

Сезонные изменения содержания биологически активных веществ и антирадикальной активности сосны обыкновенной шишек

Гуляев Д. К.

к.фарм.н., доцент, кафедра фармакогнозии

Белоногова В. Д.

д.фарм.н., заведующая, кафедра фармакогнозии

ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия, г. Пермь, Российская Федерация

Автор для корреспонденции: Гуляев Дмитрий Константинович: **e-mail:** dkg2014@mail.ru.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение в медицинскую практику новых видов лекарственного растительного сырья является актуальной задачей. Сосны обыкновенной шишки в огромных количествах заготавливаются лесничествами и являются одним из побочных продуктов лесозаготовок. Богатый химический состав данного сырья является основой для поиска возможностей его применения в медицине. **Цель.** Определить оптимальные сроки заготовки сосны обыкновенной шишек для получения сухого водного экстракта, обладающего антирадикальной активностью. **Материалы и методы исследования.** Для исследования были заготовлены шишки сосны обыкновенной второго года жизни на территории Ильинского района Пермского края. Заготовку проводили в период с июля по март. Сухой водный экстракт готовили путем экстракции шишек горячей водой. Определение содержания процианидинов в экстрактах проводили с помощью кислотного расщепления процианидинов до антоцианидинов по методу Портера. Содержание в экстрактах дубильных веществ определяли по методике Государственной Фармакопеи. Для определения антиоксидантной активности экстрактов использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом. **Результаты исследования и их обсуждение.** В результате исследования содержания дубильных веществ установлено, что наибольшее содержание наблюдается в экстрактах, полученных из шишек, заготовленных в октябре, а минимальное – из шишек, собранных в марте. Наибольшее содержание процианидинов в экстрактах, полученных из шишек, собранных в феврале и марте. Наименьшее содержание процианидинов в экстрактах, полученных из шишек, заготовленных в августе и октябре. Уровень антирадикальной активности оказался наибольшим у экстрактов из шишек, заготовленных в октябре с резким снижением активности в ноябре. С ноября по март антирадикальная активность увеличивается. **Заключение.** У всех исследуемых экстрактов наблюдается высокий уровень антирадикальной активности, что позволяет вести заготовку шишек сосны обыкновенной для получения экстрактов в период с июля по март.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, шишки, дубильные вещества, процианидины, антирадикальная активность

doi: 10.29234/2308-9113-2023-11-4-115-124

Для цитирования: Гуляев Д. К., Белоногова В. Д. Сезонные изменения содержания биологически активных веществ и антирадикальной активности сосны обыкновенной шишек. *Медицина* 2023; 11(4): 115-124.

Введение

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) семейства сосновых - *Pinaceae* является широко распространенным древесным растением на территории Российской Федерации. Сосна обыкновенная используется как источник древесины и сырья для деревообрабатывающей промышленности. На лесосеках после заготовки древесины остается огромное количество древесных отходов, которые являются источником загрязнения и риска возникновения лесных пожаров. Древесными отходами сосны обыкновенной являются: кора, древесная зелень, корневая система и шишки. Шишки сосны обыкновенной имеют богатый химический состав и могут рассматриваться в качестве перспективного источника биологически активных веществ.

В настоящее время в Государственную Фармакопею XIV издания занесены сосны обыкновенной почки и терпентинное масло эфирное очищенное (скипидар очищенный). Остальные части растения, такие как шишки, кора, семена, корни сосны, остаются мало изученными и представляют наибольший интерес в качестве потенциально возможного лекарственного растительного сырья. Объектом нашего исследования являлись шишки сосны обыкновенной второго года жизни, собранные в период с июля по март для получения сухого водного экстракта. Заготовку шишек в июне не проводили, поскольку июньские шишки зеленые, не одревесневшие с высоким содержанием эфирного масла, что обуславливает перспективу их использования в виде экстемпоральных лекарственных форм [1].

Одним из основных вопросов при изучении нового вида растительного сырья является определение оптимальных сроков заготовки. Обоснованием для установления оптимального срока заготовки сырья являются данные о содержании основных групп биологически активных веществ и фармакологическая активность.

Сосны обыкновенной шишки рассматриваются нами как сырье для получения сухого водного экстракта, обладающего антирадикальной активностью. Антирадикальный и антиоксидантный эффект извлечений из шишек растений семейства сосновых чаще всего связывают с фенольными или полифенольными соединениями [2-8]. Полифенолы содержат множество гидроксильных групп способных к передаче водорода, чем обусловлена способность подавлять свободные радикалы и прерывать цепную реакцию [9].

Одной из перспективных групп биологически активных веществ шишек и коры видов рода *Pinus* являются процианидины [10-12]. Процианидины представляют собой производные флаван-3-олов которые имеют типичный С6-С3-С6 флавоноидный скелет [13]. Уровень антиоксидантной активности растений часто связывают с содержанием процианидинов [14]. Учитывая данные источников литературы и результаты предварительных исследований, для определения оптимальных сроков заготовки шишек для получения экстракта, оценивали содержание дубильных веществ и процианидинов.

Целью исследования являлось определить оптимальные сроки заготовки сосны обыкновенной шишек для получения сухого водного экстракта, обладающего антирадикальной активностью.

Материалы и методы

Объектом исследования является сосны обыкновенной шишек экстракт сухой, полученный из сосны обыкновенной шишек, заготовленных на территории Ильинского района Пермского края. Заготавливали образцы сосны обыкновенной шишек второго года жизни в период с июля 2020 года по март 2021 года. Сбор шишек проводили в сухую погоду в середине каждого месяца, с одного участка в смешанном лесу с преобладанием ели обыкновенной и сосны обыкновенной.

Сосны обыкновенной шишек экстракт сухой получали по следующей методике: навеску воздушно-сухого сырья помещали в колбу, заливали водой, очищенной в соотношении 1:10, и экстрагировали в течение 1,5 часов при температуре 80 С при постоянном перемешивании. После экстракции остаток сырья отделяли от извлечения и проводили отстаивание в течение двух часов, затем упаривали водное извлечение на ротационном испарителе до густой массы. Упаренный остаток помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 55 С. Использовали относительно мягкие условия экстракции, поскольку очень важно обеспечить химическую стабильность полифенолов во время экстракции [15].

Определение содержания процианидинов в экстрактах сосны обыкновенной шишек проводили с помощью кислотного расщепления процианидинов до антоцианидинов по методу Портера [16,17].

Навеску экстракта около 0,2 грамм (точная навеска) помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Добавляли 20 мл 60% спирта этилового, закрывали пробкой и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°C в течении 15 минут. После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивали и доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 60%. Содержимое колбы центрифугировали в течении 10 минут со скоростью 2000-3000 об/минуту. 0,1 мл полученного извлечения переносили в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,9 мл 60% спирта этилового, 6 мл бутанола кислого, 0,2 мл железосодержащего реактива, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°C в течении 50 минут. Полученный раствор охлаждали при комнатной температуре.

Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре марки СФ 2000 ОКБ «Спектр» (Россия) при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в

качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1 мл 60% спирта этилового, 6 мл бутанола кислого и 0,2 мл железосодержащего реактива.

Содержание процианидинов в пересчете на цианидина хлорид, в %, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 20 \times 7.2 \times 100}{136 \times m \times 0.1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора;

136 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ цианидина хлорида;

m – масса сырья (экстракта), г;

W – потеря в массе при высушивании в %.

Определение содержания дубильных веществ в экстрактах проводили по методике представленной в Государственной Фармакопее Российской Федерации 14 издания [18].

Для определения антирадикальной активности сосны обыкновенной шишек экстракта сухого использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH) (Sigma-Aldrich, США, CAS номер: 1898-66-4). К 1 мл разведения экстракта сухого шишек сосны добавляли 3 мл раствора DPPH в 95% спирте этиловом с концентрацией 5 мг/100 мл. В качестве контрольного образца измеряли оптическую плотность 3 мл раствора DPPH в 95% спирте этиловом с концентрацией 5 мг/100 мл и 1 мл воды очищенной. Измерение проводили на спектрофотометре марки СФ 2000 ОКБ «Спектр» (Россия) при длине волны 517 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. Далее вычисляли антирадикальную активность, поглощение радикала по формуле:

$$\% \text{ связывания радикала DPPH} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100, \text{ где}$$

A_0 – оптическая плотность контрольного образца при 517 нм;

A_x – оптическая плотность исследуемого образца при 517 нм.

Затем определяли величину IC_{50} – концентрацию вещества, способную связать половинную концентрацию радикала DPPH, мкг/мл. Величина IC_{50} определяется по кривой ингибирования, получаемой при построении графиков ингибирования в процентах от концентрации вещества.

Количественные признаки представлены как $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное отклонение). Для статистической обработки данных использовали коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

В полученных экстрактах определяли содержание дубильных веществ. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание дубильных веществ в экстракте сухом сосны обыкновенной шишек

№	Месяц	Содержание дубильных веществ, %
1	Июль	35,42±2,18
2	Август	37,92±5,89
3	Сентябрь	30,04±1,09
4	Октябрь	44,77±2,40
5	Ноябрь	25,19±7,55
6	Декабрь	26,01±1,48
7	Январь	30,18±2,14
8	Февраль	27,71±1,05
9	Март	23,42±1,07

По результатам опыта было выявлено, что наибольшее содержание дубильных веществ в экстрактах, полученных из шишек, заготовленных в октябре, а минимальное – из шишек, собранных в марте. Содержание дубильных веществ в экстрактах варьирует от 23,42 до 44,77%.

По химической природе дубильные вещества растений можно разделить на гидролизуемые и конденсированные. Гидролизуемые дубильные вещества – это смеси сложных эфиров фенолкарбоновых кислот с сахарами и несахаридами. Конденсированные представлены продуктами конденсации катехинов, иначе называемые процианидинами. В настоящем исследовании определено содержание процианидинов в экстрактах шишек сосны, для выявления влияния на выраженность антирадикальной активности. Результаты определения содержания процианидинов в экстракте сухом водном сосны обыкновенной шишек представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание процианидинов в экстракте сухом сосны обыкновенной шишек

№	Месяц	Содержание процианидинов, %
1	Июль	18,94±1,86
2	Август	14,74±0,31
3	Сентябрь	18,78±2,52
4	Октябрь	14,04±0,26
5	Ноябрь	16,80±1,26
6	Декабрь	17,28±4,10
7	Январь	18,54±0,56
8	Февраль	21,34±1,85
9	Март	25,21±0,20

По результатам исследования установлено, что наибольшее содержание процианидинов в экстрактах, полученных из шишек, собранных в феврале и марте. Наименьшее содержание процианидинов в экстрактах, полученных из шишек, заготовленных в августе и октябре. Наблюдается увеличение содержания процианидинов от осенних месяцев к зимним.

Следующим этапом работы было определение антирадикальной активности. Результаты определения содержания дубильных веществ и процианидинов показывают, что в течение года содержание биологически активных веществ в экстракте меняется. Необходимо исследовать как экстракты шишек сосны обыкновенной, полученные из сырья разных месяцев заготовки, проявляют способность связывать свободные радикалы. Антирадикальная активность экстракта сухого водного сосны обыкновенной шишек представлена в таблице 3.

Таблица 3. Сезонные изменения антирадикальной активности сосны обыкновенной шишек экстракта сухого

№	Месяц	Антирадикальной активность, IC ₅₀
1	Июль	13,5±1,51
2	Август	13,75±1,54
3	Сентябрь	14,75±5,93
4	Октябрь	8,05±0,94
5	Ноябрь	21,72±0,05
6	Декабрь	16,4±3,30
7	Январь	11,83±5,12
8	Февраль	10,61±10,37
9	Март	12,09±0,11

В таблице 3 представлены значения антирадикальной активности (IC₅₀) для экстрактов шишек сосны обыкновенной, полученных из сырья разного времени заготовки. По результатам исследования обнаружено, что экстракты, полученные из октябрьских образцов шишек сосны обыкновенной, обладают наибольшей антирадикальной активностью.

При этом наблюдается резкое снижение антирадикальной активности у экстрактов из ноябрьских образцов шишек с постепенным увеличением антирадикальной активности в последующие месяцы.

Антирадикальная активность экстрактов остается относительно одинаковой в летние и зимние месяцы. Различия в уровнях антирадикальной активности наблюдаются у экстрактов, полученных из шишек осенней заготовки. Необходимо установить, имеется ли взаимосвязь между содержанием групп биологически активных веществ и антирадикальной активностью.

Если при увеличении содержания биологически активных веществ показатель IC_{50} снижается, это говорит об увеличении антирадикальной активности экстракта.

Для установления взаимосвязи между содержанием групп биологически активных веществ и антирадикальной активностью, определяли коэффициент корреляции.

По данным таблиц 1 и 3 установлено, что содержание дубильных веществ и антирадикальная активность взаимосвязаны между собой. При увеличении в экстракте содержания дубильных веществ наблюдается снижение величины IC_{50} , что говорит об увеличении антирадикальной активности экстракта. Значение коэффициента корреляции Пирсона составляет - 0,54 что говорит о средней отрицательной корреляции зависимости содержания дубильных веществ от величины IC_{50} антирадикальной активности экстракта. Наблюдается слабая отрицательная корреляция между содержанием процианидинов в экстрактах и уровнем антирадикальной активности.

Заключение

В результате эксперимента установлено, что содержание дубильных веществ и процианидинов оказывает влияние на уровень антирадикальной активности сосны обыкновенной шишек экстрактов. Наибольший уровень антирадикальной активности наблюдается у экстрактов, полученных из шишек, заготовленных в октябре и феврале. У всех исследуемых экстрактов наблюдается высокий уровень антирадикальной активности, что позволяет вести заготовку шишек для получения экстрактов в период с июля по март.

Литература

1. Гуляев Д.К., Машенко П.С., Белоногова В.Д., Леханова А.С. Состав эфирного масла и антирадикальная активность сосны обыкновенной шишек, заготовленных в Пермском крае. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»* 2022; 24(7): 45-50, doi: 10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-7-45-50
2. Wang L., Li X., Wang H. Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pine cones of *Pinus koraiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019; 126: 385-391, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.145
3. Yi J., Wang Z., Bai H., Yu X., Jing J., Zuo L. Optimization of Purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *Pinus Koraiensis* Pine cones. *Molecules* 2015; 20(6): 10450-10467, doi: 10.3390/molecules200610450
4. Diao Y., Chen B., Wei L., Wang Z. Polyphenols (S3) isolated from cone scales of *Pinus koraiensis* alleviate decreased bone formation in rat under simulated microgravity. *Scientific Report*. 2018; (8): 12719-12732, doi: 10.1038/s41598-018-30992-8
5. Latos-Brozio M., Masek A., Chrzescijanska E., Podsedek A., Kajszczak D. Characteristics of the polyphenolic profile and antioxidant activity of cone extracts from conifers determined using electrochemical and spectrophotometric methods. *Antioxidants* 2021; 10(11): 1723-1737, doi: 10.3390/antiox10111723

6. Li S., Xu M., Niu Q., Xu S., Ding Y., Yan Y., Efficacy of procyanidins against in vivo cellular oxidative damage: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2015; 10 (10): e0139455, doi: 10.1371/journal.pone.0139455
7. Hofmann T., Levente A., Bocz B., Bocz D., Visi-Rajczi E. Cones of coniferous taxa as a potential source of bioactive polyphenols. *Current Bioactive Compounds* 2022; 18(6), doi: 10.2174/1573407218666211230144911
8. Hofman T., Levente A., Nemeth L., Vrsanska M., Schlosserova N., Vobercova S., Visi-Rajczi E. Antioxidant and antibacterial properties of Norway spruce (*Picea abies* H. Karst.) and Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière) cone extracts. *Forests* 2021; 12 (9): 1189-1211, doi: 10.3390/f12091189
9. Shi J., Nawaz H., Pohorly J., Mitta G., Kakuda Y., Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods – engineering and technology. *Food Reviews International* 2007; 21(1): 139-166, doi: 10.1081/FRI-200040606
10. Hofman T., Visi-Rajczi E., Levente A. Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays. *Industrial Crops and Products* 2019; 145(3): 111935-111942, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111935
11. Yi J., Cheng C., Li X., Zhao H., Qu H., Wang Z., Wang L. Protective mechanisms of purified polyphenols from pinecones of *Pinus koraiensis* on spleen tissues in tumor-bearing S180 mice in vivo. *Food and Function* 2017; 8(1): 151-166, doi: 10.1039/c6fo01235c
12. Jerez M., Sineiro J., Guitián E., Nunez M.J. Identification of polymeric procyanidins from pine bark by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009; 23(24): 4013-4018, doi: 10.1002/rcm.4342
13. Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80(7): 1094-1117, doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1
14. Kalisz S., Oszmia J., Kolniak-Ostek J., Grobelna A., Kieliszek M., Cendrowski A. Effect of a variety of polyphenols compounds and antioxidant properties of rhubarb (*Rheum rhabarbarum*). *LWT* 2020; 118: 108775, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108775
15. Liazid A., Schwarz M., Varela R.M., Palma M., Guillén D.A., Brigui J., Macías F.A., Barroso C.G. Evaluation of various extraction techniques for obtaining bioactive extracts from pine seeds. *Food and Bioprocess Processing* 2010; 88(2): 247-252, doi: 10.1016/j.fbp.2009.11.004
16. Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. The Conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986; 25: 223-230, doi: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3
17. Rohr G.E., Meier B., Sticher O. Analysis of procyanidins. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2000; 21: 497-570.
18. ОФС.1.5.3.0008.15 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Государственная фармакопея XIV изд., т. 2. 2018. *Режим доступа*: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/551/> (дата обращения: 21.06.2023)

Seasonal Changes in the Content of Biologically Active Substances and Antiradical Activity of Pine Cones

Gulyaev D. K.

PhD (Pharmaceutical Sciences), Assistant Professor, Chair for Pharmacognosy

Belonogova V. D.

Doctor of Pharmaceutical Sciences, Head, Chair for Pharmacognosy

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

Corresponding Author: Gulyaev Dmitry; **e-mail:** dkg2014@mail.ru.

Conflict of interests: None declared

Funding. The study had no sponsorship.

Abstract

The introduction of new types of medicinal plant raw materials into medical practice is an urgent task. Pine cones are harvested in huge quantities by forestry and are one of the by-products of logging. The rich chemical composition of this raw material is the basis for its possible medical applications. **The aim.** To determine the optimal timing of pine cones harvesting for obtaining a dry aqueous extract with antiradical activity. **Materials and methods.** For the study, cones of the Scots pine of the second year of life were harvested on the territory of the Ilyinsky district of the Perm Territory. Harvesting was carried out in the period from July to March. Dry water extract was prepared by extraction of cones with hot water. The content of procyanidins in extracts was determined by acid cleavage of procyanidins to anthocyanidins using the Porter method. The content of tannins in the extracts was determined according to the methodology of the State Pharmacopoeia. To determine the antioxidant activity of the extracts, a reaction with a stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl was used. **Results and discussion.** As a result of the study, it was found that the highest content of tannins is observed in extracts obtained from cones harvested in October, and the minimum is from cones harvested in March. The highest content of procyanidins in extracts obtained from cones collected in February and March. The lowest content of procyanidins in extracts obtained from cones harvested in August and October. The level of antiradical activity was highest in extracts from cones harvested in October with a sharp decrease in activity in November. From November to March, antiradical activity increases. **Conclusion.** All the studied extracts have a high level of antiradical activity, which makes it possible to harvest pine cones for extracts in the period from July to March.

Keywords: Scots pine, cones, tannins, procyanidins, antiradical activity

References

1. Guljaev D.K., Mashhenko P.S., Belonogova V.D., Lehanova A.S. Sostav jefirnogo masla i antiradikal'naja aktivnost' sosny obyknovenoj shishek, zagotovlennyh v Permskom krae. [The composition of essential oil and the antiradical activity of pine cones harvested in the Perm region.] *Mediko-farmaceuticheskij zhurnal «Pul's» [Medical and pharmaceutical magazine "Pulse"]* 2022; 24(7): 45-50, doi: 10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-7-45-50 (In Russ.)
2. Wang L., Li X., Wang H. Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pine cones of *Pinus koraiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019; 126: 385-391, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.145
3. Yi J., Wang Z., Bai H., Yu X., Jing J., Zuo L. Optimization of Purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *Pinus Koraiensis* Pine cones. *Molecules* 2015; 20(6): 10450-10467, doi: 10.3390/molecules200610450
4. Diao Y., Chen B., Wei L., Wang Z. Polyphenols (S3) isolated from cone scales of *Pinus koraiensis* alleviate decreased bone formation in rat under simulated microgravity. *Scientific Reports* 2018; (8): 12719-12732, doi: 10.1038/s41598-018-30992-8

5. Latos-Brozio M., Masek A., Chrzescijanska E., Podsedek A., Kajszczak D. Characteristics of the polyphenolic profile and antioxidant activity of cone extracts from conifers determined using electrochemical and spectrophotometric methods. *Antioxidants* 2021; 10(11): 1723-1737, doi: 10.3390/antiox10111723
6. Li S., Xu M., Niu Q., Xu S., Ding Y., Yan Y., Efficacy of procyanidins against in vivo cellular oxidative damage: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2015; 10 (10): e0139455, doi: 10.1371/journal.pone.0139455
7. Hofmann T., Levente A., Bocz B., Bocz D., Visi-Rajczi E. Cones of coniferous taxa as a potential source of bioactive polyphenols. *Current Bioactive Compounds* 2022; 18(6), doi: 10.2174/1573407218666211230144911
8. Hofman T., Levente A., Nemeth L., Vrsanska M., Schlosserova N., Vobercova S., Visi-Rajczi E. Antioxidant and antibacterial properties of Norway spruce (*Picea abies* H. Karst.) and Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière) cone extracts. *Forests* 2021; 12 (9): 1189-1211, doi: 10.3390/f12091189.
9. Shi J., Nawaz H., Pohorly J., Mitta G., Kakuda Y., Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods – engineering and technology. *Food Reviews International* 2007; 21(1): 139-166, doi: 10.1081/FRI-200040606
10. Hofman T., Visi-Rajczi E., Levente A. Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays. *Industrial Crops and Products* 2019; 145(3): 111935-111942, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111935
11. Yi J., Cheng C., Li X., Zhao H., Qu H., Wang Z., Wang L. Protective mechanisms of purified polyphenols from pinecones of *Pinus koraiensis* on spleen tissues in tumor-bearing S180 mice in vivo. *Food and Function* 2017; 8(1): 151-166, doi: 10.1039/c6fo01235c
12. Jerez M., Sineiro J., Guitián E., Nunez M.J. Identification of polymeric procyanidins from pine bark by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009; 23(24): 4013-4018, doi: 10.1002/rcm.4342
13. Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80(7): 1094-1117, doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1
14. Kalisz S., Oszmia J., Kolniak-Ostek J., Grobelna A., Kieliszek M., Cendrowski A. Effect of a variety of polyphenols compounds and antioxidant properties of rhubarb (*Rheum rhabarbarum*). *LWT* 2020; 118: 108775, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108775
15. Liazid A., Schwarz M., Varela R.M., Palma M., Guillén D.A., Brigui J., Macías F.A., Barroso C.G. Evaluation of various extraction techniques for obtaining bioactive extracts from pine seeds. *Food and Bioprocess Technology* 2010; 88(2): 247-252, doi: 10.1016/j.fbp.2009.11.004
16. Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. The Conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986; 25: 223-230, doi: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3
17. Rohr G.E., Meier B., Sticher O. Analysis of procyanidins. *Studies in Natural Products Chemistry* 2000; 21: 497-570.
18. OFS.1.5.3.0008.15 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Государственная фармакопея XIV изд., т.2. [OFS.1.5.3.0008.15 "Determination of the content of tannins in medicinal plant raw materials and medicinal plant preparations". State Pharmacopoeia XIV ed., vol. 2.] 2018. Available at: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/551/> (Accessed: 21.06.2023) (In Russ.)