

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА
ЛУМУМБЫ»

На правах рукописи

Тура Блеона

**ФАРМАКОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛОДОВ ДЕРЕЗЫ
ОБЫКНОВЕННОЙ (*Lycium barbarum* L.)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент
Успенская Елена Валерьевна

Москва – 2023

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Плоды дерезы обыкновенной (<i>L. barbarum</i> L.). История	11
1.2. Ботаническая, фармакогностическая характеристика дерезы.....	12
1.3. Фармакопейные требования к контролю качества ЛРС <i>Lycium</i>	14
1.4. Обзор химических компонентов в сырье рода <i>Lycium</i> (<i>Solanaceae</i>)	18
1.5. Биологические действия компонентов растительного сырья дерезы.....	20
1.5.1. Антиоксидантная активность.....	22
1.5.2. Иммунологическая и противоопухолевая активность	22
1.5.3. Гипогликемический и гиполипидемический эффект	22
1.5.4. Профилактическое воздействие на клетки сетчатки глаз	23
1.5.5. Влияние на общее состояние здоровья и старение.....	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	24
2.1. Описание объекта исследования	24
2.2. Реактивы и растворители	24
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.3.1. Ультрафиолетовая спектроскопия.....	24
2.3.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография	25
2.3.3. Спектроскопия ИК-НПВО.....	25
2.3.4. Метод малоуглового рассеяния лазерного света	25
2.3.5. Метод динамического рассеяния света.....	26
2.3.6. Рентгенофлуоресцентная спектрофотометрия.....	27
2.3.7. Поляриметрия	27
2.3.8. Оптическая микроскопия	28
2.3.9. Биологические методы исследования. Метод <i>Spirotox</i>	28
2.4. Методики фитохимического исследования.....	29
2.4.1. Определение подлинности сырья	29
2.4.2. Определение доброкачественности сырья	29
2.4.3. Качественный анализ	29
Качественное обнаружение полисахаридов	29
Качественное обнаружение флавоноидов	29

2.4.4. Количественный анализ биологически активных веществ	29
Сумма органических кислот и аскорбиновой кислоты.....	30
Дубильные вещества.....	30
Содержание экстрактивных веществ	30
Определение флавоноидных соединений.....	31
Определение восстанавливающих сахаров	31
β -2,1-Связанные фруктозаны	31
2.4.5. Приготовление водных и спиртовых извлечений.....	32
2.4.6. Извлечение и очистка инулина из плодов дерезы обыкновенной	32
2.4.7. Статистическая обработка результатов исследований.....	32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1. Оценка качества плодов дерезы обыкновенной	33
Определение подлинности сырья	33
Идентификация сырья по морфологическим признакам.....	33
Идентификация сырья по микродиагностическим признакам.....	34
3.1.2. Числовые показатели	37
Влажность	37
Зола общая	38
Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl.....	39
Экстрактивные вещества.....	40
3.1.3. Испытания на определение маркерных групп БАВ	42
Качественный анализ.....	42
Определение восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом	47
Разработка методики количественного определения количества флавоноидов в плодах дерезы обыкновенной спектрофотометрическим методом	53
Определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин	57
Определение органических кислот методом титриметрии и ВЭЖХ	59
Определение витамина С титриметрическим методом.....	61
3.2. Изучение дисперсных характеристик, коллоидной стабильности и токсичности различных экстрактов из плодов дерезы обыкновенной	63

3.2.1. Приготовление водных извлечений для анализа	63
3.2.2. Исследование жидких экстрактов из плодов дерезы обыкновенной	65
3.2.3. Исследование настоев из плодов дерезы обыкновенной	66
Определение дисперсности настоев дерезы обыкновенной по данным метода DLS.....	66
Дисперсный анализ методом лазерной дифракции света.....	71
3.2.4. Исследование отваров из плодов дерезы обыкновенной.....	74
Определение дисперсности отваров дерезы обыкновенной по данным метода DLS.....	74
Исследование стабильности отваров	78
Оценка токсичности отваров методом <i>Spirotox</i>	80
3.2.5. Исследование настоек из плодов дерезы обыкновенной	83
Определение дисперсности настоек по данным метода DLS.....	83
Дисперсный анализ методом лазерной дифракции света.....	87
Влияние разбавления настоек на их стабильность	89
3.3. Рентгенофлуоресцентный анализ элементного профиля в образцах плодов и водно-спиртовых экстрактов дерезы обыкновенной, интродуцированной в Албании	91
3.3.1. Определение сухого остатка	91
3.3.2. Определение элементного состава	93
3.4. Разработка оптимальных способов выделения инулина - пребиотика группы фруктозанов из плодов дерезы обыкновенной (<i>L. barbarum L.</i>)	100
3.4.1. Выделение и очистка инулина	101
3.4.2. Описание субстанции.....	104
ИК-спектроскопия (НПВО).....	106
УФ-спектроскопия	111
3.4.3. Оценка чистоты и количественный анализ	111
Оптическая активность.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Мировой фармацевтический рынок демонстрирует устойчивое увеличение доли лекарственных средств (ЛС) растительного происхождения. Это вызвано целым рядом причин, среди которых: безрецептурный отпуск, доступность в сравнении с химиотерапевтическими средствами, стойкая убежденность населения в сравнительно низкой токсичности ЛС растительного происхождения. Растения рода дерезы семейства пасленовых (лат. *Lycium*) приобрели широкое мировое признание в качестве компонента здорового питания. Однако из 14 видов дерезы, распространенных в Евразии, только два - *L. barbarum* L. и *Lycium ruthenicum* M. распространены в РФ. В государственные фармакопеи (ГФ) разных стран, а также в Американскую фармакопею трав (American Herbal Pharmacopoeia, АНР), за исключением РФ, включены монографии на плоды и корни растений рода дерезы, компоненты которых обладают антиоксидантной, гепатопротекторной, гипогликемической, пребиотической и проч. активностью. Сравнительный анализ фармакопейных требований к лекарственному растительному сырью (ЛРС) рода дереза (*Lycium*) демонстрирует существующие различия не только в видах анализируемого сырья, но и перечне показателей качества [<https://www.pharmacopoeia.com/BP2019>; USP *Herbal Medicines Compendium*, 2022 <https://hmc.usp.org/>]. Следовательно, существует необходимость гармонизации национальных фармакопей на данный вид сырья в условиях глобализации его обращения. В современных литературных источниках приведены сведения о качественном и количественном составе плодов дерезы. Однако отсутствие в РФ стандартов качества на растительное сырье (РС) дерезы, которые должны включать спецификацию, описание аналитических методик, а также соответствующие критерии приемлемости для указанных показателей качества РС, делают невозможным изготовление различных лекарственных форм из плодов дерезы. Следовательно, фармакохимическая характеристика плодов дерезы обыкновенной в сочетании с изучением дисперсных свойств и данных о токсичности извлечений, позволит расширить ассортимент

отечественных лекарственных средств растительного происхождения, изготовленных из перспективного растительного сырья.

Степень разработанности темы исследования. Теоретическую основу данного диссертационного исследования составляют труды ученых, рассматривающих вопросы стандартизации и изучения химического состава и свойств плодов дерезы [Курдюков Е.Е., 2021; Попков П.Н., 2015; Amagase H. et al., 2009; Zhu S, et al., 2022], морфолого-анатомического исследования плодов дерезы [Ворончихина А.П., Семенова Е.Ф., 2021; А.М. Анцышкина, С.Л. Морохина, 2018; Barrie Cassileth, 2010]; сравнительного изучения элементного состава [Секинаевой М. А., 2018]. Однако анализ литературных данных показал малочисленность публикаций по вопросам методологии разработки новых средств на основе сырья дерезы, а также их фармакохимического исследования, что свидетельствует о необходимости продолжения исследований в рамках выбранной темы диссертационной работы.

Область исследований. Диссертационная работа соответствует формуле специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 3, 6 и 7 паспорта специальности:

Пункт 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Пункт 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Пункт 7 – Изучение биофармацевтических аспектов стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных средствах.

Объект и предмет исследования. В рамках диссертационного исследования изучали анатомо-диагностические признаки и показатели качества плодов дерезы (*Lucium barbarum* L.), уникальный биогеохимический элементный профиль, размер nano- и микрообъектов в различных извлечениях, их электрокинетическую устойчивость и биологическую активность извлечений, приготовленных из высушенных и заготовленных в конце вегетации плодов дерезы обыкновенной - интродуцента Западной Албании.

Цель работы заключается в изучении морфологических особенностей, качества исследуемых плодов, а также физико-химических свойств и коллоидной устойчивости водно-спиртовых извлечений из плодов дерезы обыкновенной (*Lucium barbarum* L.), интродуцированной в Западной Албании, для перспективного применения в фармации.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Определить анатомо-диагностические признаки и показатели качества плодов дерезы обыкновенной (*L.barbarum* L.), интродуцированной в Западной Албании;
2. Изучить дисперсный состав, коллоидную стабильность водно-спиртовых извлечений плодов дерезы обыкновенной по данным фотонной корреляционной спектроскопии и оценить биологическую активность водных извлечений методом *Spirotox* для разработки жидких фармацевтических рецептур;
3. Применить метод энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа для определения уникального элементного профиля в образцах плодов и водно-спиртовых извлечений дерезы обыкновенной определенной биогеохимической провинции в качестве подхода к стандартизации исследуемого растительного сырья и жидких форм на его основе;
4. Разработать оптимальные способы выделения инулина – пребиотика группы фруктозанов из плодов дерезы обыкновенной (*L.barbarum* L.) и предложить комплексный подход, включающий спектральные и оптические методы определения подлинности и содержания вещества.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в разработке практических, оригинальных подходов к контролю качества плодов дерезы обыкновенной определенной биогеохимической провинции, водно-спиртовых извлечений, а также выделенного маркерного вещества инулина группы фруктозанов методами химического и физико-химического анализа. Ключевые результаты исследования, составляющие его научную новизну, состоят в:

1. определении диагностических признаков (макро- и микроскопический анализ) плодов дерезы обыкновенной и в разработке методик определения биологически активных веществ маркерных групп.

2. изучении дисперсного состава, стабильности и биологической активности/токсичности приготовленных по НД водных и спиртовых извлечений из плодов дерезы обыкновенной по данным фотонной корреляционной спектроскопии;

3. определении уникального элементного профиля исследуемых объектов растительного сырья и извлечений в качестве подхода к стандартизации и контролю качества;

4. разработке способов выделения пребиотика инулина с определением его подлинности и содержания действующего вещества.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в последовательно предложенных этапах комплексной фармакохимической характеристики исследуемых объектов – плодов, дерезы обыкновенной (*Lucium barbarum* L.) а также водных и спиртовых экстрактов, что позволит стандартизовать и изготавливать ЛП на основе дерезы обыкновенной для решения фармацевтических задач по поиску и изучению новых лекарственных средств. Разработанные подходы и методики качественного и количественного анализа внедрены в практикум учебной и исследовательской деятельности кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН».

Методология и методы диссертационного исследования для решения поставленных задач включали инструментальные подходы, основанные на

применении современного аналитического оборудования для экспериментального изучения различных хроматографических, спектральных, оптических, дисперсных, электрокинетических свойств объектов диссертационной работы, а также эффектов при оценке механизмов взаимодействия с клеточным биосенсором *Spirostomum ambigua*.

Положения, выносимые на защиту:

1. осуществлен макроскопический анализ внешних признаков: цвет, форма, длина и диаметр плода; вкус; цвет и форма семени, а также микроскопический анализ анатомических особенностей плодов дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum* L.), культивированной в Западной Албании, для применения в фармацевтической практике в сферах использования перспективного растительного сырья.

2. показано, что элементный профиль плодов, как уникальная химическая характеристика биогеохимической провинции культивирования, может служить основой для определения подлинности исследуемого растительного сырья.

3. Охарактеризована дисперсность, изучена коллоидная стабильность и *Spirotox*-биологическая активность жидких экстрактов (для приема внутрь), что открывает новые возможности для фармацевтического применения перспективного растительного сырья дерезы обыкновенной.

4. разработаны оптимальные способы получения и фармацевтического анализа полисахарида инулина с применением комплекса физико-химических методов, что позволит расширить спектр возможностей фармацевтического применения дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum* L.), как источника пищевых волокон.

Степень достоверности результатов исследования подтверждается валидированными методиками, используемым современным физико-химическим оборудованием, многочисленными повторами, обеспечивающими статистически достоверные данные таблиц и графиков, а также подтвержденными ссылками на литературные источники зарубежных и отечественных авторов.

Апробация результатов исследования по диссертации «Фармакохимическая характеристика плодов дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum* L.)» проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН» (протокол № 0300–35-04/06 от 22.12.2022). Основные результаты исследования представлены в 6 публикациях, среди которых 4 статьи в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus и CAS), 2 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, а также в 2 тезисах и устных докладах на XXIII Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2022 г.); XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Москва, 2022 г).

Структура и объем диссертации. Общий объем диссертации составляет 138 страницы машинописного текста, включая 44 рисунка, 15 таблиц, 180 ссылок на литературные источники.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Научный интерес к дерезе или *Lycium barbarum L.* был проявлен в середине 20 века и был связан не только с накопленными данными, свидетельствующими о биологических эффектах данного растения, но и инструментальными возможностями изолирования и анализа активных веществ [1].

Примером служит научное заявление исследователей из Пакистана в 1969 г. о гипотензивном действии бербамин – алкалоида *Lycium barbarum L.*, механизм которого заключался в прямом угнетающем действии на миокард в дозе от 0,125 мг до 1 мг и высвобождении гистамина из тканей подопытных животных [2]. Чуть позднее японскими исследователями из Школы медицины университета Токио было установлено, что введение внутривенной инъекции неочищенного экстракта *Lycium chinense M.* способствовало овуляции у взрослой самки кролика. Это дало возможность будущим разработкам в репродуктивной физиологии, хотя природа и механизм действия биологически активных веществ оставались долгое время неизвестными [3].

Растения рода *Lycium* широко используется в традиционной китайской медицине, а также приобрели широкое мировое признание в качестве компонента питания [4]. Опрос среди 106 фитотерапевтов Израиля об использовании пасленовых в качестве лекарственных растений показал, что только четыре вида, среди которых встречается и дереза – *Lycium europeum*, *Solanum nigrum*, *Hyoscyamus aureus*, *Hyoscyamus albus* – широко используются в настоящее время [5].

1.1. Плоды дерезы обыкновенной (*L. barbarum L.*). История

История упоминания дерезы (*Lycium*) датируется 2070 г. до н. э. в виде костяных скриптов в китайских династиях Ся и Шан бассейна реки Хуанхэ [6]. В китайском языке плоды дерезы называются «gou qi zi», где «gou» означает «собака/волк», а «zi» – «маленький фрукт/ягода». В литературе встречаются многочисленные альтернативные (претенциозные) названия дерезы: лиций, волчья ягода (wolfberry), ягода годжи (goji berry), чайное растение герцога Аргайлла (Duke

of Argyll's tea plant), тибетский барбарис (Tibetan barberry), чертовы плети, заманиха, живоблот. Однако во избежание ошибок при описании растительного сырья дерезы, следует придерживаться ботанических научных названий растений: дереза обыкновенная (*Lycium barbarum* L.), дереза китайская (*Lycium chinense* Mill.), дереза арабская (*Lycium arabicum* Schweinf. ex Boiss.), дереза европейская (*Lycium europaeum* Miers), дереза русская (*Lycium ruthenicum* Murray) и др., соответствующие естественному ареалу их произрастания [7]. Все разновидности дерезы относятся к таксономическим категориям: класс – двудольные, семейство – пасленовые, триба – *Lychieae*, род – дереза, включают более 90 видов, семь из которых встречаются в Китае [8].

1.2. Ботаническая, фармакогностическая характеристика дерезы

Дереза обыкновенная – многолетний листопадный ветвистый кустарник 1–2,5 м высотой с длинными, тонкими светло-желтыми побегами и неолиственными пазушными колючками 6–15 мм. Плод – красная продолговато-яйцевидная или острая ягода, 8–18 мм длиной. Ягоды собирают спелыми, сушат до состояния сморщенного околоплодника и подвергают воздействию прямого солнечного света до тех пор, пока экзокарпий станет сухим и твердым, а мякоть – мягкой [9]. Долгое время в качестве компонентов пищи и биологически активных веществ использовались как плоды, так и листья, кора, корни и молодые побеги *Lycium*. Согласно [10] из 97 только 35 видов *Lycium* зарегистрированы в мире для применения в диетологии и медицине (рис. 1).

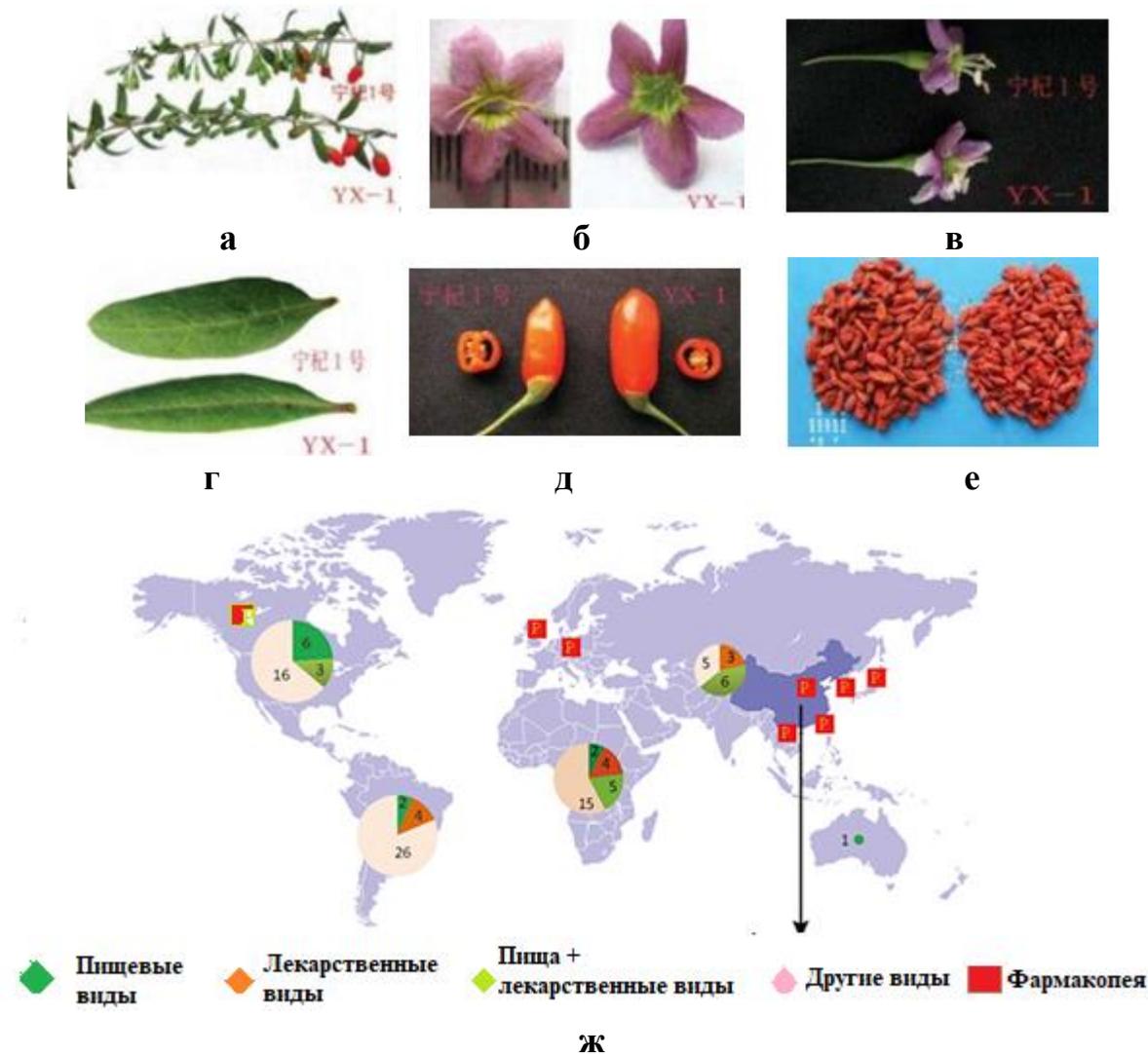


Рисунок 1. Ботаническая идентификация *L. Barbarum* L: а – ветви с ягодами; б и в – цветки; г – листья; д – свежие плоды (ягоды); е – высушенные плоды; ж – мировое распространение *Lycium* и преимущественные виды применения растительного сырья [10].

В то время как 85% видов *Lycium* встречаются в Америке и Африке, из них используются только 26%, а из 14-ти – 9 видов в Евразии. В Китае только *L. barbarum* и *L. Chinense* превратились в товары, продаваемые на мировом рынке в качестве «superfood». Несмотря на то, что плоды *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* были зарегистрированы в фармакопеях и стандартах разных государств (см. рисунок 1ж), спецификации и требования к качеству в этих стандартах различаются. Таким образом, существует очевидная и срочная необходимость в разработке унифицированного стандарта для обеспечения безопасности и эффективности плодов *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, полученных из растения *Lycium barbarum* L. или *Lycium chinense* Mill.

1.3. Фармакопейные требования к контролю качества ЛРС *Lycium*

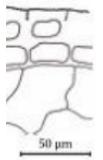
19 Марта 2019 года Американская фармакопея трав (American Herbal Pharmacopoeia, АНР) выпустила монографию, содержащую стандарты качества и терапевтический сборник плодов дерезы (*Lycium barbarum*, *L. chinense*, *Solanaceae*). Описанная монография *Lycium* стала 39-ым выпуском, опубликованным АНР с 1998 года и включала в себя результаты объединенной работы АНР, Института развития ЛР Китайской академии медицинских наук и 32 экспертов из академических кругов, промышленности и медицинской практики [11]. По состоянию на 2021 год стандарты качества на ЛРС растений *Lycium barbarum* L. и *Lycium chinense* Mill. представлены в фармакопеях Китая, Кореи, Японии, США, Великобритании и, как правило, включают разделы: названия, описание, подлинность, чистота, содержание экстрактивных веществ, условия хранения (таблица 1) [12-16].

Таким образом, сравнительный анализ требований к ЛРС *Lycium* демонстрирует тенденцию к гармонизации подходов к контролю качества, несмотря на существующие до сих пор различия в видах анализируемого сырья и перечне показателей качества (см. таблицу 1).

Таблица 1. Сравнительные фармакопейные требования к контролю качества ЛРС *Lycium*.

Растение, Названия, Синонимы	Показатели качества			
	Описание	Идентификация	Чистота	Содержание экстракта, %
Китайская фармакопея (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, English Edition 2000/2005)				
Fructus Lycii Gouqizi Плоды <i>Lycium barbarum</i> L.	Плоды подпузырьковидной или эллипсоидной формы, длиной 6-20 мм, d = 3-8 мм, алого или темно-красного цвета. Без запаха, вкус сладкий.	ТСХ - фиолетовые зоны между Rf 0,71 и Rf 0,89 (каротиноиды), синяя зона при Rf 0,56 (зеаксантин), розово-фиолетовые зоны при Rf 0,42 (эфирное масло), синяя флуоресцентная зона при Rf 0,81 (скополетин), фиолетовая зона между Rf 0,52-0,57 (линолевая кислота)	-	-
Британская фармакопея (The British Pharmacopoeia (BP) 2019/Barbary Wolfberry Fruit)				
Barbary Wolfberry Fruit Сушеные, цельные, спелые плоды <i>Lycium barbarum</i> L.	Эллиптическая, веретенообразная или яйцевидная форма, длиной 6-20 мм, d = 3-10 мм, оранжево-красного или темно-красного цвета.	1.Морфологические особенности 2.Микроскопические 3.ТСХ - ярко-синее флуоресцентное пятно для скополетина, оранжевое флуоресцентное пятно для рутозида	1. Потеря при высушивании (не более 11%; 2 ч); 2. Общая зола (не более 5 %)	Содержание экстракта - минимум 55,0 %
Фармакопея Японии (JP XVII Crude Drugs and Related Drugs / Lycium Fruit)				

<p>Lycium Fruit</p> <p>Плоды <i>Lycium</i> - это плоды растения <i>Lycium chinense</i> или <i>Lycium barbarum</i> Linne</p>	<p>Веретенообразный плод с острой вершиной, длиной 6-20 мм, d=3-8мм, темно-красного цвета. Запах характерный вкус сладкий, слегка горьковатый</p>	<p>ТСХ - желтое основное пятно появляется при значении Rf около 0,6.</p>	<p>1.Посторонние примеси (не более 2%) 4.Общая зола (не более 8 %) 5.Кислото нерастворимая зола (не более 1%);</p>	<p>Содержание экстракта – не более 35,0%</p>
<p>Корейская фармакопея трав (Korean Herbal Pharmacopoeia)</p>				
<p><i>Lycium Fruit</i> <i>Lycii Fructus</i></p>	<p>Плод <i>Lycium</i> - эллиптический, длиной от 6 мм до 20 мм и d=3-10мм; темно-красного цвета; обладают легким характерным запахом и сладким вкусом.</p>	<p>ТСХ - одно желтоватое пятно при значении Rf около 0,6.</p>	<p>1. Посторонние вещества — менее 3,0 % ветвей и плодоножек. 2.Тяжелые Me: Pb (не более 5 ppm); As (не более 3 ppm); Hg (не более 0,2 ppm); Cd (не более 0,3 ppm); 3.Остаточные пестициды 4. Диоксид серы-не более 30ppm. 5.Зола не более 8,0 %.</p>	<p>ВЭЖХ</p>
<p>Тайваньская Китайская фармакопея (Taiwan Chinese Pharmacopoeia Second Edition)</p>				
<p>Wolfberry <i>Lycii fructus</i> (<i>Solanaceae</i>) <i>Lycium chinense</i> Mill. or Ningxia wolfberry</p>	<p>Плоды - ярко-оранжево-красные ягоды эллипсоидной формы длиной 1-2 см и d=3-8 мм.</p>	<p>1.Морфологические особенности 2.Микроскопические характеристики</p>	<p>1.Влажность 2.Общая зола 3.Зола, не растворимая в кислотах 4.Водорастворимые экстракты 5.ТСХ 6.Остатки пестицидов</p>	<p>1.Содержание CLP 2.Содержание веществ-маркеров</p>

<i>Lycium barbarum</i> L.			7.Остаток серы диоксида 8.Тяжелые Ме	
Американская фармакопея трав (American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy)				
<i>Lycium chinense</i> Mill., <i>Lycium barbarum</i> L. A: <i>Lycium</i> Fruit B: Seed Pinyin Gou ji zi	<p>A: Плод Экзокарпий с неправильными полигональными ячейками, кутикула с заметными бороздками</p>  <p>B: Семена Вид поверхности (характерный для пасленовых) эпидермис– одревесневший, волнистый, с неоднородной толщиной, клетки с бороздками</p> 	-	-	-

1.4. Обзор химических компонентов в сырье рода *Lycium* (*Solanaceae*)

Согласно [16-18] в сырье дерезы обнаружено около 355 компонентов разных видов и различных частей (плоды, корневая кора, листья, семена и цветы) растения, которые классифицированы на группы: глицерогалактолипиды (около 17 соединений), фенилпропаноиды (4 соединения), кумарины (9 соединений), лигнаны (8 соединений), флавоноиды (27 соединений), амиды (около 16 соединений), алкалоиды (около 72 веществ групп имидазола, пиперидина, пиррола, спермина, тропана), антрахиноны (4 соединения), органические кислоты (32 вещества), терпеноиды (около 37 структур), стерины и стероиды (57 соединений), пептиды (5 соединений) и другие составляющие. Результаты, основанные на этих фитохимических исследованиях, могут заложить прочную основу для лучшего понимания фармакологической активности *Lycium* и оценки качества. Соотношение различных соединений в сырье дерезы и химические структуры некоторых соединений представлены на рисунке 2 и таблице 2.

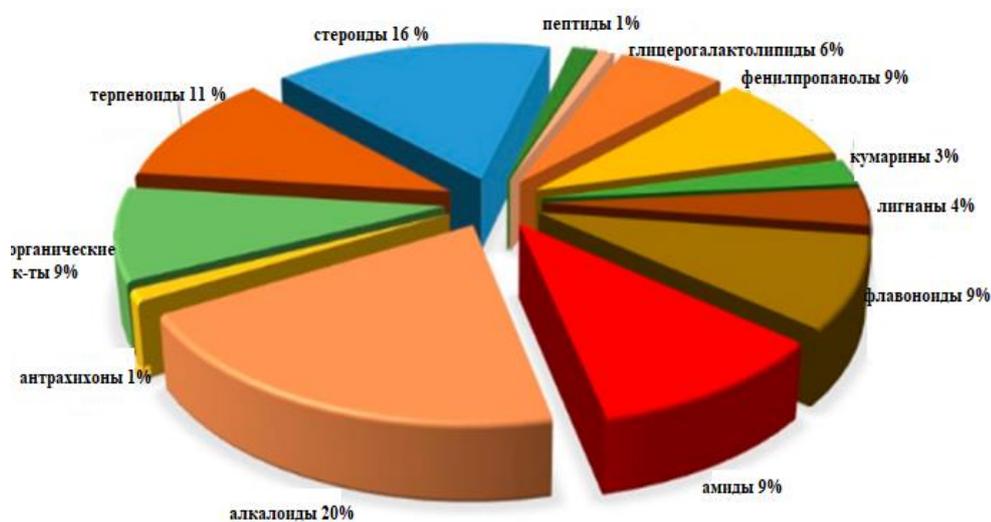
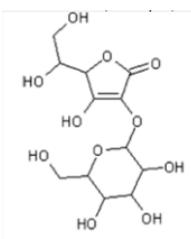
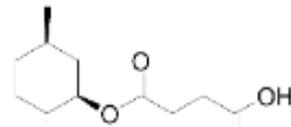
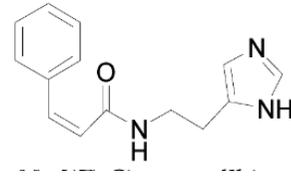
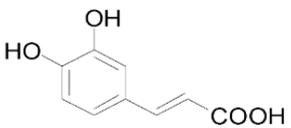
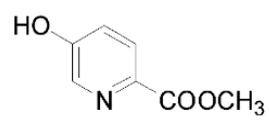
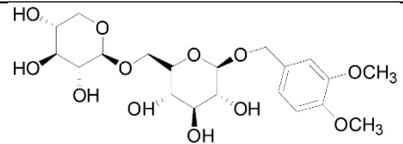
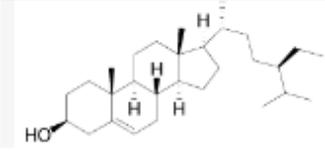
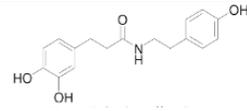


Рисунок 2. Доля биологически активных компонентов в растениях рода дерезы (*Lycium*).

Таблица 2. Химические структуры соединений из растений рода дерезы (*Lycium*)

Класс химических соединений	Структура	Источник	Класс химических соединений	Структура	Источник
Аналог витамина С	 <p>2-O-β-D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2βG)</p>	[19]*	Терпеноиды	 <p>L-Монометилсукцинат плоды <i>L. Barbarum</i></p>	[23]
Группы имидазола	 <p>[(Z)- Циннамоил]гистамин листья <i>L. Barbarum</i></p>	[20]	Фенилпропаноиды	 <p>E-Феруловая кислота кора корня <i>L. chinense</i></p>	[24]
Группы пиперидина	 <p>Метилвый эфир 5 гидрокси-2- пиридинкарбоновой к-ты плоды <i>L. Barbarum</i></p>	[21]	Глицерогалактолипиды	 <p>3', 4'-Диметокси-бензилэтил- 1-O-βD-ксилопиранозил-(1→6) -O- βD-глюкопиранозид кора корня <i>L. chinense</i></p>	[25]
Стероиды	 <p>В-Ситостерол плоды <i>L. chinense</i></p>	[22]	Амиды	 <p>N- α,β- Дигидрокаффеоил)тирамин плоды <i>L. Barbarum</i></p>	[26]

Растительное сырье *Lyium barbarum* содержит также полисахариды (*L. barbarum* полисахариды или LBP), которые, по мнению некоторых исследований, являются основными биологически активными компонентами дерезы и составляют от 5 до 8% по содержанию в высушенных плодах [28]. Из плодов *L. barbarum*, *L. chinense* и *L. ruthenicum* было выделено более 40 полисахаридов с диапазоном молекулярной массы 8–241 кДа. Полисахариды очищают спиртом при осаждении водного экстракта, а также гель-проникающей хроматографией и ВЭЖХ. Структурный состав LBP может быть изучен с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (GC-MS), ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-ToF-MS). Полисахариды LBP имеют гликопептидную структуру гликан-O-Ser и содержат галактуроновую кислоту, 18 аминокислот и моносахариды (ксилозу, глюкозу, арабинозу, рамнозу, маннозу, галактозу, фруктозу, глюкуроновую кислоту) [29].

1.5. Биологические действия компонентов растительного сырья дерезы

Положительное воздействие *Lyium barbarum* на здоровье представлено на рисунке 3. Энергетическая и пищевая ценность веществ в сырье свежих и высушенных плодах *Lyium barbarum* приведено в таблице 3.

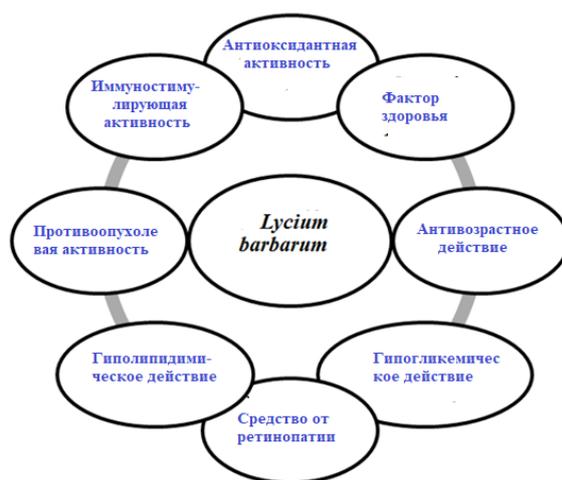


Рисунок 3. Биологические эффекты дерезы обыкновенной [29-31].

Таблица 3. Энергетическая и пищевая ценность веществ в сырье дерезы обыкновенной [29-31]

	Согласно литературе		Культивируется в Турции	Культивируется в Италии		Рекомендуемая Суточная Норма
	Свежие плоды	Высушенные плоды	Высушенные плоды	Свежие плоды	Высушенные плоды	
Энергетическая и пищевая ценность						
Энергия, ккал	-	349	-	87	348	2,000 ккал/ день
Мякоть (г/100г)	-	13,0	7,3	2,9	11,4	25 г/день
Белок (г/100 г)	4,5	14,3	8,9	2,5	10,2	0,8 г белка на кг массы тела/день
Жир (г/100 г)	2,3	0,4	4,11	1,1	4,4	44-77 г/день
Углеводы (г/100 г)	9,1	77,1	487 (г/100 мл)	15,3	61,3	225 - 325 г/день
Са (мг)	-	190	1003,40	26,6	101,3	800 мг/день
Fe(мг)	-	6,8	45,77	0,9	3,4	14 мг/день
Na (мг)	-	298	-	57,3	209,8	2300 мг/день
Витамин С (мг)	-	48,4	-	40	38	80 мг/день
Витамин А (МЕ)	-	26822	-	-	-	2333-3000 МЕ /день
Тиамин (мг)	0,23	-	-	-	-	4.9 мг/ день
Рибофлавин (мг)	0,33	-	-	-	-	1.1-1.3 мг/ день
Ниацин (мг)	1,7	-	-	-	-	14 мг/ день

1.5.1. Антиоксидантная активность

Дереза обыкновенная проявляет способность предупреждать перекисное окисление липидов (ПОЛ), связывая супероксидные анионы O_2^- и гидроксильные радикалы OH^\cdot [32], благодаря каротиноидам, флавоноидам, полисахаридным фракциям и 2-О-β-D-глюкопиранозил-L в его структуре (см. табл. 2). Способность к поглощения кислородных радикалов плодов дерезы обыкновенной сопоставима с действием таких ягод, как черника и клубника.

1.5.2. Иммунологическая и противоопухолевая активность

Вещества, содержащиеся в *Lycium barbarum*, проявляют антипролиферативное и проапоптотическое действие, а также способностью стимулировать иммунные функции и предупреждать развитие побочных эффектов химиотерапии [33]. Было заявлено, что *Lycium barbarum* приобретает эти свойства благодаря полисахаридам *Lycium barbarum* (LBP), скополетину (6-метокси-7-гидрокумарину), 2-О-β-D-глюкопиранозил-L-аскорбиновой кислоте (см. табл. 2). Было показано, что экстракты *Lycium barbarum*, приготовленные в высоких дозах (≥ 5 г/л), стимулируют белок p53 и, таким образом, определяют апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы [34]. В другом исследовании, проведенном со здоровыми добровольцами (n=60), сообщалось, что уровни лимфоцитов, интерлейкина-2 и иммуноглобулина G в группе, получавшей сок *Lycium barbarum* (120 мл), увеличились без ПО [35].

1.5.3. Гипогликемический и гиполипидемический эффект

В исследованиях на крысах, страдающих диабетом, было установлено влияние LBP на уровень глюкозы в крови. Для этого животных разделили на 5 групп (n=8) (контрольная группа, группа, которой вводили 100 мг/кг LBP, и группа, которой вводили 50, 100, 200 мг/кг LBP IV). Уровни глюкозы в крови, триглицеридов, общего холестерина и ХС-ЛПНП у крыс, которым вводили экстракты LBP (100 мг/кг) и LBP IV (200, 100, 50 мг/кг), значительно снизились по сравнению с контрольной группой диабета [32].

1.5.4. Профилактическое воздействие на клетки сетчатки глаз

Экстракты *Lycium barbarum* обладают профилактической функцией на ранней стадии дегенерации сетчатки благодаря содержанию зеаксантина и лютеолина – каротиноидов. Предположительно, механизм действия заключается в их способности снижать внутриглазное давление и ингибировать апоптоз нейронов клеток сетчатки [36].

1.5.5. Влияние на общее состояние здоровья и старение

По данным [37] ежедневное потребление сока *Lycium barbarum* (120 мл Гочи= 150 г свежего фрукты) улучшает общее состояние здоровья, выносливость, качества сна, эмоциональное состояния и ощущение счастья, а также уменьшение головной боли, депрессии, болей в спине, нарушения концентрации и недомогания.

Таким образом представленные материалы в главы 1 свидетельствуют о значительном интересе к изучаемому объекту, а также о необходимости исследования в области стандартизации и контроля качества плодов дерезы для скорейшего их в ведение в медицине РФ в качестве официального.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Описание объекта исследования

Плоды дерезы обыкновенной (*L. barbarum* L.), собранные с интродуцированных растений, были приобретены в течение летнего сезона в Национальном парке Дивьяке-Караваста Западной Албании (N 48°13'23,2" E 25°11'42,0). РС было идентифицировано по наиболее важным внешним ключевым признакам: форме жизни, типу плода и идентификации под микроскопом в соответствии с Американской фармакопеей лекарственных растений [38]. Сушеные плоды дерезы обыкновенной были помещены в отдельные пластиковые пакеты и запечатаны под вакуумом для хранения и дальнейшего использования.

2.2. Реактивы и растворители

Стандарты D-фруктозы, D-глюкозы (>95% чистоты), стандарты органических кислот винной кислоты, яблочной кислоты, лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты (>99% чистоты), рутин $\geq 94\%$ и скополетин $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich Chemical Co. Сент-Луис, Миссури, США). Азотная кислота HNO_3 , серная кислота H_2SO_4 (95-98%, реагент American Chemical Society/ACS) реагент ацетат свинца ($\geq 99\%$, реагент ACS) фосфата натрия ($\geq 99,0\%$, реагент ACS), резорцин плюс (99%, реагент ACS), хлороводородная кислота (37%, Sigma-Aldrich Chemical Co.)

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.3.1. Ультрафиолетовая спектроскопия

УФ-спектроскопию использовали для измерения оптической плотности водно-спиртовых экстрактов и инулина, выделенных из плодов дерезы обыкновенной. Использовали двухлучевой спектрофотометр Agilent Cary UV-Visible Model 100 (США) с диапазоном длин волн 190-800 нм, работающий при 100-120 В и частоте 30+ Гц и с вольфрамово-галогенным источником света. Спектры получали в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель. Толщина светопоглощающего слоя – 1 см.

2.3.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Количественный анализ флавоноидов в экстрактах дерезы обыкновенной проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 DAD с автоматическим дозатором, вакуумным дегазатором, градиентным насосом, термостатом и спектрофотометрическим диодно-матричным детектором той же серии производства США. Хроматографическая колонка: Нуклеозил фирмы Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия (100-3 C18, длина – 100 мм, внутренний диаметр - 4,6 мм, размер частиц - 2,7 мкм); температура хроматографической колонки: +35,00 °С.

Определение винной, яблочной, аскорбиновой и лимонной кислот проводили с использованием жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence, оснащенного дегазатором, четвертичным насосом, автосамплером, настроенным на объем впрыска 20 мкл, колонкой Restek HPLC RP-C18 (размер частиц 3 мкм, идентификационный номер 150 x 4,6 мм, выдерживается при 25 °С) и тип детектора - спектрофотометрический.

2.3.3. Спектроскопия ИК-НПВО

Анализ в средней ИК-области проводился с использованием ИК- Фурье-спектрометра Cary 630 (Agilent Technologies, США) с приставкой НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения / ATR-attenuated total reflection), с алмазным кристаллом. Спектральный диапазон от 5000 до 550 см⁻¹, спектральное разрешение < 2 см⁻¹. Спектры были получены и проанализированы с помощью программного обеспечения Resolutions Pro.

2.3.4. Метод малоуглового рассеяния лазерного света

Распределение надмикронных частиц в водно-спиртовых извлечениях дерезы обыкновенной определяли на оборудовании MasterSizer 3600 E (Малверн, Великобритания) при условиях: гелий-неоновый лазер $\lambda = 633$ нм, фон - вода очищенная. Результатами измерений были спектры распределения частиц по размерам в диапазоне 0,5–188 мкм. Все результаты для исследуемых растворов

были получены с учетом вычитания исходного фонового сигнала (очищенная вода) [39].

Метод малоуглового лазерного рассеяния света (LALLS) используется для определения распределения частиц по размерам на основе измерения интенсивности углового рассеяния плоской монохроматической электромагнитной волны на частицах аэрозоля или суспензии. Когда частица попадает в освещенную область и покидает ее, формируется рисунок, отражающий распределение частиц по размерам. Детектор генерирует сигнал, пропорциональный интенсивности света, попадающего на детектор, и компьютерная программа определяет распределение частиц по размерам, которое наилучшим образом соответствует результирующей дифракционной картине. Результат анализа состоит из объемного (массового) или численного распределения частиц по размерам. Для исследования дисперсных систем используется параметр затемнения лазера, который характеризует потерю интенсивности света при введении образца в измерительную ячейку в результате отражения, поглощения, дифракции и т.д [39-42].

2.3.5. Метод динамического рассеяния света

Динамическое рассеяние света, также известное как фотонная корреляционная спектроскопия, представляет собой метод, используемый для измерения размера частиц и понимания диффузионного поведения макромолекул в растворе. Этот метод измеряет броуновское движение макромолекул в растворе и то, как интенсивность света колеблется во времени. Информация о размере макромолекул может быть получена путем мониторинга движения частиц с течением времени. Более крупные частицы диффундируют медленнее, находятся в одинаковых положениях в разные моменты времени, и колебания интенсивности меньше, в то время как мелкие частицы (такие как молекулы растворителя) движутся быстрее и не занимают определенного положения, и интенсивность колеблется быстрее [43].

Гидродинамический радиус и дзета-потенциал субмикронных частиц извлечения плоды дерезы обыкновенной определяли на оборудовании Malvern Zetasizer ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания) при условиях: длина волны

лазера 658 нм; величина угла рассеяния 173° ; температур измерения 25°C ; вязкость среды 0.8872 сР; средний показатель преломления 1,34. Растворы фильтровали через субмикронный инертный мембранный фильтр (Millex GV 0,22 мкм, Merck Millipore, Великобритания).

2.3.6. Рентгенофлуоресцентная спектрофотометрия

Количественный элементный анализ (КЭА) настоящих плодов дерезы обыкновенной и их водных и спиртовой извлечении были проведен с использованием рентгенофлуоресцентного спектрофотометра (РФС) Shimadzu EDX-7000 без минерализации (Shimadzu, Япония) на основе кремниевого дрейфового детектора с термоэлектрическим охлаждением с программным обеспечением PCEDX-Navi (Япония) при условиях: ток 100 мкА, закрытая ячейка для образцов, коллиматор 10 мм, воздушная среда, майларовая и полипропиленовая пленки. В качестве стандартного эталонного материала использовалась образец NIST SRM 2976, изготовленный в MEL IAEA (МАГАТЭ) и аттестованный Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, USA) [44].

Для проведения анализ использовали высушенный до постоянной массы образец плодов дерезы обыкновенной, а также извлечения [45].

2.3.7. Поляриметрия

Метод поляриметрии позволяет определить удельное вращение вещества и, путем сравнения с известными данными, определить подлинность или оптическую чистоту вещества. Оптическую активность инулина определяли с помощью автоматического поляриметра POL-1/2 с внешним модулем Пельтье для контроля температуры (Atago Co., LTD, Япония). Диапазон измерения угла вращения $\pm 90^\circ \pm 0.002^\circ$ при значениях угла $<1^\circ$ и $\pm 0.2\%$ – при значениях $>1^\circ$. Измерение оптического вращения инулина было проведено в дистиллированной воде при 20°C . Толщина кюветы – 1 дм.

2.3.8. Оптическая микроскопия

Для определения микроскопических признаков плодов, а также размера и формы частиц инулина, извлеченных из плодов, использовали метод оптической микроскопии. Для микроскопического анализа применяли бинокулярный микроскоп Levenhuk D870T. Для проведения анализа инулина, выделенного из плодов дерезы обыкновенной, использовался микроскоп (Альтами БИО 2, Россия) с 10-кратным увеличением. Длина и размер частиц были измерены с помощью программы Altami Studio 3.3.

2.3.9. Биологические методы исследования. Метод *Spirotox*

Экстракты плодов дерезы обыкновенной являются наиболее распространенным способом употребления плодов, и по этой причине проверка на острую токсичность была проведена, чтобы определить безопасность экстрактов для человеческого организма. Исследование проводилось с использованием тест-культуры *Spirostomum ambiguum*, которая характеризуется статистически достоверной чувствительностью к токсикантам и позволяет сравнить реакцию простейших и человека. Штамм характеризуется высокой подвижностью как в горизонтальном, и в вертикальном направлениях. Но в присутствии химических веществ клетка сокращается, останавливается или меняет траекторию движения.

Когда штамм *S. ambiguum* (C_{cell}) инкубируется в растворе ксенобиотика (${}_nL$), вначале образуется промежуточный комплекс ($C \cdot In$), а затем клетка переходит в мертвое состояние (DC). Клетки умирают с течением времени, которое зависит одновременно от концентрации и температуры и линеаризовано в "координатах

Аррениуса": $k = A \cdot e^{-E_a/RT}$.

k – константа скорости процесса; A – предэкспоненциальный множитель, связанный с вероятностью столкновения частиц (лиганд-рецепторного взаимодействия); R – газовая постоянная; T – абсолютная температура, К; E_a – энергия активации.

Логарифмическая форма уравнения Аррениуса: $\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$,

$\frac{E_a}{R}$ – постоянная величина для данной реакции [47-48].

2.4. Методики фитохимического исследования

2.4.1. Определение подлинности сырья

Макроскопический и микроскопический анализы проводились согласно методикам, приведённым в ГФ XIV том 1, ОФС.1.5.3.0003.15. ГФ РФ XIV изд. [46].

2.4.2. Определение доброкачественности сырья

В образцах растительного материала проводили определение: влажности [49], золы общей [50] и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте [51], степени измельчённой и содержание примесей [52, 53].

2.4.3. Качественный анализ

Качественное обнаружение полисахаридов

Обнаружение полисахаридов проводили при водной экстракции из дерезы обыкновенной (1:10) с помощью трех различных специфических тестов на полисахариды: теста Молиша, Фелинга и Бенедикта. В присутствии полисахаридов наблюдается изменение цвета плодового экстракта.

Качественное обнаружение флавоноидов

Предварительное качественное определение флавоноидов проводили реакцией с несколькими реагентами: хлорид железа (III) 1%, ацетат свинца 1%, хлорид алюминия 2%, раствор аммиака, 1% раствор ванилина. Основываясь на изменениях цвета, можем заключить, какой тип флавоноидов присутствует в плодовых экстрактах.

2.4.4. Количественный анализ биологически активных веществ

Количественное определение различных групп БАВ проводили по следующим известным методикам. Используемые в работе методы определения сахаров и флавоноидов были разработаны ранее (с учетом влияния таких параметров, как степень измельчения, время и кратность экстракции, соотношение сырья и экстрагента, оптимальный объем добавляемых реагентов и их соотношение и т.д.).

Сумма органических кислот и аскорбиновой кислоты

Содержание органических кислот определяли с применением двух методов:

1) Методом алкалиметрического титрования 0,1М раствором NaOH до появления не исчезающего розового окрашивания, в пересчете на яблочную кислоту согласно методам, изложенным в [54].

Аскорбиновую кислоту также определяли титриметрическим методом по методике ФС "Плоды шиповника" ГФ РФ [55]. Экстракт титровали раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, которая не исчезает в течение 30-60 с.

2) Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии-спектрометрии по методике R. Scherer et al [56]. Подвижная фаза состояла из 0,01 моль/л буферного раствора KH_2PO_4 (рН = 2,60, скорректированного с помощью о-фосфорной кислоты), с использованием процедуры изократического элюирования со скоростью потока 0,5 мл мин⁻¹. Обнаружение осуществлялось при 210 нм для винной, яблочной и лимонной кислот и 250 нм для аскорбиновой кислоты. Пики были идентифицированы по времени их удерживания, сравнивая УФ-видимые спектры и пиковые значения со стандартами. Количественная оценка была проведена с использованием внешней стандартной кривой с семью точками. Концентрации варьировались от пределов количественного определения и составляли 0,25, 0,5, 0,01 и 0,8 мг мл⁻¹ для винной, яблочной, аскорбиновой и лимонной кислот соответственно.

Дубильные вещества

Содержание дубильных веществ в пересчете на танин определяли титрованием раствором перманганата калия до золотисто-желтого окрашивания по методу ОФС.1.5.3.0008.15 [57].

Содержание экстрактивных веществ

Содержание экстрактивных веществ определяли в соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.006.15 ГФ РФ XIV [58] по методике 2 «Множественная

экстракция последовательную обработку сырья одним и тем же экстрагентом с последующим получением суммарного экстракта)», экстрагенты – очищенная вода, спирт этиловый (СЭ) 40%, 70%, 96% и петролейный эфир.

Определение флавоноидных соединений

Определение флавоноидных соединений проводили в соответствие с требованиями ОФС.1.2.1.1.0003.15 и ОФС.1.2.1.2.0005, а также исследовательские работы [59-63]. В основу спектрометрического определения флавоноидов, присутствующих в экстракте плодов, было положено комплексообразование с $AlCl_3$, с максимумом поглощения около 410 нм.

Дальнейшее изучение фенольных соединений РС дерезы обыкновенной было проведено методом ВЭЖХ [63-64]. Методика подготовки образца заключалась в измельчении плодов дерезы обыкновенной с последующей двойной экстракцией этиловым спиртом различных концентраций: 30, 50, 60, 70, 80, 96 % в течение 45 минут и 15 минут. В качестве стандартных образцов (СС) использовали этанольные растворы рутина (0,05, 0,005, 0,0005 %) и скополетина (0,01, 0,001, 0,0001 %).

Определение восстанавливающих сахаров

Определение сахаров в растительной матрице ВСС проводили в соответствие с ОФС.1.2.3.0019.15 спектрофотометрическим методом. Для этого проводили измерение оптической плотности окрашенного раствора, образующегося при взаимодействии субстрата с фенол-серноокислым реактивом (метод Дюбуа). Экстракты растительного сырья дерезы обыкновенной были приготовлены, как описано в [66,67].

β -2,1-Связанные фруктозаны

Определение полимеров β -D-фруктофурунозов в растительной матрице высушенных плодов дерезы обыкновенной проводили на основе резорцинолового анализа, описанного в [68-70]. В основе данного метода лежит гидролиз фруктозанов в кислой среде с последующим образованием комплекса с резорцинолом, имеющим максимум поглощения при 480-540 нм.

2.4.5. Приготовление водных и спиртовых извлечений

Плоды использовали для приготовления настоя в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары [71]. В качестве растворителя использовалась вода, а извлечение проводилось в течение разных промежутков времени.

Настойки были приготовлены методом мацерации в лабораторных условиях, описанным в ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» [72]. В качестве растворителя был использован СЭ с различными концентрациями (40,70,95%).

В дальнейшем было проведено исследование дисперсных характеристик приготовленных экстрактов с помощью методов динамического и статического светорассеяния.

2.4.6. Извлечение и очистка инулина из плодов дерезы обыкновенной

Производство инулина проходит три основные стадии, включая экстракцию подогретой водой, очистку экстракта инулина и последующую сушку очищенного раствора с целью получения порошка инулина. Извлечение инулина проводили тремя различными методами.

Методика: комплекс полифруктанов экстрагировали из сырья при температуре 70-90 °С водой. Экстракты фильтровали и выпаривали под вакуумом до 1/3 объема, а полисахариды осаждали 96% этанолом. В процессе очистки для удаления примесей использовали карбонат натрия, оксид алюминия и активированный уголь. После этого, полученные образцы инулина идентифицировали различными методами, такими как ИК- и УФ-спектрометрия, поляриметрия и другие.

2.4.7. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку и графическое представление результатов проводили с использованием программного обеспечения Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, США). Статистическая обработка заключалась в вычислении среднего значения \pm SD.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка качества плодов дерезы обыкновенной

Определение подлинности сырья

Плоды дерезы обыкновенной являются перспективным и богатым источником важных биологически активных веществ, стандарты на которые находятся в некоторых мировых фармакопеях. Заслуживает внимания изучение растений *Lycium*, произрастающих в разных регионах, для унификации методов проверки контроля качества растительного сырья. Результаты, полученные в данном исследовании, являются основой для унификации структуры фармакопейной монографии на ЛРС и лекарственные растительные препараты на основе плодов дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum* L.)

Идентификация сырья по морфологическим признакам

Макроскопический анализ позволяет установить подлинность сырья по присутствию диагностических признаков в соответствии с требованиями редакции ГФ РФ XIV [46].

Проведена оценка плодов дерезы обыкновенной по внешним признакам (рисунок 4) в соответствии с методикой, описанной в ОФС.1.5.1.0007.15 Плоды [73].

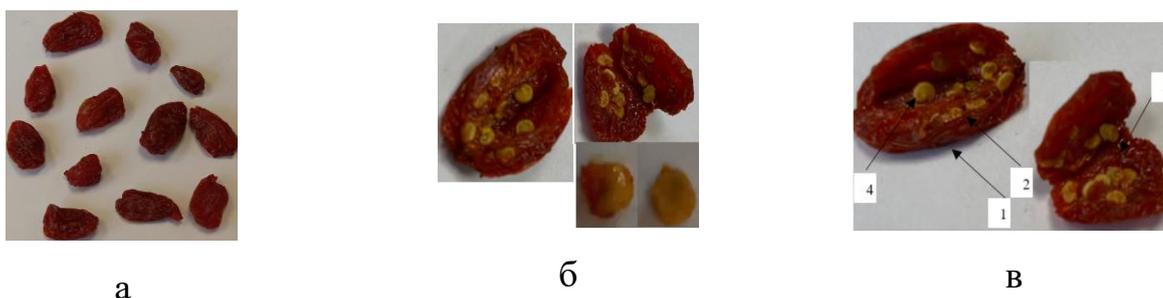


Рисунок 4. Плоды дерезы обыкновенной (*L. barbarum* L): а – общий вид; б – продольный разрез (вид семян); в – внутреннее строение: 1 – экзокарпий; 2 – эндокарпий; 3 – мезокарпий; 4 – семя.

Плоды эллиптические, веретенообразные или яйцевидные; длиной 6-18 мм, d = 3-8 мм, околоплодник оранжево-красные или темно-красные. Обладают легким

характерным запахом и вкус сладкий, слегка горьковатый. Околоплодник гибкий и сморщенный, эндокарпий мясистый, мягкий и густой. Семена 10-15, подпочковидные, плоские и загнутые кверху, 2,0-2,5 мм длиной, 0,8-1,0 мм шириной, бледно-желтые или коричневато-желтые на поверхности (таблица 4).

Таблица 4. Морфометрические показатели растительного сырья дерезы обыкновенной.

Образцы плодов				
Показатель	1	2	3	$\bar{x} \pm SD$
Ширина, мм	14,00	12,100	15,00	$13,7 \pm 1,5$
Длина, мм	4,50	6,00	6,50	$5,7 \pm 1,0$
Сухие ягоды ($m_{т.н.}$, г)	0,2849	0,2547	0,2936	$0,27 \pm 0,02$
Семена				
Ширина, мм	1,00	0,80	1,00	$0,9 \pm 0,1$
Длина, мм	2,002	2,000	2,500	$2,2 \pm 0,3$
1 Семя ($m_{т.н.}$, мг)	0,0009	0,0010	0,0013	$1,07 \cdot 10^{-3} \pm 2,0 \cdot 10^{-4}$
10 Семян ($m_{т.н.}$, мг)	0,0179	0,0183	0,01811	$1,81 \cdot 10^{-2} \pm 2,0 \cdot 10^{-4}$

Идентификация сырья по микродиагностическим признакам

Растительное сырье было идентифицировано по наиболее важным внешним ключевым признакам: форме жизни, типу плода и идентификации под микроскопом (таблица 4) в соответствии с Американской фармакопеей лекарственных растений (рис.5).

При анализе микропрепаратов с поверхности плоды было установлено, что эпидерма экзокарпия плода (рис.5а) состоит из крупных многоугольных прямостенных клеток с равномерно утолщенными стенками (многогранная форма).

Антиклинальные стенки клеток эпидермы (кожицы) экзокарпия имеют равномерные утолщения. На поперечном срезе они имеют прямоугольную форму

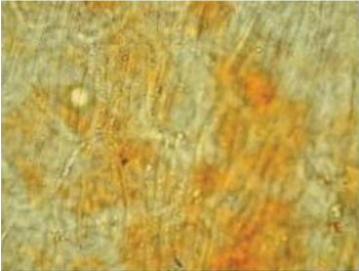
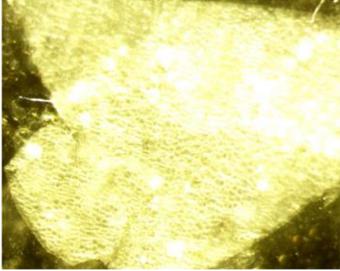
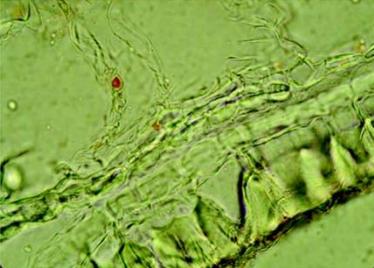
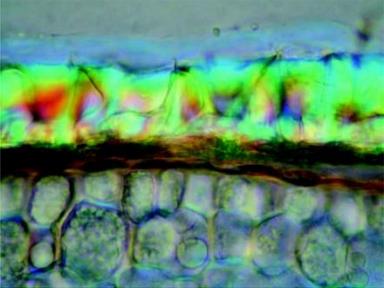
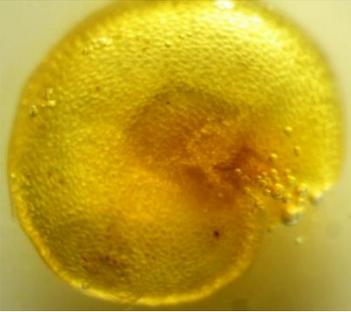
и покрыты равномерным слоем кутина. Под однослойным экзокарпием располагается многослойный мезокарпий (рис. 5б).

Клетки мякоти плода (мезокарпия) состоит из тонкостенных клеток округлой и овальной формы с крупными вакуолями, а также многочисленными хромопластами с оранжево-жёлтым содержимым. Паренхимная сочная ткань мезокарпия пронизана сетью жилок коллатеральные сосудисто-волокнистых пучков (СВП), обложенных призматическими кристаллами оксалата кальция. Также в мякоти плода встречаются небольшие скопления брахисклереид (редкие островки, состоящие из 3-5 лигнифицированных клеток).

Плёнчатый эндокарпий представлен одним слоем тонкостенных извилистых клеток. Семенная кожура (рис.5в) состоит из одного слоя толстостенных с сильно извилистыми лигнифицированными стенками клеток. Под этой тканью встречаются небольшие скопления брахисклереид.

Клетки семени, богаты крахмальными зёрнами и алейроновыми зёрнами. Сопоставление диагностических признаков исследуемых объектов с монографией Американской фармакопеи трав (АНР) [38] представлено на рисунке 5.

Таким образом, применяя нормативные подходы макро- и микроскопического анализа, были установлены диагностические признаки исследуемого растительного сырья – плодов дерезы обыкновенной (*L.barbarum L.*).

	1	2	
А			
Б			
В			
<p>Рисунок 5. Идентификация плодов <i>Lucium barbarum L.</i> при световой микроскопии из 1) Американской фармакопеи лекарственных растений и 2) образца <i>Lucium barbarum L.</i> при микроскопии. А) Экзокарпий; Б) Мезокарпий; В) Эпидермис семенника.</p>			

3.1.2. Числовые показатели

Количественное определение фармакогностических показателей важно для установления стандартов на ЛРС. Для оценки качества требуется определение физико-химических свойств растительного сырья, таких как влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10%-ном растворе соляной кислоты. Кроме того, проводится анализ экстрактивных веществ для подтверждения присутствия растительных активных веществ и их растворимость [74].

Влажность

Влажность является одним из основных факторов, ответственных за нарушение качества лекарств и рецептуры, а также за их стабильность во времени. Избыток воды в ЛРС стимулирует рост микробов, присутствие грибков или насекомых и вызывает деградацию. Таким образом, определение влажности является важным аналитическим измерением при тестировании лекарственного сырья. Определение влажности должно выполняться простым, быстрым и достоверным методом [75].

Влажность в растительном сырье дерезы обыкновенной определяли гравиметрическим методом в соответствии с ГФ РФ XIV. Образцы были гомогенизированы мельницей для получения точных аналитических результатов определения влажности и ускорения процесса высушивания. Плоды высушивали в шкафу при температуре 100°C, поскольку образцы были термически стабильными и не содержали значительного количества летучих веществ [75].

Процесс высушивания был длительным и утомительным и продолжался 16 часов, до постоянной массы. По этой причине рекомендуется высушивать плоды дерезы обыкновенной в вакуумной духовке, чтобы ускорить процесс высушивания.

Влажность (%) РС определяли по формуле (1):

$$W = \frac{(m - m_1) * 100}{m} \quad (1)$$

где: m – масса до высушивания, г; m_1 – масса после высушивания, г.

Влажность в РС дерезы обыкновенной составил $7,4\% \pm 0,5$ [76]. Таким образом предельное содержание влажности в плодах дерезы обыкновенной должно составлять не более 10%.

Зола общая

Зола — это неорганический остаток после сжигания органического вещества и испарения воды. Большинство компонентов золы - минеральные элементы, такие как фосфаты, карбонаты и силикаты натрия, калия, магния, кальция и т.д. Зола общая коррелирует с органической матрицей [77-80]. Состав и содержание зольных элементов в РС зависит от вида растений, от возраста, состояния растений, почвенно-климатических условий их произрастания [81].

Наиболее стандартным методом, используемым для определения содержания золы в образце, является сухое озоление. Образец полностью окисляется при высокой температуре (обычно $500^{\circ}\text{C} - 600^{\circ}\text{C}$) за счет улетучивания органических материалов в муфельной печи. Нагревание продолжается пока образовавшаяся зола не станет однородной по цвету, белой или серой, и свободной от частиц несгоревшего углерода и расплавленных комков.

Определение показателя «зола» определяется при оценке подлинности и чистоты исследуемого образца. Чистота лекарственного средства, то есть наличие или отсутствие инородных неорганических веществ, может быть обозначена различными значениями золы.

Общее содержание золы определяли с применением метода, описано в ГФ РФ XIV. Плоды дерезы обыкновенной измельчали, взвешивали и оставляли в муфельной печи при температуре 600°C до получения серой золы. Процесс высушивания в общей продолжался 12 часов. Содержание общей золы (X) в процентах в ЛС вычисляют по формуле (2):

$$W = \frac{m_1 * 100}{m_2} \quad (2)$$

где: m_1 – масса золы, г; m_2 – масса ЛС или ЛРС, г.

Было установлено, что зола общая составляет 2,7 – 2,9%. Значение золы общее, подтвержденное Европейской фармакопеей, должно быть не выше 14%, что близко к значению золы фармацевтических препаратов. Процентное содержание золы в этом исследовании (<10%) показало, что плоды имели довольно хорошее качество. Рекомендуется, чтобы предельное содержание золы общей в плодах дерезы обыкновенной составляло не более 5%.

Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl

Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте - показатель, также характеризующий качество и чистоту РС. Этот тип золы представляет собой остаток, образующийся после кипячения золы общей с разбавленной хлороводородной кислотой с дальнейшим прокаливанием до тех пор, пока образец не сгорит и не достигнет постоянной массы. Оставшаяся зола представляет собой нерастворимый в кислоте остаток, включая кремнеземные материалы, такие как песок и кремнистая земля - инородные неорганические вещества, присутствующие в качестве примеси [78-79].

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте определяли с применением метода ГФ РФ XIV (см. главу Материалы и методы). Содержание рассчитывали по формуле (3):

$$W = \frac{(m_1 - m) * 100}{m_2} \quad (3)$$

где: m_1 – масса золы, г; m – масса золы фильтра, г (если золы последнего более 0,002 г); m_2 – масса сырья/препарата, г.

Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте из плодов дерезы обыкновенной составляла $2,3 \pm 0,2\%$. Низкие значения золы, нерастворимой в 10% хлороводородной кислоте, в частности, указывают на низкий уровень кремнезема и посторонних примесных веществ, что является важным фактором качества растительного сырья [82].

Экстрактивные вещества

По данным литературы, дереза обыкновенная обычно используется в фитотерапии в виде настоев или отваров. Для всех видов растительного сырья, используемого для приготовления жидких форм (настоев, отваров, экстрактов и т.д.), российская фармакопея требует определение биологически активных веществ, присутствующих в растении. Экстрактивные вещества — группа веществ, извлекаемая из РС при его обработке растворителями (вода, этиловый спирт, петролейный эфир и др). Выбор систем растворителей важен для приготовления растительных жидких форм [83]. Содержание ЭВ значимо для определения фальсифицированных ЛС. Также определяется качество и чистота лекарственного вещества. Кроме того, величины ЭВ указывают на присутствие полярных, среднеполярных и неполярных компонентов в растительном материале.

Для определения ЭВ были подобраны три различных растворителя с разной полярностью – вода, эфир и спирт 40%, 70% и 96%. Для извлечения применяли метод 2, описанный в ОФС (см. главу 2.4.4.), который включает последовательную обработку сырья одним и тем же экстрагентом с последующим получением суммарного экстракта. Плоды предварительно измельчали, чтобы повысить эффективность извлечения. Каждый процесс извлечения проводили в течение 4 часов с помощью обратного холодильника. После извлечения экстракты высушивали до постоянной массы и определяли % выхода гравиметрически, по следующей формуле (4):

$$W = \frac{m * 100 * 100 * (V * n)}{a * (100 - W) * 25} \quad (4)$$

где: m — масса сухого остатка, г; a — навеска ЛРС, г; W — влажность ЛРС, %, n — число экстракций; V — объем экстрагента, используемый при однократной обработке ЛРС, мл.

Выход экстрактивных веществ в плодах представлен в таблице 3.

Таблица 3. ЭВ в плодах дерезы обыкновенной

Растворитель	Содержание ЭВ, % \pm SD
Вода очищенная	41,8 \pm 0.4
Спирт 40%	59,4 \pm 0.4
Спирт 70%	35,7 \pm 0.9
Спирт 96%	40,9 \pm 0.2
Петролейный эфир	0,6 \pm 0.04

Максимальный выход наблюдался при использовании 40%-ного этилового спирта и воды. Значения ЭВ (%) были наиболее высокие при использовании СЭ 40% (59.4 \pm 0.4 %) и воды (41.8 \pm 0.4 %). Эти результаты свидетельствуют о том, что БАВ в плодах дерезы обыкновенной имеют, в основном, высокую полярность, таких как вода (индекс полярности ИП = 9,0) и СЭ (ИП = 5,2). Это означает, что 40%-ный СЭ является оптимальным растворителем для экстракции плодов [84].

Согласно литературным данным, плоды дерезы богаты полисахаридами, полифенолами и флавоноидами, растворимыми в спирте этиловом. Это позволяет растворять полярные соединения в процессе извлечения, что приводит к увеличению выхода извлечения. Высокая концентрация воды в этаноле, возможно, повлияла на полярность этилового спирта. Таким образом, чем больше в нем воды, тем выше его полярность по сравнению с абсолютным этиловым спиртом. Это может объяснить, зачем экстрактивная значение 40%-ного этилового спирта немного выше, чем у воды и этилового спирта в более высоких концентрациях [85].

Петролейный эфир (ИП = 0,1) выбрали в качестве неполярного органического растворителя для определения выхода гидрофобных соединений, присутствующих в растительном сырье, поскольку, по данным литературы, каротиноиды, которые в основном гидрофобны, присутствуют в высокой концентрации в плодах дерезы обыкновенной. Выход гидрофобных веществ оказался низким, около 0,6%. В

дальнейшем исследовании основное внимание уделялось количественному определению гидрофильных веществ, таких как полисахариды и флавоноиды.

3.1.3. Испытания на определение маркерных групп БАВ

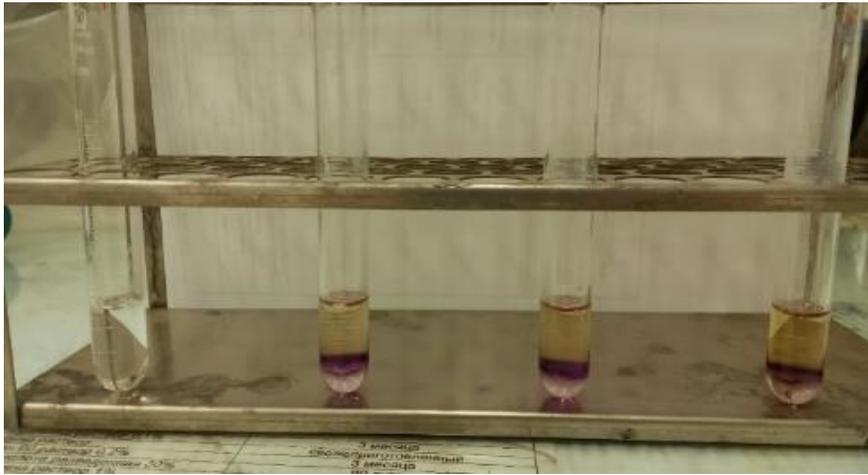
Качественный анализ

Для обнаружения полисахаридов и флавоноидов, присутствующих в экстрактах дерезы обыкновенной, использовались хромогенные реакции.

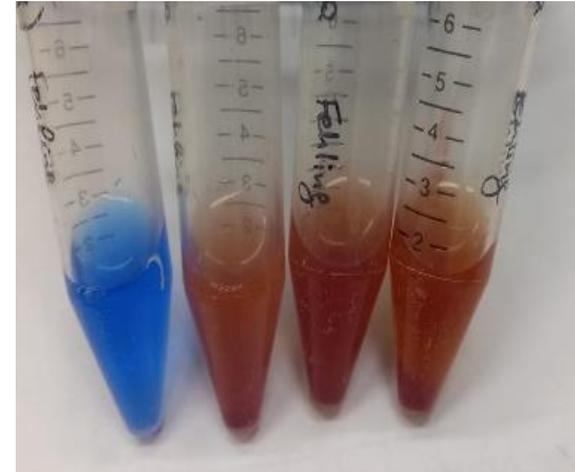
Определение полисахаридов проводилось тремя тестами: Молиша, Фелинга и Бенедикта. Все тесты оказались положительными, что свидетельствует о наличии полисахаридов в плодах (рис. 6 а, б, в).

Флавоноиды определяли с помощью различных реактивов, таких как: FeCl_3 , NaOH , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, AlCl_3 , NH_4OH , ванилин. Результаты были положительными, что свидетельствует о наличии флавоноидов в плодах дерезы обыкновенной (рис. 6 д).

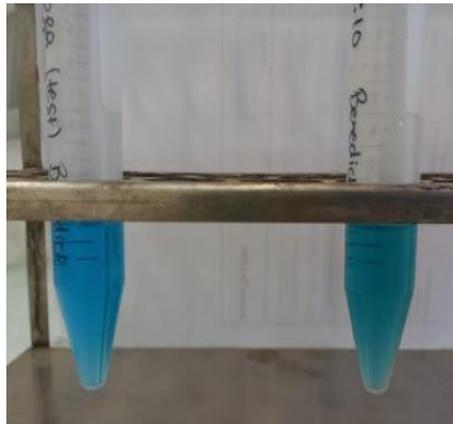
Химические реакции каждого реактива с полисахаридами или флавоноидами представлены в таблицах 5 и 6.



а



б



в



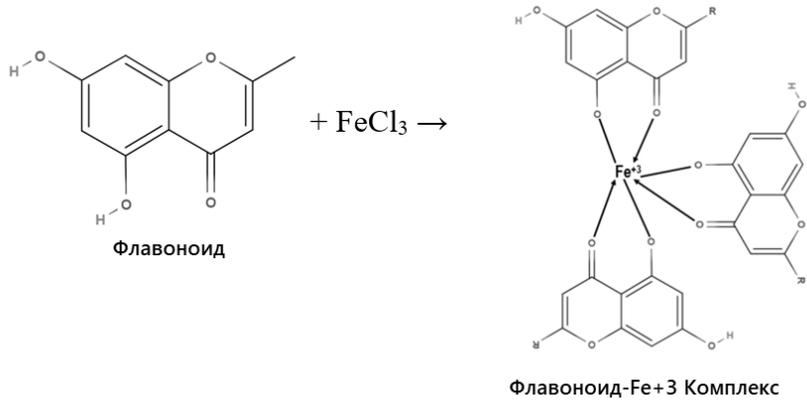
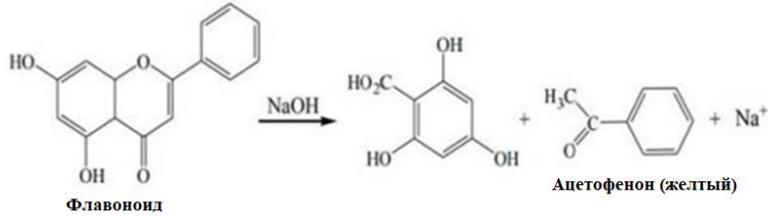
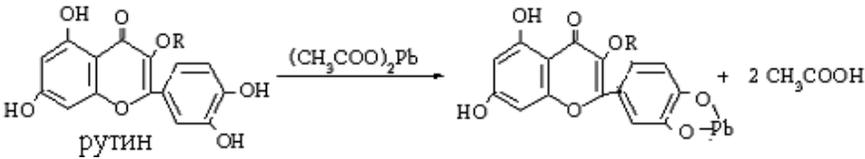
д

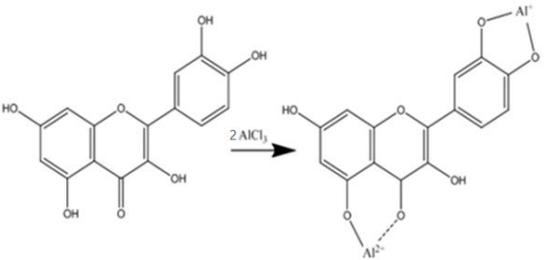
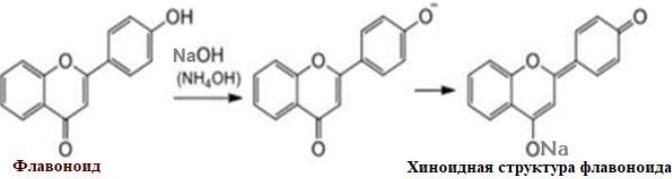
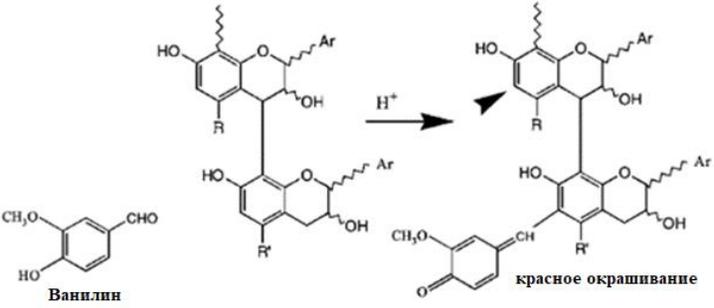
Рисунок 6. Качественные реакции для полисахаридов; а - Тест Молиша, б - Тест Фелинга, в - Тест Бенедикта и флавоноидов (д).

Таблица 5. Результаты качественных реакций на основные группы БАВ (Полисахариды) в извлечениях из сырья плодов дерезы обыкновенной.

Группа БАВ	Реактив	Химическая реакция	Результат	Вывод
Полисахариды	Тест Молиша	<p>глюкоза</p> <p>5-(гидроксиметил)фурфурол</p> <p>5-(гидроксиметил)фурфурол</p> <p>α-нафтол</p> <p>краситель фиолетового цвета</p>	Продукт фиолетового цвета [86].	содержит углеводы
	Тест Фелинга	<p>глюкоза</p> <p>реактив Фелинга</p> <p>глюконовая кислота</p> <p>тарترات калия-натрия</p> <p>оксид меди(II)</p>	Появление красновато-коричневого осадка [87].	присутствуют восстанавливающие сахара
	Тест Бенедикта	<p>α-D-гликопираноза</p> <p>D-глюкоза</p> <p>Реактив Бенедикта (синий раствор)</p> <p>D-глюконовая кислота</p> <p>Кирпично-красный осадок</p>	Цвет при кипячении меняется на зеленый [88].	присутствуют от 0,1 до 0,5 процента сахара

Таблица 6. Результаты качественных реакций на основные группы БАВ (флавоноиды) в извлечениях из сырья плодов дерезы обыкновенной.

Группа БАВ	Реактив	Химическая реакция	Результат	Вывод
Флавоноиды	Хлорид железа(III) 1%	 <p>Флавоноид + FeCl₃ → Флавоноид-Fe+3 Комплекс</p>	Коричневая окраска [89].	присутствуют флавоноиды (3-ОН-группа)
	Гидроксид натрия 10%	 <p>Флавоноид $\xrightarrow{\text{NaOH}}$ Ацетофенон (желтый) + Na⁺</p>	Желтое окрашивание [90].	присутствуют флавоны, флавонолы, флаваноны
	Ацетат свинца 1%	 <p>рутин + (CH₃COO)₂Pb → Флавоноид-Рb + 2 CH₃COOH</p>	Образуют желтые хлопья в растворе, выпадающие в осадок [91].	присутствуют Флавоны, халконы и ауроны

<p>Хлорид алюминия 2%</p>		<p>Желтое окрашивание с яркой зеленой флуоресценцией в УФ-светом [92].</p>	<p>присутствуют флавоноиды</p>
<p>Раствор аммиака</p>		<p>Желтое окрашивание, переходящее при нагревании в оранжевое [89].</p>	<p>-</p>
<p>1 % раствор ванилина</p>		<p>Красное окрашивание [93].</p>	<p>присутствуют флавоны, флаваноны, флаванолы и флаванолы</p>

Определение восстанавливающих сахаров спектрофотометрическим методом

Биологической активностью плодов дерезы обыкновенной, в основном обладают полисахариды *Lucium barbarum L.* (LBP), которые продемонстрировали иммунорегуляторные и нейропротекторные свойства, антиоксидантное, омолаживающее, противодиабетическое, противоопухолевое действие [94]. Также нескольких исследований показали высокую концентрацию углеводов в плодах дерезы обыкновенной [95 - 97].

Количественное определение углеводов в плодах дерезы обыкновенной проводили с применением простого, быстрого, чувствительного и воспроизводимого спектрофотометрического метода фенол-серной кислоты, разработанного Дюбуа (см. главу 2.4.4.5). Метод основан на реакции фенолов с продуктами окисления моносахаридов. При реакции с концентрированной серной кислотой сахараиды обезвоживаются и образуют производные фурфурола [98], которые вступают в реакцию с фенолом и образуют окрашенные комплексы, поглощающие свет в видимом диапазоне при $\lambda_{\max} = 490$ нм. После добавления фенола и серной кислоты цвет растворов стал ярко-желтым и устойчивым и характеризовался определенным максимумом поглощения (рис.7) [199-102].

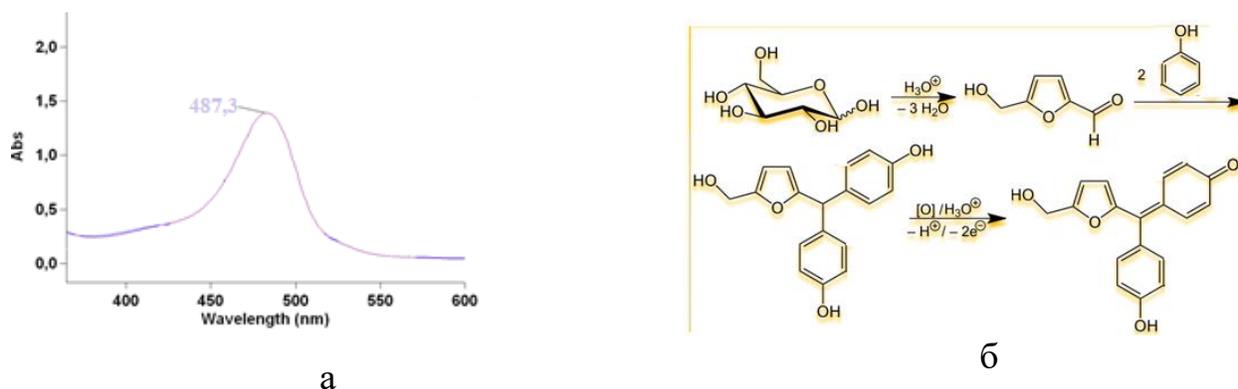


Рисунок 7. Определение сахаридов по методу Дюбуа: (а) – спектр поглощения исследуемого раствора; (б) – схема хромогенной реакции.

Извлечения из растительного сырья дерезы обыкновенной изготавливали так, как описано в главе 2.4.4. Методика: экстракт извлекали из 0,500 г сырья ($d = 7$ мм) в смеси $H_2O : H_2SO_4$ конц. (5,7:1) с помощью водяной бани с обратным холодильником (30 мин), фильтровали в колбу $V = 100$ мл и добавляли очищенную воду. Также было проведено холостое определение. Смесь 5%-ного раствора фенола и H_2SO_4 конц. (1:5) добавляли в пробирки, содержащие растворы стандартного образца (стандарт глюкозы $4 \cdot 10^{-3}\%$ в воде), холостого раствора и экстракта (тестируемый раствор) в объемах $V=1$ мл с последующим разбавлением концентрированной H_2SO_4 до 10 мл. Измерения оптической плотности проводили через 30 минут при длине волны 490 нм с использованием спектрофотометра Cary UV-Visible Model 100 (США) [30]; [103-104].



Содержание восстанавливающих сахаров (X , %) рассчитывали по формуле (5) (см. главу 2.4.4.):

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot V}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)} \cdot 100\% \quad (5)$$

где A - поглощение восстанавливающих сахаров; A_0 - поглощение стандарта глюкозы; a - масса образца сырья, г; a_0 - масса образца стандарта, г; V - объем разведения для восстанавливающих сахаров; W - содержание влаги в сырье, %; P - чистота стандарта в %

Для установления завершенности извлечения восстанавливающих сахаров из плодов дерезы обыкновенной было изучено влияние соотношения сырья и экстрагента, кратности экстракции и оптимального времени экстракции. Результаты по определению содержания суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье представлены в таблице 7.

Таблица 7. Условия экстракции для извлечения восстанавливающих сахаров из плодов дерезы обыкновенной.

Неизменяемый параметр	Варьируемый параметр	Содержание суммы восстанавливающих сахаров , % $X \pm SD$
Степень измельчения, мм		
Соотношение сырье : экстрагент 1:200	7	34,8 ± 0.3
	5	32 ± 0.4
	4	28,8 ± 0.9
	3	21,7 ± 0.8
Соотношение массы сырья к объему экстрагента		
Степень измельчения 7 мм	1:25	25,5 ± 0.6
	1:50	24,9 ± 0.3
	1:125	27,4 ± 0.2
Время экстракции (мин)		
Соотношение сырье: экстрагент 1:200, степень измельчения 7 мм	15	29,1 ± 0.5
	30	33,5 ± 0.2
	90	33,3 ± 0.4
	120	31,8 ± 0.3
Кратность экстракции		
Соотношение сырье: экстрагент 1:200, степень измельчения 1 мм	1	30,3 ± 0.3
	2	56,7 ± 0.5
	3	70,4 ± 0.5

Оптимальными условиями для извлечения восстанавливающих сахаров из плодов дерезы обыкновенной являются следующие: степень измельчения образца составляет $d=7$ мм, оптимальное соотношение РС: растворитель составляет 1:125 и оптимальное время экстракции составляет 90 мин. Увеличение кратности экстракции способствует увеличению выхода восстанавливающих моносахаридов из полисахаридного комплекса плодов. Для максимального извлечения восстанавливающих сахаров потребовалось три экстракции. На рисунке 7а показаны спектры поглощения стандартного раствора (глюкозы) и испытуемых образцов (экстрактов) при $\lambda_{\max} = 487 \pm 3$ нм.

Содержание суммы восстанавливающих полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X, %) колебалось от $21,7 \pm 0,8\%$ до $70,4 \pm 0,5\%$. Максимальный выход углеводов составил $70,4 \pm 0,5\%$ при оптимальных условиях экстракции.

Определение суммы фруктозанов и фруктозы

Растущий интерес к полисахаридам плодов дерезы обыкновенной вел нас к количественному исследованию фруктозанов, присутствующих в растении. Фруктозаны представляют собой полимеры фруктозы с β -связанными фруктозными единицами, которые обычно признаны пищевыми волокнами, макромолекулами, которые сопротивляются пищеварению эндогенными ферментами человека, поскольку большинство проходит через желудок и тонкую кишку в основном нетронутыми. Существует три основных фруктозана: инулин, леваны (или флейны) и грамминаны [105]. Инулин обычно касается всех β (2 \rightarrow 1) линейных фруктозанов, классифицируемых как "неперевариваемые" растительные углеводы, которые являются пищевыми волокнами, улучшающими перистальтику кишечника [106].

Классические методы количественного определения, такие как спектрофотометрический метод, определяют итоговую концентрацию фруктанов на основании эквивалентов фруктозы, выделяющейся после слабокислотного гидролиза или ферментативного расщепления. Реакция состоит в тройном дегидрировании моносахарида до 5-гидроксиметилфурфурола (ГМФ)

(кетогексозы) или до фурфуrolа (кетопентозы). Наконец, производное фурана вступает в реакцию с резорцином, образуя темно-вишнево-красный продукт [107]. Этот метод впервые был описан Селивановым (1887) для определения фруктозы или сахарозы (тест Селиванова), а также называется анализ с резорцинолом (рис. 8).

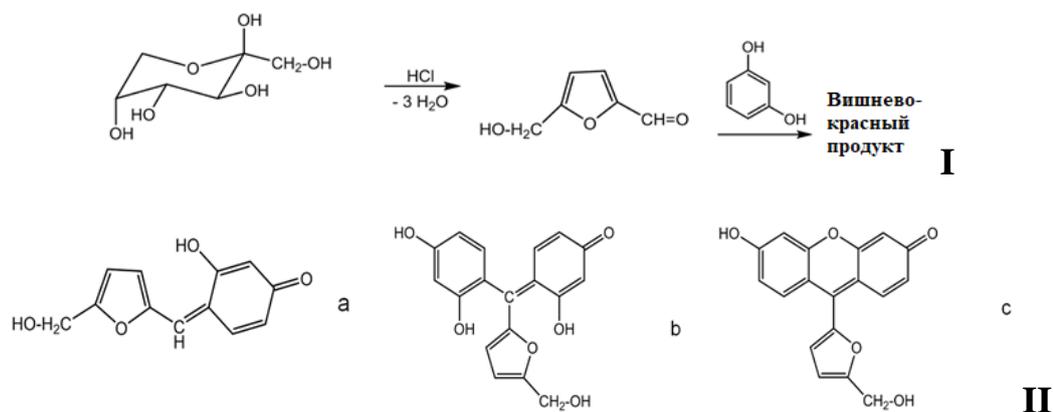


Рисунок 8. I: Тест Селиванова. II a, b, c: Структуры, которые были назначены красному продукту [111].

Реакция обычно проводится в слабокислых условиях, и у полученный комплекс демонстрирует самое высокое поглощение при 480-540 нм. Под действием соляной кислоты одна молекула инулина расщепляется на 34-35 молекул фруктозы и одну молекулу глюкозы. Кетозы (фруктоза) обезвоживаются быстрее, чем альдозы (глюкоза), с образованием производного фурана. В этих условиях только фруктоза взаимодействует с резорцином. Следовательно, существует прямая зависимость между концентрацией инулина и фруктозы, образующейся в результате гидролиза [108-109].

Анализ на резорцин применяли для количественного определения фруктозанов в пересчете на фруктозу в плодах дерезы обыкновенной. Извлечения получали из образца из 2 г измельченного сырья ($d=1$ мм) на водяной бане в две стадии, сначала экстрагировали 60 мл воды (60 мин), а затем 30 мл воды (30 мин). Полученные извлечения объединяли в колбе $V=100$ мл с последующим добавлением 2,0 мл 10% (w/v) водного раствора ацетата свинца и 4,0 мл 5% (w/v) водного раствора фосфата натрия. Раствор фильтровали, отбрасывали первые 10 мл и разбавляли водой в 20 раз (раствор А). Также были приготовлены стандартный раствор фруктозы – $5,6 \cdot 10^{-4}\%$ и эталонный образец - очищенная вода.

Измерения оптической плотности продуктов, образовавшихся после расщепления инулина резорцином в кислой среде, проводили при $\lambda_{\max} = 483$ нм: к 5 мл раствора А добавляли 5,0 мл 0,1% спиртового раствора резорцина и 10,0 мл 30% соляной кислоты с последующим нагреванием при 80° С (20 мин). Также было проведено холостое определение. Содержание фруктозанов (X, %) рассчитывали по формуле (6).

$$X = \frac{A * a_0 * P}{A_0 * a * (100 - W)} * 100 \quad (6)$$

где: А – оптическая плотность испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность стандартного раствора; а – навеска сырья, г; а₀ – навеска стандартного образца рутин, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Максимальное поглощение водной экстракции из комплексообразования плодов было при длине волны 485 нм, что совпадает с максимальным поглощением продукта стандарта фруктозы с резорцином. Таким образом, можно сделать вывод, что длина волны 485 нм может быть использована для спектрофотометрического определения фруктозанов в плодах дерезы обыкновенной в пересчете на фруктозу (рис.9).

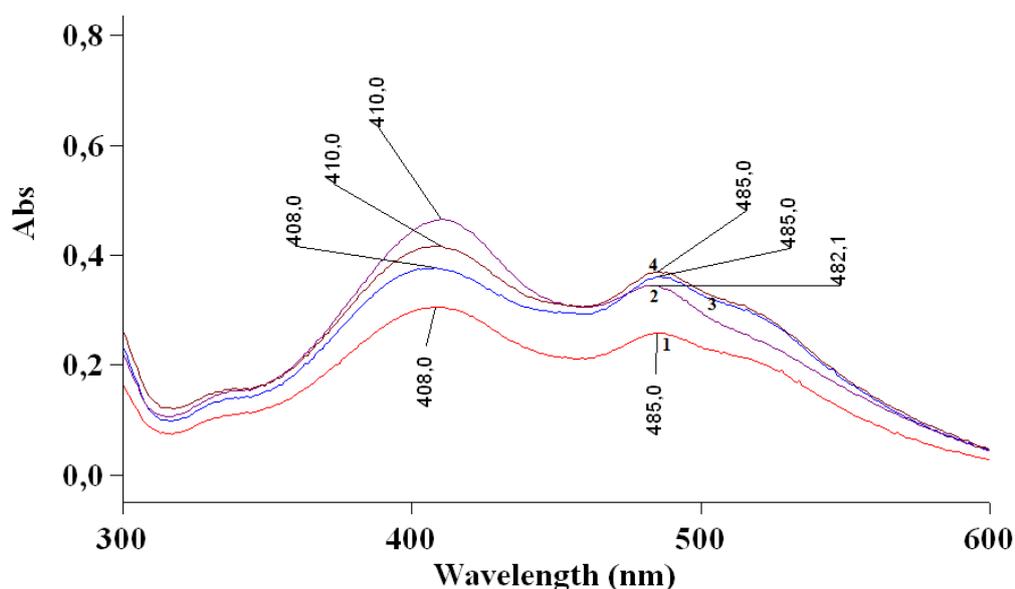


Рисунок 9. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов фруктозы и экстрактов из плодов дерезы обыкновенной, полученных с резорцином. 1- Стандартный раствор; 2,3,4-экстрактивные растворы (n=3, p<0,05).

Содержание фруктозанов в пересчете на фруктозу в плодах дерезы обыкновенной, интродуцированных в Албании, находится в диапазоне $20,6 \pm 0,7$ %, что сопоставимо с количеством инулина, экстрагированного из сушеных корней цикория (15-20% или 35,7-47,6 г/100 г растительного сырья) [110]. Цикорий использовался на промышленных уровнях для извлечения фруктозана типа инулина. Таким образом, плоды дерезы обыкновенной можно считать концентрированным источником инулина и могут быть перспективным источником фруктозанов и новых лекарственных препаратов [111].

Разработка методики количественного определения количества флавоноидов в плодах дерезы обыкновенной спектрофотометрическим методом

Для спектрофотометрического определения флавоноидов были проведены предварительно хромогенные реакции, основанные на образовании комплексов с солью алюминия (III). Основа колориметрического метода заключается в том, что алюминия хлорид образует кислотоустойчивые комплексы с несколькими гидроксильными группами флавонов и флавонолов, что приведет к образованию нового желтого хромофора. При этом наблюдается bathochromный сдвиг полосы поглощения флавоноидов от 330-350 нм к 390-410 нм видимого диапазона (рис. 10). Данный метод, является селективным только для флавонолов и флавонов лютеолина [112-114].

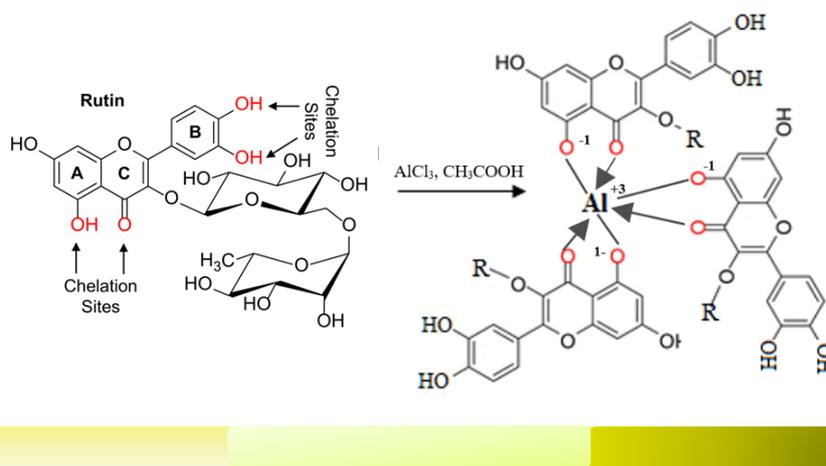


Рисунок 10. Схема хромогенной реакции образования комплекса ФЛВ-Al.

Испытуемые растворы готовили так, как описано в главе 2.4.4. и включали этапы двух последовательных извлечений: из 2 г измельченных ($d=4$ мм) плодов дерезы обыкновенной с 40 мл этилового спирта 80% в течение 60 минут с дальнейшим прибавлением к растительной массе дополнительной порции 40 мл этилового спирта с выдерживанием в течение 30 минут. Содержимое отфильтровывали в мерную колбу объемом 100 мл (раствор А). Для проведения реакции комплексообразования к 15 мл раствора А добавляли 5,0 мл раствора хлорида алюминия 2%, 1,0 мл раствора уксусной кислоты 33% и разводили этиловым спиртом 70% в колбе объемом 25 мл. Вследствие того, что этот метод селективен по флавонолам, в качестве стандартного раствора использовали рутин [114]. Стандартный раствор и раствор сравнения готовили, согласно [61]. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X , %) вычисляли по формуле (7):

$$X, \% = \frac{A \cdot a_0 \cdot 4 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 15 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (7)$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность стандартного раствора; a_0 – навеска стандартного образца рутина, г; a – навеска сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

Экстракты с $AlCl_3$ привели к появлению новой полосы высокого поглощения, которая максимальна при 405-410 нм (рис. 11) [114].

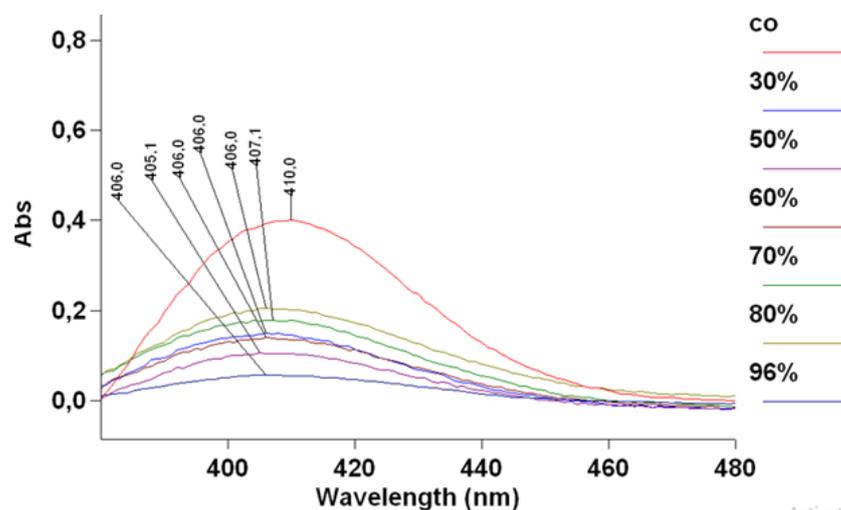


Рисунок 11. Спектры поглощения комплекса рутина с алюминием в спиртовой средах (СО), и флавоноидов из растительного экстракта С (%) этилового спирта 30, 50, 60, 70, 80, 96.

Таким образом разработанная нами методика количественного определения суммы флавоноидов показала, что наиболее полное извлечение флавоноидов из плодов дерезы обыкновенной достигается экстракцией 80%-ым этиловым спиртом в течение 60 минут при степени измельчения сырья с $d=4$ мм и соотношении растение:экстрагент 1:20. Оптимальные условия реакции комплексообразования: $C=2\%$, $V=5$ мл раствора хлорида алюминия, $t=45$ минут. Содержание флавоноидов в сырье плодов дерезы обыкновенной колеблется от 0.06% до 0.11%. В плодах дерезы обыкновенной в оптимальных условиях экстракции содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) составляет 110 мкг/100 г.

Этанольные экстракты, использованные для спектрофотометрического анализа, фильтровали с помощью политетрафторэтиленовых мембранных фильтров 0,45 мкм, а затем дополнительно анализировали методом RP ВЭЖХ. Хроматографическая колонка: Нуклеозил фирмы Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия (100-3 С18, длина – 100 мм, внутренний диаметр - 4,6 мм, размер частиц - 2,7 мкм); температура хроматографической колонки: +35,00 °С. ВЭЖХ-анализ проводили при следующих условиях: подвижная фаза (а) - водный раствор муравьиной кислоты (1%); (б) - этиловый спирт 96% со следующим градиентным

элюированием: 90% А и 10% В первоначально, уменьшено до 80% А через 10 мин, уменьшено до 70% А через 20 мин, снижается до 50% А через 30 мин, снижается до 10% А через 40 мин, затем поддерживается до 60 мин. Скорость потока 1 мл/мин и объем образца 1 мкл. В качестве стандартных образцов использовали этанольные растворы рутина (0,05, 0,005, 0,0005 %) и скополетина (0,01, 0,001, 0,0001 %).

Соединения флавоноидов и кумарина были идентифицированы и количественно определены в плодах дерезы обыкновенной. Идентификация методом ВЭЖХ-DAD основана на сравнении спектра поглощения УФ-излучения и времени (RT) с соответствующими стандартными соединениями: рутином из группы флавоноидов и скополетином из группы кумаринов (рис.12).

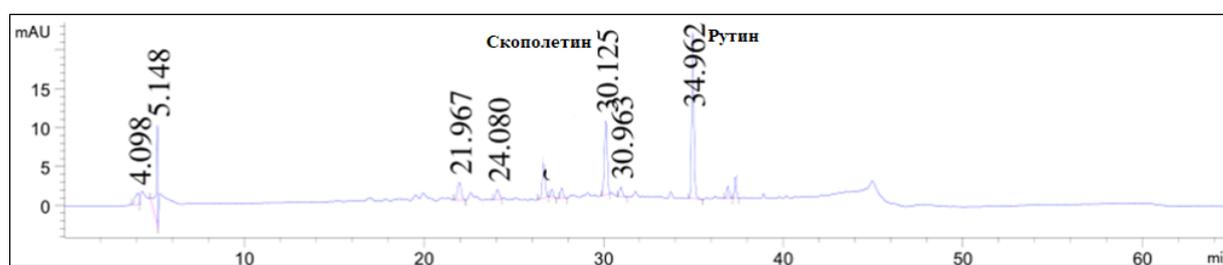


Рисунок 12: Хроматограмма экстракта плодов дерезы обыкновенной (n=5, p<0,05).

Основным флавоноидным соединением в плодах был рутин со значением 2,10 - 5,48 мг/г сухого образца (в расчете на рутин). Максимальный выход рутина зависит от концентрации растворителя. Максимальное количество рутина, извлеченного из плодов ($5,48 \pm 0,26$ мг/г), экстрагируется 80%-ным этанолом, а минимальный выход достигается при использовании этанола с 96%-ной концентрацией ($2,10 \pm 0,09$ мг/г). Количество экстрагированного рутина является самым высоким при $5,48 \pm 0,26$ мг/г, когда в качестве растворителя используется 80%-ный СЭ. Такая концентрация рутина, присутствующего в плодах дерезы обыкновенной, также сообщается в других исследованиях.

Максимальное количество скополетина, экстрагированного из плодов дерезы обыкновенной ($0,76 \pm 0,03$ мг/г), экстрагируется 70%-ным этиловым спиртом, а минимальный выход достигается при использовании этилового спирта с 96%-ной

концентрацией ($0,48 \pm 0,02$ мг/г). Общий выход скополетина практически постоянен, несмотря на концентрации растворителя (рис.13).

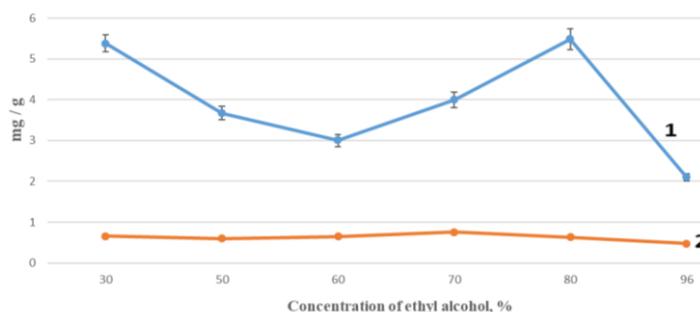


Рисунок 13. Содержание рутина (1) и скополетина (2) в плодах дерезы обыкновенной ($n=3$, $p<0,05$).

Исследования показали, что рутин обладает спектром фармакологических преимуществ при лечении различных хронических заболеваний, таковых как рак, диабет, гипертония и гиперхолестеринемия. С другой стороны, скополетин обладает антиоксидантными свойствами, противовоспалительной активностью, он проявляет апоптотическое и антипролиферативное действие на клеточную линию рака предстательной железы и является активным компонентом плодов дерезы обыкновенной для ингибирования пролиферации простатических клеточных линий человека (PC3).

Определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин

Определение содержания дубильных веществ в плодах дерезы обыкновенной проводили титриметрическим методом, в пересчете на танин.

Метод перманганатометрического титрования основан на способности дубильных веществ быстро окисляться перманганатом калия в кислой среде с индикатором индигосульфоновой кислоты. После завершения окисления дубильных веществ перманганатом калия, индигосульфоновая кислота окисляется до изатина, в результате которого в точке эквивалентности цвет раствора меняется с голубого на золотисто-желтый (рис.14).

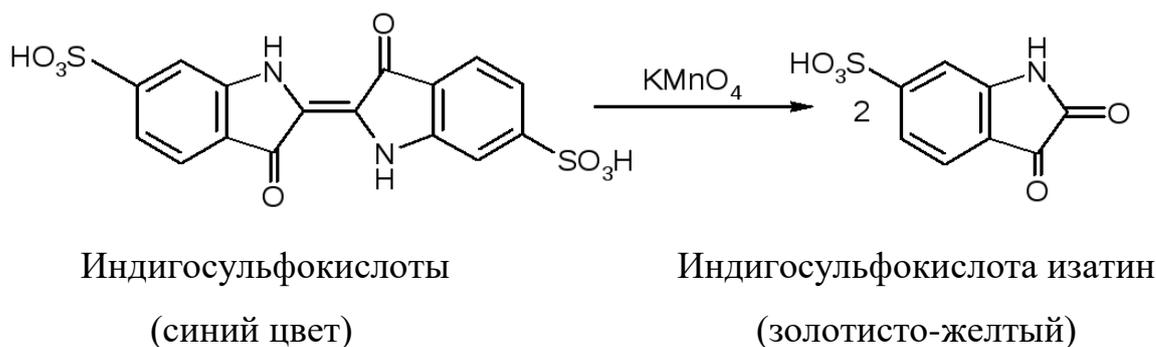


Рисунок 14. Схема количественного определения дубильных веществ в ЛРС [118].

Способ предусматривает определение суммы всех фенольных соединений, но использование коэффициента пересчета Нейбауэра (0,004157 г - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл 0,1 моль экв/л раствора перманганата калия, в пересчете на танин) позволяет определить содержание дубильных веществ. Извлечение проводят по аналогии со способом приготовления отвара, который позволяет определить количество дубильных веществ, полученных пациентами при изготовлении отвара из этого ЛРС [115-116]. Метод дает завышенные результаты, поскольку происходит одновременное окисление различных веществ, отличных от дубильных веществ, и это следует учитывать для приблизительного количественного определения дубильных веществ, присутствующих в растительном сырье [117]. Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле (8):

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad (8)$$

где: V – объем калия перманганата раствора 0,02 М, израсходованного на титрование водного извлечения, мл; V1 — объем калия перманганата раствора 0,02 М, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл калия перманганата раствора 0,02 М (в пересчете на танин), г; а – навеска сырья или лекарственного растительного препарата, г; W – влажность ЛРС, %; 250 – общий объем водного извлечения, мл; 25 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Содержание дубильных веществ в плодах дерезы обыкновенной варьировалось от 0,75% до 0,98% при среднем содержании $0,87 \pm 0.1\%$.

Определение органических кислот методом титриметрии и ВЭЖХ

Органические кислоты в основном накапливаются во плодах и овощах и определяют характерный вкус многих растительных продуктов. Органические кислоты играют важную роль в питательных качествах и органолептических характеристиках плодов, таких как вкус, запаха и текстуры. Некоторые органические кислоты, содержащиеся во плодах, - яблочная, лимонная, винная, пировиноградная, уксусная кислоты. Около 70% от их общего количества выпадает на яблочную кислоту и до 20% на лимонную кислоту, а для плодов характерно преобладание свободных органических кислот над связанными [119-120].

Содержание свободных органических кислот в плодах дерезы обыкновенной определяли титриметрическим методом, основанная на титровании определенных объемов экстракта раствором щелочи. раствором соляной кислоты до появления не исчезающего розового окрашивания [55]. Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле (9):

$$X = \frac{V \cdot 0.0067 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 10 \cdot (100 - W)} \quad (9)$$

где 0,0067 — количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл раствора натра едкого (0,1 моль/л), в граммах; V — объем раствора натра едкого (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах; m — масса сырья в граммах; W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Установлено, что содержание свободных органических кислот и кислых солей в плодах дерезы обыкновенной составляет $1,44 \pm 0.06\%$ или 1440 мг/100г.

Также, содержание органических кислот были установлены в соответствии с [56], с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ Shimadzu Prominence) на ВЭЖХ-колонке Restek (l=300 мм, d=4,6 мм); в качестве

подвижной фазы предварительной обработки использовали смешанный раствор 0,1 моль/л H_3PO_4 и 0,1 моль/л $KH_2PO_4-H_2O$ подвижный, рН 2,2, с использованием процедуры изократического элюирования со скоростью потока 1 мл/мин; $\lambda = 210$ нм. Полученный гомогенат из 50 г сырья в 500 мл воды центрифугировали в течение 10 минут при 4000 g. Надосадочную жидкость пропускали через фильтр толщиной 0,45 мкм.

Наблюдаемые пики были идентифицированы путем проверки времени удерживания и спектров поглощения каждой органической кислоты как плодов дерезы обыкновенной, так и стандартов при 210 нм (рис. 15).

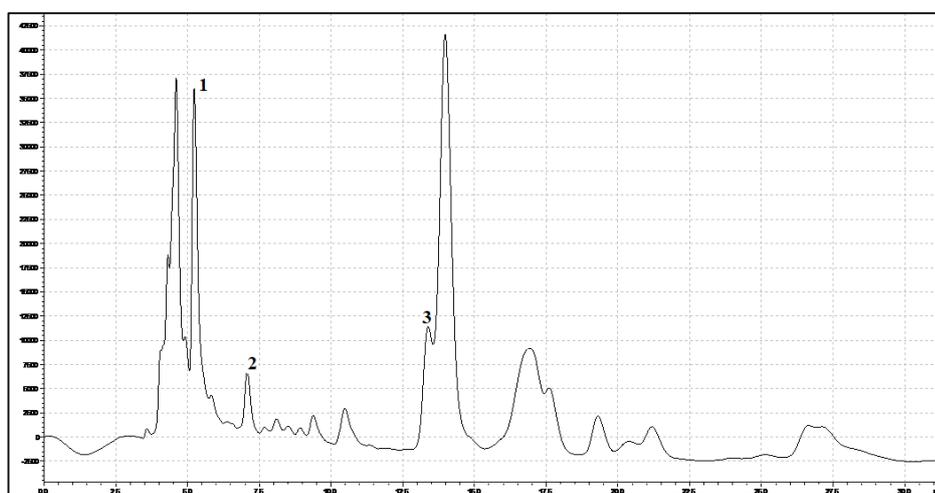


Рисунок 15. Хроматограмма экстракта плодов дерезы обыкновенной при 210 нм. 1- винная кислота, 2-яблочная кислота, 3-лимонная кислота (n=5, p<0,05).

Из образцов плодов были выделены и идентифицированы три органические кислоты: винная, яблочная и лимонная. Наблюдались хорошо разрешенные и высокие пики при времени удерживания 4,35 мин и 13,85 мин. Этот пик мог быть связан с органическими кислотами, но время удерживания не соответствовало ни одному из стандартов, поэтому идентификация была невозможна (см. рис.15).

Винная кислота (420 мг/100 г) была основной органической кислотой, за ней следовали яблочная кислота (180 мг/100 г) и лимонная кислота (390 мг/100 г). Таким образом, плоды дерезы обыкновенной классифицируются как плоды с винной кислотой.

Определение витамина С титриметрическим методом

Содержание аскорбиновой кислоты в плодах дерезы обыкновенной проводилось в соответствии с [55], в котором аскорбиновую кислоту титровали 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, что является показателем для оценки содержания аскорбиновой кислоты (витамина С).

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать окислительно-восстановительный индикатор синего красителя 2,6-дихлороиндофенол до бесцветного раствора. Для того чтобы снизить влияние восстанавливающих краситель веществ, кроме аскорбиновой кислоты, образец подкисляют до pH около 3,5, обычно 3% метафосфорной кислотой (HPO_3) или соляной кислотой. В кислой среде недиссоциированная молекула дихлорфенолиндофенола имеет максимум поглощения при 518 нм и приобретает розовый цвет, а аскорбиновая кислота восстанавливает ее до бесцветного соединения (рис.16). Данный метод подходит для окрашенных растворов и обычно определяет на 5-10% более высокие количества аскорбиновой кислоты в образцах плодов, чем метод ВЭЖХ [121-123].

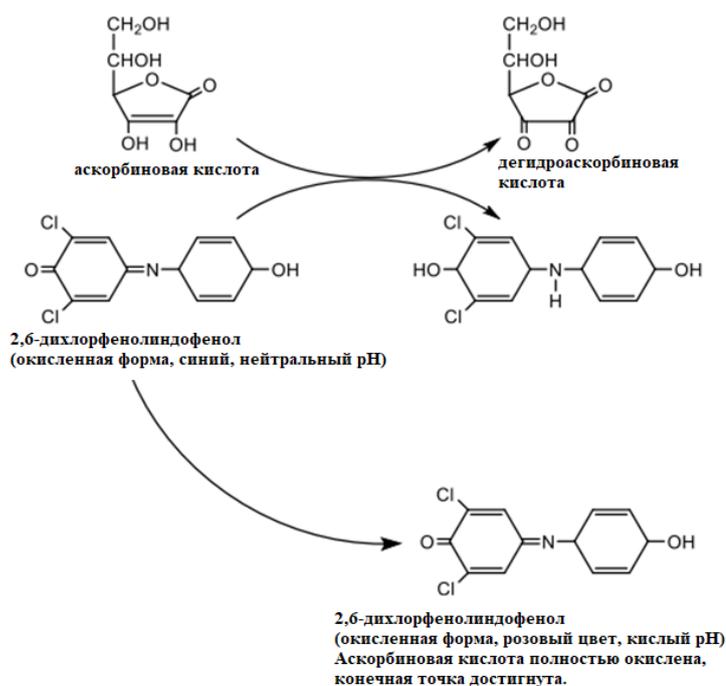


Рисунок 16. Основы определения витамина С методом титрования [141].

Содержание аскорбиновой кислоты (X,%) пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле (10):

$$X = \frac{V \cdot 0.000088 \cdot K \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot l \cdot (100-W)} \quad (10)$$

где V – объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, мл; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 300 – объем извлечения, соответствующий всей навеске; l – объем извлечения, взятого на титрование. l – объем извлечения, взятого на титрование.

Содержание аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах и ЛРС должно быть определено для того, чтобы создать правильную диету, удовлетворяющую потребность организма в этом витамине.

Вклад в ежедневное потребление витамина С из одной порции (100 г) плодов албанской дерезы обыкновенной является высоким, около $0,244 \pm 0,007\%$ или 244 мг/100 г, в то время как рекомендуемое потребление витамина С с пищей составляет 90 мг/день. Количество аскорбиновой кислоты, обнаруженной во плодах, оказалось выше, чем другие данные, представленные в литературе, такие как Donna D. и соавт. для итальянских плодов дерезы обыкновенной (48,94 мг/100 г) и Nzeuwa I.VY и др. для китайской плодов дерезы обыкновенной (33,15 - 113,86 мг/100 г) [124].

Аскорбиновая кислота участвует в окислительно-восстановительных процессах при синтезе стероидных гормонов и формировании соединительной ткани, она способствует усилению регенеративных процессов. Аскорбиновую кислоту применяют для профилактики гиповитаминоза и простудных заболеваний, а также для лечения воспалительных процессов и атеросклероза.

3.2. Изучение дисперсных характеристик, коллоидной стабильности и токсичности различных экстрактов из плодов дерезы обыкновенной

3.2.1. Приготовление водных извлечений для анализа

Последние исследования показывают, что экстракты плодов дерезы обыкновенной, содержащие полисахариды (LBP) и другие БАВ, обладают целым рядом биологических эффектов (см. раздел 1.5.), включая воздействие на старение, нейропротекцию, борьбу с усталостью /выносливостью, повышение метаболизма, контроль уровня глюкозы у диабетиков, глаукому, антиоксидантные свойства, иммуномодуляцию, противоопухолевое действие. Было проведено множество фитохимических и биологических исследований различных извлечений из плодов дерезы обыкновенной, однако, среди них нет данных по исследованиям дисперсных характеристик, коллоидной стабильности и токсичности извлечений [125]. По этой причине следующим этапом исследования было приготовление нескольких видов извлечений из плодов и изучение характеристик дисперсности с целью выбора наилучших условий для приготовления извлечений как в домашних условиях, так и в условиях фармацевтической промышленности.

Высушенные плоды дерезы обыкновенной широко применяются в китайской медицине в виде травяных чаев, для производства настоек, вина, сока. Плоды часто вводят в состав травяных смесей [126]. Поскольку плоды дерезы применяют в виде жидких форм, нами были приготовлены настои, отвары и настойки при различных условиях, как описано в ГФ РФ XIV (см. главу 2.4.5.).

Водные экстракты - настои и отвары – были приготовлены в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» (таблица 8). Методика: для приготовления настоев взяли 10 г плодов в 100 мл очищенной воды и настаивали на кипящей водяной бане в течение разных временных интервалов (15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 минут). Затем они были отфильтрованы с помощью бумажного фильтра. Цвет настоев варьировался от светло-желтого до ярко-оранжевого в зависимости от времени настаивания.

Таблица 8. Условия приготовления экстрактов плодов дерезы обыкновенной.

Тип экстракта	Методика	Растворитель	Соотношение РС:вода	Время экстракции, t, мин
Настои	ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары.	Вода	1:10	t ₁ = 15
Отвары			1:50	t ₂ = 30 t ₃ = 60 t ₄ = 90
Настойки	ОФС.1.4.1.0019.15 Настойки	Этиловый спирт 40%, 70%, 96%	1:5 1:10	2·10 ³ (14 дней)

Методика для приготовления отваров: к 1 г предварительно измельченного растительного сырья добавляли воду (1:10) с учетом коэффициента водопоглощения и настаивали на кипящей водяной бане в течение 15, 30, 45, 60 минут при комнатной температуре, затем процеживали и отжимали оставшийся сок. Полученные отвары имели желтый цвет с ярким фруктовым запахом (рис.17).



Рисунок 17. Отвары, полученные из плодов дерезы обыкновенной (слева направо: 15 мин, 30 мин, 45 мин, 60 мин); соотношение плодов: вода 1:10.

Вода является подходящим экстрагентом для плодов дерезы, поскольку позволяет извлекать полисахариды. Кроме того, ранее было установлено, что при

водной экстракции содержание экстрактивных веществ составляет около 40% (см. главу 3.1.2.). Таким образом, водные экстракты (ВЭ) содержали высокие концентрации разнообразных химических соединений, присутствующих в плодах.

Настойки из плодов дерезы обыкновенной были приготовлены по методике, описанной в ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты», а также в соответствии с указаниями в иных литературных источниках [127-128]. Настойки получали в лабораторных условиях методами мацерации, который является простым и не требует дорогостоящего оборудования. Настойки - препараты, содержащие или 1 часть растительного сырья и 5 частей жидкости, или 1:10 [128]. К определенной массе плодов добавляли СЭ в разной концентрации (40,70,95%) и оставляли на две недели в прохладном и темном месте, непрерывно встряхивая. Для приготовления экстракта зачастую рекомендуют использовать воду и СЭ из-за их разницы в полярности. Через две недели настойки отфильтровывали и подвергали дальнейшему исследованию. Всего было приготовлено 6 образцов настоек. Полученные экстракты характеризовались различным внешним видом, цветом и ароматом (рис.18).



Рисунок 18. Настойки, полученные из плодов дерезы обыкновенной методом мацерации. Слева направо (концентрация – соотношение плодов и экстрагента): 40%–1:5; 40% - 1:10; 70% - 1:5; 70% - 1:10; 96% - 1:5; 96% - 1:10.

3.2.2. Исследование жидких экстрактов из плодов дерезы обыкновенной

Согласно требованиям нормативной документации (НД), испытания качества жидких экстрактов (ЖЕ) включают в себя такие разделы, как описание, потеря в

массе при высушивании, определение спирта этилового, остаточных органических растворителей, нормированного содержания ионов тяжелых металлов, сухого остатка. Однако, учитывая свойства ЖЕ, как гетерогенных систем, при приготовлении и контроле их качества следует принимать во внимание поверхностные явления на межфазных границах [129]:

$$\Delta G_s = \sigma \Delta S + S \Delta \sigma.$$

Как видно из уравнения, к уменьшению поверхностной энергии (G_s) приводит снижение поверхностного натяжения (σ) при $S = \text{const}$ (процессы адсорбции, адгезии) или сокращение площади поверхности раздела фаз (S) при $\sigma = \text{const}$ (процессы коагуляции, коалесценции) [130].

Размер частиц, распределение по размерам и поверхностный заряд играют важную роль в усвоении клетками, стабильности и биораспределении. Таким образом, целью исследования является изучение дисперсионных характеристик, коллоидной стабильности, в том числе кинетической, в образцах водных и спиртовых жидких экстрактов из плодов рода *дереза обыкновенная* для разработки новых перспективных фитопрепаратов.

3.2.3. Исследование настоев из плодов *дерезы обыкновенной*

Определение дисперсности настоев *дерезы обыкновенной* по данным метода DLS

Гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности (PDI) и дзета-потенциал настоев измеряли методом динамического рассеяния света с использованием Malvern MasterSizer 3600 E до и после фильтрации через субмикронный инертный мембранный фильтр Millex-GV 0,22 мкм. Методика: образцы переносили в одноразовые калибровочные кюветы для измерения размера или в специальные капиллярные ячейки для измерения дзета-потенциала.

На рисунке 19 показаны средние значения гидродинамических диаметров настоев плодов *дерезы обыкновенной* на дифференциальной кривой распределения, которые характеризуются тримодальным распределением нано- и микрочастиц. Большая доля частиц (около 90%) находится в диапазоне от 400 до

600 нм. В зависимости от времени инфузии и фильтрации средний размер частиц (Z-Average) изменялся с 254 нм до 557 нм. Настой при $t=15$ минут продемонстрировал наименьший средний размер $d=433$ нм, а настой при $t=90$ минут - наибольший $d=557$ нм. Заметные пики в диапазоне 3200 – 5500 нм с размерной долей 2-6% указывают на присутствие агрегированных частиц с высокой молекулярной массой. Пики из трех проб совпадают друг с другом, которые являются отражением очищенного и гомогенного препарата (см. главу 2.3.5).

При пропускании настоя через фильтры Millex-GV размер уменьшается примерно в 2 раза. Значение PDI при настаивании в течение 15 и 90 минут увеличивается в два раза после фильтрации, что свидетельствует об увеличении полидисперсности настоев и их склонности к агрегации. Однако, среднее значение Z-Average уменьшается, как минимум, в 2 раза. Мы предполагаем, что макромолекулы (полисахариды), присутствующие в РС, не проходят через фильтр Millex с $d_{пор}=0,22$ мкм.

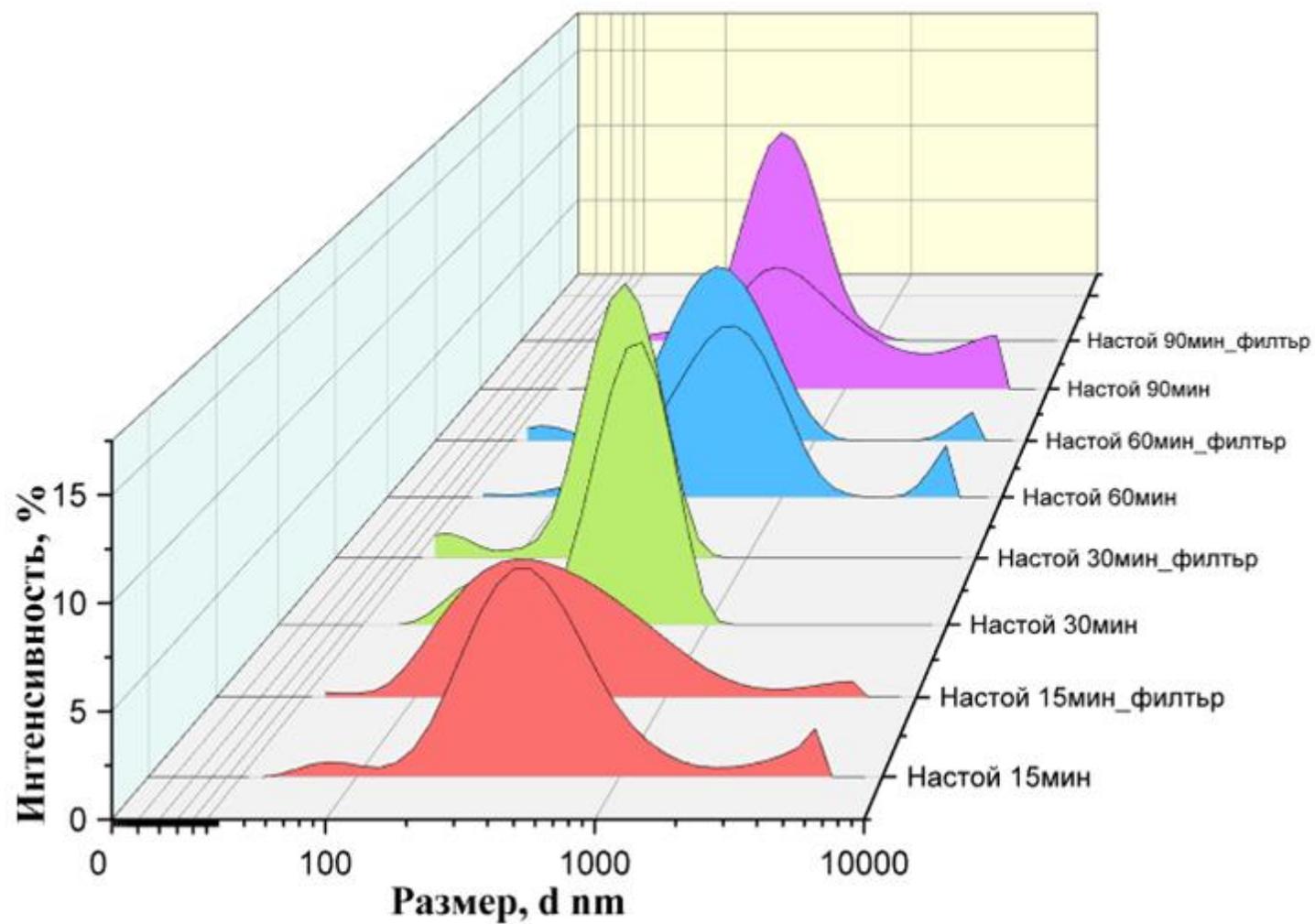


Рисунок 19 - Распределение частиц по размерам настоя по данным DLS.

Значения индексов (PDI) колеблется от 0,34 до 0,60, что характеризует монодисперсность препаратов. Все настои характеризуется величинами дзета-потенциала в диапазоне от -23 до -27 мВ, что указывает на удовлетворительную устойчивость/ коллоидную стабильность мицелл (рис.20).

Вследствие того, что большинство клеточных мембран заряжены отрицательно, дзета-потенциал может влиять на способность наночастиц проникать через мембраны, в то время как катионные частицы обладают повышенной токсичностью, связанной с разрушением клеточной стенки [150].

В целом, настой при $t=30$ минут продемонстрировал наилучшие дисперсные характеристики с небольшим средним значением $Z\text{-Average } d \sim 260$ нм (после фильтрации), монодисперсностью (PDI $\sim 0,4$) и коллоидной стабильностью при значении ζ -потенциала = -23 мВ.

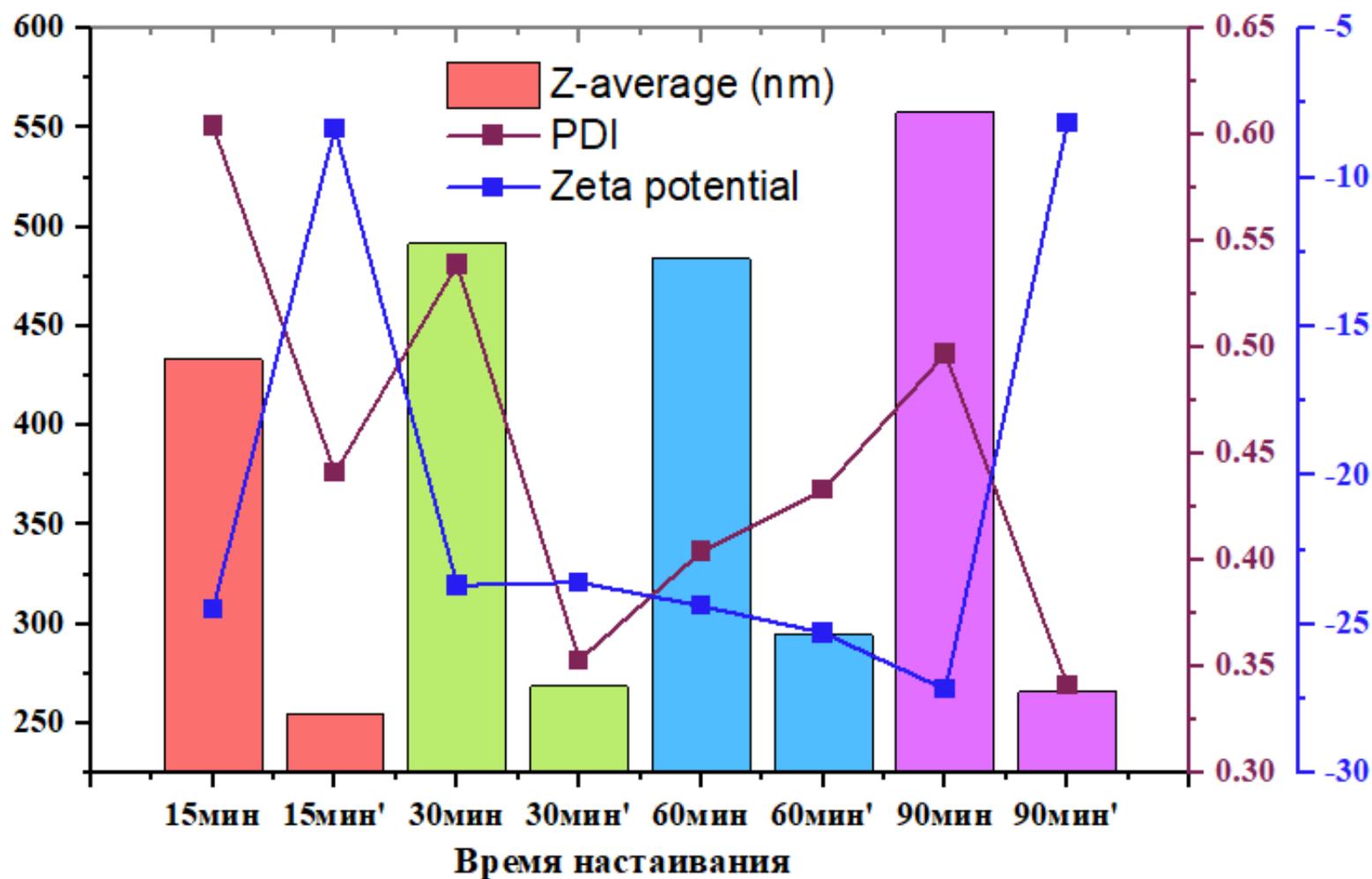


Рисунок 20. Среднее значение Z, PDI и дзета-потенциал настои: 15 мин', 30 мин', 60 мин', 90 мин' - фильтрованные настои (0,22 мкм) $\bar{X} \pm SD$, n = 3.

Дисперсный анализ методом лазерной дифракции света

Анализ размеров частиц определяли методом малоуглового лазерного рассеяния света (LALLS), представленного в ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размерам методом лазерной дифракции света» (см. главу 2.3.4).

Для характеристики жидких сред ЛС необходимо провести анализ таких дисперсных параметров, как лазерное светорассеяние, объемная концентрация частиц дисперсной фазы; интегральное значение удельной площади поверхности дисперсной фазы ($\text{м}^2/\text{см}^3$) [132]. Дисперсные характеристики, полученные для настоек, представлены на рисунке 21.

Кривые распределения показывают, что во всех настояях частицы имели диаметр менее 140 $\mu\text{м}$ и занимали около 90% объема системы. Основная объемная доля микронных агрегатов в образце настоя при $t=15$ и 90 мин распределена в области размеров $d=121-140$ $\mu\text{м}$. Фильтрование не оказывало значительного влияния на распределение частиц по размерам.

Образец настоя при $t=30$ мин содержал частицы диаметром 8–50 $\mu\text{м}$, объемная доля которых составляла от 3% до 6%. После фильтрации частицы диаметром 20,5 $\mu\text{м}$ присутствуют в значительной объемной доле (45,5%). Образец настоя при $t=60$ мин содержал частицы диаметром 23–28 $\mu\text{м}$, объемная доля которых составляла около 31% (рис.22).

Лазерное затемнение, которое характеризует потерю интенсивности света при прохождении через образец в измерительной ячейке, составляет менее 0,5 во всех образцах. Значения уменьшаются, минимум, в два раза после фильтрации, что указывает на то, что некоторые из крупных молекул остались на фильтре и настои становятся более монодисперсными.

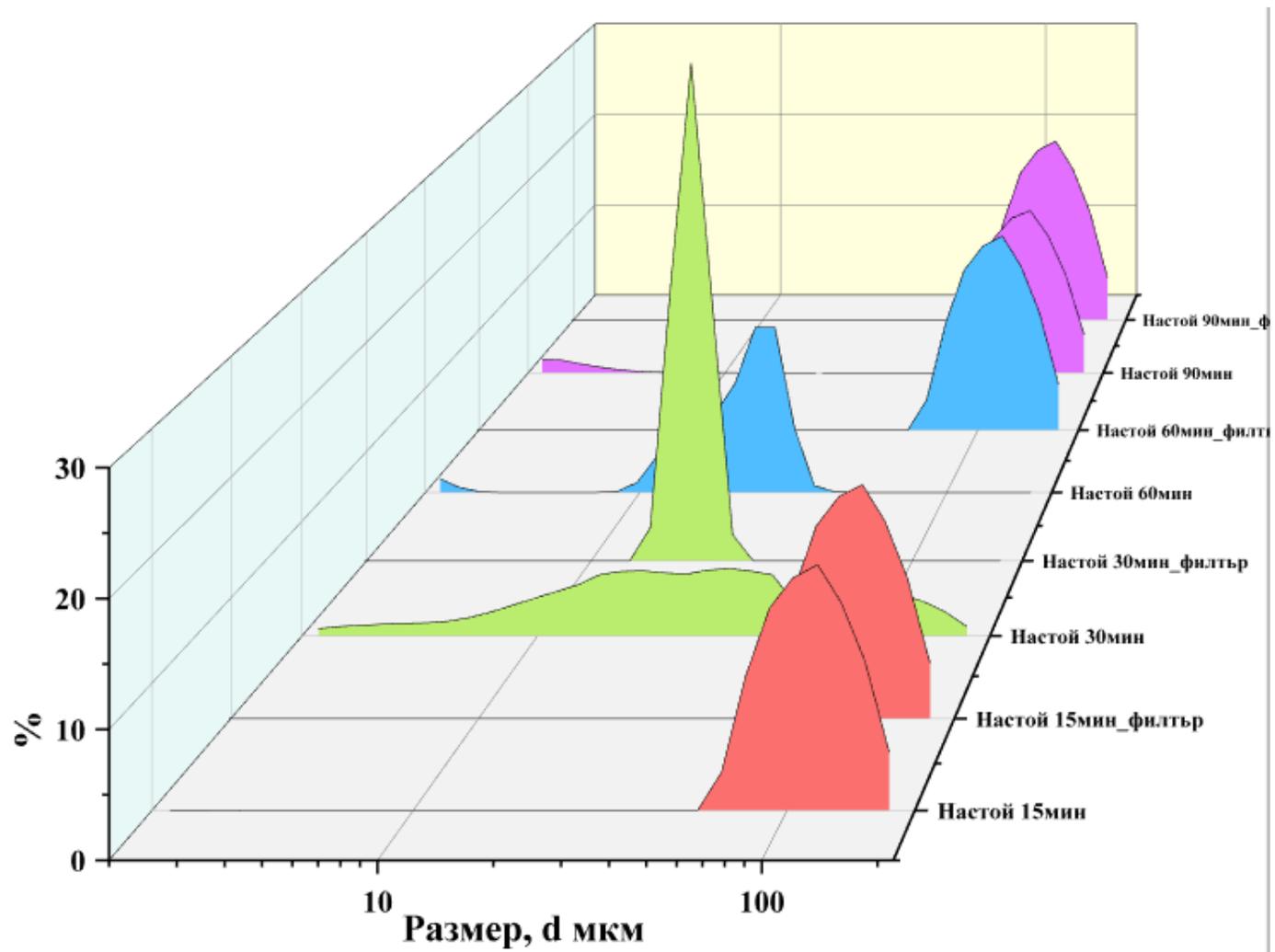


Рисунок 21. Изменение дисперсных характеристик в образцах настоев по данным метода LALLS.

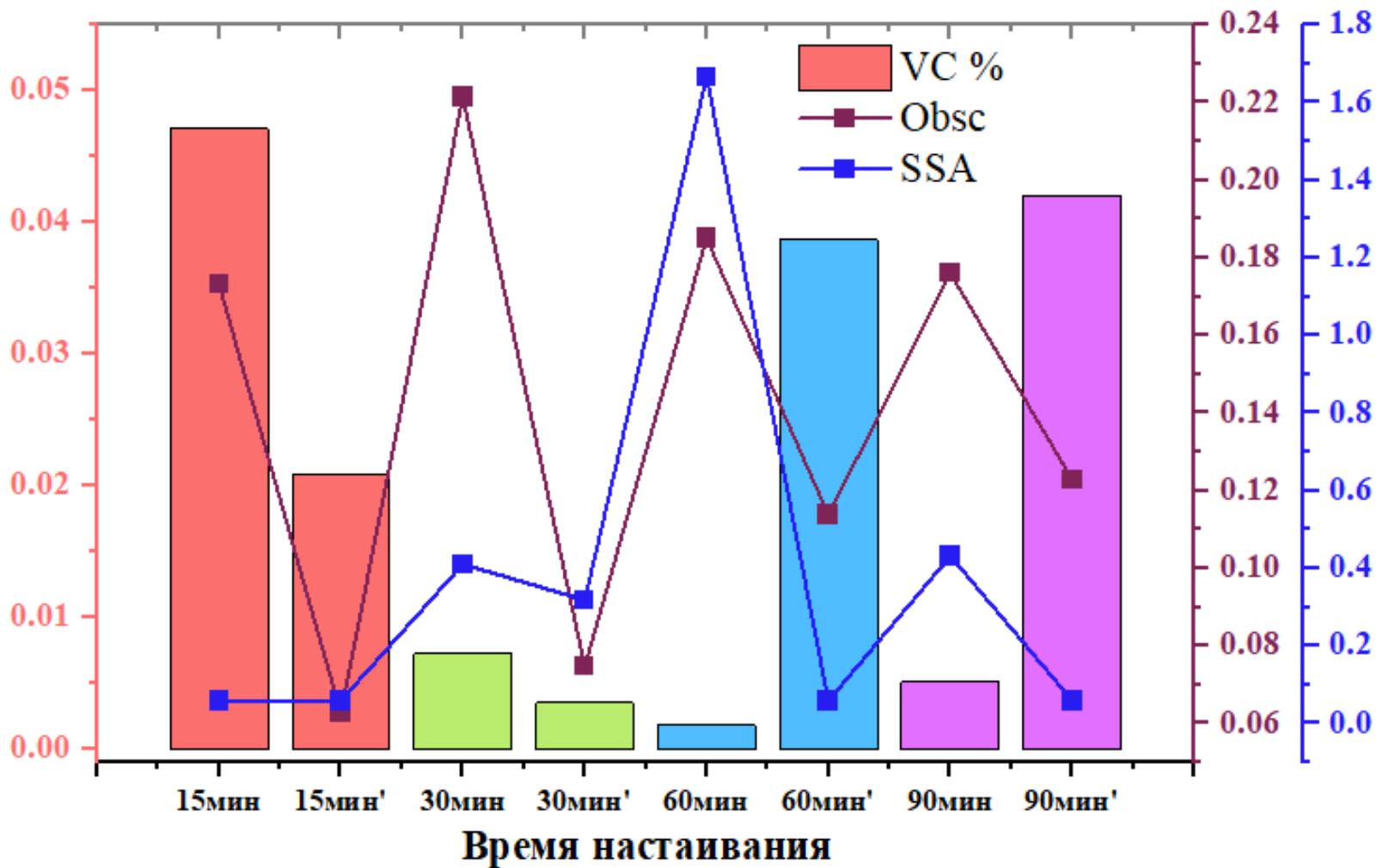


Рисунок 22. Объемная концентрация (VC %) и лазерное затемнение (Obscuration) до и после фильтрования образцов настоя (t' - образцы после фильтрования через Millex-GS); $\bar{X} \pm SD$, $n = 3$.

Полученные результаты демонстрируют, что метод LALLS может быть использован для характеристики дисперсности настоев РС дерезы обыкновенной в микронном диапазоне.

3.2.4. Исследование отваров из плодов дерезы обыкновенной

Определение дисперсности отваров дерезы обыкновенной по данным метода DLS

Подобное исследование проводилось также для отваров из плодов дерезы обыкновенной. На рисунке 23 представлены результаты определения среднего значения гидродинамического диаметра частиц в единицах интенсивности ($I, \%$) для отваров, полученных в условиях различного времени настаивания ($t, \text{мин}$) и пропускания через ФС Millex-GS.

Все отвары, не прошедшие фильтрующую насадку (ФН) через Millex-GS, демонстрируют мономодальное распределение фракции частиц со сдвигом максимума распределения вправо по оси ОХ по мере увеличения времени настаивания отваров от 15 минут до 1 часа (рис.23).

Отвар при $t=15$ минут имеет мономодальное распределение в области от 295 нм до 531 нм с максимумом при 459 нм. После фильтрации картина меняется, и распределение частиц приобретает бимодальный характер с максимумом при 43,8 нм и 342 нм, предполагая присутствие агрегированных частиц с высокой молекулярной массой. Значение индекса полидисперсности PDI снижается в два раза после фильтрации, а среднее значение Z-Average снижается пятикратно (рис. 24).

Подобные явления наблюдались с другими отварами, однако со сдвигом максимального распределения частиц на 825 нм для всех трех отваров. Образцы, прошедшие через фильтр, имеют два максимума и характеризуются бимодальным распределением нано- и микрочастиц (рис.23).

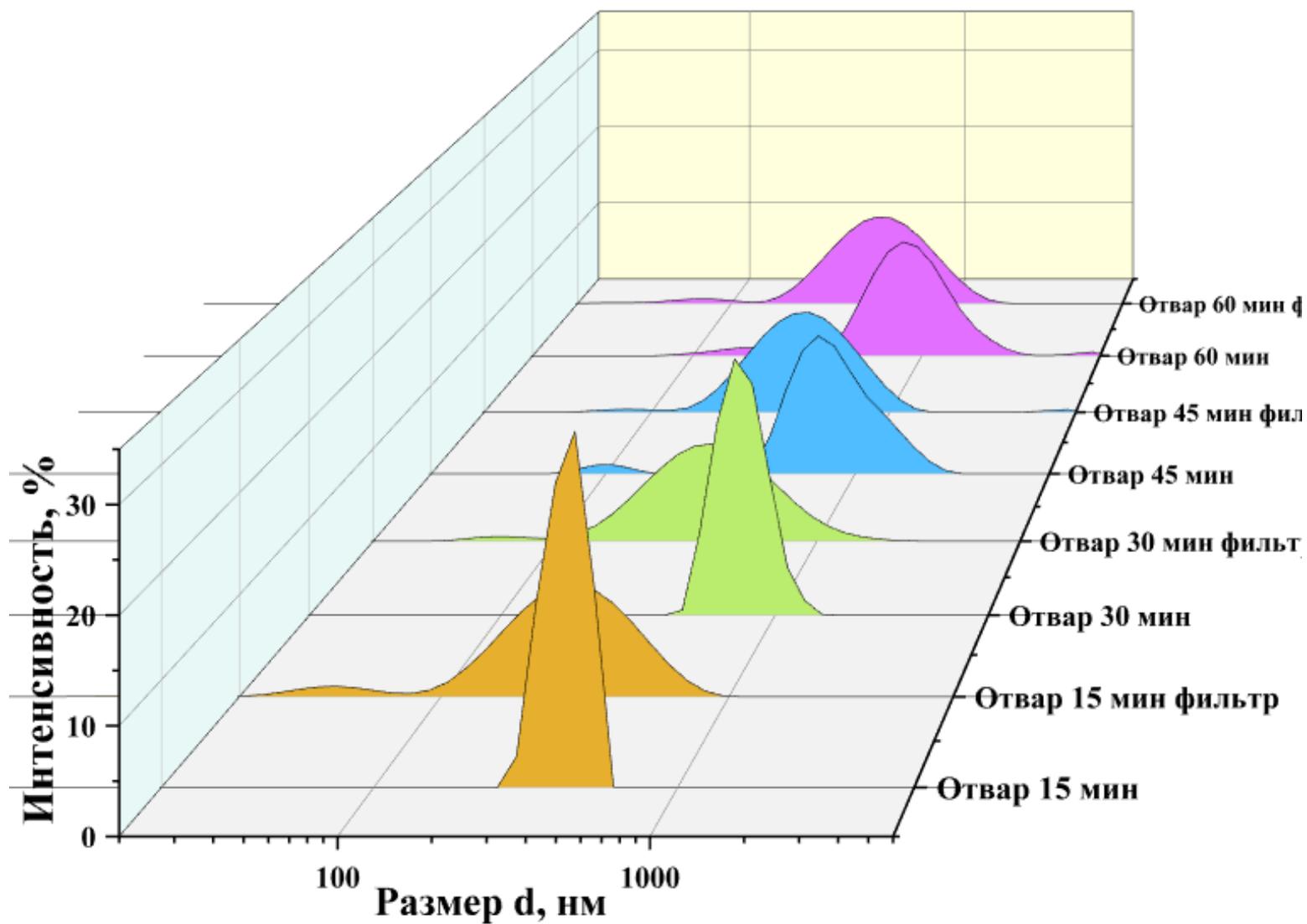


Рисунок 23. Распределение частиц по размерам отваров плодов дерезы обыкновенной в соответствии с DLS.

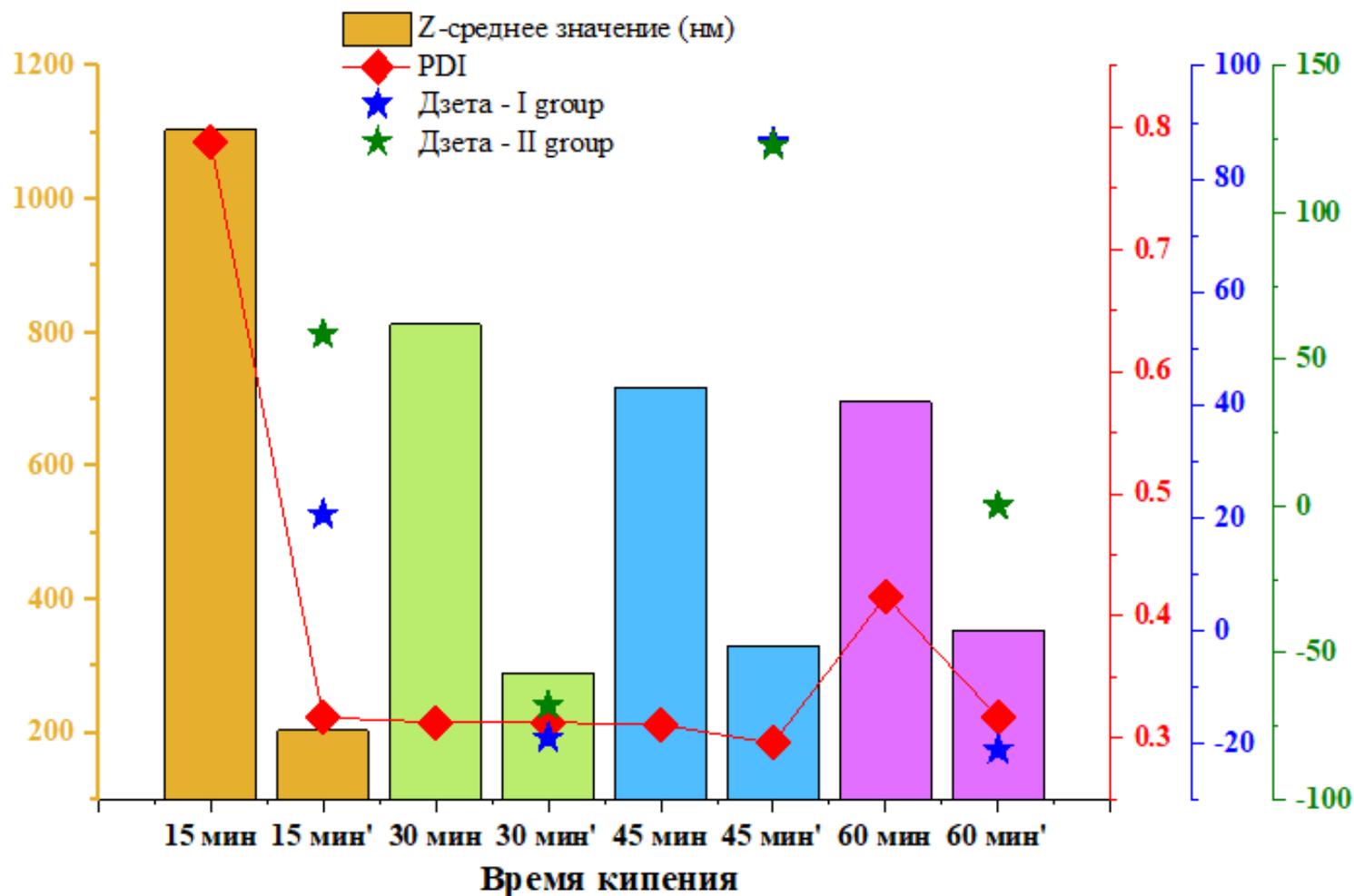


Рисунок 24. Среднее значение Z, PDI и дзета-потенциал отваров: 15мин', 30 мин', 60 мин', 90 мин' - фильтрованные отвары (0,22 мкм) $\bar{X} \pm SD$, n = 3.

Значения PDI для отваров составляют <0,4%, которые свидетельствуют об умеренной полидисперсности отваров и не были существенно изменены после пропускание через ФН. С другой стороны, фильтрование снижает среднее значение Z-Average в несколько раз, что возможно указывает за то, что крупные агрегаты, присутствующие в отварах, удалялись фильтрованием. Однако пропускание образцов отваров через ФН Millex-GV для удаления частиц пыли и другой примеси может приводить к формированию искусственно узкому распределению частиц по размерам, то есть, к ложному результату. Полимодальное распределение частиц возникает в результате агломерации - процесса, при котором наночастицы образуют ассоциаты, рассеивающие свет и маскирующие низкоинтенсивный рассеянный свет от мелких частиц, снижая достоверность результатов [133].

Значения ζ -потенциала, измеренные для образцов отваров, прошедших через Millex-GS, представлены в таблице 9.

Таблица 9. Дзета-потенциал частиц дисперсной фазы в отваров дерезы обыкновенной (*Lucium Varabarum* L.)

Образец	$\bar{\xi}_1 \pm SD, \text{ мВ}$	$\bar{\xi}_2 \pm SD, \text{ мВ}$
2	+21 ± 6	+59 ± 1.5
4	-19 ± 4	-68 ± 3
6	+86 ± 4	+123 ± 2
8	-21 ± 3	—

Дзета-потенциал, возникающий на границе скольжения дисперсионной среды и неподвижного слоя жидкости, окружающей частицу, характеризует устойчивость коллоидной системы при значении ~30 мВ. Согласно табличным данным, значения электрокинетического потенциала исследуемых отваров представлены двумя группами (за исключением образца 8), демонстрируют не только различную устойчивость, но и перемену заряда с отрицательного на положительный в зависимости от времени настаивания образца.

Бóльшей устойчивостью характеризуются образец ЖЭ с временем настаивания $t=45$ мин (образец б): значительное отталкивающее электростатическое взаимодействие предотвращает сближение частиц друг с другом и образование агломератов ($S>0$, $\sigma = \text{const}$).

Предположительно, это обусловлено действием минералов, которые со временем отделяют от плодов. Действительно, плоды дерезы обыкновенной содержат калий и кальций в относительно высоких количествах, и они могут влиять на величину дзета-потенциала. Кроме того, согласно данным одного исследования, добавление солей кальция повышало величину дзета-потенциала [134].

Исследование стабильности отваров

Интерес представляют, также, результаты кинетических исследований стабильности частиц в отварах спустя 10 дней после приготовления: значение ζ -потенциала изменилось и приблизилось к нулю, что нивелировало отталкивающий эффект двойного электрического слоя. Это является показателем высокой нестабильности дисперсий, с тенденцией к коагуляции. Для стабилизации коллоидов в дисперсную систему были введены растворы электролитов (рис. 25).

В растворы были добавлены разные концентрации соли с целью оценки влияния ионной силы на дзета-потенциал плодовых отваров. На значения дзета-потенциала во всех отварах существенно влияют ($p < 0,05$) растворы солей.

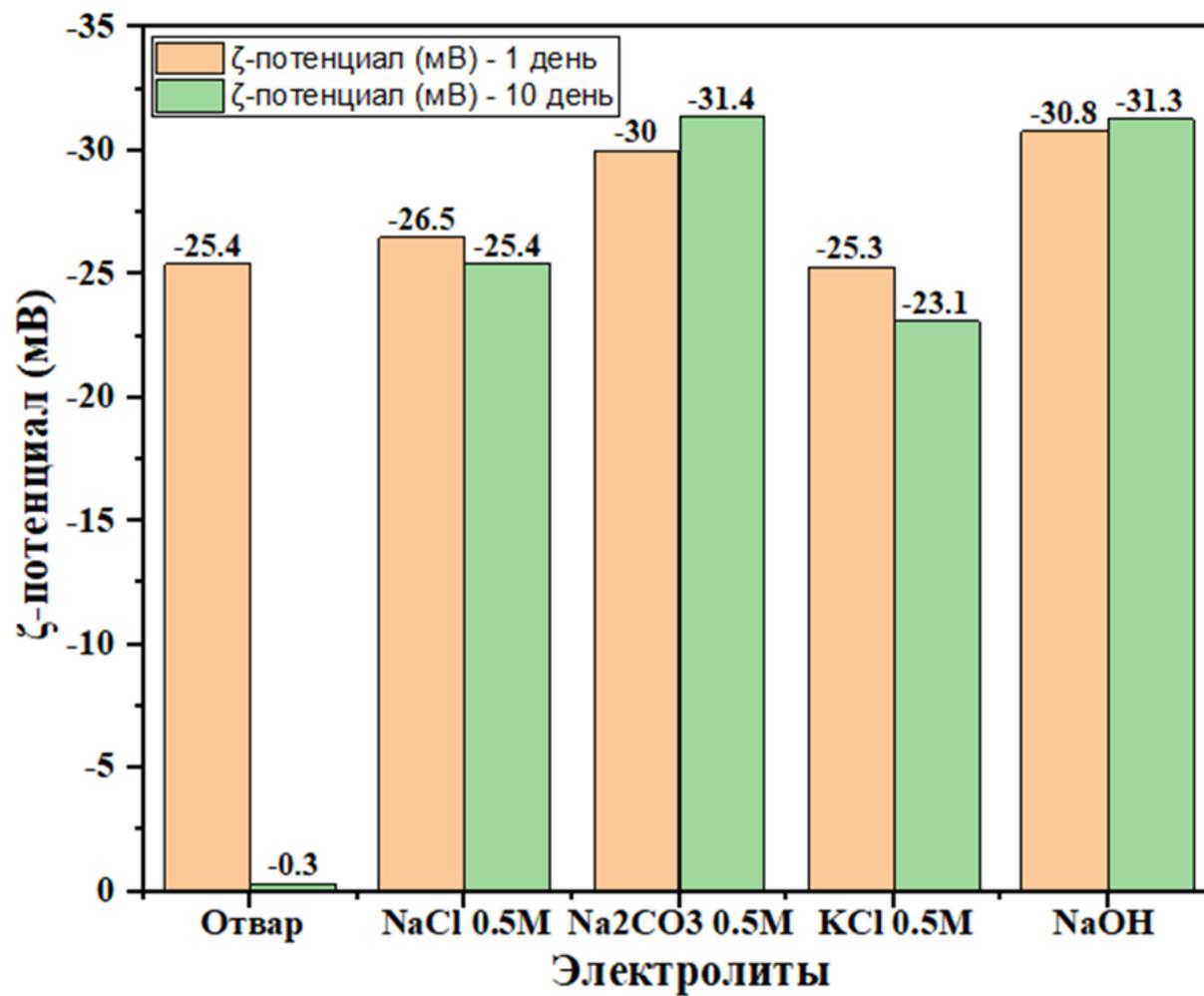


Рисунок 25. Изменение значений ζ -потенциала во времени при введении растворов электролитов в отвар 30 мин. $\bar{X} \pm SD$, $n = 3$.

Было замечено, что значение дзета-потенциала для отвара через 10 дней снижалось с -25,4 до 0 мВ. С другой стороны, образцы отваров, в которые были добавлены растворы электролитов, не демонстрировали резкого снижения дзета-потенциала через 10 дней и характеризовались значением ζ -потенциала в диапазоне от -23 до -31 мВ.

Известно, что кислотность среды влияет на толщину двойного электрического слоя [134]. Таким образом, варьирование рН повысило стабильность суспензии и уменьшило склонность к агломерации. Ионы Na^+ влияют на конформационные свойства полисахаридов, содержащихся в сырье дерезы, уменьшая гидродинамический диаметр коллоидных частиц и увеличивая значения дзета-потенциала, способствуя повышению стабильности отваров во времени [135]. По этой причине к образцу отвара с $t=30$ мин были добавлены растворы натриевых солей (0,5 моль/л NaCl , 0,5 моль/л Na_2CO_3) и калиевой соли (0,5 моль/л KCl). Согласно [136], влияние рН на стабильность коллоида не менее существенно, чем влияние ионной силы, следовательно, нами были использованы растворы 1 моль/л NaOH [136].

Анализ дзета-потенциала коллоидных частиц в растворе лекарственного средства может быть полезно с точки зрения выбора состава рецептуры для обеспечения стабильности и увеличения срока годности. Основываясь на полученных результатах, мы предполагаем, что оптимальными условиями приготовления отваров, характеризующихся стабильным PDI, диаметром частиц $d \leq 300$ нм и высоким значением дзета-потенциала, может считаться время настаивания $t=30$ мин с пропусканием образцов через ФН Millex-GS и добавлением солевых электролитов или подщелачиванием.

Оценка токсичности отваров методом *Spirotox*

Поскольку отвары представляют собой наиболее распространенный способ применения плодов дерезы обыкновенной в домашних условиях, то для определения безопасности и отсутствия неблагоприятных эффектов отваров на организм человека,

была исследована токсичность с применением тест-культуры *Spirostomum ambiguum*. Методом *Spirotox* основан на изучении Аррениусовской кинетики скорости гибели клеточного биосенсора от температуры. Температурная зависимость лиганд-индуцированной гибели клеточного биосенсора (инфузорий) в образцах отваров проводилась в диапазоне 299-305 К с шагом 2 К. Проведенный эксперимент по инкубации инфузории в отвар продемонстрировал отсутствие токсичности, что выражалось в значительном сроке жизни клеточного биосенсора и удовлетворительной двигательной активности. Сахара, присутствующие в отварах, создают оптимальную среду для жизнедеятельности инфузорий.

Поскольку образец отвара продемонстрировал отсутствие токсических эффектов, была изучена биологическая активность смеси отвара и спирта этилового (СЭ) с целью изучения влияния отвара на снижение токсичности СЭ. Данный подход, названный, как методом добавок, использовался нами для оценки снижения токсического действия токсикантов в присутствии объекта исследования.

Была протестирована токсичность этилового спирта в концентрации 20% (рис. 26), результаты оценки кажущейся энергии активации ($^{obs}E_a$) процесса гибели клеточного биосенсора в исследуемой среде представлен на рисунке 26 и таблице 10 [137-138].

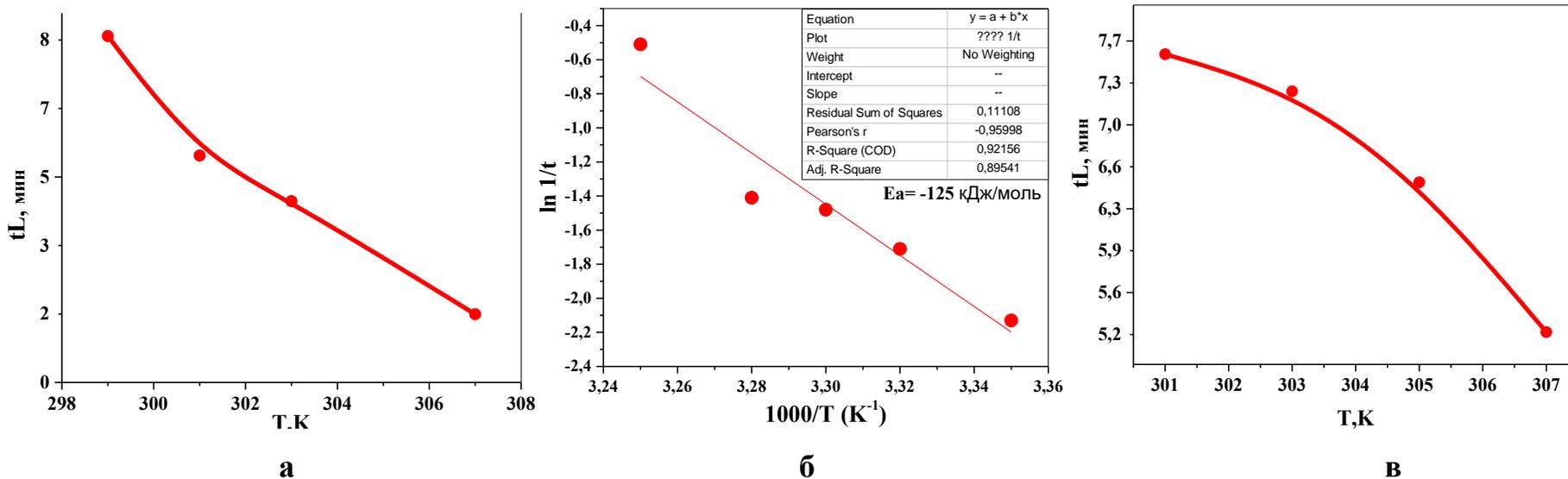


Рисунок 26. Зависимость времени жизни *S. ambigua* от температуры в прямых и Аррениусовских (б) координатах в 20% растворе этилового спирта (а, б) и в смеси отвар: спирт, 20% (в).

Таблица 10. Значение $^{obs}E_a$ процесса гибели *S. ambigua* в исследуемых средах

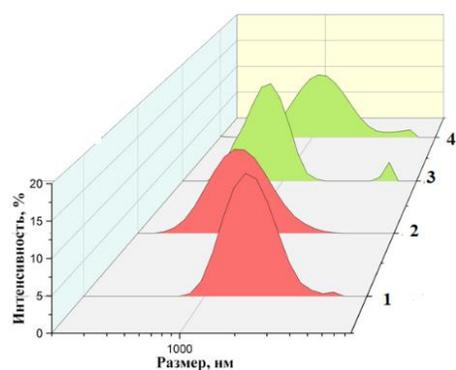
Образец	$^{obs}E_a \pm SD$, кДж/моль
Этиловый спирт 20%	125±6
смесь отвар:этиловый спирт 20%	-

Значение $^{obs}E_a$ отражает лигандо-рецепторное взаимодействие, сопровождаемое клеточной гибелью. Согласно литературным данным [138], высокие значения $^{obs}E_a$ соответствуют веществам с низкой биологической активностью/токсичностью, характеризующимся высокой клеточной выживаемостью. В смеси отвар:20% СЭ (2:1) продолжительность жизни инфузорий увеличилась в несколько раз. С целью ускорения гибели клеточного биосенсора температурный интервал исследования скорости перехода клетки в неактивное состояние (Dead Cells) был завышен в сравнении с исходным растворителем и составил 301-307 К (см. рис. 26 в).

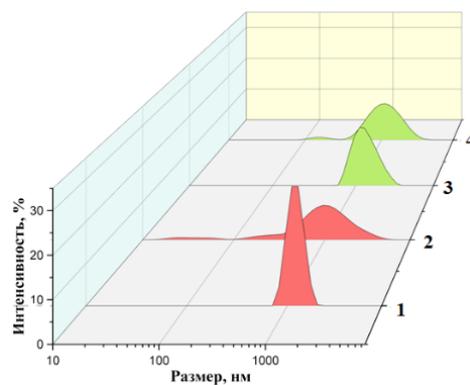
3.2.5. Исследование настоек из плодов дерезы обыкновенной

Определение дисперсности настоек по данным метода DLS

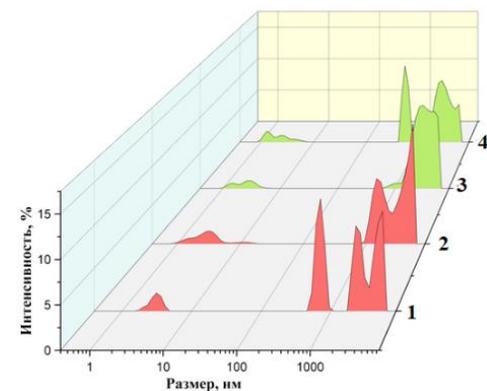
На рисунке 27 представлены результаты по определению размера нано- и субмикронных частиц в образцах спиртовых извлечений с различной концентрацией экстрагента - спирта этилового с разведением 1:5 или 1:10. Все образцы прошли этап пропускания через ФН Millex-GS, а также исследования недельной кинетики по данным метода DLS. Результаты, представленные на рисунке 25, демонстрируют бимодальное распределение частиц дисперсной фазы с заметным снижением единиц интенсивности рассеянного лазерного света на графиках с недельной кинетикой для всех образцов, кроме настойки с 40% концентрацией экстрагента; индекс PDI варьируется от 0,2 до 0,5, что свидетельствует об отсутствии полидисперсности образца.



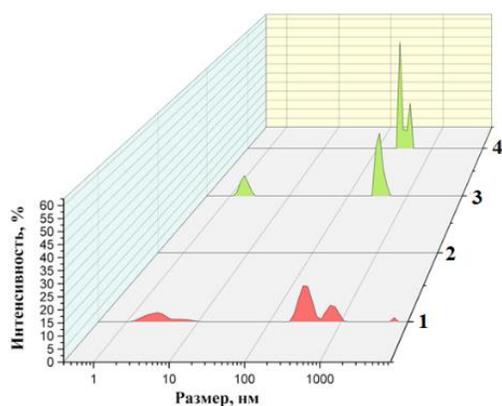
а



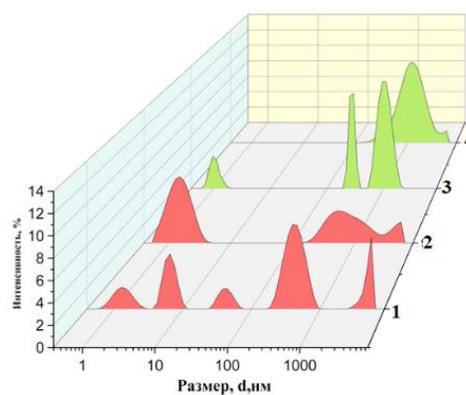
б



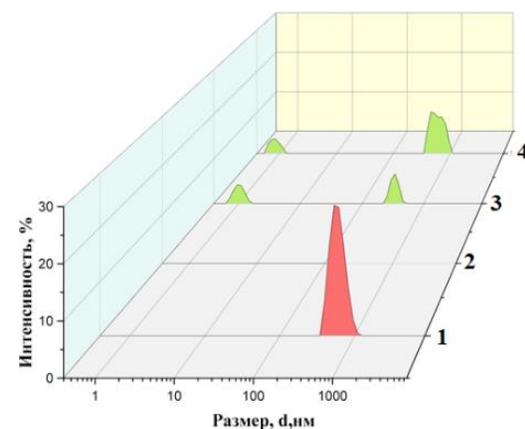
в



г



д



е

Рисунок 27. Распределение частиц по размерам в настойках из плодов дерезы обыкновенной с разной концентарцией этилового спирта и недельной кинетикой по данным метода DLS: а) 40%; б) 40%,7 дней; в) 70% ; г) 70%,7 дней; д) 96%; е) 96%,7 дней; (на графиках– соотношение сырье:экстрагент и фильтрование через Millex-GS: 1 - 1:5; 2 - 1:5, ФН; 3 - 1:10; 4 - 1:10,ФН) $\bar{X} \pm SD$, n = 3.

В настойке с 40% этиловым спиртом частицы дисперсной фазы имеют $d \sim 1 \mu\text{м}$ без видимых изменений после пропускания через ФН Millex-GS и по завершении недельной кинетики (см. рис. 27 а, б).

Настойки, приготовленные на 96% этиловом спирте (сырье:экстрагент 1:5) содержат частицы как в нано-, так и субмикронном диапазоне размеров, высокие значения PDI (около 1,0) указывают на полидисперсность образца. Однако, недельная кинетика продемонстрировала исчезновение частиц с $d \leq 100$ нм. Обращает на себя внимание значение электрокинетического потенциала, близкого к нулю. Исключение составляет образец настойки, приготовленного на 40% экстрагенте в соотношении 1:5: $\bar{\xi} = -52$ мВ и 3-кратным падением через 7 дней (рис.28).

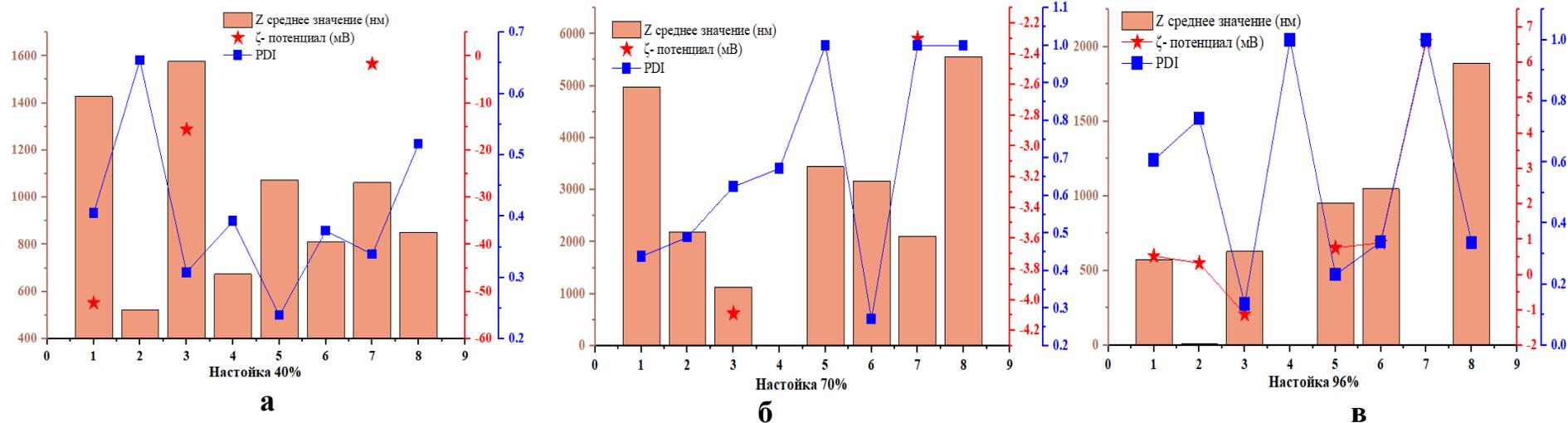


Рисунок 28. Значение среднего диаметра частиц (Z-Average), PDI и дзета-потенциал в образцах настоек, приготовленных на этиловом спирте 40% (а), 70% (б), 96% (в).

На ОХ – соотношение сырье:экстрагент (1:5 и 1:10), фильтрация через Millex-GS и недельная кинетика: 1-1:5, 2-1:5, ФН, 3-1:5, недельная кинетика; 4-:5, ФН, недельная кинетика; 5-1:10; 6-1:10, ФН; 7-1:10, недельная кинетика; 8-1:10, ФН, недельная кинетика; $\bar{X} \pm SD$, n = 3.

Дисперсный анализ методом лазерной дифракции света

Методом LALLS показано, что все образцы настоек представлены частицами дисперсной фазы с размерами от 30 до 160 μm , сохраняющие свои размеры, также, после пропускания через фильтрующую насадку Millex-GS (рис. 29).

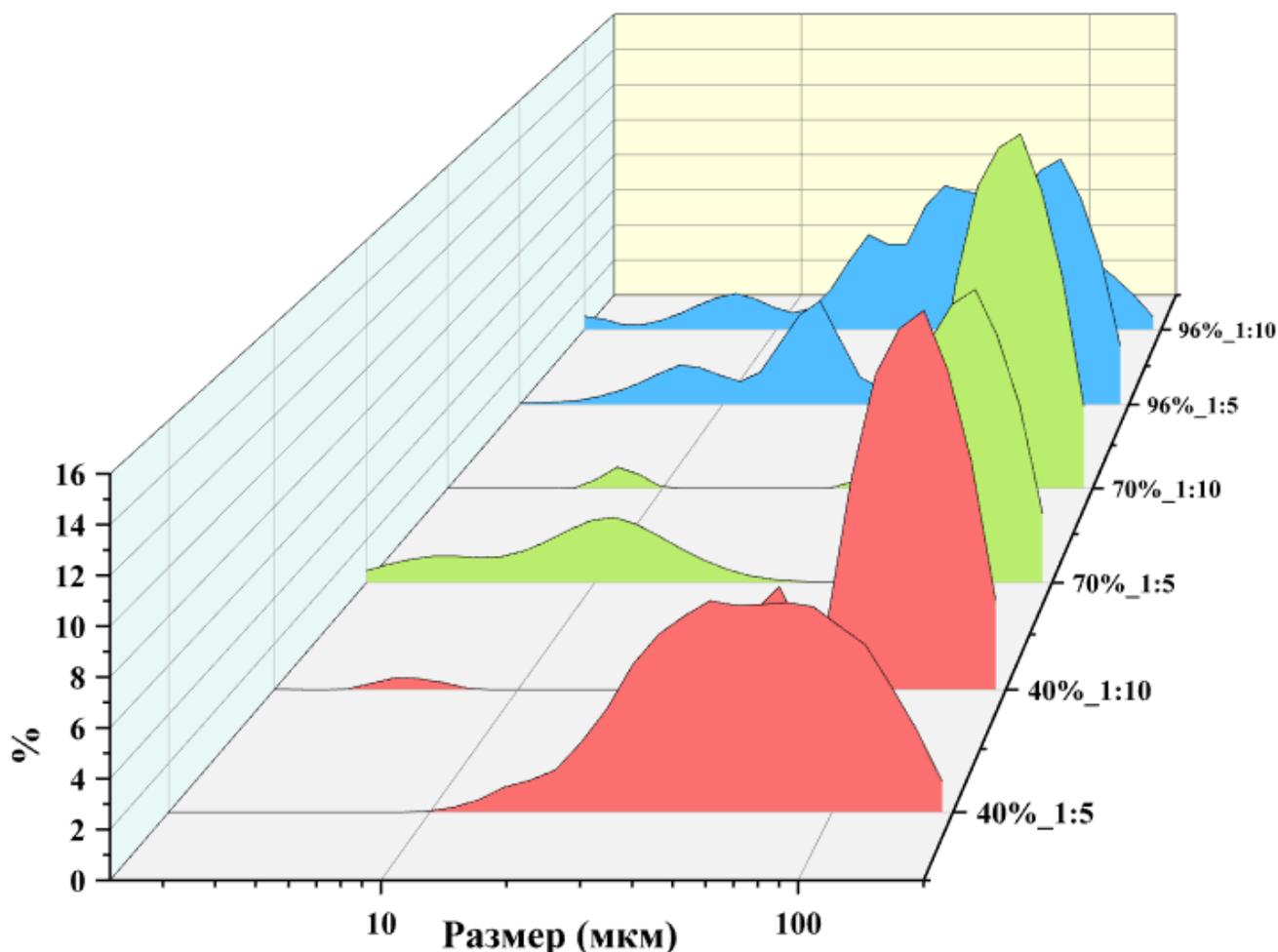


Рисунок 29. Распределение частиц по размерам в образцах настоек с различной концентрацией экстрагента и соотношением сырье:экстрагент $\bar{X} \pm SD$, $n = 3$.

Настойка, приготовленная на 40% этиловом спирте (1:5) содержит частицы диаметром 37-104 μm , объемная доля которого составляет около 65%. Тогда как, настойка 1:10 содержала частицы диаметром 77-162 μm , объемная доля которого

составляет около 80%. Для настоек, приготовленных на 70% этаноле, лазерное затемнение и объемная концентрация в несколько раз выше при соотношении 1:10, по сравнению с соотношением 1:5. Значительную долю объема (8-10%) в обеих настойках составляли частицы диаметром 77-162 μm . Объемная доля микронных агрегатов в настойке, приготовленной на 96% этаноле, распределена в области 89 - 121 μm (рис. 30).

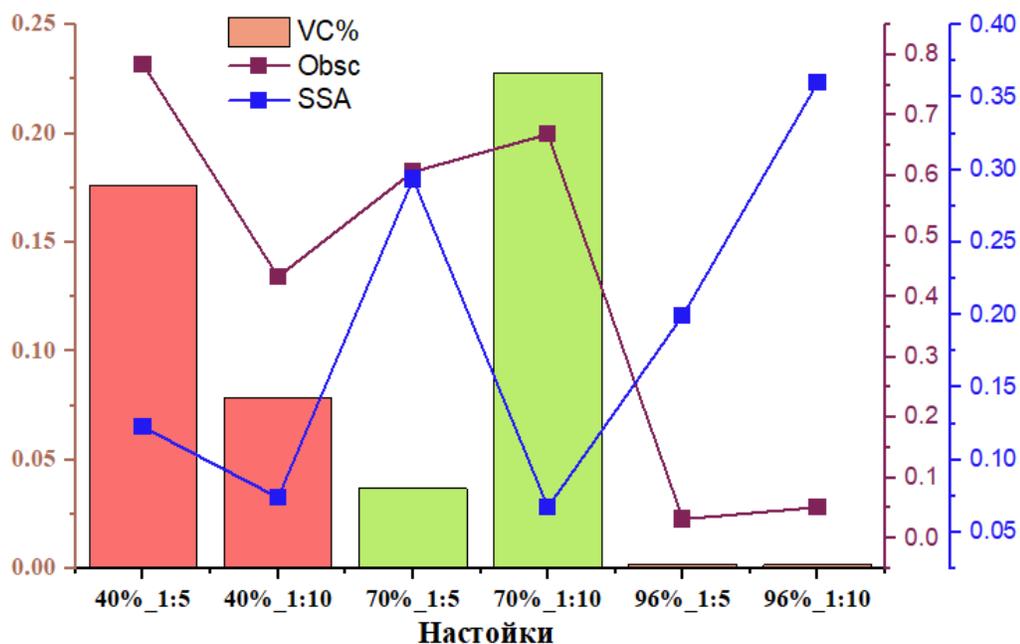


Рисунок 30. Интегральные характеристики дисперсности образцов настоек: объемная концентрация (VC,%), лазерное светорассеяние (Obscuration), удельная площадь поверхности частиц (ssa, m^2/cm^3) в образцах настоек с различной концентрацией экстрагента и соотношением сырье:экстрагент $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 3$.

Полученные результаты демонстрируют, что метод LALLS может быть использован для характеристики полидисперсности настоек ЛРС дерезы обыкновенной

Влияние разбавления настоек на их стабильность

Настойки представляют собой концентрированные растительные экстракты, предусматривающие предварительное разведение водой перед применением [140]. Нами было проведено исследование по влиянию разведения на стабильность настоек при хранении по данным метода DLS: спустя 7 дней частицы в нанодиапазоне почти полностью исчезли, однако при предварительном разведении водой 1 мл (20 капель) настойки в 10 мл воды наночастицы появились снова (таблица 11).

Как видно из табличных данных, с увеличением соотношения сырье:экстрагент значения гидродинамического диаметра частиц уменьшаются, в то время как значения PDI увеличиваются. Частицы в настойке, приготовленной на 40% этиловом спирте в соотношении 1:5 до разведения представлены бимодальным распределением с максимумами при 1766 и 5400 нм. После разведения - частицы характеризовались средним диаметром $d=830$ нм, в то время, как значение PDI не изменилось.

В образце настойки на 40% этиловом спирте (1:10) после разбавления водой наблюдалось бимодальное распределение частиц по размерам. Значение PDI увеличилось в два раза, что указывает на изменение дисперсности образца.

Настойки, приготовленные на 70% этиловом спирте (1:5 и 1:10), подвергались изменениям дисперсных свойств после разведения водой в большей мере: средний размер частиц уменьшается десятикратно, с увеличением индекса PDI (см. табл. 11).

Таблица 11: Коллоидная характеристика настоек до и после разведения в воде.

Образец настойки (концентрация экстрагента, соотношение сырье:экстракт)	До разведения в воде			После разведения в воде (1:10)		
	d,nm±SD	Интенсивность лазерного света, %	PDI	d,nm±SD (I, II – размерные группы)	Интенсивность лазерного света, %	PDI
40%, 1:5	1766±500 5400±300	98 2	0,35	830±270	100	0,35
40%,1:10	910±190	100	0,34	I: 790±255 II: 150±30	90 10	0,87
70%,1:5	350±60 3,0±0,5	70 30	0,62	I: 42±12 II:430±17	81 17	0,88
70%,1:10	330±30 2,0±0,2	73 26	1,00	I: 30±9,0 II:620±21	65 16	0,38
96%,1:5	520±85	100	0,13	I:710±170 II: 70±18	59 21	0,48
96%,1:10	-	-	1,00	I:510±1,0 II: 65±15	64 23	0,58

Что касается образцов настойки, приготовленной на 96% этиловом спирте (1:5 и 1:10), наблюдается появление частиц в нанодиапазоне около 70 нм. Значение PDI в обоих случаях показало умеренно монодисперсные растворы.

Для всех образцов настоек, кроме, приготовленных на 70% этиловом спирте (1:10) и 96% этиловом спирте (1:10), наблюдалось увеличение PDI с разведением настойки водой, что может косвенно указывать на изменение полидисперсности [141,142].

Следует отметить, что распределение наночастиц по размерам в коллоидном растворе может изменяться под влиянием объема растворителя и концентрации частиц. Изучение гетерогенных свойств и коллоидной стабильности водных и спиртовых жидких экстрактов из плодов дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum L.*) может представлять интерес для разработки новых перспективных фитопрепаратов.

3.3. Рентгенофлуоресцентный анализ элементного профиля в образцах плодов и водно-спиртовых экстрактов дерезы обыкновенной, интродуцированной в Албании

Для проведения количественного элементного анализа (КЭА) методом энергодисперсионного РФА использовали как исследуемые плоды, высушенные до постоянной массы и предварительно измельчённые, так и приготовленные водно-спиртовые извлечения [143-147].

3.3.1. Определение сухого остатка

Потеря в массе исследуемого образца дерезы обыкновенной, проводимая в соответствии с ОФС.1.2.1.0010.15 в течение 4 ч при температуре 75°C, определена по формуле (11) и составила $X=11,5\%$. Определение сухого вещества в жидкой пробе позволяет получить более точное представление о химическом составе анализируемого материала и сравнить различные образцы с аналогичными физико-химическими свойствами [148]. Данный подход широко используется в качестве стандартного для измерения содержания влаги в материалах с высокой влажностью [149].

Методика заключалась в следующем: 2,000 г измельченных плодов помещали в фарфоровую чашку и высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу BINDER FD (Hielkema Testequipment B.V., Тутлинген, Германия). Потеря массы при высушивании (X) в процентах рассчитывалась по формуле:

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100\%, \quad (11)$$

где: m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г; m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г; m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

Полученный по окончании сушки образец представлял собой крупнозернистый, оранжево-красного цвета с приятным сладким ароматом порошок (рис. 31, таблица 12).



(a)



(b)

Рисунок 31. Плоды дерезы обыкновенной (а) цельные плоды (б) после сушки до получения постоянной массы.

Таблица 12. Потеря в массе при высушивании образцов из плодов дерезы обыкновенной.

t, ч	m_1 , Г	m_2 , Г	m_3 , Г	Потеря при высушивании, %
0		123,8770	2,0103	
1		123,7551	1,8881	
2		123,7136	1,8466	
3		123,6932	1,8262	
4		123,6695	1,8025	
5		123,6548	1,7878	
6	121,8670	123,6438	1,7768	11,54%

Потеря в массе за счет воды и летучих веществ составляет 11,54%. Для обеспечения безопасного хранения конечное содержание влаги в продуктах питания должно составлять для плодов менее 20% [150]. Удаление влаги предотвращает рост и размножение микроорганизмов, ответственных за гниение, и уменьшает реакции разрушения, опосредованные влагой. Содержание влаги в плодах дерезы обыкновенной ниже верхнего предела нормы и является одним из признаков того, что плоды стабильны для безопасного хранения.

3.3.2. Определение элементного состава

Согласно [151-153] плоды дерезы обыкновенной отличаются высоким содержанием элементов, таких, как калий, кальций, магний, фосфор, железо, цинк, медь и селен. Для исследования элементного состава образцов был применен рентгенофлуоресцентный спектрофотометр Shimadzu EDX-7000 без предварительной минерализации. В качестве стандартного эталонного материала использовалась образец NIST SRM 2976, изготовленный в MEL IAEA (МАГАТЭ) и аттестованный Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, USA) [152]. Концентрацию каждого элемента в высушенных плодах дерезы обыкновенной рассчитывали по формуле (12):

$$C_{\text{образец}} = C_{\text{стандарт}} \cdot \frac{I_{\text{образец}}}{I_{\text{стандарт}}}, \quad (12)$$

где $C_{\text{образец}}$ – концентрация элемента в растении (мкг/г), $C_{\text{стандарт}}$ – концентрация элемента в стандарте (мкг/г), $I_{\text{образец}}$ и $I_{\text{стандарт}}$ – интенсивность флуоресценции.

На рисунке 32 представлен элементный профиль высушенного образца исследуемых плодов *L. barbarum* L.

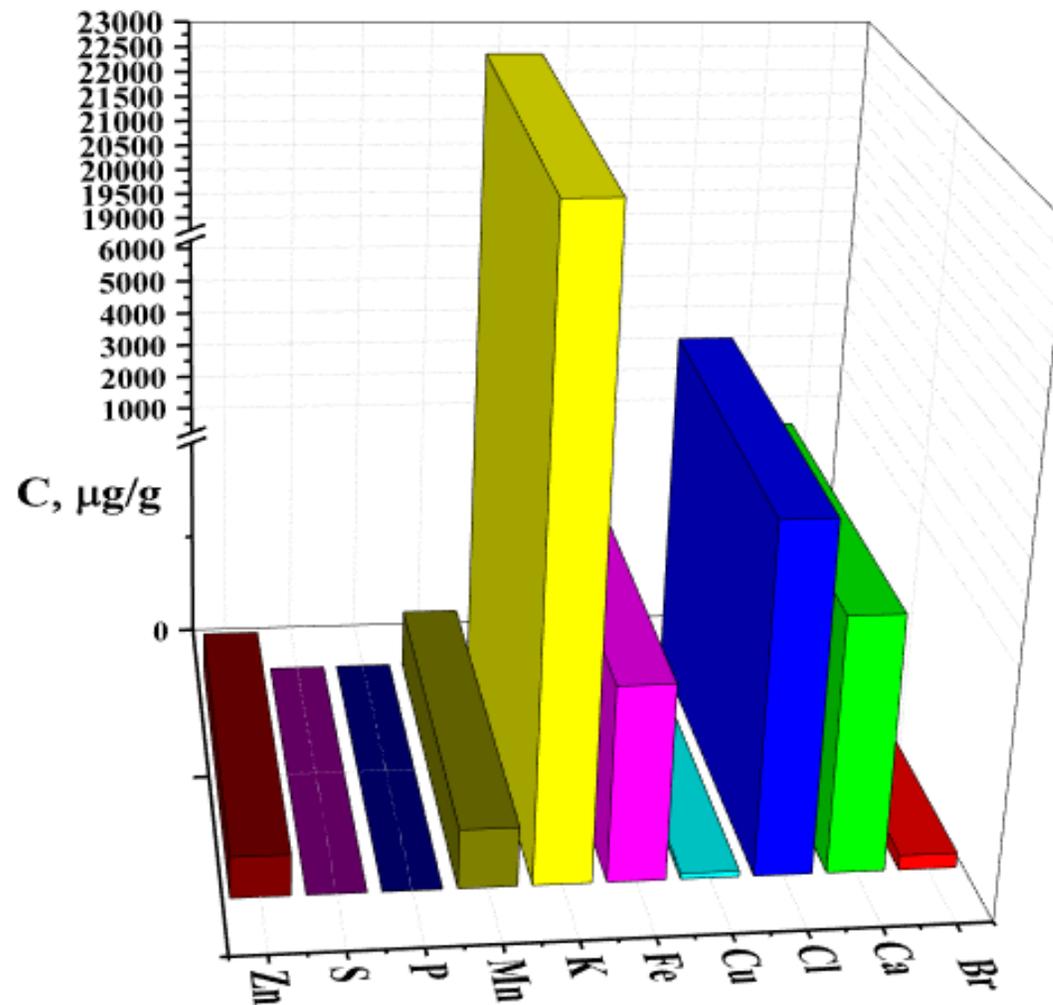


Рисунок 32. Элементный профиль образцах высушенных плодов дерезы обыкновенной (n=3).

Полученный результат демонстрирует разделение биологически значимых элементов, обнаруженных в высушенном сырье *L. barbarum* L., на две группы. Первая группа – Cu, Fe, Mn, Zn – элементы 3d-подуровня, принадлежащие к эссенциальным (жизненно необходимые для человека) и микробиогенным элементам, обеспечивающие в растениях метаболическую функцию, фотосинтез, а также азотный обмен. Мажорным по содержанию из данной группы является только Fe (185 мкг/г), что, согласно [153], является оптимальным с точки зрения отсутствия морфологической и физиологической токсичности для растения. Вторая группа – Ca, Cl, K, P, S – макробиогенные элементы. Обращает на себя внимание высокое содержание K (22,8 мг/г), согласующегося с результатами [154]. Калий является важным для роста и питания растения макроэлементом, входящим в группу транспортных белков.

Следующим этапом было исследование элементного состава различных экстрактов из плодов дерезы обыкновенной – настоев, отваров и настоек. Экстракты были приготовлены так, как описано в главе 3.2.1. с различным временем настаивания, а также с последующей сушкой до постоянного массы.

Количественный элементный анализ (КЭА) четырех образцов настоев с различным временем настаивания продемонстрировал содержание калий в качестве мажорного элемента, однако, в меньшей концентрации в сравнении с высушенными плодами (рис. 33).

В процессе экстрагирования в воду из плодов переходит лишь незначительное количество элементов: Zn, Fe, Cu, S. В настой при $t=15$ мин цинк является преобладающим элементом с концентрацией 430 мкг/г. В других настоях его концентрация снижается. Концентрация ионов Cl^- составляет около 200 мкг/г в образцах при $t=60$ и 90 мин. Все остальные элементы находятся в незначительных концентрациях (см. рис. 32).

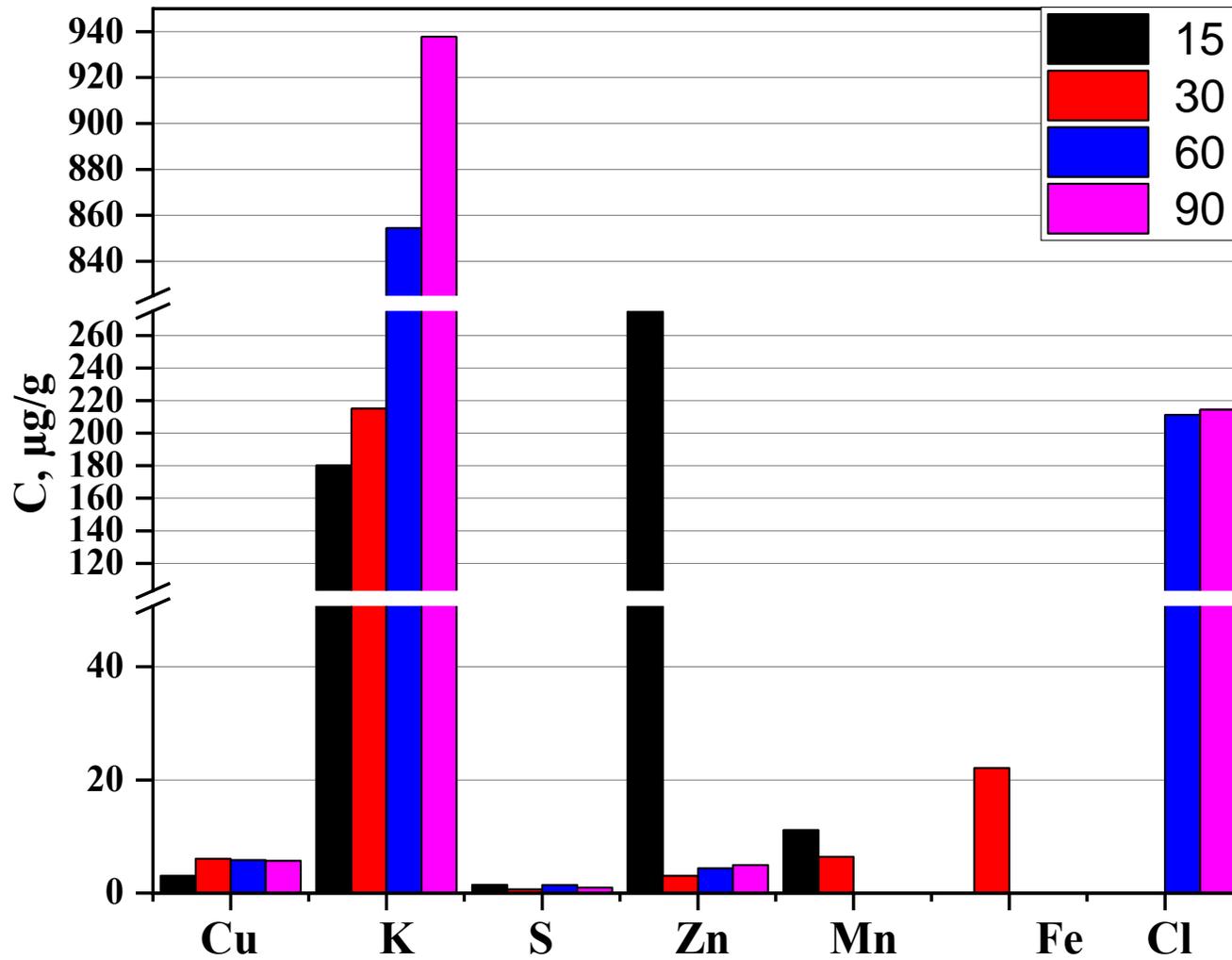


Рисунок 33. Элементный профиль в образцах настоев из плодов дерезы обыкновенной *L. barbarum* L. На вставке – время настаивания t , мин ($n=3$).

Отвары являются еще одним видом экстрактов, представляющих интерес, поскольку плоды дерезы обыкновенной часто принимают в виде отвара в китайской медицине. Отвары были приготовлены так, как описано в 3.2.1. при различном времени настаивания, а также были высушены до постоянной массы (рис. 34).



Рисунок 34. Остаток после высушивания в образцах отваров из дерезы обыкновенной (слева направо - время настаивания при $t=15, 30, 45$ и 60 мин.

Остаток после высушивания образцов отваров характеризовались разной интенсивностью окраски, что может косвенно указывать на различия в КЭА.

Во всех отварах преобладает калий - около $23\ 000$ мкг/г, его значение сравнимо с содержанием в высушенном сырье плодов дерезы обыкновенной (см. рис. 28). Практически весь калий, содержащийся в плодах, переходит в водный раствор. Другие элементы, присутствующие в отваре: хлор ($Cl \sim 5000$ мкг/г), кальций ($Ca \sim 1300$ мкг/г), фосфат ($P \sim 2500$ мкг/г) и бром ($Br - 17 - 560$ мкг/г). По сравнению с высушенными плодами, концентрация фосфора и брома в отваре при времени настаивания $t=90$ мин значительно более высокая [155-156].

Существует также явное различие между настоями и отварами (рис. 35).

Анализ настоек показывает такую же ситуацию, как и в случае с настоями, в которых калий является преобладающим элементом, но в действительно низких концентрациях по сравнению с высушенными плодами или отваром (рис. 36).

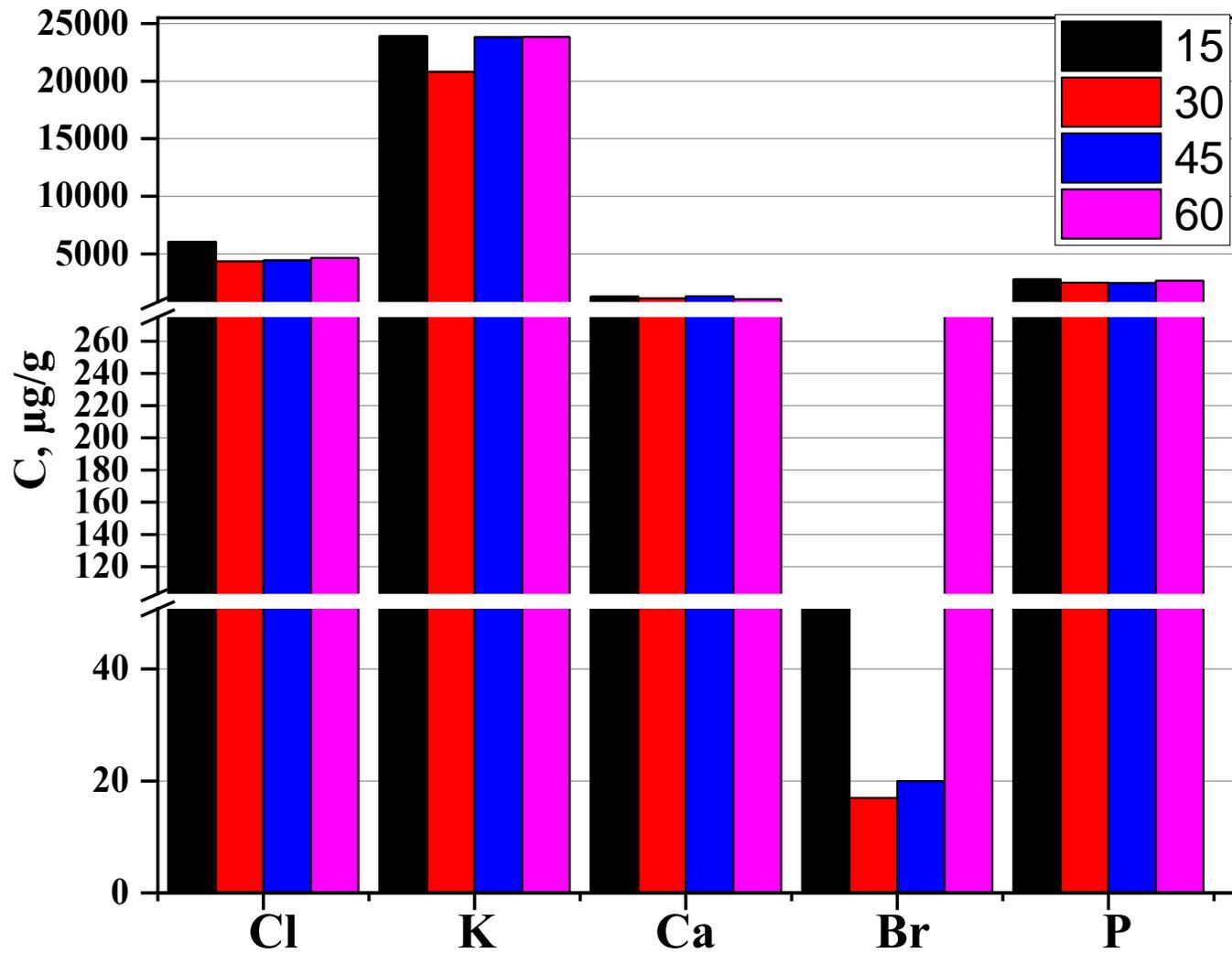


Рисунок 35. Элементный профиль в образцах отваров из плодов дерезы обыкновенной *L. barbarum* L. На вставке – время настаивания t , мин ($n=3$).

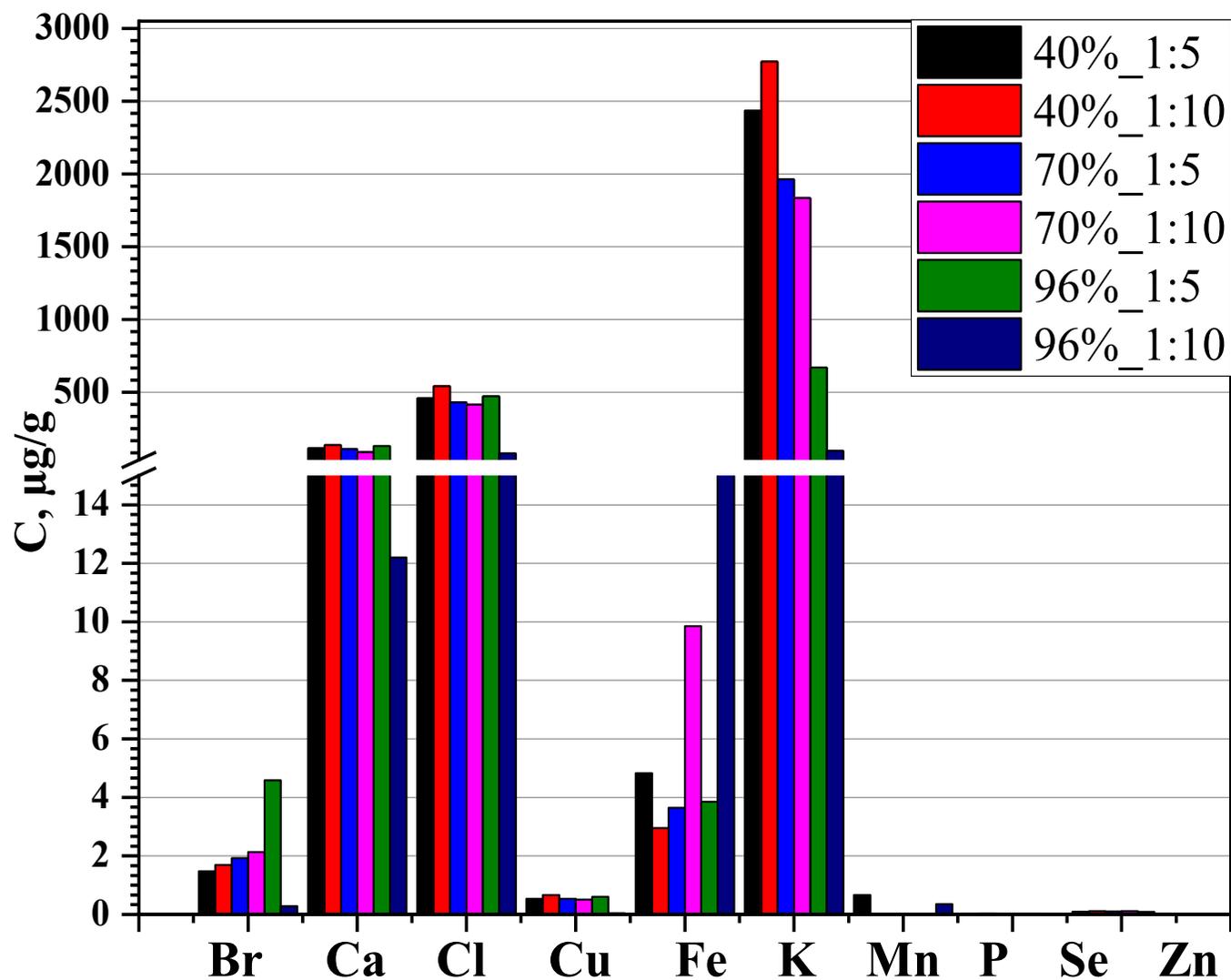


Рисунок 36. Элементный профиль в образцах настоек из плодов дерезы обыкновенной *L. barbarum* L. На вставке – концентрация спирта и разведения (n=3).

Как видно из представленных рисунков – отвары, водные и спиртовые извлечения характеризуются разным качественным и количественным элементным составом: наиболее полно представлены группы макро- и микробиогенных элементов в спиртовых настойках, однако по содержанию (С, $\mu\text{г/г}$) элементов лидируют водные извлечения. В отваре (время настаивания $t=15$ мин) обнаружено наибольшее содержание Zn ($274 \mu\text{г/г}$), превышающее другие растительные лидеры, например, семена тыквы. Обращает на себя внимание тот факт, что содержание К – мажорного макроэлемента, необходимого для поддержания нормального мембранного потенциала покоя клеток, в высушенных плодах дерезы обыкновенной сопоставимо с образцами настоев (24 мг/г) вне зависимости от времени их настаивания.

Таким образом, описанный элементный профиль высушенных плодов *L. barbarum* L. может выступать в качестве образца сравнения при проведении стандартизации дерезы обыкновенной, интродуцированной в Западной Албании.

3.4. Разработка оптимальных способов выделения инулина - пребиотика группы фруктозанов из плодов дерезы обыкновенной (*L. barbarum* L.)

Инулин (INU) - невосстанавливающий полисахарид из 35–42 остатков D-фруктофураноз, соединенных β -1,2-связью, полуацетальным гидроксилем с D-глюкопиранозой, выполняющий в растениях функцию резервного углевода. Относится к группе пищевых волокон, улучшающих микробиом кишечника (рис. 37).

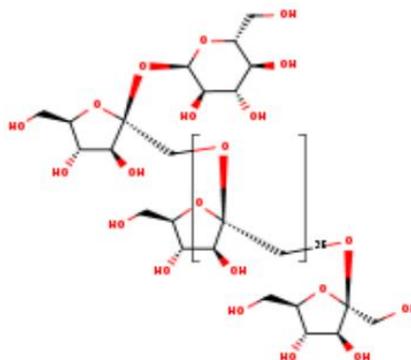


Рисунок 37. Структура инулина [157].

Фруктозаны инулинового типа с β -2 \rightarrow 1 гликозидной связью не усваиваются в тонком кишечнике человека из-за β -конфигурации аномерного углерода. Они ферментируются микрофлорой толстого кишечника, проявляя таким образом бифидогенную природу или пребиотический эффект [156].

Инулин улучшает вкусовые качества пищи, а также обладает различными физиологическими функциями, такими как снижение уровня сахара и жира в крови, включая холестерин и триглицериды [157-159].

Ранее нами было установлено содержание суммы фруктозанов и фруктозы в плодах дерезы $20,6 \pm 0,7$ % (см. 3.1.3.), следовательно, исследуемые плоды дерезы, интродуцированные в Албании, можно считать богатым источником фруктозанов.

3.4.1. Выделение и очистка инулина

Известно, что растворимость инулина в воде увеличивается с повышением температуры [160], следовательно, процесс производства инулина должен быть основан на извлечении горячей водой при условиях: $t=60$ мин и $T \sim 100^\circ\text{C}$.

Изучение литературы [160-164] с описанием различных методов экстракции с извлечением инулина, позволило нам отобрать три доступных метода экстракции и два метода очистки (рис. 38).

Метод 1. Около 50 г плодов экстрагировали в течение 1 часа при 80°C , экстракцию повторяли дважды. Полученный экстракт отфильтровывали и выпарили до $1/3$ объема. Полисахариды в растворе осаждали пятикратным объемом 96% этилового спирта, отфильтровывали и высушивали при комнатной температуре с последующей очисткой. Очистка включала в себя следующие этапы: растворение осадка в горячей воде в соотношении 1:5, добавление натрия карбоната при $T=80^\circ\text{C}$, экстракцию в течение 60 мин и фильтрование. К полученному фильтрату добавляли алюминия оксид, нагревали при 75°C при непрерывном перемешивании в течение 30 мин и вновь фильтровали. Надосадочную жидкость концентрировали, охлаждали и обрабатывали 96% этиловым спиртом при соотношении концентрат:этанол (1:3).

Плоды дерезы обыкновенной

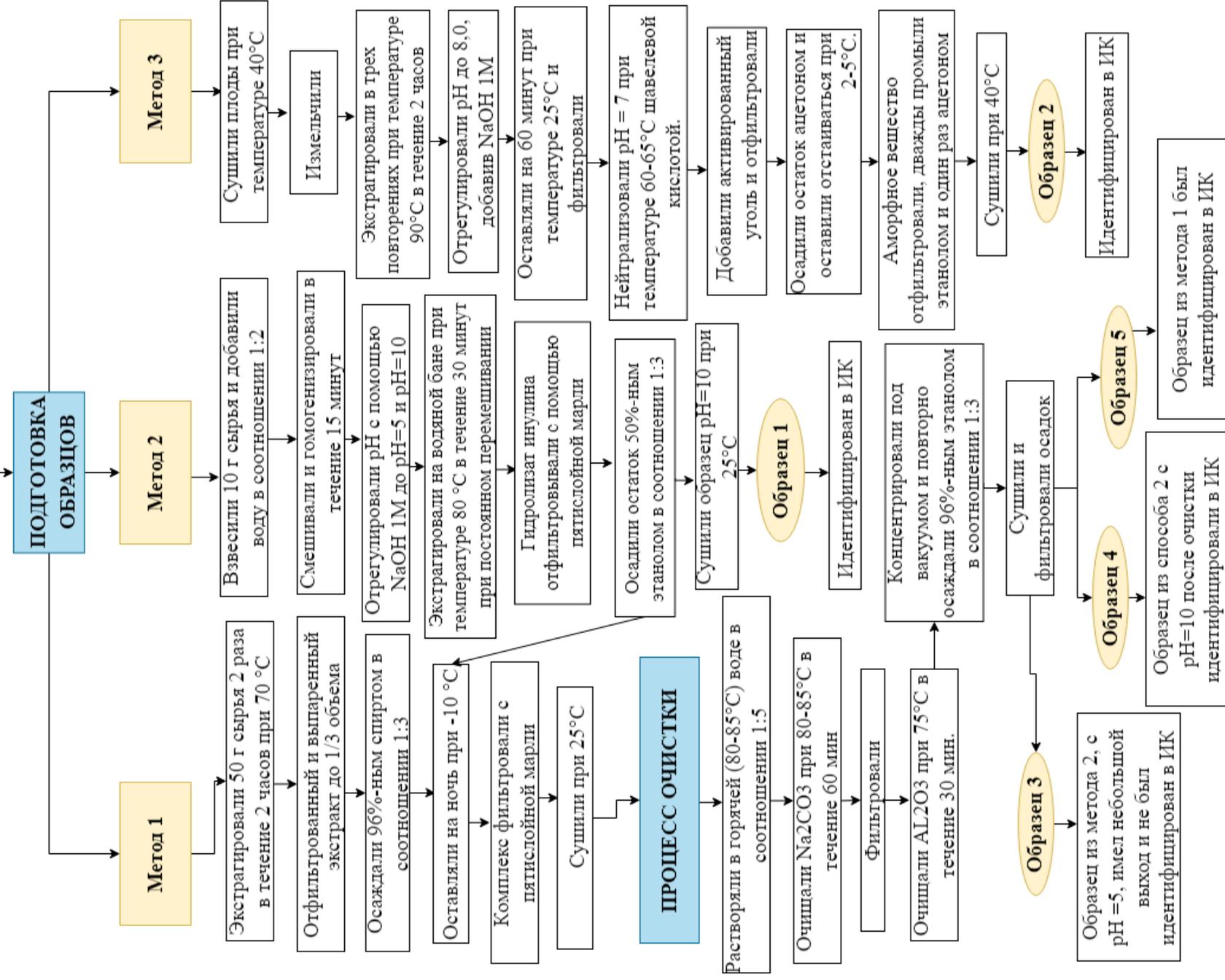


Рисунок 38. Схема выделения и очистки инулина

Осадок фильтровали, промывали холодной дистиллированной водой и высушивали (см. рис. 38, образец 5). Карбонат натрия использовали для разрушения комплекса инулин-пектин, для коагуляции белков без разрушения инулина. Оксид алюминия был добавлен для поглощения примесей, таких как фенолы, полифенолы и продукты их окисления. Метод очистки не потребовал дорогостоящих материалов и оказался простым [163].

Метод 2. Для второго метода плоды дерезы обыкновенной сортировали и добавляли воду в соотношении 1:2, смешивали и гомогенизировали в течение 15 минут, затем доводили до pH 5 (контроль) и pH=10 1моль/л раствором NaOH. Процесс экстракции проводили на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 минут, непрерывно перемешивая. Гидролизат инулина фильтровали через пятислойную марлю, добавляли этиловый спирт и оставляли на 18 часов при $T = -10^{\circ}\text{C}$, а затем фильтровали (см. рис. 34 образец 1). Остальные образцы (см. рис.38 образцы 3 и 5), полученные этим методом, были очищены карбонатом натрия и оксидом алюминия, как описано выше (см. Метод 1) [164].

Метод 3. Плоды дерезы обыкновенной промывали водой, высушивали при 40°C в вакуумной камере, измельчали и экстрагировали горячей водой в соотношении 1:2 с обратным холодильником в течение 30 минут. Экстракцию повторили три раза, фильтраты смешали. pH доводили до 8,0 с помощью 1моль/л раствором NaOH и оставляли смесь при комнатной температуре на 1 час с последующим фильтрованием и нейтрализацией до pH 7 щавелевой кислотой при температуре 60-65°C. Прибавляли активированный уголь и снова фильтровали. Активированный уголь добавляли для обесцвечивания экстракта, удаления пигментов и растворимых примесей. Остатки отфильтровывали, осаждали ацетоном и оставляли на ночь при температуре $T=2-5^{\circ}\text{C}$. Аморфное вещество фильтровали, дважды промывали этиловым спиртом, ацетоном и, наконец, высушивали при 40°C (см. рис. 38 Образец 2) [165].

Высушенные образцы инулина измельчались до мелкодисперсного порошка и сохранялись в сухих контейнерах. В дальнейшем их анализировали с применением

различных методов, таковых как ИК-спектроскопия, УФ-видимая спектроскопия, поляриметрия и другие.

3.4.2. Описание субстанции

Внешний вид. Используя разные методы экстракции и очистки, были получены 5 разных образцов инулина. Визуальная оценка показала, что образец 1 представлял собой красный аморфный порошок без запаха со тенденцией к грануляции. Образец 2 характеризовался, как черный гранулированный порошок с высокой пористостью, без запаха. Выход образца 3 был низким, поэтому не подвергался дальнейшему анализу. Образец 4 имел коричневатый цвет, с низкой склонностью к гранулированию, без запаха. Образец 5 имел красно-черный цвет, с крупными бесформенными частицами, без запаха (рис. 39).

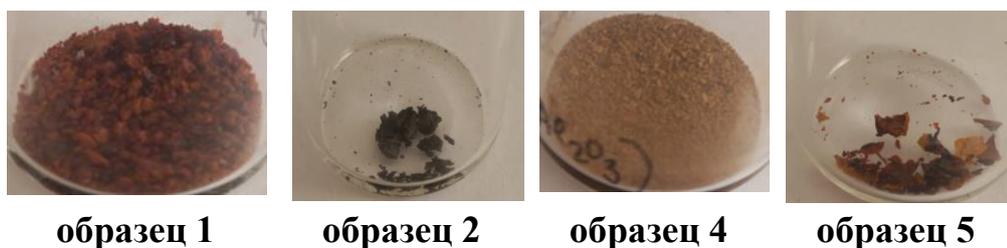
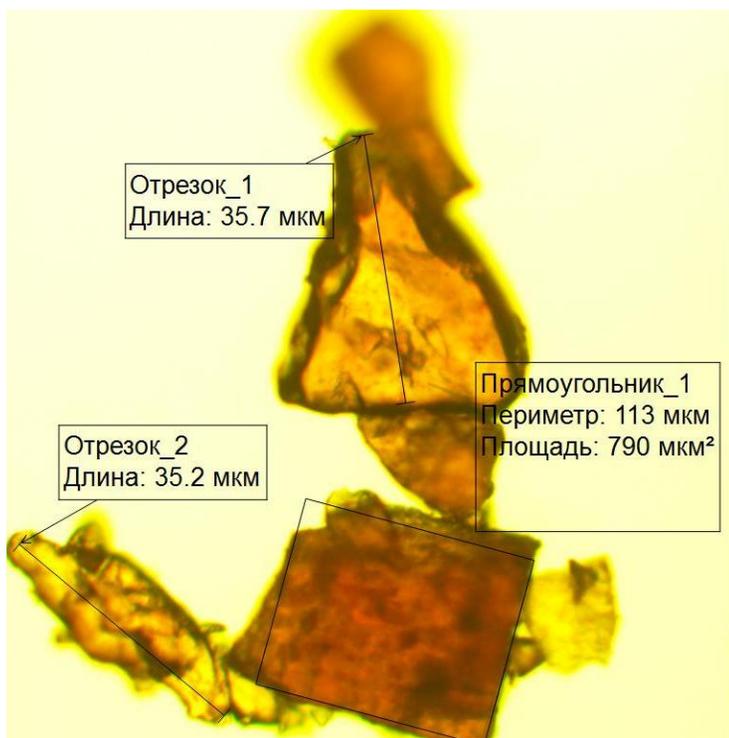


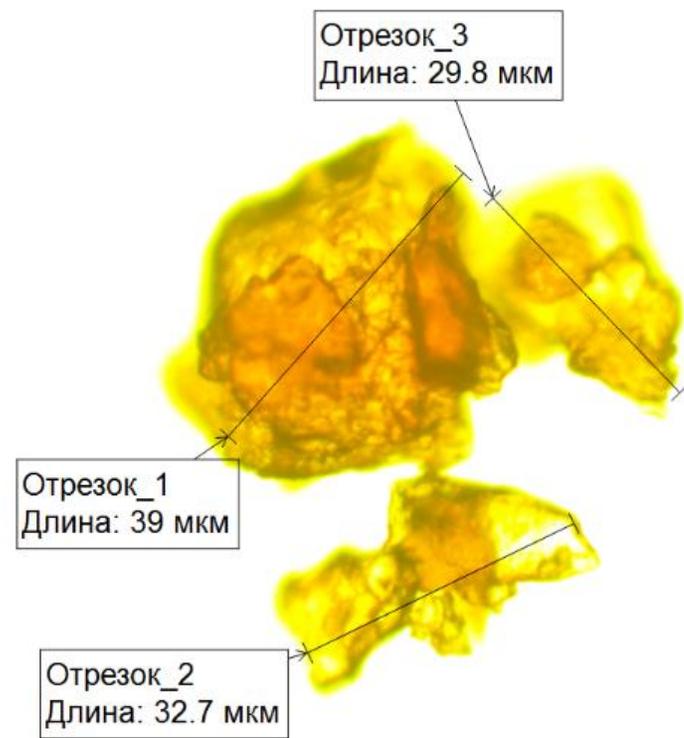
Рисунок 39. Инулин, извлекаемый и очищаемый различными способами.

Размер и форма частиц. Дисперсность лекарственных веществ напрямую связана с их терапевтическим эффектом. Чем мельче частицы лекарственного вещества, тем больше поверхностная энергия, тем легче оно растворяется в биологических жидкостях и всасывается для достижения эффекта. Показатель “Размер частиц” лекарства определяет фракционное распределение частиц разного размера, является показателем его качества и функциональных свойств, а также подтверждает, что лекарство произведено с использованием точной технологии [166].

В результате микроскопического исследования было обнаружено, что образец инулина содержит несколько типов кристаллов с различными размерами и формами частиц (рис. 40).



а



б

Рисунок 40. Морфология частиц образца 4 инулина.

Морфология инулина была довольно неоднородной и включала множество различных форм с размерами 30-40 мкм. Также были обнаружены крупные квадратные частицы (размером около 28 мкм × 28 мкм) с шероховатой поверхностью. Более крупный размер частиц порошка инулина, возможно, вызван гигроскопичностью порошка из-за более высокого содержания низкомолекулярных сахаров, в результате чего образовались некоторые агломераты с пористой структурой [167-168].

Растворимость фармацевтической субстанции является важной характеристикой, которая определяет чистоту, скорость высвобождения, абсорбцию и эффективность активного фармацевтического ингредиента [169]. Проведена оценка растворимости образцов 1, 2, 4 и 5 выделенного инулина в воде (таблица 13).

Таблица 13. Растворимость разных образцов инулина

Инулин	Объем растворителя (мл) для растворения 1 г субстанции	Растворимость
Образец 1	> 200	Мало растворим
Образец 2	>10 000	Практически нерастворим
Образец 4	>200	Мало растворим
Образец 5	> 500	Мало растворим

Спектральные характеристики при определении подлинности инулина

ИК-спектроскопия (НПВО)

Углеводы имеют несколько специфических функциональных групп: ОН-группы и связи С-О, С-С и С-Н в углеродном скелете [170]. ИК-спектры образцов инулина можно разделить на три характерных спектральных области: от 3600 до 1550, от 1500 до 1000 см⁻¹ и менее 900 см⁻¹ - область «отпечатков пальцев (рис. 41, 42).

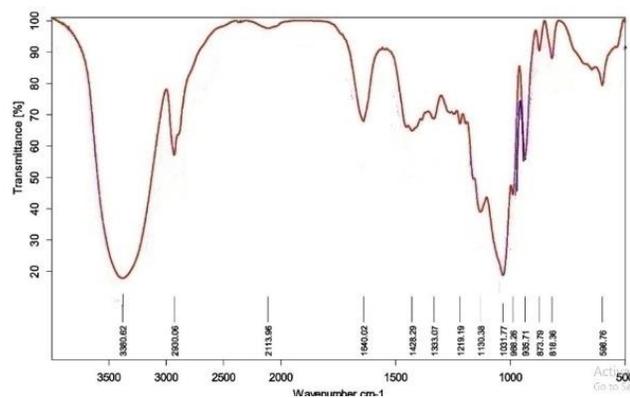
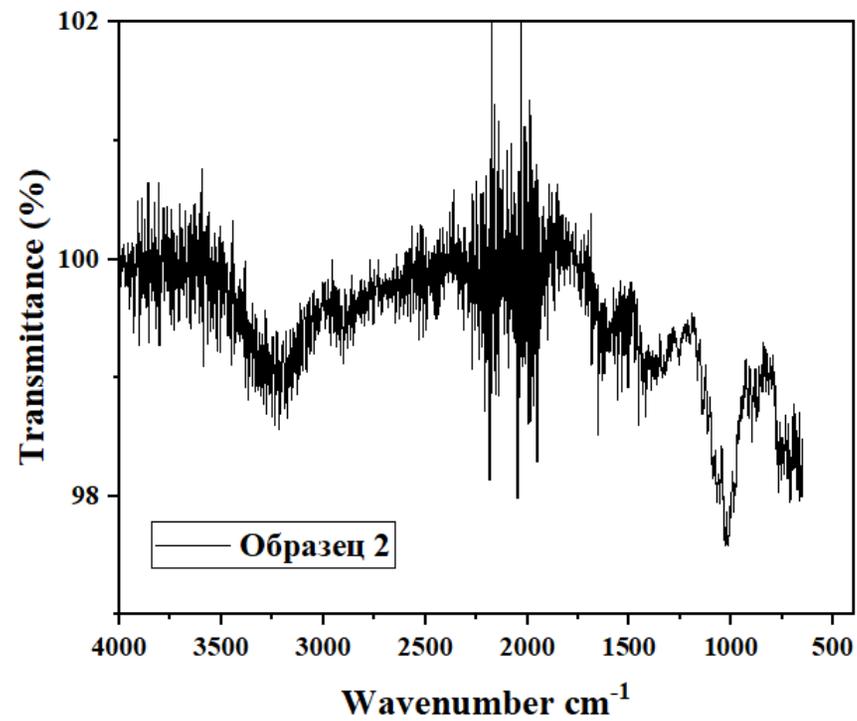
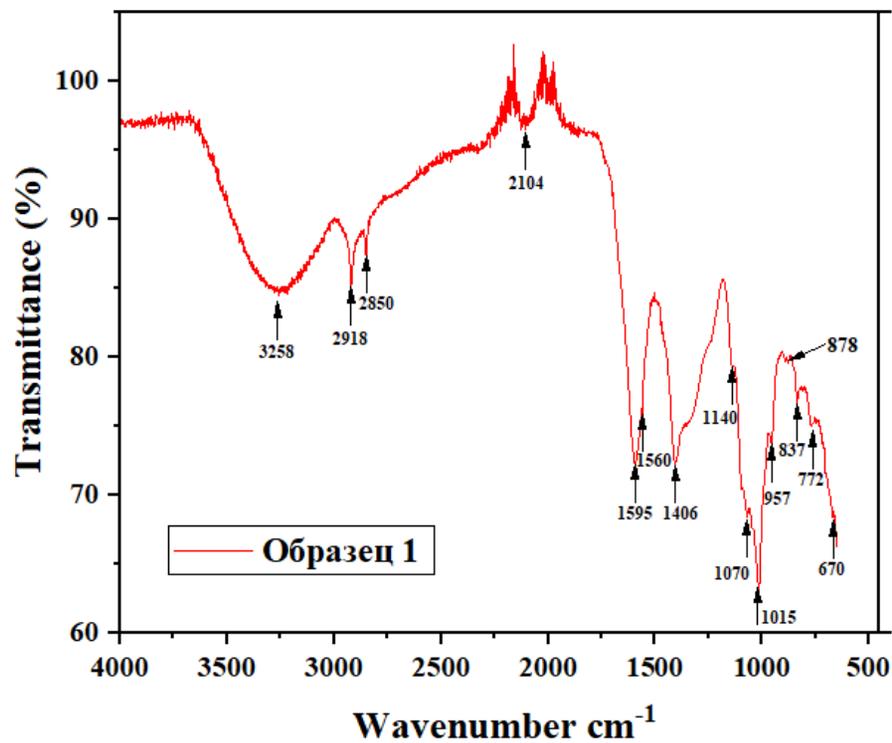


Рисунок 41. ИК-спектры образцов инулина 1, 2 и стандарта инулина (Sigma).

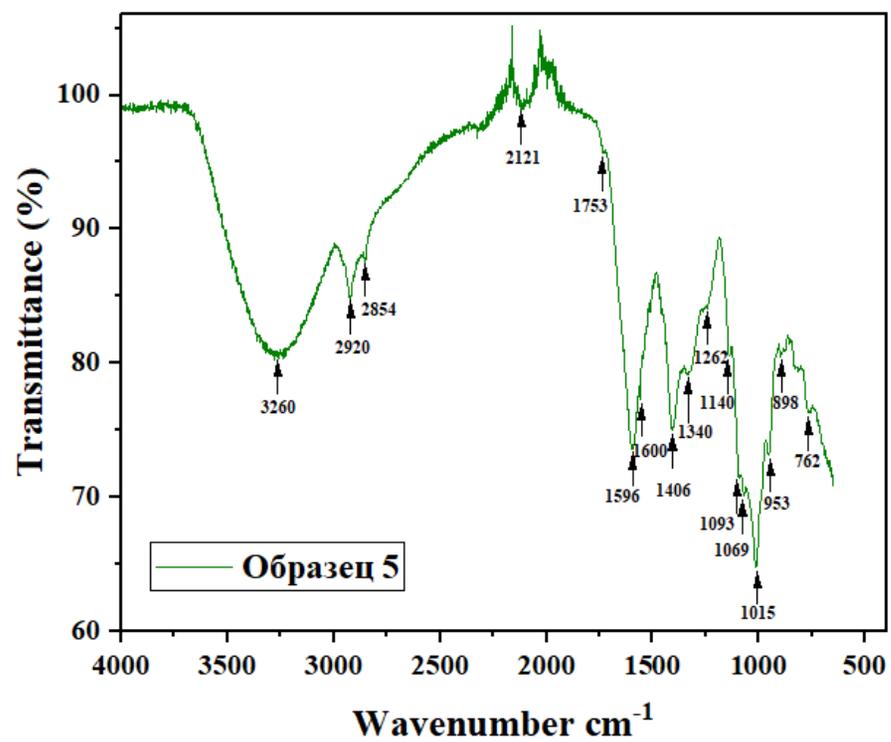
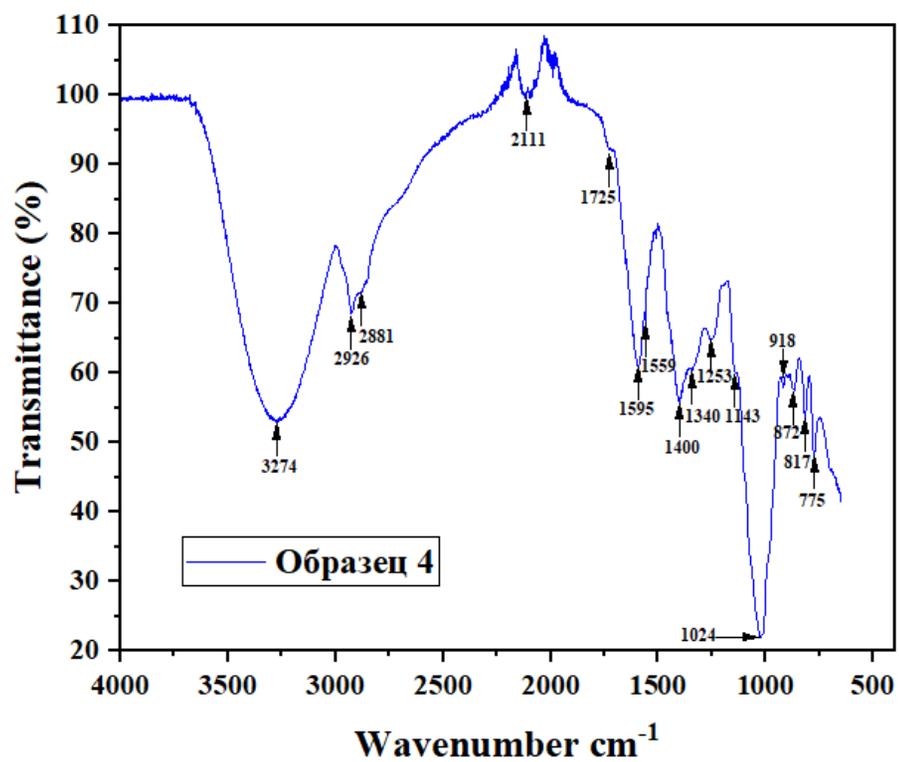


Рисунок 42. ИК-спектры образцов инулина 4 и 5.

В области 3000-2700 см^{-1} появляется резкая полоса со средней интенсивностью около 2918, 2961, 2920 см^{-1} (образцы 1, 4 и 5 соответственно), относящаяся к валентной вибрации CH_2 асимметричного растяжения CH_2 . Основные широкие пики поглощения около 3260 см^{-1} были вызваны связями O-H и N-H [171]. Область 1500 и 900 см^{-1} имеет последовательность интенсивных пиков, в основном благодаря сильно связанным режимам растяжения C-C , C-O и C-O-H , C-O-C деформации различных олиго- и полисахаридов, указывает на высокое содержание общих нерастворимых углеводов [172]. Максимум поглощения при 1725 и 1753 см^{-1} для образцов 4 и 5 соответственно, вероятно, обусловлен карбонильной группой C=O [173]. Полоса при 1600-1400 см^{-1} указывала на присутствие этерифицированных карбоксильных групп [174]. Максимум около 1603 см^{-1} , возможно, обусловлен поглощением функциональных групп примесного вещества лигнина. Максимум при 1560 см^{-1} обусловлен C=O -растяжением $-\text{NHCOCH}_3-$ в полисахаридах [172]. Спектральные полосы около 1340 см^{-1} и 1406 см^{-1} могут быть отнесены к колебаниям при изгибе в плоскости и внутренним деформациям групп CH , CH_2 и OH из фруктозного кольца. Полоса поглощения при 1340-1250 см^{-1} , показывающая небольшое содержание этерифицированных карбоксильных и гидроксильных групп, указывают на присутствие пектина и/или лигнина [174]. Спектральные полосы около 1140, 1070 и 1030 см^{-1} обусловлены валентными колебаниями растяжения связей C-O и C-O-C между мономерами и растяжением инулинового пиранозного кольца.

В области менее 900 см^{-1} образуется множество характерных полос поглощения, которые полезны для конформационных исследований углеводов. Предыдущие исследования спектров показали, что инулин в корнях топинамбура или цикория можно идентифицировать по отдельной, резкой и характерной полосе при 936 см^{-1} . Этот пик не идентифицирован в инулине, экстрагированном из плодов дерезы обыкновенной, но был смещен на 918 или 953 см^{-1} , что может указывать на остаток $\alpha\text{-D-GlcP}$ в цепи [175]. Полосы при 878, 872 и 898 см^{-1} (образцы 1, 4, 5 соответственно) и 837 и 817 см^{-1} (образцы 1 и 4) подтвердили колебание кольца

CH₂ β-аномера и присутствие 2-кетофуранозы, другими словами, подтвердили присутствие β-(2→1) гликозидные связи [176-177].

Характерные полосы поглощения при 670 см⁻¹ представляют собой пиранозные кольца в полимерной цепи, а также являются характеристиками вибрации биомолекулы при растяжении связей [177] (таблица 14).

Таблица 14. Основные полосы поглощения в ИК-спектре образцов инулина.

Волновое число, см ⁻¹ *			Тип колебаний, функциональная группа
Образец 1	Образец 4	Образец 5	
3258	3274	3260	ν _{O-H} (ОН); межмолекулярные Н-связи
2918	2961	2920	ν _{C-H} как (CH ₂)
2850	2881	2854	ν _{C-H} как (CH ₂)
-	1725	1753	Карбонильное С=О растяжение ацетильных групп гемицеллюлозы
1595	1595	1596	О-С-О асимметричное растяжение
1560	1559	-	С=О растяжение -NHCOCH ₃ - в полисахаридах
1406	1400	1406	δ _{C-H} как (CH ₂)
-	1340	1340	β _{O-H} (ОН)
-	1253	1262	С-О вибрация растяжения ацетильной группы в лигнине
1140	1143	1140	ν _{C-O-C} как (C-O-C)
1070	-	1069	ν _{C-O} (C-O)
1015	1024	1015	ν _{C-O} (C-O)
957	918	953	остаток α-D-Glcp в углеводной цепи
878	872	898	Аномерные сгибы δ(C1-H), вибрация кольца (2-кетофураноза)
837	817	-	2-ketose
772	775	762	
670	-	-	пиранозные кольца

* Образец 2, очищенный активированным углем, не давал воспроизводимого ИК-спектра.

Далее образцы 1, 4 и 5 были проанализированы с применением УФ-спектроскопии и поляриметрии.

УФ-спектроскопия

На рисунке 43 представлены УФ-спектры поглощения водных растворов образцов 1 и 4 инулина.

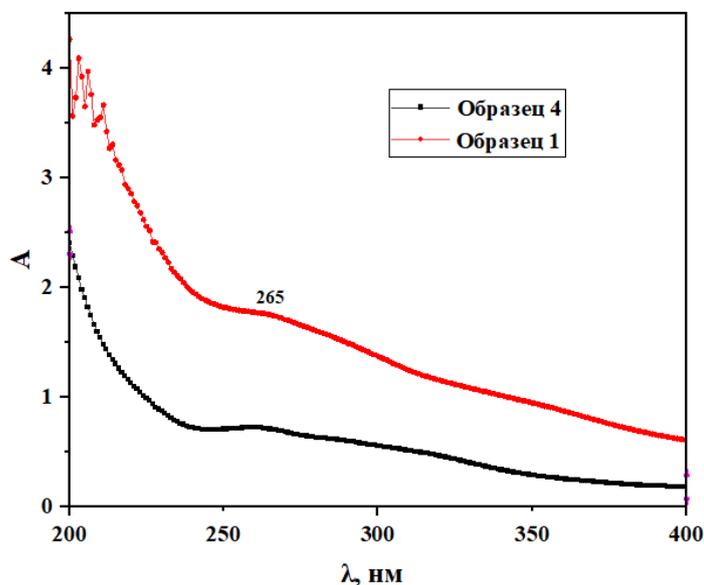


Рисунок 43. УФ-спектры 0,05% водных растворов инулина (образцов 1 и 4).

Видно, что поглощение растворами инулина происходит в области от 190 до 230 нм, что является результатом $n-\sigma^*$ и/или $\pi-\pi^*$ переходов, которые встречаются во многих функциональных группах, таких как амин, карбоксильные, карбонильные и сложные эфиры. Поглощение в диапазоне 260 ~ 280 нм обычно приписывается $\pi-\pi^*$ электронным переходам в ароматических и полиароматических соединениях, обнаруживаемых в большинстве сопряженных молекул, включая белки [178-180].

Эти результаты указывают на то, что инулин, извлеченный из дерезы обыкновенной, представляет собой очень большую и сложную молекулу, содержащую множество групп, поглощающих ультрафиолетовое излучение.

3.4.3. Оценка чистоты и количественный анализ

Для оценки чистоты и качественного определения инулина, экстрагированного из плодов дерезы обыкновенной, использовалась поляриметрия.

Оптическая активность

Инулин представляет собой полимер фруктозы и глюкозы, содержащими хиральные центры (см. рис. 33). Оптическая активность водных растворов инулина (образец 4) показала левое вращение плоскости поляризации, а также линейную зависимость от концентрации (рис. 44).

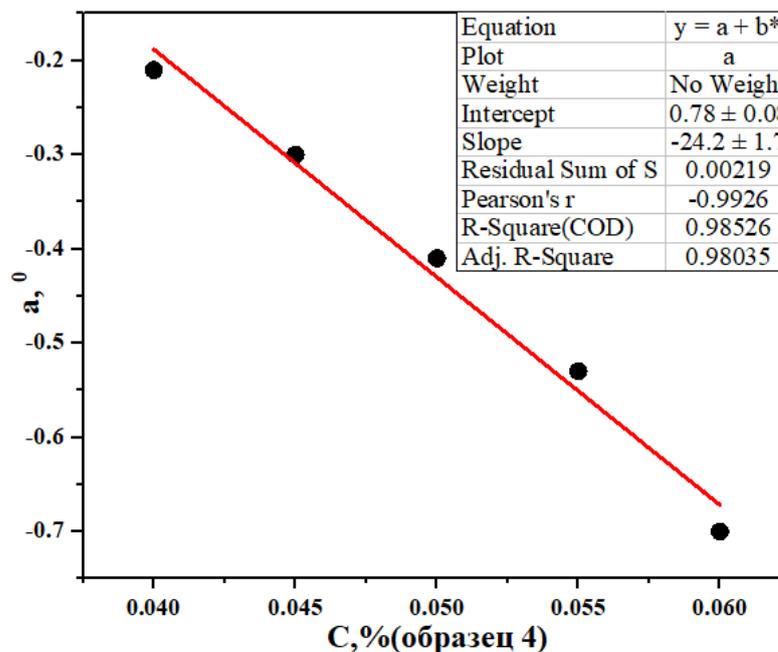


Рисунок 44. Зависимость угла оптического вращения $\alpha, ^\circ$ от концентраций (C%) в водных растворах инулина (образец 4).

Значение удельного вращения, зависящего от природы вещества, рассчитывали по формуле (13):

$$\alpha = \frac{[\alpha]_D^{20} \cdot C, \% \cdot l_{\text{дм}}}{100} \quad (13)$$

где α – измеренный угол вращения, град; l – толщина слоя, дм; c – концентрация раствора, г вещества на 100 мл раствора; $[\alpha]_D^{20}$ – удельное оптическое вращение.

Результаты по исследованию оптической активности водных растворов инулина (образец 4) представлены в таблице 15.

Таблица 15. Оптическая активность водных растворов инулина (образец 4)

C, %	$\alpha, ^\circ$	$[\alpha]_{20}^D [^\circ \cdot \text{мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{дм}^{-1}]$
0,04	-0,21	-525
0,045	-0,30	-666
0,05	-0,41	-820
0,055	-0,53	-963
0,06	-0,70	-1166

Видно, что в области низких концентраций ($\leq 0,1\%$) оптическая активность растворов инулина в воде коррелирует с концентрацией растворов, согласно закону Би́о (см. рис 40). Удельное оптическое вращение водного раствора инулина $[\alpha]_{20}^D$ варьируется от -525 до -1166 $[^\circ \cdot \text{мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{дм}^{-1}]$. Таким образом, прямая зависимость $\alpha, ^\circ$ – C, % (закон Би́о,) в интервале $4 \cdot 10^{-2}$ - $6 \cdot 10^{-2}\%$, $r=0,9920$ позволяет применять поляризацию для контроля качества инулина по показателям «подлинность», «чистота», «количественное определение».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационном исследовании разработаны оригинальные подходы к характеристике плодов дерезы обыкновенной, интродуцированной в Национальном парке Дивьяка-Караваста (Divjake-Karavasta) Западной Албании, на основе фармакохимических исследований. Определены показатели качества плодов дерезы обыкновенной, включающие изучение макроскопических и микроскопических диагностических признаков, определение «маркерных» группы БАВ. Исследован биогеохимический элементный состав сырья и извлечений из плодов дерезы методом РФА, что может быть использовано для идентификации РС по профилю макро- и микроэлементов в плодах и извлечениях.

Подробно охарактеризованы динамические и кинетические показатели дисперсности извлечений РС: диаметр нано- и субмикронных частиц, стабильность во времени. Предложены способы увеличения стабильности путем добавления ПАВ к жидким образцам. Усовершенствованы способы получения перспективного фруктозана – инулина, способного улучшить микробиом кишечника и предложены физико-химические способы его идентификации и количественного определения.

Фармакохимическая характеристика плодов дерезы обыкновенной в сочетании с изучением дисперсных свойств и токсичности извлечений, позволит расширить ассортимент отечественных ЛС растительного происхождения, изготовленных из перспективного сырья.

ВЫВОДЫ

1. Изучены анатомические особенности, проведена оценка качества исследуемых плодов дерезы обыкновенной, а также физико-химических свойства водно-спиртовых извлечений, предоставляющие новые возможности применения в фармации *Lucium barbarum L* - продуцента Западной Албании.

2. Оценка макроскопических признаков и анатомического строения исследуемого РС в сопоставлении с монографией Американской фармакопеи трав, позволяют идентифицировать исследуемое сырье, как плоды дерезы обыкновенной (интродуц.); числовые показатели плодов, экстрактивные вещества присутствуют в количестве, допустимом НД; определено содержание восстанавливающих сахаров ($70,4 \pm 0,5\%$), флавоноидов ($0,11 \pm 0,05\%$), свободных органических кислот ($1,44 \pm 0,06\%$) и аскорбиновой к-ты ($0,244 \pm 0,007\%$), полисахаридов ($20,6 \pm 0,7\%$), дубильных веществ в пересчете на танин ($0,87 \pm 0,1\%$).

3. Методом ФКС показано, что оптимальными условиями для приготовления настоев из плодов дерезы обыкновенной, являются: время настаивания с $t=30$ мин, пропускание через фильтрующую насадку, что дает наилучшие дисперсные характеристики: $d \sim 260$ нм, монодисперсность ($PDI \sim 0,4$) и электрокинетическую стабильность $\xi = -23$ мВ; для отваров: $t_{\text{настаивания}} = 45$ мин; для настоев: 96% концентрация спирта этилового, недопустимость фильтрования через Milles-GS с обязательным указанием на применение в свежем виде, без хранения; добавление электролитов способствует кинетической устойчивости отваров и стабилизации ζ -потенциала -23 до -31 мВ; разведение спирта этилового отваром из плодов дерезы способствует снижению его токсичности по данным метода *Spirotox*.

4. Оценка биогеохимического элементного профиля методом РФА показало присутствие двух значимых групп в РС: эссенциальных элементов Cu, Fe, Mn, Zn с мажорным содержанием Fe (185 мкг/г) и макробиогенных Ca, Cl, K, P, S элементов с значительным содержанием K (22,8 мг/г); в водных и спиртовых извлечениях происходит изменение элементного профиля с сохранением

значимого содержания К (24 мг/г), сопоставимого с высушенным сырьем плодов дерезы.

5. Предложены различные способы получения фруктозана инулина из плодов *L. barbarum* L., один из которых (образец 2) продемонстрировал высокую производительность; проведена оценка качества полученного продукта по показателям «описание», «растворимость», «подлинность» (морфология частиц, Фурье-ИКС в сравнении с CRS и определение оптической активности $[\alpha]_D^{20} = -828 \pm 250 [^{\circ} \cdot \text{мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{дм}^{-1}]$; соблюдение закона Био в концентрационном диапазоне от $4 \cdot 10^{-2}$ до $6 \cdot 10^{-2}\%$ позволит, также, применять метод поляриметрии для определения содержания действующего вещества.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ - биологически активные веществ

ВСС - воздушно-сухое сырье

INU - инулин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Spirotox - кратковременный тест на острую токсичность с использованием простейшей *Spirostomum ambigua*

ВЭ - водные экстракты

TNF- α - (Tumor necrosis factor- α) – фактор некроза опухоли, полипептидный медиатор и провоспалительный цитокин

ГМФ - гидроксиметилфурфурол

ГФ - государственная фармакопея

РС - растительное сырье

LALLS - малоугловое рассеяние лазерного света

ОФС - общая фармакопейная статья

LBPс - полисахариды *L. barbarum*

КЭА - количественный элементный анализ
ЛС - лекарственное средство
ЛРС - лекарственное растительное сырье
ЛП - лекарственный препарат
Фурье-ИКС - Фурье- инфракрасный спектрометр
СХ – сахараиды
СЭ – спирт этиловый
ФН – фильтрующая насадка
СВП – сосудисто-волокнистые пучки
УФВ-СФ – ультрафиолетовая и видимая спектрофотометрия
ФЛВ - флавоноиды
АНР - American Herbal Pharmacopoeia
ФДМ - фотодиодная матрица
DLS - динамическое светорассеяние
РФА - рентгенофлуоресцентный анализ
ЖЛФ - жидкая лекарственная форма
ФС - фармацевтическая субстанция
МАГАТЭ - международное агентство по атомной энергии
КО – количественное определение
Flr - флуоресценция
ОФ – обращенно-фазовый

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christen P., Kapetanidis I. Flavonoids from *Lycium halimifolium* // *Planta medica*. – 1987. – Т. 53. – №. 06. – С. 571-572.
2. Khan I., Qayum A., Qureshi Z. Study of the hypotensive action of berbamine, an alkaloid isolated from *Berberis lycium* // *Life sciences*. – 1969. – Т. 8. – №. 17. – С. 993-1001.
3. Suzuki M., OSAWA S., HIRANO M. A *Lycium chinense* Miller component inducing ovulation in adult female rabbits // *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. – 1972. – Т. 106. – №. 3. – С. 219-231.
4. Heywood V. H. Ethnopharmacology, food production, nutrition and biodiversity conservation: towards a sustainable future for indigenous peoples // *Journal of ethnopharmacology*. – 2011. – Т. 137. – №. 1. – С. 1-15.
5. Dafni A., Yaniv Z. Solanaceae as medicinal plants in Israel // *Journal of ethnopharmacology*. – 1994. – Т. 44. – №. 1. – С. 11-18.
6. Bukhari S. M. F. et al. Ethnobotanical and biochemical study of *Berberis lycium royle* collected from different areas of Azad Jammu and Kashmir // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. – 2021. – Т. 2021.
7. Lin L. et al. Prediction of the potential distribution of Tibetan medicinal *Lycium ruthenicum* in context of climate change // *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2017. – Т. 42. – №. 14. – С. 2659-2669.
8. Zhang Z.Y et al. *Flora of China*; Missouri Botanical Garden Press: St / Louis, MO, USA. – 1994. – Т. 17. 342 с.
9. Секинаева М. А. и др. Изучение анатомических признаков травы дерезы обыкновенной (*Lycium barbarum* L.) // *Успехи современного естествознания*. – 2015. – №. 9-2. – С. 231-235.

10. Yao R., Heinrich M., Weckerle C. S. The genus *Lycium* as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review //Journal of ethnopharmacology. – 2018. – T. 212. – C. 50-66.
11. American herbal pharmacopoeia: botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines. Monograph AHP - *Lycium* (Goji) Fruit. / Roy Upton, Alison Graff, Georgina Jolliffe, Reinhard Länger, Elizabeth Williamson – CRC Press, 2016 – 782 c.
12. *Lycium* Fruit. The Japanese Pharmacopoeia 17th Edition. – 2017.
13. *Lycium* Fruit. The Korean Pharmacopoeia (Tenth Edition). – 2016.
14. Wolfberry, *Lycii* Fructus. Taiwan Herbal Pharmacopoeia (Tenth Edition). – 2016.
15. *Lycium barbarum* Linné. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China. – 2015. – T. 1.
16. *Lycium barbarum* Linné. The British Pharmacopoeia (BP) 2019.
17. Qian D. et al. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae) //Molecules. – 2017. – T. 22. – №. 6. – C. 911.
18. Gao Y. et al. *Lycium barbarum*: a traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent //Aging and disease. – 2017. – T. 8. – №. 6. – C. 778.
19. Kocyigit E., Sanlier N. A review of composition and health effects of *Lycium barbarum* //International Journal of Chinese Medicine. – 2017. – T. 1. – №. 1. – C. 1-9.
20. Chiale C. A., Cabrera J. L., Juliani H. R. NαCinnamoylhistamine derivatives from *Lycium cestroides* //Phytochemistry. – 1990. – T. 29. – №. 2. – C. 688-689.

21. Li J. et al. Pyrrole alkaloids with potential cancer chemopreventive activity isolated from a goji berry-contaminated commercial sample of African mango //Journal of Agricultural and food chemistry. – 2014. – T. 62. – №. 22. – C. 5054-5060.
22. Redgwell R. J. et al. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 1. Characterisation of soluble and insoluble polymer fractions //Carbohydrate polymers. – 2011. – T. 84. – №. 4. – C. 1344-1349.
23. Hiserodt R. D. et al. Identification of monomenthyl succinate, monomenthyl glutarate, and dimenthyl glutarate in nature by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry //Journal of agricultural and food chemistry. – 2004. – T. 52. – №. 11. – C. 3536-3541.
24. Li X. N. et al. A new furo lactone-type lignan from *Lycium chinense* //Natural Product Research. – 2013. – T. 27. – №. 8. – C. 750-752.
25. Yang Y. N. et al. Nine new compounds from the root bark of *Lycium chinense* and their α -glucosidase inhibitory activity //RSC advances. – 2017. – T. 7. – №. 2. – C. 805-812.
26. Xie L. W. et al. Activity-guided isolation of NF- κ B inhibitors and PPAR γ agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller //Journal of ethnopharmacology. – 2014. – T. 152. – №. 3. – C. 470-477.
27. YAHARA S. et al. Cyclic peptides, acyclic diterpene glycosides and other compounds from *Lycium chinense* Mill //Chemical and pharmaceutical bulletin. – 1993. – T. 41. – №. 4. – C. 703-709.
28. Wu D. T. et al. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2016. – T. 129. – C. 210-218.

29. Xie J. H. et al. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities //Food hydrocolloids. – 2016. – T. 60. – C. 148-160.
30. Jabbar S., Abid M., Zeng X. Nutritional, phytochemical characterization and antioxidant capacity of Ningxia Wolfberry (*Lycium barbarum* L.) //J. Chem. Soc. Pak. – 2014. – T. 36. – №. 6. – C. 1079-1087.
31. Yang X. et al. *Lycium barbarum* polysaccharides reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats //Chemico-biological interactions. – 2013. – T. 204. – №. 3. – C. 166-172.
32. Kulczyński B., Gramza-Michałowska A. Goji berry (*Lycium barbarum*): composition and health effects—a review //Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. – 2016. – T. 66. – №. 2. – C. 67-75.
33. Chao J. C. J. et al. Hot water-extracted *Lycium barbarum* and *Rehmannia glutinosa* inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells //World journal of gastroenterology: WJG. – 2006. – T. 12. – №. 28. – C. 447-884.
34. Amagase H., Sun B., Nance D. M. Immunomodulatory effects of a standardized *Lycium barbarum* fruit juice in Chinese older healthy human subjects //Journal of medicinal food. – 2009. – T. 12. – №. 5. – C. 1159-1165.
35. Zhao R. et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Lycium barbarum* polysaccharide in diabetic rats //Chinese herbal medicines. – 2015. – T. 7. – №. 4. – C. 310-315.
36. Amagase H., Nance D. M. *Lycium barbarum* increases caloric expenditure and decreases waist circumference in healthy overweight men and women: pilot study //Journal of the American College of Nutrition. – 2011. – T. 30. – №. 5. – C. 304-309.
37. Niro S. et al. Nutritional evaluation of fresh and dried goji berries cultivated in Italy //Italian Journal of Food Science. – 2017. – T. 29. – №. 3. – C. 398-408.

38. American herbal pharmacopoeia: botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines. Monograph AHP - Lycium (Goji) Fruit. / Roy Upton, Alison Graff, Georgina Jolliffe, Reinhard Länger, Elizabeth Williamson – CRC Press, 2016 – 782 с.

39. ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание

40. Ul'yantsev A. S. et al. Application of low-angle laser scattering to the quality control of pharmaceutical powders and suspensions. 2. Barium sulfate //Pharmaceutical chemistry journal. – 2009. – Т. 43. – №. 7. – С. 422-424.

41. Анфимова Е. В. и др. Исследование кинетики растворимости лекарственных субстанций методом лазерной дифракции в водных растворах с различным изотопным составом по водороду //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №. 1. – С. 150-155.

42. Nikiforova M. V., Uspenskaya E. V., Syroeshkin A. V. Изучение возможности применения метода малоуглового рассеяния лазерного света для определения подлинности активного фармацевтического ингредиента анаферона детского //Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2018 – Т. 20. – №. 5. – С. 107-112.

43. Stetefeld J., McKenna S. A., Patel T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences //Biophysical reviews. – 2016. – Т. 8. – С. 409-427.

44. Макарова М. П. и др. Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофициальных растениях //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8. – №. 2. – С. 93-97.

45. ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание.

46. ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
47. Uspenskaya E. et al. Preparation, characterization and studies of physicochemical and biological properties of drugs coating lactose in fluidized beds. // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2020. – Т. 12. – №. 5. – С. 272-278.
48. Uspenskaya E. V. et al. Assesment of biology activity of the peeling substances by the physicochemical approaches on the Spirostomum ambiguum cell model //Int. J. Pharm. Pharm. Sci. – 2021. – Т. 13. – №. 7. – С. 82-86.
49. ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
50. ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
51. ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
52. ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
53. ОФС.1.5.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
54. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина. – 1989. – 400 с.

55. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. Fructus rozae - плоды шиповника / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина. – 1989. – 400 с.
56. Scherer R. et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices //Food Chemistry. – 2012. – Т. 135. – №. 1. – С. 150-154.
57. ОФС.1.5.3.0008.15 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание.
58. ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание.
59. ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание.
60. ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание.
61. ФС.2.5.0016.15 «Земляники лесной листья» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание.
62. Буханова У. Н., Попов Д. М., Селезнев Н. Г. Разработка методик качественного и количественного определения суммы флавоноидов в сборе "Лорполифит" //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – №. 3. – С. 11-16.
63. Mocan A. et al. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves //Molecules. – 2014. – Т. 19. – №. 7. – С. 10056-10073.

64. Шевлякова О. А. и др. Современные способы определения и идентификации флавоноидов горянки (*epimedium*) //Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2016. – Т. 57. – №. 3. – С. 172-183.
65. ФС.2.5.0027.15 «Мать-и-мачехи обыкновенной листья» Российская государственная фармакопея, XIII издание.
66. Никулин А. В. и др. Определение суммы восстанавливающих сахаров и водорастворимых полисахаридов в субстанциях растительного происхождения //Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т. 10. – №. 5. – С. 42-59.
67. DuBois M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances //Analytical chemistry. – 1956. – Т. 28. – №. 3. – С. 350-356.
68. Буханова У. Н., Попов Д. М., Селезнев Н. Г. Методика определения суммы фруктозанов и фруктозы в сборе " Лорполифит" //Фармация. – 2013. – №. 1. – С. 22-24.
69. ФС.2.5.0070.18 «Девясила высокого корневища и корни» Российская государственная фармакопея, XIII издание.
70. Bokov D. O. et al. Pharmacopoeial analysis of inulin-containing medicinal plant raw materials and drugs //Pharmacognosy Journal. – 2020. – Т. 12. – №. 2. – С. 415-421.
71. ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» Российская государственная фармакопея, XIII издание.
72. ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» Российская государственная фармакопея, XIII издание.
73. ОФС.1.5.1.0007.15 «Плоды» Российская государственная фармакопея, XIII издание.

74. Saraf S. et al. Evaluation of physicochemical and phytochemical properties of Safoof-E-Sana, a Unani polyherbal formulation //Pharmacognosy research. – 2010. – Т. 2. – №. 5. – С. 318.
75. Park W. Y. Determination of Moisture and Ash Contents of Food, LML Mollet, Handbook of Food Analysis. – 1996. – С. 59-92.
76. ОФС.1.1.0013.15. «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Российская государственная фармакопея, XIV издание.
77. Bhargava V. V., Saluja A. K., Dholwani K. K. Detection of heavy metal contents and proximate analysis of roots of *Anogeissus latifolia* //Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2013. – Т. 1. – №. 6. – С. 61-65.
78. Rao Y., Xiang B. Determination of total ash and acid-insoluble ash of Chinese herbal medicine *Prunellae Spica* by near infrared spectroscopy //Yakugaku Zasshi. – 2009. – Т. 129. – №. 7. – С. 881-886.
79. Chaudhari R. K., Girase N. O. Determination of soluble extractives and physicochemical studies of bark of *Sesbania sesban* (L) Merr //J Chem. – 2015. – Т. 7. – С. 658.
80. Singh P. S. et al. Standardization and pharmacological investigation on leaves of *Ficus bengalensis* //Int J Res Pharm Chem. – 2011. – Т. 1. – С. 891-903.
81. Кавеленова Л. М., Здетовский А. Г., Огневенко А. Я. К специфике содержания зольных веществ в листьях древесных растений в городской среде в условиях лесостепи (на примере Самары) //Химия растительного сырья. – 2001. – №. 3. – С. 85-90.
82. Saebi A. et al. Precision harvesting of medicinal plants: elements and ash content of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) as affected by harvest height //Biological Trace Element Research. – 2021. – Т. 199. – С. 753-762.

83. Arawande J. O. et al. Extractive Values and Antioxidant Properties of Leaves, Seeds, Pods and Coats Moringa Plant //Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. – 2021. – T. 39. – №. 4. – C. 31530-31536.
84. Abarca-Vargas R., Peña Malacara C. F., Petricevich V. L. Characterization of chemical compounds with antioxidant and cytotoxic activities in bougainvillea x buttiana holttum and standl, (Var. rose) extracts //Antioxidants. – 2016. – T. 5. – №. 4. – C. 45.
85. Hikmawanti N. P. E., Fatmawati S., Asri A. W. The effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of Katuk (Sauropus androgynus (L.) Merr.) leaves extracts //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – T. 755. – №. 1.
86. García Fernández-Villa S., Chércoles Asensio R., San Andrés Moya M. Effectiveness Evaluation of Molisch's Test for the Identification of Historical Cellulose Plastics. – 2020.
87. Konwar M. et al. Fehling solution/DIPEA/hydrazine: an alternative catalytic medium for regioselective synthesis of 1, 4-disubstituted-1H-1, 2, 3-triazoles using azide–alkyne cycloaddition reaction //Tetrahedron Letters. – 2016. – T. 57. – №. 40. – C. 4473-4476.
88. Olczuk D., Priefer R. A history of continuous glucose monitors (CGMs) in self-monitoring of diabetes mellitus //Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. – 2018. – T. 12. – №. 2. – C. 181-187.
89. Saleem A. et al. Preparation of marketable functional food to control hypertension using basil (ocimum basillium) and peppermint (mentha piperita) //International Journal of Innovations in Science & Technology. – 2019. – T. 1. – №. 1. – C. 15-32.
90. Fransina E. G. et al. Phytochemical screening of water extract of gayam (Inocarpus edulis) Bark and its amylase inhibitor activity assay //IOP Conference Series:

Materials Science and Engineering. – IOP Publishing, 2019. – Т. 509. – №. 1. – С. 012074.

91. Реакционная способность гетероциклических соединений. Реакции обнаружения алкалоидов и флавоноидов. [Электронный ресурс]: – Электрон. журн. – режим доступа к журн.: <https://studfile.net/preview/5810983/page:5/>

92. Ilmi H. M., Elya B., Handayani R. Association between total phenol and flavonoid contents in *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) bark and leaf extracts and lipoxygenase inhibition //International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2020. – Т. 12. – №. 1. – С. 252-256.

93. Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N. Analysis of condensed tannins: a review //Animal feed science and technology. – 2001. – Т. 91. – №. 1-2. – С. 21-40.

94. Mollica A. et al. Phenolic analysis and in vitro biological activity of red wine, pomace and grape seeds oil derived from *Vitis vinifera* L. cv. Montepulciano d’Abruzzo //Antioxidants. – 2021. – Т. 10. – №. 11. – С. 1704.

95. Montesano D. et al. A simple HPLC-ELSD method for sugar analysis in goji berry //Journal of chemistry (Hindawi). – 2016. – Т. 2016. – С. 1-5.

96. Potterat O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity //Planta medica. – 2010. – Т. 76. – №. 01. – С. 7-19.

97. Mohammed Z. Y., Alsamarrae K. W., Hamza S. J. Quantitative analysis of total polysaccharides and total carotene from *Lycium barbarum* fruit //Int. J. Mod. Biol. Med. – 2013. – Т. 4. – С. 204-215.

98. Ehnert S. et al. Simultaneous quantification of total carbohydrate and protein amounts from aqueous solutions by the sulfuric acid ultraviolet absorption method (SA-UV method) //Analytica Chimica Acta. – 2021. – Т. 1174. – С. 338712.

99. Chow P. S., Landhüsser S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues //Tree physiology. – 2004. – T. 24. – №. 10. – C. 1129-1136.
100. Quero-Jiménez P. C. et al. Total carbohydrates concentration evaluation in products of microbial origin //Afinidad. – 2019. – T. 76. – №. 587.
101. de Toledo V. A. A. et al. Spectrophotometry as a tool for dosage sugars in nectar of crops pollinated by honeybees // Macro to nano spectroscopy. InTech. Edited by Jamal Uddin. – 2012. – T. 1. – №. 14 – C. 269-290.
102. Woldu A. R., Tsigie Y. A. Optimization of hydrolysis for reduced sugar determination from avocado seed wastes //American Journal of Environment Energy and Power Research. – 2015. – T. 3. – C. 1-10.
103. Skenderidis P. et al. Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation //Toxicology reports. – 2018. – T. 5. – C. 251-257.
104. Skenderidis P. et al. Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of goji berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) fruits //Antioxidants. – 2019. – T. 8. – №. 3. – C. 60.
105. Stick R. V., Williams S. Carbohydrates: the essential molecules of life. – Elsevier, 2010– C. 321-341.
106. Roberfroid M. B. Introducing inulin-type fructans //British journal of nutrition. – 2005. – T. 93. – №. S1. – C. S13-S25.
107. Sánchez-Viesca F., Gómez R. Reactivities involved in the Seliwanoff reaction //Modern Chemistry. – 2018. – T. 6. – №. 1. – C. 1-5.
108. Matros A. et al. Determination of fructans in plants: current analytical means for extraction, detection, and quantification //Annual plant reviews online. – 2019. – T. 2. – C. 1-39.

109. Rane R. et al. Spectrophotometric method for quantitative determination of inulin in Naturo lax–A powder //International Journal of Pharma Research and Health Sciences. – 2018. – Т. 6. – №. 1. – С. 2160-2164.
110. Abed S. M. et al. Inulin as prebiotics and its applications in food industry and human health; a review //International Journal of Agriculture Innovations and Research. – 2016. – Т. 5. – №. 1. – С. 88-97.
111. Kishan C. S. et al. A Comprehensive Review on Pharmaceutical and Nutritional Applications of Inulin //Int. J. Appl. Pharm. – 2021. – Т. 13. – С. 30-38.
112. Chang C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods //Journal of food and drug analysis. – 2002. – Т. 10. – №. 3 – С. 178-182.
113. Shraim A. M. et al. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation //LWT. – 2021. – Т. 150. – С. 111932.
114. Pękał A., Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay //Food Analytical Methods. – 2014. – Т. 7. – С. 1776-1782.
115. Сичко Н. О. Оценка накопления дубильных веществ в разновозрастном курильском чае кустарниковом, произрастающем на Северном Кавказе //Новые технологии. – 2019. – №. 2. – С. 244-255.
116. Самылина И. А., Антонова Н. П., Рудакова И. П. Исследования по разработке фармакопейного метода определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье //Фармация. – 2009. – №. 6. – С. 3-6.
117. Pozdnyakova T. A., Bubenchikov R. A. Development of methodology for the quantitative determination of tannins in the Geranium sibiricum L. herb //Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – №. 2. – С. 40-42.

118. Выделение дубильных веществ из ЛРС. [Электронный ресурс]: – Электрон. журн. – режим доступа к журн.:

<https://studfile.net/preview/5016670/page:63/>

119. Филиппова Г. Г., Смолич И. И. Биохимия растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы студентов. – 2004.

120. Shi Y. et al. Recent Progress in the Study of Taste Characteristics and the Nutrition and Health Properties of Organic Acids in Foods //Foods. – 2022. – Т. 11. – №. 21. – С. 3408.

121. R.J. Pither. Encyclopedia of Analytical Science: Food and nutritional analysis. Fruits and Fruit Products. / Editor(s): Paul Worsfold, Alan Townshend, Colin Poole. – Elsevier, 2005. – Т. 2. – 334-341 с.

122. Caballero B. Encyclopedia of Food and Health. [Текст] / Finglas P., Toldrá F. – Academic Press. – 2015. – 4006 с.

123. Pande S. S. Effect of alcoholic fermentation on phytochemical (polyphenol/flavonoid, vitamin C and FOS) levels and radical scavenging activity of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root slices. В //Tech. Thesis. Tribhuvan Univ., Nepal. – 2019.

124. Alzahrani H. R. et al. Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values //Arabian Journal of Chemistry. – 2017. – Т. 10. – №. 7. – С. 906-913.

125. Chang R. C. C. et al. (ed.). *Lycium barbarum* and human health. – Springer Netherlands, 2015. – №. 12075.

126. Ma Z. F. et al. Goji berries as a potential natural antioxidant medicine: An insight into their molecular mechanisms of action //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2019. – Т. 2019.
127. Ищенко В. И. Промышленная технология лекарственных средств. Пособие (2-е издание). – 2012.
128. Веремчук О. А., Моисеев Д. В. Разработка технологии получения и стандартизация настойки вереска обыкновенного побегов //Актуальные проблемы медицины. – 2018. – Т. 41. – №. 1. – С. 125-132.
129. Fang C. K. et al. Nucleation processes of nanobubbles at a solid/water interface //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 24651.
130. Клындюк А.И. Поверхностные явления и дисперсные системы// БГТУ. -2011; 317 с.
131. Clogston J. D., Patri A. K. Zeta potential measurement //Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. – Humana Press (Elsevier) – 2011. – Т. 697. – С. 63-70.
132. Успенская Е. В. и др. Фармакопейные методы определения размера частиц. Метод лазерной дифракции света в контроле гетерогенности лекарственных средств //Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2016. – Т. 18. – №. 9. – С. 112-115.
133. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential–what they are and what they are not? //Journal of controlled release. – 2016. – Т. 235. – С. 337-351.
134. Wang H. et al. Effect of calcium ions on rheological properties and structure of Lycium barbarum L. polysaccharide and its gelation mechanism //Food Hydrocolloids. – 2022. – Т. 122. – С. 107079.
135. Carneiro-da-Cunha M. G. et al. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide

solutions envisaged for multilayered films production //Carbohydrate polymers. – 2011. – T. 85. – №. 3. – C. 522-528.

136. Karmakar S. Particle size distribution and zeta potential based on dynamic light scattering: Techniques to characterize stability and surface charge distribution of charged colloids //Recent Trends Mater. Phys. Chem. – 2019. – C. 117-159.

137. Uspenskaya E. et al. Development of an effective way to increase the biological activity of nicotinamide—a new strategy to protect against photoageing and skin neoplasia //BIO Web of Conferences. – EDP Sciences, 2020. – T. 22. – C. 01005.

138. Syroeshkin A. V. et al. Mechanical transformation of compounds leading to physical, chemical, and biological changes in pharmaceutical substances //The Scientific World Journal. – 2018. – T. 2018. – C. 1-8.

139. Uspenskaya E. et al. Preparation, characterization and studies of physicochemical and biological properties of drugs coating lactose in fluidized beds. – 2021. – T. 12. – №. 5. – C. 272–278.

140. Bone K. A clinical guide to blending liquid herbs: herbal formulations for the individual patient. – Elsevier Health Sciences, 2003. – 544 c.

141. Dehsari H. S. et al. Effect of precursor concentration on size evolution of iron oxide nanoparticles //CrystEngComm. – 2017. – T. 19. – №. 44. – C. 6694-6702.

142. Gudkov S. V. et al. Influence of the Concentration of Fe and Cu Nanoparticles on the Dynamics of the Size Distribution of Nanoparticles //Frontiers in Physics. – 2020. – T. 8. – C. 622551.

143. Lovkova M. Y. et al. Chemical features of medicinal plants //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2001. – T. 37. – C. 229-237.

144. Papa S. et al. Trace elements in fruit and vegetable //EQA-International Journal of Environmental Quality. – 2009. – T. 2. – C. 79-83.

145. Benzie, I.F.F. Herbal Medicine Biomolecular and Clinical Aspects, Second Edition. / Benzie, I.F.F. Wachtel-Galor S. – CRC Press, 2011. – 500 c.
146. Marguí E., Queralt I., Almeida E. X-ray fluorescence spectrometry for environmental analysis: Basic principles, instrumentation, applications and recent trends //Chemosphere. – 2022. – C. 135006.
147. Winkler A. et al. Total reflection X-ray fluorescence analysis of elemental composition of herbal infusions and teas //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2020. – T. 100. – №. 11. – C. 4226-4236.
148. Uspenskaya E. V. V. et al. A Comprehensive Biological and Physico-Chemical Characterization of Humic and Fulvic Acids Nanoparticles as a Perspective Drug. – 2021.
149. Ling J. et al. Prediction and fusion algorithm for meat moisture content measurement based on loss-on-drying method //International Journal of Agricultural and Biological Engineering. – 2020. – T. 13. – №. 4. – C. 198-204.
150. Afolabi I. S. Moisture migration and bulk nutrients interaction in a drying food systems: a review //Food and Nutrition Sciences. – 2014. – T. 58. – №. 8. – C. 692-714.
151. Yossa Nzeuwa I. B. et al. Comparative metabolic profiling of Lycium fruits (*Lycium barbarum* and *Lycium chinense*) from different areas in China and from Nepal //Journal of Food Quality (Hindawi). – 2019. – T. 2019.
152. Kulaitienė J. et al. Concentrations of minerals, soluble solids, vitamin C, carotenoids and toxigenic elements in organic goji berries (*Lycium barbarum* L.) cultivated in Lithuania //Biological Agriculture & Horticulture. – 2020. – T. 36. – №. 2. – C. 130-140.

153. Covaci E. et al. Characterization of *Lycium barbarum* L. berry cultivated in North Macedonia: A chemometric approach //Journal of Berry Research. – 2020. – T. 10. – №. 2. – C. 223-241.
154. Hoorn E. J. et al. Regulation of the renal NaCl cotransporter and its role in potassium homeostasis //Physiological reviews. – 2020. – T. 100. – №. 1. – C. 321-356.
155. Pu F., Chen N., Xue S. Calcium intake, calcium homeostasis and health //Food Science and Human Wellness. – 2016. – T. 5. – №. 1. – C. 8-16.
156. Pool-Zobel B. L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data //British Journal of Nutrition. – 2005. – T. 93. – №. S1. – C. S73-S90.
157. Escobar-Ledesma F. R. et al. Extraction of inulin from andean plants: An approach to non-traditional crops of Ecuador //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 21. – C. 5067.
158. Zhou F. et al. *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP): A novel prebiotics candidate for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* //Frontiers in Microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 1034.
159. Young I. D., Latousakis D., Juge N. The immunomodulatory properties of β -2, 6 fructans: A comprehensive review //Nutrients. – 2021. – T. 13. – №. 4. – C. 1309.
160. Apolinário A. C. et al. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology //Carbohydrate polymers. – 2014. – T. 101. – C. 368-378.
161. Madia V. N. et al. Analytical characterization of an inulin-type fructooligosaccharide from root-tubers of *Asphodelus ramosus* L //Pharmaceuticals. – 2021. – T. 14. – №. 3. – C. 278.

162. Saengkanuk A. et al. A simplified spectrophotometric method for the determination of inulin in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers //European Food Research and Technology. – 2011. – Т. 233. – С. 609-616.
163. Kriukova Y. et al. Chain length distribution of inulin from dahlia tubers as influenced by the extraction method //International journal of food properties. – 2017. – Т. 20. – №. sup3. – С. S3112-S3122.
164. Characterization of inulin from local red dahlia (*Dahlia* sp. L) tubers by infrared spectroscopy //Procedia Chemistry. – 2015. – Т. 16. – С. 78-84.
165. Akram W., Garud N. Optimization of inulin production process parameters using response surface methodology //Future Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-9.
166. Ю. А. Гончикова, Е. А. Илларионова, И. П. Учебное пособие, применение оптических методов в анализе лекарственных средств. –Сыроватский, Иркутск ИГМУ – 2019. – 57 с.
167. Khuenpet K. et al. Effect of pretreatments on quality of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber powder and inulin extraction //Transactions of the ASABE. – 2015. – Т. 58. – №. 6. – С. 1873-1884.
168. Escobar-Ledesma F. R. et al. Extraction of inulin from andean plants: An approach to non-traditional crops of Ecuador //Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 21. – С. 5067.
169. Naskar B. et al. Viscosity and solubility behavior of the polysaccharide inulin in water, water+ dimethyl sulfoxide, and water+ isopropanol media //Journal of Chemical & Engineering Data. – 2010. – Т. 55. – №. 7. – С. 2424-2427.
170. Chikkerur J. et al. Production of short chain fructo-oligosaccharides from inulin of chicory root using fungal endoinulinase //Applied biochemistry and biotechnology. – 2020. – Т. 191. – С. 695-715.

171. Al-Wraikat M. et al. Structural Characterization of Degraded *Lycium barbarum* L. Leaves' Polysaccharide Using Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide //Polymers. – 2022. – T. 14. – №. 7. – C. 1404.
172. Bekers M. et al. Carbohydrates in Jerusalem artichoke powder suspension //Nutrition & Food Science. – 2007. – T. 37. – №. 1. – C. 42-49.
173. Bezazi A. et al. Novel extraction techniques, chemical and mechanical characterisation of *Agave americana* L. natural fibres //Composites Part B: Engineering. – 2014. – T. 66. – C. 194-203.
174. Kusmiyati N., Wahyuningsih T. D. Widodo. Extraction and identification of inulin-type fructooligosaccharides from *Dahlia pinnata* //L. Asian J Chem. – 2018. – T. 30. – №. 2. – C. 355-358.
175. Temkov M. et al. Characterization of inulin from *Helianthus tuberosus* L. obtained by different extraction methods–Comparative study //Scientific Works of University of Food Technologies. – 2015. – T. 62. – C. 461-464.
176. Nadezhda P. et al. Chemical characterization and anticomplimentary activity of inulin isolated from *cichorium intybus* l. By green extraction techniques. // Conference: 17th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience 2021. / Prague, Check Republic, 2021. –C. 75-80.
177. Petkova N. T., Sherova G., Denev P. P. Characterization of inulin from dahlia tubers isolated by microwave and ultrasound-assisted extractions //International Food Research Journal. – 2018. – T. 25. – №. 5.
178. Trabelsi L. et al. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis* //Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2009. – T. 14. – C. 27-31.

179. Bélanger W. et al. Extraction improvement of the bioactive blue-green pigment “Marennine” from diatom *Haslea ostrearia*'s blue water: A solid-phase method based on graphitic matrices //Marine drugs. – 2020. – T. 18. – №. 12. – C. 653.

180. Liu G. et al. Synthesis, stability and anti-fatigue activity of selenium nanoparticles stabilized by *Lycium barbarum* polysaccharides //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – T. 179. – C. 418-428.