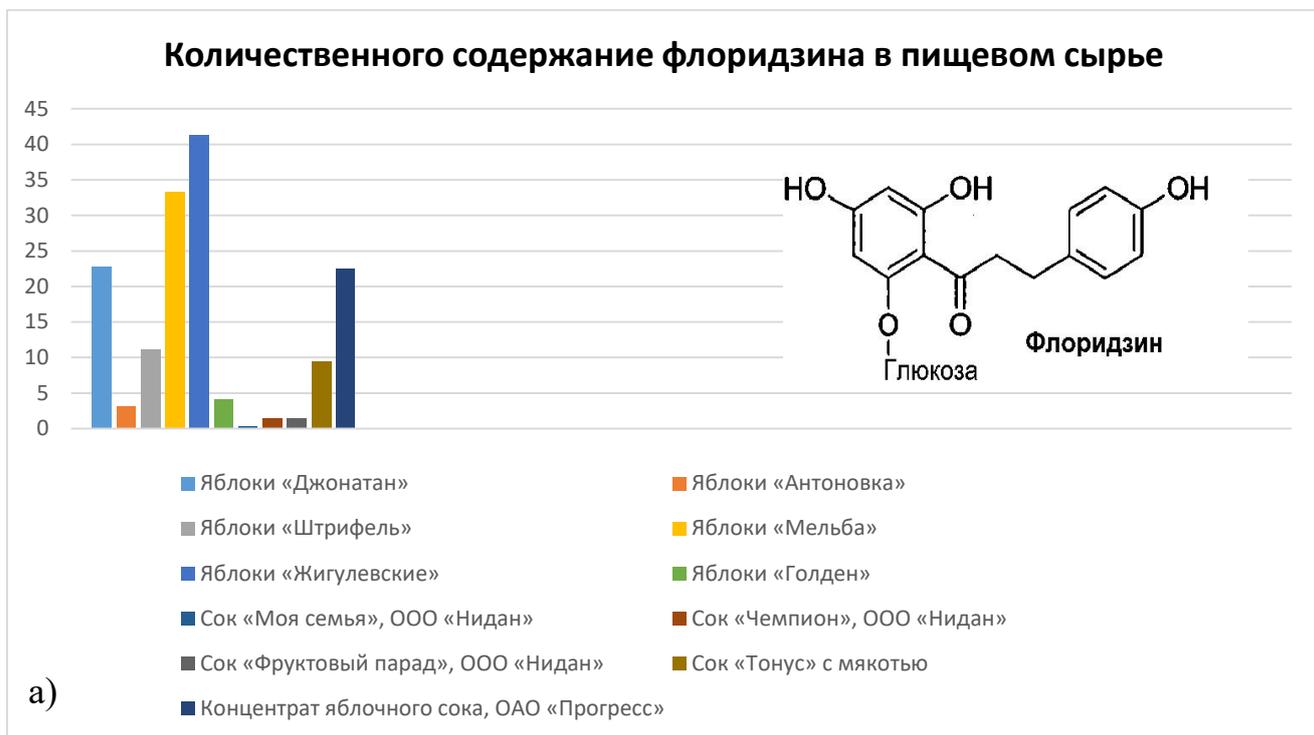
противоатеросклеротического, кардиотонического, антиаллергического, иммуномодулирующего действия. Данная субстанция была использована авторами для получения средства «Помал» [105].

Так же несомненный интерес вызывают исследования, направленные на анализ состава биологически активных веществ, содержащихся в листьях яблони домашней и лесной, что особенно актуально, учитывая значительную по объемам сырьевую базу. Анализ листьев яблони домашней и лесной позволил выявить наличие в них в значительных количествах флоридзина [251], обеспечивающего высокую антидиабетическую активность [206], а также фенолгликозид - арбутин [173], что позволяет рассматривать листья яблони в качестве перспективного источника расширения сырьевой базы лекарственных растений, накапливающих арбутинов.

Исследования Рылиной Е.В. были посвящены анализу дигидрохалкона флоретина (2,4,6,4-тетрагидроксидигидрохалкон) и его 2-глюкозида флоридзина (4,6,4-тригидрокси-2-(β-Д-глюкопиранозилокси)-дигидрохалкон) в пищевом растительном сырье – плоды яблони домашней и получаемых из них пищевых продуктах – соках, нектарах, пюре [102]. Анализ количественного содержания компонентов, исследуемых пищевых образцов проводили по калибровочному графику или с применением метода внешнего стандарта, характеризуемого автором как наиболее приемлемый для хроматографического анализа многокомпонентных матриц. Указанные соединения были идентифицированы и количественно определены во всех исследуемых автором образцах.

Результаты количественного содержания флоретина и флоридзина приведены в диаграммах.

Рис.5. Схема результатов количественного содержания флоридзина (а) и флоретина (б)



Наиболее значимые соединения фенольной природы, идентифицированные в сырье растений рода *Malus* представлены в приложении №.2

### **1.5. Фармакологическое действие извлечений из листьев и плодов яблони лесной и домашней и перспективы использования в медицинской практике.**

Плоды яблони домашней, как известно, находят широкое применение в пищевой промышленности, являясь традиционной плодовой культурой и составляя не менее 15% мировой фруктовой продукции. Они отличаются высокими вкусовыми качествами и способностью длительно сохраняться в свежем виде. Ароматные плоды, обладающие специфическим яблочным запахом, применяют в свежем виде, мочеными. В составе десертных блюд, разнообразных кулинарных изделий, соков и вин. Получаемый из отходов переработки плодов яблони домашней, пектин применяется как в пищевой, так и фармацевтической промышленности [90].

Учитывая богатый и разнообразный состав биологически активных веществ, обнаруженных как в плодах, так и в листьях яблони домашней и лесной, а также опыт народной медицины, указанное сырье вызывает значительный интерес исследователей, изучающих особенности фармакологического действия сырья яблони и извлечений из плодов и листьев. Фитотерапевты, как известно, широко практикуют «яблочную» диету, дающую хорошие результаты при лечении острых и хронических энтероколитов, что объясняется достаточным содержанием в плодах пектиновых веществ и танинов [49, 101, 193]. Пектины способны связывать и выводить из организма холестерин, что объясняет популярность у диетологов яблочной диеты, рекомендуемой для лечения и профилактики атеросклероза, а низкая калорийность плодов яблони делает их незаменимыми при лечении пациентов, страдающих ожирением. [101] Niwa T, Nасао M установлено, что пектиновые волокна высокой степени очистки проявляют выраженный профилактический эффект при вызванном введением морфина запоре у лабораторных животных, значительно

увеличивая подвижность эпителия толстого кишечника (Effect of dietary fiber on morphine induced constipation in rats).

Экспериментальная оценка желчегонного, гипохолестеринемического, гепатопротекторного действия извлечений из шрота плодов яблони домашней, проведенная на белых крысах в сравнении с аналогичным действием традиционных лекарственных средств – фламина, силибина, полиспонина в дозе 25 мг\кг показала большую эффективность шрота. [105]. Симонян А.В. использовал фракцию полифенолов и тритерпеновых сапонинов, выделяемых из плодов яблони домашней, для получения мази Випом, проявляющей ранозаживляющую, противовоспалительную активность на нелинейных крысах, подвергшихся термическому ожогу. Эффективность заживления ожогов у экспериментальных животных авторы изучали по результатам гистологических, микробиологических анализов, а также оценивая степень снижения площади кожного дефекта в сравнении с аналогичными показателями препарата Левомиколь. [112].

В литературе описано исследование влияния полифенольного комплекса листьев яблони лесной на течение экспериментального гепатита [32], вызываемого подкожным введением 50% раствора четыреххлористого углерода в растительном масле в дозировке 0,4 мл на 100 г массы животного однократно в течение 24 часов. Из листьев яблони лесной авторы извлекали полифенольные комплексы, которые вводили экспериментальным животным в дозе 0,2 г/кг в виде водных растворов через зонд в желудок за 2 часа до введения масляного раствора четыреххлористого углерода. При проведении морфологического исследования печени лабораторных животных, получавшим полифенольный комплекс листьев яблони, были выявлены эффекты мембраностабилизирующего действия полифенольного комплекса листьев яблони, выявлены ранние симптомы активации процессов регенерации в печени, что позволило авторам рассматривать полифенольный комплекс листьев яблони как перспективное гепатопротекторное средство

[32]. Экспериментальные исследования, проведенные Saito Miyahe, выявили эффект торможения полифенолами, выделенными из плодов яблони домашней разных сортов, АДФ-рибосульфотрансферазы токсина холеры и вызванного токсином накопления жидкости у лабораторных животных (Saito T1, Miyake M, Toba M, Okamatsu H, Shimizu S, Noda M. Inhibition by apple polyphenols of ADP-ribosyltransferase activity of cholera toxin and toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol Immunol.* 2002;46(4):249-55.).

В исследованиях [204] была доказана высокая антидиабетическая активность экстракта, получаемого из листьев яблони домашней, которую связывают с присутствием флоридзина.

#### **1.6. Современное состояние стандартизации листьев, плодов яблони лесной и яблони домашней.**

В настоящее время листья и плоды яблони лесной не являются в РФ официальным ЛРС, поскольку отсутствует нормативная документация, позволяющая осуществлять стандартизацию данного растительного сырья.

Стандартизация плодов яблони в РФ осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТов 27572 - 87 "Яблоки свежие промышленной переработки", 21122 - 75 "Яблоки свежие поздних сроков созревания", 16270 – 70 "Яблоки свежие ранних сроков созревания", применяемых в пищевой промышленности. Следует отметить, что в пищевой промышленности, наряду с заготовкой плодов яблони домашней, допускается использование плодов яблони лесной, ягодной и др. При этом все многообразие плодов яблони классифицируется в зависимости от срока созревания и сохраняемости плодов, формы плода, и размеров плода (приложение №3)

Показатели качества, по которым осуществляется стандартизация плодов яблони представлены в таблице «Показатели качества плодов яблони», определяемые согласно требованиям ГОСТ пищевой промышленности (приложение №4)

Показатели качества, предусмотренные данными документами, включают определение: внешнего вида плодов, запаха и вкуса, степени зрелости, массовой доли растворимых сухих веществ, в соке плодов, размера плодов по наибольшему поперечному диаметру, наличие сетки на плодах, механических повреждений, побурение мякоти. Очевидно, что определение данных показателей качества не дает возможность в полной мере оценить содержание ценных пищевых и биологически-активных веществ в сырье. Для сырья –листья яблони какие-либо нормативные документы не выявлены, что, в свою очередь, учитывая данные литературы, подтверждающие широкий спектр фармакологического действия, обусловленный высоким содержанием разнообразных БАВ, актуализирует исследования, направленные на разработку показателей качества данного сырья. Для дальнейшего планирования дизайна исследования, мы сочли целесообразным оценить современное состояние методов стандартизации фармакопейного растительного сырья, относящегося к семейству Розоцветные.

### **1.7. Современное состояние методов анализа фармакопейных видов ЛРС, заготавливаемого от представителей семейства Розоцветные.**

Как уже отмечалось ранее, многие представители семейства Розоцветные находят широкое применение в медицине и включены в Государственную Фармакопею. Краткая характеристика представителей семейства розоцветные, наиболее широко применяемых как самостоятельно, так и в качестве сырья для получения лекарственных средств разнообразного фармакологического действия, представлена в таблице 3.

*Таблица 3. Краткая характеристика представителей семейства Розоцветные, применяемых в медицине.*

Название	ФС	Хим.состав	Пути использования и препараты
Виды	ГФ XI ст	Аскорбиновая кислота (не	Поливитаминозное средство,

шиповника	38. Fructus Rosae; ГОСТ 1994-93 Плоды шиповника Техни- ческие условия	менее 0,2%), органические кислоты (не менее 2,6%), каротиноиды, токоферолы, жирное масло, флавоноиды: кверцетин, изокверцитин, тилирозид, катехины, антоцианы, пектиновые вещества	используются в качестве сырья при производстве препаратов Холосас, Каротолин, Сироп шиповника, включены в состав витаминовых и поливитаминовых сборов, микстуры Траскова. Входят в состав сборов «Мирфазин» «Бруснивер» и «Бруснивер-Т», комплексного препарата «Витаон» в виде масляного экстракта. Включены в пропись бальзама «Первопрестольный», эликсиров «Алтайский», «Эвалар» и «Амрита». Экстракт плодов шиповника входит в состав противовоспалительного, противомикробного препарата «Фарингал» и антисептического, диуретического препарата «Канефрон»( Германия)
Малина обыкновенная (Rubus idaeus L.)	ГОСТ 3525-75 Плоды малины	3-глюкуронид кверцетина, 3-глюкуронид и 3-0-в-д- глюкопиранозид кемпферола, катехины.антоцианы, проантоцианидины, аскорбиновая, лимонная, яблочная, салициловая и др.фенолкарбоновые	В качестве потогонного и жаропонижающего средства в виде настоя, входят в состав потогонных сборов. Сироп из свежих плодов применяют как корректирующее вкус лекарственных препаратов средство. Сок плодов проявляет антибактериальную

		кислоты, моно-и сесквитерпеноиды и другие.	и противоопухолевую активность. [6]
Рябина обыкновенная ( <i>Sorbus aucuparia</i> )	ГФ XIV ФС.2.5.009 3.18 Fructus Sorbi; ГОСТ 6714-74 Плоды рябины обыкновенной	Плоды рябины содержат каротиноиды, аскорбиновую кислоту, спирт сорбит, урсоловую и олеаноловую кислоты, фенолкарбоновые кислоты: хлорогеновая, изохлорогеновая, кофейная, феруловая, кумаровая, гидроксикоричная, кверцитин, рутин, кемпферол, кверцитрин. гиперозид, цианидин, лейкоцианидин, эпикатехингаллат, яблочную, лимонную. Винную, сорбиновую, янтарную кислоты.	Применяют в поливитаминных сборах. Липидный комплекс плодов проявляет ранозаживляющее действие. Фенольные соединения – антиоксидантное, экстракт плодов снижает уровень липидов в печени и холестерина в крови. Выявлена антибактериальная и антипротозойная активность [60] Входит в состав эликсира «Эвалар»
Арония черноплодная ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	Аронии черноплодной свежие плоды ( <i>Aronia melanocarpa</i> recens fructus) ФС.2.5.000 2.15 Взамен ФС 42-66-87	В плодах рябины черноплодной содержится Р- витаминный комплекс, включающий флавоноиды, катехины, цианидины, а также достаточно высокое количество аскорбиновой кислоты (до 110-120 мг%. Стандартизацию осуществляют по сумме антоцианов в пересчете на	Применяется в качестве витаминного средства и при гипертонической болезни. Выпускают Аронии черноплодной таблетки, применяемые как антигипертензивное средство. Входят в состав эликсира «Алтайский»

	Аронии черноплод ной сухие плоды ( <i>Aronia melanocarp ae sicco fructus</i> ) ФС.2.5.000 3.15	цианидин-3-О-глюкозид, содержание которых должно быть не менее 3%,	
Черёмуха обыкновенн ая ( <i>Padus avium Mill.</i> )	Черемухи обыкновен ной плоды – <i>Padi avii fructus</i> ФС.2.5.004 9.15 Взамен ГФ XI, вып.2, ст.36	Плоды содержат хлорогеновую кислоту, антоцианы- 3-рутинозид и 3-глюкозид цианидина, флавоноиды, дубильные вещества, цианогенные соединения – синильную кислоту, амигдалин	Применяют в виде отвара как вяжущее средство. Входят в состав эликсира «Алтайский»
Земляника лесная ( <i>Frangaria vesca L.</i> )	Земляники лесной листья ( <i>Frangariae vescae folia</i> ) ФС.2.5.001 6.15 Взамен ФС-42- 0144-05	Листья содержат флавоноиды, основной из которых рутин, каротиноиды, аскорбиновую кислоту, дубильные вещества, эфирное масло, полисахариды.	Применяют в виде настоя как диуретическое средство. Экстракт листьев проявляет кардиотоническое, гипотензивное, антиоксидантное и гипогликимическое действие [78]. Настойка листьев земляники лесной обладает стрессопротекторными и цитопротекторными свойствами
Виды боярышника	Боярышни ка плоды	В цветках и плодах содержатся гиперозид,	Из плодов и цветков получают настои, применяемые при

	ФС. 2.5.0061.18	кверцетин, рутин, в цветках- 8- метоксикемпферол, витексин, ацетилвитексин, биокверцетин, пиннатифидин, антоцианы плодов представлены пеонидином и цианидином. Плоды содержат тритерпеновые сапонины, агликоном которых является олеаноловая кислота.	функциональных расстройств сердечной деятельности, мерцательной аритмии, гипертонической болезни. Выпускают Боярышника настойку, используемую как антиаритмическое средство, а также Боярышника экстракт жидкий. Жидкий экстракт плодов боярышника входит в состав комплексного седативного, анксиолитического препарата «Ново-Пассит» (Чехия). Настойка плодов боярышника включена в состав гиполипидимического, антиатеросклеротического препарата «Ультравит» (Нидерланды) и седативный препарат «Валоседан» и кардиотонический препарат «Кардиовален»
--	--------------------	---	--

В ГФ XI были включены видов сырья, заготавливаемых от представителей Розоцветные (цветки, плоды боярышника, плоды черемухи, плоды рябины, плоды шиповника), а в ГФ XIII – листья земляники, плоды аронии, плоды черемухи.

Анализ литературных данных выявил значительное количество публикаций, посвященных как фитохимическому анализу различных видов

сырья, заготавливаемых от представителей семейства Розоцветные, так и направленных на разработку объективных методик стандартизации данных видов сырья, с последующим включением в нормативную документацию.

Поскольку представители семейства Розоцветные чаще накапливают такие группы БАВ как флавоноиды, фенолкарбоновые и органические кислоты, дубильные вещества и витамины, большинство предлагаемых авторами методик ориентировано на анализ именно данных групп веществ. Причем для анализа дубильных веществ авторами используется как традиционный фармакопейный метод, изложенный в статье «Дубильные вещества», так и спектрофотометрия (СФМ) после осаждения дубильных веществ кожаными порошком, согласно рекомендациям Европейской Фармакопеи, а также метод ВЭЖХ. [5,6]. Анализ фенолкарбоновых кислот и флавоноидов в сырье проводится, как правило с использованием методов СФМ и ВЭЖХ [5,6].

Значительное количество работ посвящено анализу плодов и цветков боярышника как фармакопейных, так и еще не являющихся официальным сырьем видов. Методологические основы исследования сырья боярышника были сформулированы в исследованиях Самылиной И.А. и продолжены ее учениками [107]. В результате данных исследований сырьевая база боярышника была расширена с двух официальных видов, включенных в ГФ X – Боярышник колючий (*Crataegus oxyacantha* L.) и Б.крово-красный (*C. Sanguinea* Pall.) до 12 видов, включенных в ГФ XI. Авторами были разработаны методики идентификации гиперозида методом ТСХ и хромато-спектрофотометрический метод количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид.[107] Исследования сырья боярышника успешно продолжаются, поскольку видовое разнообразие позволяет находить новые источники для расширения сырьевой базы. Так, в ходе сравнительного анализа антоцианов и флавонолов в плодах *Crataegus sanguinea* Pall. и *C. Submollis* Sarg., выявлено, что содержание флавоноидов в

плодах боярышника мягковатого в 1,5, а антоцианов в 4 раза выше, чем в плодах боярышника кроваво-красного [33, 127], что доказывает актуальность и перспективность исследований, направленных на изучение видового многообразия данного сырья. Так же внимание исследователей привлекает возможность расширения сырьевой базы за счет введения в медицинскую практику листьев боярышника, химический состав ценных БАВ которых, не уступает традиционному сырью [117]. Следует отметить, что при изучении сырья боярышника Самылиной И. А. впервые был предложен методологический подход к использованию единых принципов стандартизации на этапах «лекарственное растительное сырье – субстанция – препарат» [107], широко реализуемый исследователями при разработке методов анализа как аллопатических, так и гомеопатических лекарственных средств [10]

Стандартизацию свежих и сухих плодов Аронии черноплодной, включенных в ГФ XIII, осуществляют по суммарному содержанию антоцианов в пересчете на цианидин-3-0-глюкозид методом спектрофотометрии при длине волны 534 нм. При этом исследования, направленные на подробный фитохимический анализ плодов аронии и совершенствование методов стандартизации, продолжаются. [54] В исследованиях Косман В.М. и соавт.с использованием метода ВЭЖХ идентифицированы индивидуальные фенольные вещества: фенольные кислоты (галловая и кофейная); проантоцианидины (катехин и эпикатехин); кемпферол, гесперетин, кверцетин-3-о-рамнозид, гесперетин-7-(2-О-рамнозидо-)-О-глюкозид, рутин и кверцитин и проведена оценка антирадикальной активности экстрактов аронии [46]

Достаточно подробно изучен состав БАВ черемухи обыкновенной, причем авторами проводилось исследование различных органов растения, в результате которого установлено содержание в плодах фенолкарбоновых кислот, в частности, хлорогеновой, 3-рутинозида и 3-глюкозида цианидина, в

листьях – кверцетина, 3-О-в-глюкопиранозида кверцетина, генистеина, разнообразных гликозидов кемпферола [97], в цветках – гиперозида, астрагалина, 3-галактозилглюкозида кверцетина. В результате проведенных фитохимических исследований была существенно усовершенствована нормативная документация на данное сырье, однако в качестве метода количественного определения, по-прежнему, используется методика определения дубильных веществ – ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Стандартизацию впервые вошедших в ГФ XIII в качестве официального сырья листьев земляники лесной определяют спектрофотометрически при длине волны 410 нм в пересчете на рутин. Так же для данного сырья предусмотрено определение экстрактивных веществ в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Следует отметить, что в предшествующих разработках документации исследованиях Петуховой О.В. метод спектрофотометрического определения был опробован для анализа листьев земляники лесной и садовой, а также, учитывая принцип сквозной стандартизации – для экстракта листьев земляники сухого. [88]

Корневища лапчатки являются традиционным фармакопейным сырьем, включенным помимо Российской, в Европейскую (ЕФ) и Немецкую. Французскую, Британскую Фармакопеи. Качественный анализ корневищ лапчатки прямостоячей согласно требованиям ГФ XIII осуществляется с использованием качественной реакции с железом аммония сульфатом, а также с применением ТСХ (в качестве стандарта используется галловая кислота). Количественное определение осуществляется титриметрически (перманганатометрия) и спектрофотометрически (в пересчете на пирогаллол) [19]. Идентификацию веществ дубильной природы согласно требованиям ЕФ

осуществляют с использованием тонкослойной хроматографии в системе растворителей ледяная уксусная кислота-эфир-гексан-этилацетат (20:20:20:40). Вещества катехиновой природы детектируются после проявления в парах аммиака в количестве не менее четырех красно-коричневых пятен. Количественное содержание дубильных веществ в корневищах лапчатки прямостоячей устанавливают спектрофотометрическим методом в пересчете на пирогаллол (определяется количество дубильных веществ, не адсорбирующихся кожаным порошком). С целью установления природы фенольных соединений корневищ лапчатки разработан метод ВЭЖХ [19]

Плоды шиповника, включенные в ГФ XI, не вошли в XIII издание ГФ, что может быть связано с необходимостью совершенствовать методы количественного определения аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот, однако были вновь включены в ГФ XIV. В литературе имеется значительное количество работ, посвященных фитохимическим исследованиям различных видов шиповника, направленным на изучение гидрофильной и липидной фракций плодов данного сырья. [30, 110] Несомненный интерес вызывают исследования, направленные на создание безотходных технологий переработки сырья шиповника, позволяющих обеспечить максимальное использование всего комплекса БАВ и работы, посвященные обогащению пищевых продуктов экстрактами шиповника.

Таким образом, очевидна общая тенденция к первостепенному исследованию в сырье представителей семейства Розоцветных веществ фенольной природы с возможным анализом индивидуальных соединений, обуславливающих специфическую фармакологическую активность данного конкретного сырья. Учитывая имеющиеся литературные данные, подтверждающие наличие в листьях и плодах яблони лесной дубильных веществ, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, необходимо при

планировании дизайна собственного исследования остановиться на подробном анализе веществ данных групп.

## **ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1**

- 1.** Осуществлен информационно-аналитический поиск для оценки состояния изученности химического состава, фармакологических свойств и перспектив использования в качестве лекарственного растительного сырья плодов и листьев яблони лесной.
- 2.** Анализ научной литературы и патентной документации выявил наличие достаточной сырьевой базы яблони лесной на территории Российской Федерации, а также, подтвержденный современными экспериментальными исследованиями, значительный спектр фармакологического действия, обусловленный химическим составом сырья, содержащего гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, полисахариды, витамины, органические кислоты
- 3.** По результатам мониторинга научной литературы выявлено, что для анализа сырья яблони разных видов, исследователями используются различные методы современного физико-химического анализа, позволяющие осуществить качественную и количественную оценку содержания указанных выше биологически активных веществ (бумажная и тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, ГХМС, спектрофотометрия, денситометрия) , однако отсутствуют данные системного фармакогностического анализа сырья, направленные на разработку показателей качества.
- 4.** До настоящего времени в РФ осуществляется стандартизация только плодов яблони домашней в соответствии с требованиями ГОСТ, разработанных для пищевой промышленности. Показатели качества, рекомендуемые данными документами, предусматривают оценку: внешнего вида плодов, запаха и вкуса, степени зрелости, массовой доли растворимых сухих веществ в соке плодов, размера плодов по наибольшему поперечному диаметру, наличие сетки на плодах, механических повреждений, побурение мякоти. Очевидно, что определение данных показателей качества не дает возможность в полной мере оценить содержание ценных пищевых и

биологически-активных веществ в сырье. Нормативная документация на плоды и листья яблони лесной отсутствует, что определяет невозможность использования их в широкой медицинской практике.

5. Учитывая данные фармакологических исследований, а также опыт использования сырья в медицинской практике, для расширения номенклатуры отечественных лекарственных препаратов растительного происхождения актуальным является проведение фармакогностического анализа плодов и листьев яблони лесной с целью разработки показателей качества для включения в нормативную документацию, а также создание на основе исследуемого сырья новых лекарственных средств.

## **ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Краткое описание объектов исследования, особенностей их заготовки и консервации.**

Объектом исследования служили плоды и листья яблони лесной, заготовленные от дикорастущих растений в подлеске смешанного леса в Истринском и Чеховском районах Московской области в августе-сентябре 2015-2017 г., а также образцы любезно предоставленные Ботаническим садом Петра Великого им. В. Л. Комарова и ботаническим садом МГУ им. Ломоносова, для ряда сравнительных анализов использовались листья и плоды яблони домашней позднеспелых сортов Антоновка и Ренет Симиренко, широко культивируемых на территории РФ, соответствующие требованиям ГОСТ 21122-75 «Яблоки свежие поздних сроков созревания».

Отобранные образцы использовались для исследований в свежем, замороженном и высушенном виде. Заготовленное сырье немедленно передовалось на сушку, которую проводили, используя шкафы лабораторные сушильные при соблюдении режима сушки в контролируемом интервале 50-70 С. Для части собранных образцов листьев, плодов яблони лесной применяли консервацию замораживанием, которую проводили согласно нормативам ГОСТ РФ 53956-2010 «Фрукты быстрозамороженные», осуществляя интенсивное снижение температуры исследуемого сырья с формированием центров образования льда до достижения внутри массы замораживаемых образцов температурного значения - 18 С с соблюдением средней скорости снижения температуры не ниже 0,5 см/ч ( скорость замораживания образцов сырья – отношение толщины замороженного слоя обрабатываемого сырья, см, ко времени ч, в течение которого замороженный слой полностью сформировался ).

Образцы высушенного сырья листьев и плодов яблони лесной и сортовые образцы яблони домашней поздних сроков созревания хранились в

мешках промышленного изготовления из бумаги с учетом требований нормативной документации [ОФС 1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ XIII] в специальном помещении с уровнем контроля влажности, температуры, обеспечением возможности проветривания, исключая попадания прямых солнечных лучей. Хранение замороженных образцов осуществляли в морозильных камерах в пакетах полиэтиленовых. Свежее сырье использовалось для непосредственного анализа, проводимого не позднее 24 часов со времени заготовки.

Отбор точечных, объединенных, средних и аналитических проб листьев и плодов яблони лесной производили согласно рекомендациям общей статьи ГФ XIII (ОФС.1.1.0005.15 Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов).

В процессе выполнения экспериментальной работы использовались настои, настойки гомеопатические матричные, образцы жидкого экстракта и сиропа из исследуемого сырья, полученные в соответствии с рекомендациями ГФ XI, XIII, XIV.

В процессе экспериментальных исследований нами использовались реактивы и реагенты, соответствующие требованиям нормативно-технической документации, регулирующей их доброкачественность.

При проведении экспериментальных исследований, требующих использования стандартных образцов, использовались представленные на российском рынке стандартные образцы различных производителей («Sigma-Aldrich» и «Flucka» и др).

## **2.2. Краткая характеристика аналитических методов и лабораторного оборудования, используемых при изучении исследуемого сырья**

### **2.2.1. Анализ арбутина в листьях, плодах яблони лесной**

Идентификацию арбутина в исследуемых объектах проводили с использованием качественных реакций [76, 79] и методом ТСХ. Пробоподготовку для проведения качественных реакций проводили согласно рекомендациям ГФ XI, для осуществления хроматографического анализа 0,5 г сырья, предварительно измельченного на лабораторной мельнице (точная навеска) помещали в смесь, полученную смешиванием равных объемов метанола и воды дистиллированной общим объемом 5 мл и осуществляли нагрев с использованием холодильника обратного на водяной бане не менее 15 минут. Полученное горячее извлечение сразу же фильтровали, с последующим промыванием фильтра смесью из равных объемов метанола и воды. Анализ извлечения проводили на хроматографических пластинках «Merck» в системах растворителей:

\*кислота муравьиная безводная – вода-этилацетат (6:6:88)

В качестве стандартов использовали арбутин, галловую кислоту и гидрохинон, которые в количестве 25 мг растворяли в метаноле и доводили объем полученного раствора сравнения до 10,0 мл этим же растворителем.

Пробы наносили на пластинки в количестве 20 мкл для исследуемого извлечения и 10 мкл для раствора сравнения, содержащего стандартные образцы. После прохождения фронта растворителей пластинки высушивали при температуре 105-110° С и опрыскивали раствором дихлорхинонхлоримида в метаноле (концентрация 10г/л), с последующей обработкой раствором натрия карбоната.

Также с целью идентификации арбутина использовали сравнение УФ-спектров извлечений из анализируемых образцов листьев, плодов яблони лесной с УФ- спектром, полученным для СО арбутина при используемой

длине волны 280 нм, а также метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Нами применялась металлическая колонка Kromasil C18 с параметрами 4,6 x 250 мм. Размер частиц неподвижной фазы составлял 5 микрон. В качестве подвижной фазы нами использовалась система растворителей состава:  $\text{CH}_3\text{OH}$  -  $\text{H}_2\text{O}$  -  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (концентрированная), приготовленная в соотношении объемов компонентов 400: 600: 5. Элюирование осуществлялось в изократическом режиме. Анализ исследуемых образцов проводили после стандартной пробоподготовки при комнатной температуре. Контроль скорости подачи элюента осуществлялся на уровне 0,8 мл/ мин. Время эксперимента составило 70-80 минут. Детектирование проводилось с использованием УФ-детектора «GILSTON» UV/VIS модели 151. Использовалась аналитическая длина волны 280 нм.

Примерно 10,00 г. (точная навеска) исследуемых образцов листьев яблони лесной, предварительно измельченных, количественно помещали в колбу вместимостью 0,250 л, заливали сырье 70 мл  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (70%), затем колбу подсоединяли к обратному холодильнику и проводили нагревание на кипящей водяной бане в течение 1 часа с начала кипения экстракционной смеси. По завершении времени экстракции, исследуемое извлечение фильтровали, используя лабораторный фильтр мембранный (диаметром пор фильтра 0,25-0,45 мкм) в колбу мерную вместимостью 100 мл (первые 5-7 мл фильтрата отбрасывали), после чего доводили объем полученного извлечения этанолом 70% до метки.

Параллельно осуществляли приготовление 0,05% растворов веществ фенольной природы СО в 70% этаноле по известной методике. [92, 179] По 20 мкл исследуемых растворов и раствора сравнения вводили в хроматограф с использованием микрошприца Hamilton емкостью 25 мкл и осуществляли хроматографирование.

Количественное содержание арбутина в анализируемых образцах сырья яблони проводили с применением иодиметрического титрования по

известной фармакопейной методике. Процесс пробоподготовки анализируемого высушенного сырья яблони лесной включал проведение измельчения аналитической пробы до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 2 мм. Листья яблони лесной, при консервации которых использовалось замораживание, а также сырье, постыпавшее на исследование свежим нарезали до достижения размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 7-9 мм.

### **2.2.2. Изучение состава и оценка суммарного содержания флавоноидов**

Идентификацию флавоноидов проводили методом ТСХ в системах растворителей хлороформ – метиловый спирт (8:2) и этилацетат –метановая кислота безводная –вода (70:15:15) с детектированием зон, соответствующих веществам флавоноидной природы в УФ –свете при длине волны 365 нм и последующей обработке спиртовым раствором алюминия хлорида 5%. После обработки детектирующим реагентом пластинку нагревали при температуре 100-105°C в сушильном шкафу в течение 2-3 мин, после чего просматривали при дневном освещении.

Идентификацию компонентного состава фракции флавоноидов проводили так же методом ВЭЖХ на приборе «GILSTON» UV/VIS МОДЕЛЬ 151».

Для проведения эксперимента высушенные плоды и листья яблони лесной подвергали измельчению до достижения размера частиц сырья, способных проходить через сито, диаметр отверстий которого составляет 3 мм (ГОСТ 214-83). Около 1,0 г исследуемого сырья (точная навеска) аккуратно переносили в колбу вместимостью 100 мл, приливали 20 мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 70%, колбу с анализируемым сырьем и экстрагентом присоединяли к обратному холодильнику и осуществляли извлечение на кипящей водяной бане в течение 60-70 минут с начала закипания водноспиртовой смеси в экстракционной колбе. По завершении времени экстракции, исследуемую

смесь подвергали последовательно охлаждению и фильтрации в мерную колбу объемом 25 мл, с применением фильтра бумажного лабораторного. Объем полученного извлечения доводили  $C_2H_5OH$  70% до метки.

Параллельно осуществлялось приготовление серии 0,05% растворов сравнения стандартных образцов в 70% спирте этиловом. При проведении хроматографического анализа исследуемые извлечения и растворы сравнения объемом 20 мкл вводили в хроматограф и проводили исследование по вышеизложенной методике.

Количественное определение суммарного содержания веществ флавоноидной природы проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на 3-рутинозид кверцетина по приводимой далее методике.

Стадия пробоподготовки исследуемого сырья предусматривала измельчение аналитической пробы до достижения размера частиц, проходящих сквозь сито, с диаметром отверстий 2 мм. Около 1, 0 г (точная навеска) сырья яблони лесной, предварительно подвергшихся пробоподготовке, помещали в коническую колбу, снабженную шлифом вместимостью 0, 25 л, вносили 100 мл  $C_2H_5OH$  70%. Колбу с исследуемой смесью аккуратно подсоединяли к обратному холодильнику и осуществляли нагрев на водяной бане в течение полутора часов, осуществляя периодическое встряхивание с целью смывания частиц сырья со стенок экстракционной колбы. По истечении времени экстракции колбу с спиртовым извлечением охлаждали до температуры лаборатории. Извлечение подвергали фильтрации через фильтр из бумаги фильтровальной общелабораторного назначения, промытый предварительно этанолом 70%. Первые 10-15 мл фильтрата отбрасывали. Данное извлечение использовалось для проведения реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, для чего из него аналитической пипеткой осуществляли забор 2.0 мл исследуемого извлечения и переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливали 5 мл раствора алюминия хлорида 5% в этиловом спирте 70% и

по истечении 10 минут вносили 1 мл этановой кислоты 3%. Полученную смесь доводили до метки этанолом 70% и оставляли на 0,5 часа для стабилизации образующегося комплекса. По истечении получаса измеряли оптическую плотность анализируемого извлечения с использованием кювет с толщиной слоя 10 мм. Используемая длина волны в эксперименте составила 410 нм.

Оценку суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин для абсолютно сухого сырья рассчитывали с учетом удельного показателя поглощения, рассчитанного для продукта реакции комплексообразования рутина с алюминия хлоридом:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A^0 \times a \times 2 \times (100 - W)}$$

Где А - значение показателя оптической плотности испытуемого извлечения;

А – значение удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 4109 нм, значение которого принимается за 260;

а- навеска сырья, взятого для анализа, гр.;

W – Влажность сырья, %

### **2.2.3. Изучение состава и оценка суммарного содержания гидроксикоричных кислот**

Все использованные в исследовании реактивы имели степень чистоты ч.д.а. Изучение качественного состава биологически активных веществ осуществляли в извлечениях из листьев яблони, полученных экстракцией 70% этиловым спиртом, на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSON», производства Франции, модель 305, снабженном ручным инжектором, модели RHEODYNE 7125 USA с использованием последующей компьютерной обработкой полученных данных

экспериментального анализа с применением программы Мультитхром для Windows. В эксперименте применялась колонка металлическая размером 4,6 x 250 мм KROMASIL C18, размер частиц неподвижной фазы составил 5 мкм. В качестве элюента применяли смесь CH<sub>3</sub>-CN – H<sub>2</sub>O – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (концентрированная) в соотношении 20: 80: 0,05. Анализ осуществляли при температуре лаборатории. Подвижную фазу подавали со скоростью 1,0 мл/мин. Время проведения анализа варьировало от 40 до 60 минут. Детектирование осуществляли с применением УФ-детектора «GILSON» UV/VIS модель 151 при аналитической длине волны, равной) 370 нм [83].

Оценку количественного содержания гидроксикоричных кислот в сырье яблони лесной осуществляли методом спектрофотометрии в пересчете на (НО)<sub>2</sub>С<sub>6</sub>Н<sub>3</sub>СН=СНСООН (кофейная кислота; 3,4-диоксикоричная кислота; 3-(3,4-дигидрофенил) -2-пропеновая кислота). Исследуемое сырье, предварительно измельченное массой 2 г (точная навеска) помещали в колбу объемом 200 мл и добавляли 70 мл воды дистиллированной. Колбу с анализируемой смесью присоединяли к обратному холодильнику и осуществляли нагрев на водяной бане в течение 10- 15 минут. Экстракцию осуществляли повторно. Полученные экстракты охлаждали при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр. Извлечения аккуратно вносили в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили объем раствора дистиллированной водой до метки. Затем в мерную колбу емкостью 50 мл переносили 1 мл полученного ранее экстракта и доводили объем испытуемого экстракта до метки с использованием 20% этанола. Оптическую плотность испытуемого экстракта измеряли при аналитическом для кислоты кофейной значении длины волны, составляющем 325 нм. Для использования в качестве раствора сравнения был отобран этанол 20%.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот (X, %) в листьях яблони лесной в пересчете на кислоту кофейную вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_x \times 200 \times 50 \times 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times m \times V_a \times (100 - W)},$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого извлечения

$E_{1\text{см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения кислоты кофейной при 325 нм, составляющий 782

$m$  – масса навески измельченных листьев яблони лесной

$V_a$  – объем аликвоты, мл

$W$  – влажность, %

#### **2.2.4. Изучение состава и оценка суммарного содержания органических кислот**

Качественный анализ свободных органических кислот проводили методом ионо-эксклюзионной хроматографии с использованием методики, разработанной А. Н. Кузьменко применительно к исследованию карбоновых кислот, содержащихся в лекарственном растительном сырье [51]. Пробоподготовка сырья была описана автором для высушенных трав, кор и подземных органов исследованных лекарственных растений. Учитывая, что анализ проводился нами для плодов и листьев различных способов консервации, пробоподготовка была нами модифицирована и на стадии измельчения высушенные листья и плоды измельчали в лабораторной мельнице, а свежее и замороженное сырье растирали до кашицеобразной массы в аптечной ступке, после чего к пробе сырья массой 2 г. (точная навеска), помещенной в лабораторную фарфоровую чашку приливали 20 мл воды дистиллированной и нагревали на водяной бане в течение 15 минут, после чего оставляли для охлаждения в течение 30 минут и подвергали центрифугированию на лабораторной центрифуге (8000 об./мин) в течение 5 минут с последующей фильтрацией.

Полученной извлечение исследовали на приборе «Цвет 3006» с кондуктометрическим детектором на сорбенте Aminex Q-15S (8 x 300 мм), скорость потока 0,7 мл/мин, с 5 мМ раствором бензойной кислоты, используемым в качестве элюента.

Идентификацию карбоновых кислот осуществляли путем сравнения с временами удерживания стандартов.

Расчет количественного содержания свободных органических кислот определяли в сравнении титриметрическим методом в пересчете на кислоту яблочную в соответствии с методикой ГФ РФ XI.

### **2.2.5. Определение аминокислотного состава листьев, плодов яблони лесной**

Определение состава аминокислот в исследуемых плодах и листьях яблони лесной проводили по известной методике, пробоподготовка сырья в которой предусматривает обработку исследуемого сырья (точная навеска измельченных листьев, плодов яблони лесной- 50 мг) 25 мл раствора додецилсульфата натрия 0,25% в 0,1 М буферном фосфатном растворе, обеспечивающем значение водородного показателя - 6,5 [67]

Исследуемые образцы подвергали инкубированию в лабораторном термостате в течение 60 минут, контролируя уровень температуры, после чего осуществляли забор образцы пипеткой и переносили его на колонку хроматографическую (15 x 1,5 см), заполненную гелем Toyoperl HW -55 F. Выделение аминокислотных фракций осуществляли в температурном режиме 25 С. В качестве элюента применяли 0,25% раствор додецилсульфата натрия в 50 мМ фосфатном буфере. Хроматографический анализ исследуемых образцов осуществляли с применением коллектора фракций "multriac" LKB, снабженного детектирующим устройством. Аминокислотный состав белковой фракции изучали на приборе Keltex 1030, Швеция. В ампулу для проведения гидролиза амидной связи микрошприцем вводили 10 нМ

раствора концентрата в буфере и проводили упаривание на вакуумном насосе с ловушкой, заполненной диметилкетонем с жидким азотом. После чего вносили раствор кислоты хлороводородной, замораживали и запаивали под вакуумом. Пробу термостатировали 24 часа при контроле постоянства температурного режима 105°C. После вскрытия ампулы, содержимое упаривали, добавляли 0,5 мл воды и снова высушивали, растворяли в 0,7 мл смеси 0,1% трифторуксусной кислоты и 5% ацетонитрила, центрифугировали 5 минут при 2000 об/мин и микрошприцем вводили в автосамплер аминокислотного анализатора. Показания интегратора прибора расшифровывали по стандартным хроматограммам известных аминокислот.

### 2.2.6. Определение дубильных веществ

Идентификацию дубильных веществ в исследуемом сырье осуществляли с использованием качественных реакций, традиционно применяемых для данной группы веществ [29], а также методом ТСХ, рекомендуемым Европейской Фармакопеей 7 изд. Так же нами использовалась методика ТСХ на пластинках «Сорбфил» 10x15 см, апробированная ранее и показавшая наилучшее разделение полифенольных соединений для образцов сырья, рассматриваемых в качестве источника дубильных веществ [5] в системе растворителей:

- ✓ эфир диэтиловый - этановая кислота ледяная – гексан – этилацетат (20:20:20:40)
- ✓ метановая кислота безводная – этилацетат-толуол (10: 30: 60)
- ✓ н-бутанол- этановая кислота – вода (4:1:2)
- ✓ этилацетат – метановая кислота безводная – вода (80:10:10)

Обнаружение зон адсорбции разделяемых веществ осуществляли в УФ-свете при длине волны 254 и 365 нм, с последующим детектированием раствором железа аммония сульфата 1% и алюминия хлорида раствором 2% спиртовым.

Результаты проведенного ТСХ анализа были использованы для формирования показателей подлинности листьев и плодов яблони лесной.

Количественное содержание дубильных веществ оценивали в сравнении с использованием титриметрического метода в пересчете на танин и спектрофотометрически в пересчете на кислоту галловую.

Определение суммарного содержания полифенольных веществ в исследуемых объектах осуществляли с использованием методики Фолина-Чикалтеу, описанной ранее для анализа различных растительных объектов. [78,96] Данный метод основывается на использовании аналитического реактива Фолина – Чикалтеу, представляющего собой смесь фосфорновольфрамовой ( $P_2O_5 \times 12 \quad WO_3 \times 42 \quad H_2O$ ; М. масса=3680,9) и фосфорномолибденовой кислот ( $H_7P(Mo_2O_7)_6 \times H_2O$ ; М. масса=1861,28) . В ходе реакции, протекающей при взаимодействии полифенольных веществ анализируемого объекта и реактива Фолина – Чикалтеу, полифенольные вещества окисляются и формируется интенсивная голубоватая окраска смеси восстановленных вольфрамов и молибдатов. Оптическая плотность извлечения оказывается пропорциональной содержанию полифенольных веществ. Нами использовалась пробоподготовка, широко используемая при анализе пищевого и лекарственного растительного сырья [96].

Параллельно анализу объектов исследования осуществляли измерение оптической плотности раствора, приготовленного нами из 1 мл РСО галловой кислоты, 5 мл свежеприготовленного реактива Фолина – Чикалтеу, 15 мл 20% раствора натрия карбоната и воды, дистиллированной до 100 мл.

Суммарное содержание полифенольных соединений в % в пересчете на кислоту галловую вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 1 \times 100 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times a \times 100 \times 100 \times (100 - w)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора

$D_0$  – оптическая плотность раствора РСО галловой кислоты

$m$  – масса сырья, г

$m_0$  – масса РСО галловой кислоты, г

$a$  – аликвота раствора  $A$ , мл

$w$  – потеря в массе при высушивании сырья, %

### 2.2.7. Определение полисахаридов

Как известно, в пищевой промышленности плоды яблони домашней широко используются для производства яблочного пектина, качество которого характеризуется требованиями ГОСТ 29186 – 91 «Пектин». При этом в работах многих исследователей для плодов яблони разных видов проводится количественное определение суммарного содержания полисахаридов [11,67]. Мы сочли целесообразным провести сравнительный анализ содержания полисахаридов в сырье по фармакопейной методике ГФ XI, модифицированной для анализа плодов и листьев яблони, представленных свежим, высушенным и замороженным сырьем, а также провести анализ содержания водорастворимых и нерастворимых пектинов в исследуемом сырье, по известным методикам, применяемым для количественной оценки содержания пектиновых веществ в растительном сырье [61,71].

Оценку количественного содержания полисахаридов в плодах и листьях яблони лесной проводили гравиметрическим методом, после пробоподготовки включающей измельчение аналитической пробы свежих или замороженных плодов, или листьев яблони лесной до пюре-образного состояния путем истирания в ступке, а для высушенного сырья измельчение в лабораторной мельнице. Точную навеску измельченных свежих. Высушенных или замороженных плодов, или листьев яблони лесной помещали в колбу со шлифом объемом 250 мл, приливали 200 мл воды, дистиллированной и нагревали до кипения с обратным холодильником на

водяной бане в течение получаса. Экстракцию веществ полисахаридной природы осуществляли еще дважды. Полученные таким образом извлечения объединяли и проводили центрифугирование на центрифуге лабораторной с частотой вращения 5000 оборотов/мин в течение 10-15 минут, после чего жидкость с осадка аккуратно декантировали в колбу мерную объемом 500 мл сквозь марлевый пятислойный фильтр, предварительно промытый водой дистиллированной. 25 мл, полученного вышеизложенным способом извлечения, заливали в центрифужную пробирку, приливали 75 мл спирта этилового 95% и помещали на водяную баню на 10 минут. Пробирку с извлечением охлаждали и подвергали центрифугированию в течение получаса. Жидкость над осадком отфильтровывали под вакуумом при значении остаточного давления 16 кПа сквозь стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Полученный в результате проведенных операций осадок количественно помещали на фильтр и промывали сначала 95% этиловым спиртом, затем ацетоном и, в конце, этилацетатом. Фильтр с промытым от балластных веществ осадком просушивали последовательно на воздухе и в сушильном шкафу при температуре 100-105 С, взвешивали и рассчитывали содержание полисахаридов в сырье.

Для выделения суммы водорастворимых пектинов 5,0 г (точная навеска) измельченных плодов или листьев яблони лесной помещали в мерную колбу емкостью 500 мл, заливали нагретой до температуры 40-50 С° дистиллированной водой и выдерживали в данном температурном интервале в течение 30 минут на водяной бане, после чего осуществляли фильтрацию через слой сложенной вчетверо марли. Остаток на фильтре вновь заливали горячей водой, осуществляли фильтрацию, после чего объединяли полученные фильтраты. Данные фильтраты, согласно литературным данным, обогащены водорастворимыми пектинами. К полученному извлечению, содержащему водорастворимые пектины, приливали равный объем 0,4% раствора натрия гидроксида и выдерживали 12 часов при комнатной

температуре. Затем извлечение подкисляли 1% раствором уксусной кислоты, после чего приливали 50 мл 10% раствора кальция хлорида, добавление которого вызывает осаждение водорастворимых пектинов. Полученный таким образом осадок фильтровали через предварительно взвешенный фильтр, промывали водой дистиллированной до отрицательной реакции на хлорид-ионы с раствором серебра нитрата. Полученный осадок отфильтровывали и гравиметрически определяли содержание водорастворимых пектинов в исследуемом сырье.

Остаток после выделения водорастворимой фракции пектинов количественно переносили в коническую колбу емкостью 500 мл, приливали 150 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты, после чего выдерживали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Содержимое колбы охлаждали и осуществляли фильтрацию через бумажный фильтр, полученный остаток дробно промывали водой, объединяя полученные смывы в ту же колбу. Фильтр с остатком помещали в экстракционную колбу, в которую предварительно внесли 40 мл 1% раствора аммония нитрата, вновь помещали на кипящую водяную баню, после чего фильтровали в ту же колбу. В объединенном извлечении количественно оценивали содержание нерастворимых в воде пектиновых веществ, после соответствующей пробоподготовки.

### **2.2.8. Определение товароведческих показателей исследуемого сырья**

Определение товароведческих показателей сырья осуществляли, руководствуясь требованиями ГФ XI, XIII, XIV: ОФС 1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»; ОФС 1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»; ОФС 1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС 1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания

примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Отбор проб исследуемого сырья для проведения товароведческого анализа осуществляли в соответствии с рекомендациями ОФС 1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

### **2.2.9. Определение антимикробной активности исследуемого сырья**

Определение антимикробной активности извлечений из листьев и плодов яблони лесной осуществляли, руководствуясь методическими указаниями методом диффузии в агар на плотной питательной среде. В работе использовались штаммы тест-микроорганизмов обычно применяемые при изучении антимикробного действия ЛРС (справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования под ред. Биргера М.О. – М.: Медицина 1982, С 172-177).

### **2.3. Валидация методов, обработка полученных результатов**

Валидацию методов определения групп БАВ проводили согласно ГФ XIII изд., в. 1, с.222. «Валидация аналитических методик» (ОФС.1.1.0012.15). Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII изд., в. 1, с.235. «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» (ОФС.1.1.0013.15) [51], для обработки данных использовался пакет ПО Microsoft Office Excel 2010. Метрологические характеристики методик анализа представлены далее.

Метрологические характеристики методики определения БАВ в двух видах яблони ( $n = 5$ ,  $P_x = 0,95$ ,  $t(p, f) = 2,776$ )

$n$  – число повторных испытаний;

$\bar{X}$  – среднее значение из числа повторностей,  $\bar{X} = \frac{\sum_i^n x_i}{n}$ ;

$P_x$  – доверительная вероятность;

$t(P, f)$  – критерий Стьюдента;

$S_x^2$  – дисперсия;

$S_x$  – стандартное отклонение;

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}};$$

$S_{\bar{X}}$  – стандартное отклонение среднего результата,  $S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$ ;

$\Delta x$  – доверительный интервал,  $\Delta x = \frac{t(P,f) \times S_x}{\sqrt{n}}$ ;

$\bar{\varepsilon}$  – относительная ошибка определения,  $\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta x}{\bar{X}} \times 100\%$

#### **2.4. Разработка методического подхода к анализу плодов, листьев яблони лесной на основе системного анализа нормативной документации и научной литературы**

Обобщая проработанные литературные данные и принципы создания нормативной документации на пищевое (ГОСТ) и лекарственное растительное сырье (ОФС), нами предложены подходы к исследованию нового перспективного сырья – плоды и листья яблони лесной, содержащие сложный комплекс биологически активных веществ и обладающих широким спектром фармакологической активности, представленные на рис. 6

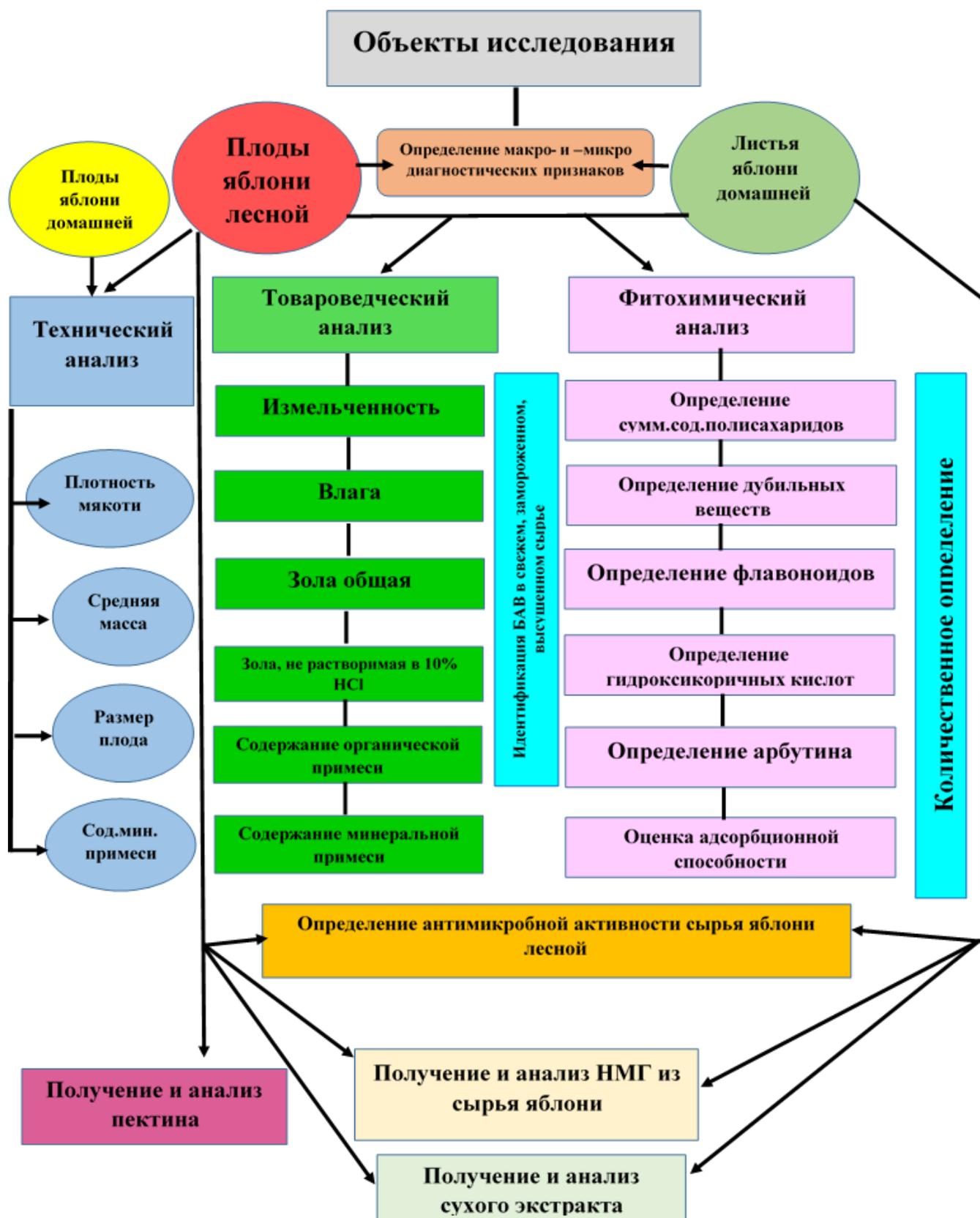


Рис.6. Схема проведения исследований листьев и плодов яблони лесной

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЛИСТЬЕВ, ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ И ЯБЛОНИ ДОМАШНЕЙ**

Учитывая отсутствие нормативной документации, характеризующей качество плодов и листьев яблони лесной нами проводилось изучение морфолого-анатомических признаков сырья с учетом их variability, обусловленной возможным влиянием метода консервации в соответствии с требованиями ОФС «Плоды» «Листья» и общепринятой методики сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур (Мичуринск: ВНИИС им.И.М.Мичурина,1999)

#### **3.1. Изучение внешних признаков сырья яблони лесной и домашней**

С целью определения внешних признаков плоды и листья исследовались в свежесобранном виде, высушенными и замороженными. Высушенные листья яблони лесной предварительно подвергали размягчению, опуская на несколько минут в теплую воду, после чего расправляли на стеклянной пластинке и приступали к изучению внешних признаков. Поскольку плоды яблони относятся к группе сочных плодов и в процессе сушки склонны изменять форму, данное сырье, согласно требованиям ГФ XIII ОФС.1.5.1.0007.15 Плоды, исследуют сначала в сухом виде, а затем в после размачивания в теплой воде или нагревании в течении 5 минут на кипящей водяной бане. Анализ замороженных плодов и листьев проводили после предварительно проведенного размораживания сырья в холодильнике в температурном режиме 5-7°C в течение 120 минут, после чего плоды и листья яблони лесной изучалось невооруженным глазом при

дневном освещении, с использованием лупы (10х) или стереомикроскопа. Результаты анализа представлены в таблица 4-8.

*Таблица 4. Морфометрические показатели свежих листьев яблони*

Вид сырья		Длина листа, см	Ширина листа, см	Средняя масса свежего листа
<b>Яблоня домашняя – Malus domestica Borkh.</b>	Антоновка обыкновенная	6,2-7,4	4,3-5,0	0,64
	Ренет семиренко	6,6-7,8	4,4 – 5,1	0,68
	Пепин шафранный	6,1-7,0	4,8-5,2	0,58
<b>Яблоня лесная - Malus sylvestris Mill</b>		5,5-6,4	4,2-4,8	0,57

*Таблица 5. Морфометрические показатели свежих плодов яблони*

Вид сырья		Длина плода, см	Ширина плода, см	Средняя масса свежего плода, г	Индекс формы плода
<b>Яблоня домашняя – Malus domestica Borkh</b>	Антоновка обыкновенная	6,5	7,9	169-178	0,82
	Ренет семиренко	6,8	6,7	170-196	1,02
	Пепин шафранный	7,5	8,0	146-164	0,94
<b>Яблоня лесная - Malus sylvestris Mill</b>		2.1-3.3	2,5-3,0	42-64	0,84- 1,10

*Таблица 6. Морфометрические показатели высушенных листьев яблони*

Вид сырья		Длина листа, см	Ширина листа, см	Средняя масса листа
<b>Яблоня домашняя – Malus domestica Borkh.</b>	Антоновка обыкновенная	6,0-7,2	4,0-4,8	0,58
	Ренет семиренко	6,3-7,1	4,2 – 5,0	0,55
	Пепин шафранный	5,8-7,0	4,1-5,0	0,48

<b>Яблоня лесная - Malus sylvestris Mill</b>	5,2-6,0	4,0-4,6.	0,23
--	---------	----------	------

*Таблица 7. Сравнение внешних признаков листьев яблони лесной и домашней*

<b>Признак</b>	<b>Яблоня лесная</b>	<b>Яблоня домашняя</b>
Листья		
Строение и размеры	Листья простые, черешковые, длина от 3,7 до 5,4 см, ширина от 2,0 до 3,5	Листья простые, черешковые, разной величины в зависимости от сорта длиной до 12, шириной до 9 см
Форма	Эллиптическая, округлая или яйцевидная	Различной формы в зависимости от сорта, чаще всего яйцевидные
Расположение	Очередное	Очередное
Верхушка, основание и влагалище листа	Верхушка с коротким острием	Различной формы
Край листа	Край листа неравномерно-мелкозубчатый	Край городчато-пильчатый
Жилкование листа	Жилкование перистонервное. Срединная жилка, вдавленная с верхней поверхности листа, сильно выпуклая, беловатая с внутренней поверхности.	Жилкование перистонервное
Опушение	Многочисленные мелкие волоски с нижней поверхности	Различная степень и характер распространения опушенности в зависимости от сорта
Наличие воскового налета	Отсутствует	Отсутствует
Цвет, запах, вкус	Цвет листьев сверху темно-зеленый, снизу- серовато-	От светло- до темно-зеленого в зависимости от

	зеленый светлый. Запах слабый травянистый, Вкус горьковато-вяжущий.	сорта
--	---	-------

Таблица 8. Сравнение внешних признаков плодов яблони лесной и домашней

Признак	Яблоня лесная	Яблоня домашняя
Плоды		
Тип плода	Яблоко (Pomum)	Яблоко
Тип околоплодника	Сочный	Сочный
Наличие плодоножки	Присутствует плодоножка размером от 13,5 до 19,0 мм	Присутствуют плодоножки различной длины, в зависимости от сорта
Форма и особенности строения околоплодника	Шаровидной или, реже, яйцевидной формы	Форма плода различная, в зависимости от сорта (округлая, цилиндрическая, яйцевидная, ширококоническая, колокольчатая, плоскоокруглая, широкоцилиндрическая, округлоконическая, коническая, плоская)
Характер поверхности околоплодника	Поверхность гладкая, блестящая	Поверхность гладкая. блестящая
Размеры	Длина: От 2,3 - до 3 см поперечное сечение от 2,2 до 3,1	Различные в соответствии с классификацией (очень мелкие, мелкие, ниже среднего, средние, выше среднего, крупные, очень крупные)
Количество семян, их форма, размеры, характер поверхности	4-10 семян заостренно-яйцевидной формы с гладкой блестящей поверхностью буроватого цвета	До 10, в зависимости от сорта
Запах	Специфический, яблочный	Яблочный, свежий

Цвет	Светло-зеленый, допускаюся покраснения	От зеленого до ярко-красного в зависимости от сорта
Вкус	Кислый, сильно вяжущий	От кисло-сладкого до сладкого в зависимости от сорта

В результате проведенных исследований для плодов и листьев яблони лесной были установлены наиболее существенные признаки, характеризующие внешний вид сырья. Установлено, что для плодов внешний вид сырья, свежего, высушенного или замороженного отличается сильнее, чем для листьев, внешние признаки которых после предварительной пробоподготовки практически не отличаются. Для плодов следует отмечать форму околоплодника, характер поверхности, размеры, цвет, вкус, запах, отличающиеся в зависимости от способа консервации.

Измельченное сырье представляет собой отдельные кусочки листьев, плодов разной формы, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм.

Порошок листьев представляет собой кусочки листовых пластинок и черешков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Порошок плодов представляет собой смесь частиц околоплодника и косточек плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм

### **3.2. Изучение микроскопических признаков сырья яблони лесной и домашней**

Анализ научной литературы не выявил данных по анатомо-диагностической характеристике плодов листьев яблони лесной, которые могли бы быть использованы при составлении раздела «Микроскопия». Имеются лишь общие сведения, характеризующие анатомическое строение плодов отдельных сортов яблони домашней, а также исследованы анатомо-диагностические признаки цельных плодов *Malus pallasiana* Juz. [91].

Учитывая вышеизложенное, нами было проведено анатомо-диагностическое исследование цельных и измельченных плодов и листьев яблони лесной свежих, высушенных и консервированных замораживанием,

### **3.2.1. Изучение диагностических признаков при микроскопическом изучении свежих, высушенных и замороженных плодов яблони лесной и яблони домашней.**

При определении анатомо-диагностических признаков плодов яблони лесной использовали зрелые целые и измельченные плоды разных способов консервации; микропрепараты готовили в соответствии с общепринятыми методиками (ГФ XIV).

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

При рассмотрении микропрепаратов измельченных плодов выявлены обрывки эпидермы, окончатость клеток, обрывки мезокарпия, паренхимные клетки разнородные, неправильной формы, рыхло расположенные в очертании округлые, как бы смятые. Каменистые клетки отдельно и в кусочках мезокарпия, обрывки механических волокон с кристаллами оксалата кальция.

*Таблица 9. Диагностические признаки в сырье плоды разных видов консервации*

Ткань	Диагностический признак в сырье
-------	---------------------------------

		свежие	замороженные	высушенные
Эпидермис	Форма клеток	Окончатые	Окончатые	Окончатые
	Тип устьичного комплекса	Аномоцитный тип	Аномоцитный тип	Аномоцитный тип
	Наличие кутикулы	Образует радиальную складчатость	Образует радиальную складчатость	Образует радиальную складчатость
	Трихомы	Одиночные простые волоски	Одиночные простые волоски	Одиночные простые волоски
Мезофилл	Структура мезофилла	Мезофилл листа рыхлый	Мезофилл листа рыхлый	Мезофилл листа рыхлый
	Кристаллические включения	Встречаются друзы кальция оксалата, призматические кристаллы	Встречаются друзы кальция оксалата, призматические кристаллы	Встречаются друзы кальция оксалата, призматические кристаллы

### **3.2.2. Изучение микродиагностических признаков свежих, высушенных и замороженных листьев яблони лесной и яблони домашней.**

При определении анатомо-диагностических признаков листьев яблони лесной микропрепараты готовили в соответствии с общепринятыми методиками (ГФ XIV). Эпидермис верхней стороны листа представлен довольно крупными многоугольными клетками, антиклинальные стенки которых обладают четковидными утолщениями. Над жилками клетки эпидермиса имеют более вытянутую форму, основная масса изодиаметрические. Клетки нижнего эпидермиса более мелкие извиленные. На верхней стороне листа устьица встречаются изредка и окружены 4-5

околоустьичными клетками. Устьица крупные, овальной формы, сильно приподнятые, аномоцитного типа. На нижней стороне листа они многочисленные, кутикула образует вокруг устьиц радиальную складчатость.

Верхняя сторона листа почти голая, нижняя покрыта многочисленными простыми извилистыми многоклеточными волосками, заостренными на конце, слегка расширенными у основания с тонкими стенками и гладкой поверхностью. Основание волоска прикрепляется к небольшой по размерам, несколько приподнятой клетке эпидермиса, расположенной на стыке нескольких эпидермальных клеток, ориентированных вокруг места прикрепления по радиусу и покрытых кутикулой, обладающей радиальной складчатостью. Мезофилл листа рыхлый, изредка встречаются друзы кальция оксалата. Проводящая система листа образует развитую сеть жилок, снабженных кристаллоносной обкладкой.

При рассмотрении микропрепарата измельченных листьев яблони обнаружены извилистые клетки эпидермиса, в фрагментах верхнего и нижнего эпидермиса встречается аномоцитный тип устьичного комплекса, устьица округлой или овальной формы, замыкающие клетки обладают почковидной формой, длина устьиц составляет до 28 мкм, ширина 18-22 мкм, многочисленные простые многоклеточные волоски, заостренные на конце, несколько расширенные у основания, с тонкими стенками и гладкой поверхностью; жилка листа с кристаллоносной обкладкой; обнаружены друзы кальция оксалата в мезофилле листа.

Анализ данных микроскопического исследования листьев яблони лесной свежих, высушенных и замороженных показал идентичность выявленных признаков, среди которых диагностическое значение имеют: размер и форма клеток эпидермиса, тип устьичного комплекса, расположение и строение волосков, наличие друз кальция оксалата в мезофилле и кристаллоносная обкладка по жилке листа. Полученные результаты определения анатомо-

диагностических признаков включены в раздел «Микроскопия» разрабатываемой нормативной документации.

*Таблица 10. Диагностические признаки в сырье листа разных видов консервации*

Ткань		Диагностический признак в сырье		
		свежие	замороженные	высушенные
Эпидермис	Форма клеток	Крупные многоугольные клетки (верхний эпидермис) Извилистые (нижний эпидермис)	Крупные многоугольные клетки (верхний эпидермис) Извилистые (нижний эпидермис)	Крупные многоугольные клетки (верхний эпидермис) Извилистые (нижний эпидермис)
	Тип устьичного комплекса	Аномоцитный тип устьичного комплекса	Аномоцитный тип устьичного комплекса	Аномоцитный тип устьичного комплекса
	Наличие кутикулы	Образует радиальную складчатость	Образует радиальную складчатость	Образует радиальную складчатость
	Трихомы	Многочисленные, простые. Извилистые. Многочлеточные волоски значительно чаще встречающиеся на нижнем эпидермисе листа	Многочисленные, простые. Извилистые. Многочлеточные волоски значительно чаще встречающиеся на нижнем эпидермисе листа	Простые, извилистые. многоклеточные волоски значительно чаще встречающиеся на нижнем эпидермисе

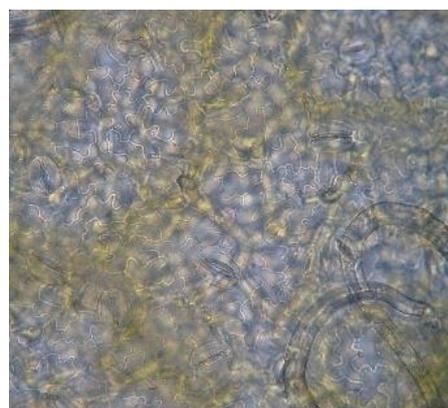
				листа
Мезофилл	Структура мезофилла	Мезофилл листа рыхлый	Мезофилл листа рыхлый	Мезофилл листа рыхлый
	Кристаллические включения	Встречаются друзы кальция оксалата	Встречаются друзы кальция оксалата	Встречаются друзы кальция оксалата
	Особенности жилки листа	Наличие кристаллоносной обкладки	Наличие кристаллоносной обкладки	Наличие кристаллоносной обкладки



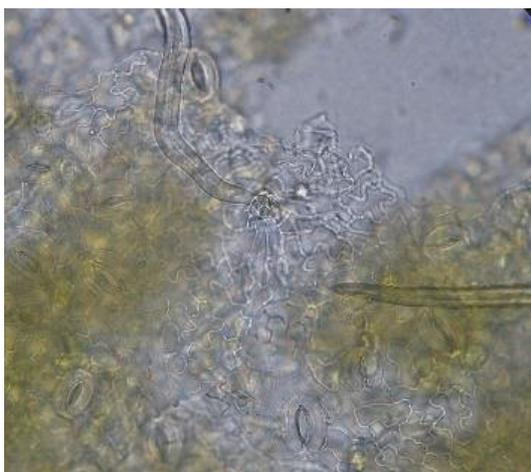
**Рис. 7. Фрагмент жилки листа с верхней и нижней стороны  
Ув×20**



**Рис. 8  
Ув×400**



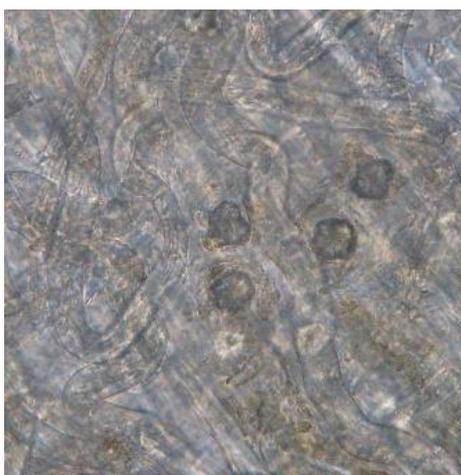
**Рис.9  
Фрагмент нижнего  
эпидермиса  
Ув×400**



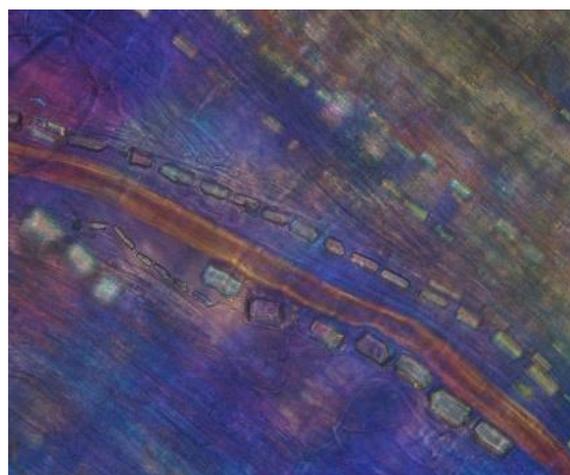
**Рис.10**  
**Фрагмент нижнего**  
**эпидермиса**  
**Ув×400**



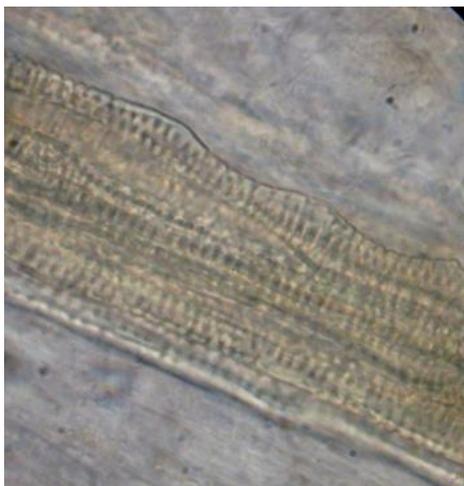
**Рис. 11**  
**Фрагмент нижнего**  
**эпидермиса**  
**Ув×40**



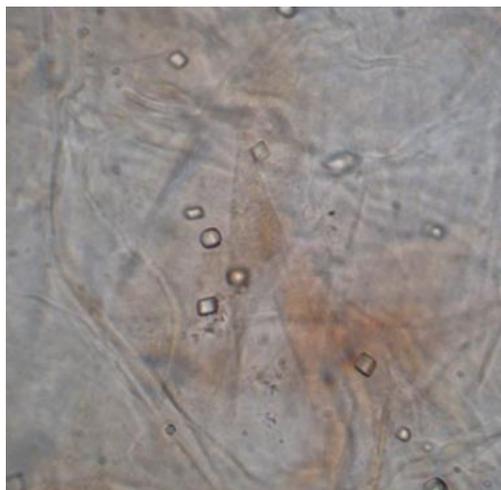
**Рис.12**  
**Друзы оксалата кальция в**  
**мезофилле листа**  
**Ув×1000**



**Рис.13**  
**Кристаллоносная обкладка**  
**по жилке листа в поляризованном свете**  
**Ув×400**



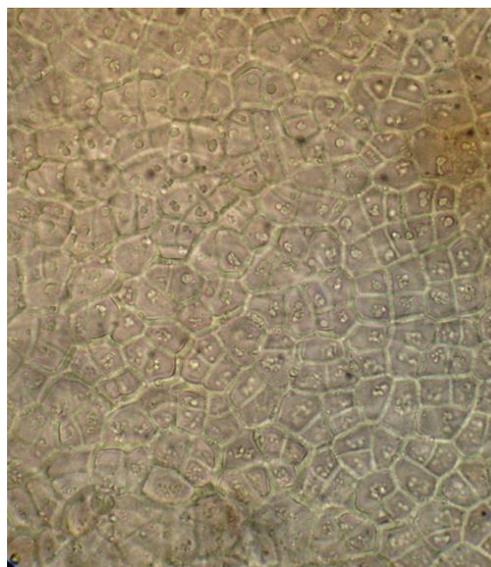
**Рис. 14**  
**Фрагмент проводящего пучка.**  
**Ув×400**



**Рис.15**  
**Клетки мезокарпия.**  
**Кубические кристаллы оксалата кальция.**  
**Ув×1000**



**Рис. 16**  
**Эндокарпий.**  
**Механические волокна. Ув×400**



**Рис.17**  
**Эндокарпий с поверхности. Ув×400**

### ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Изучены внешние признаки плодов и листьев яблони лесной, установлены характерные макродиагностические признаки, а также линейные размеры плодов и листьев растения. Листья яблони лесной очередные, чершковые (длина черешка до 3,5 см), цельные широкоэллиптические, округлые или яйцевидные на вершине с коротким, возможно, направленным несколько вбок острием, длина которого не превышает 10 мм край листа неравномерно-мелкозубчатый или пильчато-зубчатый, жилкование перистонервное, главная жилка сильно вдавлена с верхней поверхности листа, выпуклая с нижней поверхности, окраска беловатая с опушением. Цвет верхней поверхности листа темно-зеленый, нижней-серовато-зеленый светлый с выраженным опушением. Плод яблони лесной- яблоко шаровидной формы, твердые желто-зеленого цвета, с кольцевой оторочкой, образованной сросшимися чашелистиками, в мякоти плода находятся до 7 семян эллиптической формы с темно-коричневой поверхностью. Запах свежий, яблочный. Вкус кислый, вяжущий. При смачивании поверхности листа (лучше визуализируется на нижней светлой поверхности) или среза плода каплей раствора железоаммонийных квасцов развивается черно-зеленое окрашивание.

2. Проведено изучение микроскопических анатомо-диагностических признаков листьев и плодов яблони лесной: для идентификации листьев диагностическое значение имеют строение верхнего и нижнего эпидермиса, размер и форма клеток эпидермиса, аномоцитный тип устьичного комплекса, расположение и строение волосков, наличие друз кальция оксалата в мезофилле и кристаллоносная обкладка по жилке листа; для идентификации плодов диагностическое значение имеют характер эпидермиса и мезофилла, строение эндокарпия, наличие механических элементов, друз и кристаллов кальция оксалата.

3. Установлено, что способ консервации не оказывает влияние на встречаемость анатомо-диагностических признаков исследуемого сырья, которые присутствуют во всех исследованных образцах и могут быть включены в соответствующие разделы разрабатываемой нормативной документации.

## **ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ, ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ С УЧЕТОМ ИСПОЛЬЗУЕМОГО МЕТОДА КОНСЕРВАЦИИ СЫРЬЯ**

Как показано в обзоре литературы, плоды и листья яблони лесной представляют собой ценное сырье, по содержанию биологически активных веществ, не уступающее традиционным лекарственным растениям, обладающее разнообразным фармакологическим действием, доказанным множественными фармакологическими испытаниями [140,170]. Однако разрозненность и отсутствие систематичности в исследованиях химического состава данного сырья препятствуют созданию современной нормативной документации, разработка которой будет способствовать внедрению плодов и листьев яблони лесной в современную медицинскую практику.

### **4.1. Результаты предварительного качественного группового анализа биологически активных веществ листьев, плодов яблони лесной свежих, высушенных, замороженных.**

С целью проведения предварительного анализа групп БАВ плодов и листьев яблони лесной нами были получены извлечения из исследуемого сырья с применением в качестве экстрагентов воды дистиллированной и водно-спиртовых смесей разной концентрации, приготовленные в соответствии с требованиями ГФ XI, XIII, XIV изданий.

Для получения водных извлечений 5,0 г измельченного сырья различными способами консервации заливали 50 мл воды дистиллированной и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Извлечения фильтровали, остаток вновь заливали 50 мл воды дистиллированной и данную стадию повторяли дважды. Водные извлечения, полученные трехкратной экстракцией, объединяли и использовали для определения групповой принадлежности БАВ.

С полученными извлечениями из свежих, высушенных и консервированных замораживанием плодов и листьев яблони проводили качественные реакции на группы БАВ с использованием наиболее широко распространенных в фармакопейном анализе реактивов. Результаты предварительного фитохимического анализа новых видов сырья листьев, плодов яблони лесной свежих, высушенных и замороженных, представлены в таблице 14. Как видно из данных таблицы для всех изучаемых видов сырья предварительно подтверждено наличие таких групп БАВ, как дубильные вещества, флавоноиды, полисахариды, сапонины.

Таблица 11. БАВ, обнаруженные в результате предварительного химического анализа листьев, плодов яблони лесной

БАВ	Качественные реакции	Ожидаемый результат	Обнаружено при анализе					
			Листьев			Плодов		
			Свежих	Высушенных	Замороженных	Свежих	Высушенных	Замороженных
Дубильные вещества	1. Реакция осаждения раствором желатина: к 2-3 мл извлечения из сырья приливали по каплям свежеприготовленный раствор желатина.	Образование видимого помутнения, исчезающего в случае внесения избыточного количества желатина.	+	+	+	+	+	+
	2. К 2-3 мл извлечения прибавляли 4-5 капель раствора квасцов железоаммониевых.	Образование черно-фиолетового окрашивания с постепенным развитием зеленовато-черного цвета	+	+	+	+	+	+
	3. К 2 мл извлечения приливали по каплям 1% раствор антипирина.	Образование осадка светло-серого цвета.	+	+	+	+	+	+

	<p>4. К 2 мл извлечения приливали по каплям свежеприготовленную бромную воду.</p> <p>5. К 2 мл извлечения прибавляли 3-4 кристаллика натрия нитрата и 3 капли 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной</p>	<p>Постепенное формирование желтоватого творожистого осадка.</p> <p>Образование темно-коричневого окрашивания</p>	+	+	+	+	+	+
Флавоноиды	<p>1. Цианидиновая проба: К 3 мл извлечения приливают 5 капель концентрированной кислоты хлористоводородной и до 10 г цинка. Реакционную смесь прогревают на кипящей водяной бане в течение 3 минут.</p> <p>2.</p>	Образование розовато-оранжевого окрашивания	+	+	+	+	+	+

Полисахариды	К 10 мл водного извлечения приливали 30 мл спирта этилового 95%	Образование хлопьевидных сгустков, образующих осадок при стоянии	+	+	+	+	+	+
Сапонины	5 мл водного извлечения сильно встряхивают в пробирке	Образование обильной и стойкой во времени пены	+	+	+	+	+	+

## 4.2. Идентификация и количественная оценка флавоноидов и фенолкарбоновых кислот листьев, плодов яблони лесной

Анализ литературных данных показал, что плоды яблони лесной содержат широкий спектр фенолкарбоновых кислот, характеризующийся достаточно высоким содержанием [173, 179]. При этом указанные вещества способны встречаться в растительном сырье как в свободном, так и связанном виде – в составе гликозидированных производных и сложных эфиров.

Учитывая вышеизложенное для идентификации фенолкарбоновых кислот в плодах и листьях яблони лесной, пробоподготовка исследуемого сырья осуществлялась с проведением предварительного щелочного гидролиза, для расщепления связанных форм кислот.

Извлечения из плодов и листьев яблони лесной получали по следующей схеме.

*Методика.* Аналитическую пробу свежих и замороженных плодов и листьев яблони измельчали до кашицеобразного состояния, а высушенных листьев и плодов – до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. 50 г свежих или замороженных измельченных плодов или листьев, или 10 г высушенных (точная навеска) помещали в колбу, снабженную шлифом емкостью 300 мл, приливали 150 мл спирта этилового 70% и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Полученное извлечение из сырья охлаждали и фильтровали через пятислойный марлевый фильтр в колбу емкостью 500 мл. К фильтрату приливали 150 мл 1 М раствора натрия гидроксида и оставляли при комнатной температуре в течение суток, для осуществления щелочного гидролиза. Затем содержимое колбы количественно переносили в делительную воронку емкостью 500 мл, приливали 150 мл этилацетата и встряхивали в течение 20 мин. По окончании расслаивания этилацетатный слой желтоватой окраски собирали в колбу емкостью 300 мл. Обработку фильтрата этилацетатом осуществляли дважды. Полученное

этилацетатное извлечение упаривали под вакуумом на ротационном испарителе до объема 15 мл.

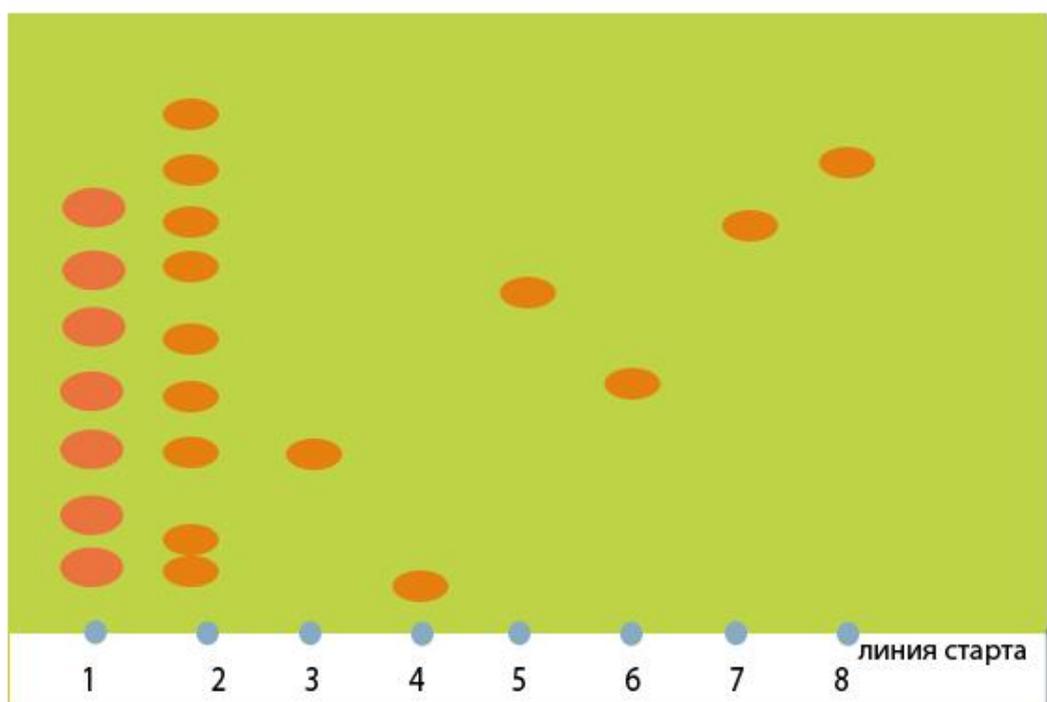
На стартовую линию хроматографической пластинки микрошприцем наносили по 20 мкл полученных этилацетатных извлечений из исследуемого сырья и осуществляли хроматографирование восходящим способом в системе растворителей толуол – метиловый спирт – кислота уксусная ледяная (90 : 16 : 4), показавшей лучшее разделение компонентов фракции фенолкарбоновых кислот в предыдущих исследованиях плодов семейства Rosaceae. [5, 6]

После прохождения фронтом растворителей 10-12 см, хроматографическую пластинку извлекали из камеры, просушивали на воздухе в течение 5-7 мин. и обрабатывали раствором железа хлорида с последующим нагреванием в сушильном шкафу при 105°C в течение 5 минут.

На хроматограммах извлечений из свежих и замороженных образцов наблюдалось 7 зон адсорбции. Со стандартными образцами идентифицированы галловая кислота ( $R_f$  около 0,37), кофейная кислота ( $R_f$  около 0,33).

Анализ качественного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в плодах и листьях яблони лесной проводили методом ТСХ проводили так же в системе растворителей н-бутанол – уксусная кислота – вода (40: 12 : 28 ). Хроматограммы просматривали и УФ-свете. На хроматограмме извлечений из листьев яблони лесной были обнаружены 9 зон с значением  $R_f$  0,34; 0,36 ; 0,47 ;0, 51; 0,57; 0,61; 0,68 ; на хроматограмме извлечений из плодов яблони лесной выявлены 7 зон. Общий вид хроматограммы приведен на рисунке 18.

Рисунок.18 Схема хроматограммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот извлечений из листьев, плодов яблони лесной



- 1- Извлечение из плодов яблони лесной высушенных;
- 2- Извлечение из листьев яблони лесной высушенных;
- 3- PCO кислота галловая
- 4- PCO кислоты кофейная
- 5- PCO рутин
- 6- PCO катехин
- 7- PCO кверцетин
- 8- PCO лютеолин

Таблица 12. Результаты исследования флавоноидов и фенолкарбоновых кислот извлечений из листьев и плодов яблони лесной, а также НМГ и сухих экстрактов из исследуемого сырья методом ТСХ в системе *n*-бутанол: уксусная кислота: вода (40:12:28)

Исследуемый образец	Rf пятен	Идентифицировано	Неидентифицировано
---------------------	----------	------------------	--------------------

Извлечение из плодов яблони лесной	0,34 0,37 0,45 0,49 0,57 0,61 0,68	Кофейная; Галловая; Катехин; рутин	Вещество с Rf=0,37 Вещество с Rf= 0,68 Вещество с Rf=0,61
Извлечение из листьев яблони лесной	0,34 0,36 0,45 0,49 0,57 0,62 0,65 0,70 0,78	Кофейная кислота; Галловая кислота; Катехин; Рутин; Кверцитин; лютеолин	Вещество с Rf=0,36 Вещество с Rf=0,62
НМГ плодов яблони лесной	0,34 0,37 0,45 0,49 0,57 0,61 0,68	Кофейная; Галловая; Катехин; рутин	Вещество с Rf=0,37 Вещество с Rf= 0,68 Вещество с Rf=0,61
НМГ листьев яблони лесной	0,34 0,36 0,45 0,49 0,57 0,62 0,65 0,70 0,79	Кофейная кислота; Галловая кислота; Катехин; Рутин; Кверцитин; лютеолин	Вещество с Rf=0,36 Вещество с Rf=0,62
Сухой экстракт плодов яблони лесной	0,34 0,37 0,45 0,49 0,57 0,61 0,68	Кофейная; Галловая; Катехин; рутин	Вещество с Rf=0,37 Вещество с Rf= 0,68 Вещество с Rf=0,61
Сухой экстракт листьев яблони лесной	0,34 0,36 0,45 0,49 0,57 0,62 0,65 0,70 0,79	Кофейная кислота; Галловая кислота; Катехин; Рутин; Кверцитин; лютеолин	Вещество с Rf=0,36 Вещество с Rf=0,62
ГСО рутина (ФС 42-2508-87)	0,49	—	—

СО катехина (№CAS 154-23-4)	0,63	–	–
СО галловой кислоты (№ CAS 59-95-86- 8)	0,33	–	–
PCO кофейной кислоты	0,45	–	–
СО кверцетин ( № CAS 6151-25- 3)	0,65	–	–
СО лютеолина (№ CAS 491-70-3)	0,70	–	–

Отличий в количестве зон на хроматограммах свежих, высушенных и замороженных плодов и листьев яблони лесной идентифицировано не было.

Валидацию методики осуществляли по специфичности выбранной хроматографической системы. Определение специфичности методики анализа качественного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот осуществляли по совпадению между собой основных зон адсорбций, по их соответствию предложенной методике в образцах извлечений из исследуемых листьев, плодов яблони лесной.

Приемлемость оценивалась по совпадению зон адсорбций, исследуемых образцов сырья –листья, плоды яблони лесной описанию предложенной методики. Проведенные контрольные эксперименты подтвердили совпадения между собой зон адсорбции исследуемых образцов, а также их соответствие предложенной нами методике.

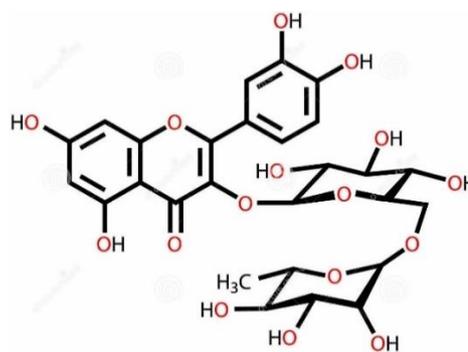
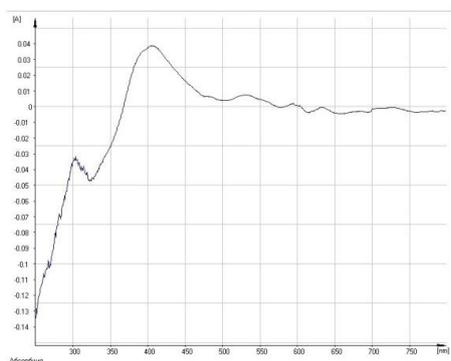
Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин (2-(3,4-дигидроксифенил)- 5,7- дигидро-кси-3-[ $\alpha$ -L-рамнопиранозил- ( 1 $\rightarrow$ 6 ) - $\beta$ -D-глюкопиранозилокси]- 4H-хромен-4-он) рассчитывали спектрофотометрическим методом по известной методике.

Спектрофотометрическое исследование осуществляли на приборе SPECORD 250Analitik Jena AG (производство Германии) в кварцевых кюветах в диапазоне

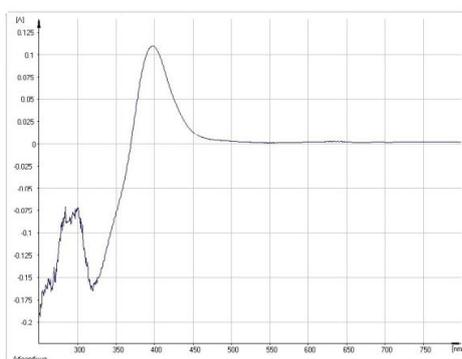
длин волн 240-500 нм. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в соответствии с требованиями методик, представленных в ГФ XIII. Валидация осуществлялась по критериям линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности методики. Пробоподготовка листьев осуществлялась по стандартной методике, широко применяемой при анализе лекарственного растительного сырья, для свежих и замороженных плодов яблони лесной применялось истирание в ступке с стеклянным порошком.

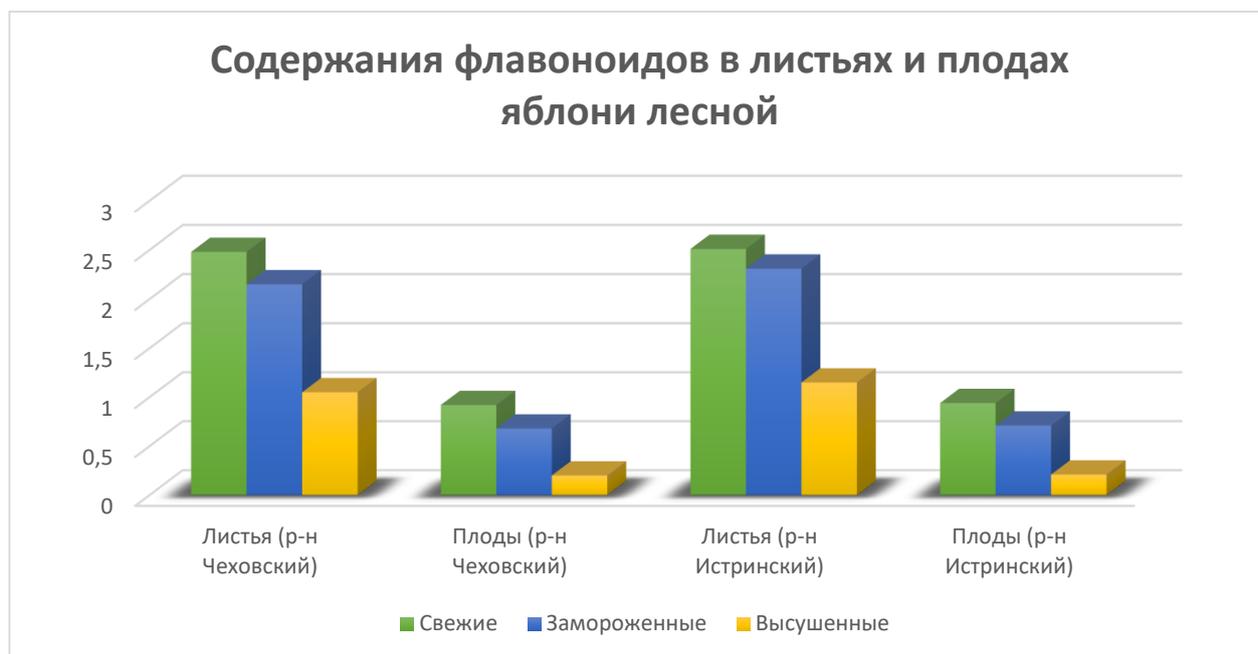
В качестве стандартного образца применяли ГСО Рутин (ФС 42-2508-87). УФ-спектр ГСО рутина в спирте этиловом представлен на рисунке.20

*Рис.19. УФ-спектр исследуемого образца*



*Рис.20. УФ –спектр ГСО Рутин*





*Рис.21. Содержание флавоноидов в листьях и плодах яблони лесной*

Учитывая многочисленные литературные данные, подтверждающие непосредственную связь между содержанием в сырье яблони лесной флавоноидов и фармакологической активностью, а также планируя включить метод количественной оценки суммарного содержания флавоноидов в разрабатываемую нормативную документацию на листья, плоды яблони лесной, осуществили валидацию предлагаемой методики. Линейность методики проверяли на пяти отобранных экспериментальных точках (значениях концентрации). Анализируемые растворы получали увеличением аликвотной доли, составившей 0,75; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 мл соответственно. На графике представлена зависимость величины оптической плотности от взятых аликвот на анализ и от содержания флавоноидов в сырье соответственно. Как видно, из данных графика, значение коэффициента корреляции, который представляет собой критерий приемлемости линейности, составил 0,9867, т.е. демонстрирует значение близкое к 1, что в свою очередь, подтверждает наличие линейной зависимости между значением величины оптической плотности исследуемых образцов и действующих веществ.

*Таблица 13. Результаты подтверждения линейности методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов.*

Номер образца	Аликвотная доля, мл	Оптическая плотность, А
1	0,75	0,1178
2	1,00	0,2073
3	2,00	0,3938
4	2,50	0,4975
5	3,00	0,6015

Рис.22 Результат проверки линейности методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин

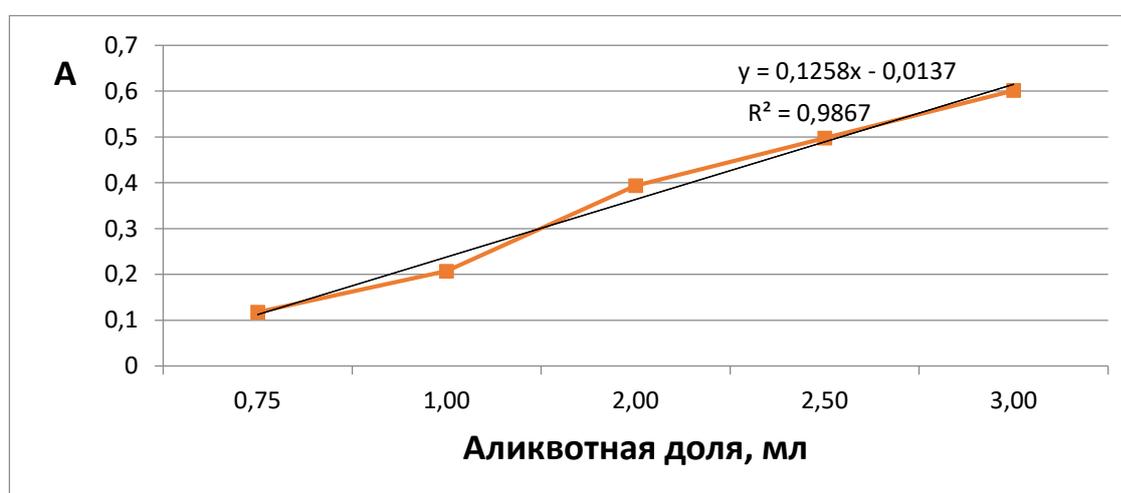


Таблица 14. Результаты оценки воспроизводимости методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях яблони лесной		
	Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	2.513	2.476	2,537
2	2.499	2.489	2,549
3	2.518	2,478	2.534
Хср	2.510	2.481	2.540
RSD, %	0,32	0.63	0.45

Таблица 15. Результаты оценки повторяемости методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов

Номер образца			1	2	3	4	5	6
Содержание флавоноидов, %			2,499	2,510	2,446	2,524	2,484	2,546
$f$	$X_{cp}$	$S^2$	S	$\Delta X$	$\Delta X_{cp}$	t (99%)	$\epsilon$ , %	RSD,%
5	2,501	0.00119	0.0345	0.039	0.018	2.03	1.56	0.96

Таблица 16. Результаты определения правильности методики.

Номер образца	Суммарное содержание флавоноидов в пробе, г	Добавлено СО рутина, г	Ожидаемое содержание,г	Полученное содержание,г	Открываемость,%
1	0,0250	0,01	0,035	0,0326	93,14
2	0,0250	0,02	0,045	0,0467	103,77
3	0,0250	0,03	0,055	0,0539	98,00
4	0,0248	0,01	0,0348	0,0336	96,55
5	0,0248	0,02	0,0448	0,0451	100,66
6	0,0248	0,03	0,0548	0,0554	101,09
7	0,0256	0,01	0,0356	0,0348	97,75
8	0,0256	0,02	0,0456	0,0459	100,65
9	0,0256	0,03	0,0556	0,0562	101,07
RSD, % = 2,183					

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

Воспроизводимость методики проверяли два аналитика на трех исследуемых образцах в трех повторностях.

Правильность методики оценивали методом добавок путем добавления СО рутина в точно известном количестве к исследуемым экспериментальным образцам с использованием девяти определений при трех значениях содержания флавоноидов в исследуемом образце. Как следует из данных таблицы относительное стандартное отклонение не превышает 5%, что подтверждает отсутствие систематической ошибки.

Предварительный качественный анализ гидроксикоричных кислот проводили с использованием бумажной хроматографии на хроматографической бумаге марки «Filtrak» FN 2 в системе растворителей н-бутанол – кислота уксусная – вода (4:1:2) После высушивания хроматограмму просматривали в видимом и ультрафиолетовом свете. Доминирующие зоны адсорбции соответствовали кофейной и хлорогеновой кислотам, демонстрирующим в ультрафиолетовом свете голубую флуоресценцию. После обработки хроматограмм с исследуемыми образцами извлечений из плодов и листьев яблони раствором 1% железа хлорида (III) в метаноле зона кофейной кислоты приобретает серо-зеленую, а хлорогеновой – зеленую окраску.

Идентификацию гидроксикоричных кислот и флавоноидов в плодах и листьях яблони лесной осуществляли также методом ВЭЖХ. Хроматографический анализ этанольного извлечения из листьев и плодов яблони лесной, заготовленных в различные фазы вегетации, показал идентичность биологически активных веществ, состав которых представлен в таблице 20 и на рисунке 23.

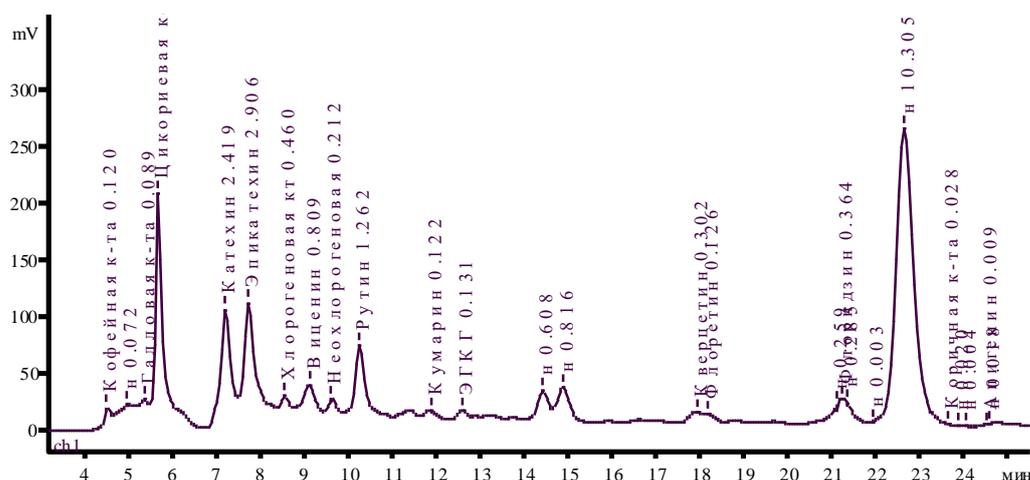


Рис.23 – Хроматограмма спиртового извлечения из листьев яблони лесной методом ВЭЖХ при 280 нм (70% спирт этиловый)

Таблица 17. Результаты исследования фенольных соединений в сухом и свежем сырье – листья яблони лесной, методом ВЭЖХ.

№	Время, мин	Площадь	Площадь	Название
1	4.464	86.71	0.12	Кофейная к-та
2	4.945	52.11	0.07	Неидентифицирован
3	5.317	64.34	0.09	Галловая к-та
4	5.624	2088.28	2.90	Цикориевая к-та
5	7.161	1741.89	2.42	Катехин
6	7.695	2093.01	2.91	Эпикатехин
7	8.507	331.60	0.46	Хлорогеновая к-та
8	9.063	582.90	0.81	Виценин
9	9.594	152.45	0.21	Неохлорогеновая к-та
10	10.22	908.78	1.26	Рутин
11	11.84	87.84	0.12	Кумарин
12	12.56	94.00	0.13	ЭГКГ
13	14.4	438.15	0.61	Неидентифицирован
14	14.86	588.03	0.82	Неидентифицирован
15	17.9	217.32	0.30	Кверцетин
16	18.14	90.67	0.13	Флоретин
17	21.1	186.74	0.26	Неидентифицирован

18	21.22	262.50	0.36	Флоридзин
19	21.32	205.58	0.29	Неидентифицирован
20	21.95	2.27	0.00	Неидентифицирован
21	22.63	7422.06	10.31	Неидентифициров
22	23.65	19.94	0.03	Коричная к-та
23	23.86	14.28	0.02	Неидентифицирован
24	24.07	2.96	0.00	Неидентифицирован
25	24.49	6.54	0.01	Апигенин
26	24.58	12.90	0.02	Неидентифицирован
27	27.67	0.00	0.00	Неидентифицирован
28	28.74	25.73	0.04	Неидентифицирован
29	37.49	54243.52	75.31	Неидентифицирован

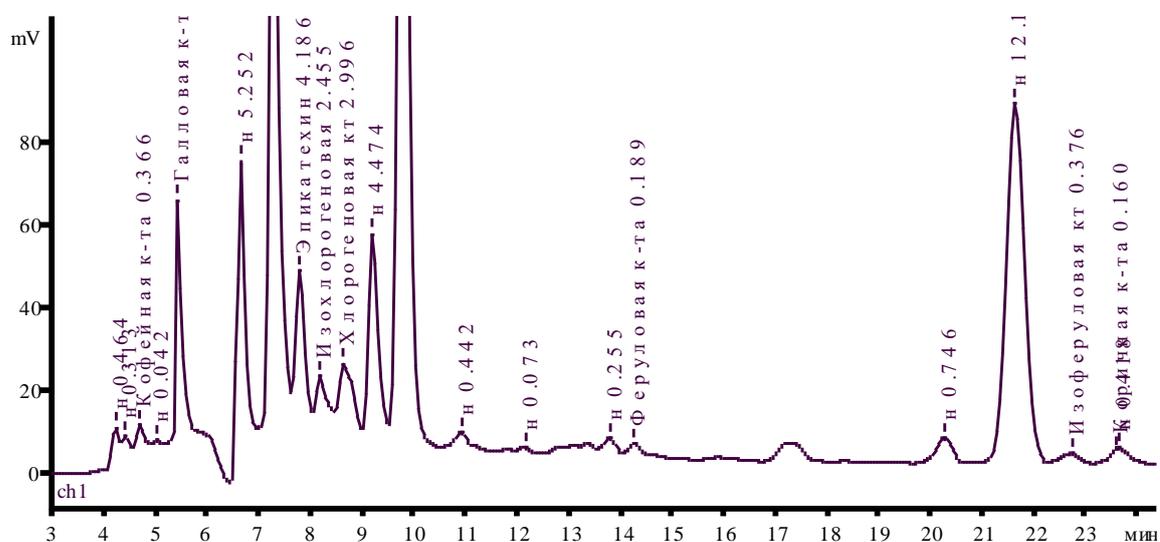


Рис.24 – Хроматограмма спиртового извлечения из плодов яблони лесной методом ВЭЖХ при 280 нм (70% спирт этиловый)

Таблица 18. Результаты определения состава фенольных соединений в сухом и свежем сырье – плоды яблони лесной, методом ВЭЖХ.

№	Время, мин	Площадь	Площадь	Название
1	4.187	82.45	0.46	Неидентифициров
2	4.367	55.71	0.31	Неидентифициров

3	4.653	65.09	0.37	Кофейная к-та
4	5.001	7.52	0.04	Неидентифициров
5	5.395	776.26	4.37	Галловая к-та
6	6.634	933.63	5.25	Неидентифициров
7	7.242	2578.03	14.50	Катехин
8	7.761	744.15	4.19	Эпикатехин
9	8.148	436.42	2.46	Изохлорогеновая
10	8.605	532.55	3.00	Хлорогеновая кт
11	9.17	795.28	4.47	Неидентифициров
12	9.758	3777.24	21.25	Неидентифициров
13	10.88	78.62	0.44	Неохлорогеновая
14	12.13	13.06	0.07	Рутин
15	13.76	45.31	0.25	Неидентифициров
16	14.25	33.59	0.19	Феруловая к-та
17	20.23	132.62	0.75	Флоретин
18	21.61	2156.73	12.13	Флоридзин
19	22.73	66.91	0.38	Изоферуловая кт
20	23.54	28.50	0.16	Коричная к-та
21	23.62	74.36	0.42	Неидентифициров
22	32.49	1.57	0.01	Неидентифициров
23	32.6	6.23	0.04	Неи дентифициров
24	33.54	8.96	0.05	Кемпферол
25	34.17	4.88	0.03	Неидентифициров
26	34.22	3.16	0.02	Неидентифициров
27	34.29	6.90	0.04	Неидентифициров
28	36.04	2260.30	12.72	Неидентифициров
29	36.08	2037.02	11.46	Неидентифициров
30	37.62	13.28	0.07	Неидентифициров
31	44.81	14.91	0.08	Неидентифициров
32	46.71	0.58	0.00	Неидентифициров
33	46.89	4.44	0.02	Неидентифициров

Рис.25. Схема содержания веществ фенольной природы в листьях, плодах яблони лесной.



Таблица 19. Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в листьях яблони в пересчете на кислоту кофейную в период цветения

№ образца	Исследуемый объект	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	Листья яблони лесной, заготовленные в Истринском районе московской области	1,881±0,96
2	Листья яблони лесной, заготовленные в Чеховском районе московской области	2,340±0,74
3	Листья яблони домашней сорта Антоновка	1,794±0,92
4	Листья яблони домашней сорта Ренет Семиренко	1,657±0,72

Статистическая обработка данных шести параллельных измерений показала, что количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной в пересчете на кислоту кофейную составило от 1,9644 до 2,7480 в период плодоношения. Ошибка единичного измерения составила 0,91%. (таблицы 2-4)

*Таблица 20. Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в листьях яблони в пересчете на кислоту кофейную в период плодоношения*

№ образца	Исследуемый объект	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	Листья яблони лесной, заготовленные в Истринском районе Московской области	1,9644±0,91
2	Листья яблони лесной, заготовленные в Чеховском районе Московской области	2,7480±0,75
3	Листья яблони домашней сорта Антоновка	1,8706±0,84
4	Листья яблони домашней сорта Ренет Семиренко	1, 8076±0,73

*Таблица 21. Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот в листьях яблони в пересчёте на кислоту кофейную в осенний период опадания и сбора плодов (в случае яблони домашней)*

№ образца	Исследуемый объект	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, %
1	Листья яблони лесной, заготовленные в Истринском районе Московской области	1,3182±0,95
2	Листья яблони лесной, заготовленные в Чеховском районе Московской области	1,4050±0,81
3	Листья яблони домашней сорта Антоновка	1,2430±0,97
4	Листья яблони домашней сорта Ренет Семиренко	1,1250±0,79

Таблица 22. Результаты определения метрологически характеристики методики количественного определения гидроксикоричных кислот в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной

n	f	$X_{\text{ср}}$	$S^2$	$S_x$	P, %	t (P, f)	$\Delta X_{\text{ср}}$	$\varepsilon_{\text{ср}}$ , %
Листья яблони лесной (Истринский район), собранные в фазу цветения								
5	4	1,881	0,0002115	0,00145	95	2,78	0,01808	0,96
Листья яблони лесной (Истринский район), собранные в фазу плодоношения								
5	4	1,9644	0,0002072	0,0144	95	2,78	0,017896	0,91
Листья яблони лесной (Истринский район), собранные в фазу опадания плодов								
5	4	1,6182	0,0001535	0,01238	95	2,78	0,015400	0,95

Статистическая обработка данных пяти параллельных измерений показала, что количественное содержание гидроксикоричных кислот в листьях яблони лесной в пересчете на кофейную кислоту в период цветения составило –  $1,881 \pm 0,96$  (Истринский район),  $2,340 \pm 0,74$  (Чеховский район), в период плодоношения –  $1,9644 \pm 0,91$  (Истринский район),  $2,7480 \pm 0,75$  (Чеховский район), и период опадания плодов –  $1,3182 \pm 0,95$  (Истринский район),  $1,4050 \pm 0,81$  (Чеховский район), для листьев яблони сортов Антоновка обыкновенна и Ренет Семиренко колебалось содержание от  $1,8706 \pm 0,84$  до  $1,1250 \pm 0,79$ .

#### 4.4. Идентификация и количественная оценка органических кислот листьев, плодов яблони лесной

Как известно, в живом организме карбоновые кислоты являются активными участниками цикла Кребса. В экспериментах было установлено, что введение некоторых С4-дикарбоновых кислот способствует возрастанию потребления кислорода в тканях в значительно больших объемах, чем необходимо для осуществления процесса их собственного окисления, что подтверждает участие карбоновых кислот в каталитическом возрастании потребления кислорода тканями организма. [Страйер Л. Биохимия. М.1994] Учитывая важность содержащихся в растительном сырье карбоновых кислот, участников цикла

Кребса, стимулирующих в организме обменные процессы, был проведен ряд исследований пищевого сырья, в том числе яблок различных сортов и плодового пюре, получаемого из смеси помологических сортов, в ходе которых было установлено наличие во всех исследуемых объектах винной, лимонной, молочной, фумаровой, щавелевой, яблочной и янтарной кислот [115] Однако, нами не обнаружены данные литературы, посвященные анализу карбоновых кислот в плодах и листьях яблони лесной.

Предварительный анализ состава органических кислот осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10x15см) в системах растворителей наиболее часто применяемых для анализа органических кислот:

\* этиловый спирт 95% - концентрированный р-р аммиака (16:4,5);

\* н-бутанол-кислота муравьиная-вода (5:0, 5:2)

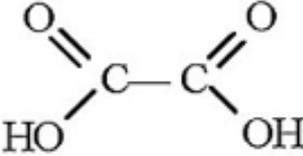
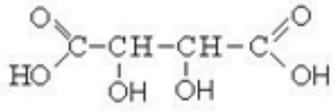
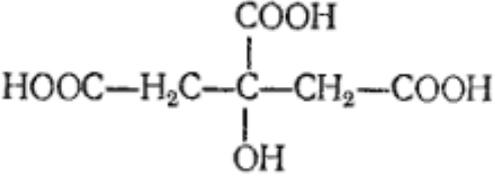
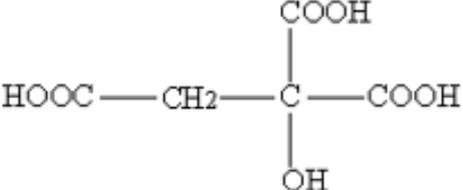
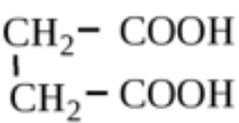
\* этилацетат- муравьиная кислота- вода (3:1:1);

\* этилацетат-кислота уксусная-кислота муравьиная –вода (100:11:11:25) [118]

Лучшее разделение и качество разделяемых зон было достигнуто при использовании хроматографической системы этилацетат-кислота уксусная-кислота муравьиная –вода (100:11:11:25), что обусловило наш дальнейший выбор для исследования органических кислот в извлечениях из листьев и плодов яблони лесной.

Насыщение хроматографической камеры парами подвижной фазы осуществляли в течение получаса. Обнаружение зон адсорбции исследуемых веществ осуществляли, используя раствор бромкрезолового зеленого 0,2% с последующим прогреванием пластинок в сушильном шкафу в изотермическом режиме. Органические кислоты детектировались на хроматограммах как желтые пятна на синем фоне. Хроматографические параметры органических кислот, используемых в качестве стандартов представлены в таблице 23.

Таблица 23. Хроматографические параметры органических кислот стандартов

Название кислоты	Формула	Значение Rf	Квалификация стандарта
Кислота щавелевая <i>этандиовая кислота</i>		0,14	ГОСТ 22180-76 Реактивы. Кислота щавелевая
Кислота винная 2,3- <i>дигидроксибутандио- вая кислота</i>		0,35	ГОСТ 5817-77 Реактивы. Кислота винная
Кислота лимонная 2-гидрокси-1,2,3- <i>пропантрикарбоновая кислота</i>		0,39	ГОСТ 908-2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая
Кислота яблочная 2-гидроксибутандио- <i>вая кислота</i>		0,80	ГОСТ 32748- 2014 Добавки пищевые. Кислота яблочная Е 296
Кислота янтарная <i>бутандиовая кислота</i>		0,91	ГОСТ 6341-75 Реактивы. Кислота янтарная

Результаты хроматографического разделения органических кислот в исследуемом сырье представлены на рисунке и в таблице 24.

Таблица 24. Результаты хроматографического анализ органических кислот в исследованном сырье

Исследуемое сырье	Значения Rf	Идентифицированные органические кислоты
Листья яблони лесной свежие	0,13	Щавелевая
	0,36	Винная
	0,40	Лимонная
	0,78	Яблочная
	0,92	Янтарная
Листья яблони лесной замороженные	0,14	Щавелевая
	0,36	Винная
	0,41	Лимонная
	0,79	Яблочная
	0,90	Янтарная
Листья яблони лесной высушенные	0,15	Щавелевая
	0,35	Винная
	0,40	Лимонная
	0,79	Яблочная
	0,92	Янтарная
Плоды яблони лесной свежие	0,14	Щавелевая
	0,36	Винная
	0,43	Лимонная
	0,77	Яблочная
	0,91	Янтарная
Плоды яблони лесной замороженные	0,13	Щавелевая
	0,35	Винная
	0,42	Лимонная
	0,79	Яблочная
	0,93	Янтарная
Плоды яблони лесной высушенные	0,14	Щавелевая
	0,35	Винная
	0,40	Лимонная
	0,78	Яблочная
	0,90	Янтарная

Анализ качественного состава и количественного содержания карбоновых кислот в образцах исследуемого сырья осуществляли по методике Кузьменко А.Н. [51] методом ионо-эксклюзионной хроматографии. Для осуществления качественной идентификации хроматограмм отдельные пики обнаруживаемых карбоновых кислот идентифицировали методом добавок с применением стандартных растворов.

По данным хроматографического анализа установлено, что плоды и листья яблони лесной содержат тот же набор карбоновых кислот, который был установлен ранее для сортовых плодов яблони домашней [75]. Общий вид хроматограммы для извлечений из свежих плодов и листьев яблони представлен на рисунке. Качественный и количественный состав органических кислот в водных извлечениях из плодов и листьев яблони лесной представлен в таблице 25.

*Таблица 25. Содержание органических кислот в плодах, листьях яблони лесной, мг/100 г*

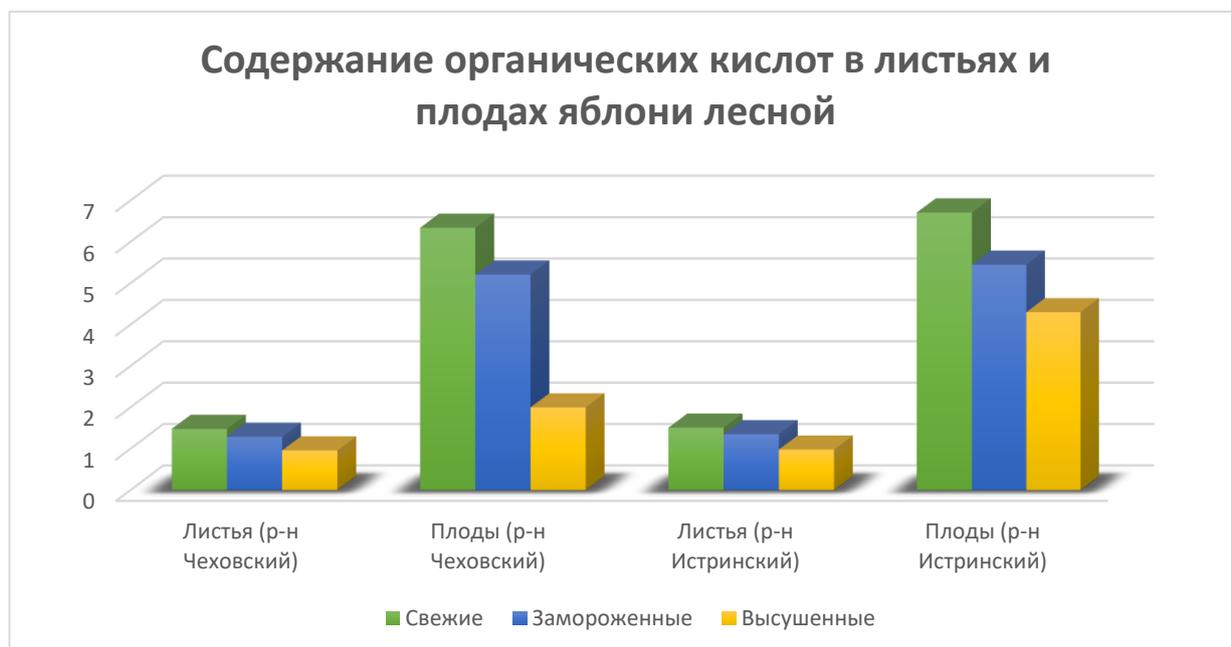
<b>Наименование кислоты</b>	<b>Плоды свежие</b>	<b>Плоды Заморо- женные</b>	<b>Плоды Высушен- ные</b>	<b>Листь я свежие</b>	<b>Листья заморожен- ные</b>	<b>Листья высушен- ные</b>
Винная	7.5	7.3	Следы	7.8	7.5	Следы
Лимонная	180,0	173,5	134,5	196,0	194	145
Молочная	Следы	Следы	Следы	Следы	Следы	Следы
Фумаровая	5	5	следы	5	5	следы
Щавелевая	Менее 5	Менее 5	Следы	Менее 5	Менее 5	Следы
Яблочная	1169,0	1065,5	706,0	1345	1280	987
Янтарная	Менее 5	Следы	Следы	Менее 5	Следы	Следы

Как видно из данных таблицы, преобладающей кислотой во всех образцах является яблочная, содержание которой составило от 1169,0 мг/100 г до 706,0 мг/100 г.

Учитывая простоту, доступность и удобство титриметрических методов анализа мы сочли целесообразным так же провести определение суммарного содержания свободных органических кислот по методике «Определение содержания свободных органических кислот» (ГФ Х1., ст.38 Fructus Rosae) в пересчете на яблочную кислоту. Результаты анализа и метрологические характеристики представлены в таблице 26.

*Таблица 26. Результаты количественной оценки содержания свободных органических кислот методом кислотно-основного титрования в плодах и листьях яблони лесной различных методов консервации*

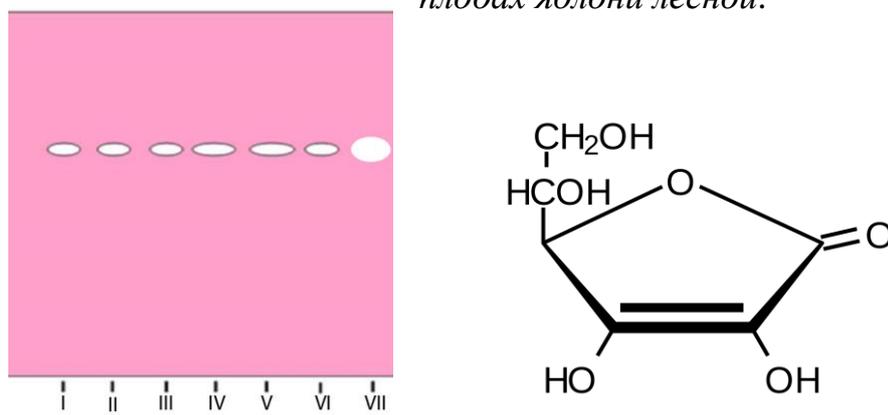
Вид сырья		X, %	P, %	t (P, f)	S	Sx	$\Delta X$	E, %
Листья (Истринский район)	Свежие	1,57	95	2.78	0.0004	0.020	0.0240	1.58
	Замороженные	1,35	95	2.78	0.00065	0.025	0.0316	2.34
	Высушенные	0,98	95	2.78	0.00075	0.0274	0.034	3.47
Листья (Чеховский район)	Свежие	1,48	95	2.78	0.0004	0.0200	0.0240	2.08
	Замороженные	1,29	95	2.78	0.00035	0.0187	0.0232	1.79
	Высушенные	0,96	95	2.78	0.00035	0.0187	0.0232	2.42
Плоды (Чеховский район)	Свежие	6,71	95	2.78	0.0004	0.0200	0.0248	0.37
	Замороженные	5,45	95	2.78	0.00025	0.0158	0.0197	0.36
	Высушенный	4,30	95	2.78	0.00060	0.0244	0.0305	0.71
Плоды (Истринский район)	Свежие	6,34	95	2.78	0.00035	0.0187	0.0232	0.37
	Замороженные	5,21	95	2.78	0.00080	0.0280	0.0350	0.67
	Высушенные	4,15	95	2.78	0.00085	0.0292	0.0362	0.87



*Рис.26. Содержание органических кислот в листьях и плодах яблони лесной*

Согласно литературным данным в составе изучаемых видов лекарственного сырья содержится достаточное количество аскорбиновой кислоты, обуславливающей ценность плодов, листьев яблони лесной, как источника витамина С. Для обнаружения у-лактона-2,3-дегидро-L-гулоновой (аскорбиновой) кислоты использовали наиболее чувствительную систему растворителей: этилацетат – ледяная уксусная кислота (80:20). Детектирование проводили после опрыскивания пластинок раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Аскорбиновая кислота обнаруживалась в виде бесцветных пятен на розовом фоне с значением Rf около 0,62 на уровне пятна свидетеля аскорбиновой кислоты (ГОСТ 4815-76 Кислота аскорбиновая пищевая, квалификация ЧДА) (рис.27). Зоны адсорбции аскорбиновой кислоты присутствовали в извлечениях всех объектов исследования, однако в свежих и замороженных листьях и плодах проявлялись значительно интенсивнее.

Рис.27. Схема хроматограммы аскорбиновой кислоты в исследуемых листьях и плодах яблони лесной:



*Водные извлечения:*

1. Свежих плодов яблони лесной
2. Заморож. плодов яблони лесной
3. Высушенных плодов яблони лесной
4. Свежих листьев яблони лесной
5. Заморож. листьев яблони лесной
6. Высушенных листьев яблони лесной
7. Стандартный образец кислоты аскорбиновой ( $R_f=0,63$ )

Количественное определение аскорбиновой кислоты в исследуемом сырье осуществляли по методике ГФ XI, «Плоды шиповника». Результаты анализа представлены в таблице 27.

Таблица 27. Результаты определения содержания аскорбиновой кислоты в исследуемых

Вид сырья		X, %	P, %	t (P, f)	S	Sx	$\Delta X$	E, %
Листья (Чеховский)	Свежие	0,112	95	2,78	0,0000475	0,006892	0,00856	7.6
	Замороженные	0,097	95	2,78	0,0000082	0,002863	0,00356	3.7

район)	Высушенные	0,064	95	2,78	0,0000145	0,003800	0,004734	7.4
Листья (Истринский район)	Свежие	0,119	95	2,78	0,0000062	0,002490	0,003090	2,6
	Замороженные	0,101	95	2,78	0,0000165	0,004100	0,005097	5.1
	Высушенные	0,068	95	2,78	0,0000155	0,003937	0,00480	7.2
Плоды (Чеховский район)	Свежие	0,301	95	2,78	0,000014	0,00374	0,00465	1,5
	Замороженные	0,292	95	2,78	0,0000055	0,002345	0,00293	1,1
	Высушенный	0,115	95	2,78	0,0000085	0,002910	0,0036	3.2
Плоды (Истринский район)	Свежие	0,315	95	2,78	0,0000086	0,002915	0,00362	1.2
	Замороженные	0,299	95	2,78	0,0000055	0,002345	0,00293	1,0
	Высушенные	0,109	95	2,78	0,0000063	0,00249	0,00309	2.8

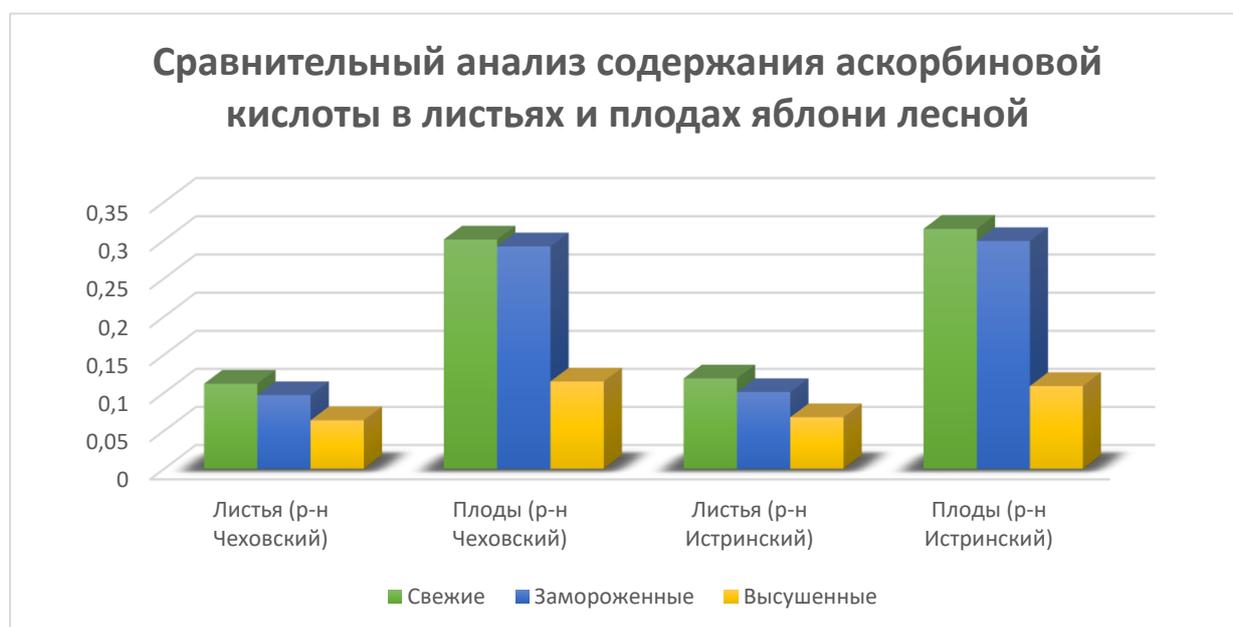


Рис 28. Сравнительный анализ содержания аскорбиновой кислоты в листьях и плодах яблони лесной

#### 4.5. Результаты аминокислотного анализа листьев, плодов яблони лесной

Анализ литературных данных свидетельствует о неуклонном росте интереса исследователей к оценке содержания свободных и связанных аминокислот в пищевом и лекарственном растительном сырье, причем научный поиск направлен, как на исследования влияния растительных аминокислот на

биохимические процессы организма человека, так и на изучение влияния различных внешних факторов на накопления аминокислот в растительном организме [119] При этом, до сих пор лекарственное растительное сырье в официальной медицине не рассматривается как полноценный источник легкоусваиваемых форм аминокислот, что, во многом, связано с недостаточной изученностью аминокислотного состава растительных объектов, в том числе яблоны лесной. Нами исследовался аминокислотный состав плодов и листьев яблоны лесной после пробоподготовки, опробованной нами ранее при исследовании жомов плодов яблоны домашней поздних сроков созревания [67,69]. Результаты анализа исследуемого сырья представлены в таблице 28.

Как видно из данных таблицы, аминокислотный состав исследуемых объектов до и после гидролиза не изменяется и представлен 18 аминокислотами, причем соотношение индивидуальных аминокислот в образцах соответствует соотношению, определенному ранее для сортовой образцова яблоны домашней плодов, высушенных [67].

*Таблица 28. Аминокислотный состав плодов и листьев яблоны*

Количественное содержание аминокислот, %	Выявлено при аминокислотном анализе					
	Плодов яблоны лесной		Листьев яблоны лесной		Яблони домашней сорта Пепин Шафранный плодов [ 67 ]	
	До гидролиза	После гидролиза	До гидролиза	После гидролиза	До гидролиза	После гидролиза
Asp (D)	0,18	0,31	0,23	0,36	0,20	0,31
Thr (T)	0,05	0,07	0,06	0,09	0,09	0,12
Ser (S)	0,07	0,11	0,06	0,10	0,08	0,15
Glu (E)	0,26	0,34	0,29	0,35	0,28	0,35
Pro (P)	0,11	0,15	0,13	0,17	0,14	0,18

Gly (G)	0,07	0,09	0,05	0,07	0,05	0,08
Ala (A)	0,09	0,14	0,12	0,16	0,06	0,10
Cys (C)	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Val (Val)	0,02	0,04	0,01	0,03	0,02	0,03
Met (M)	0,06	0,08	0,04	0,05	0,06	0,08
Ile (I)	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Leu (L)	0,034	0,038	0,036	0,041	0,031	0,034
Tyr (Y)	0,012	0,017	0,013	0,019	0,011	0,011
Phe (F)	0,02	0,08	0,03	0,06	0,04	0,08
Lys (K)	0,028	0,036	0,026	0,038	0,022	0,031
His (H)	0,006	0,008	0,006	0,012	0,004	0,008
Trp (W)	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Arg (R)	0,080	0,120	0,060	0,110	0,101	0,130

Как видно из данных таблицы, аминокислотный состав исследуемых объектов до и после гидролиза не изменяется и представлен 18 аминокислотами, включая аспарагиновую кислоту, треонин, серин, глутаминовую кислоту, пролин, глицин, аланин, цистеин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, триптофан, аргинин, среди которых доминантными являются до и после гидролиза в плодах – глутаминовая и аспарагиновая кислоты, до и после гидролиза в листьях – аспарагиновая, глутаминовая кислоты, аланин и пролин, в следовых количества для всех видов сырья наблюдается триптофан, изолейцин, цистеин, причем соотношение индивидуальных аминокислот в образцах соответствует соотношению, определенному ранее для сортовой образцов яблони домашней поздних сроков созревания.

#### **4.6. Результаты оценки содержания полисахаридов, включая пектиновую фракцию**

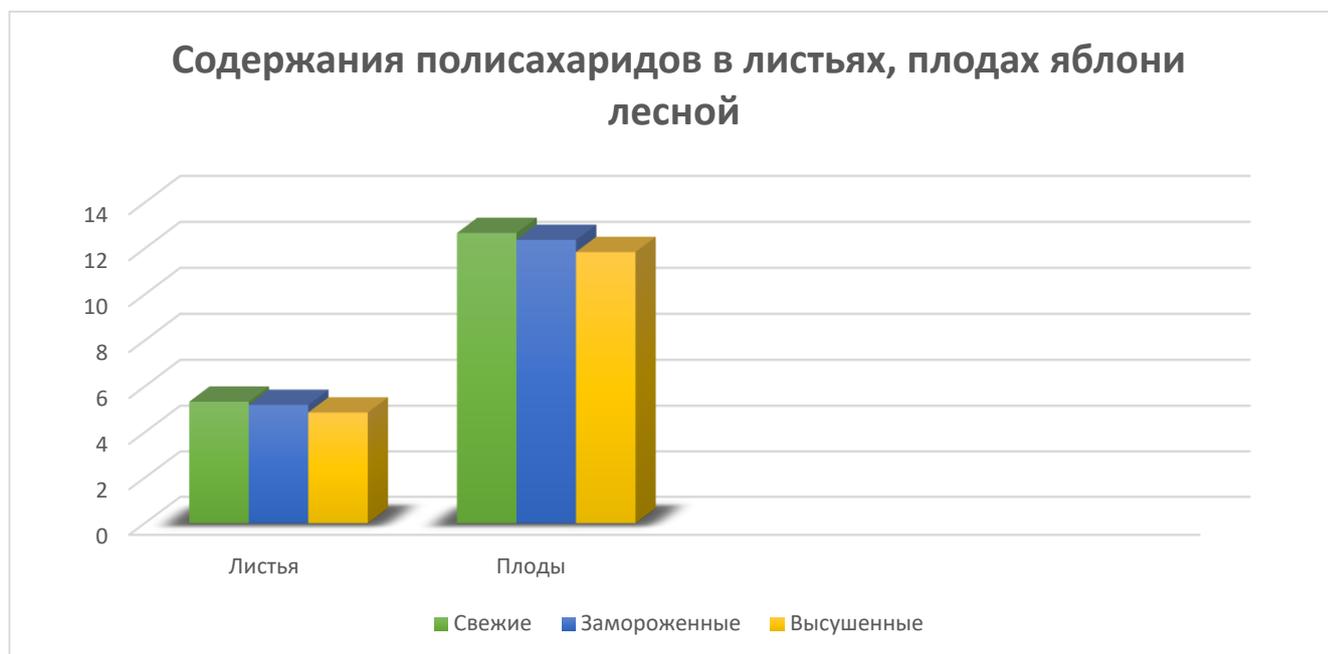
Как известно, плоды яблони домашней являются одним из промышленных источников получения пищевого пектина, который выделяют из жома плодов после предварительного механического выжимания из сырья яблочного сока.

Основной массив научной литературы, охватывающий проблему содержания в яблоне полисахаридного комплекса, посвящен анализу плодов яблони домашней. [24,49,61] Мы сочли целесообразным провести оценку общего содержания полисахаридов в плодах и листьях яблони лесной, а также определить выход пектиновых веществ.

Количественное определение суммарного содержания полисахаридов в сырье определяли в соответствии с требованиями ГФ XIII (ФС.2.5.0032.15). Результаты гравиметрического определения полисахаридов представлены в таблице 29.

*Таблица 29. Результаты определения содержания полисахаридов в листьях и плодах яблони лесной.*

<b>Исследуемое сырье</b>		<b>X,%</b>	<b>P,%</b>	<b>t(P,f)</b>	<b>S<sup>2</sup></b>	<b>S</b>	<b>X</b>	<b>E,%</b>
Листья	Свежие	5,34	95	2,78	0,00515	0,07176	0,0892	1,67
	Замороженные	5,20	95	2,78	0,00755	0,08689	0,1080	2,08
	Высушенные	4,87	95	2,78	0,00425	0,06250	0,0812	1,66
Плоды	Свежие	12,68	95	2,78	0,01520	0,12328	0,0189	1,49
	Замороженные	12,38	95	2,78	0,04010	0,20025	0,2489	2,01
	Высушенные	11,85	95	2,78	0,01825	0,1351	0,168	1,43



*Рис.29. Содержание полисахаридов в листьях, плодах яблони лесной*

Анализ данных, приведенных в таблице показывает наличие процессов, способствующих снижению суммарного содержания полисахаридов в исследуемом сырье как при его высушивании, так и при замораживании, однако, потери данной группы веществ не являются критическими.

Количественное определение пектиновых веществ проводили гравиметрическим методом, осуществляя пробоподготовку, включающую дробное экстрагирование водой (1:50) в трижды в течение получаса на кипящей водяной бане. Собранные водные извлечения объединяли, с последующей фильтрацией через бумажный фильтр, упаривали на роторном испарителе до половины исходного объема, после чего проводили осаждение фракции водорастворимых пектинов двухкратным объемом 96% этилового спирта. Полученный осадок отделяли центрифугированием с частотой вращения 5000 об/мин. в течение 10 минут, после чего последовательно промывали диметилкетон и этиловым эфиром кислоты этановой, просушивали и взвешивали. Оставшийся после выделения водорастворимой фракции остаток заливали 1% водным раствором хлороводорода и проводили гидролиз в течение 3 часов. Полученное извлечение затем снова упаривали до половинного объема,

добавляли 96% этиловый спирт для осаждения пектиновых веществ. Образовавшийся остаток отделяли центрифугированием, осуществляли его очистку последовательным промыванием диметилкетонем и этиловым эфиром кислоты этановой, после чего сушили и взвешивали. Расчет проводили на объединенный остаток пектинов. Суммарное содержание пектинов составило 4,6% для листьев и 8,9% для плодов яблони лесной.

Анализируя полученные результаты, следует отметить незначительное снижение содержания полисахаридов в сырье при высушивании, что не может препятствовать использованию данного сырья в качестве источника полисахаридов, а также позволяет рассматривать все виды плодов яблони лесной в качестве источника получения пектинов, допуская выбор метода консервации для производителя.

#### **4.7. Идентификация и количественная оценка содержания арбутина в исследуемом сырье**

Как известно, официальным растительным сырьем, содержащим арбутин, являются листья *брусники* и листья *толокнянки*, включенные в ГФ XIII. Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idea* L.) и толокнянка обыкновенная (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) представляют собой многолетние кустарнички, для сохранения популяции которых, в соответствии с требованиями «Инструкции по сбору и сушке» повторная заготовка на том же участке допустима через 5-10 лет (для сырья листья брусники) и через 5 лет (для сырья листья толокнянки). При этом, следует отметить, что постановлением Правительства Российской Федерации №168 от 26.02.1996 «Об утверждении Положения о лицензировании отдельных видов деятельности в области охраны окружающей среды» деятельность по сбору и реализации сырья из дикорастущих лекарственных растений передана под лицензирование местным органам, т.е. регулирование заготовительного процесса сырья для общенационального использования передано на рассмотрение местных территориальных органов управления, что часто приводит к хищнической

эксплуатации промышленных зарослей и, как следствие, перебоем в поставке данных видов сырья и истощении ресурсов. Высокая потребность в сырье, содержащем арбутин, обуславливает актуальность поиска альтернативных видов лекарственного растительного сырья, введение которых в официальную практику невозможно без разработки высокочувствительных методов идентификации и количественного определения действующего вещества и последующей разработки современной нормативной документации.

Арбутин, представляющий собой в D –гликопиранозид гидрохинона (рисунок 30)., впервые был выделен Кавалье из листьев толокнянки в 1853 г.

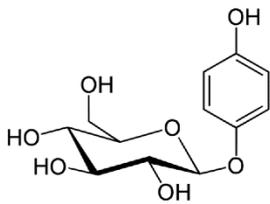


Рис.30 Структура арбутина

Позже он был обнаружен в растениях родов *Calluna*, *Ledum*, *Erigeron*, *Gaultheria*. В «Комментариях к четвёртому изданию Российской Фармакопеи» [42] содержится частная статья «Arbutinum», включающая описание методики извлечения арбутина из растительного сырья, свойства, испытания на подлинность и чистоту вещества, условия хранения и применения. Впервые синтез природного гликозида – арбутина в виде ацетата был осуществлен А. Михаэлем в 1879 г. с использованием ацилированных гликозилгалогенидов. Схема синтеза п-гидроксифенил-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-гликопиранозид (ацетат арбутина) представлена на рисунке 31.



Рис.31 Схема синтеза природного гликозида арбутин в виде ацетата

Однако в чистом виде арбутин в медицинской практике находит ограниченное применение, в основном в косметологии.

Как и другие фенольные гликозиды, арбутин из растительного сырья извлекают этиловым (96, 70 и 40 %) или метиловым спиртом, с последующей очисткой спиртовых извлечений. Выделение индивидуального арбутина осуществляют, как правило, методом адсорбционной хроматографии. Для идентификации арбутина в лекарственном растительном сырье широко применяют метод хроматографии в тонком слое сорбента или на бумаге. При проведении хроматографического анализа в тонком слое сорбента исследователями используются системы растворителей:  $C_4H_9OH-CH_3COOH-H_2O$  (4:1:5) [57],  $n-C_4H_9OH - CH_3COOH - H_2O - C_6H_4(CH_3)_2$  (6:2:3:4),  $CHCl_3- 96\% C_2H_5OH$  (6:4) [52]  $CH_3COOH$  60%,  $CH_3COOC_2H_5- HCOOH - H_2O$  (3:1:1) [4]. При хроматографировании на бумаге чаще применяют растворы кислоты уксусной разной концентрации. Так, при изучении индивидуального вещества, выделенного из листьев груши обыкновенной [57] сортов «Бэре» и «Лесная красавица» использовалась ТСХ в системе БУВ (4:1:5) с свидетелем арбутином-стандартом, позволившая идентифицировать данное вещество как арбутин. [52] В исследованиях, направленных на разработку эффективных методик идентификации арбутина подземных и надземных вегетативных органов *Bergenia crassifolia* [121] используется хроматография на бумаге и в тонком слое сорбента. Автор отмечает наличие фиолетовой флуоресценции пятен в УФ-свете, а также развитие красной окраски зон адсорбции арбутина после проявления хроматограмм реактивом Паули. По результатам исследований арбутин идентифицирован в зеленых, красных и бурых листьях и корневищах бадана с использованием различных систем растворителей. [121]. В случае выделения с использованием хроматографических методов арбутина- индивидуального вещества для подтверждения подлинности определяют температуру плавления, УФ- и ИК спектры [39]. В связи с присутствием в молекуле арбутина ароматических  $C=C$ -связей максимум поглощения в УФ спектре ожидается при

270-300 нм. Для арбутина максимум поглощения находится при 282 нм и может быть использован как для качественной характеристики, так и для количественного определения арбутина в растительном сырье.

В инфракрасном спектре арбутина присутствуют характерные полосы при 3200 - 3400 см, наличие которых обусловлено присутствием спиртовых и фенольных гидроксильных групп; полосы 1515, 1460, 1440 см типичны для ароматических С=C-связей. Совпадение спектров исследуемых извлечений со спектром стандарта достоверно указывает на идентичность соединений, что было использовано для идентификации арбутина, выделенного из листьев груши [39].

Для идентификации арбутина многими авторами использовались химические превращения (гидролиз, ацетилирование, метилирование и др.) с последующим сравнением констант продуктов превращения с литературными данными. Так, арбутин состава  $C_{12}H_{16}O_7$ , выделенный из листьев груши, имеющий температуру плавления 152-153 С, ацетилировали с образованием пентаацетильного производного состава  $C_{22}H_{26}O_{12}$ , с температурой плавления 146 С. [57]

Как уже упоминалось выше, согласно требованиям ГФ количественная оценка содержания арбутина в сырье осуществляется иодометрическим титрованием гидрохинона, получаемого после извлечения и гидролиза арбутина.

При титровании продукта гидролиза арбутина раствором йода определение точки эквивалентности осуществляется визуально по изменению окраски индикатора, что зависит от субъективных факторов и может приводить к ошибке. Так же следует отметить длительность процесса количественного определения арбутина с использованием фармакопейного метода, что приводит к необходимости использования физико-химических методов анализа. [114, 189]. Известен фотоэлектроколориметрический метод [17] количественного определения, основанный на осуществлении реакция образования азокрасителя после взаимодействия арбутина с диазотированным сульфаниламидом (сульфацил-натрий). При анализе листьев и корневищ бадана [121]

количественное содержание арбутина осуществляли по калибровочному графику. Минимальным значением, при котором осуществляется идентификация арбутина установлена концентрация 6,3 мкг/мл. При этом автор отмечает, что используемая при пробоподготовке извлечения очистка экстракта бадана от балластных соединений полифенольной природы осаждением их раствором  $Pv(CH_3COO)_2$  влечет потери арбутина, что может существенно повлиять на результаты количественного анализа, проводимого фотоколориметрическим методом [23, 121]. Многие авторы используют в исследованиях различные вариации спектрофотометрического метода определения арбутина, среди которых наиболее используемыми оказались: метод, основанный на измерении оптической плотности в видимой области спектра после получения антипиринового красителя [121] и метод, осуществляемый при аналитической длине волны 281 нм после фильтрования исследуемого извлечения через слой алюминия оксида с применением полученного значения удельного показателя поглощения арбутина, составившего  $77,3 \pm 3,1$  [52].

В американской [238] и европейской [192] растительных фармакопеях количественную оценку содержания арбутина в сырье осуществляют методом ВЭЖХ. Согласно требованиям европейской фармакопеи [192], исследуемое сырье подвергают двукратной экстракции водой очищенной, в качестве неподвижной фазы применяют октадецилсиликагель, элюирование осуществляют в изократическом режиме, подвижная фаза – вода-метанол (90:10). По американской методике [238] предусмотрено использование в качестве неподвижной фазы также октадецилсиликагеля, используется градиентный режим элюирования смесями метанола и воды очищенной. Детектирование проводят при длине волны 280 нм. Так же согласно литературным данным, для анализа арбутина методом ВЭЖХ наиболее используемыми являются обращенная фаза C18 в качестве сорбента и элюент, имеющий кислый pH среды [1]. При этом использование элюентов с pH менее 2,0 не рекомендуется, т.к. снижает стабильность неподвижной фазы за счет возможного гидролиза силанольных

групп сорбента [1]. Так, с целью совершенствования метода количественного определения арбутина в листьях толокнянки была разработана методика обращенно-фазовой ВЭЖХ [52]: детектирование при 280 нм, подвижная фаза: 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , подкисленный  $\text{H}_3\text{PO}_4$  до  $\text{pH}=3$  и ацетонитрил (9:1) с расходом подвижной фазы 0,6 мл/мин., а для анализа сырья и спиртовых извлечений из свежих и высушенных побегов рододендрона [92] использовалась подвижная фаза  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}_3\text{PO}_4$  (концентрированная) в соотношении компонентов подвижной фазы по объему 80 : 120 : 1 в условиях изократического элюирования, осуществляя подачу элюента со скоростью 0,8 мл/мин. Проводя оценку количественного содержания арбутина, содержащегося в сырье различных видов бадана (*Bergenia crassifolia*, *B. Cordifolia*, *B. Ligulata*, *B. Ciliate*), собранных в различных климатических зонах, в разные фазы вегетации, также использовалась ВЭЖХ. [135,162].

Учитывая имеющиеся литературные данные, характеризующие присутствие в различном сырье рода *Malus* арбутина, мы сочли целесообразным провести анализ изучаемого сырья на содержание в нем арбутина. В исследовании использовались качественные реакции на арбутин, рекомендуемые фармакопейными методиками, а также реакции образования антипиринового красителя и азокрасителя, описанные в литературе [52], ТСХ и УФ-спектрофотометрия. При проведении ТСХ-анализа применяли хроматографические пластины «Сорбфил ПТСХ – АФ-А-УФ». Детектирование осуществляли, просматривая хроматограммы после обработки раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе натрия карбоната. Регистрацию спектров осуществляли на спектрофотометре SPECORD 250 для спиртовых извлечений из исследуемого сырья.

С учетом результатов, полученных в наших предыдущих исследованиях [42] при анализе извлечений из листьев яблони лесной, рекомендуемые для подтверждения арбутина в сырье качественные реакции проводились нами до и

после осаждения полифенольных веществ с применением основного ацетата свинца. Результаты представлены в приложении № 5.

По окончании проведения хроматографического разделения, пластинки высушивали и просматривали в УФ-свете, наблюдая развитие интенсивной флюоресценции пятен фиолетового цвета. Затем пластинки обрабатывали реактивом Паули и наблюдали появление окрашенных, совпадающих зон адсорбции извлечений из сырья и арбутина-стандарта с значением величины  $R_f = 0,87 \pm 0,01$ .

Спектрофотометрическим методом для идентификации арбутина были получены спектры исследуемых извлечений из листьев яблони лесной и яблони домашней разных сортов, и раствора стандартного образца арбутина, совпадающие по конфигурации кривой и положению минимумов и максимумов, что позволяет идентифицировать арбутин во всех исследуемых образцах.

Для идентификации арбутина в исследуемом сырье нами так же использовался метод ТСХ, включенный в Фармакопею республики Беларусь. В системе растворителей кислота муравьиная безводная – вода – этилацетат (6:6:88). После проявления хроматограммы раствором дихлорхинонхлоримида в метаноле на участке, соответствующем испытываемому раствору обнаруживается 8 зон, среди которых три совпадают с зонами и окраской стандартов гидрохинона (ГОСТ 19627-74 Гидрохинон (парадиоксибензол)) (зона синего цвета), галловой кислоты (CAS 5995-86-8 Biochem) (зона коричневого цвета) и арбутина (зона синего цвета). Наиболее интенсивная зона арбутина была характерна для свежих и замороженных листьев яблони лесной, высушенное сырье - плоды яблони лесной содержат арбутин в следовых минорных значениях.

Выбор длины волны для проведения дальнейших исследований осуществлялся путем анализа УФ-спектров стандартного образца арбутина в спирте этиловом и спиртового извлечения из исследуемого сырья- листья яблони лесной.

Таблица 30. Выбор оптимальной длины волны для исследования листьев яблони лесной разных способов консервации

Образец	$\lambda_{\text{max}}$ для СО	$\lambda_{\text{max}}$ для опытного образца		
		Свежее сырье	Высушенное сырье	Замороженное сырье
Арбутин	221 нм	285,5 нм	286 нм	285,5 нм
	285 нм			

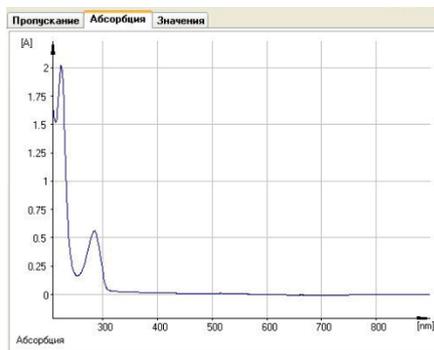


Рис.32. УФ-спектр арбутина-стандарта

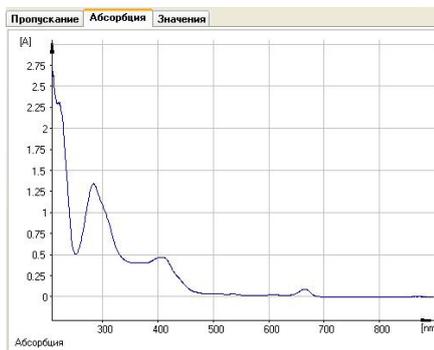


Рис.33. УФ-спектр спиртового извлечения

Идентификацию арбутина в исследуемых образцах осуществляли методом ВЭЖХ по описанной в разделе «Материалы и методы» методике.

Полученные нами результаты выявили в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной с использованием метода внутренней нормализации - 13 соединений, в составе которых обнаружен арбутин ((2R,3S,4S,5R,6S)-2-гидроксиметил-6-(4-гидроксифенокси) оксан-3,4,5-триол). Следует отметить, что хроматограмма спиртовых извлечений из сухих и свежих листьев яблони лесной идентичны. (рис.34, таблица 34.)

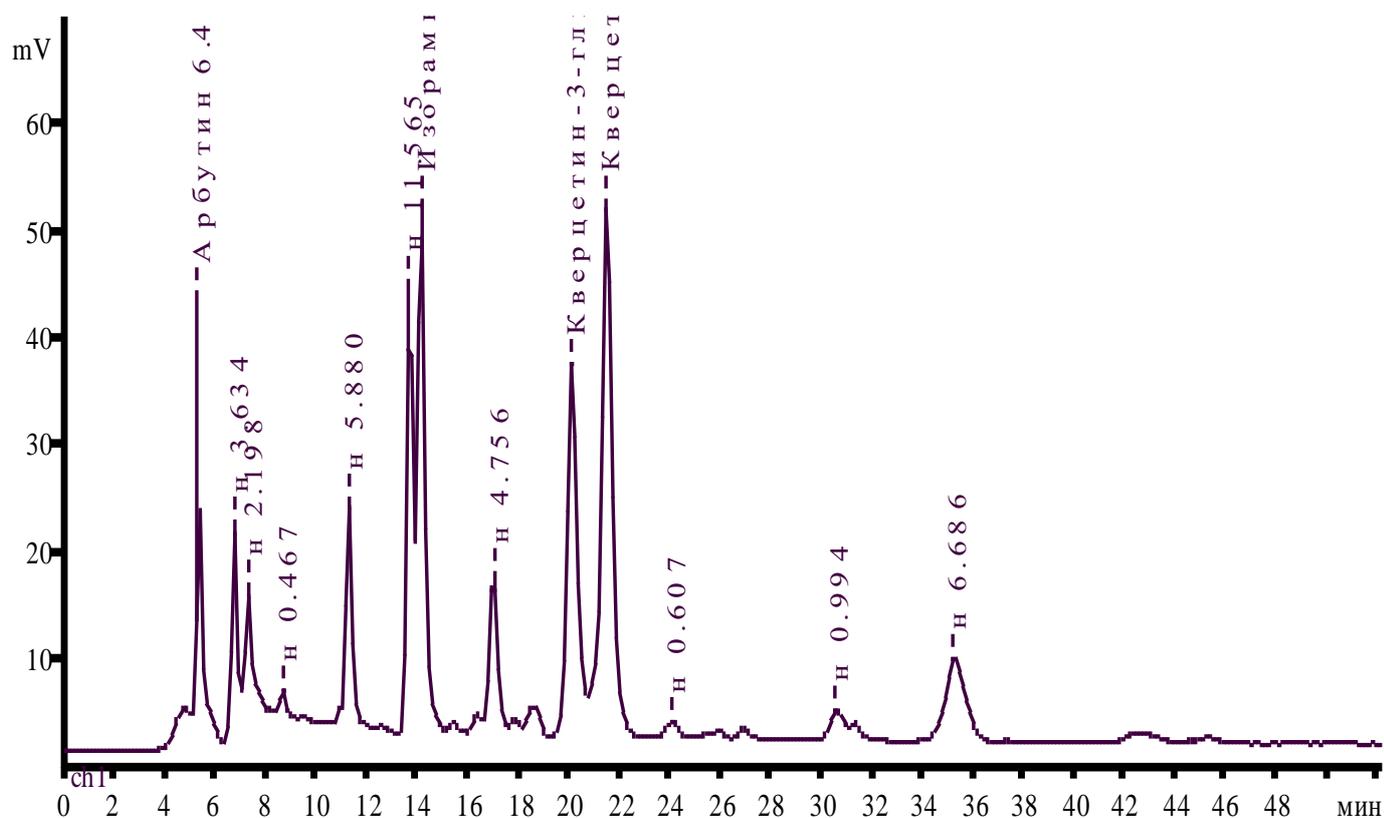


Рис.34 – Хроматограмма спиртового извлечения из листьев яблони лесной методом ВЭЖХ, при 370 нм

Таблица 31. Результаты анализа фенольных соединений в исследуемом сырье – яблони лесной листья разных способов консервации, методом ВЭЖХ.

№	Время, мин	Площадь, мV*сек	Площадь, %	Название
1	5,274	399.03	6.42	Арбутин
2	6,70	225.92	3.63	Неидентифициров
3	7,24	136.68	2.20	Неидентифициров
4	8,61	29.03	0.47	Неидентифициров
5	11,23	365.61	5.88	Неидентифициров
6	13,66	719.04	11.56	Неидентифициров
7	14,09	990.92	15.94	Изорамнетин-3-гал
8	16,96	295.70	4.76	Неидентифициров
9	20,07	994.15	15.99	Кверцетин-3-глюк
10	21,45	1546.10	24.87	Кверцетин-3-рут
11	24,09	37.73	0.61	Флоридзин
12	30,53	61.80	0.99	Неидентифициров
13	35,22	415.72	6.69	Кверцетин

Содержание арбутина в пересчете на абсолютно сухое сырье определяли методом абсолютной калибровки с применением компьютерной программы Мультихром Windows. Расчет осуществляли по формуле:

$$C (\%) = \frac{S_{ис.} \times C_{ст.} \times 100 \times 100 \times 100}{S_{ст.} \times 25 \times \alpha \times (100 - W)}; \text{ где}$$

$S_{ис.}$  – площадь пика в исследуемом растворе;

$S_{ст.}$  – площадь пика раствора арбутина СО;

$C (\%)$  – содержание арбутина, %;

$C_{ст.}$  – масса навески арбутина СО;

$\alpha$  – масса сырья, взятого на анализ, г;

$W$  – потеря в массе при высушивании в %;

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в спиртовых извлечениях из листьев яблони лесной в пяти независимых повторностях представлены в таблице 32.

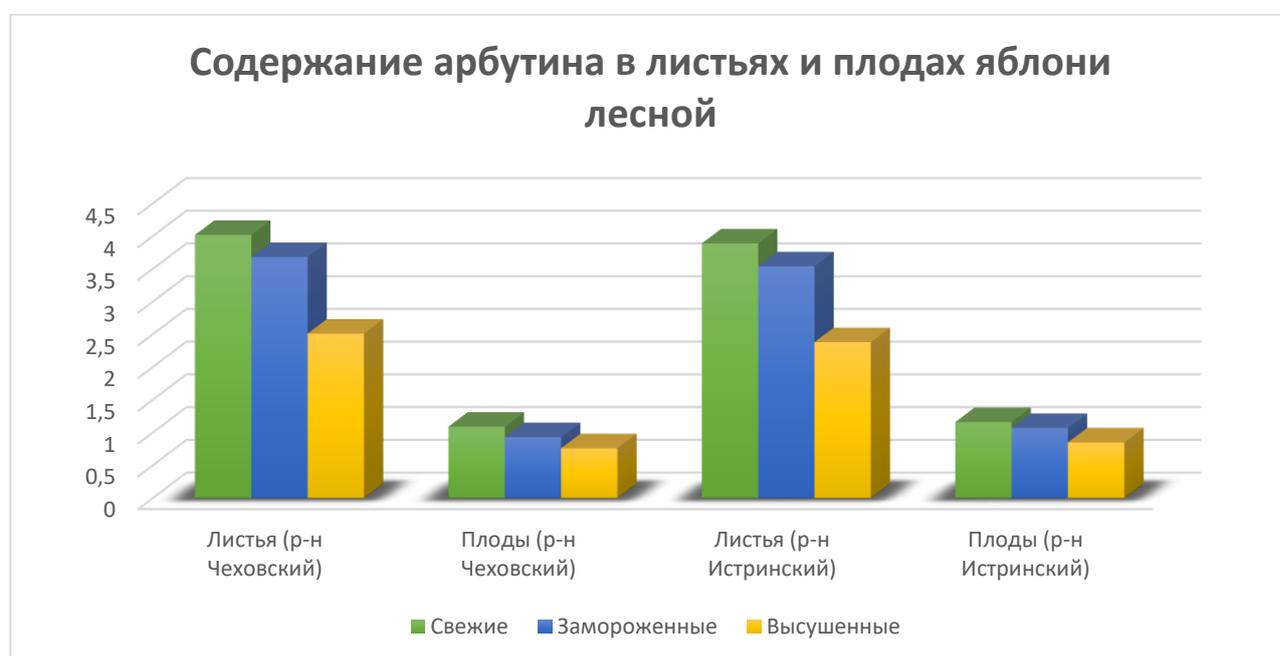
*Таблица 32. Результаты определения метрологических характеристик методики количественной оценки содержания арбутина в спиртовых извлечениях из исследуемого сырья - яблони лесной листья.*

n	f	$X_{cp}$	$S^2$	$S_x$	P, %	t (P, f)	$\Delta X_{cp}$	$\varepsilon_{cp}$ , %
Свежее сырье – Листья яблони лесной								
5	4	0,972	0,00005	0,0071	95	2,78	0,00883	0,908
Высушенное сырье – Листья яблони лесной								
5	4	0,7406	0,0000282	0,00531	95	2,78	0,0066	0,890
Замороженное сырье - Листья яблони лесной								
5	4	0,901	0,000029	0,0054	95	2,78	0,0067	0,74

Относительная ошибка используемой методики количественной оценки содержания арбутина с 95%-ой вероятностью составляет  $\pm 0,908\%$  для свежих и  $\pm 0,890\%$  для высушенных листьев яблони лесной.

Как отмечалось выше, результаты иодометрического титрования образцов извлечений исследуемого сырья составили около 3%, что несколько выше, чем значения показателей количественного содержания арбутина в исследуемом сырье, определяемых по методике ВЭЖХ.

Увеличенный выход арбутина в методике йодометрического титрования может быть объяснен наличием незначительных количеств примесных веществ полифенольной природы, что, соответственно, сказывается на возрастании расчетных показателей при проведении титрования.



*Рис. 35. Содержание арбутина в листьях и плодах яблони лесной*

#### **4.8. Количественная оценка дубильных веществ в исследуемом сырье**

Учитывая имеющиеся литературные данные, о возможности использования для качественного определения дубильных веществ [5] 1% раствора коллагена, нами была проведено подтверждение наличия дубильных веществ в исследуемом сырье с использованием данного реактива, на основании полученных результатов

было показано, что дубильные вещества были идентифицированы во всех изучаемых образцах.

При проведении ТСХ нами использовалась система растворителей муравьиная кислота безводная-этилацетат –толуол (10:30:60), использование которой давало наилучшие результаты при исследовании дубильных веществ в работах предыдущих авторов [5]. Детектирование зон адсорбции осуществляли в УФ- свете при длине волны 250 и 365 нм с последующей обработкой раствором квасцов железоаммонийных и ванилина раствором в хлористоводородной кислоте 2%.

Количественное определение суммы дубильных веществ в листьях, плодах яблони лесной осуществляли методом перманганатометрического титрования. Результаты представлены в таблице 33.

*Таблица 33. Количественное определение суммы дубильных веществ в листьях, плодах яблони лесной осуществляли методом перманганатометрического титрования*

<b>Сырье</b>	<b>Способ консервации</b>	<b>X,%</b>	<b>P,%</b>	<b>t(P,f)</b>	<b>S2</b>	<b>S</b>	<b>X</b>	<b>E,%</b>
Листья	свежие	9,57	95	2,78	0,00115	0,0339	0,042	0,44
	замороженные	9,23	95	2,78	0,0027	0,0519	0,646	0,70
	высушенные	7,25	95	2,78	0,00068	0,026	0,032	0,45
Плоды	свежие	5,01	95	2,78	0,00068	0,026	0,032	0,63
	замороженные	4,67	95	2,78	0,00145	0,038	0,47	1,01
	высушенные	3,92	95	2,78	0,005	0,070	0,087	2,24



*Рис.36. Содержание дубильных веществ в листьях и плодах яблони лесной*

Следует отметить, что в пищевой промышленности для оценки качества пищевого растительного сырья, чаще проводят оценку не содержания дубильных веществ, а определяют полифенольный комплекс.

Количественное содержание веществ полифенольной природы осуществляли методом Фолина-Чикалтеу (Folin-Ciocalteu), широко применяемым для изучения пищевых растений и продуктов их переработки. Метод подразумевает использование реактива Фолина-Чикалтеу, представляющего собой смесь фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот. В процессе взаимодействия вещества полифенольной природы окисляются под действием реактива и формируется интенсивное голубое окрашивание, обусловленное образованием смеси восстановленных вольфрамов и молибдатов. Оптическая плотность раствора пропорциональна содержанию полифенольных веществ. Определение содержания суммы фенольных соединений осуществляли по методике, включающей экстракцию веществ полифенольной природы из измельченного исследуемого сырья листьев, плодов яблони лесной спиртом этиловым 70% при постоянном перемешивании и нагревании на водяной бане в течение 120 минут с последующим охлаждением и фильтрацией экстракционной смеси, отбором 2 мл полученного извлечения, последующим разбавлением

аликвоты водой деионизированной, взаимодействием с реактивом Фоллина-Чикалтеу в присутствии 15 мл 20% раствора натрия карбоната и измерением оптической плотности полученного окрашенного испытуемого раствора при длине волны 765 нм.

Параллельно проводили измерение оптической плотности раствора, состоящего из одного мл раствора СО галловой кислоты, 5 мл реактива Фоллина-Чикалтеу, 15 мл 20% раствора натрия карбоната и деионизированной воды до 100 мл.

Количественное содержание веществ полифенольной природы в % в пересчете на галловую кислоту рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 1 \times 100 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times a \times 100 \times 100 \times (100 - w)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора

D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора СО галловой кислоты

m – масса сырья, г

m<sub>0</sub> – масса СО галловой кислоты, г

a – аликвота испытуемого раствора, мл

w – потеря в массе при высушивании сырья, %

*Таблица 34. Количественное определение суммы дубильных веществ в листьях, плодах яблони лесной осуществляли методом Фолина-Чикалтеу*

Определяемый показатель качества	Объект исследования		
	Листья яблони лесной, заготовленные в Истринском районе Московской области	Листья яблони лесной, заготовленные в Чеховском районе Московской области	Листья яблони домашней (сорт Антоновка)
Содержание суммы полифенольных	11,28	12,13	9.96

соединений, %			
---------------	--	--	--

#### **4.9. Общая оценка влияния способа консервации на состав БАВ листьев и плодов яблони лесной свежих, высушенных и замороженных**

Подводя итог проведенных исследований по оценке количественного содержания в исследуемом сырье – листьях, плодах яблони лесной разных способов консервации и свежих основных групп БАВ, представленных органическими и фенолкарбоновыми кислотами, полисахаридами, флавоноидами, арбутином (результаты количественного определения представлены в таблице), следует отметить, что максимальное содержание всех групп веществ ожидаемо характерно для свежего сырья.

Так замораживание листьев яблони лесной привело к незначительному снижению суммарного содержания полисахаридов, составившему 1,3-2,6 %, снижение содержания органических кислот составило 10,6-12,8%, потеря содержания дубильных веществ составила 2,8- 3,5%, флавоноидов 8,0-13,3%, арбутина 8,4- 9,0%.

Анализ замороженных плодов яблони лесной показал незначительное снижение суммарного содержания пектинов, составившему 2,4-3,2 %, снижение содержания органических кислот составило 17,8-18,9%, потеря содержания дубильных веществ составила 6,8-11,4%, флавоноидов 24,4-26,1%, арбутина 7,8-14,7%.

Тепловая сушка исследуемого сырья приводила к значительно более серьезным потерям БАВ. При определении действующих веществ в высушенных листьях яблони лесной выявлено снижение суммарного содержания полисахаридов, составившему 8,6-8,8%, снижение содержания органических кислот составило 35,1%, потеря содержания дубильных веществ составила 23,2-24,2%, флавоноидов 54,2-57,6%, арбутина 37,5-38,8%

Анализ высушенных плодов яблони лесной показал незначительное снижению суммарного содержания пектинов, составившему 7,1 %, снижение содержания органических кислот составило 34,8-35,9%, потеря содержания дубильных веществ составила 20,2-20,6%, флавоноидов 77,0-78,2%, арбутина 26,7-30,3%. При этом, несмотря на значительные потери БАВ в исследуемом сырье в процессе сушки, содержание их остается на достаточно высоком уровне, а сохранность сырья, по данным многочисленных публикаций, оказывается более стабильной, что позволяет рекомендовать к использованию предприятиями фармацевтической промышленности все предлагаемые виды сырья с учетом имеющихся мощностей для переработки свежего, высушенного и замороженного сырья.

Таблица 35. Содержание БАВ в исследуемых листьях яблони лесной и домашней

Исследуемое ЛРС		Содержание %				
		Полисахариды	Сумма органических кислот	Арбутин	Дубильные вещества	Флавоноиды
Листья Яблони Лесной (Инстринский район)	свежие	5,34	1,51	3,89	9,57	2,51
	замороженные	5,20	1,35	3,54	9,23	2,31
	высушенные	4,87	0,98	2,38	7,25	1,15
Листья Яблони Лесной (Чеховский район)	свежие	5,22	1,48	4,02	9,64	2,48
	замороженные	5,15	1,29	3,68	9,37	2,15
	высушенные	4,77	0,96	2,51	7,40	1,05
Листья Яблони Домашней	свежие	5,75	1,46	3,65	8,75	2,01
	замороженные	5,30	1,20	3,38	8,24	1,97

ней (Антонов- ка)	ные					
	высуш енные	4,98	0,90	2,18	6,60	1,03
Листья Яблони Домаш- ней (Пепин)	свежие	5,25	1,45	3,20	8,34	2,24
	заморо жен- ные	5,10	1,30	2,91	8,10	2,05
	высуш енные	4,25	0,93	1,89	6,32	1,15
Листья Яблони Домаш- ней (Ренет)	свежие	5,53	1,47	3,34	8,44	2,00
	заморо жен- ные	5,25	1,36	3,01	8,20	1,96
	высуш енные	4,28	0,94	2,15	6,12	1,10

Таблица 36. Содержание БАВ в исследуемых плодах яблони лесной и домашней

Исследуемое ЛРС		Содержание %				
		Полисаха риды	Сумма органических кислот	Арбутин	Дубильные вещества	Флавоноиды
Плоды Яблони Лесной (Инстрин ский район)	свежие	12,68	6,71	1,16	5,01	0,94
	замороже нные	12,38	5,45	1,07	4,67	0,71
	высушенн ые	11,78	4,30	0,85	3,98	0,21
Плоды Яблони	свежие	12,55	6,34	1,09	4,74	0,92
	замороже	12,15	5,21	0,93	4,20	0,68

Лесной	нны					
(Чеховски	высушенн	11,65	4,15	0,76	3,78	0,20
й район)	ые					
Плоды	свежие	9,75	4,76	0,84	4,36	0,90
Яблони	замороже	9,45	3,55	0,61	3,24	0,65
Домашне	нны					
й	высушенн	8,95	2,90	0,43	2,68	0,19
(Антонов	ые					
ка)						
Плоды	свежие	9,25	4,25	0,81	4,66	0,91
Яблони	замороже	8,85	3,79	0,63	3,19	0,69
Домашне	нны					
й	высушенн	8,25	2,85	0,39	2,67	0,20
(Пепин)	ые					
Плоды	свежие	11,10	4,30	0,87	3,24	0,90
Яблони	замороже	10,80	3,66	0,69	2,85	0,66
Домашне	нны					
й	высушенн	10,20	2,79	0,47	2,11	0,20
(Ренет)	ые					

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Проведён сравнительный анализ состава основных групп БАВ свежих, замороженных и высушенных листьев и плодов яблони лесной с использованием качественных реакций, ТСХ и ВЭЖХ. Установлено наличие яблочной, лимонной, щавелевой, фумаровой и янтарной кислот, кислоты аскорбиновой. Анализ фенольных соединений листьев яблони лесной выявил наличие 13 соединений, среди которых сравнением с стандартными образцами идентифицированы изорамнетин-3-галактозид, кверцитин-3-глюкозид, кверцитин-3-рутинозид, флоредзин, флоретин, кверцитин, арбутин, в плодах идентифицированы кофейная кислота, галловая кислота, цикориевая кислота, катехин, эпикатехин, хлорогеновая кислота, виценин, неохлорогеновая кислота, рутин, кумарин, эллаговая кислота, кверцетин, флоретин, флоридзин, коричная кислота, апигенин.
3. Установлено, что способ консервации не влияет на компонентный состав биологически активных веществ в изучаемых объектах.
4. С учетом анализа научной литературы и путем собственных экспериментальных исследований подобраны методики количественного определения суммарного содержания полисахаридов, органических кислот, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, дубильных веществ, арбутина в исследуемом сырье. Методом аминокислотного анализа идентифицированы свободные и связанные аминокислоты.
5. Анализ полученных нами экспериментальных данных количественного содержания полисахаридов, органических кислот и гидроксикоричных, дубильных веществ, арбутина, флавоноидов в свежих, высушенных и замороженных листьях и плодах яблони лесной, следует отметить, что максимальное содержание всех групп веществ ожидаемо характерно для свежего сырья. Так замораживание листьев яблони лесной привело к незначительному снижению суммарного содержания полисахаридов, составившему 1,3-2,6 %,

снижение содержания органических кислот составило 10,6-12,8%, потеря содержания дубильных веществ составила 2,8- 3,5%, флавоноидов 8,0-13,3%, арбутина 8,4- 9,0%. Анализ замороженных плодов яблони лесной показал незначительное снижению суммарного содержания пектинов, составившему 2,4-3,2 %, снижение содержания органических кислот составило 17,8-18,9%, потеря содержания дубильных веществ составила 6,8-11,4%, флавоноидов 24,4-26,1%, арбутина 7,8%.

7. Выбор теплового режима сушки плодов и листьев яблони лесной приводил к значительно более серьезным потерям БАВ. При определении действующих веществ в высушенных листьях яблони лесной выявлено снижению суммарного содержания полисахаридов, составившему 8,6-8,8%, снижение содержания органических кислот составило 35,1%, потеря содержания дубильных веществ составила 23,2-24,2%, флавоноидов 54,2-57,6%, арбутина 37,5-38,8%. Анализ высушенных плодов яблони лесной показал незначительное снижению суммарного содержания пектинов, составившему 7,1 %, снижение содержания органических кислот составило 34,8-35,9%, потеря содержания дубильных веществ составила 20,2-20,6%, флавоноидов 77,0-78,2%, арбутина 26,7-30,3%. При этом, несмотря на значительные потери БАВ в исследуемом сырье в процессе сушки, содержание их остается на достаточно высоком уровне, а сохранность сырья, по данным многочисленных публикаций, оказывается более стабильной, что позволяет рекомендовать к использованию предприятиями фармацевтической промышленности все предлагаемые виды сырья с учетом имеющихся мощностей для переработки свежего, высушенного и замороженного сырья.

## ГЛАВА 5. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТЬЕВ, ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ.

### 5.1. Разработка показателей качества нового лекарственного растительного сырья – листья, плоды яблони лесной

Для осуществления стандартизации исследуемого сырья плоды и листья яблони лесной нами экспериментально были установлены числовые показатели качества сырья и исследовано изменение данных показателей при хранении, что позволило рекомендовать сроки годности. Числовые показатели, характеризующие качество сырья – влажность, зола общая и зола нерастворимая в 10% кислоте хлористоводородной, содержание примесей и экстрактивных веществ осуществляли с учетом требований методик ГФ XI и XIII изданий. Проведенные исследования позволили установить показатели качества плодов и листьев яблони лесной, представленные в таблицах 37-40.

Учитывая перспективы использования в медицинской практике экстракционных препаратов из исследуемого сырья показатель «экстрактивные вещества» определяли при извлечении водой и 70% спиртом этиловым.

Анализ микробиологической чистоты показал, что образцы листьев и плодов яблони лесной полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к ЛРС, а содержание микроорганизмов в плодах и листьях яблони лесной находится в значениях рекомендуемых нормативной документацией.

*Таблица 37. Оценка числовых показателей и результаты определения микробиологической чистоты в исследуемом сырье- яблони лесной листья*

Анализ	Показатели	Содержание
Числовые показатели листьев яблони лесной	Влажность	8,5%
	Зола общая	3,5%
	Зола, нерастворимая в 10% HCl	1,7%

	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	15,0%
	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом	18,5%
	Радионуклиды (Sr-90)	соответствует
Микробиологическая чистота	Аэробные бактерии	$0,9 \cdot 10^5 - 1,4 \cdot 10^5$
	Дрожжевые и плесневые грибы	$0,7 \cdot 10^2 - 1,4 \cdot 10^2$
	<i>Escherichia coli</i>	Не обнаружено
	Семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	нет
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	нет
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Нет
	<i>Salmonella</i>	нет

Таблица 38. Показатели и нормы качества листьев яблони лесной

Показатели	Методы	Норма
1	2	3
Внешние признаки	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.1.0003.15 «Листья»	Данные ГОСТ частично дополнены
Микроскопия	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»	Соответствует описанию
Подлинность	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ТСХ	Зеленовато-желтое окрашивание (флавоноиды) ТСХ: «Sorbil», система растворителей: спирт бутиловый – кислота уксусная ледяная – дистиллированная вода

		(4:1:2), должно обнаруживаться зона адсорбции на уровне рутина
	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ТСХ	ТСХ: «Sorbil», система растворителей: кислота муравьиная безводная-дистиллированная вода-этилацетат (6:6:88), после проявления раствором дихлорхинонхлоримида в метаноле на хроматограмме обнаруживаются две зоны синего (одна - на уровне арбутина-стандарта) и три зоны цвета коричневого цвета
Влажность	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья»	Не более 10%
Зола общая	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая»	Не более 5%
Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в Хлористоводородной кислоте»	Не более 2%
Измельченность	ГФ РФ XIII издания	1-3 мм
Пожелтевшие листья и черешки	ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственных растительных препаратах»	Не более 3%
Органическая примесь		Не более 0,5%

Минеральная примесь		Не более 0,5%
Радионуклиды	В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».	соответствует
Микробиологическая чистота	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Категория 4А
Количественное определение	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях»	Сумма флавоноидов в пересчете на Рутин: не менее 1,0% Арбутин: не менее 1,0%

Таблица 39. Оценка числовых показателей и результаты определения микробиологической чистоты в исследуемом сырье- яблони лесной плоды

Анализ	Показатели	Содержание
Числовые показатели плодов яблони лесной	Влажность	13,5%
	Зола общая	2,7%
	Зола, нерастворимая в 10% HCl	0,5%
	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	15,0%
	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом	18,0%
	Радионуклиды (Sr-90)	соответствует
Микробиологическая чистота	Аэробные бактерии	$0,6 \cdot 10^5 - 1,2 \cdot 10^5$
	Дрожжевые и плесневые грибы	$0,4 \cdot 10^2 - 1,1 \cdot 10^2$
	Escherichia coli	нет
	Семейства Enterobacteriaceae	нет
	Pseudomonas aeruginosa	нет
	Staphylococcus aureus	Нет
	Salmonella	нет

Таблица 40. Показатели и нормы качества плодов яблони лесной.

Показатели	Методы	Норма
1	2	3
Внешние признаки	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.1.0007.15 «Плоды»	Данные ГОСТ частично дополнены
Микроскопия	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»	Соответствует описанию
Подлинность	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ТСХ	Зеленовато-желтое окрашивание (флавоноиды) ТСХ: «Sorbil», система растворителей спирт бутиловый – кислота уксусная ледяная – дистиллированная вода (4:1:2), должно обнаруживаться зона адсорбции на уровне рутина и гиперозида
	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ТСХ	ТСХ: «Sorbil», система растворителей: этилацетат – спирт метиловый – диэтиламин (70:20:15), должно обнаруживаться зона адсорбции на уровне эсцина

Влажность	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья»	Не более 13%
Зола общая	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая»	Не более 12%
Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в Хлористоводородной кислоте»	Не более 3,5%
Измельченность	ГФ РФ XIII издания	1-3 мм
Пожелтевшие листья и черешки	ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственных растительных препаратах»	Не более 3%
Органическая примесь		Не более 0,5%
Минеральная примесь		Не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Категория 4А
Количественное определение	ГФ РФ XIII издания ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях»	Рутин: не менее 1,0%

## **5.2. Разработка технологических показателей плодов, характеризующих качество сырья в пищевой промышленности.**

Поскольку плоды, листья яблони лесной используются в пищевой промышленности, как компонент смесей сухофруктов, различных тонизирующих напитков, БАД, мы сочли целесообразным провести оценку ряда технологических показателей, используемых для характеристики доброкачественности пищевого растительного сырья.

### **Определение показателя твердости свежих и высушенных плодов яблони**

Известно, что для оценки качества плодов в пищевой промышленности используется ряд показателей, рекомендуемых «Методическими указаниями по химико-технологическому сортоиспытанию овощных, плодовых и ягодных культур для консервной промышленности» (1993) среди которых заслуживает внимания такой показатель как твердость мякоти, поскольку в ряде работ показана взаимосвязь значения данного показателя с величинами, характеризующими содержание ценных питательных и биологически активных веществ в сырье.

Твердость мякоти плодов яблони лесной определяли пенетрометром FHT-15 (фруттестер) с плунжером диаметром 3,5 мм, глубиной проникновения индектора 10 мм, предназначенным для проведения измерений твердости среднего слоя околоплодника (перикарпия) у плодов культурных растений.

Так же важным объективным показателем для определения съемной зрелости плодов яблони является иодокрахмальная проба, позволяющая проводить для сырья экспресс-диагностику степени зрелости, поскольку в плодовых культурах, достигших физиологической зрелости биохимический процесс синтеза крахмала и его накопления в паренхимных тканях сменяется противоположным процессом- гидролитическим расщеплением крахмала с образованием сахаров. Методика, позволяющая оценивать степень зрелости плода, разработанная советским ученым Целуйко Н.А. включает выдерживание разрезанного вдоль плода в течение 5-10 секунд в йодном растворе, получаемом растворением 4 г калия йодида и 1 г кристаллического йода в 100 г воды дистиллированной. Степень зрелости исследуемого плода характеризуется относительным наличием в сырье крахмала, содержание которого определяют по 5-ти балльной шкале. Нами были проведены исследования по оценке технологических характеристик плодов яблони лесной разной степени зрелости, результаты которых представлены в таблице 41.

Таблица 41. Определение технологических показателей плодов яблони (свежих)

Время заготовки плодов яблони лесной	Диаметр исследуемого плода (см)	Твердость мякоти плода яблони, кг/см <sup>2</sup>	Результат йодо-крахмальной пробы, баллы	Содержание полисахаридов, %
Стадия развития «плод лещина», июнь 2017	2,1-2,4	10,0-10,6	5	11,89-12,32
Стадия развития «плод грецкий орех»	3,0-3,3	8,7-9,5	4	12,36-12,46
10.08.2017	3,5-3,7	7,5-8,0	3-4	12,55-12,68
30.08.2017	3,6-3,9	7,0-7,5	3	12,32-12,56
15.09.2017	3,7-4,1	6,8-7,3	3	9,78-10,24

Сравнение полученных результатов с литературными данными, характеризующими аналогичные показатели, определяемые для сортовых плодов яблони домашней, показывает увеличение показателя твердости мякоти плода для исследуемого сырья, и меньший переход крахмала в свободные сахара в плодах яблони лесной, при этом наблюдаются некоторое снижение показателей суммарное содержание полисахаридов при достижении плодами яблони лесной стадии съемной зрелости.

### **5.3. Сравнительный анализ различных технологических способов выделения пектинов из плодов яблони лесной и домашней.**

Как уже отмечалось ранее, плоды яблони домашней служат одним из промышленных источников пектина. Анализ содержания пектинов в плодах и

листьях яблони лесной показал перспективность использования данного сырья для получения яблочного пектина.

В литературе описано значительное количество технологических схем промышленного получения яблочного пектина, включающих, как правило, базовые производственные стадии : предварительную пробоподготовку исходного сырья; экстрагирование пектина совмещенное с гидролитическим расщеплением минеральными или органическими кислотами, очистка полученного извлечения фильтрацией, с последующим осветлением и концентрированием, выделение пектиновых веществ с использованием этилового спирта или растворов солей, очистка полученного пектина, с последующей сушкой и измельчением по необходимости. Основные стадии технологического процесса получения пектина представлены на рис. 37.

*Рис.37. Основные стадии технологического процесса получения пектина из плодов яблони лесной.*



Для получения пектина нами использовались вполне зрелые плоды яблони лесной, которые подвергали измельчению на универсальной вальцевой дробилке, при котором происходит разрушение клеток мезокарпия плода яблони не менее чем на 75%. Совмещенная технологическая стадия гидролиз-экстрагирования осуществлялась водным раствором хлороводорода в диапазоне водородного показателя 1.5-2,5, при нагревании экстракционной смеси на водяной бане при контроле температуры в интервале 70-80 °С в течение 180 минут, значение гидромодуля (ГМ) не менее 12. Технологическую стадию гидролиз-экстрагирования при данных параметрах повторяли двукратно, полученные извлечения объединяли. Концентрирование полученного в условиях гидролиз-экстрагирования извлечения проводили в роторном испарителе до достижения половинного от исходного объема, после чего приступали к стадии осаждения пектиновых веществ спиртом этиловым 95%, взятым в трехкратном объеме. Полученный осадок отделяли центрифугированием, после чего еще раз промывали этанолом и высушивали при 60-65°С. Для полученного по вышеуказанной схеме пектина плодов яблони лесной проводилось изучение показателей качества в сравнении с пищевым пектином промышленного производства. Органолептические показатели, полученного нами пектина, представлены в таблице 42.

*Таблица 42. Анализ органолептических показателей пектина*

Наименование показателя	Характеристика	Определено при анализе		
		Пектина яблочного	Пектина цитрусового	Пектина, полученного из плодов яблони лесной
Внешний вид	Порошок тонкого помола без посторонних примесей	соответствует	соответствует	соответствует
Вкус	Слабокислый	Слабокислый	Слабокислый с чуть заметной горчинкой	Слабокислый
Запах	Отсутствует	Отсутствует	отсутствует	отсутствует
Цвет	От светло-серого до кремового	кремовый	Желтовато-кремовый	кремовый

#### 5.4. Разработка некоторых показателей качества пектина плодов яблони лесной.

Анализ показателей качества пектина яблони лесной осуществляли в сравнении с показателями пектина яблочного промышленного производства в соответствии с требованиями ГОСТ 29186-91 «Пектин». Для определения перспективности использования плодов яблони лесной в качестве источника получения пектина наиболее значимыми показателями качества являются степень этерификации и студнеобразующая способность. Результаты проведенного анализа представлены в таблице 43.

Таблица 43 Анализ физико-химических показателей пектина

Наименование показателя	Рекомендуемая норма	Определено при анализе		
		Пектина яблочного	Пектина цитрусового	Пектина, полученного из плодов яблони лесной
Массовая доля влаги %, не более	10	8,5	9,7	8,3
Степень этерификации, %, не менее	70	70,5	72,7	70,8
Студнеобразующая способность, градусы Тарр-Бейкера, не менее	200	210	208	213
Массовая доля нитратов %, не более	0,18	0,15	0,17	0,07
Посторонние примеси, видимые невооруженным глазом	Не допускаются	Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют
Массовая доля частиц волокнистой фракции размером более 0,5 мм, %, не более	20	13,5	16,0	15,5

### 5.5. Изучение адсорбционной способности измельченных плодов и пектина яблони лесной.

Учитывая возможность использования измельченного сырья яблони лесной в качестве энтеросорбентов, нами была проведена оценка адсорбционной способности порошка листьев, плодов яблони лесной. Наличие адсорбционной способности определялось по методике, включающей взбалтывание 0,1 г исследуемого порошка плодов, листьев яблони лесной в лабораторном цилиндре объемом 50 мл с притертой пробкой с 20 мл 0,2% раствора метиленового синего с последующим отстаиванием и фильтрацией. Фильтрат исследуемых образцов оставался практически бесцветным, что подтверждает наличие у порошка листьев, плодов яблони лесной адсорбционной способности, количественную оценку которой проводили по методике, рекомендованной для стандартизации энтеросорбента "Полифепан", включающей проведение адсорбции из раствора красителя метиленового синего с известной концентрацией на исследуемых образцах [67,124] (точная навеска) при перемешивании на ротационной качалке в течение 1 часа с последующей фильтрацией образцов через стеклянный фильтр, разведением 5 мл фильтрата и исходного раствора метиленового синего дистиллированной водой и измерение оптической плотности анализируемых образцов на спектрофотометре при длине волны 668 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Адсорбционную способность порошка в граммах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(D_0 - D_1) \cdot C \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot (1 - 0,01 w)}$$

где  $D_0$  - величина оптической плотности исходного раствора метиленового синего

$D_1$  - величина оптической плотности раствора после сорбции на анализируемом образце

$m$  - масса навески препарата в граммах

w - влажность препарата

C - концентрация раствора метиленового синего, взятого на сорбцию, г/мл

100 - объем раствора метиленового синего, взятого на сорбцию в мл

Параллельно нами было проведено определение показателя адсорбционной активности средств, разрешенных к применению в РФ в качестве энтеросорбентов "Полифепан" (АО "Сайнтекс"), "Фильтрум – сти" (АВВА РУС), а также пектина яблочного пищевого и микрокристаллической целлюлозы. Результаты сравнительного определения показателей адсорбционной способности исследуемого сырья- порошков листьев, плодов яблони лесной и традиционных энтеросорбентов представлены в таблице 44.

*Таблица 44. Показатели адсорбционной способности порошка листьев, плодов яблони лесной и некоторых отечественных энтеросорбентов.*

<b>Объект исследования</b>	<b>Адсорбционная способность, г на 1 г сорбента.</b>
Порошок плодов яблони лесной	0,056
Порошок листьев яблони лесной	0,052
Пектин яблочный	0,062
Полифепан	0,075
Фильтрум-сти	0,068
Микрокристаллическая целлюлоза	0,017

Как видно из таблицы 44, измельченное до порошкообразного состояния сырье яблони лесной проявляет себя как достаточно эффективный сорбент с показателями адсорбционной способности 0,052 г на 1 г сорбента для порошка листьев и 0,056 г на 1 г сорбента для порошка плодов, что выше аналогичного показателя целлюлозы микрокристаллической, что обуславливает перспективность дальнейших исследований порошка листьев, плодов яблони лесной, с целью получения на их основе эффективного энтеросорбента. В предыдущих

исследованиях нами было показано, что использование добавок яблочного пектина и извлечений из плодов яблони лесной в состав пищевых коктейлей «Magic of life», рекомендуемых в очистительных диетах, в эксперименте приводило к существенному увеличению их адсорбционной способности. [65]

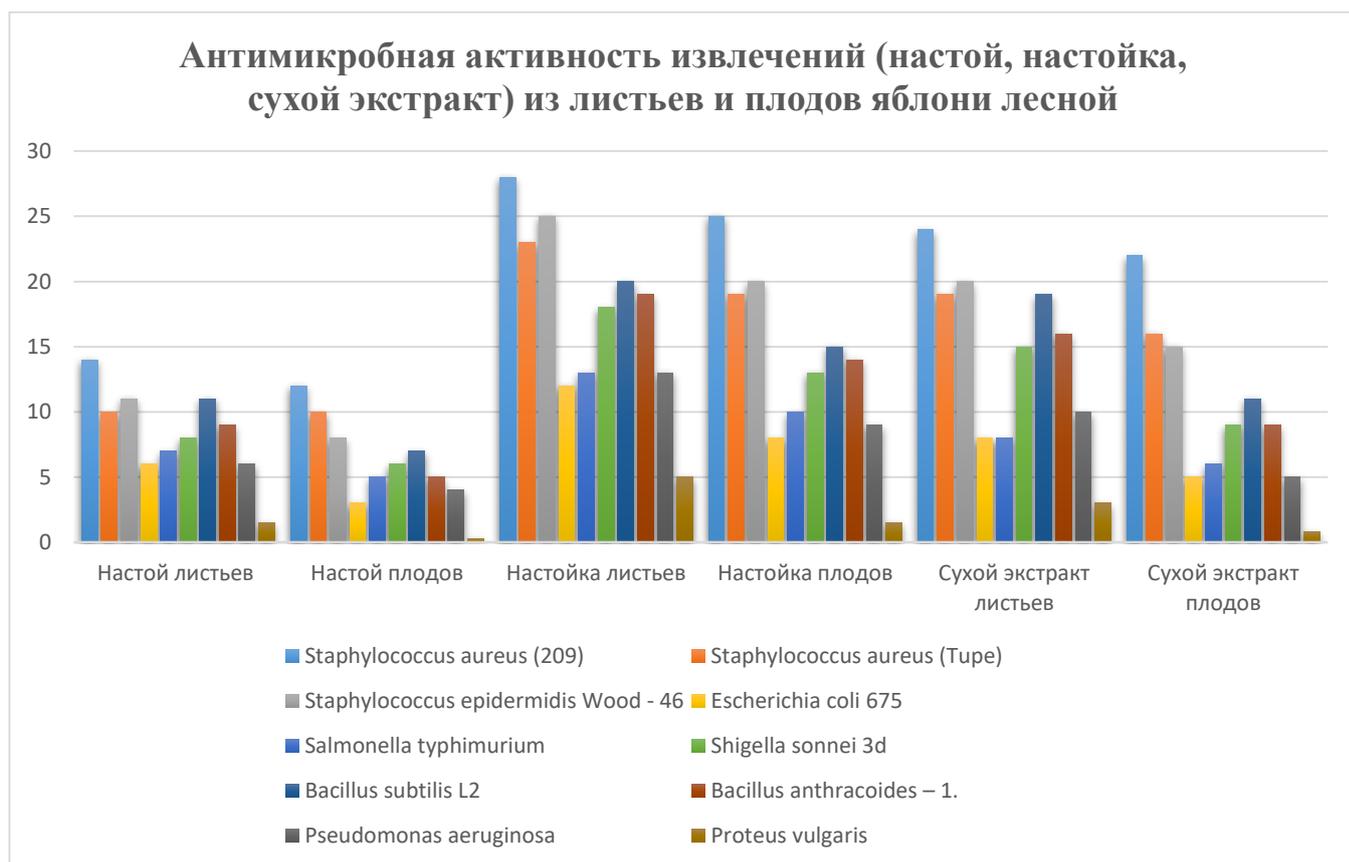
### 5.6. Определение антимикробной активности извлечений из плодов и листьев яблони лесной.

Изучение антимикробной активности водных извлечений из листьев, плодов яблони лесной (настой, настойка, сухой экстракт) проводили методом диффузии в агар на плотной питательной среде. Питательную среду готовили из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя. Оценку антимикробной активности исследуемых извлечений осуществляли сравнением зон угнетения тест-микробов.

Полученные результаты определения антимикробной активности представлены в таблице 45.

*Таблица 45. Результаты определения антимикробной активности извлечений из листьев, плодов яблони лесной.*

Наименование культуры микроорганизма	Величина зоны задержки роста, мм					
	Листья яблони лесной			Плоды яблони лесной		
	Настой	Настойка	Сухой экстракт	Настой	Настойка	Сухой экстракт
Staphylococcus aureus (209)	14	28	24	12	25	22
Staphylococcus aureus (Tupe)	10	23	19	10	19	16
Staphylococcus epidermidis Wood - 46	11	25	20	8	20	15
Escherichia coli 675	6	12	8	3	8	5
Salmonella typhimurium	7	13	8	5	10	6
Shigella sonnei 3d	8	18	15	6	13	9
Bacillus subtilis L2	11	20	19	7	15	11
Bacillus anthracoides – 1.	9	19	16	5	14	9
Pseudomonas aeruginosa	6	13	10	4	9	5
Proteus vulgaris	1,5	5	3	0,3	1,5	0,8



*Рис. 38. Антимикробная активность извлечений (настой, настойка, сухой экстракт) из листьев и плодов яблони лесной*

В ходе проведенных исследований установлено, что все изучаемые извлечения из листьев и плодов яблони лесной проявляют выраженное антимикробное действие в отношении *Staphylococcus aureus* (209), *Staphylococcus aureus* (Tupe), *Staphylococcus epidermidis* Wood – 46, а также умеренное антимикробное действие в отношении *Escherichia coli* 675, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* 3d, *Bacillus subtilis* L2, *Bacillus anthracoides* – 1, *Pseudomonas aeruginosa*, в отношении *Proteus vulgaris* антимикробной активности не выявлено. При этом, все исследуемые извлечения из листьев яблони лесной показывают достоверно более высокие результаты антимикробной активности, по сравнению с аналогичными извлечениями из плодов.

Таким образом, из результатов испытаний на антимикробную активность, следует, что максимальной антимикробной активностью обладают настойки листьев и плодов яблони лесной, экстрактом и настоем из данного сырья также, пусть и в меньшей степени, присущи антибактериальные свойства.

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.

1. Проведено определение числовых показателей для нового лекарственного растительного сырья - плоды, листья яблони лесной, определены нормы, рекомендованные к включению в разрабатываемую НД «Яблони лесной плоды», «Яблони лесной листья».
2. Для плодов яблони лесной разработана технология выделения пектиновых веществ и проведена оценка их показателей качества в соответствии с требованиями ГОСТа «Пектин». Для пектина, полученного из плодов яблони лесной, определено: массовая доля влаги % - не более 8,3, степень этерификации, % - не менее 70,8, студнеобразующая способность, градусы Тарр-Бейкера, не менее 213, массовая доля нитратов % - не более 0,07, массовая доля частиц волокнистой фракции размером более 0,5 мм, % - не более 15,5.
3. Проведено определение адсорбционной способности порошка листьев, плодов яблони лесной и полученного на их основе пектина в сравнении с широко используемыми в медицине природными адсорбентами.
4. Изучена антимикробная активность извлечений (настой, настойка и жидкий экстракт) из листьев, плодов яблони лесной. Установлено, что все изучаемые извлечения из листьев и плодов яблони лесной проявляют выраженное антимикробное действие в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* Wood – 46, а также умеренное антимикробное действие в отношении *Escherichia coli* 675, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* 3d, *Bacillus subtilis* L2, *Bacillus anthracoides* – 1, *Pseudomonas aeruginosa*, в отношении *Proteus vulgaris* антимикробной активности не выявлено. При этом, все исследуемые извлечения из листьев яблони лесной показывают достоверно более высокие результаты антимикробной активности, по сравнению с аналогичными извлечениями из плодов.

## ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ И ПЛОДОВ ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ

### 6.1. Оптимизация параметров получения водных извлечений из листьев и плодов яблони лесной разных способов консервации.

Получение водных извлечений из высушенных листьев и плодов яблони лесной регламентируется общей фармакопейной статьей ГФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары». Нормативная документация, регламентирующая технологию получения водных экстрактов из свежего и замороженного растительного сырья – листья и плоды яблони лесной, в настоящее время отсутствует. Учитывая вышеизложенное, нами было проведено исследование по выбору оптимальных условий получения водных извлечений из свежесобранных и подвергнутых заморозке листьев и плодов. С целью определения влияния фактора измельченности ЛРС на степень извлечения комплекса действующих веществ из свежих и замороженных листьев и плодов яблони лесной получали настои из исследуемых видов сырья в соответствии с рекомендациями инструкции по применению в соотношении сырье : экстрагент 1 : 20. Листья использовались в цельном и измельченном виде, получаемом путем нарезки до размера частиц, проходящих сквозь сите с диаметром отверстий 7 мм плоды – в грубой нарезке и измельченном до кашицеобразного состояния виде. Степень извлечения суммы действующих веществ определяли по показателю сухого остатка. Результаты исследования представлены в таблице 46.

*Таблица 46. Содержание сухого остатка водных извлечений из свежих, замороженных и высушенных листьев, плодов яблони лесной в зависимости от измельченности исследуемого сырья.*

Используемое для получения настоя сырье	Сухой остаток, %	
	Листья яблони лесной	Плоды яблони лесной
Настои из свежего сырья		
Цельное сырье	$1,09 \pm 0,03$	$1,17 \pm 0,05$

Измельченное сырье	$1,83 \pm 0,06$	$1,92 \pm 0,05$
Настои из замороженного сырья		
Цельное сырье	$1,04 \pm 0,06$	$1,08 \pm 0,04$
Измельченное сырье	$1,67 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,03$
Настои из высушенного сырья		
Цельное сырье	$0,98 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,05$
Измельченное сырье	$1,38 \pm 0,04$	$1,45 \pm 0,03$

Как видно из данных таблицы, настои, полученные с использованием измельченных листьев и плодов яблони лесной, демонстрируют более высокими значениями сухого остатка, чем водные извлечения, полученные из цельного или грубо нарезанного сырья.

Учитывая опыт применения отваров и настоев из высушенных плодов других представителей семейства Rosacea, а также данные, полученные в предыдущих исследованиях свежих и замороженных плодов боярышника, рябины, шиповника и малины [111] в соотношении сырье : экстрагент 1 : 20 (в соответствии с инструкцией по применению) или 1:10 (согласно фармакопейной методике) [111], мы сочли целесообразным при выборе оптимальной концентрации водных извлечений из свежих и замороженных листьев и плодов яблони лесной использовать настои из измельченного ЛРС в соотношении сырье : экстрагент 1: 10 и 1:20. Расчет необходимого объема экстрагента вели с учетом влажности исходных листьев и плодов по следующей формуле:

$$X = V_{\text{изв.}} - \frac{m * W}{100}$$

где X – объем экстрагента, мл

$V_{\text{изв.}}$  – объем извлечения, мл

m – навеска сырья, г

W – влажность сырья, %.

Методика получения водных извлечений из свежих и замороженных плодов яблони лесной. Около 30 г свежих или замороженных (после предварительной разморозки) плодов яблони лесной растирают в аптечной ступке до кашицеобразного состояния. Далее измельченные плоды заливают заранее рассчитанным (с учетом влажности сырья) объемом воды очищенной. Настаивают в инфундирном стакане на кипящей водяной бане при частом перемешивании в течение получаса, затем при комнатной температуре 10 минут. Фильтруют и доводят водой до требуемого объема.

Результаты исследования представлены в таблице 47.

*Таблица 47. Содержание сухого остатка водных извлечений из свежих, замороженных и высушенных листьев и плодов яблони лесной в зависимости от соотношения сырья: экстрагент*

Соотношение сырья: экстрагент	Сухой остаток, %	
	Листья яблони лесной	Плоды яблони лесной
Настои из свежего сырья		
1 : 10	2,72 ± 0,07	2,95 ± 0,06
1 : 20	1,63 ± 0,06	1,72 ± 0,07
Настои из замороженного сырья		
1 : 10	2,34 ± 0,09	2,55 ± 0,08
1 : 20	1,47 ± 0,05	1,69 ± 0,04
Настои из высушенного сырья		
1 : 10	2,15±0,05	2,34±0,07
1 : 20	1,24±0,07	1,28±0,05

Полученные результаты свидетельствуют о существенном возрастании степени

извлечения БАВ из свежих и замороженных листьев и плодов яблони лесной в водных извлечениях, полученных в соотношении сырье: экстрагент 1: 10. С целью определения оптимального режима экстрагирования были получены настои и отвары из измельченных свежих и замороженных листьев и плодов яблони лесной в соотношении сырье: экстрагент 1: 10. Степень извлечения БАВ определяли по сухому остатку. В результате проведенных исследований выявлено, что сухой остаток в отварах из свежих и замороженных листьев и плодов яблони лесной в 1,30-1,44 раза превышал данный показатель в настоях из исследуемых видов сырья. Таким образом, в ходе проведенного эксперимента нами были подобраны оптимальные условия получения водных извлечений из свежих и замороженных листьев и плодов яблони лесной.

## **6.2. Сравнительный анализ некоторых показателей качества водных извлечений из листьев и плодов яблони лесной разных способов консервации.**

Для проведения экспериментальной оценки содержания БАВ, были получены отвары из свежих, замороженных и высушенных листьев, плодов яблони лесной.

Изготовление водных извлечений из высушенных листьев и плодов яблони лесной осуществляли согласно требованиям фармакопейной методики в соотношении сырье - экстрагент 1 : 10 из измельченного сырья.

Для всех полученных водных извлечений определяли органолептические характеристики (цвет, прозрачность, запах, вкус, рН). Результаты определения представлены в таблице 48.

*Таблица 48. Органолептические характеристики и значения рН водных извлечений из листьев, плодов яблони лесной*

Показатели	Вид сырья	
		Листья яблони лесной

	Свежие	Высуш.	Заморож.	Свежие	Высуш.	Заморож.
Цвет	Насыщенный, коричневый	Красновато-коричневый	Насыщенный коричневый	Желтовато-коричневаты	Желтовато-бежевый	Желтовато-бежевый
Прозрачность	Прозрачный со слабой опалесценцией	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный
Запах	Специфический	Специфический	Специфический	Своеобразный фруктовый	Своеобразный фруктовый	Своеобразный фруктовый
Вкус	Терпкий, вяжущий	Терпкий, вяжущий	Терпкий, вяжущий	Кислый, вяжущий	Кислый, вяжущий	Кислый, вяжущий
рН	3,75	3.97	3,78	3.34	3,67	3,41

Полученные извлечения представляли собой окрашенные прозрачные или слабо опалесцирующие жидкости со специфическим запахом, кислым или терпким вяжущим вкусом и кислой реакцией среды.

Как известно, сухой остаток включает сумму веществ, извлекаемых из сырья растворителем в случае водных извлечений – водой), и может характеризовать суммарное содержание гидрофильной фракции БАВ.

Определение сухого остатка настоев и отваров из листьев и плодов яблони лесной проводили по методике, изложенной в статье ГФ XIV издания «Настойки». 5 мл исследуемого извлечения помещали в предварительно высушенный и взвешенный бюкс. Извлечение выпаривали на водяной бане досуха и помещали в сушильный шкаф при температуре 100°С на 120 мин. После

чего бюкс охлаждали в эксикаторе в течение 30 минут и взвешивали.

Сухой остаток определяли по формуле:

$$X = \frac{(m_{62} - m_6) \cdot 100}{m_{61} - m_6}$$

где  $m_6$  – масса пустого бюкса, в граммах;

$m_{61}$  – масса бюкса с навеской до прокаливания, в граммах;

$m_{62}$  – масса бюкса с навеской после прокаливания.

Все водные извлечения, полученные из свежего сырья, характеризовались большим значением сухого остатка, по сравнению с отварами и настоями из плодов, подвергнутых консервации. В извлечениях из замороженного сырья значение данного показателя было снижено в среднем на 6,7%, а в извлечениях из высушенного сырья – на 13,5%. В сравнении с исследуемыми образцами из свежего сырья.

### **6.3. Оценка количественного содержания биологически активных веществ в водных извлечениях из листьев и плодов яблони лесной.**

В настоящее время существующая нормативная документация на настои и отвары не предусматривает проведение испытаний водных извлечений по количественному содержанию БАВ. Однако данный показатель очень важен для подтверждения качества экстракционных препаратов, в том числе настоев и отваров, т.к. именно разнообразные БАВ, перешедшие в извлечение из используемого ЛРС, отвечают за основное фармакологическое действие любой лекарственной формы.

Учитывая вышеизложенное, мы сочли целесообразным осуществить количественное определение основных групп БАВ, определенных нами ранее в исследуемом сырье. В эксперименте проводилось определение содержания органических кислот, флавоноидов, дубильных веществ и полисахаридов в

отварах и настоях листьев и плодов яблони лесной. Водные извлечения из исследуемого сырья характеризовали также по общей сумме БАВ, которую иллюстрирует содержание сухого остатка. Определение суммарного содержания органических кислот осуществляли методом алкалометрического титрования, флавоноидов – методом спектрофотометрии после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом в пересчете на рутин, дубильных веществ- методом перманганатометрического титрования, полисахаридов- гравиметрически. Результаты оценки содержания основных групп БАВ в водных извлечениях из листьев и плодов яблони лесной представлены в таблице 50.

*Таблица 50. Содержание основных групп БАВ в водных извлечениях из листьев, плодов яблони лесной.*

Вид сырья		Содержание основных групп БАВ				
		Орг. К-ты	Дуб.вещ- ва	Полисах.	Флав-ды	Сух.ост
Листья	Свежие	0,438	0,458	0,490	0,011	3,320
	Замороженные	0,430	0,432	0,460	0,009	3,180
	Высушенные	0,422	0,408	0,380	0,007	2,800
Плоды	Свежие	0,563	0,32	0,940	0,009	2,550
	Замороженные	0,577	0,311	0,900	0,008	2,420
	Высушенные	0,424	0,241	0,810	0,006	2,170

#### **6.4. Особенности получения и оценка показателей качества НМГ из листьев, плодов яблони лесной**

Учитывая зарубежный опыт использования сырья яблони лесной для производства гомеопатических препаратов, нами получены настойки гомеопатические матричные из свежих и замороженных плодов яблони лесной, произведенные по методам 2 и 2а ОФС 42-0027-05 «Настойки матричные гомеопатические» с использованием в качестве экстрагента 90% этилового спирта, а также из высушенных плодов и листьев яблони лесной, произведенные

методом 4 ОФС 42-0027-05 «Настойки гомеопатические матричные» с использованием 70% этанола и в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России (Министерство здравоохранения РФ) от 26 октября 2015 г. №751н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность» об.)

Так как в частной нормативной документации отсутствуют специальные указания, то были использованы следующие методы получения НМГ:

1. НМГ из свежесобранных и подвергнутых замораживанию плодов яблони лесной изготавливались по методу 2а – методом мацерации из свежего лекарственного растительного сырья, содержащего менее 70% сока, с влажностью более 60%, не включающего эфирных масел, смол и слизи. Методика: плоды яблони лесной взвешивали на отдельных образцах осуществляли определение влажности (свежее –  $9,78 \pm 1,78$ , замороженное –  $70,31 \pm 2,50$ ), после чего подвергают тщательному измельчению. Измельченную массу плодов яблони лесной взвешивают и сразу же заливают не менее, чем половинным от массы использованного сырья, количеством спирта этилового, перемешивают и оставляют в плотно закрытой емкости при температуре не превышающей  $32^{\circ}\text{C}$ . Затем осуществляют расчет необходимого для доведения объема спирта этилового, смешивают с полученной массой и оставляют не менее, чем на 10 дней, осуществляя контроль температуры помещения (не выше  $20^{\circ}\text{C}$ ) с периодическим встряхиванием экстрагируемого материала, после чего массу отжигают и осуществляют фильтрацию.
2. НМГ из высушенных плодов яблони лесной изготавливалась в соответствии с методом 4 – метод мацерации (из высушенного сырья растительного происхождения, свежего сырья животного происхождения и высушенных грибов). Методика: высушенные плоды яблони лесной

измельчают, заливают спиртом этиловым и оставляют в закрытом сосуде, осуществляя ежедневное взбалтывание экстрагируемой массы при температуре не выше 20°C, на срок не менее 8 суток, после чего извлечение сливают, сырье отжимают, отжатую жидкость доливают к полученному извлечению и осуществляют фильтрацию.

В полученных настойках матричных гомеопатических проводили определение таких показателей как значение рН, плотность, сухой остаток по методикам ГФ XI изд. Установлено, что указанные показатели в настойках из свежих и замороженных плодов и листьев яблони лесной практически не различались. Матричные настойки из высушенных плодов и листьев характеризовались более высоким значением рН (4,32), а также сниженным в 1,5 раза значением сухого остатка, по сравнению с матричной настойкой из свежих плодов и в 1,45 раз из свежих листьев.

Результаты определения приведены в таблице 51.

*Таблица 51. Результаты определения сухого остатка, плотности и водородного показателя настоек матричных гомеопатических из листьев и плодов яблони лесной*

<b>Объекты исследования</b>	<b>рН</b>	<b>Плотность, г/мл</b>	<b>Сухой остаток, %</b>
НГМ свежих плодов яблони лесной	3,04	0,965	8,15 ± 0,14
НГМ из замороженных плодов яблони лесной	3,11	0,961	7,92 ± 0,10
НГМ из высушенных плодов яблони лесной	4,32	0,948	5,62 ± 0,11
НГМ из свежих листьев яблони лесной	3,52	0,964	9,75±0,16
НГМ из замороженных листьев яблони лесной	3,78	0,960	9,25±0,10
НГМ из высушенных листьев яблони лесной	4,51	0,957	6,74±0,13

При проведении качественного анализа БАВ методом тонкослойной

хроматографии с использованием методик, применяемых нами ранее при анализе исходного сырья, во всех изучаемых НМГ плодов и листьев яблони лесной идентифицированы хлорогеновая кислота, кофейная кислота, галловая кислота, яблочная кислота и лимонная кислота. Зоны адсорбции гиперозида, хлорогеновой и яблочной кислот на хроматограммах настоек из высушенных плодов и листьев яблони были менее интенсивными, чем на полученных в аналогичных условиях хроматограммах матричных настоек из свежего и замороженного сырья.

Анализ полифенольного комплекса настоек матричных гомеопатических осуществляли методом ВЭЖХ, в описанных ранее условиях. Полученные хроматографические профили идентичны хроматографическим профилям исходного сырья.

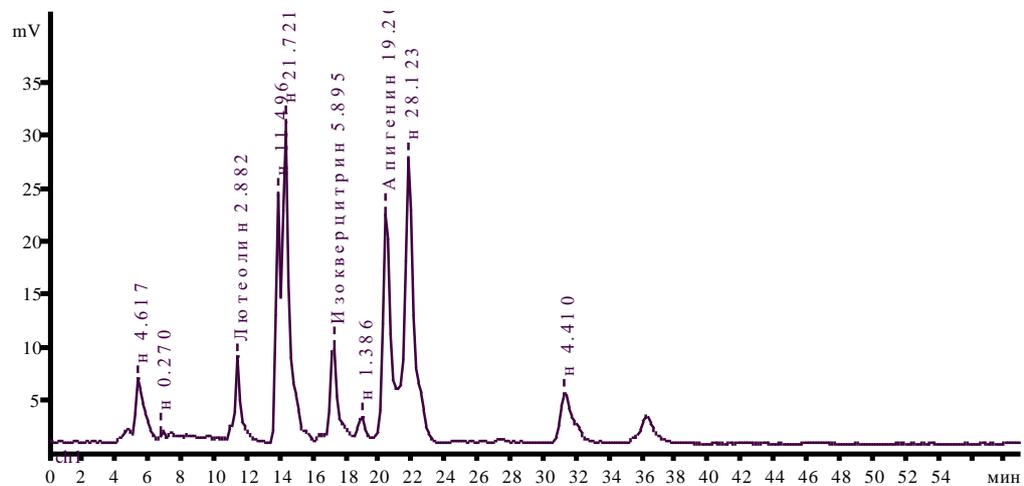


Рис. 39. – Хроматограмма НМГ из листьев яблони (370 нм)

Таблица 52. Компонентный состав НМГ из листьев яблони 370 нм

№	Время, мин	Площадь, мV*сек	Площадь, %	Название
1	5.282	171.01	4.62	Неидентифициров
2	6.747	9.99	0.27	Неидентифициров
3	11.32	106.74	2.88	Лютеолин
4	13.79	425.77	11.50	Неидентифициров
5	14.23	804.50	21.72	Неидентифициров
6	17.14	218.34	5.90	Исокверцитрин
7	18.86	51.34	1.39	Неидентифициров

8	20.37	711.13	19.20	Апигенин
9	21.74	1041.58	28.12	Неидентифициров
10	31.22	163.33	4.41	Неидентифициров

Рис.40. – Хроматограмма НМГ из плодов (2) яблони (370 нм)

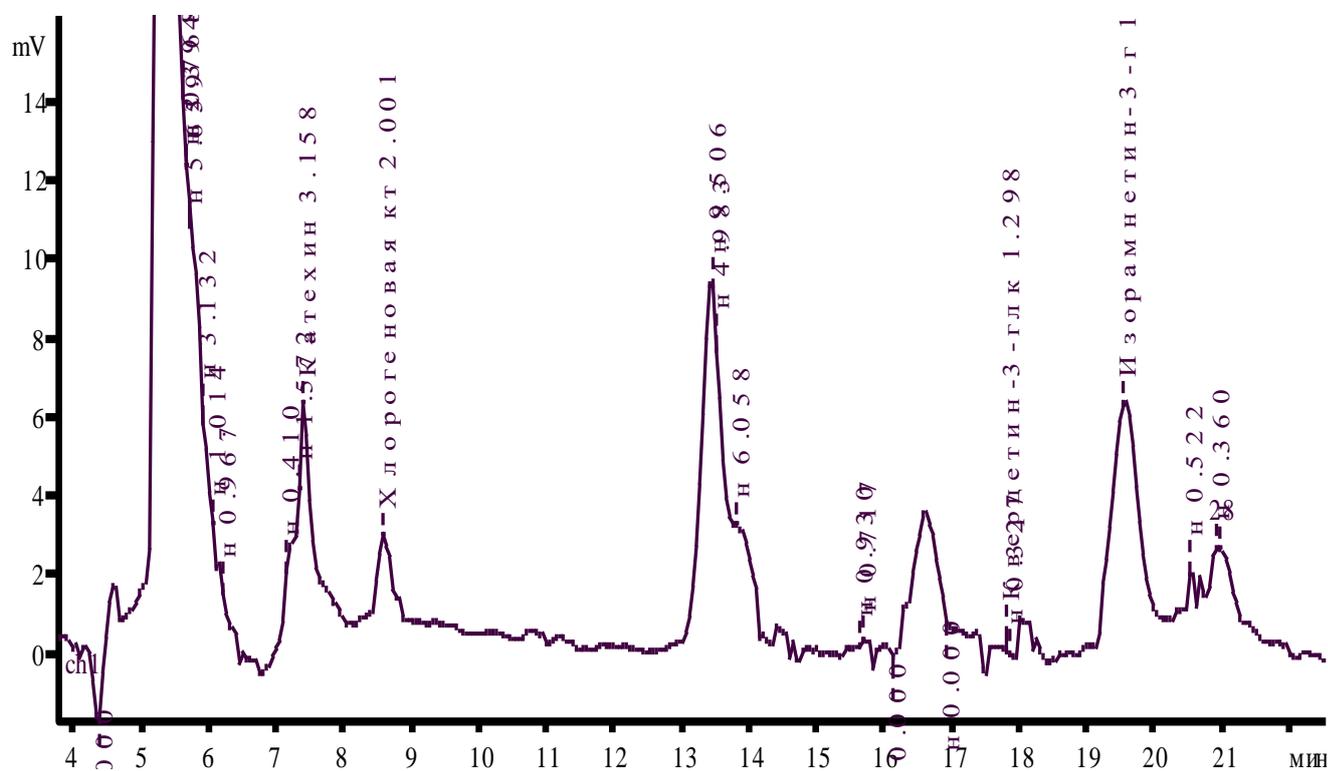


Таблица 53. Компонентный состав НМГ из плодов яблони 370 нм

№	Время, мин	Площадь, mV*сек	Площадь, %	Название
1	4.352	0.00	0.00	Неидентифициров
2	5.214	111.41	7.52	Неидентифициров
3	5.35	335.39	22.65	Галловая к-та
4	5.437	128.57	8.68	Пик5
5	5.56	58.63	3.96	Неидентифициров
6	5.631	11.37	0.7	Неидентифициров
7	5.645	35.46	2.39	Неидентифициров
8	5.702	83.80	5.66	Неидентифициров
9	5.863	46.38	3.13	Неидентифициров
10	6.039	15.02	1.01	Неидентифициров
11	6.156	14.31	0.97	Неидентифициров
12	7.122	6.07	0.41	Неидентифициров

13	7.299	23.28	1.57	Неидентифициров
14	7.361	46.76	3.16	Катехин
15	8.55	29.63	2.00	Хлорогеновая кт
16	13.41	140.77	9.51	Неидентифициров
17	13.49	73.79	4.98	Неидентифициров
18	13.79	89.71	6.06	Неидентифициров
19	15.63	13.77	0.93	Неидентифициров
20	15.66	10.62	0.72	Неидентифициров
21	16.11	0.00	0.00	Неидентифициров
22	16.89	0.00	0.00	Неидентифициров
23	17.81	19.22	1.30	Кверцетин-3-глк
24	17.83	4.85	0.33	Неидентифициров
25	19.53	164.89	11.13	Изорамнетин-3-г
26	20.51	7.73	0.52	Неидентифициров
27	20.88	5.33	0,36	Неидентифициров

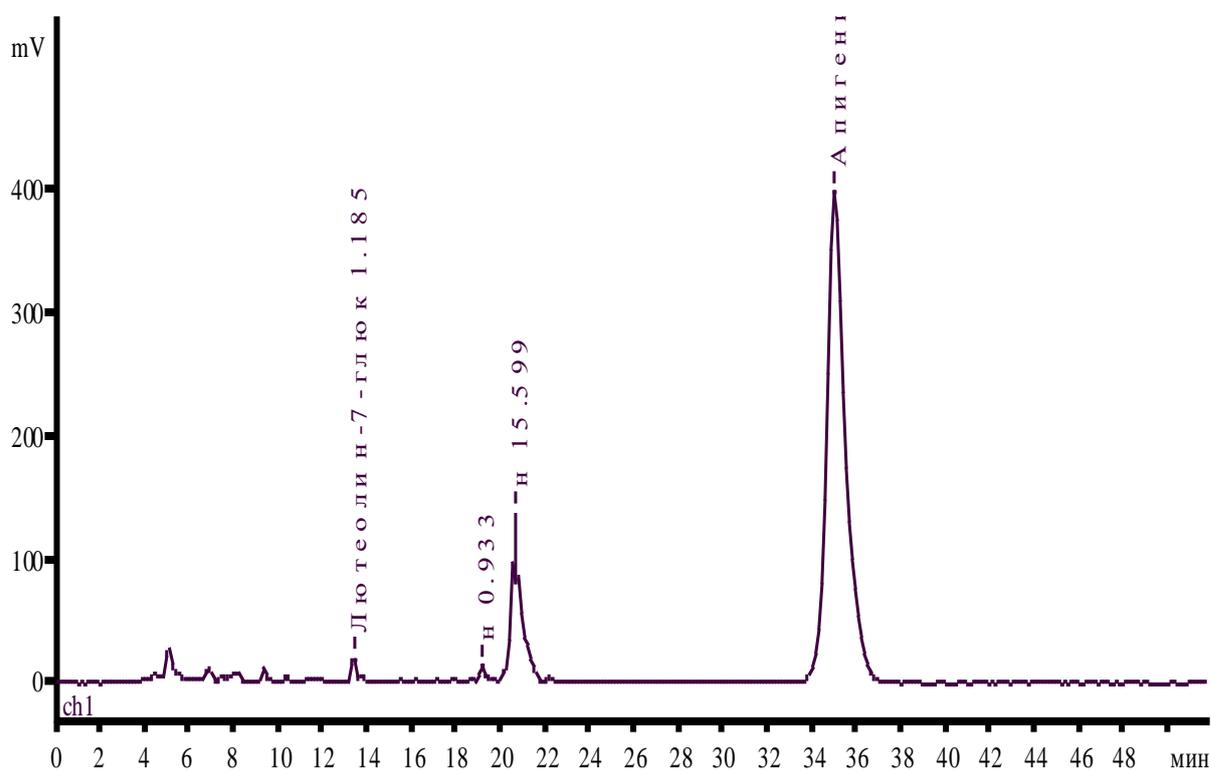


Рис.41. – Хроматограмма НМГ из листьев яблони (280 нм)

Таблица 54. Компонентный состав НМГ из листьев яблони 280 нм

№	Время, мин	Площадь, мV*сек	Площадь, %	Название
1	13,31	337.09	1.19	Лютеолин-7-глюк
2	19,10	265.41	0.93	Неидентифициров

3	20,55	4436.74	15.60	Неидентифициров
4	34,93	23403.64	82.28	Апигенин

Рис.9. – Хроматограмма НМГ из плодов (2) яблоки (280 нм)

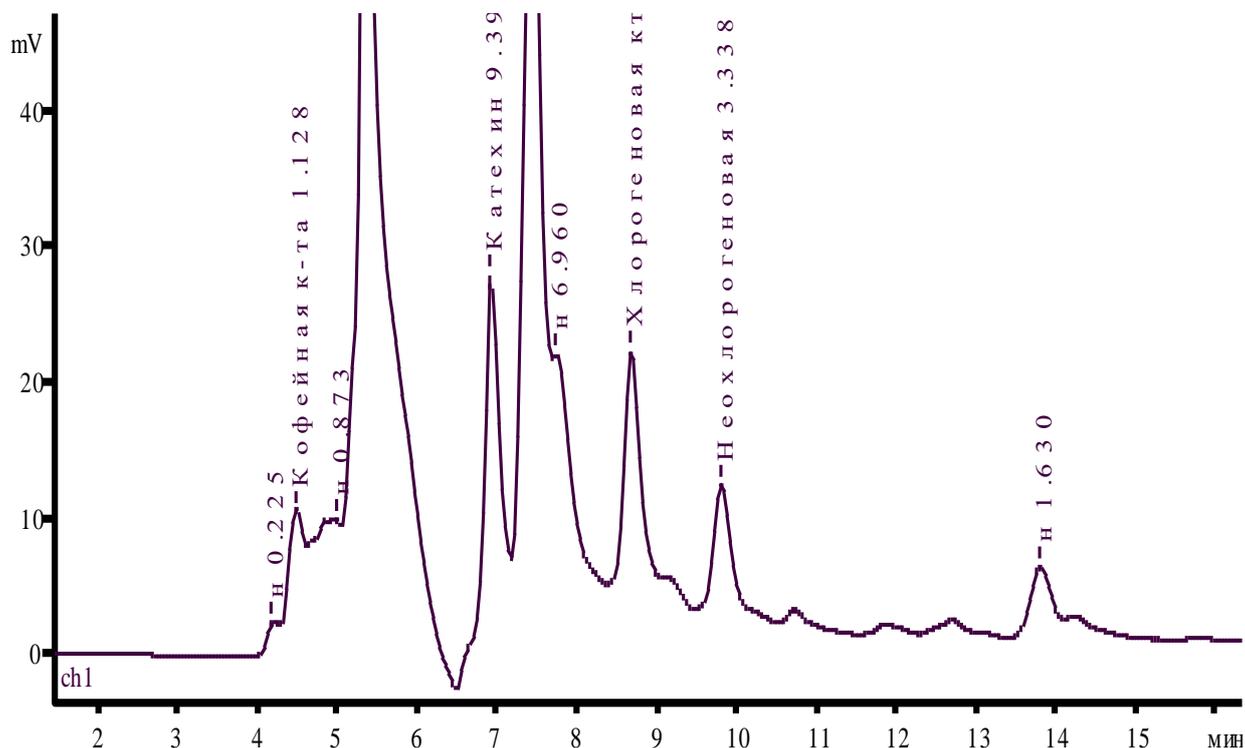


Таблица 42. Компонентный состав НМГ из плодов яблоки 280 нм

№	Время, мин	Площадь, mV*сек	Площадь, %	Название
1	4.154	10.17	0.22	Неидентифициров
2	4.444	51.04	1.13	Кофейная к-та
3	4.957	39.50	0.87	Неидентифициров
4	5.333	1642.77	36.29	Галловая к-та
5	6.898	425.34	9.40	Катехин
6	7.415	1077.71	23.81	Эпикатехин
7	7.716	315.05	6.96	Неидентифициров
8	8.657	226.74	5.01	Хлорогеновая кт
9	9.786	151.07	3.34	Неохлорогеновая
10	13.78	73.76	1.63	Неидентифициров
11	17.11	55.46	1.23	Неидентифициров
12	21.65	186.08	4.11	Неидентифициров
13	36.07	271.78	6.00	Неидентифициров

Количественное определения в полученных из листьев. Оценку количественного содержания основных групп БАВ (органических кислот, аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ и полисахаридов) в матричных настойках осуществляли по приведенным ранее методикам для анализа исходного сырья. Результаты исследования представлены в таблице 5.5.2.

Как видно из данных таблицы, матричная настойка из высушенных плодов и листьев яблони лесной по содержанию всех изучаемых групп БАВ значительно уступала настойке из свежего сырья. При этом нельзя с уверенностью утверждать, что данные различия связаны именно с качеством и свойствами высушенного растительного сырья. Вполне возможно, что сниженное содержание действующих веществ в гомеопатической настойке из высушенных плодов и листьев яблони лесной объясняется различиями в технологии получения матричных настоек из свежего и замороженного сырья (соотношение сырье-экстрагент для настоек из свежего сырья составляет 1:2, а из высушенного – 1:10).

Матричные настойки из замороженных плодов и листьев яблони лесной по содержанию органических кислот, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ, флавоноидов и полисахаридов практически не отличались от настоек из свежего и высушенного сырья, что позволяет рассматривать возможность использования замороженных плодов и листьев яблони лесной в качестве возможной замены свежему сырью при изготовлении настойки матричной гомеопатической.

Таблица 56. Количественное содержание БАВ в настойках матричных гомеопатических из листьев, плодов яблони лесной.

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

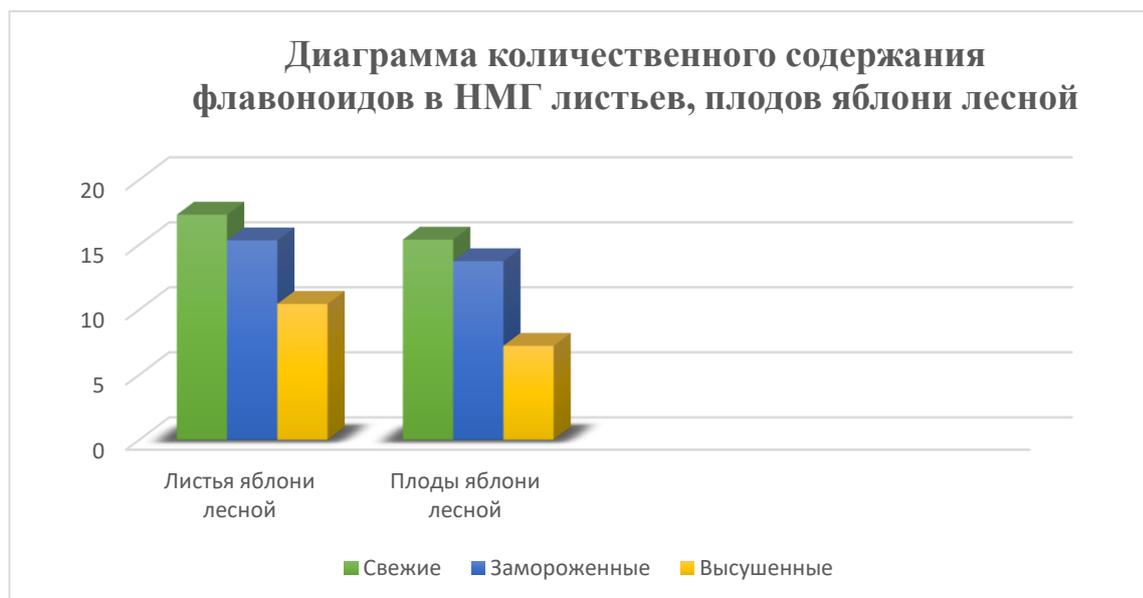
Диаграмма количественного содержания органических кислот в НГМ листьев, плодов яблони лесной



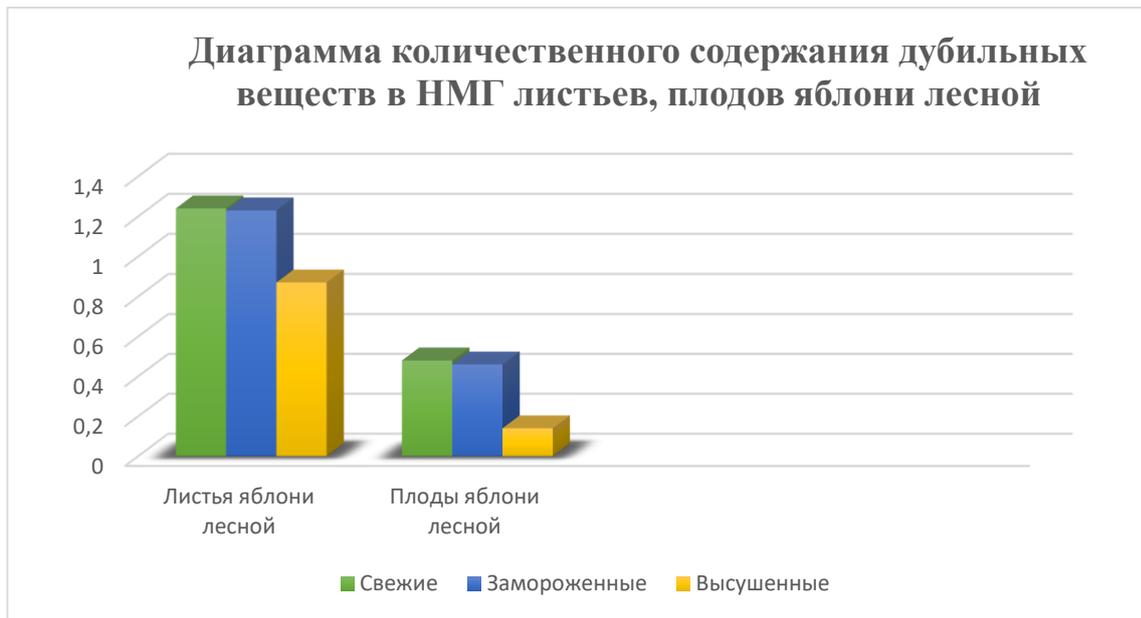
*Рис.43. Диаграмма количественного содержания органических кислот в НМГ листьев, плодов яблони лесной.*



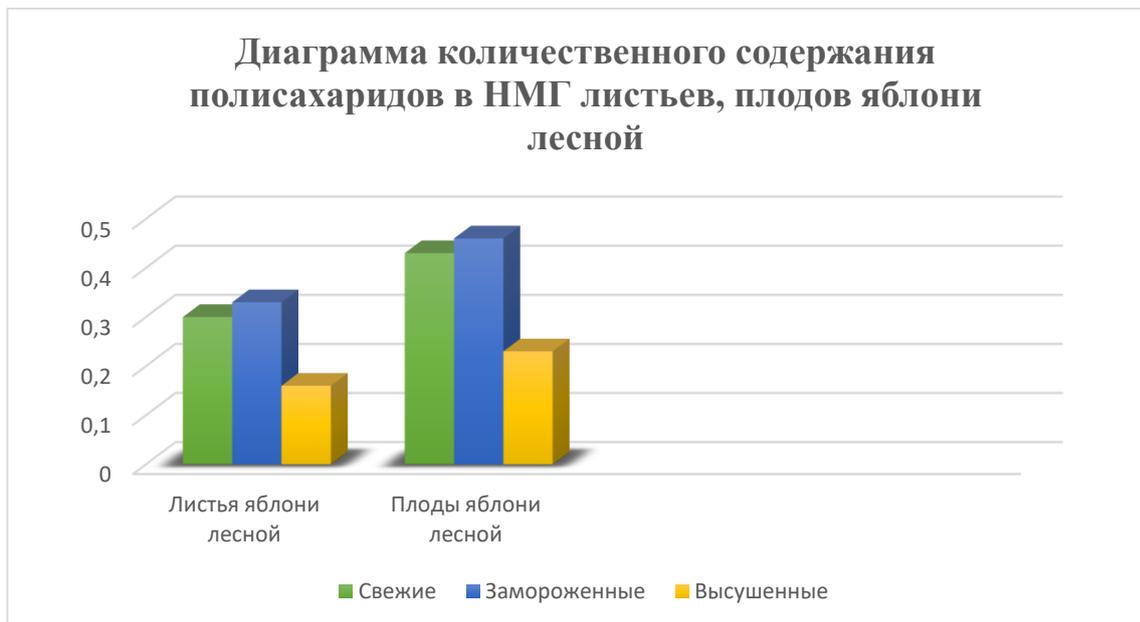
*Рис.44. Диаграмма количественного содержания аскорбиновой кислоты в НМГ листьев, плодов яблони лесной.*



*Рис.45. Диаграмма количественного содержания флавоноидов в НМГ листьев, плодов яблони лесной.*



*Рис.46. Диаграмма количественного содержания дубильных веществ в НМГ листьев, плодов яблони лесной.*



*Рис.47. Диаграмма количественного содержания полисахаридов в НМГ листьев, плодов яблони лесной.*

## **6.5. Получение и стандартизация сухого экстракта листьев и плодов яблони лесной.**

Учитывая данные научной литературы, характеризующие выбор оптимальных условий получения экстракционных препаратов из лекарственного растительного сырья, а также данные собственных экспериментальных исследований по изучению основных групп биологически-активных веществ листьев, плодов яблони лесной, нами была предложена технология получения сухого экстракта из данного сырья.

### **6.5.1. Изучение возможности получения сухих экстрактов из листьев и плодов яблони лесной.**

Воздушно сухое сырье – листья и плоды яблони лесной измельчали и осуществляли экстрагирование в соотношении сырье: экстрагент (спирт этиловый) 1:5 при постоянном перемешивании и нагревании с контролем оптимальной температуры на уровне 40°C в течение 120 минут. Полученное таким образом извлечение из исследуемых листьев, плодов яблони лесной отстаивали в прохладном месте в течение 2-3 суток, после чего проводили фильтрацию.

Технологический процесс изготовления сухого экстракта включал упаривание жидкого извлечения на роторно-вакуумном испарителе при поддержании температуры 40°C, т.е. в условиях традиционно применяемых при производстве сухих экстрактов [96]. Полученное таким образом сгущенное извлечение подвергали вакуумной сушке при температуре 36°C в течение суток. Полученные сухие экстракты из листьев и плодов яблони лесной представляли собой порошки желто-коричневого (плоды) и темно-коричневого цвета (листья) с приятным запахом и кисловатым вяжущим вкусом, хорошо растворимые в воде и спирте этиловом.

Количественное определение суммарного содержания флавоноидов осуществляли спектрофотометрическим методом путем сравнения с раствором

PCO Рутина. При осуществлении спектрофотометрического анализа сухих экстрактов листьев, плодов яблони лесной была проведена проверка значения аналитической длины волны, которую следует использовать для измерения оптической плотности исследуемых образцов. С этой целью были сняты спектры поглощения комплекса раствора исследуемых экстрактов листьев, плодов яблони лесной с хлоридом алюминия и комплекса рабочего стандартного образца 3-рутинозид кверцетина с раствором  $AlCl_3$  в интервале длин волн от 190 до 700 нм. Максимум поглощения комплекса 3-рутинозид кверцетина с алюминия хлоридом наблюдается при длине волны 416 Нм. Аналогичные максимумы наблюдались нами для комплексов, полученных при проведении реакции комплексообразования с хлоридом алюминия экстрактов листьев, плодов яблони лесной.

*Таблица 57. Показатели качества сухих экстрактов листьев, плодов яблони лесной*

<b>Показатели качества сухого экстракта</b>	<b>Сухой экстракт листьев яблони лесной</b>	<b>Сухой экстракт плодов яблони лесной</b>
Описание	Аморфный гигроскопичный порошок темно-коричневого цвета, слабого своеобразного запаха, с горьковатым сильно вяжущим вкусом	Аморфный гигроскопичный порошок желто-коричневого цвета, приятного запаха, с кисловатым вяжущим вкусом
Содержание влаги, %	2,37	3,02
Содержание тяжелых металлов, %	Менее 0,01	Менее 0,01
Суммарное содержание флавоноидов, мг/100г	13,74	15,40

Так же, с учетом требований статьи ГФ «Экстракты» нами проводилось определение подлинности, полученных сухих экстрактов и количественное определение суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин.

### 6.5.2. Разработка метода стандартизации сухих экстрактов из листьев, плодов яблони лесной

С использованием, предложенных для анализа исходного сырья-листьев и плодов яблони лесной, методик идентификации подтверждено содержание, присущих исходному сырью групп БАВ, а также проведено количественное определение, результаты которого представлены в таблице 58.

Таблица 58. Определение основных групп БАВ в сухих экстрактах листьев, плодов яблони лесной

Объекты исследования	Органические кислоты, %	Аскорбиновая кислота, мг/100г	Флавоноиды, мг/100г	Дубильные вещества, %	Полисахариды, %
Сухой экстракт плодов яблони лесной	0,45±0,06	23,17±0,05	15,40±0,04	0,48±0,03	0,43±0,05
Сухой экстракт листьев яблони лесной	0,40±0,04	21,09±0,02	13,74±0,02	0,46±0,02	0,46±0,03

Для включения в разрабатываемую документацию раздела «Количественное определение» нами предложена удобная и не требующая дорогостоящего оборудования методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, основные стадии которой представлены в таблице 59.

Таблица 59. Характеристика основных стадий методики количественного анализа суммы флавоноидов в экстрактах листьев, плодов яблони лесной

Характеристика стадии методики количественного определения суммы флавоноидов впересчете на рутин в сухом экстракте листьев, плодов яблони лесной	Проводимые действия
Взятие точной навески анализируемого экстракта листьев, плодов яблони лесной	Для проведения анализа отмеряется точная навеска (1 г) исследуемого экстракта листьев или плодов яблони лесной, которую вносят в мерную колбу объемом 50 мл
Извлечение суммы флавоноидов из исследуемых сухих экстрактов	К помещенному в колбу сухому экстракту добавляют 30 мл спирта этилового 70%, перемешивают до полного растворения исследуемого экстракта и доливают тот же экстрагент до метки (раствор А).
Отбор аликвоты для анализа	1 мл раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл
Проведение реакции комплексообразования с раствором алюминия хлорида для очистки исследуемого образца от возможного влияния примесных соединений	К отобранной аликвоте добавляют 1 мл 2% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, доводят объем до метки спиртом этиловым, тщательно перемешивают.
Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в сухих экстрактах листьев, плодов яблони	По истечении 20-30 минут с момента начала реакции комплексообразования проводят оценку показателя оптической

лесной	плотности исследуемого извлечения на спектрофотометре при длине волны 416 нм
--------	--

В ходе анализа нами использовался раствор сравнения, который готовили разбавляя в мерной колбе 25 мл этанола 70% аликвоты раствора А , взятой в объеме 1 мл.

Параллельно с анализом исследуемых экстрактов проводили измерение оптической плотности раствора СО 3-рутинозидкверцетина, полученным растворением 0,05 г стандарта в 50 мл этанола 70%, с последующим доведением объема до 100 мл с алюминия хлоридом, полученным аналогично исследуемому извлечению из листьев и плодов яблони лесной.

В процессе хранения и переработки листьев, плодов яблони есть вероятность микробного заражения сырья. С целью исключения возможного инфицирования пациентов, принимающих экстракт, нами было проведено испытание на микробиологическую чистоту, исследуемых экстрактов. Данные проведенного исследования показали присутствие в экстрактах листьев, плодов яблони лесной аэробных бактерий, не превышающее нормы общей статьи «Испытания на микробиологическую чистоту».

*Таблица 59. Результаты испытаний сухих экстрактов листьев, плодов яблони лесной на микробиологическую чистоту.*

Показатели	Норма	Сухой экстракт листьев яблони лесной	Сухой экстракт плодов яблони лесной
Общее количество аэробных бактерий в 1 г.	Не более $1 \times 10^7$	<10	<10
Escherichia coli в 1 г	Отсутствие	Отсутствие	Отсутствие

Salmonella spp в 1 г	Отсутствие	Отсутствие	Отсутствие
Энтеробактерии в 1 г	Не более $1 \times 10^2$	Отсутствие	Отсутствие
Общее число грибов в 1 г.	Не более $1 \times 10^4$	Отсутствие	Отсутствие

### 6.6. Изучение возможности создания сиропа плодов яблони лесной.

Учитывая широкое распространение в странах Евросоюза сиропа плодов яблони, применяемого в качестве общеукрепляющего средства и пищевой витаминной добавки (рис. 48), реализация которого осуществляется как в отделах натуральной продукции супермаркетов, так и в аптеках, нами была предложена технология получения сиропа из сока плодов яблони лесной.



Рис.48. Сироп яблони лесной производства республики Кипр.

Основным этапом получения сиропа плодов яблони лесной является извлечение субстанции - сока плодов яблони лесной, получаемого механической переработкой плодов яблони лесной свежих. Согласно литературным данным, технологические стадии получения натуральных фруктовых соков включают измельчение (реже дробление) предварительно вымытых плодов, выделение сока, осуществляемое из сочных плодов прессованием и последующая очистка выделенного из сырья сока. При осуществлении лабораторного получения сока из свежесобранных плодов яблони лесной нами осуществлялись следующие технологические стадии:

1. **Измельчение** отобранного и промытого сырья- *Fructus Mali sylvestris* *recons*: осуществление данной стадии технологического процесса должно обеспечивать разрушение клеток паренхимы плода не менее чем на 75%.

Измельчение плодов яблони лесной осуществляли с использованием измельчителя универсального «Кормилец», рекомендуемого для переработки мелких партий фруктов (яблоки, груши, айва и др.) По окончании измельчения

наличие разрушенных семян яблоки в полученной мезге составило 8,5% (при рекомендуемой норме не более 15%). С целью повышения выхода из обрабатываемого сырья сока перед осуществлением прессования мезги прогревали в температурном режиме до 75 С, поскольку нагревание фруктовой мезги способствует процессу денатурации, присутствующей в ней белковой фракции, что позволяет существенно увеличить сокоотдающую способность сырья.

#### 2. Прессование мезги плодов яблоки лесной:

С целью получения сока мезгу плодов яблоки лесной количественно переносили на домкратный рычажный пресс «SOK-6» в пищевые фильтровальные мешки. Вовремя осуществления прессования следили, чтобы не было смещения фильтровального мешка, а мезга из него не выходила. Выход сока яблоки лесной составил не менее 62%.

#### 3. Процеживание сока яблоки лесной:

Собранный из-под пресса сок яблоки лесной пропускали через сито из нержавеющей стали, применяемой в пищевой промышленности с отверстиями диаметром 0,75 мм или капроновое сито №18 с целью очистки сока от попавших при прессовании кусочков мезги, семян и других примесей.

#### 4. Фильтрация сока яблоки лесной:

Фильтрацию предварительно процеженного сока яблоки лесной осуществляли на фильтр-прессах «Прогресс», контролируя давление процесса на уровне 157,0 кПа.

#### 5. Консервирование сока яблоки лесной:

Полученный нами сок плодов яблоки лесной консервировали в соответствии с требованиями ГОСТ 32101-2013 «Консервы. Продукция соковая. Соки фруктовые прямого отжима. Общие технические условия» сорбиновой кислотой ГОСТ 32779-2014 «Добавки пищевые. Кислота сорбиновая Е 200», которую использовали в количестве 0,05% от массы полученного сока, разводя в расчетном количестве сока, нагретом до 80°C. Сок с добавлением сорбиновой

кислоты размешивали не менее 10 мин в сборнике с мешалкой, после чего сок дополнительно прогревали до температуры 75 °С и осуществляли на розлив.

Фасовка сока яблони лесной:

Для фасования сока яблони лесной применяли стеклянную тару, соответствующую требованиям ГОСТ 5717.1 ; 10117.2 объемом от 200 до 1000 мл.. Дополнительно прогретый до 75 °С сок яблони лесной расфасовывали и осуществляли стерилизацию полученного продукта.

Стерилизация сока яблони лесной:

Сок яблони лесной стабилизированный расчетным количеством кислоты сорбиновой стерилизовали в стандартной стеклянной таре при температуре 85 °С и давлении 118 кПа.

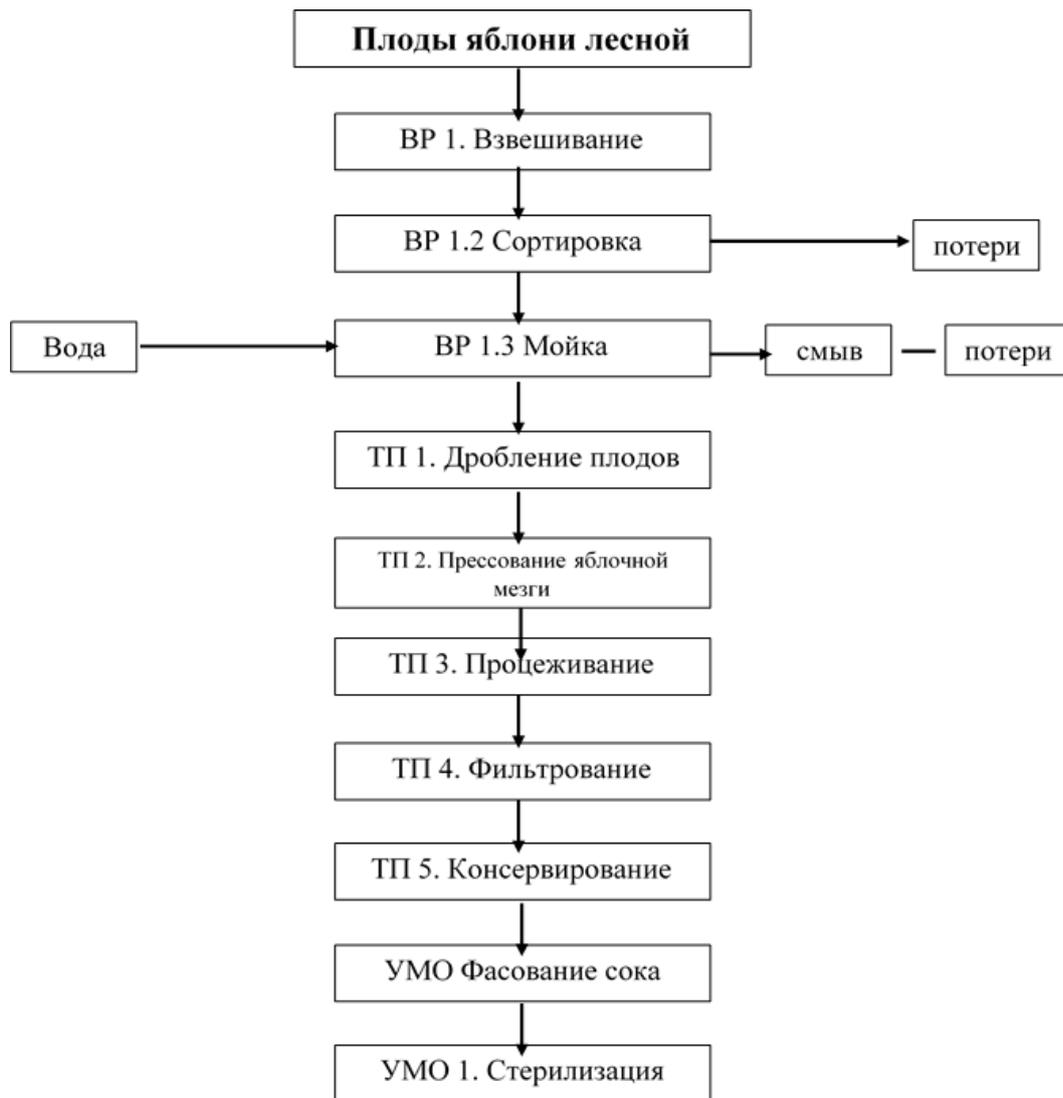
Конечный продукт -сок яблони лесной, полученный нами в соответствии с представленной выше технологической схеме представлял собой жидкость желтого цвета кисло-вяжущего вкуса, своеобразного свежего яблочного запаха.

Сгущение сока плодов яблони лесной осуществляли добавлением сиропа сахарного по ГФ Х (стр.624). Состав сиропа плодов яблони лесной представлен в таблице 60.

*Таблица 60. Состав сиропа плодов яблони лесной*

Компонент сиропа плодов яблони лесной	Рекомендуемое количество
Сок плодов яблони лесной сгущенный	5,0 г
Кислоты лимонной пищевой (ГОСТ 908-79)	0,5 г
Натрия бензоата (ФС 42-2458-94)	0,5 г
Сиропа сахарного (ГФХ)	До 100 мл

Рис. 49. Схема получение сока плодов яблони лесной для производства сиропа



Анализ показателей качества сиропа плодов яблони лесной осуществляли в соответствии с требованиями методики ГФ РФ XIII OFC.1.4.1.0012.15 «Сиропы». В качестве критериев доброкачественности анализируемого сиропа плодов яблони лесной использовали приведенные ниже показатели: описание, показатель преломления, плотность, подлинность, количественное содержание флавоноидов. На основании проведенных исследований были предложены показатели качества сиропа плодов яблони лесной, представленные в таблице 61.

Таблицам 61. Нормы и показатели качества сиропа плодов яблони лесной

Показатели качества	Регламентация методов, используемых при	Рекомендуемые нормы
---------------------	---	---------------------

	определении показателей качества	
Описание	ГФ РФ XIII OFC 1.4.1.0012.15 «Сиропы», том 1	Прозрачная коричневатозеленоватая густая жидкость, кисло-сладкого яблочного вкуса и специфического свежего запаха
Подлинность	Качественные реакции с железозаменимыми квасцами	Черно-синее окрашивание (дубильные вещества)
Показатель преломления	ОФС 1.2.1.0017.15 «Рефрактометрия»	1,452-1,455
Значение pH	ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия»	5,300-5,420
Плотность, г/мл	ОФС 1.2.1.0014.15 «Плотность»	1,325-1,330
Количественное содержание	ОФС 1.2.1.1.003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»	Рутин не менее 0,35%
Микробиологическая чистота	ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Категория 3А

Данные полученные нами при стандартизации сиропа плодов яблони лесной подтверждают, что разработанная лекарственная форма по всем нормам качества: описание, показатель преломления, значение pH, плотность, соответствует требованиям, предъявляемым к лекарственной форме сиропа.

## **ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6**

- 1.** В ходе проведенных исследований доказана возможность приготовления водных извлечений из высушенных, свежих и замороженных плодов, листьев яблони лесной. При сравнительном анализе, полученных из указанных видов сырья водных извлечений, установлено, что полученные из свежих и замороженных листьев, плодов яблони лесной водные извлечения по органолептическим показателям, содержанию сухого остатка, значению водородного показателя, а также по количественным характеристикам основных групп БАВ (флавоноиды, органические кислоты, дубильные вещества, полисахариды) аналогичны извлечениям из высушенного сырья.
- 2.** В ходе проведенных экспериментов установлена допустимость использования при изготовлении НМГ нового растительного сырья листья, плоды яблони лесной в высушенном, консервированном замораживанием виде, а также свежесобранного. При определении качественного состава и количественной оценке основных групп БАВ установлена идентичность качественного и количественного состава НМГ из листьев, плодов яблони лесной свежесобранных, а также подвергшихся консервации высушиванием или замораживанием.
- 3.** Разработана технология и осуществлена стандартизация сухих экстрактов из листьев, плодов яблони лесной.
- 4.** Предложена технология получения сиропа плодов яблони лесной и разработаны показатели качества для включения в планируемую НД.

## **ОБЩИЕ ВЫВОДЫ:**

1. Проведено информационно-аналитическое изучение научной литературы и патентной документации, необходимой для создания современных требований к качеству листьев, плодов яблон и лесной разных видов консервации.
2. Проведен анализ анатомо-морфологического строения цельного и измельченного ЛРС - плоды и листья яблони лесной свежих, замороженных и высушенных, на основании которого установлены основные диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию данного сырья и подготовлены рекомендации для включения в раздел «Определение подлинности», планируемой НД;
3. Проведено определение качественного состава и количественного содержания основных БАВ (флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, суммарного содержания полисахаридов и пектинов, арбутина) в листьях и плодах яблони лесной свежих, замороженных и высушенных; разработаны и апробированы методики подтверждения подлинности и оценки количественного содержания флавоноидов, содержание которых составило в свежих листьях до 2,51%, в замороженных листьях до 2,31%, в высушенных листьях до 1,15%, в свежих плодах до 0,94%, в замороженных плодах до 0,71%, в высушенных плодах до 0,21% и арбутина в свежих листьях до 4,02%, в замороженных листьях до 3,68%, в высушенных листьях до 2,51%, в свежих плодах до 1,16%, в замороженных плодах до 1,07 %, в высушенных плодах до 0,85%.
4. Проведено определение показателей качества плодов и листьев яблони лесной, установлены их нормы для включения в разрабатываемую НД. Учитывая подходы к анализу качества пищевого сырья, для плодов яблони лесной определен ряд технических характеристик, включая количественную оценку содержания пектина в сырье, а также определены показатели качества полученного нами пектина в сравнении с пектином яблочным, пищевым.

5. Изучено влияние используемого способа консервации листьев и плодов яблони лесной на показатели качества экстракционных препаратов на их основе. Выявлено, что содержание действующих веществ снижается незначительно при использовании высушенного сырья по сравнению с аналогичными показателями экстракционных препаратов из свежих и замороженных плодов и листьев.
6. Проведен анализ НМГ, полученных из свежих, замороженных, высушенных листьев и плодов яблони лесной, в ходе которого было подтверждено соответствие качественного состава НМГ и исходного сырья, а также осуществлено количественное определение органических кислот, аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ и полисахаридов.
7. Изучена антимикробная активность извлечений (настой, настойка и жидкий экстракт) из листьев, плодов яблони лесной. Установлено, что все изучаемые извлечения из листьев и плодов яблони лесной проявляют антимикробное действие в отношении 8 штаммов микроорганизмов. При этом, все исследуемые извлечения из листьев яблони лесной показывают достоверно более высокие результаты антимикробной активности, по сравнению с аналогичными извлечениями из плодов. На основании проведенных исследований получен Патент №2639119 Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью.

### **Практические рекомендации и предложения**

Результаты исследования расширяют спектр представлений о представителях рода *Malus* и позволяют эффективно и рационально использовать в медицине и фармацевтической практике новое ЛРС – листья и плоды яблони лесной.

Разработанные в ходе исследований подходы к стандартизации сырья могут быть использованы в учебном процессе по курсу «Фармакогнозия» для высших учебных заведений, в элективном курсе естественно-научных дисциплин в РЦ «МСП». Особо важным представляется, приводимое автором научное обоснование введения в отечественную номенклатуру листьев, плодов яблони лесной, что позволит расширить ассортимент российского ЛРС.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

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

### Список литературы

1. Абдулина С.Г. и др. Фармацевтический анализ / под ред.: Г.К.Будникова, С.Ю.Гармонова.М., 2013.С.316-319.
2. Абизов Е.А. Биологическое и химико-технологическое обоснование лекарственной ценности видов рода *Elaeagnus* L. (лох) интродуцированных в России (автореф.дис.док) - Москва, 2012
3. Абу Али Ибн Сина (Авиценна) 1081. Канон врачебной науки. 2-е издание: В 5 кн.: Пер.с арабского. Ташкент: «Фан» Книга II. С. 674-675
4. Абу Али ибн Сина, Канон врачебной науки, книга II, статья 734 Туффаяблоня; перевод с араб. Ю.Н. Заводовского и С.Мирзаева, изд. «Фан», Узбекская ССР, Ташкент 1982 г.
5. Аврач А. С.,Самылина И. А. ,Сергунова Е .В. Тонкослойная хроматография в анализе плодов лекарственных растений семейства Розоцветные. Фармация. -2014.-№2.-с.15-18 ;
6. Аврач А.С., Самылина И.А. Сергунова Е.В., Изучение фенольных соединений плодов и настоев малины обыкновенной различными способами консервации. Сеченовский вестник. -2014. - №1(15).-с.114-115
7. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов // Фармация. 2006. № 4. С. 8-12.
8. Атлас тибетской медицины/Пер.Т.А.Асеевой, Н.Д.Болхосоевой, Т.Г.Бухашеевой, Д.Б.Дашиева. - М.: Галарт,1994.
9. Афанасьева Л.В.→ Кашин В.К. Содержание микроэлементов в растениях→ *Vaccinium uliginosum* L.,→ произрастающих в Южном Прибайкалье→. Химия растительного сырья 2013, №2, С.195-200
- 10.Багирова В.Л., Лякина М.Н..Костенникова З.П. Флавоноиды в гомеопатических настойках кротегус. Фармация 2003.2.с.41-42
- 11.Баханова М.В., Анцупова Т.П. Химический состав плодов яблони ягодной в условиях Бурятии. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Том 19, №2 2017, с.416-119

- 12.Бахтеев Ф.Х. Важнейшие плодовые растения. – Москва. Просвещение 1970. 351 С.
- 13.Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М.: Техносфера, 2009. 472 с.
- 14.Библиотека им. В.И. Ленина отдел рукописей/ прохладный Вертоград. Фонд Ундольского ед.хр. 1337. XVII в.
- 15.Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения; под ред. А.П. Сергеева. М.: Мир, 1977. 239 с.
- 16.Богоявленский Н.А. Древнерусское врачевание в XI-XVII вв.М.,1960
- 17.Браиловская В.А.Лукьянчикова Г.И. Фотоколориметрическое определение арбутина в листьях толокнянки. Фармация.1972 №3 с.31-32
- 18.Бреднева Н.Д., Муравьев И.А. Разработка новой технологии производства настойки из свежесобранных плодов боярышника. Фармация, 1987 №4, С33-37
- 19.Бубенчикова В.Н., Сухомлинов Ю.А. Изучение состава фенольных соединений лапчатки прямостоячей методом ВЭЖХ// Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.- 2005.- 2С.160-161) (Хисямова Д.М. Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода лапчатка. Автореф. Дисс.к.фарм.н. Самара 2017
- 20.В. Рихтер История медицины в России СПб; 1814, Т 11, С 156,
- 21.Васильев К. Г., Григораш Ф. Ф. Очерки медицины и здравоохранения Латвии.М.,1964
- 22.Герасимова, И.В. Сырье и материалы кондитерского производства / И.В. Герасимова. – М.: Агропромиздат,1991. – 204 с.
- 23.Горбунцова Н.М., Федосеева Л.М.Горбикова О.А. Количественное определение арбутина в листьях бадана. Актуальные проблемы фармации.СБ.науч.тр. Барнаула, 1995.с.196-199.

24. Горячева, Г.Н. Особенности использования фруктово-ягодных полуфабрикатов / Г.Н. Горячева, Т.В. Савенкова, Ю.А. Тарасенко // Кондитерское производство. – 2006. – № 1. – С. 13.
25. ГОСТ Р 53041-2008. Изделия кондитерские и полуфабрикаты кондитерского производства. Термины и определения. М.: Стандартинформ, 2009. – 16 с.
26. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е издание – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
27. Государственная фармакопея СССР VII издание, Москва 1925 г., ст. 172, С.162
28. Григорьев А.В. Рентгенофлуоресцентный анализ растительных материалов, способы добавок и внешнего стандарта. Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена Выпуск № 144 / 2012: 82- 91.
29. Гринкевич Н.И., Сафронич.Л.Н. 1983. Химический анализ лекарственных растений. М.: «Высшая школа» 176.с.
30. Гринкевич Н.И., Кочкарева Т.Ф., Мухамеджанова Д.М. Распространение и запасы плодов вида *Rosa L.* На Западном Памире. Растительный ресурс, 1991. Т 27. Выпуск 1., с.78-82
31. Дейнека В.И., Сидоров А.Н., Кульченко Я.Ю., Дейнека Л.А., Тохтарь В.К., Дроголова Н.А. Антоцианы нетрадиционных растительных источников. С.259-264
32. Дроговоз С.М., Николаев С.М. Влияние полифенольных комплексов из растений на течение экспериментального гепатита. Фармация 1983, №4, стр.74-75.
33. Евдокимова О.В. Исследования по разработке и стандартизации таблеток плодов боярышника (автореф.дис.канд.), Москва 1996
34. Еремина А.В., Попков В.А., Дегтярева Е.А., Решетняк В.Ю. Биологически-активные вещества винограда: классификация, фармакологические

- эффекты, лекарственные препараты и БАД на их основе // Натуротерапия и гомеопатия- 2003, №4, с 27-30
35. Жизнь растений под ред. Академика АН СССР А.Л. Тахтаджана. Москва. Просвещение 1982. Т.5 (2), С.155
36. Загоскин Н.П. Врачи и врачебное дело в старинной Руси. СПб; 1891, С 47
37. Иванова Е.В., Сорокопудов В.Н. Морфологические особенности видов рода *Malus* (L.) Mill. При интродукции в условиях Белгородской области // Современные проблемы науки и образования. -2014.-№3 с.34-38
38. История фармация и организация фармацевтического дела. И.И. Левинштейн, Москва-Ленинград, 1939 год
39. Калошина Н.А., Денисенко О.Н., Мазулин А.В. Изучение арбутинсодержащего сырья во флоре юго-востока Украины.= Запорожье, 1989.-3с.=Деп. В НПО «Союзмедиформ» .10.04.89.№17506
40. Капранов В.А., Хашим Р., Мудрость веков; древняя таджикская медицина о сохранении здоровья. Душанбе: Ирфон, 1981. 2016 с.
41. Келимханова С.Е. Баелова А.Е. Кожамжанова А.С. Микроэлементный состав лекарственного растительного сырья как показатель его качества. - Вестник КазНМУ им.С.Д. –Асфендиарова. 1/0/-№4, вып.2.С.108-110.
42. Комментарии к четвертому изданию Российской Фармакопеи, Москва, типография Т.И. Гаген, Большая Лубянка, дом Кн.Голицина, 1893 г., С.414-416.
43. Кондейкина В.И., Огарева Н.П. Динамика содержания флоридзина в семенах и плодах яблони. Доклады ТСХА 1982. Вып.181, С.188-190
44. Копытько Я.Ф., Сокольская Т.А., Даргаева Т.Д. Регламентация качества настоек гомеопатических матричных и сырья для их изготовления в России и за рубежом. Традиционная медицина. 2010. № 23. С. 53-56. Kopyt'ko Ja.F., Sokol'skaja T.A., Dargaeva T.D. Reglamentacija kachestva nastoek go meopaticeskijh matricznych i syr'ja dlja ih izgotovlenija v Rossii i za rubezhom. Tradicionnaja medicina. 2010. № 23. S. 53-56.

45. Косенко Н.В. Состояние и прогноз рынка лекарственного растительного сырья. – Материалы 52-й региональной конференции по фармации, фармакологии и подготовке кадров. 1997г, С 110-112
46. Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., ДАДАЛИ Ю.В., Макаров В.Г. Фенольные соединения экстракта аронии черноплодной и его антиоксидантная активность. боярышника. Сб. научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» Москва 2018 с.301-305
47. Косман В.М., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н. Фитохимический анализ плодов облепихи крушиновидной российских сортов, культивируемых в Финляндии и содержащих их пищевых продуктов. Вопросы питания. 2009 №3. С. 38-42
48. Кочетова М.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография ряда фенольных и полифенольных соединений: Дис. к. х. н. М., 2003. - 126 с
49. Кристенсен Ян О.С. Улучшенный способ обработки растительного материала, содержащего пектин: пат.2336280 Российская Федерация. 2008.
50. Киселева Г.К. Особенности развития яблони различных сроков созревания/ Киселева Г.К., Ненько Н.И., Артюх С.Н. Плодоводство и виноградарство Юга России. 2010. №3. С.43-48
51. Кузьменко А.Н., Попков В.А. Определение карбоновых кислот лекарственных растениях методом ион-эксклюзионной хроматографии//Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2007, с.8-10
52. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Платонов И.А., Павлова Л.В. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной. Химия растительного сырья. 2015, №1. С 95-100
53. Левинштейн И.И. История фармации и организации фармацевтического дела. Москва, 139

54. Логвинова Е.Е. и др. Исследования химического состава плодов аронии различных сортов // Фармация, 2015 6 с. 22-26
55. Лучков Н.Г. Особенности роста и зазвития яблони в условиях вертикальной зональности/ Н.Г. Лучков, А.Р. Расулов, Р.Х. Кудяев, Г.А. Пономарева // Вестник РАСХН 2002, №2. С.47-50
56. Мазепина Л.С. Сравнительное фармакогностическое изучение грушанки круглолистной, зимолубки зонтичной, толокнянки обыкновенной. Автореф. дисс. канд. фарм. наук.-М., 2011.-24с.
57. Мазулин А.В. Изучение перспективных видов растений Юго-востока Украины для создания лекарственных средств. Автореферат дисс. Доктора фарм. наук. Москва 1994- 50с.
58. Мазулин А.В., Денисенко О.Н., Калошина Н.А. Новый метод количественного определения арбутина в растительном сырье. Запорожский мед. институт, 1989, 10 с. = Деп. В НПО «Союзмединформ» №18389.
59. Маковецкая Е.Ю., Максютин И.П. Исследования биологически активных веществ стеблей и шрота зверобоя после производства Новоиманина// Тезисы докладов республиканской научной конференции, Харьков 1991 - с.194-195
60. Матющенко Н.В., Степанова Т.А. Стандартизация плодов рябины, Фармация 2003, №5, С.16-20
61. Михеева Л.А., Тры А.В. Выделение пектина из растительного сырья и изучение его некоторых химических свойств // Вестник ВГУ. Серия: Химия, биология, фармация. 2013. № 2. С. 53–56.
62. Мотылева С.М., Кузнецов М.Н., Микроморфология листьев триплоидных иммунных к парше сортов яблони. // Современное садоводство. Совершенствование методов исследований. 2010. №1. С.72-78
63. Нестерова Н.В. «Разработка показателей подлинности и доброкачественности жома плодов яблони» /материалы республиканской

- научно-практической конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы образования науки и производства в фармации», Ташкент, ноябрь, 2015. С 56-58.
64. Нестерова Н.В. Анатомо-диагностические признаки жома и порошка жома плодов яблони лесной *Malus Sylvestris L.* И домашней *Malus Domestica Borkh.* Инновационные технологии в науке и образовании. VI международная научно-практическая конференция, Чебоксары. 2016, С. 92-95
65. Нестерова Н.В. Изучение адсорбционной способности и возможности совершенствованная рецептуры коктейлей для здорового питания *Magic of life.* Инновационные технологии в науке и образовании. VII международная научно-практическая конференция, Чебоксары. 2016
66. Нестерова Н.В. Изучение зависимости количественного содержание биологически активных веществ листьев яблони лесной и домашней от способов консервации. журнал «Здоровье и образование в XXI веке» ТОМ 19 (№8, 2017)
67. Нестерова Н.В., Абизов Е.А. Изучение сорбционной способности и фитохимический анализ жома плодов яблони лесной и домашней. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств, Москва. №4. 2015. С.40-47
68. Нестерова Н.В., Аглушевич А.В., Бирюкова Н.В. Формирование естественно-научного мышления учащихся на примере открытого урока «Сравнительный анализ плодов яблони лесной и домашней». В сборнике: Признание года 2018 сборник научных статей. Пенза, 2018. С. 83-87.
69. Нестерова Н.В., Е.А. Абизов. Фитохимическое обоснование перспектив использования порошка жома плодов яблони домашней зимних сортов созревания, журнал «Здоровье и образование в XXI веке», том 17, №1. С. 90-94.
70. Нестерова Н.В., Нестерова О.В., Аглушевич А.В. Идентификация ионов железа в фармакопейной прописи «Экстракт железа яблочнокислового»,

- полученного из плодов яблони лесной и домашней. В сборнике: Наука, образование, общество: тенденции и перспективы развития Сборник материалов IX Международной научно-практической конференции. Редколлегия: О.Н. Широков [и др.]. 2018. С. 61-63.
71. Нестерова Н.В., Полковников П.Р. Сравнительный анализ содержания пектина в плодах яблони ягодной, яблони лесной и рябины черноплодной/ В сборнике: WORLD SCIENCE: PROBLEMS AND INNOVATIONS сборник статей XXIII Международной научно-практической конференции. 2018. С. 268-271.
72. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Сравнительная оценка суммарного содержания дубильных веществ в листьях яблони лесной и домашней зимних сортов. Международная научно-практическая конференция «Научные исследования: теория, методика и практика», Чебоксары 2017, С 94-96
73. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Анализ содержания фосфолипидов в плодах яблони лесной. Материалы республиканской Материалы республиканской Научно-практической конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации, Ташкент, 2017. С. 64-66
74. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Влияние способа консервации на содержание биологически-активных веществ плодов яблони, Журнал «Фармация» 2017, т. 66, №3
75. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Влияние условий экстракции на выход фенольных соединений листьев яблони лесной и домашней. Международная научно-практическая конференция «Научные исследования: векторы развития», с 11-14, Чебоксары 2017
76. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Идентификация арбутина в листьях яблони домашней и лесной. Материалы республиканской Научно-практической

- конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации, Ташкент, 2016. С 34-47.
77. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Идентификация фенольных соединений в листьях яблони лесной (*Malus sylvestris* Mill.) Материалы V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине»
78. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Изучение качественного состава и показателей качества листьев яблони лесной и домашней. журнал «Здоровье и образование в XXI веке» 2016, №5, т 18, с. 251-258
79. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Определение арбутина в лекарственном растительном сырье DOI: <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-03-04> Год издания: 2018 Журнал «Фармация», выпуск 3., 2018 – ВАК
80. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Перспективы использования лекарственного растительного сырья *Malus Sylvestris* в гомеопатии. / «Развитие гомеопатического метода в современной медицине» Сборник материалов XXVI Московской международной гомеопатической конференции
81. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Разработка показателей качества настойки гомеопатической матричной плодов яблони лесной, Сборник материалов XXVII Московской международной гомеопатической конференции 27–28 января 2017 г.
82. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Разработка потенциометрического метода определения дубильных веществ настойки матричной гомеопатической плодов яблони лесной, «Развитие гомеопатического метода в современной медицине» Сборник материалов XXVIII Московской международной гомеопатической конференции, 26–27 января 2018 г
83. Нестерова Н.В., Самылина И.А., Бобкова Н.В., Кузьменко А.Н., И.И. Краснюк (мл.), Вестник московского университета. серия 2: химия ИФ

- (2016) – 0.521; SJR= 0.187. Количественное определение гидроксикоричных кислот и анализ динамики их накопления в листьях яблони лесной.
- 84.Нестерова Н.В., Самылина И.А., Кондрашев С.В. Сравнительный анализ микроэлементного состава яблони лесной и домашней методом рентгенофлуоресцентного анализа. Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке» 2019, Том 21, No 1, С. 80
- 85.Нестерова Н.В., Самылина И.А., Матюшин А.А. Изучение показателей качества пектина, получаемого из плодов яблони лесной (*Malus sylvestris* Mill.), материалы республиканской Материалы республиканской Научно-практической конференции (с международным участием) «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации, Ташкент, 2017. С.45-48
86. Онегин С.В. Фармакогностическое изучение верескп обыкновенного (*Calluna vulgaris* L.) Дисс. Канд.фарм.наук Ярославль,2008ю-2008-116 с.
- 87.Патент №2639119 Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью. Нестерова Н.В, Самылина И.А., дата Гос. Регистрации 19.12.2017
- 88.Петухова О.В. Фармакогностическое изучение листьев земляники лесной и садовой региона Урала. Автореферан дисс.на соиск уч.степени к.фарм.наук. 15.00.02, Пермь 2003.с.21.
- 89.Пищевая химия / А.П. Нечаев, С.Е. Траубенберг, А.А. Кочеткова [и др.]; под ред. А.П. Нечаева. – Изд-е 3-е,испр. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 640 с
- 90.Погребная В.Л., Алтуньян М.К., Улитин О.А. Способ получения яблочного пектина из яблочных выжимок:пат. 1399303 СССР. 1988.
- 91.Потанина О.Г., Самылина И.А. Анатомо-диагностические признаки цельных и измельченных плодов *Malus Pallasiana* Juz.Фармация 2002 №2 с.16-18;
- 92.Потрясай К.А., Копнин А.А., Даргаева Т.Д.,Маркарян А.А..Сокольская Т.А. Количественное определение арбутина в сырье рододендрона золотистого

- (*Rhjdodendron aureum Georgi.*) методом высокоэффективной жидкой хроматографии. Сибирский медицинский журнал, 2009, № 8, с.134-138
93. Приложение №2 к приказу №335 Минздравмедпрома России от 28.11.1995
94. Пьяникова, Э.А. Анализ потребительских, технических, функциональных свойств яблок, районированных в Курской области // Товаровед продовольственных товаров. – 2013. – № 9. – С. 67–71. ISSN 2074-9414. Техника и технология пищевых производств. 2015. Т. 38. № 3158
95. РАН (Москва, 27 октября 2016 г.). М.: ВНИИМП им. В.М. Горбатова. С. 192–195. Церевитинов Ф.В. Химия и товароведение свежих плодов и овощей. М.: Госторгиздат, 1949. Т. 1. 619 с.
96. Редико Е.Э. Анализ и стандартизация полифенольного комплекса листьев и жомы плодов черной смородины. Автореферат диссертации на соискание уч. степени канд. фарм. наук. Москва 2009.
97. Родина С.Ф., Симагин В.С., Схороход Т.В. Пищевая ценность плодов *Radus avium* Mill. и *Radus virginiana* (L.) Mill. и продуктов их переработки в связи с перспективами культивирования. Растительные ресурсы. 1993. С.49-55
98. Рогачкова Е.И., Нестерова Н.В., Аглушевич А.В., Бирюкова Н.В. Анализ современного состояния методов контроля качества нитритов и нитратов в плодах яблони разных сортов. В сборнике: Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации сборник статей XVI Международной научно-практической конференции. Пенза, 2018. С. 237-241.
99. Руденко О.С., Ибрагимова М.М., Кондратьев Н.Б., Керби О.А., Савенкова Т.В.; Способ определения массовой доли яблочного пюре в мармеладе и жележном корпусе конфеты: пат. 2492469 Рос. Федерация: МПК G01N33/02 / заявитель и патентообладатель Российская академия сельскохозяйственных наук Государственное научное учреждение научноисследовательский институт кондитерской промышленности (ГНУ

- НИИКП). – № 2012125209/15; заявл. 19.06.2012; опубл. 0.09.2013, Бюл. № 25.
100. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. М.: Брандес-Медицина, 1998. – 340 с.
101. Румянцева; Г.Н. Сравнительное действие различных ферментных препаратов при получении яблочного пектина / Г.Н. Румянцева, О.А. Варфоломеева // Междунар. 137 науч.-практич. коти́ф. ГУ ВЬИТИ ММС и ППЖ РАСХЫ: материалы.- Волгоград, 2003.-С. 35-36.
102. Рылина Е.В. «Определение индикаторных фенольных соединений нефлавоноидной природы в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ» Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Москва, 2010
103. Савельев Н.И., Леонченко В.Г., Макаров В.Н., Жбанова Е.В., Черенкова Т.А. Ю. Биохимический состав плодов и ягод и их пригодность для переработки. / Мичуринск, 2004. - 124 с.
104. Саканян Е.И., Сакаева И .В., Рукавицына Н.П., Лякина М.Н., Антонова Н.П., Постоюк Н.А. ВОПРОСЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ СВЕЖЕГО ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, Фармация, 2015
105. Саламатов А.А. "Разработка комплексной технологии биологически активных веществ из шрота яблок и лекарственных форм на их основе.". Автореферат диссертации на соискание ученой степени к.фарм.наук. Курск 2009.
106. Саламатов А.А., Аванесян А.А. Разработка технологии капсулированной лекарственной формы на основе водного извлечения из шрота яблок \\ 66 Открытая научно-практическая конференция молодых ученых ВолГМУ с международным участием (23-25 апреля 2008) .- Волгоград ,2008.-с.275-276.

107. Самылина И. А., Киселева Т. Л. Изучение химического состава нефармакопейных видов боярышника и оценка их фармакологической активности. Фармация 1990, 1, с.12-18
108. Самылина И.А., Нестерова Н.В. «Исторический опыт и перспективы использования сырья яблони в медицине и фармации» /журнал «Здоровье и образование в XXI веке» 2015, №4, т 17, с. 251-258
109. Санчжей Чжамцо. Практическое руководство по тибетской медицине Лхан - Тхабс/Пер. А.А.Кособурова.- Улан - Удэ: Республиканская типография,1997.
110. Сергунова Е.В. Исследования по стандартизации плодов шиповника/Е.В. Сергунова, А.А.Сорокина//Фармация.-2011.-№5.-с.12-15
111. Сергунова Е.В. Изучение состава биологически-активных веществ лекарственного растительного сырья различных способов консервации и лекарственных препаратов на его основе. Автореферат диссертации на соискание ученой степени д.ф.н. Москва, 2016
112. Симонян А.В., Саламатов А.А., Аванесян А.А.. Разработка рациональных лекарственных форм на основе биологически активных веществ из шрота яблок. Материалы 14 международной фармацевтической выставки "Аптека-2007".,М.,2007.С. 147-149.
113. Табаторович А.Н.,Резниченко И.Ю.Особенности химического состава яблочного пюре как основа идентификации. ISSN 2074-9414. Food Processing: Techniques and Technology.2015.Vol.38.N 3.p.153-159
114. Таланов А.А. Фармакогностическое изучение голубики болотной (*Vaccinium uliginosum* L.) Дисс.канд.фарм.наук.Ярославль,2013-176 с.
115. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Введ. 2002-11-01. М.: Изд-во стандартов, 2002. 2-6 с.
116. Тринеева О.В., Сафонова И.И, Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. Идентификация органических кислот методом ТСХ в извлечениях из

- растительных объектов. Сорбционные и хроматографические процессы 2013.т.13. Вып.6, с.ю 896-898
117. Трофимова С.В. Фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. Из флоры Башкортостана: дисс.к.фарм.наук: 14.04.02.Пермь,2014-161 с
118. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО *GRATAEGUS SANGUINEA* RALL. ИЗ ФЛОРЫ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН МЕТОДОМ ВЭЖХ Трофимова С.В., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Иванова С.П., Хафизова Р.Р. В сборнике: Современная медицина и фармацевтика: анализ и перспективы развития VIII Международная научно-практическая конференция. 2013. С. 36.
119. Трунов Ю.В.,Цуканова Е.М.,Ткачев Е.Н.,Сергеева Н.Н.,Якуба Ю.Ф. Изучение влияния условий питания на содержание аминокислот в листьях яблони НТП: земледелие и растениеводство.с.23-28
120. Тутельян В. А., Лашнева Н. В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты: распространенность, пищевые источники, биодоступность // Вопросы питания. 2008. №77 (1). С. 4 19:
121. Федосеева Л.М. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* L.), произрастающего на Алтае. Химия растительного сырья. 2003, №1 с.73-77
122. Федосеева Л.М., Малолеткина Т.С. Выделение некоторых фенольных соединений и идентификация арбутина зеленых листьев бадана // Химия растительного сырья.1999 №3 с.109-111.,
123. Широглазова Л.П. Качественный и количественный состав минеральных веществ плодов *Rubus*, произрастающих на территории Красноярского края. Науки о жизни: от исследований к практике.

Материалы I научного форума молодых ученых. Барнаул, изд. алт. ун-та.  
С.45-46

124. ФСП 42-2793-97 "Полифепан"
125. Хасанова С. Р., Кудашкина Н. В., Еникеева К. И., Андреева П. А., Свирская М. В. Сравнительный анализ содержания флавоноидов в плодах некоторых видов боярышника. Сб. научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» Москва 2018 с.383-386.
126. Химический состав пищевых продуктов. Справочные таблицы содержания основных пищевых веществ и энергетической ценности пищевых продуктов. Книга I. М., 1987. - С. 72-73.
127. Химический состав российских пищевых продуктов: справочник / под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 235 с.
128. Чупарина Е.В. Мартынов А.М. Жапова О.И. Рентгенофлуоресцентный анализ лекарственных растений Восточной Сибири / Всероссийское совещание «Современные проблемы геохимии» 24- 27 октября 2012. С.157.
129. Чупарина Е.В., Гуничева Т.Н. Состояние и проблемы рентгенофлуоресцентного анализа растительных материалов. Аналитика и контроль. 2004; 8 (3): 211-226.
130. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. "Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека ", М. ТрансЛит 2009. с.52- 63.
131. A. Schieber, P. Keller, R. Carle. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A. 910 (2011) 265-273
132. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. J Agri Food Chem 2001;49:3606e13

133. Alonso RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. Online characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A* 2004;1046:89e100.
134. Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in food additive specifications. Combined Compendium of Food Additive Specifications FAO JECFA. Monographs 1, Volume 4. Rome, 2006 (FHP).
135. B.Boros,S.Jakabova,T.Madarasz,R.Molnar,B.Galambosi, F.Kilar,A.Felinger, A.Farkas. Validated HPLC Method for Simultaneous Quantitation of Bergenin, Arbutin and Gallic Acid in Leaves of Different *Bergenia* Species /*Chromatographia* 2014 DOI 10.1007
136. Beuerle T., Schreier P., Schwab W. (R)-3- Hydroxy-5( Z )- octenyl b-D- glucopyranoside from *Malus sylvestris* fruits// *Nat.Prod.Lett.* 1997 Vol.10, N2.P.119-124
137. Beuerle T.,Schreier P.,Schwab W. 1997 (R-)-3-Hydroxy-5(Z)-oktenyl b-D- glucopyranoside from *Malus sylvestris* fruits // *Nat.Prod.Lett.* Vol.10,N 2.P.119-124; *Chem. Abstrs.*1997, Vol.127 .N 188241.
138. Biedrzycka E, Amarowicz R. Diet and health: apple polyphenols as antioxidants. *Food Rev Int* 2008;24:235e51.
139. Bylund D., Norström S.H., Essén S.A., Lundström U.S. Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2007;1176:89–93. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.064. [PubMed] [CrossRef]
140. C.Gosch H.Halbwirth J.Kuhn S.Miosic "Biosynthesis of phlorizidin in apple (*Malus domestica* Borkh.)" *Plant Science* vol.176 no 2 pp.223 -231 2009
141. C.Gosch H.Halbwirth J.Kuhn S.Miosic "Biosynthesis of phlorizidin in apple (*Malus domestica* Borkh.)" *Plant Science* vol.176 no 2 pp.223 -231 2009

142. Carlo Andreotti, Guglieimo Costa, Dieter Treutter «Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment »/ *Scientia Horticulturae* 109 (2006) 130-137
143. Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chem* 2007;100:1044e8.
144. Chaudhary P, Shukla SK, Kumar IP, Namita I, Afrin F, Sharma RK. Radioprotective properties of apple polyphenols: an in vitro study. *Mol Cell Biochem* 2006;288:37e46.
145. Cinquanta L., Di Matteo M., Estia M. Physical pre-treatment of plums (*Prunus domestica*). Part 2. Effect on the quality characteristics of different prune cultivars. *Food Chem.* 2002;79:233–238. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00138-3. [CrossRef]
146. Cui T., Kozo N., Ma L. et al. Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear // *Journal of agricultural and food chemistry* . - 2005. - vol. 53, №10, - P. 3882-3887
147. D.Stojiljkovic, I.Arsic, V.Tadic. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.)Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals, *Industrial Crops and Products* 80 (2016),165-176
148. Dai J., Mumper R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* 2010;15:7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
149. Eberhardt M., Lee C., Liu R.H. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 2000;405:903–904. doi: 10.1038/35016151. [PubMed] [CrossRef]
150. Es-Safi N.E., Guyot S., Ducrot P.H. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:6969–6977. doi: 10.1021/jf061090f. [PubMed] [CrossRef]

151. Fang N., Yu S., Prior R.L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:3579–3585. doi: 10.1021/jf0201327. [PubMed] [CrossRef]
152. Feng XJ, Cao XL, Li Y, Yu XH, Hu GH. Applications of phloridzin and recent advances of its separation and purification. *J Beijing Technol Bus Univ* 2008;26:13e6.
153. Giomaro G., Karioti A., Bucchini A., Giamperi L., Ricci D., Fraternali D. Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy) *Chem. Cent. J.* 2014;8:45. doi: 10.1186/1752-153X-8-45. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
154. Gruz J., Novák O., Strnad M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chem.* 2008;111:789–794. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.05.014. [CrossRef]
155. Guo S, Duan JA, Tang YP, Zhu ZH, Qian YF, Yang NY, Shang EX, Qian DW. Characterization of nucleosides and nucleobases in fruits of *Ziziphus jujuba* by UPLC-DAD-MS. *J Agric Food Chem* 2010;58:10774e80
156. Hagen S.F., Borge G.I., Bengtsson G.B., Bilger W., Berge A., Haffner K., Solhaug K.A. Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh. Cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biol. Technol.* 2007;45:1–10. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.02.002. [CrossRef]
157. Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C.W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A.B., Haffner K., Baugerod H., Andersen L.F., et al. A systematic screening of total antioxidant in dietary plants. *J. Nutr.* 2002;132:461–471. doi: 10.1093/jn/132.3.461. [PubMed] [CrossRef]
158. He X, Liu RH. Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 2008;56:9905e10.

159. Hyson DA. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Adv Nutr* 2011;2:408e20.
160. Jaiswal R., Karakose H., Ruhmann S., Goldner K., Neumuller M., Treutter D., Kuhnert N. Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by HPLC/MS and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:12020–12031. doi: 10.1021/jf402288j. [PubMed] [CrossRef]
161. Jedrychowski W, Maugeri U, Pac A, Sochacka TE, Galas A. Reduced risk of colorectal cancer and regular consumption of apples: hospital based case-control study in Poland. *Cent uropean J Med* 2009;4:320e6.
162. Jiang H.,Guo f.,Zhang L.,Chen Y.,Li S.,Yang F.Comparison of arbutin contents from *Bergenia purpurascens* in Yunnan/ China *J.MateriaMedica* 2010, 35(14) p. 1812-1814.
163. Karonen M., Loponen J., Ossipov V., Pihlaja K. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2004;522:105–112. doi: 10.1016/j.aca.2004.06.041. [CrossRef]
164. Khanizadeh S., Tsao R., Rekika D., Yang R., Charles M.T., Rupasinghe V. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Compos. Anal.* 2008;21:396–401. doi: 10.1016/j.jfca.2008.03.004. [CrossRef]
165. Kromhot D. Diet and cardiovascular deseases *J. Nutr.Health Aging* 20001,v.5,p144-149.
166. Lee J., Jeong M.C., Ku K.H. Chemical, physical, and sensory properties of 1-MCP-treated Fuji apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits after long-term cold storage. *Appl. Biol. Chem.* 2017 doi: 10.1007/s13765-017-0288-6. [CrossRef]
167. Leontowicz M, Gorinstein S.,Leontowicz H.,Lojec " Apple and pear peel and pulp and theirinfluence on plasma lipids andantioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets"/ *.J.Agric.FoodChem/2003,51, 5780-5785.*

168. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis r., Kviklys D., Uselis N., Janulis V. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves. The Scientific World Journal Volume 2014, Article ID 306217, 10.
169. Lin L.Z., Harnly J.M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:1084–1096. doi: 10.1021/jf062431s. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
170. Lu Y, Foo LY. Identification and quantification of major polyphenol in apple pomace. *Food Chem* 1997;59:187e94.
171. M.Liaudanskas, P.Viskelis,R.Raudonis, D. Kviklis, N. Uselis and V.Janulis "Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves ". The Scientific World Journal Volume 2014, ID 306217 ,p.155
172. M.Liaudanskas, P.Viskelis,R.Raudonis, D. Kviklis, N. Uselis and V.Janulis "Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves ". The Scientific World Journal Volume 2014, ID 306217 ,p.155
173. M.Petkovsek A.Slatnar F.Stampar and R.Veberic " The influence of organic integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over f 2-year period": *Journal of the Science of Food and Agriculture/* vol.90/no. 14 pp. 2366 - 2378. 2010.
174. Manzoor M., Anwar F., Saari N., Ashraf M. Variations of Antioxidant Characteristics and Mineral Contents in Pulp and Peel of Different Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars from Pakistan. *Molecules.* 2012;17:390–407. doi: 10.3390/molecules17010390. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
175. March R.E., Miao X.S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004;231:157–167. doi: 10.1016/j.ijms.2003.10.008. [CrossRef]
176. Mulinacci N."Полифенолы в яблоках" *J.Chromat.*2001,v.913.p.37-43

177. Naczk M., Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits, and vegetables: Occurrence,-extraction and analysis // Journal of Pharmaceutical' and Biomedical' Analysis. 2006. №41. P. 1523-1542.
178. Nakajima Y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions // Life Sciences. 2007. № 80. P. 370-377.
179. N. V. Nesterovaa, \*, I. A. Samylinaa, A. N. Kuzmenkoa, I. A. Kuzmenkoa, I. I. Krasnyuk, Jr.a, and A. A. Evgrafov, Вестник московского университета. серия 2: химия ИФ (2016) – 0.521; SJR= 0.187 Quantitative Determination of Arbutin in *Malus sylvestris* Leaves by High-Performance Liquid Chromatography.
180. Nakatani N., Kayano S., Kikuzaki H., Sumino K., Katagiri K., Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) J. Agric. Food Chem. 2000;48:5512–5516. doi: 10.1021/jf000422s. [PubMed] [CrossRef]
181. Navarro M., Lebron R., Quintanilla J.E., Cueva C., Hevia D., Quesada S., Gabriela Azofeifa G., Moreno M.V., Monagas M., Bartolome B. Proanthocyanidin Characterization and Bioactivity of Extracts from Different Parts of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw) Antioxidants. 2017;6:12 doi: 10.3390/antiox6010012. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
182. Navarro M., Moreira I., Arnaez E., Quesada S., Azofeifa G., Alvarado D., Monagas M.J. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. Plants. 2017;6:50 doi: 10.3390/plants6040050. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
183. Noratto G., Porter W., Byrne D., Cisneros L. Identifying Peach and Plum Polyphenols with Chemopreventive Potential against Estrogen-Independent

- Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:5219–5226. doi: 10.1021/jf900259m. [PubMed] [CrossRef]
184. Nunes C., Guyot S., Marnet N., Barros A.S., Saraiva J.A., Renard C.M., Coimbra M.A. Characterization of plum procyanidins by thiolytic depolymerization. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56:5188–5196. doi: 10.1021/jf8006135. [PubMed] [CrossRef]
185. Oliveira A.P., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentao P., Seabra R.M., Silva B.M. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf // *Food Chemistry*. 2008. № 111. P. 393-399.
186. Ooi L.S., Wang H., He Z., Ooi V.E. Antiviral activities of purified-compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae) // *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. № 106. P. 187-191.
187. Padda M.S., Picha D.H. Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes // *Scientia Horticulturae*. 2008. №149: P. 17-20.
188. Papetti A., Daglia Mi, Aceti C., Sordelli B., Spini V., Carazzone C., Gazzani G. Hydroxycinnamic acid' derivatives occurring in *Cichorium endivia* vegetables // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008. № 48. P. 472-476.
189. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in Bearberry ( *Arctostaphylos uva-ursi* ) Leaves by High- Performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* 12 ,2001 p.336-339/
190. Parmar V.S. et al. 1984 .Polyphenols of the heartwood of *Malus sylvestris* Mill. \ Indian J.Pharm. Sci.Vol.46 N 5.P.189-190 , R.Tsao,R.Yang,J.Young,H/Zhu Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC) \ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Volumt 51 Issue 21 8 October 2003,P.6347-6353

191. Perrone D., Farah A., Donangelo C.M., Paulis T., Martin P R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars // *Food Chemistry*. 2008. № 106.P: 859-867.
192. Ph.Eur.2012: European Pharmacopoeia , 8 edition.Strasbourg (FR): Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe (EDQM), 2012. Pp 1162-1163.
193. Philip G. Crandall, Louise Wicker. Pectin Internal Gel Strength: Theory, Measurement, and Methodology. Final Report of the IFT Committee, Pectin Standartization. *Food Technology*. 1959, V. 13, pp. 496–506.
194. Pinelli P., Agostini F., Comino C., Lanteri S., Portis E., Romani A\ Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves // *Food Chemistry*. 2007. № 105. P. 1695-1701.
195. Poyrazoh^E., Gokmen V., Artik N. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates. (*Punica granatum L.*) Grown in Turkey // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002. № 15. P. 567-575.
196. Prior R., Cao G. Фитоантиоксиданты во фруктах и овощах; влияние на здоровье.Hort. Sci. 2000,p.588-592.
197. Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységú L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011;50:586–621. doi: 10.1002/anie.201000044. [PubMed] [CrossRef]
198. R.P. Feliciano, C. Antunes, A. Ramos, A.T. Serra, M.E. Figueira, C.M.M. Duarte, A. de Carvalho, M.R. Bronze. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1. Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *J Funct Foods*, 2 (2010), pp. 35-45
199. Riess W. Pharmacokinetics and metabolism of the new anti-inflammatory agent Voltaren / W. Riess, H. Sterlin // *Scand I. Rheumatology*, 1978, № 22, P. 18-22.

200. Renard J. The use of nimesulide and its analogues in cancer chemoprevention / J. Renard, F. Julemont, X. de Leval // *Anticancer Agents Med Chem.* 2006, № 6(3); P. 233-237.
201. Robbins R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical-methodology // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2003. № 51. P. 2866-2887.
202. Roesler R., Catharino R.R., Malta L.G., Eberlin M.N., Pastore G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry // *Food Chemistry.* 2007. № 104. P. 1048-1054.
203. Rop O., Jurikova T., Mlcek J., Kramarova D., Sengee Z. Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (*Prunus domestica* L.) typical of the White Carpathian Mountains. *Sci. Hortic.* 2009;122:545–549. doi: 10.1016/j.scienta.2009.06.036. [CrossRef]
204. S.Masumoto Y.Akimoto H.Oike and M.Kobori "Dietary phlorizidin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice" *Journal of AGRICULTURAL AND Food Chemistry*" vol 57 no 11 pp. 4651-4656 2009
205. Sadecka Jana. Determination of ibuprofen and naproxen in tablets / Sadecka Jana, Cakrt Miroslav, Hercegova Andrea // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 2001. - Vol. 25. - № 5-6. - P. 881-891. - ISSN 0731-7085.
206. Schneider W., Degen P. // *J. Chromatogr.* - 1981. - Vol. 217. - P. 263-271.
207. Scott P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and myocardial infarctions (MI): systematic assessment of the available evidence / P. Scott, G. Kingsley, C. Smith // *Arthritis Rheumat.*, 2006, № 54, P. 109.
208. Schieber A. "Определение фенольных кислот и флавоноидов в яблоках и сливах ВЭЖХ" *J.Chrom.* 2001, v.910, p.265-273.

209. Schwab W., Schreier P. Vomifoliol 1-0- $\beta$ -d-xylopyranosyl-6-o- $\beta$ -d-glucopyranoside: A disaccharide glycoside from apple fruit. *Phytochemistry*. 2008;29:161–164. doi: 10.1016/0031-9422(90)89030-D. [CrossRef]
210. Shahidi F., Naczk M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, // Technomic Publishing Company Lancaster PA. 1995. № 61. P. 167-180.
211. Shao JW, Dai YC, Xue JP, Wang JC, Lin FP, Guo YH. In vitro and n vivo anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. *European J Med Chem* 2011;46:2652e61.
212. Shao X, Bai NS, He K, Ho CT, Yang CS, Sang SM. Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chem Res Toxic* 2008;21:2042e50.
213. Shao X., Bai N., He K., Ho C.-T., Yang C.S., Sang S. Apple Polyphenols, Phloretin and Phloridzin: New Trapping Agents of Reactive Dicarbonyl Species. *Chem. Res. Toxicol.* 2008;21:2042–2050. doi: 10.1021/tx800227v. [PubMed] [CrossRef]
214. Silva B.M., Andrade P.B., Martins R.C., Seabra R.M., Ferreira M.A. Principal component analysis as tool 'of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam // *Food Chemistry*. 2006. № 94. P. 504-512.
215. Singleton V., Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965;16:144–158.
216. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela – Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods in Enzymology*. – 1999. – Vol.299 – P.152-178
217. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods in Enzymology*/-1999.-Vol.299-P.152-178.

218. Slimstead R., Vangdal E., Brede C. Analysis of Phenolic Compounds in Six Norwegian Plum Cultivars (*Prunus domestica* L.) J. Agric. Food Chem. 2009;57:11370–11375. doi: 10.1021/jf902054x. [PubMed] [CrossRef]
219. Sousa W.R., Rocha C., Cardoso C.L., Silva DIH., Zanoni MiV. Determination,of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods // Journal of Food Composition and Analysis. 2004. № 17. P. 619^633.
220. Spitaler R., Schlorhauser P.D., Ellmerer E.P1, Merfort I., Bortenschlager S., Stuppner H., Zidorn C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO // Phytochemistry. 2006. № 67. P. 409-417.
221. Spranger I., Sun B., Mateus A.M., Freitas V., Ricardo-da-Silva J.M. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. Food Chem. 2008;108:519–532. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.004. [PubMed] [CrossRef]
222. Sul D, Kim HS, Lee D, Joo SS, Hwang KW, Park SY. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. Life Sci 2009;84:257e62.
223. Sumere C.F., Lea P.J. The Biochemistry of plant phenolics // Annual proceedings of the phytochemicalsociety of Europe. 1985. № 25. P. 110-117.
224. T.Ohta, H.Morinaga,T.Yamamoto and T.Yamada" Effect of phlorizin on metabolic abnormalities in Spontaneously Diabetic Torii rats ",Open Journal of Animal Sciences, vol.2, no.2,p.113-118,2012.
225. T.Ohta, H.Morinaga,T.Yamamoto and T.Yamada" Effect of phlorizin on metabolic abnormalities in Spontaneously Diabetic Torii rats ",Open Journal of Animal Sciences, vol.2, no.2,p.113-118,2012.
226. Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad«M., El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species // Food5 Chemistry. 2007. № 104. P. 1372-1378.

227. The United States Pharmacopeia / The Nacional Formular XXVII./19. — 2004.
228. Thompson R., Jacques D., Haslam E., Plant procyanidinis \\ J.Chem.Soc. 1972, N11, P.1387-1399
229. Tomas-Barberan F., Gil M.I., Cremin P., Waterhouse A.L., Hess-Pierce B., Adel A., Kader A.A. HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:4748–4760. doi: 10.1021/jf0104681. [PubMed] [CrossRef]
230. Traversa G. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs / G. Traversa, C. Bianchi, R. Da Cas // *BMJ*, 2003, № 327, P. 18-22.
231. Tong S., Yan J., Guan Y. Preparative separation of isomeric caffeoylquinic acids from Flos Lonicerae by pH-zone-refining counter-current chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2008. № 1212. P. 48-53.
232. Treutter D., Wang D., Farag M.A., Baires G.D., Rühmann S., Neumüller M. Diversity of phenolic profiles in the fruit skin of *Prunus domestica* plums and related species. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:12011–12019. doi: 10.1021/jf303644f. [PubMed] [CrossRef]
233. Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu HH. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agri Food Chem* 2003;51:6347e53.
234. Tsao R., Yang R., Young C., Zhu H. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) *J. Agric. Food Chem.* 2003;57:6347–6353. doi: 10.1021/jf0346298. [PubMed] [CrossRef]
235. United States Pharmacopeia 23. The National Formulary 23, Rockwill, MD: United States Pharmacopeia convection, Inc., 1995. - P. 2140:
236. United States Pharmacopeia 24. The National Formulary 24 Rockwill, MD: United States Pharmacopeia convection, Inc., 2000. - P. 2356.
237. United States Pharmacopeia 30.

238. Uva Ursi Leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L.). Standards of analysis, quality control, and therapeutic // American Herbal Pharmacopoeia/2008
239. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Recommended for Adoption at Step 4 of the ICN Process on 6 November 1996 // ICN Steering Committee. 1996.
240. Varassi G., Marinageli F., Polci A. // Pain Updated Review. Seattle. 1996.- P. 150.
241. Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical // *Talanta*. 2007. № 71. P. 230-235.
242. Vineetha V.P., Giriya S., Soumya R.S., Raghu K.G. Polyphenol-rich apple (*Malus domestica* L.) peel extract attenuates arsenic trioxide induced cardiotoxicity in H9c2 cells via its antioxidant activity. *Food Funct.* 2014;5:502–511. doi: 10.1039/c3fo60470e. [PubMed] [CrossRef]
243. Wang Z., Wang J., Sun Y., Li S., Wang H. Purification of caffeic acid, chlorogenic acid and luteolin from *Caulis Lonicerae* by high-speed counter-current chromatography // *Separation and Purification Technology*. 2008. № 63, P. 721-724.
244. Weisz G.M., Kammerer D.R., Carle R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS<sup>n</sup> // *Food Chemistry*. 2009. № 115. P. 758-765.
245. Wolfe K., Wu X., Liu R.H. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:609–614. doi: 10.1021/jf020782a. [PubMed] [CrossRef]
246. Wolfe KL, Liu RH. Apple peels as a value-added food ingredient. *J Agric Food Chem* 2003;51:1676e83.
247. X Shao, N.S.Bai, k.He, C.Ho.C.Yang , S/M/Sang Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonil species .*Chem Res Toxic*,21 ,2008/P/2042-2050

248. Yamamoto Eiichi. Methylcellulose-immobilized reversed-phase precolumn for direct analysis of drugs in plasma by HPLC / Yamamoto Eiichi, Murata Kaoru, Ishihama Yasushi, Asakawa Naoki // *Anal. Sci.* 2001. - Vol. 17. -№ 10.- P. 1155-1159.-ISSN 0910-6340.
249. Ye Xiaoxia. Chiral division by method HPLC with use vancomycin as chiral additives to a mobile phase. / Ye Xiaoxia, Yu Xiong // *Fenxi huaxueChin. J. Anal. Chem. Chin. J. Anal. Chem.* 2003. - Vol. 31. - № 5. -P. 522-526. - ISSN 0253-3820.
250. Zhang T., Wei X., Miao Z., Hassan H., Song Y., Fan M. Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. *Chem. Cent. J.* 2016;10:47. doi: 10.1186/s13065-016-0195-7. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef]
251. Zhang X. Z., Zhao Y.Bo, Li C. M.. Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*) // *Journal of Plant Physiology.* - 2007, Vol. 164,-P. 574—580
252. Zupan A., Mikulic-Petkovsek M., Slantnar A., Stampar F., Veberic R. Individual phenolic response and peroxidase activity in peel of differently sun-exposed apples in the period favorable for sunburn occurrence. *J. Plant Physiol.* 2014;171:1706–1712. doi: 10.1016/j.jplph.2014.08.010. [PubMed] [CrossRef]

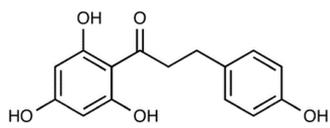
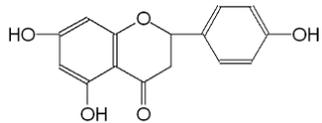
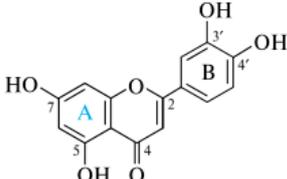
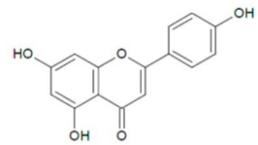
**ПРИЛОЖЕНИЯ***Приложение 1. Краткая характеристика видов яблони*

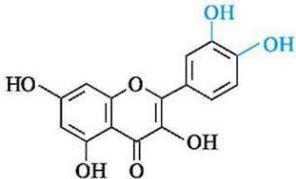
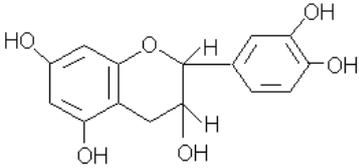
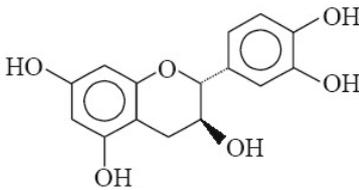
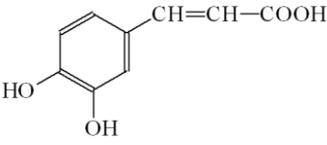
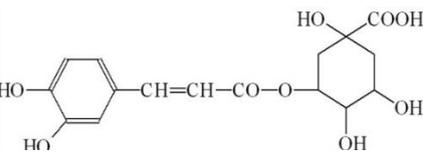
<b>Вид яблони</b>	<b>Краткая характеристика</b>	<b>Распространение</b>
<p><b>Яблоня лесная</b> <b>Malus sylvestris</b> <b>Mill.</b></p>	<p>Дерево высотой до 10—12 м, диаметром до 0,5 м. Крона раскидистая, шатровидная. Листья эллиптические, округлые, на вершине с коротким остриём. Цветёт одновременно с распусканием листьев. Цветки белые или розовые, в малоцветковых щитках, цветёт в мае. Плоды шаровидные, желтовато-зелёные, до 3 см, съедобные. Корневая система с хорошо развитым, глубоко уходящим в почву стержневым корнем. К почве среднетребовательна. Переносит солонцеватость почвы, заболоченных почв избегает. Засухоустойчива. Относительно теневынослива, но лучше растёт и развивается на опушках. Морозостойка. Растёт медленно, даёт поросль от пня. Поражается яблоневого молью. Наибольший интерес представляет как холодостойкий и сильнорослый подвой для культурных сортов яблонь. Древесина используется в токарном производстве.</p>	<p>Родина — смешанные и широколиственные леса Европы, Крым.</p>
<p><b>Яблоня ягодная</b> <b>(сибирская)</b> <b>Malus baccata</b> <b>(L.) Borkh.</b></p>	<p>Дерево высотой до 10—12 м, с низко начинающимся ветвлением, нередко растёт кустообразно. Листья эллиптические, с заострённой вершиной. Цветёт после распускания листьев.</p>	<p>Родина — Забайкалье, Дальний Восток. В культуре повсеместно.</p>

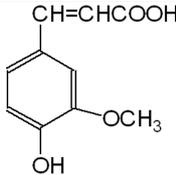
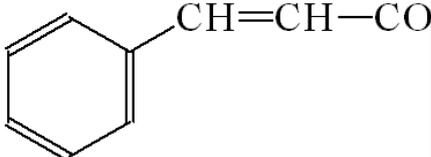
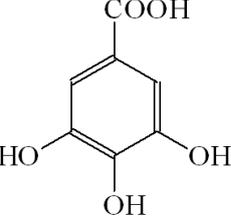
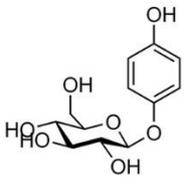
	<p>Цветки белые, по 4—8 в зонтиковидных соцветиях. Плоды шаровидные, до 1 см, жёлтые, терпкие, с горечью. Поверхностная корневая система. К почве малотребовательна, засухоустойчива, переносит длительные морозы до -50°C. Используется как подвой для культурных сортов. Переносит стрижку.</p>	
<p><b>Яблоня домашняя</b> <i>Malus domestica</i> Borkh.</p>	<p>Объединяет до 300 (10000) сортов. Дерево высотой от 3—6 до 10—14 м, диаметром до 0,9 м, ствол покрыт трещиноватой корой. Побеги опушённые, несколько ребристые. Листья яйцевидные, с заострённой верхушкой и округлым основанием, с обеих сторон опушённые. Цветки на коротких беловойлочных цветоножках, белые или розовые. Долговечность культурной яблони 30—100 лет.</p>	
<p><b>Яблоня маньчжурская</b> <i>Malus mandshurica</i> (Maxim)</p>	<p>Дерево высотой до 10 м, диаметр до 45 см. Листья широкояйцевидные, яйцевидные или обратнояйцевидные. Цветки диаметром 3—5 см, белые, по 3—8 в зонтиковидных соцветиях. Плоды красные или жёлтые. Декоративна, особенно в период цветения.</p>	<p>Родина — Приморский край, северный Китай.</p>
<p><b>Яблоня Недзвецкого</b> <i>Malus niedzwetzkyana</i></p>	<p>Дерево высотой до 2—6 (8) м. Крона шатровидная. Листья обратнояйцевидные, эллиптические или продолговатые, до 8 см длиной,</p>	<p>Родина — Тянь-Шань.</p>

<b>Dieck.</b>	<p>мелкозубчатые, тёмно-зелёные с красным оттенком. Цветки пурпурные, до 3—4 см в диаметре.</p> <p>Плоды мелкие фиолетово-пурпурные с восковым налётом, несъедобные.</p> <p>Морозостойка, неприхотлива, устойчива к вредителям и болезням, растёт относительно быстро.</p>	
<p><b>Яблоня Палласова (сибирская)</b> <b>Malus pallasiana Juz.</b></p>	<p>Дерево высотой до 3—5 м. Крона округлая, ствол извилистый с диаметром до 15 см. Листья яйцевидные или короткоэллиптические, суженные в умеренно длинное остроконечие. Цветки белые до 2—3,5 см в диаметре, в зонтиках по 4—8. Плоды шаровидные, до 1 см в диаметре, жёлтые с красноватым оттенком, обычно с горечью. Используется как рано и обильно цветущее дерево, переносит стрижку, пригодна для создания живых изгородей.</p>	<p>Родина — Восточная Сибирь, Дальний Восток, Монголия, северный Китай.</p>
<p><b>Яблоня сахалинская</b> <b>Malus sachalinensis Juz.</b></p>	<p>Дерево до 10—12 м высотой, 20—30 см в диаметре. Листья овальные или яйцевидные, вытянуты в длинное остроконечие, с клиновидным основанием. Цветки до 3 см в диаметре, в полузонтиках, белые или розоватые. Плод почти шаровидный, 8—10 мм в диаметре.</p> <p>Растёт по долинам рек и на морском берегу.</p>	<p>Сахалин, Курильские острова. Эндем.</p>

Приложение 2. Соединения фенольной природы, идентифицированные в разном сырье растений рода яблоня

Наименование вещества	Класс соединений	Брутто-формула, молекулярная масса	Вид сырья, в котором содержание вещества максимально
<p>Флоретин</p> 	производное дигидрохалкона	$C_{15}H_{14}O_5$	листьях яблони, листья маньчжурского абрикоса
<p>Флоридзин</p> 	производное дигидрохалкона		Листья, кора яблони
<p>Нарингенин</p> 	флаванон	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	Цветки бессмертника песчаного
<p>Лютеолин</p> 	флаванон	$C_{15}H_{10}O_6$	Трава хвоща, спорыша, горца почечуйного, цветки пижмы, цветки ромашки, древесина и листья яблони
<p>Апигенин</p> 	флаванон		Цветки бессмертника, древесина яблони
<p>Кверцетин</p> 	флавонол	$C_{15}H_{10}O_7$	Плоды, цветки боярышника,

			плоды софоры, трава зверобоя, древесина и листья яблони
<p>Эпикатехин</p> 	катехины	$C_{15}H_{14}O_6$	Листья чая, плоды и листья винограда, плоды какао, плоды и листья яблони
<p>Катехин</p> 	катехины	$C_{15}H_{14}O_6$	Листья чая, плоды и листья винограда, плоды какао, плоды и листья яблони, листья смородины, листья крыжовника
<p>Кофейная кислота</p> 	Фенолкарбоновые кислоты	$C_9H_8O_4$	Листья груши, листья яблони, листья винограда, листья мяты. плоды ирги
<p>Хлорогеновая кислота</p> 	Фенолкарбоновые кислоты	$C_{16}H_{18}O_9$	Листья груши, листья яблони, листья винограда, листья мяты.
<p>Феруловая кислота</p>	Фенолкарбоновые кислоты	$C_{10}H_{10}O_4$	Плоды и листья шиповника, плоды и листья малины, листья,

 <p>CH=CHCOOH</p>			цветки и плоды рябины
<p>Коричная кислота</p>  <p>CH=CH—CO</p>	Фенолкарбоновые кислоты	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Листья и плоды лавровишни
<p>Галловая кислота</p>  <p>COOH</p> <p>HO OH OH</p>	Фенолкарбоновые кислоты	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Корневища и листья бадана, кора дуба, корневища лапчатки
<p>Арбутин</p> 	Производные фенолов	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	Листья толокнянки, листья брусники, побеги рододендрона, листья, плоды яблони, листья, плоды груши

*Приложение 3. Классификация плодов яблони в зависимости от их размерных характеристик (По данным Чижиковой О.Г. и соавт. «Товароведение и экспертиза плодоовощных и вкусовых товаров»)*

Название классификационной группы в зависимости от величины плода	Средняя масса плода, г.	Максимальный диаметр поперечного среза плода, мм
Очень крупные	> 176	>76
Крупные	126-175	61-75
Больше среднего	101-125	56-60
Средние	76-100	51-55
Меньше среднего	51-75	41-50
Мелкие	26-50	30-40
Очень мелкие	До 25	25-30

Приложение 4. Показатели качества плодов яблони, определяемые согласно требованиям ГОСТ пищевой промышленности.

Наименование показателя	Рекомендуемые нормы		
	«Яблоки свежие для промышленной переработки» ГОСТ 27572-87	«Яблоки свежие поздних сроков созревания» ГОСТ 21122-75	«Яблоки свежие ранних сроков созревания» ГОСТ 16270-70
Внешний вид	Плоды здоровые. Свежие, цельные, чистые, вполне развившиеся, без повреждений сельскохозяйственными вредителями, без механических повреждений, типичной для данного помологического сорта формы и окраски. С плодоножкой или без нее	Плоды типичные по форме и окраске для данного помологического сорта, без повреждений вредителями и болезнями. С плодоножкой или без нее, но без повреждений кожицы плода	Плоды, по форме и окраске соответствующие данному помологическому сорту, без повреждений вредителями и болезнями, с плодоножкой или без нее, но без повреждений кожицы плода
Запах и вкус	Свойственные данному помологическому сорту, без постороннего запаха и привкуса	Без постороннего запаха и вкуса	Без постороннего запаха и привкуса
Степень зрелости	Техническая, потребительская. Плоды однородные по степени зрелости	Плоды однородные по степени зрелости, но не зеленые и не перезревшие	Съемная - при заготовке, потребительская - при реализации.

			Перезревшие плоды не допускаются
Массовая доля растворимых сухих веществ в соке плодов, %, не менее	10,0	Раздел отсутствует	Раздел отсутствует
Размер плодов по наибольшему поперечному диаметру, см, не менее	6,0	65 – для плодов круглой формы; 60- для плодов овальной формы	55
Содержание плодов менее установленного размера , не более	10,0	Раздел отсутствует	Раздел отсутствует
Сетка на плодах	Слабая, тонкая, сетеподобная, не резко контрастирующая с естественной окраской плодов	Допускается слабая, тонкая, сетеподобная, не резко контрастирующая с общим цветом плодов	
Нажимы, градобоины, зарубцевавшиеся повреждения вредителями	3 см <sup>2</sup> , в том числе не более 3 пятен парши, каждое диаметром не более 0,3 см	Не более двух градобоин, легкие нажимы, не влияющие на хранение. общей площадью не более 2 см <sup>2</sup> . Допускаются плоды с 1-2	Допускаются нажимы и градобоины общей площадью до 3 см, допускаются плоды с 1-2 засохшими повреждениями плодовой жоркой не

		засохшими повреждениями плодожоркой не более 2% партии	более 2% партии
Содержание плодов со свежими проколами	Не допускается	Раздел отсутствует	Не более двух заживших проколов кожицы



Приложение. 6

Проект ФС «Яблони лесной листья – *Mali sylvestris folia*»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Яблони лесной листья – *Mali sylvestris folia*

ФС - Вводится впервые

---

Собранные во время плодоношения, высушенные листья, дикорастущего, многолетнего растения Яблони лесной – *Malus sylvestris* Mill., семейство Розоцветные – Rosaceae.

### ПОДЛИННОСТЬ

**Внешние признаки.** *Цельное сырье.* Листья цельные или частично-измельченные простые, черешковые, длиной до 13 см, шириной до 7 см. Эллиптическая, округлая или яйцевидная форма листовой пластинки, часто - верхушка с коротким острием, край листа неравномерно-мелкозубчатый, жилкование перистонервное. При рассмотрении сырья под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видно, что листовая пластинка имеет многочисленные мелкие волоски с нижней стороны листа, срединная жилка, вдавленная с верхней поверхности листа, сильно выпуклая, беловатая с внутренней поверхности. Восковой налет отсутствует. Черешки листьев длиной до 5 см, округлые или полукруглые в сечении, имеют редкое опушение. Цвет листьев с верхней стороны

темно-зеленый, с нижней - серовато-зеленый, светлый. Запах - слабый травянистый, вкус водного извлечения - горьковато-вяжущий.

*Измельченное сырье.* Смесь кусочкой различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

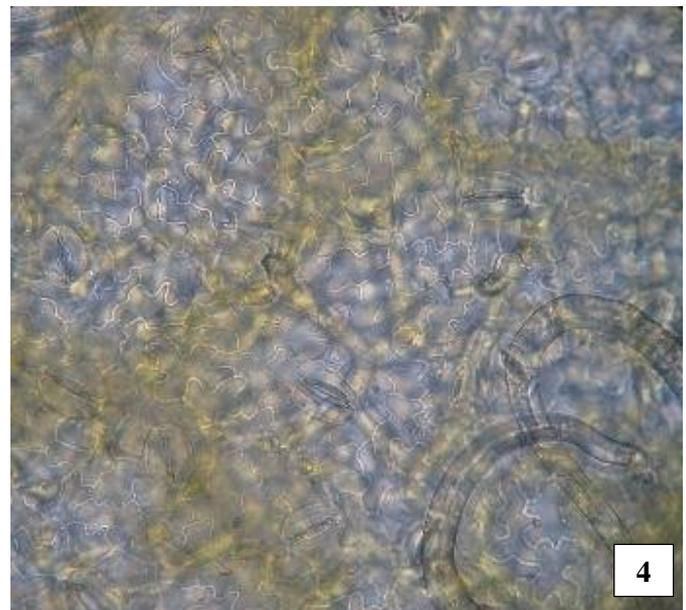
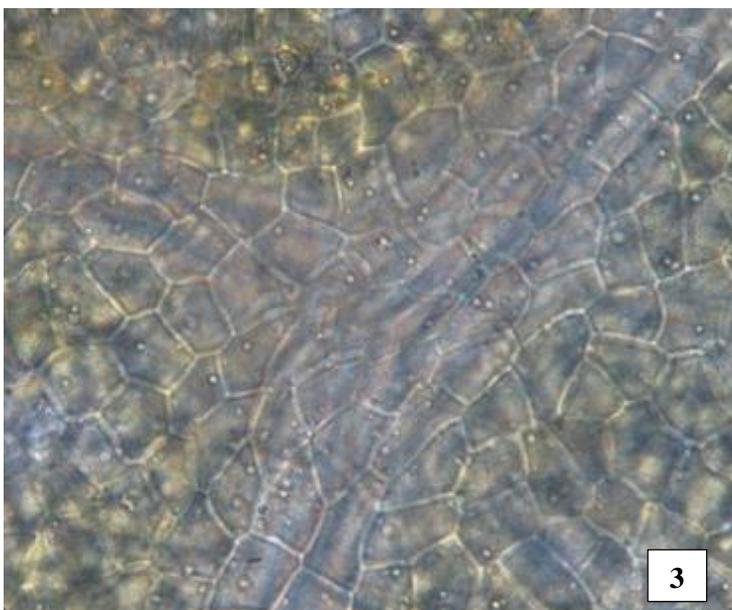
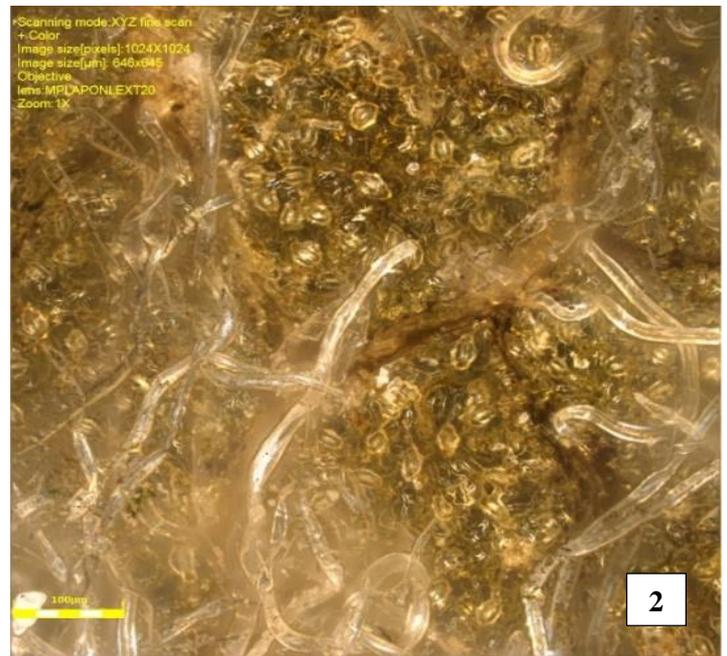
Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах - слабый травянистый, вкус водного извлечения - горьковато-вяжущий.

***Микроскопические признаки.*** *Цельное сырье, измельченное сырье.* Эпидермис верхней стороны листа представлен довольно крупными многоугольными клетками, антиклинальные стенки которых обладают четковидными утолщениями. Над жилками клетки эпидермиса имеют более вытянутую форму, основная масса изодиаметрические. Клетки нижнего эпидермиса более мелкие извилистые. На верхней стороне листа устьица встречаются изредка и окружены 4-5 околоустьичными клетками. Устьица крупные, овальной формы, сильно приподнятые, аномоцитного типа. На нижней стороне листа они многочисленны, кутикула образует вокруг устьиц радиальную складчатость.

Верхняя сторона листа почти голая, нижняя покрыта многочисленными простыми извилистыми многоклеточными волосками, заостренными на конце, слегка расширенными у основания с тонкими стенками и гладкой поверхностью. Основание волоска прикрепляется к небольшой по размерам, несколько приподнятой клетке эпидермиса, расположенной на стыке нескольких эпидермальных клеток, ориентированных вокруг места прикрепления по радиусу и покрытых кутикулой, обладающей радиальной складчатостью. Мезофилл листа рыхлый, изредка встречаются друзы кальция оксалата. Проводящая система листа образует развитую сеть жилок, снабженных кристаллоносной обкладкой.

При рассмотрении микропрепарата измельченных листьев яблони обнаружены извилистые клетки эпидермиса, в фрагментах верхнего и нижнего эпидермиса встречается аномоцитный тип устьичного комплекса, устьица

округлой или овальной формы, замыкающие клетки обладают почковидной формой, длина устьиц составляет до 28 мкм, ширина 18-22 мкм, многочисленные простые многоклеточные волоски, заостренные на конце, несколько расширенные у основания, с тонкими стенками и гладкой поверхностью; жилка листа с кристаллоносной обкладкой; обнаружены друзы кальция оксалата в мезофилле листа.



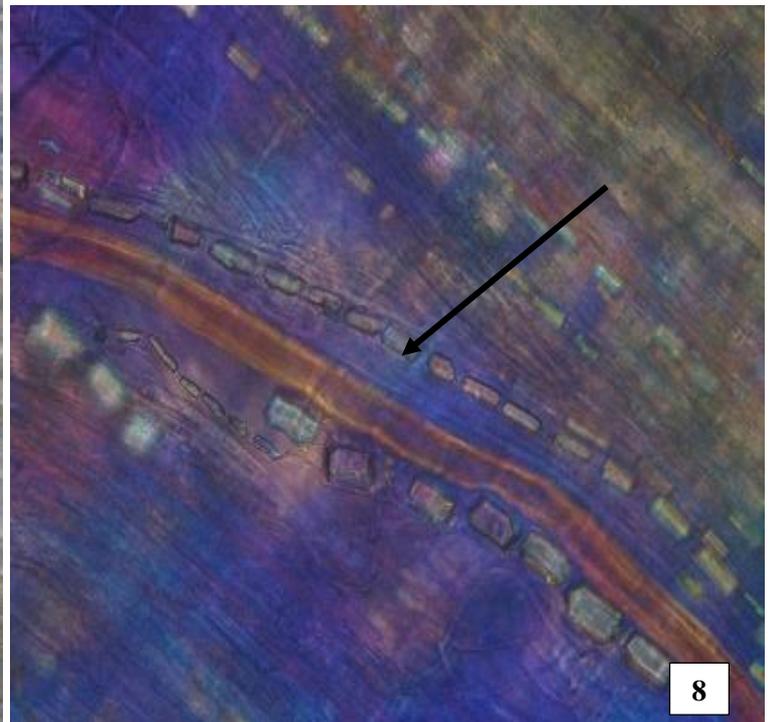
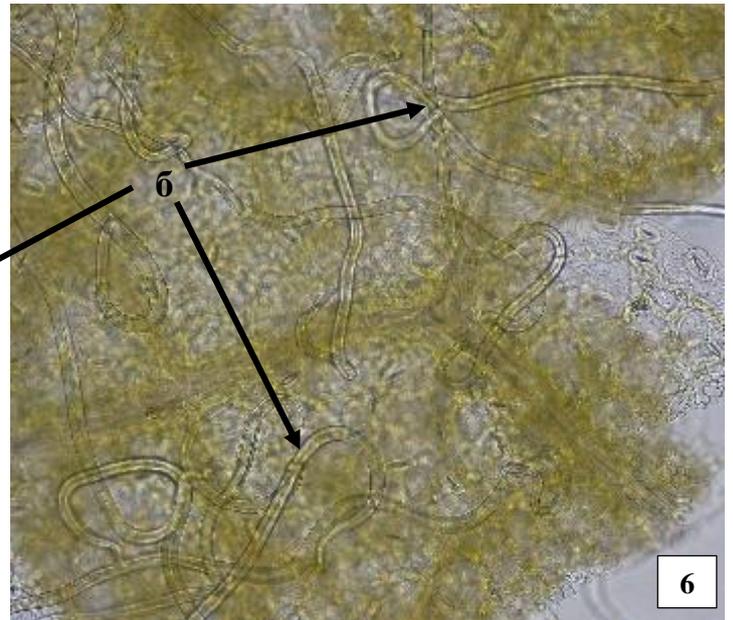
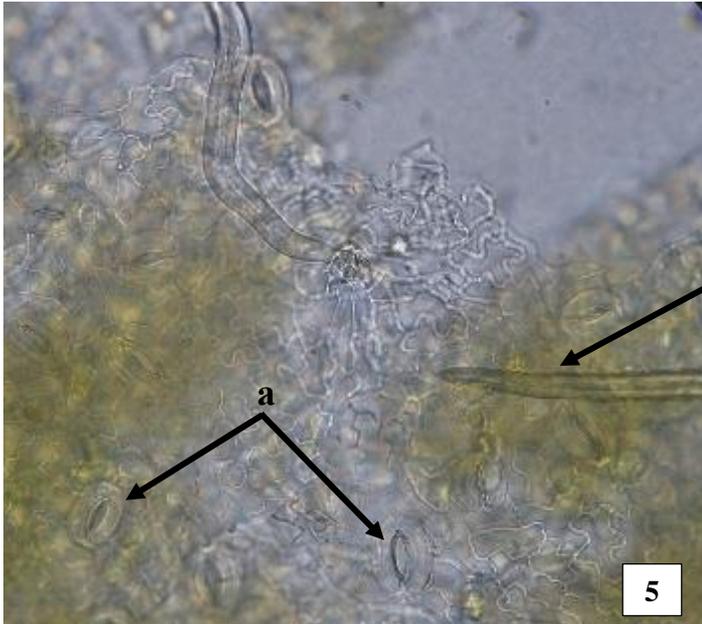


Рисунок – Яблони лесной листья

1. - Фрагмент жилки листа с верхней стороны (Ув×20)
2. Фрагмент жилки листа с нижней стороны (Ув×20)
3. Строение клеток верхнего эпидермиса (Ув×400)
4. Строение клеток верхнего эпидермиса (Ув×400)

- 5,6. Фрагмент верхнего эпидермиса ( $Ув \times 400$ ), а – устьица аномоцитного типа, б – простые волоски различной формы
7. Друзы оксалата кальция в мезофилле листа ( $Ув \times 1000$ )
8. Кристаллоносная обкладка по жилке листа в поляризованном свете ( $Ув \times 400$ )

## **Определение основных групп биологически активных веществ**

### ***Тонкослойная хроматография***

#### *Приготовление растворов.*

*Раствор СО (арбутина).* Около 25 мг арбутина помещают в мерную колбу объемом 10 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 70%, нагревают на водяной бане до полного растворения, затем раствор охлаждают, доводят объем этиловым спиртом до метки и перемешивают.

*Раствор СО (галловой кислоты).* Около 25 мг галловой кислоты помещают в мерную колбу объемом 10 мл, прибавляют 10 мл спирта этилового 70%, нагревают на водяной бане до полного растворения, затем раствор охлаждают, доводят объем этиловым спиртом до метки и перемешивают.

На линию старта ТСХ-пластинки со слоем силикогеля наносят 20 мкл (0,002 мл) испытуемого раствора. Рядом наносят 10 мкл (0,001 мл) раствора СО арбутина и 10 мкл раствора СО галловой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 3-5 минут, после чего вносят в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 минут смесью растворителей: кислота муравьиная безводная – вода – этилацетат (6:6:88) и осуществляют хроматографирование восходящим способом. При прохождении фронтом растворителя около 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают при температуре от 105 до 110°C до исчезновения запаха растворителей, после чего отпрыскивают раствором 10 г/л дихлорхинонхлоримида в метаноле и раствором натрия карбоната безводного. На хроматограмме раствора СО арбутина должна обнаруживаться зона адсорбции

синего цвета. На хроматограмме раствора СО галловой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции коричневого цвета.

На хроматограмме исследуемого раствора должна обнаруживаться зона синего цвета на уровне зоны арбутина, зона коричневого цвета на уровне зоны кислоты галловой и другие зоны: 3 зоны синего цвета и несколько зон коричневого цвета.

Около 0,5 г листьев, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, вносят в мерную колбу объемом 50 мл, приливают 10 мл воды дистиллированной и кипятят 3 минуты, после чего фильтруют через бумажный фильтр.

К 1 мл полученного фильтрата приливают 5 мл раствора аммиака и добавляют 1-2 мл раствора натрия фосфорномолибдата 10%, должно появиться синее окрашивание (арбутин)

К 2-3 мл фильтрата приливают 0,5 мл железа (III) аммония сульфата раствора 1%; должно появиться черно-синее окрашивание (дубильные вещества)

## ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 13%

**Зола общая.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4%

**Зола неастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2%

### Посторонние примеси

**Листья, изменившие окраску (пожелтевшие, потемневшие, почерневшие).**

*Цельное сырье* – не более 5%

**Кусочки листьев, изменившие окраску (потемневшие, почерневшие).**

*Измельченное сырье* – не более 5%

**Органическая примесь.** *Цельное сырье* - не более 1 %.

**Минеральная примесь.** *Цельное сырье*, измельченное 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».

**Микробиологическая чистота.** Определение проводят согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** *Цельное сырье, измельченное сырье:*

*Содержание дубильных веществ – не менее 7%*

*Экстрактивные вещества, извлекаемые водой не менее 15%*

*Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом не менее 18%*

*Сумма флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1 %*

*Приготовление растворов.*

Раствор СО рутина. Около 0,1 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре до 130 °С в течение 3 ч, помещают в колбу объемом 25 мл, растворяют в спирте 70 % в при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутина). Срок хранения: 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутина, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доведенного спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, перемешивают. (раствор Б СО рутина).

Пробоподготовка включала измельчение аналитической пробы сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченных плодов или листьев яблони лесной засыпали в коническую колбу, снабженную шлифом емкостью 250 мл, добавляли 100 мл спирта этилового 70%. Колбу аккуратно присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане в течение 90 минут, осуществляя периодическое встряхивание с целью смывания частиц сырья со стенок экстракционной колбы. По окончании времени экстракции колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, промытый предварительно спиртом этиловым 70%. Первые 10-15 мл фильтрата отбрасывали. Из полученного таким образом извлечения аналитической пипеткой отбирали 2,0 мл испытуемого раствора и переносили в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляли 5 мл алюминия хлорида раствора алюминия хлорида 5% в этиловом спирте 70% и по истечении 10 минут вносили 1 мл этановой кислоты 3%. Объем доводили до метки спиртом этиловым 70% и оставляли на 30 минут для стабилизации образующегося комплекса. По истечении 30 минут измеряли оптическую плотность исследуемого раствора в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм.

Оценку суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин для абсолютно сухого сырья рассчитывали с учетом удельного показателя поглощения, рассчитанного для продукта реакции комплексообразования рутина с алюминия хлоридом:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A^0 \times a \times 2 \times (100 - W)}$$

Где А - значение показателя оптической плотности испытуемого извлечения;

А – значение удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 4109 нм, значение которого принимается за 260;

а- навеска сырья, взятого для анализа, гр.;

W – Влажность сырья, %

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** Осуществляется с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья». Упаковка. В ящики с отверстиями в боковых стенках и крышках по 0,5 кг нетто. Транспортирование. Свежесобранное сырье следует отправлять для переработки немедленно после сбора любым видом транспорта.

**Хранение.** Хранение ЛРС осуществляется с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Приложение. 7

Проект ФС «Яблони лесной листья – *Mali sylvestris folia*»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

### ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Яблони лесной плоды – *Mali sylvestris fructus*

ФС - Вводится впервые

---

Собранные в период полного созревания и высушенные плоды, дикорастущего, многолетнего растения Яблони лесной – *Malus sylvestris* Mill., семейство Розоцветные – Rosaceae.

#### ПОДЛИННОСТЬ

***Внешние признаки.*** Цельное сырье.

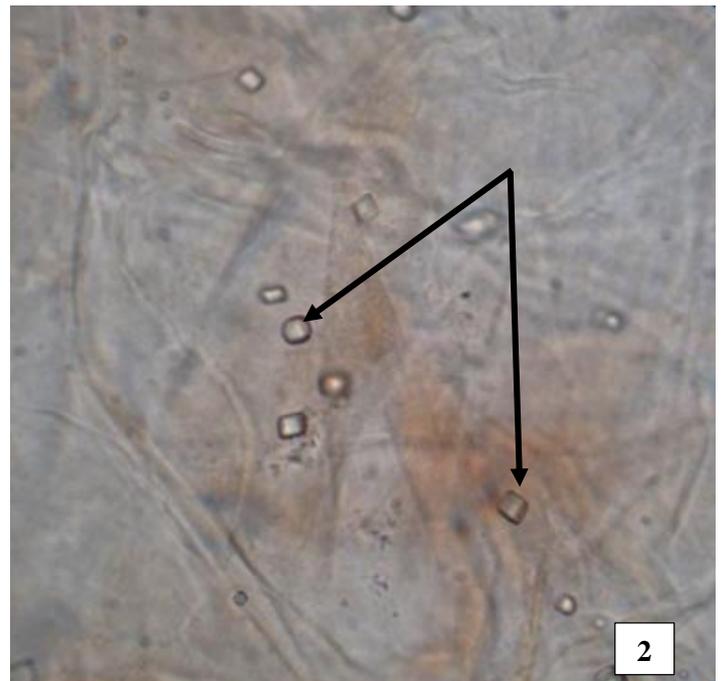
Плоды яблокообразные длиной от 2,3 - до 3 см в поперечном сечении от 2,2 до 3,1 см, присутствует плодоножка размером от 13,5 до 19,0 мм, тип околоплодника сочный шаровидной или, реже, яйцевидной формы, поверхность гладкая, блестящая. В мякоти плоды присутствует 4-10 семян заостренно-яйцевидной формы с гладкой блестящей поверхностью буроватого цвета.

Цвет плодов светло-зеленый, однако допускаются покраснения. Запах - специфический, яблочный. Вкус водного извлечения кислый, сильно вяжущий.

***Микроскопические признаки.*** Цельное сырье, измельченное сырье.

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

При рассмотрении микропрепаратов измельченных плодов выявлены обрывки эпидермы, окончатость клеток, обрывки мезокарпия, паренхимные клетки разнородные, неправильной формы, рыхло расположенные в очертании округлые, как бы смятые. Каменистые клетки отдельно и в кусочках мезокарпия, обрывки механических волокон с кристаллами оксалата кальция.



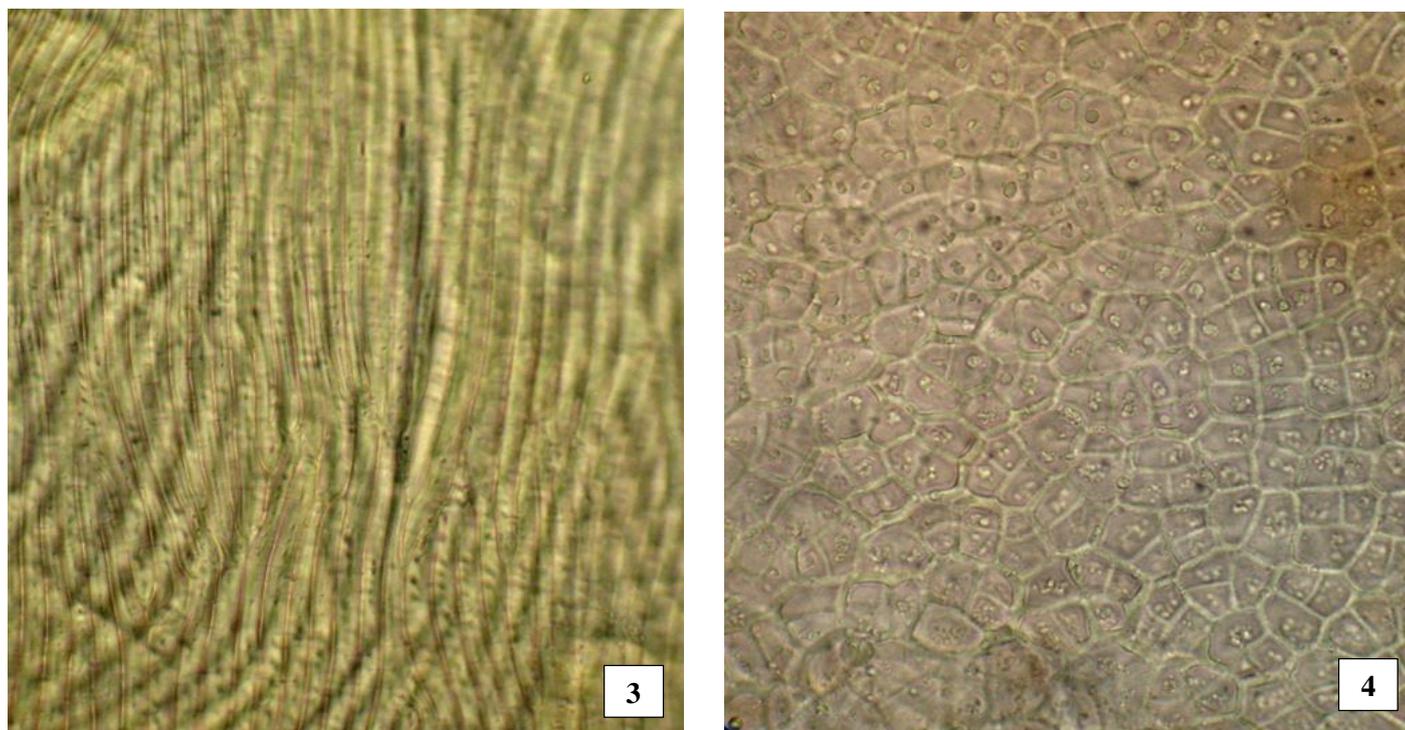


Рисунок – Яблони лесной плоды

1. Фрагмент проводящего пучка (Ув×400)
2. Клетки мезокарпия. Кубические кристаллы оксалата кальция (Ув×1000)
3. Эндокарпий. Механические волокна (Ув×400)
4. Эндокарпий с поверхности (Ув×400)

### Определение основных групп биологически активных веществ

#### *Качественные реакции.*

Около 1,0 г. Измельченных плодов помещают в колбу емкостью 50 мл, добавляют 30 мл 70% спирта этилового и нагревают на водяной бане в течение 20 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, упаривают на кипящей водяной бане, фильтруют через бумажный фильтр. К 5 мл фильтрата прибавляют 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в этиловом спирте; развивается желто-зеленое окрашивание (флавоноиды)

К 15 мл раствора А (количественное определение) приливают 25 мл. спирта этилового 95% и перемешивают; постепенно развиваются хлопьевидные сгустки, которые при стоянии формируют осадок (полисахариды).

## ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 15%

**Зола общая.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3%

**Зола неастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1%

**Посторонние примеси****Недозрелых плодов.**

*Цельное сырье* – не более 2,5%

**Почерневших плодов.**

*Цельное сырье* – не более 2%

**Других частей растения (плодоножек, веточек, листьев)**

*Цельное сырье* – не более 0,5%

**Органическая примесь.** *Цельное сырье* - не более 0,5 %.

**Минеральная примесь.** *Цельное сырье*- не более 0,2%.

**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».

**Микробиологическая чистота.** Определение проводят согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.**

*Цельное сырье, измельченное сырье:*

*Экстрактивные вещества, извлекаемые водой не менее 15%*

*Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% этиловым спиртом не менее 18%*

*Сумма флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,2 %*

*Сумма полисахаридов не менее 11%*

*Приготовление растворов.*

Раствор СО рутин. Около 0,1 г (точная навеска) СО рутин, предварительно высушенного при температуре до 130 °С в течение 3 ч, помещают в колбу объемом 25 мл, растворяют в спирте 70 % в при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутин). Срок хранения: 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутин, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доведенного спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, перемешивают. (раствор Б СО рутин).

Пробоподготовка включала измельчение аналитической пробы сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 1 мм. Около 1, 0 г (точная навеска) измельченных плодов или листьев яблони лесной засыпали в коническую колбу, снабженную шлифом емкостью 250 мл, добавляли 100 мл спирта этилового 70%. Колбу аккуратно присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане в течение 90 минут, осуществляя периодическое встряхивание с целью смывания частиц сырья со стенок экстракционной колбы. По окончании времени экстракции колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, промытый предварительно спиртом этиловым 70%. Первые 10-15 мл фильтрата отбрасывали. Из полученного таким образом извлечения аналитической пипеткой отбирали 2.0 мл испытуемого раствора и переносили в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляли 5 мл алюминия хлорида раствора

алюминия хлорида 5% в этиловом спирте 70% и по истечении 10 минут вносили 1 мл этановой кислоты 3%. Объем доводили до метки спиртом этиловым 70% и оставляли на 30 минут для стабилизации образующегося комплекса. По истечении 30 минут измеряли оптическую плотность исследуемого раствора в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм.

Оценку суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин для абсолютно сухого сырья рассчитывали с учетом удельного показателя поглощения, рассчитанного для продукта реакции комплексообразования рутина с алюминия хлоридом:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A^0 \times a \times 2 \times (100 - W)}$$

Где А - значение показателя оптической плотности испытуемого извлечения;

А – значение удельного показателя поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 4109 нм, значение которого принимается за 260;

а- навеска сырья, взятого для анализа, гр.;

W – Влажность сырья, %

Аналитическую пробу измельченных плодов яблони лесной массой 10 г. (точная навеска) помещают в колбу со шлифом, емкостью 250 мл, прибавляют 200 мл дистиллированной воды и подсоединяют к обратному холодильнику, после чего проводят кипячение на водяной бане в течении получаса. Экстракцию повторяют дважды, используя каждый раз дополнительно 100 мл воды дистиллированной. Все полученные водные извлечения объединяют и проводят центрифугирование, с частотой вращения 5000 оборотов в минуту в течении 5 минут, после чего аккуратно сливают в мерную колбу, емкостью 500 мл через 3 слоя марли. Объем в колбе доводят водой до метки (раствор А). 20 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, приливают 95% спирт 75 мл, перемешивают в течении

5 минут нагревают на водяной бани и центрифугируют с частотой вращения 5000 оборотов в минуту в течении 15 минут. Жидкость над осадком фильтруют, осадок количественно переносят на фильтр и последовательно промывают 10 мл раствора 95% спирта, 10 мл ацетона и 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивают на воздухе, а затем до постоянной массы в сушильном шкафу. Содержание полисахаридов рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

$m_1$  – масса фильтра в граммах

$m_2$  – масса фильтра с полученным осадком в граммах

$M$  – масса сырья в граммах

$W$  – потеря в массе при высушивании, в %

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** Осуществляется с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья». Упаковка. В ящики с отверстиями в боковых стенках и крышках по 0,5 кг нетто. Транспортирование. Свежесобранное сырье следует отправлять для переработки немедленно после сбора любым видом транспорта.

**Хранение.** Хранение ЛРС осуществляется в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Приложение 8. Патент №2639119. Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2639119

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА, ОБЛАДАЮЩЕГО  
АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) (RU)*

Авторы: *Нестерова Надежда Викторовна (RU),  
Самылина Ирина Александровна (RU)*

Заявка № 2017111502

Приоритет изобретения 05 апреля 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 19 декабря 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 05 апреля 2037 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 639 119** (13) **C1**

(51) МПК  
*A61K 36/73* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2017111502, 05.04.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.04.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.04.2017

(45) Опубликовано: 19.12.2017 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, ФГАОУ  
 ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова,  
 технопарк

(72) Автор(ы):

Нестерова Надежда Викторовна (RU),  
 Самылина Ирина Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования Первый Московский  
 государственный медицинский университет  
 им. И.М. Сеченова Министерства  
 здравоохранения Российской Федерации  
 (Сеченовский университет) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: Государственная Фармакопея  
 СССР, вып.2. М.: Медицина, 1990, Статья  
 "Настойки", стр.148. RU 2409378 C2,  
 20.01.2011. М.Д. МАШКОВСКИЙ.  
 Лекарственные средства. М.: Медицина,  
 1988, т.2, стр.420.

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА, ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

## (57) Формула изобретения

Способ получения средства, обладающего антимикробной активностью, заключающийся в том, что высушенные листья яблони лесной объединяют в соотношении 1:1 по массе с жомом плодов яблони лесной, полученным после механического отжима сока и последующей сушки при 45°C в изотермическом режиме, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, экстрагируют 40% этанолом в соотношении 1:5 и настаивают в течение 48 часов, фильтруют, остаток экстрагируют 95% этанолом в соотношении 1:5, настаивают в течение 24 часов, фильтруют и объединяют полученные извлечения.

RU 2 6 3 9 1 1 9 C 1

RU 2 6 3 9 1 1 9 C 1



## Приложение 10.



## АКТ

Внедрения в учебный процесс

Ташкентского фармацевтического института

Результатов диссертационного исследования

Нестеровой Надежды Викторовны

на тему: «ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ  
MALUS SYLVESTRIS (ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ) Mill.».

Мы, нижеподписавшиеся, председатель, проректор Ташкентского фармацевтического института по учебной и воспитательной работе, д.фарм.н., проф. Юлдашев З.А., зав.кафедрой фармакогнозии д.фарм.н., профессор Урманова Ф.Ф., профессор кафедры фармакогнозии, д.фарм.н. Комилов Х.М. удостоверяем факт внедрения научной работы Нестеровой Надежды Викторовны в учебный процесс кафедры фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института. Материалы исследователя используются в программах повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов с высшим фармацевтическим образованием при чтении лекций и проведении семинаров.

Председатель комиссии:

Проректор Ташкентского фармацевтического института  
по учебной и воспитательной работе,  
д.фарм.н., проф.

З.А. Юлдашев

Члены комиссии:

зав.кафедрой фармакогнозии

д.фарм.н., профессор

Ф.Ф. Урманова

профессор кафедры фармакогнозии,

д.фарм.н.

Х.М. Комилов

доцент кафедры фармакогнозии и

стандартизации лекарственных средств

факультета повышения квалификации и

переподготовки фармацевтов, к.фарм.н.

Н.А.Абдурахмонова

## Приложение 11.

**Российская Федерация  
МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

**Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«Московский государственный университет  
пищевых производств»  
(ФГБОУ ВО «МГУПП»)  
Институт медико-социальных технологий**

Волоколамское шоссе, дом 11, Москва, 125080  
E-mail: [delo@mgupp.ru](mailto:delo@mgupp.ru)  
<http://www.mgupp.ru>  
ОКПО 02068634, ОГРН 1037739533699,  
ИНН/КПП 7712029651/774301001

от «19» сентября 2018 г. № 10-дб

«УТВЕРЖДАЮ»

**Директор ИМСТ ФГБОУ ВО  
«МГУПП»,**

**д.м.н., профессор**

**В.В.Гладько**



**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов научно-исследовательской работы

Результаты диссертационного исследования на тему «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья *MalusSylvestris* (Яблони лесной)», выполненного Нестеровой Надеждой Викторовной, внедрены в учебную работу кафедры фармации Института медико-социальных технологий ФГБОУ ВО «МГУПП» Минобрнауки России.

Материалы исследователя используются в учебных программах повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов с высшим фармацевтическим образованием при чтении лекций и проведении семинаров.

Заведующий кафедрой фармации,  
к.ф.н.

/И.С.Крысанов/

## Приложение 12.

## УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной работе  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, доктор  
медицинских наук, профессор

« 10 » 04 / 2018 г. И.Р. Рахматуллина

## А К Т

внедрения результатов диссертационного исследования Нестеровой Надежды Викторовны на тему «Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья *Malus Sylvestris* (L.) Mill.» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по направлению подготовки 33.06.01 – «Фармация» (направленность подготовки 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия») на кафедре фармации ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармации ИДПО: зав. кафедрой фармации ИДПО д. фарм. н, профессора В.А. Катаева, профессора, д. фарм. н. Г.М. Латыповой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Нестеровой Надежды Викторовны, посвященного фармакогностическому изучению яблони лесной, разработке методик качественного и количественного анализа, обоснованию подходов к стандартизации сырья *Malus Sylvestris* (L.), в научно-исследовательской работе, а также в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, ординаторами, аспирантами и специалистами. Результаты исследований способствуют повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья яблони лесной и дополняют данные о фармакологических свойствах исследуемого растения.

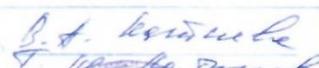
Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармации ИДПО  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,  
доктор фармацевтических наук, профессор



В.А. Катаев

Профессор кафедры фармации ИДПО  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,  
доктор фармацевтических наук, профессор

Подпись:   
Зав. кафедрой фармации ИДПО  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,  
Г.М. Латыпова

450008, г. Уфа, ул. Ленина, д.3

## Приложение 13.

## АКТ

Внедрения в учебный процесс

ФГБОУ ВО Воронежский Государственный Университет

Результатов диссертационного исследования

Нестеровой Надежды Викторовны

на тему: «ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ  
MALUS SYLVESTRIS (ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ) Mill.».

Мы, нижеподписавшиеся, председатель, декан фармацевтического факультета, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, д.фарм.н., проф. Сливкин А.И., доцент кафедры управления и экономики фармации и фармакогнозии, к.фарм.н. Гудкова А.А., ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии, к.фарм.н. Чистякова А.С. удостоверяем факт внедрения результатов научной работы Нестеровой Надежды Викторовны в учебный процесс кафедры фармакогнозии Воронежского Государственного Университета. Разработанная исследователем методика подтверждения подлинности и оценки количественного содержания флавоноидов и арбутина в плодах и листьях яблони лесной используются в программе дисциплины фармакогнозия.

Председатель комиссии:

декан фармацевтического факультета,  
зав. кафедрой фармацевтической химии  
и фармацевтической технологии,  
д.ф.н., проф.

 /А.И. Сливкин/

Члены комиссии:




/А.А. Гудкова/

/А.С. Чистякова/

## Приложение 14.

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной работе  
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ  
 им. И.М. Сеченова Минздрава  
 России (Сеченовский Университет)  
 Т.М. Литвиновой  
 «15» 03 2019 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационного исследования  
 «ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ  
 СЫРЬЯ MALUS SYLVESTRIS (ЯБЛОНИ ЛЕСНОЙ) Mill.»  
 по направлению подготовки 33.06.01 «Фармация» (направленность  
 подготовки 14.04.02 «фармацевтическая химия, фармакогнозия»)  
 Нестеровой Надежды Викторовны

Мы, нижеподписавшиеся, директор Ресурсного центра «Медицинский Сеченовский Предуниверсарий» Бирюкова Наталья Викторовна, заместитель директора, к.ист.н. Ресурсного центра «Медицинский Сеченовский Предуниверсарий» Ярошенко Александра Анатольевна, удостоверяем факт внедрения научной работы Нестеровой Надежды Викторовны в учебный процесс Ресурсного центра «Медицинский Сеченовский Предуниверсарий». Материалы исследователя используются при чтении лекций и проведения семинаров элективных курсов Ресурсного центра.

Директор Ресурсного центра  
 «Медицинский Сеченовский  
 Предуниверсарий»

 /Н.В. Бирюкова/

Заместитель директора Ресурсного центра  
 «Медицинский Сеченовский  
 Предуниверсарий»

 /А.А. Ярошенко/