

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МОРОЗОВА ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ
ВИДОВ РОДА БОЯРЫШНИК (*CRATAEGUS* L.)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор В.А. КУРКИН

Самара – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ И АНАЛИЗА СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА БОЯРЫШНИК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	18
1.1. Растения рода Боярышник как перспективный источник лекарственных средств	18
1.1.1. Историческая справка.....	20
1.1.2. Характеристика таксона	21
1.1.2.1. Ботаническое описание	21
1.1.2.2. Ареал обитания, культивирования.....	26
1.1.3. Современные данные о химическом составе.....	28
1.1.4. Применение представителей рода Боярышник в медицине....	33
1.2. Стандартизация сырья и препаратов боярышника.....	36
1.2.1. Качественные реакции	36
1.2.2. Количественное определение	40
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	43
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1. Объекты исследования	45
2.2. Методы исследования.....	46
2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа.....	46
2.2.2. Химические методы анализа	48
2.2.3. Хроматографические методы анализа.....	49
2.2.4. Физико-химические методы анализа.....	50
2.2.5. Фармакологические методы анализа	51

2.2.6. Микробиологические методы анализа	52
ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА БОЯРЫШНИК	54
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	65
ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА БОЯРЫШНИК	66
4.1. Предварительное фитохимическое исследование сырья растений рода Боярышник	66
4.1.1. Метод тонкослойной хроматографии	67
4.1.2. Метод УФ-спектроскопии.....	68
4.2. Выделение индивидуальных веществ из листьев боярышника кровоаво-красного	70
4.2.1. Исследование фракций, содержащих перспективные индивидуальные вещества, выделенные из листьев боярышника кровоаво- красного	72
4.2.2. Идентификация выделенных веществ и их характеристики...	73
4.2.3. Изучение химической структуры выделенных веществ.....	81
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	86
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО- КРАСНОГО.....	87
5.1. Разработка методики качественного анализа листьев боярышника кровоаво-красного	87
5.1.1. Качественный анализ методом тонкослойной хроматографии	88

5.2.2. Качественный анализ методом УФ-спектроскопии	90
5.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного	92
5.3. Числовые показатели для нового вида лекарственного растительного сырья «Боярышника кроваво-красного листа»	101
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	103
ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ОБОСНОВАНИЮ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО И БОЯРЫШНИКА ПОЛУМЯГКОГО	104
6.1. Изучение антидепрессантного действия препаратов на основе плодов, цветков, листьев и побегов боярышника.....	105
6.1.1. Боярышник кроваво-красный	105
6.1.2. Боярышник полумягкий	106
6.2. Изучение диуретического действия препаратов на основе плодов, цветков, листьев и побегов боярышника	107
6.2.1. Боярышник кроваво-красный	107
6.2.2. Боярышник полумягкий	111
6.3. Изучение антимикробной активности препаратов плодов, цветков и листьев боярышника	114
6.3.1. Боярышник кроваво-красный	114
6.3.2. Боярышник полумягкий	116
6.4. Изучение острой токсичности препаратов на основе плодов, цветков и листьев боярышника	118
6.4.1. Боярышник кроваво-красный	119
6.4.2. Боярышник полумягкий	119

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	140
Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования.....	141
Приложение 2. Патент на изобретение «Способ количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного»	147
Приложение 3. Патент на изобретение «Способ получения вещества, обладающего диуретической и антидепрессантной активностью».....	148
Приложение 4. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Боярышника кроваво-красного листа»	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В соответствии со Стратегией развития фармацевтической промышленности в Российской Федерации до 2020 года одной из основных задач является разработка и создание отечественных лекарственных препаратов с полным производственным циклом на территории нашей страны. При этом проект Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2030 года добавляет к импортозамещению задачу увеличения экспорта отечественных лекарственных препаратов на внешние рынки.

Учитывая данный факт, необходимо отметить, что препараты на основе лекарственного растительного сырья с каждым днем увеличивают свою популярность и применяются как для лечения, так и для профилактики заболеваний различной нозологии (Куркин В.А., 2014; Самылина И.А. и др., 2006; Martins Ekor, 2014), что, возможно, связано с низкой токсичностью данных препаратов при достаточно высокой эффективности, а также их сравнительной дешевизной по сравнению с синтетическими аналогами (Киселева Т.Л. и др., 2009; Куркин В.А., 2016; Самылина И.А. и др., 2004, 2008; Самбукова Т.В. и др., 2017; Pal S.K., 2003).

Особое место среди лекарственных растений в нашей стране и за её пределами занимают растения рода Боярышник (*Crataegus* L.), препараты на основе которых человечество с давних времен применяет для терапии сердечно-сосудистых заболеваний (Самылина И.А., 1990, 2010; Zorniak M., 2017; Jie Wang, 2013). Кроме того, положительное действие боярышника отмечено при атеросклерозе (Liu, 2009; Yang, 2011), расстройствах центральной нервной системы (Самылина И.А., 2007), а также описано наличие диуретического действия боярышника при длительном применении (Пастушенков Л.В., 1990). Лечебные свойства боярышника, как считается, обусловлены комплексом биологически активных соединений, включающим флавоноиды, процианидины, тритерпеновые сапонины, органические кислоты и др. (Киселева Т.Л. и др., 2007; Самылина И.А., 1990, 2007; Куркин В.А.,

2016). Однако химический состав некоторых видов рода Боярышник не изучен в полной мере.

На сегодняшний день в России официальными считаются плоды и цветки 12 видов растений рода Боярышник, не все из которых обладают большой сырьевой базой на территории нашей страны. По этой причине важным является изучение химического состава и определение возможных полезных фармакологических свойств сырья широко распространенных фармакопейных и нефармакопейных видов рода Боярышник. Кроме того, в ходе изучения литературных источников нами были выявлены различия в методических и методологических подходах при анализе плодов, цветков и листьев боярышника, что подтверждает необходимость изучения химического состава сырья боярышника с целью разработки актуальных и научно обоснованных методик его стандартизации.

Без внимания остаются составляющие значительную часть фитомассы растения листья боярышника, которые совместно с цветками успешно применяются в странах Европейского союза и США, а в Республике Беларусь имеется отдельная фармакопейная статья на листья. Важно подчеркнуть, что за рубежом активно исследуются возможности применения листьев с цветками боярышника, а также их препаратов в терапии различных заболеваний (Leila Jalaly, 2015; Schmidt U., 1994). Данный факт подчеркивает необходимость разработки отечественной нормативной документации для нового вида лекарственного растительного сырья – боярышника листья.

Таким образом, сравнительное фармакогностическое исследование некоторых видов рода Боярышник является актуальным.

Степень разработанности темы.

В настоящее время сырьё растений рода боярышник в Российской Федерации описывают статьи на цветки и плоды в ГФ РФ XIV издания.

Статья на листья боярышника в действующей фармакопее Российской Федерации не представлена. Отечественными учеными (Хасанова С.Р., 2016 г.) предложены методики качественного анализа листьев боярышника

методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей этилацетат – муравьиная кислота – вода (14:3:3) с обнаружением пятен стандартных образцов рутина, гиперозида и хлорогеновой кислоты, а также методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника спектрофотометрический методом в пересчете на рутин (Хасанова С.Р., 2016). В фармакопее Республики Беларусь для определения подлинности листьев боярышника используют качественные реакции с различными реагентами (аммония хлорид, раствор железа (III) и др.), а для целей количественного анализа - спектрофотометрическое определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин и спектрофотометрическое определение содержания суммы процианидинов в пересчете на цианидина хлорид. Рядом иностранных авторов описаны методики количественного определения флавоноидов в листьях боярышника методом жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием, а также методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (Mudge E.M., 2016; Cheng S., 2007; Zhe G., 2013).

Таким образом, на сегодняшний день в нашей стране существуют фармакопейные методики качественного и количественного определения цветков и плодов боярышника, однако для листьев боярышника официальные методики не разработаны. Предложенные отдельными авторами методики анализа листьев боярышника различаются между собой. Кроме того, описанные методики относятся к разным видам рода боярышник, которые могут отличаться друг от друга по химическому составу.

Следовательно, исследования в области стандартизации лекарственного растительного сырья видов рода боярышник является актуальным.

Цель работы и основные задачи исследования.

Целью диссертационного исследования является фармакогностическое исследование некоторых видов рода Боярышник, произрастающих на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Провести сравнительное морфолого-анатомическое исследование черешков листьев боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) и боярышника однопестичного (*Crataegus monogyna* Jacq.).
2. Провести сравнительное фитохимическое исследование листьев боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) и боярышника полумягкого (*Crataegus submollis* Sarg.).
3. Провести изучение химического состава листьев боярышника кроваво-красного.
4. Разработать методики качественного анализа для листьев боярышника кроваво-красного.
5. Разработать методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного.
6. Разработать показатели качества для листьев боярышника кроваво-красного.
7. Провести фармакологическое исследование по обоснованию целесообразности создания лекарственных растительных препаратов на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого.
8. Разработать проект фармакопейной статьи (ФС) на новый вид лекарственного растительного сырья – «Боярышника кроваво-красного листья».

Научная новизна

Морфолого-анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного и листьев боярышника однопестичного позволило выявить характерные диагностические петиолярные признаки для данных видов сырья, заключающиеся в особенностях очертаний базальной, медиальной и апикальной части черешка, особенностях эпидермы и ее кутинизации, характере люминисценции кутина и протопласта, особенностях опушения, а также армирования проводящих пучков.

В ходе изучения химического состава листьев боярышника кроваво-красного впервые выделено флавоноидное вещество - 7-O- β -D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона, являющееся новым природным соединением. Впервые выделены и идентифицированы для листьев боярышника: кверцитрин, трифолин, 4-O- β -D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты, 3-O- β -D-глюкопиранозид эргостерина. Кроме того, в ходе колоночной хроматографии также выделены известные для данного растения вещества – витексин, 2''-O-рамнозид витексина, гиперозид, кофейная кислота и олеаноловая кислота.

Разработаны и описаны методики для качественного и количественного анализа флавоноидных соединений в листьях боярышника кроваво-красного. Качественный анализ с помощью метода тонкослойной хроматографии с использованием стандартного образца гиперозида предполагает определение отношения коэффициентов удерживания пятна, соответствующего 2''-O-рамнозиду витексина, к коэффициенту удерживания пятна, соответствующего гиперозиду. Предложенная методика количественного анализа заключается в определении суммы флавоноидов в пересчете на 2''-O-рамнозид витексина, содержание которого в листьях боярышника кроваво-красного должно быть не менее 2,5%.

Научная новизна данного диссертационного исследования подтверждена патентами Российской Федерации на изобретение: № 2669162 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного» (заявка № 2017146138, от 26.12.2017 г., решение о выдаче патента 08.10.2018 г.) и № 2677284 «Способ получения вещества, обладающего диуретической и антидепрессантной активностью» (заявка № 2018109667 от 19.03.2018 г., решение о выдаче патента 16.01.2019 г.).

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны методики для качественного и количественного анализа флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Предложенный качественный анализ методом ТСХ предполагает использование гиперозида в качестве СО. Количественную оценку содержания суммы флавоноидов предлагается проводить методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина.

Разработаны показатели качества листьев боярышника кроваво-красного, включая числовые (содержания суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина не менее 2,5%). Разработан проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья - «Боярышника кроваво-красного листа».

Обосновано применение нового вида лекарственного растительного сырья «Боярышника кроваво-красного листа» в медицинской практике. Кроме того, определено, что боярышник полумягкий является перспективным растением, сырье которого может быть использовано для разработки и создания ЛРП.

Выявлено наличие антидепрессантной и диуретической активности для препаратов на основе плодов, цветков, листьев и побегов боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого. Определено, что жидкие экстракты на основе цветков, листьев и побегов боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого можно отнести к III классу токсичности (ГОСТ 12.1.007-76).

Для препаратов боярышника кроваво-красного установлено противомикробное действие в отношении ряда микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*).

Результаты, полученные в ходе проведения диссертационного исследования, применяются в научном и учебном процессе в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: на кафедре фармацевтической технологии, кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре управления и экономики фармации, кафедре химии фармацевтического факультета, в производственном процессе на ЗАО «Самаралектравы», в рабочем процессе в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы базируется на глубоком изучении и системном обобщении литературных источников в области фармакогностического исследования видов рода Боярышник, оценки актуальности работы и степени разработки темы исследования. С учетом поставленной цели и задач был разработан план выполнения диссертационного исследования, были определены объекты и методы.

Объектами диссертационной работы являлись различные виды сырья растений рода Боярышник, собранные на территории Самарской области, промышленные образцы плодов боярышника, а также водно-спиртовые извлечения, полученные на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого. Данное исследование проводили с использованием цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектрометрии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, колоночной хроматографии, пробирочных и гистохимических реакций, фармакологических и микробиологических методов. Математическую обработку осуществляли с применением программного обеспечения в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

Связь задач исследования с планами научных работ.

Диссертационная работа выполнялась согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 01200900568 до 28.04.2015; с 28.04.2015 № Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты сравнительного морфолого-анатомического исследования петиолярных признаков листьев боярышника кроваво-красного и листьев боярышника однопестичного.
2. Результаты исследования химического состава листьев боярышника кроваво-красного.
3. Результаты исследований по разработке методик качественного и количественного анализа листьев боярышника кроваво-красного.
4. Данные по разработке показателей качества листьев боярышника кроваво-красного.
5. Результаты исследования фармакологической активности водно-спиртовых извлечений из сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого.
6. Результаты исследования по разработке проекта ФС «Боярышника кроваво-красного листа».

Степень достоверности. Достоверность диссертационной работы подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием цифровой и люминесцентной микроскопии, колоночной хроматографии, тонкослойной хроматографии, УФ-спектрометрии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, химических, фармакологических и микробиологических методов анализа.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на областных, российских и международных конференциях: конференции студенческого научного общества «Мечниковские чтения - 2015» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.), на XX Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека» (г. Самара, 2015 г.); на Научной сессии молодых ученых и студентов – 2016 «Медицинский этюды» (г. Нижний Новгород, 2016 г.); на конференциях «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2016, 2017, 2018 гг.); на I Межвузовской студенческой научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2016); на 91-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (г. Казань, 2017 г.); на 69-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Республика Беларусь, г. Витебск, 2017 г.); на V Научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (г. Москва, 2017 г.), на шестой Научной конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» (Москва, 2018 г.), на Международной научной конференции теоретических и прикладных разработок «Научные разработки: евразийский регион» (г. Москва, 2019).

Публикации. По теме исследования опубликовано 25 печатных работ, из них 9 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, получено 2 патента Российской Федерации на изобретение.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в учебном и научном процессах ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России на кафедре фармацевтической технологии, кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре управления и экономики фармации, кафедре химии фармацевтического факультета, в производственном процессе на ЗАО

«Самаралектравы», в рабочем процессе в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Личный вклад автора. Все описанные в диссертационной работе результаты исследований получены автором. Автором исследована петиолярная анатомия листьев боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного, выявлены характерные диагностические признаки листьев данных растений.

Проведена сравнительная оценка фитохимического состава листьев боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого, из листьев боярышника кроваво-красного выделено и идентифицировано 10 индивидуальных соединений, разработаны и обоснованы методики качественного и количественного определения листьев боярышника кроваво-красного. Для целей качественного и количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного рекомендованы методы тонкослойной хроматографии и УФ-спектроскопии. Изучена антидепрессантная, диуретическая, антимикробная активность и острая токсичность жидких экстрактов на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого. Разработан проект фармакопейной статьи «Боярышника кроваво-красного листа».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 - «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам: 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 – «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом

влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье»; 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».

Объем и структура работы. Диссертационная работа описана на 139 страницах машинописного текста, данные изложены в форме 23 таблиц и представлены на 39 рисунках. Данная работа включает в себя введение, литературный обзор, объекты и методы исследования, 5 глав, представляющих результаты исследований, выводы и заключение, список литературы, который состоит из 131 источника, 38 из которых написаны на иностранном языке.

Во введении описаны актуальность, цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях и апробации работы.

Глава 1 представляет собой обзор литературных источников отечественных и иностранных авторов в области фармакогностических исследований некоторых видов рода Боярышник (*Crataegus* L.). В главе подробно описаны данные, касающиеся ареала произрастания, химического состава, методик качественного и количественного анализа сырья боярышника кроваво-красного, боярышника однопестичного и боярышника полумягкого. Кроме того, в данной главе представлена информация о применении вышеуказанных видов боярышника в официальной и народной медицине России и других стран.

Глава 2 описывает объекты и методы исследования.

Глава 3 посвящена результатам сравнительного морфолого-анатомического исследования черешков листьев боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного.

В главе 4 описаны результаты сравнительного фитохимического исследования листьев боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого, приведены результаты выделения индивидуальных соединений из листьев боярышника кроваво-красного, данные по их химическому строению и структуре.

Глава 5 посвящена разработанным методикам качественного и количественного анализа листьев боярышника кроваво-красного.

Глава 6 описывает результаты исследования антидепрессантной, диуретической, противомикробной активности, а также острой токсичности жидких экстрактов на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого.

Диссертация завершается заключением, выводами, практическими рекомендациями, перспективами дальнейшей разработки и списком литературы.

В приложениях к работе представлены акты внедрения, патент РФ № 2669162 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного», патент РФ № 2677284 «Способ получения вещества, обладающего диуретической и антидепрессантной активностью», проект ФС «Боярышника кроваво-красного листа».

ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ И АНАЛИЗА СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА БОЯРЫШНИК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Растения рода Боярышник имеют продолжительную историю медицинского применения. Так, первое упоминание о боярышнике в традиционной китайской медицине относится к 659 году нашей эры, что соответствует и европейским источникам, судя по которым о лечебном действии боярышника знали в эпоху Диоскорида в первом веке нашей эры [95], к концу 1800-х годов боярышник стали официально применять для лечения заболеваний сердца [95, 128]. В современном мире боярышник не потерял своей популярности, множество клинических исследований и испытаний доказывают, что препараты боярышника обладают комплексом лечебных действий, среди которых наиболее значимы гиполипидемическое, антиатеросклеротическое, гипотензивное и кардиопротекторное [112, 117].

Кроме того, богатая сырьевая база растений рода боярышник в дополнении к вышеперечисленному делает его наиболее интересным объектом для исследований [4, 32, 40, 50].

1.1. Растения рода Боярышник как перспективный источник лекарственных средств

В Российской Федерации в диком виде можно встретить примерно 40 видов растений рода боярышник [5, 78]. При этом в Государственную Фармакопею РФ XIV издания включено 12 видов боярышника:

1. Боярышник кроваво-красный (*C. sanguinea* Pall.);
2. Боярышника сглаженный (*C. laevigata* Poir.) или боярышник колючий (*C. oxyacantha* Pojark.);
3. Боярышник Королькова (*C. korolkovii* L.);
4. Боярышник желтый (*C. chlorocarpa* Lenne et C. Koch);
5. Боярышник даурский (*C. dahurica* Koehne ex Schneid.);
6. Боярышник однопестичный (*C. monogyna* Jacq.);

7. Боярышник германский (*C. alemanniensis* Cin.);
8. Боярышник пятипестичный (*C. pentagyna* Waldst. et Kit.);
9. Боярышник восточно-балтийского (*C. orientobaltica* Cin.);
10. Боярышник отогнуточашелистиковый (*C. curvisepala* Lindm.);
11. Боярышник курземский (*C. x curonica* Cin.);
12. Боярышник даугавский — (*C. x dunensis* Cin.).

Следует отметить, что из указанных видов в России произрастает только 9 наименований, а официальными видами лекарственного растительного сырья боярышника являются цветки и плоды [21, 39, 74].

Несколько иначе обстоит ситуация с фармакопейными видами сырья боярышника в других странах. Так, 32 фармакопея Соединенных Штатов к официальному сырью боярышника относит листья с цветками боярышника однопестичного и боярышника колючего или сглаженного [126]. Европейская фармакопея 8 издания регламентирует качество плодов боярышника однопестичного и боярышника колючего, а также листьев с цветками боярышника однопестичного, б. колючего, б. пятипестичного, б. черного и боярышника азароль [101]. В Белоруссии помимо плодов, цветков и листьев с цветками в официальной практике применяют также листья боярышника кроваво-красного и боярышника колючего [15, 16].

Как мы видим, в различных странах используют виды боярышника, наиболее специфичные для конкретной местности и обладающие обширной сырьевой базой. По этой причине для данного исследования были выбраны три вида рода боярышник: два фармакопейных вида, наиболее типичные для нашего региона и встречающиеся в медицинской практике других стран - боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall.) и боярышник однопестичный (*Crataegus. monogyna* Jacq.), а также один нефармакопейный, но широко культивируемый вид боярышника – боярышник полумягкий (*Crataegus submollis* Sarg.), отличающийся от других видов боярышника крупными плодами и цветками [28, 49, 50].

1.1.1. Историческая справка

Родовое название – *Crataegus* берет свое начало от греческого слова «*cratanos*» (*cratos* – сила, *agein* – действовать), что означает «*сильный*» или «*крепкий*». Латинское название *Crataegus* боярышник приобрёл за свойства крепкой древесины и долговечности, стойкости к неблагоприятным внешним условиям, а также из-за наличия твердых колючек, защищающих растение от внешних воздействий [6, 12, 42, 43, 70].

Синонимы слова *Crataegus* и его названия на европейских языках происходят от физических характеристик растения. Являясь тернитым кустом боярышник обычно использовали в качестве изгороди. Считается, что английское название боярышника – «*hawthorn*» образовалось от слова «*haw*» - устаревшее английское слово «*hedge*», означающий изгородь. Интересно также и то, что немецкое слово «*hagedorn*» происходит от использования боярышника в качестве забора для разделения земель на участки [106].

Латинское видовое название боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) происходит от слова *sanguineus* – кровавый, что, с одной стороны, говорит о цвете плодов боярышника кроваво-красного, а с другой, - намекает на пурпурно-коричневый окрас ветвей данного вида растения [38, 42, 43].

Видовое название боярышника однопестичного (*Crataegus monogyna* Jack) происходит от греческих слов «*mónos*» - уникальный, единственный и «*gynè*» - самка, данный факт указывает на то, что цветок данного вида боярышника имеет только один пестик [98].

Интересно, что одно из английских названий боярышника полумягкого (*Crataegus submollis* Sarg.) – Quebec hawthorn, а также еще одно латинское наименование *Crataegus canadensis* Sargent, вероятно, обусловлено местом изначального происхождения данного растения (Северная Америка и Канада) [99].

1.1.2. Характеристика таксона

Большинство растений рода Боярышник способны легко скрещиваться между собой и образовывать гибриды [34], что может вызвать затруднения при попытках морфологической диагностики растений. Для облегчения решения данной задачи существуют множество литературных источников, подробно описывающих морфолого-диагностические признаки растений рода *Crataegus* L. В результате литературного обзора, проведенного в рамках диссертационной работы, нами были выделены и изложены ниже основные морфологические признаки изучаемых видов боярышника (табл. 1).

1.1.2.1. Ботаническое описание

Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall., семейство Розоцветные (*Rosaceae*)) – высокий кустарник или небольшое дерево высотой 1-4 м (рис. 1) [46, 48, 70, 79, 92]. Ствол боярышника кроваво-красного серовато-коричневого цвета, побеги крепкие, блестящие, с пурпурно-красной корой и расположенными на них прямыми толстыми колючками от 2 до 5 см длиной [8, 12, 25, 26, 29, 40, 92]. Листья очередные, короткочерешковые, листовая пластинка обратнояйцевидной формы, с острой верхушкой и клиновидным основанием, сверху темно-зеленые, снизу – светло-зеленые, с обеих сторон покрыты волосками [11, 49, 50, 52, 54, 59, 92].

Соцветия у боярышника кроваво-красного густые многоцветковые щитки с опадающими нитевидными прилистниками, расположенными на концах коротких боковых побегов [46, 48, 54, 92]. Цветет боярышник кроваво-красный в мае-июне, причем обильное цветение продолжается от 3 до 8 дней [12, 46, 52].

Цветки некрупные (около от 1,2 до 1,5 см) желтовато-белые или розоватые с пурпурными пыльниками в густом щитковидном соцветии, со своеобразным запахом, насчитывают около 20 тычинок. Чашелистики в числе пяти, продолговато-треугольные, цельные [11, 26, 42, 46, 48, 92]. Плодоносит боярышник в августе-сентябре [12, 48, 52]. Плоды шаровидной формы,

диаметром от 8 мм до 1 см, кроваво-красные, реже оранжево-желтые с 3-4 косточками, мучнистой мякотью и кисло-сладким вкусом [8, 46, 55, 59, 82, 92].



Рисунок 1 – Боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall.), семейство Розоцветные (*Rosaceae*). Фото автора.

Боярышник однопестичный (*Crataegus monogyna* Jack., семейство Розоцветные (*Rosaceae*)) – кустарник среднего размера или деревце до 5 м высотой (рис. 2). Побеги с небольшими прямыми и немногочисленными острыми колючками до 1 см в длину. Листья 3-7-лопастные до 4 см в длину с ширококлиновидным основанием и острой верхушкой, с верхней стороны темно-оливково-зеленые, блестящие, а с нижней светлее, вплоть до голубовато-зеленых, имеют короткие черешки. Край листа пильчатый, с зубцами разной величины. Цветение наблюдается с мая по июнь. Цветки белого цвета, в щитковидных соцветиях, диаметром 1,5 см. Плоды с одной косточкой, коричнево-красные, широкояйцевидные до 1 см в длину [8, 47, 55, 58, 82, 83, 98].



Рисунок 2 – Боярышник однопестичный (*Crataegus monogyna* Jack.), семейство Розоцветные (*Rosaceae*). Фото автора.

Боярышник полумягкий или мягковатый (*Crataegus submollis* Sarg. семейство Розоцветные (*Rosaceae*)) – кустарник или дерево длиной 6-8 м, диаметр ствола может достигать до 30 см (рис. 3). Ветви светло-коричневого или пепельно-серого цвета, образуют широкую крону. Побеги темно-зеленого цвета с тонкими, прямыми или слегка изогнутыми колючками ярко-каштанового цвета от 3 до 9 см в длину. Листья яйцевидной формы, достигают до 9 см в длину и до 6,5 см в ширину, густо опушены, темно-зеленого цвета. Листья черешковые, с серповидными, железисто-пильчатыми прилистниками. Соцветия 5-15 цветковые, войлочно опушенные. Цветки диаметром 2-2,5 см на длинных тонких цветоножках, с белыми лепестками и железистыми чашелистиками, тычинок 10 с пыльниками, столбиков от 3 до 5. Плоды шаровидной формы, покрыты волосками, ярко оранжевые или красные с рассеянными бледными точками, диаметром от 10 до 15 мм, содержат желтую мучнистую мякоть и от 3 до 5 косточек 8 мм длиной. Цветет боярышник полумягкий в мае-июне, плоды созревают в сентябре-октябре и быстро опадают [28, 50, 83, 99].



Рисунок 3 – Боярышник полумягкий (*Crataegus submollis* Sarg.),
семейство Розоцветные (*Rosaceae*). Фото автора.

Таблица 1 – Признаки отличия некоторых видов боярышника

Диагностические признаки	<i>Crataegus sanguinea</i> Pall.	<i>Crataegus monogyna</i> Jack.	<i>Crataegus submollis</i> Sarg.
Листья	Цвет		
	Листья с верхней стороны темно-зеленые, с нижней - более светлые.	Листья с верхней стороны темно-зеленые, с нижней светлее, вплоть до голубовато-зеленых.	Листья темно-зеленые.
	Размер		
	Листья 2-6 см длиной и 2,5-5 см шириной.	Листья до 4 -4,5 см в длину и ширину.	Листья 4-9 см длиной и 3-6,5 см шириной .

	Опушенность		
	Листья опушены.	Молодые листья опушены по жилкам, позднее волоски сохраняются только в пазухах жилок.	Листья густо опушены.
	Форма		
	Листья - широко ромбические, обратнойяйцевидной формы, с ширококлиновидным основанием и острой верхушкой.	Листья яйцевидные, с ширококлиновидным основанием и острой верхушкой.	Листья широкояйцевидные.
Цветки	Цвет		
	Цветки желтовато-белые или розоватые.	Цветки белые.	Цветки белые.
	Размер		
	Цветки от 1,2 до 1,5 см в диаметре.	Цветки до 1,5 см в диаметре	Цветки - 2-2,5 см в диаметре.
	Количество тычинок		
	20	20	10

Плоды	Соцветие		
	Щитковидное.	Щитковидное.	Щитковидное.
	Форма		
	Шаровидная.	Широкояйцевидная.	Шаровидная.
	Размер		
	Плоды диаметром от 8 мм до 10 мм.	Плоды диаметром до 10 мм	Плоды диаметром до 15 мм.
	Количество косточек		
	3-4.	1.	3-5.
	Цвет		
	Плоды кроваво-красные.	Плоды коричневатокрасные.	Плоды оранжевые или красные с рассеянными бледными точками.

1.1.2.2. Ареал обитания, культивирования

Род боярышника насчитывает около 1500 видов, которые распространены в умеренных, реже субтропических районах Северного полушария, главным образом в Северной Америке. Во флоре России насчитывается около 55 видов, а в средней полосе России 3 вида. Боярышники – растения широколиственных и смешанных лесов Европейской части России, Западной и Восточной Сибири, широко культивируемые как декоративные растения [40, 49, 50].

Боярышник кроваво-красный является восточноевропейско-сибирским видом, имеет евразийский тип ареала, величина которого с запада на восток составляет более пяти тысяч км (рис. 4). Распространен боярышник кроваво-красный на территории степных и лесных зон Сибири, на Урале, Кавказе, южных и восточных районах европейской части России и Восточном

Казахстане. Изредка встречается на территории Среднего Поволжья. Произрастает в редких сухих лесах, на опушках, полянах, и поймах рек, реже в долинах и оврагах [6, 24, 42, 55, 59, 70, 74, 79, 91, 92]. Культивируется далеко за пределами естественного ареала обитания как декоративное растение в полевых полосах, придорожных насаждениях, парках, скверах [11, 46, 48, 52].

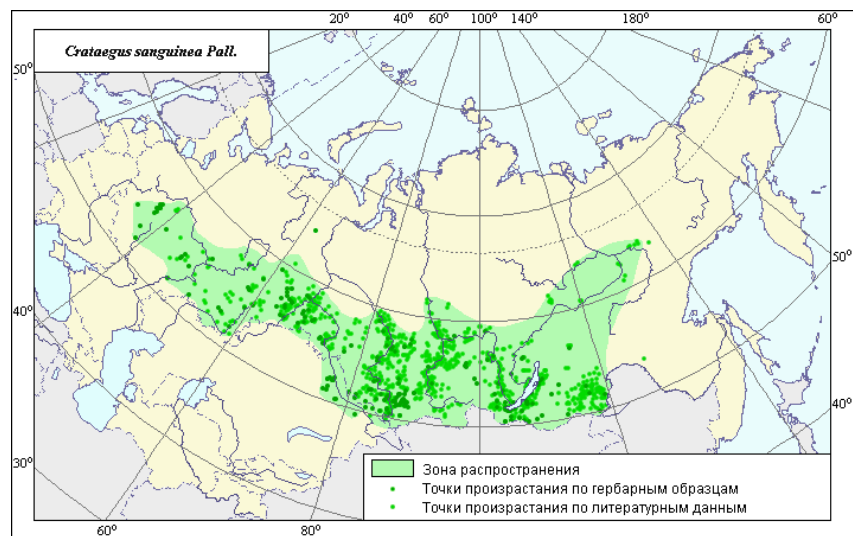


Рисунок 4 - Ареал распространения *Crataegus sanguinea* Pall. [4]

Боярышник однопестичный - среднеевропейский вид боярышника (рис. 5), наибольшее распространение получил в Европе, Северной Америке, восточной Азии, встречается в некоторых частях Австралии и Новой Зеландии. Растет в Крыму, на Кавказе и в Белоруссии по склонам речных берегов, среди кустарниковых зарослей и в светлых лесах, разводится в садах и парках в качестве живых изгородей вдоль заборов, по солнечным склонам, в лиственных и сосновых лесах [8, 10, 42, 58, 98].

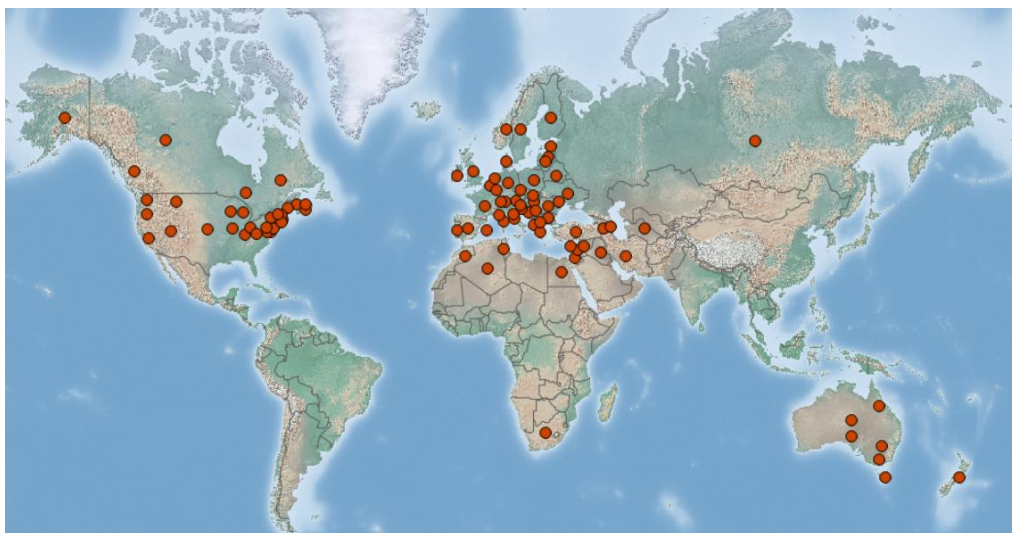


Рисунок 5 - Ареал распространения *Crataegus monogyna* Jacq. [98]

Боярышник полумягкий - североамериканский вид боярышника, в диком виде распространен на территории Северной Америки, от Квебека до Массачусетса, а также встречается в Европе, включая Францию и северную Италию. Растет данный вид боярышника на сырых склонах по лесным опушкам. Кроме того, с 1830 г. боярышник полумягкий широко культивируется далеко за пределами его естественного ареала обитания [10, 28, 99, 122, 123].

1.1.3. Современные данные о химическом составе

Боярышник кроваво-красный. Листья, цветки и плоды боярышника содержат различные полифенольные соединения (флавоноиды и проциандины), которые, вероятнее всего ответственны за кардиотоническое действие данного растения [34, 42, 73, 74, 106]. Кроме того, интерес в лечебном плане также представляют тритерпеновые сапонины плодов боярышника [33, 42] (табл.2).

Плоды боярышника кроваво-красного содержат флавоноиды (гиперозид, кверцитрин, кверцетин, витексин, ацетилвитексин), органические кислоты (яблочную, лимонную, виннокаменную, аскорбиновую и др.), гидроксикоричные кислоты (кофейная, хлорогеновая кислоты), а также

тритерпеновые сапонины (урсоловая, олеаноловая и кратегусовая кислоты), дубильные вещества, полисахариды (пектины), стерины (β -ситостерин), процианидины различной степени полимеризации, сорбит, холин, ацетилхолин, макроэлементы (калий, кальций, магний, железо) и микроэлементы (марганец, медь, цинк, кобальт, хром, алюминий, селен, никель, стронций, свинец, иридий), а также каротиноиды и жирное масло [6, 40, 42, 55, 59, 70, 74, 75, 89, 90].

В цветках боярышника кроваво-красного содержатся эфирное масло, дубильные вещества, флавоноиды (гиперозид, ацетилвитексин, витексин, кверцетин, пиннатифидин), органические кислоты (кофейная, хлорогеновая), ацетилхолин, холин, триметиламин, макроэлементы (калий, кальций, магний, железо, магний), микроэлементы (марганец, медь, цинк, кобальт, молибден, хром, алюминий, барий, селен, никель, стронций, свинец, иридий). [6, 40, 55, 59, 79].

В листьях боярышника кроваво-красного содержатся витамин С, дубильные вещества, флавоноиды (гиперозид, рамнозид витексина) [65, 66]. Кроме того, башкирскими учеными из листьев боярышника кроваво-красного были выделены 17 веществ: гиперозид, витексин, изовитексин, апигенин, космосин, кверцетин, рутин, нарингин, лютеолин, лютеолин-7-глюкозид, гесперидин, дигидрокверцетин, катехин, физетин, процианидин, кофейная и хлорогеновая кислоты [88].

Боярышник однопестичный. Действие данного вида боярышника обусловлено прежде всего флавоноидами, олигомерными процианидинами, биогенными аминами и некоторыми другими веществами. Положительный эффект на организм человека наблюдается при взаимодействии всех содержащихся в боярышнике веществ [58] (табл. 2).

В плодах данного растения содержатся флавоноиды (витексин, 4'-рамнозид витексина, кверцетин, гиперозид) каротиноиды, эпикатехин, галлокатехин, сорбит, фитостерины, тритерпеновые кислоты [27, 65].

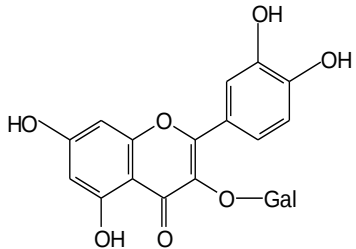
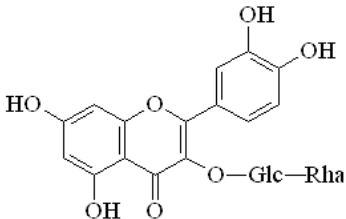
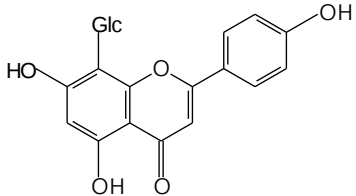
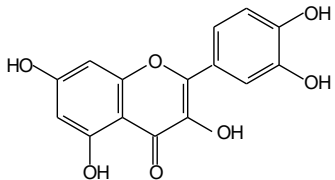
В цветках боярышника однопестичного обнаружены флавоноиды (гиперозид, рамнозид витексина, витексин, сапонаретин, кртезид, 3-О-рамногалактозид кверцетина, кемпферол, рутин), каротиноиды, витамин С, холин, эфирное масло, фитостерины, алкалоиды, жирные кислоты [7, 27, 65].

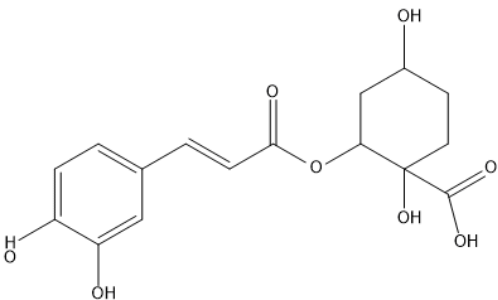
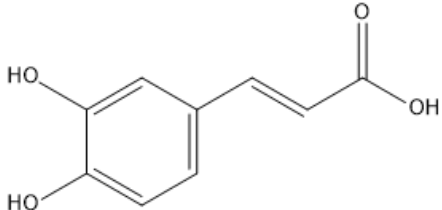
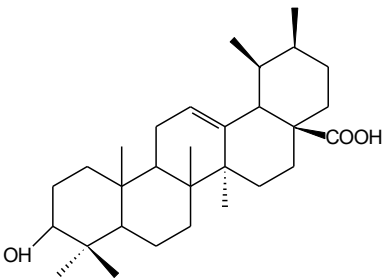
В листьях обнаруживаются тритерпеноиды (олеаноловая, урсоловая кислоты), синильная кислота, витамин С, каротин, катехин, эпикатехин, флавоноиды (рутин, витексин, сапонаретин, гиперозид, рамнозид витексина, кртезид, рамнозид моноацетилвитексина, кемпферол), сапонины и эфирное масло [27, 65].

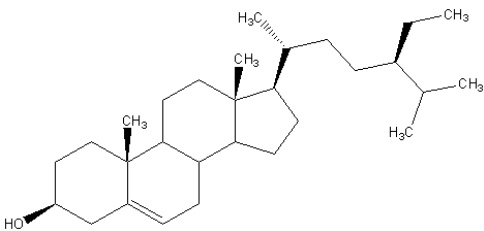
Боярышник полумягкий. Из плодов боярышника полумягкого выделены гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая, неохлорогеновая и кофейная кислота), флавоноиды (гиперозид, биокверцетин, витексин), дубильные вещества, тритерпеновые сапонины, гидроксикумарины и аминокислоты [77] (табл. 2). Из эфирного масла цветков боярышника полумягкого выделены ациклические монотерпеноиды: линалоол, α -терпинеол, гераниол, нерол; фенилпропаноиды: тимол и карвакрол; ароматические соединения: бензальдегид, 2-аминобензальдегид и 4-метоксибензальдегид. Кроме того, в эфирном масле цветков боярышника полумягкого описано присутствие дигидроэдулана [13].

Рядом авторов было проведено исследование фитохимического состава липофильного комплекса листьев боярышника полумягкого, в результате были выделены терпеноиды (линалоол, гераниол, эвгенол и др.); ароматические соединения (бензальдегид, бензофенон, фитол и др.); жирные кислоты (миристиновая, пальмитиновая, олеиновая, стеариновая и др.) [123].

Таблица 2 – Важнейшие компоненты сырья некоторых видов рода
Боярышник

№	Название БАС Структурная формула	Источник (вид ЛРС), источник литературы
1.	Гиперозид 	Плоды, цветки, листья боярышника кроваво-красного [40, 50, 55, 59, 86]; Плоды, цветки, листья боярышника однопестичного [27, 58, 65]; Плоды боярышника полумягкого [77].
2.	Рутин 	Листья боярышника кроваво-красного [88]; Цветки и листья боярышника однопестичного [27, 65].
3.	Витексин 	Плоды, цветки боярышника кроваво-красного [40, 42, 55, 59, 79]; Плоды, цветки, листья боярышника однопестичного [27, 58, 65]; Плоды боярышника полумягкого [77].
4.	Кверцетин 	Плоды, цветки боярышника кроваво-красного [6, 40, 42, 55, 59, 79]; Плоды боярышника однопестичного [27, 65].

5.	Хлорогеновая кислота 	Плоды, цветки, листья боярышника кроваво-красного [6, 40, 42, 55, 59, 79, 88]; Плоды боярышника однопестичного [27, 65]; Плоды боярышника полумягкого [77].
6.	Кофейная кислота 	Плоды, цветки, листья боярышника кроваво-красного [6, 40, 42, 55, 59, 79, 88]; Плоды боярышника однопестичного [27, 65]; Плоды боярышника полумягкого [77].
7.	Урсоловая кислота 	Плоды боярышника кроваво-красного [6, 40, 42, 55, 59, 70, 74]; Листья боярышника однопестичного [27, 65].

8.	β-Ситостерин 	Плоды боярышника кроваво-красного [40, 42].
----	--	--

1.1.4. Применение представителей рода Боярышник в медицине

Растения рода боярышник применяются в народной медицине с давних времен [120]. Первые упоминания о положительном влиянии боярышника на сердце относятся к первому веку нашей эры [131], а первое документальное упоминание об использовании боярышника в терапии сердечных заболеваний относится к концу 1800-х годов, тогда предполагалось, что боярышник можно использовать при стенокардии, гипертонии, гиперлипидемии, аритмии и других сердечно-сосудистых заболеваний [128].

В настоящее время боярышник не потерял своей популярности и считается универсальным сердечным средством, поскольку способен снижать основные факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний: воспаление, гипертонию и тромбоз [34, 58, 73, 75, 112, 128, 129, 131]. Так, для боярышника описаны следующие сердечно-сосудистые эффекты: гипотензивный, кардиотонический, коронарорасширяющий и антиаритмический [2, 3, 31, 58, 75, 80, 85, 87].

Препараты боярышника избирательно расширяют коронарные сосуды и сосуды головного мозга, улучшают коронарное кровообращение, оказывают тонизирующее действие на миокард, нормализуют сердечный ритм, усиливают снабжение сердца и мозга кислородом, тем самым улучшая обмен веществ в сердечной мышце. [34, 55, 59, 73]. По этой причине препараты боярышника назначают при функциональных расстройствах сердечной

деятельности, недостаточности кровообращения в пожилом возрасте, нарушениях сердечного ритма, стенокардии [34, 55, 59, 73].

Боярышник также высокоэффективен в качестве профилактики сердечных заболеваний при постоянных перегрузках и признаков износа организма [58]. Наличие кардиотонических и кардиопротекторных свойств боярышника подтверждено большим количеством клинических исследований [105, 121, 127].

Проведенный в 2003 году метаанализ рандомизированных плацебо-контролируемых исследований применения экстракта боярышника для лечения пациентов с хронической сердечной недостаточностью показал наличие благоприятного для сердечно-сосудистой системы действия по сравнению с плацебо [118]. Следует отметить, что эффективность лечения наблюдается в основном при применении экстракционных препаратов боярышника (настойки, жидкие экстракты), а не отдельных веществ. Возможно, данный факт обусловлен синергизмом биологически активных соединений сырья боярышника. Кроме того, синергизм также отмечается при совместном приеме препаратов боярышника и сердечных гликозидов, что позволяет снизить дозу последних [34, 73, 106].

Помимо действия на сердце и сосуды препараты боярышника также понижают возбудимость нервной системы, нормализуют сон и общее состояние организма, способствуют ускоренному выздоровлению после тяжелых болезней [55, 59, 74, 106], а также снижению уровня холестерина в крови. Так, описаны некоторые исследования, в ходе которых после применения препаратов боярышника у животных наблюдалось снижение уровня холестерина и триглицеридов в крови [112, 129].

Также в рандомизированном, двойном слепом исследовании использования многокомпонентного растительного препарата на основе боярышника при лечении дислипидемии в 2014 было выявлено, что указанный растительный препарат вызывал небольшое снижения содержания в плазме

липопротеинов низкой плотности после 12-недельного курса лечения, не вызывая при этом нежелательных явлений [103].

При длительном применении боярышника наблюдается антигипертензивный и умеренный диуретический эффект, что позволяет назначать его на начальных стадиях гипертонической болезни [55, 59, 106]. Кроме того, боярышник используют при расстройствах ЦНС, таких как депрессии и тревожные состояния [34, 73, 106]. Цветки и плоды боярышника содержат некоторое количество рутина и других флавоноидов, поэтому препараты на их основе обладают мягким сосудоукрепляющим действием [34, 73].

Некоторыми авторами отмечается наличие антибактериальной активности в отношении ряда микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* [109, 111]. Некоторые авторы описывают также антиоксидантное действие извлечений из сырья боярышника [96, 104, 110].

Интересен тот факт, что в 2016 году было опубликовано исследование, в ходе которого был сделан вывод, что экстракт из листьев боярышника стимулирует антипролиферативную активность, «арест» клеточного цикла и апоптоз в человеческих клетках рака толстого кишечника HT-29 и HCT-116 [115].

В сборах цветки боярышника применяются для лечения доброкачественной гиперплазии (аденоме) предстательной железы, а плоды – в терапии импотенции [40]. Боярышник назначают также при атеросклерозе, бессоннице, неврозах, при повышении функции щитовидной железы, а также в климактерическом периоде [34, 40, 42, 58, 73, 106].

Отвары из плодов боярышника используют в стоматологии для полосканий при пародонтозе, стоматитах и гингивитах [34, 73].

1.2. Стандартизация сырья и препаратов боярышника

В настоящее время плоды боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) как официальное сырьё включены в Государственную фармакопею РФ XIV издания, Государственную фармакопею Республики Беларусь и Республики Казахстан. Цветки данного вида боярышника включены в Государственную фармакопею РФ XIV издания и белорусскую фармакопею. Листья боярышника кроваво-красного описаны в фармакопее Республики Беларусь [15, 16, 17, 21, 23].

Качество плодов боярышника однопестичного (*Crataegus monogyna* Jacq.) регламентируется в Государственной фармакопее РФ XIV издания, Европейской фармакопее, немецкой, британской, французской фармакопеех и фармакопеех Республики Беларусь и Республики Казахстан. Цветки боярышника однопестичного как лекарственное растительное сырьё имеют место в Государственной фармакопее РФ XIV издания, французской и белорусской фармакопеех. Качество листьев с цветками боярышника однопестичного описано в европейской, немецкой, британской, французской и белорусской фармакопеех, а также в фармакопее США [16, 17, 21, 33, 101, 126].

Боярышник полумягкий (*Crataegus submollis* Sarg.) является декоративным растением и в настоящее время не включен ни в одну из фармакопей мира [33].

1.2.1. Качественные реакции

Фармакопейная статья в ГФ РФ XIV издания на **плоды** боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного предлагает обнаружение основных групп биологически активных соединений методом тонкослойной хроматографии в присутствии стандартного образца гиперозида в системе этилацетат — ацетон — толуол — муравьиная кислота безводная — вода (20:10:10:5:5).

Детекцию веществ проводят, обработав раствором дифенилбороксиэтиламина, затем раствором полиэтиленгликоля, после чего пластику сушат и проявляют в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм. Зона адсорбции гиперозида должна быть: желтого, зеленовато-желтого, желто-зеленого или желто-оранжевого цвета. В случае испытуемого образца на уровне зоны стандартного образца (СО) гиперозида должна обнаруживаться зона, соответствующая гиперозиду, и зона светло-синего или синего цвета выше уровня СО гиперозида [21]. Зарубежные фармакопеи (европейская, белорусская и фармакопея Республики Казахстан) предлагают для определения подлинности плодов боярышника использовать метод тонкослойной хроматографии на пластинке со слоем силикагеля Р (в системе растворителей: кислота муравьиная безводная – вода – метилэтилкетон – этилацетат 10:10:30:50, об/об/об/об), где в качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты, гиперозида и рутина, растворенных в метаноле. После прохождения фронта растворителя пластинку высушивают и опрыскивают 1% раствором аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты в метаноле, а затем 50 г/л раствором макрогола 400 в метаноле. Затем проводят детекцию в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм, в результате чего на пластинке раствора сравнения должны быть видны снизу-вверх следующие зоны флуоресценции: желто-коричневая зона (рутин), светло-голубая зона (хлорогеновая кислота) и желтовато-коричневая зона (гиперозид); в верхней трети пластинки светло голубая зона (кофейная кислота). В случае испытуемого раствора на пластинке обнаруживаются три зоны, сходные по расположению и флуоресценции с раствором сравнения, которые соответствуют хлорогеновой кислоте, гиперозиду и кофейной кислоте. [16, 17, 101]. На наш взгляд, вещества, используемые как стандартные образцы в данных методиках анализа (хлорогеновая кислота, кофейная кислота и рутин), широко встречаются в лекарственном растительном сырье, следовательно, они не являются специфичными для плодов боярышника.

В случае **цветков** боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного ГФ РФ XIV издания предлагает метод ТСХ на пластинках «Силуфол» в присутствии стандартных образцов гиперозида, кверцетина и рутина в системе: этилацетат-бутанон-2-муравлиная кислота-вода (30:10:5:5). Детекцию проводят после обработки пластины раствором дифенилборилоксиэтиламина и раствором полиэтиленгликоля в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм. На уровне пятна СО кверцетина должна появиться зона адсорбции с флуоресценцией желтого, оранжевого или оранжево-зеленого цвета; две зоны адсорбции с флуоресценцией желтого цвета, одна из которых на уровне гиперозида, другая – чуть выше; зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне рутина; зона адсорбции голубого-синего цвета ниже зоны адсорбции СО гиперозида; зона адсорбции с флуоресценцией от голубого до синего ниже зоны кверцетина. [21]. В фармакопее Республики Беларусь для оценки подлинности цветков боярышника описана методика ТСХ в системе: хлороформ-метанол (80:20 об/об), где в качестве СО используют гиперозид, проявление пластинки проводят в УФ-свете при длине волны 365 нм, а также при дневном свете, предварительно обработав пластинку раствором алюминия хлорида с последующим нагреванием. В результате чего в ультрафиолетовом свете должна быть заметна желто-зеленая флуоресценция (гиперозид), а в дневном свете – ярко-желтая окраска [16].

Мы считаем, гиперозид является одним из характерных флавоноидов для цветков боярышника, по этой причине вышеописанные подходы являются объективным и позволяют адекватно оценивать подлинность данного вида сырья.

Определение подлинности **листьев** боярышника кроваво-красного в соответствии с белорусской фармакопеей предполагает проведение химических реакций с аммония хлоридом, в результате которых появляется зеленовато-желтого окрашивания при нагревании; с раствором железа (III) аммония сульфата в присутствии кислоты хлористоводородной в бутаноле –

появление красного окрашивания при нагревании [16]. Мы предполагаем, что для усовершенствования данной методики целесообразно будет добавить метод тонкослойной хроматографии с использованием научно-обоснованных стандартных образцов.

Для **листьев с цветками** (цветущие побеги) боярышника однопестичного в фармакопее США предусмотрена методика ТСХ со следующими СО: рутин, хлорогеновая кислота, гиперозид и витексин в системе растворителей: этилацетат – вода – ледяная уксусная кислота – муравьиная кислота (10:2,6:1,1:1,1). Проявление пластинки проводят раствором 2-аминоэтилдифенилбората в метаноле (1%), затем обработкой раствором полиэтиленгликоля 4000 в метаноле (5%) и детектированием в УФ свете [126]. Кроме того, в фармакопее США предусмотрена методика определения подлинности цветущих побегов боярышника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, где в качестве стандартов используют растворенные в метаноле рутин, хлорогеновую кислоту, гиперозид и витексин. В качестве подвижной фазы используют раствор А, который состоит из смеси тетрагидрофурана, метанола и ацетонитрила (92,4:4,2:3,4). Раствор Б представляет собой 0,5% раствор фосфорной кислоты в воде. Детектирование проводят при длине волны 336 нм на колонке размером 4,0 мм x 10 см, с размерами частиц наполнителя L1 5 мкм. Температура колонки поддерживается на уровне 25°C. Данная методика представляется нам довольно затруднительной с точки зрения интерпретации результатов анализа и громоздкой.

Европейская и белорусская фармакопеи в разделе «Подлинность» листьев с цветками боярышника описывают метод ТСХ с раствором сравнения, состоящим из хлорогеновой кислоты и гиперозида, растворенных в метаноле. В качестве подвижной фазы используют систему: безводная кислота муравьиная-вода-метилэтилкетон-этилацетат (10: 10: 30: 50). Детекцию осуществляют обработкой растворами аминоэтилового эфира

дифенилборной кислоты в метаноле, а затем полиэтиленгликоля в метаноле, и проявлением в УФ свете при 365 нм [16, 101].

Из всего вышеперечисленного следует, что существуют некоторые разногласия касательно анализа цветущих побегов боярышника, которые, вытекают из использования различных подходов к стандартизации сырья. Следовательно, до сих пор остается нерешенным вопрос, какой метод может считаться наиболее целесообразным и подходящим, принимая во внимание особенности флавоноидного состава исследуемого сырья.

1.2.2. Количественное определение

Важной составляющей любой методики количественного определения лекарственного растительного сырья является экстракция, в том числе выбор оптимального экстрагента. В методиках количественного определения сырья боярышника в фармакопеях различных стран применяют отличающиеся друг от друга способы экстракции. Подробнее данные отличия представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Варианты экстракции сырья боярышника в различных фармакопеях

Фармакопеи	Плоды	Цветки	Листья с цветками	Листья
ГФ РФ XIV издания	Нагревание с 96% этанолом в течение 1 часа	Нагревание с 96% этанолом в течение 1 часа	-	-
Европейская фармакопея, издание 9.0	Нагревание с 70% этанолом в течение 30 минут	-	Нагревание с 60% этанолом в течение 10 минут	-

Фармакопея Республики Беларусь, второе издание	Нагревание с 70% этанолом в течение 30 минут	Нагревание с 96% этанолом в течение 1 часа	Нагревание с 60% этанолом в течение 10 минут	Нагревание с 70% этанолом в течение 1 часа
Фармакопея Республики Казахстан, первое издание	Нагревание с 70% этанолом в течение 30 минут	-	-	-
Фармакопея США, 32 издание	-	-	Нагревание с метанолом в течение 5 часов	-

Таким образом, время экстракции и экстрагент для одних и тех же видов сырья различаются, что свидетельствует о необходимости проведения дополнительных исследований по подбору оптимального экстрагента и условий экстракции. Следовательно, для разработки метода количественного определения суммы флавоноидов важно подобрать экстрагент с учетом фитохимических особенностей лекарственного растительного сырья.

Для количественного определения **плодов** боярышника ГФ РФ XIV издания описывает спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид после трехкратного нагревания в течение 60 мин со спиртом на водяной бане. Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид должна быть не менее 0,04 %, определение проводят при длине волны 410 нм [21]. Фармакопеи фармакопеях Республики Беларусь и Республики Казахстан, а также европейская фармакопея для данного вида сырья регламентируют спектрофотометрическое определение содержания процианидинов при длине волны и 555 нм (Европейская фармакопея и фармакопея Республики Беларусь) и 545 нм (фармакопея Республики Казахстан) в пересчете на цианидина хлорид, которого должно быть не менее

0,06% (Европейская фармакопея и фармакопея Республики Беларусь) и не менее 1,0% (фармакопея Республики Казахстан). Помимо вышеперечисленного, фармакопея Республики Беларусь предлагает также методику хромато-спектрофотометрического определения содержания флавоноидов в пересчете на гиперозид при длине волны 365 нм, содержание которых в высушенных плодах должно быть не менее 0,06% [16, 17, 101]. Таким образом, в представленных нормативных документах описываются различные подходы к количественному определению содержания флавоноидов в плодах боярышника, а также имеет место различие в выборе показателя качества (сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид или сумма процианидинов).

В **цветках** боярышника по ГФ РФ XIV издания и фармакопее Республики Беларусь определяют содержание гиперозида хромато-спектрофотометрическим методом при длине волны 365 нм, гиперозида должно быть не менее 0,5 % [16, 21]. Однако на наш взгляд, хромато-спектрофотометрическое определение, довольно громоздко и затруднительно в исполнении.

Количественное определение **листьев** боярышника по фармакопее Республики Беларусь предполагает спектрофотометрическое определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (должно быть не менее 0,25%) при длине волны 409 нм и спектрофотометрическое определение содержания суммы процианидинов в пересчете на цианидина хлорид, которого должно быть не менее 5,0%, при длине волны 550 нм [16]. Нам представляется, что выводы относительно объективности данной методики определения могут быть сделаны только после глубокого исследования химического состава данного сырья.

Листья с цветками боярышника в фармакопее США количественно анализируют методом ВЭЖХ, с помощью которой определяют содержание С-гликозилированных флавонов в пересчете на витексин (должно быть не менее 0,6%) и О-гликозилированных флавонов в пересчете на гиперозид (должно

быть не менее 0,45%). Детектирование при определении С-гликозилированных флавонов проводят при длине волны 336 нм на колонке размером 4 мм х 10 см и скоростью потока около 1,0 мл в минуту. При определении О-гликозилированных флавонов (термин взят из фармакопеи, при этом, на наш взгляд, в данном случае имеются в виду флавонолы) используют детекцию при длине волны 370 нм на колонке размером 4,6 мм х 25 см со скоростью потока 1,5 мл в минуту [126].

Количественный анализ биологически активных соединений в листьях с цветками по Европейской фармакопее и фармакопее Республики Беларусь включает спектрофотометрическое определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид (должно быть не менее 1,5%), при длине волны 410 нм (Европейская фармакопея и фармакопея Республики Беларусь). На наш взгляд, в случае листьев с цветками боярышника необходимо дополнительное исследование по выбору аналитической длины волны, характерной для веществ, содержащихся в сырье.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. В результате проведенного анализа литературы выявлены перспективные с медицинской и фармацевтической точки зрения виды Боярышника – боярышник кроваво-красный, боярышник однопестичный и боярышник полумягкий.
2. Исследуемые виды боярышника обладают большой сырьевой базой на территории Российской Федерации. Так, боярышник кроваво-красный и боярышник однопестичный широко встречаются в диком виде, а боярышник полумягкий повсеместно культивируется, кроме того, данный вид боярышника отличаются быстрым ростом и более крупными плодами по сравнению с другими дикорастущими видами боярышника.
3. Растения рода Боярышник обладают определенным набором фармакологических свойств, обусловленных флавоноидами, процианидинами, тритерпеновыми сапонинами, антоцианами, органическими

кислотами, однако химический состав некоторых видов рода Боярышник изучен в недостаточной степени.

4. Обнаружено, что методические и методологические подходы к анализу сырья растений рода боярышник в отечественной и зарубежных фармакопеях сильно различаются. Данный факт подтверждает необходимость углубленного исследования химического состава сырья боярышника для определения диагностически значимых веществ и подбора оптимальных экстрагентов и условий экстракции.

5. На сегодняшний день фармакопейные статьи на листья и листья с цветками боярышника в Российской Федерации отсутствуют. Данный факт не позволяет применять вышеуказанные виды сырья в медицинской и фармацевтической практике. Следовательно, актуальными являются исследования, направленные на разработку проектов фармакопейных статей на новые виды ЛРС «Боярышника листья» и «Боярышника листья с цветками».

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами данной диссертационной работы являлись образцы сырья боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.), боярышника однопестичного (*Crataegus monogyna* Jacq.), боярышника полумягкого (*Crataegus submollis* Sarg.), заготовленные в период с 2015 по 2017 гг.

Изученное ЛРС:

- Плоды, цветки, листья и побеги боярышника кроваво-красного, которые были заготовлены в Самарском Ботаническом саду в 2015-2017 гг.
- Листья боярышника однопестичного, заготовленные в Ботаническом саду г. Самара в 2015-2017 гг.
- Плоды, цветки, листья и побеги боярышника полумягкого, заготовленные в Ботаническом саду г. Самара в 2015-2017 гг.
- Промышленные образцы плодов боярышника: «Лекрасэт», «Красногорсклексредства».

Были изучены следующие лекарственные растительные препараты и фармацевтические субстанции:

1. Жидкие экстракты плодов, цветков, листьев и побегов боярышника кроваво-красного (70% этиловый спирт);
2. Жидкие экстракты плодов, цветков, листьев и побегов боярышника полумягкого (70% этиловый спирт).
3. Индивидуальные вещества: 4-О-β-D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты, 3-О-β-D-глюкопиранозид эргостерина, трифолин, кверцитрин, витексин, 2''-О-рамнозид витексина, гиперозид, кофейная кислота, олеаноловая кислота, 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона.

Для проведения диссертационной работы использовалась следующая приборная база:

1. Весы Мора ВА-4М.
2. Весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20.
3. Весы электронные марки САРТО ГОСМ ЛВ 210-А.
4. Весы аналитические «Mettler Toledo XS 204»;
5. Масс-спектрометр «KratosMS-30» и спектрометр «BrukerAM-300».
6. Спектрофотометр модели «Specord 40» (AnalytikJena) и «СФ-2000» (ОКБ Спектр).
7. Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ».
8. Хроматографические системы: *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода, хлороформ-этанол-вода, хлороформ-этанол в различных соотношениях.
9. Термостат суховоздушный «ТС-1/80».
10. Цифровые микроскопы «Motic» DM-111 и «Motic» DM-39C-N9GO-A.
11. Люминисцентный микроскоп Альтами-ЛЮМ-2.
12. Сита с отверстиями различного диаметра.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа

В ходе диссертационной работы исследовались свежие и высушенные листья боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного. Сушку осуществляли естественным путём [63]. Пробоподготовку высушенных листьев осуществляли в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания [19]. Свежее сырьё для анализа фиксировалось в смеси: этиловый спирт, глицерин и вода в соотношении 1:1:1.

Морфолого-анатомический анализ проводили по общей фармакопейной статье «Листья» в соответствии с ГФ РФ XIV издания [19]. Образцы сырья рассматривали невооруженным глазом и с использованием лупы (x10). Размеры исследуемых объектов определяли при помощи линейки и ПО цифрового микроскопа. Цвет объектов оценивали при дневном освещении визуально; запах – при разламывании фрагментов сырья; вкус – пробуя водное извлечение измельченного сырья. Микроскопировали в проходящем свете на белом поле, используя микроскопы марки Motic: модели DM-111 и DM-39C-N9GO-A. Использовался метод люминесцентной микроскопии на микроскопе «Альтами ЛЮМ-2» (Россия) с использованием голубого светофильтра 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт), спектральный диапазон возбуждения люминесценции при которой составлял: 420-550 нм.

Гистохимические реакции проводили по описанным ниже методикам.

1. Гистохимическая реакция для обнаружения кутинизированной поверхности эпидермы. На микропрепарат наносили несколько капель раствора Судана III, накрывали предметным стеклом и микроскопировали. Кутинизированные оболочки клеток эпидермиса окрашивались в розовый цвет [18, 30, 42].

Приготовление раствора Судана III. 0,3 г Судана III растворяли в 100 мл спирта этилового 70%, нагревали до кипения, кипятили 3-5 минут, охлаждали, фильтровали и доводили объем до метки спиртом этиловым 70% [18].

2. Гистохимическая реакция для обнаружения одревесневших оболочек клеток. На микропрепарат наносили несколько капель раствора сернокислого анилина, накрывали покровным стеклом и микроскопировали. Одревесневшие и лигнифицированные оболочки клеток окрашивались в желтый цвет [18, 30, 42].

Приготовление раствора сернокислого анилина. 2,0 г сернокислого анилина растворяли в смеси 4 мл ледяной уксусной кислоты и 194 мл спирта этилового 50% [42].

3. Гистохимическая реакция для обнаружения крахмалоносных клеток. На микропрепарат капали раствор Люголя, накрывали предметным стеклом и микроскопировали. Крахмальные включения окрашивались в сине-фиолетовый цвет [18, 30].

Приготовление раствора Люголя. 1 г йода и 2 г калия йодида растворяли в 17 мл воды, хорошо перемешивали [18].

2.2.2. Химические методы анализа

Реакция с раствором железа (III) хлорида использовалась для выявления соединений, имеющих незамещенные фенольные ОН-группы. После добавления 1% раствора железа (III) хлорида спиртового наблюдается коричневое окрашивание (3-ОН-группы), зеленое окрашивание (ОН-группа в положении 5) или синее окрашивание (3¹,4¹,5¹-ОН-группы) [42].

Цианидиновая реакция (проба Shinoda) применялась для выявления флавоноидов. К 1-2 мл извлечения добавляли 5 капель хлороводородной кислоты концентрированной и 5-10 мг цинка, в результате проявлялась красно-малиновое окрашивание [35, 42].

Цианидиновая реакция с модификацией по Брианту – следующий этап вышеописанной цианидиновой реакции. Раствор, полученный в ходе первой реакции, разводили водой очищенной (1:1) и прибавляли *n*-бутанол. Присутствие агликонов флавоноидов обнаруживалось в случае перехода красно-малинового окрашивания в органический слой. Присутствие гликозидов обнаруживалось по распределению окраски в нижнем неорганическом слое [42].

Реакция с щелочным раствором диазобензолсульфокислоты использовалась для обнаружения свободных ароматических ОН-групп. К 1-2 мл извлечения прибавляли 1-2 капли раствора диазобензолсульфокислоты (ДСК). Наблюдалось окрашивание раствора в желтоватый цвет [42].

Реакция с алюминия (III) хлоридом использовалась для обнаружения флавоноидов. К 1-2 мл исследуемого извлечения прибавляли 1-2 мл 3% раствора алюминия (III) хлорида спиртового. При наличии флавоноидов наблюдалось желтое окрашивание, и желто-зеленая флуоресценция при $\lambda = 366$ нм [42].

Реакция Сальковского применялась для обнаружения сапонинов и стеринов. Сухой остаток растирали с небольшим количеством хлороформа и добавляли серную кислоту концентрированную. После чего в случае наличия сапонинов наблюдалось появление окрашивания от желтого до красного цвета [35, 42, 56].

Реакция Либермана-Бурхарда использовалась для обнаружения стероидного цикла. К 1-2 мг вещества добавляли 1 мл смеси концентрированной серной кислоты и уксусного ангидрида (50:1). В случае наличия веществ стериновой природы наблюдалось проявление окраски от красно-фиолетовой до синей [9, 35, 42].

2.2.3. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ) [18, 44, 53, 70, 93]

Тонкослойная хроматография применялась для изучения извлечений из листьев растений рода боярышник.

Использовались следующие хроматографические пластинки: «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». До проведения хроматографического исследования удаляли влагу из сорбента, предварительно помещая пластинки в термостат при температуре 100-105°C.

В ходе исследования апробировалась следующая система растворителей: хлороформ – спирт этиловый 96% - вода (26:16:3).

Образцы извлечений наносили капилляром на линию старта, после этого пластинку погружали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами системы растворителей в течение 24 часов. Хроматографирование осуществляли восходящим способом. Анализ считали завершенным, когда фронт растворителя достигал 7-8 см.

После извлечения из системы пластинки высушивали и оценивали визуально при дневном свете. Дополнительно пластинки просматривали в УФ-свете при 254 и 366 нм, затем обрабатывали щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, раствором алюминия хлорида, спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты.

2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография [42, 74]

Данный метод применялся для изучения фитохимического состава листьев боярышника кроваво-красного. Для проведения колоночной хроматографии использовались колонка с диаметром 8 см и высотой сорбента 5 см, сорбент – силикагель КСКГ измельченный (фракция 0,04-0,10 мм, ГОСТ 3956-76, производитель: Sorbis Group). В ходе анализа использовались следующие элюенты: хлороформ, спирт этиловый 96%, смеси спирта этилового и хлороформа в различных соотношениях и вода очищенная.

Для дальнейшей очистки фракций, полученных в ходе колоночной хроматографии и содержащих отдельные биологически активные соединения листьев боярышника кроваво-красного, использовались колонка с диаметром 2 см и высотой сорбента 2 см и следующие сорбенты: силикагель, полиамид для колоночной хроматографии (производитель Woelm Pharma, Германия) и сефадекс (марка LH-20).

2.2.4. Физико-химические методы анализа

1. ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия.

ЯМР ^1H спектры и ЯМР ^{13}C спектры получали на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и колебании температурного

режима ионного источника от 100 до 250 °С. Определение температуры плавления выделенных соединений проводили на блоке Кофлера [9, 19].

2. Спектрофотометрия [18, 42, 44, 45].

Спектрофотометрия использовалась для определения содержания соединений фенольной природы в извлечениях из сырья растений рода боярышни. Кроме того, данный метод применялся для анализа индивидуальных веществ, выделенных из листьев боярышника кроваво-красного. Анализ проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) и спектрофотометре «СФ-2000» (ОКБ Спектр) при длинах волн в диапазоне 190-600 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Результаты спектрофотометрического определения обрабатывали, используя программу «WinAspect Excel».

2.2.5. Фармакологические методы анализа

В рамках данной работы проводилось исследование диуретической и антидепрессантной активности, а также острой токсичности водно-спиртовых извлечений на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого на кафедре фармакологии имени з.д.н. РФ проф. А.А. Лебедева Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ).

Исследования проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 200-220 г. Животные содержались в условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде. Каждая группа состояла из десяти животных. Исследуемые фармакологические средства вводили внутривентрикулярно через зонд в дозе 100 мкл/кг [60]. Контролем служил 70% этиловый спирт.

Диуретическую активность жидких экстрактов боярышника в дозе 100 мкл/кг определяли в хронических экспериментах [41].

Препаратом сравнения для 4-х ч экспериментов являлся диуретик фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг (с коротким латентным периодом и продолжительностью действия), препаратом сравнения для 24-х ч

экспериментов – диуретик гипотиазид в средней терапевтической дозе 20 мг/кг (с длительным латентным периодом и продолжительностью действия). В день эксперимента животным опытной группы вводилось внутривентрикулярно фармакологическое средство на фоне 3% водной нагрузки, контролем для препаратов сравнения служила вода в идентичном объеме. Животные помещались в обменные клетки. Собирались 4-х ч и 24-х ч порции мочи. Определялась почечная экскреция воды, регистрировалась концентрация натрия и калия методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3.

Исследование антидепрессантной активности проводили с использованием теста «Отчаяния» [84]. При этом в течение пяти минут фиксировали индивидуальное время активных попыток животных выбраться из воды. В качестве синтетического препарата сравнения использовался антидепрессант амитриптилин в дозе 5 мг/кг. Контролем в этом случае служила вода в объеме 0,5% от массы тела животного. Все препараты вводили однократно на фоне аналогичной водной нагрузки, эксперимент проводили через 1 ч после введения препарата.

Кроме того, проводилось изучение острой токсичности жидких экстрактов боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого [51]. Опыты по изучению острой токсичности проводились на 50 белых беспородных половозрелых крысах обоего пола. Животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой. В первый день животные находились под непрерывным наблюдением, общая длительность одного эксперимента составляла 14 дней.

2.2.6. Микробиологические методы анализа

В ходе диссертационного исследования проводился скрининговый анализ противомикробной активности водно-спиртовых извлечений на 70% этиловом спирте из плодов, цветков и листьев боярышника кроваво-красного,

а также плодов, цветков, листьев боярышника полумягкого. Контролем служил экстрагент – 70 % этиловый спирт. Определение минимальной ингибирующей концентрации осуществляли с использованием метода двойных серийных разведений в бульоне (микрометод) в соответствии с МУ 4.2.1890-04. Учет результатов осуществляли визуально, сравнивая рост микроорганизма в присутствии препарата с ростом культуры в ячейке без него. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма [57].

Тестовыми культурами в опытах по исследованию антимикробной активности жидких экстрактов боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого являлись: *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 27853), *Staphylococcus aureus* (штамм 25923), *Escherihia coli* (штамм 25922), *Bacillus cereus* (клинические штаммы), *Candida albicans* (клинические штаммы).

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОРФОЛОГО- АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА БОЯРЫШНИК

Анатомическое строение листа и прилистников боярышника кроваво-красного подробно изложено в недавних работах отечественных ученых [81, 88]. Так, были определены важные диагностические признаки листьев боярышника кроваво-красного: четковидные утолщения клеток эпидермиса верхней стороны листа, извилистые клетки нижнего эпидермиса с погруженными устьицами аномоцитного типа (2-5 клеток) простые одноклеточные волоски, закрепленные в центре розетки, состоящей из 5-7 клеток и окрашенные в бурый цвет, многоклеточные железки на многоклеточной ножке [81, 88].

Как известно, одним из наиболее значимых методов диагностики подлинности лекарственного растительного сырья является петиолярная анатомия [62, 76]. Строение черешка листа отличается разнообразием и видовой специфичностью, что в свою очередь позволяет проводить адекватную диагностику среди близкородственных видов. По этой причине мы решили подробно остановиться на сравнительном изучении петиолярной анатомии листьев родственных фармакопейных видов боярышника - боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного.

Черешок листа боярышника кроваво-красного достигает 3 см в длину, а черешок боярышника однопестичного - 2 см. У основания листа изучаемых видов боярышника имеются прилистники серповидно-изогнутой формы.

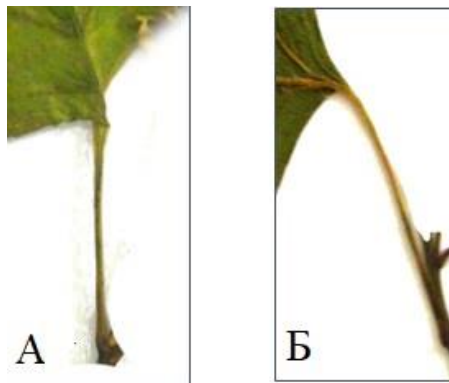


Рисунок 6 – Черешок боярышника кроваво-красного (А) и боярышника однопестичного (Б)

Морфологически черешок можно разделить на три части: базальную, медиальную и апикальную части.

Базальная часть черешка боярышника кроваво-красного на поперечном сечении почти округлая с незначительной впадиной с верхней стороны листа (рис. 7).

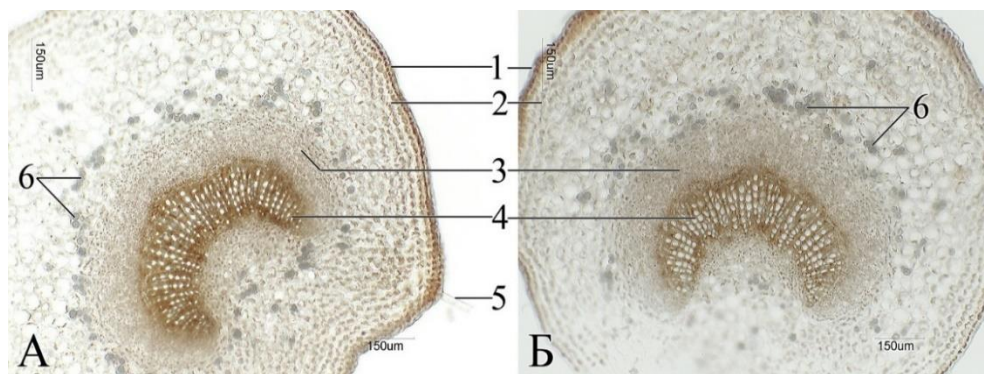


Рисунок 7 – Базальная часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А, Б – общий вид (x100)

Обозначения: 1 – эпидермис; 2 – колленхима; 3 – флоэма; 4 – ксилема; 5 – трихома; 6 – друзы

Срез медиальной части черешка боярышника кроваво-красного неровный с двумя сильно вытянутыми ребрами. Апикальная часть черешка угловатая, ребристая, со значительным жестким опушением (рис. 8).



Рисунок 8 – Черешок боярышника кроваво-красного. Поперечный срез:

А – Медиальная часть (x100); Б – Апикальная часть (x100)

Обозначения: 1 – железистая трихома; 2 – эпидермис; 3 – колленхима; 4 – основная паренхима; 5 – ксилема; 6 – флоэма; 7 – друзы

Базальная часть черешка боярышника однопестичного на поперечном сечении округлая с незначительной впадиной с верхней стороны (рис. 9).

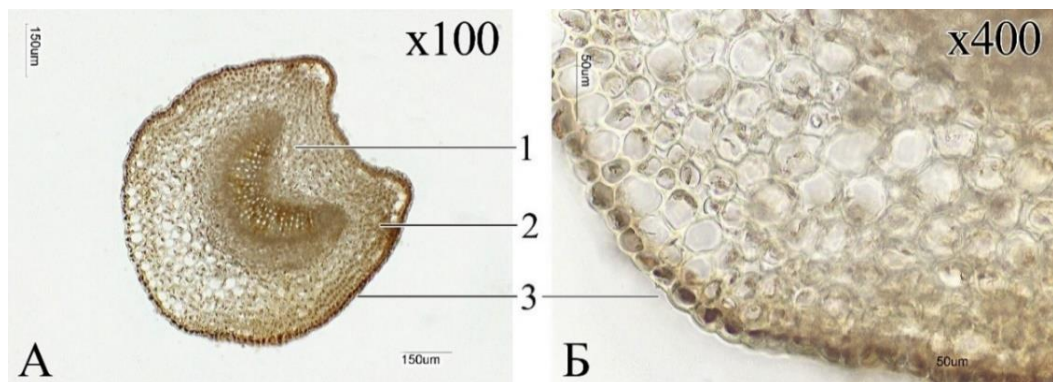


Рисунок 9 – Базальная часть черешка боярышника однопестичного.

Поперечный срез: А – Общий вид (x100); Б – Общий вид (x400)

Обозначения: 1 - основная паренхима, 2 - колленхима, 3 - эпидермис

Медиальная часть черешка боярышника однопестичного имеет два сильно оттянутых ребра, апикальная - угловато-ребристая (рис. 10).



Рисунок 10 – Черешок боярышника однопестичного. Поперечный срез:

А – Медиальная часть (x100); Б – Апикальная часть (x100)

Обозначения: 1 – эпидермис; 2 – колленхима; 3 – основная паренхима

При рассмотрении среза базальной части черешка боярышника кроваво-красного обнаруживается закрытый коллатеральный пучок, который располагается в центре и имеет форму полумесяца. Проводящие элементы ксилемы лигнифицированы, что подтверждается качественной реакцией с раствором сернокислого анилина (рис. 11).

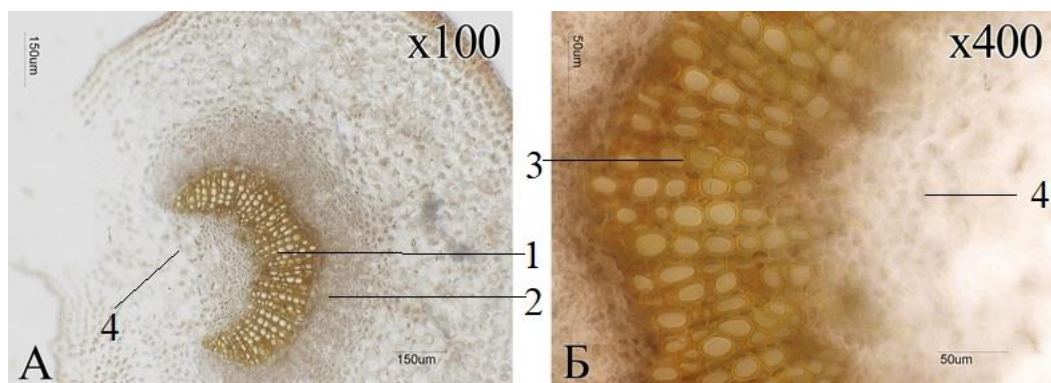


Рисунок 11 – Базальная часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А – общий вид, окрашенный сернокислым анилином (x100); Б – фрагмент проводящего пучка, окрашенный сернокислым

анилином (x400)

Обозначения: 1 ксилема; 2 – флоэма; 3 – проводящие элементы ксилемы; 4 – основная паренхима сердцевины

Элементы ксилемы в проводящем пучке черешка боярышника кроваво-красного можно идентифицировать по ярко-желтой флуоресценции лигнифицированных клеточных стенок в УФ-свете. Клетки ксилемной паренхимы содержат аморфный протопласт, люминесцирующий оранжевым цветом (рис. 12).

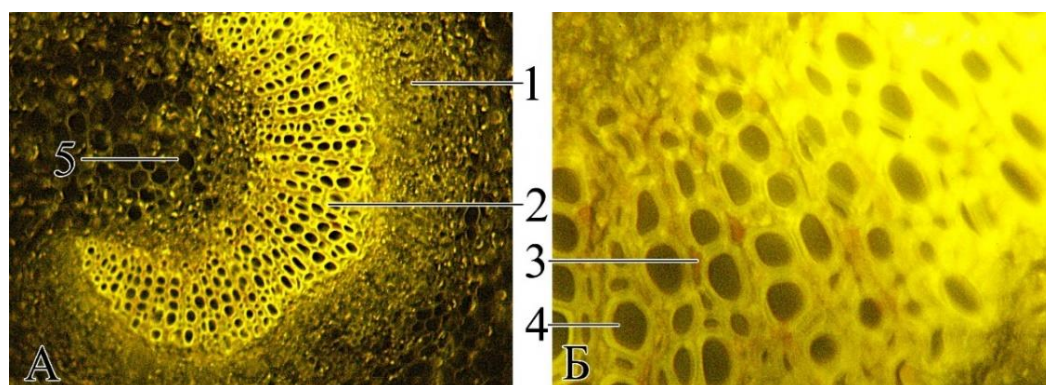


Рисунок 12 – Базальная часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А – люминесценция, фрагмент (x100);

Б – люминесценция, фрагмент проводящего пучка (x400)

Обозначения: 1 – флоэма; 2 – ксилема; 3 – пигмент ксилемы; 4 – проводящие элементы ксилемы; 5 – основная паренхима сердцевины

Черешок боярышника кроваво-красного по всей длине армирован уголково-колленхимой, которая расположена в большей степени с верхней и нижней стороны черешка. Причем в медиальной части колленхима развита сильнее, чем в апикальной части черешка. Клетки колленхимы апикальной части угловатые, неправильной формы с заметным протопластом в полости (рис. 13). В медиальной части черешка колленхима преимущественно уголково-пластинчатого типа, локализованная под эпидермой по всему периметру черешка (рис. 14).

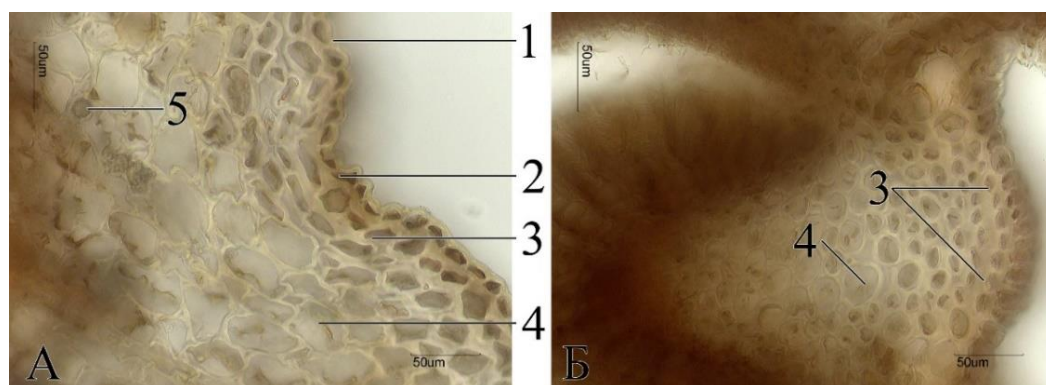


Рисунок 13 – Апикальный часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А - дорзальная сторона (x400);

Б – вентральная сторона (x400)

Обозначения: 1 – эпидермис; 2 - пигмент эпидермиса; 3 – колленхима; 4 -основная паренхима; 5 – друзы

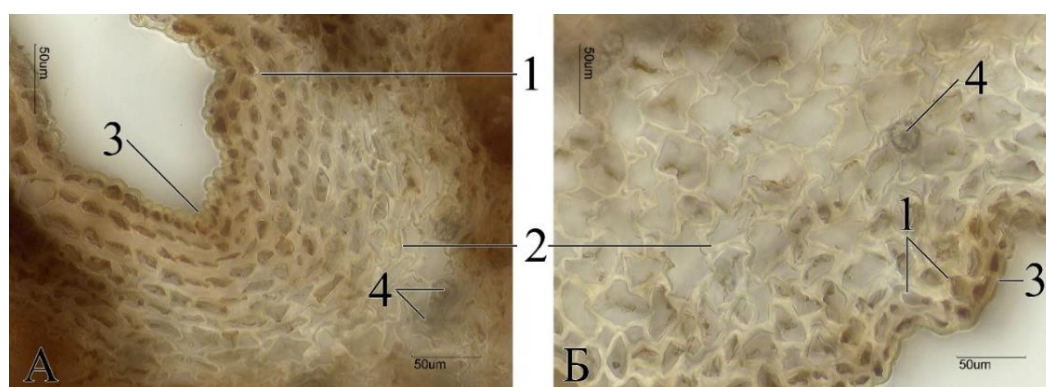


Рисунок 14 – Медиальная часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А – вентральная сторона (x400);

Б – дорзальная сторона (x400)

Обозначения: 1 – колленхима; 2 - основная паренхима; 3 – эпидермис; 4 -друзы

Черешок боярышника кроваво-красного сильно паренхимизирован, причем паренхима увеличивается от листовой поверхности к базальной части черешка. Клетки паренхимы тонкостенные, округлой формы с мелкими межклетниками. Протопласты аморфные, светло-коричневого цвета. В паренхиме встречаются крупные друзы оксалата кальция округлой и

звездчатой формы (рис. 15). При микроскопировании в УФ-свете на малом увеличении друзы хорошо видны по светло-желтому свечению (рис. 15).

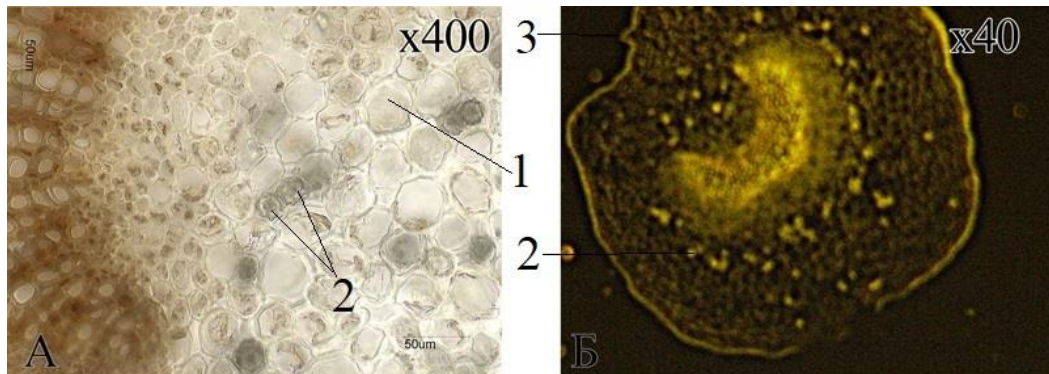


Рисунок 15 – Базальная часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А - Фрагмент проводящего пучка (x400);

Б - Общий вид, люминесценция (x40)

Обозначения: 1 – клетки основной паренхимы; 2 – друзы; 3 - кутикула

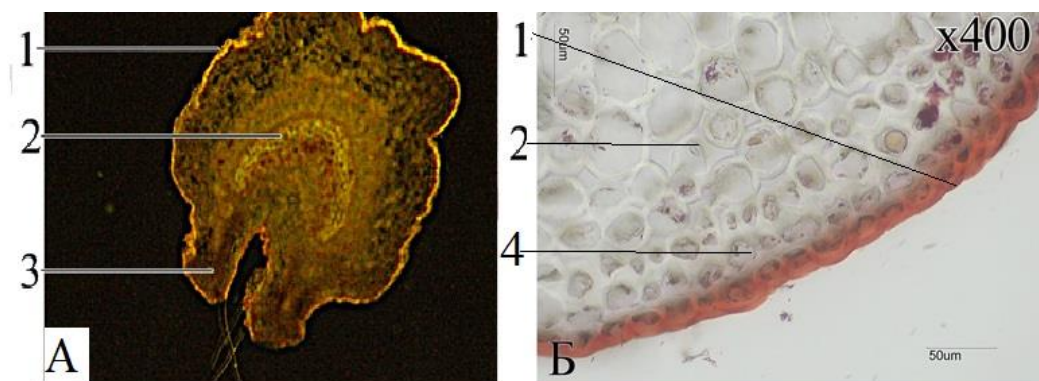


Рисунок 16 – Черешок боярышника кроваво-красного.

А - Общий вид медиальной части, люминесценция (x40);

Б - Фрагмент кутикулы ребра черешка после окрашивания Суданом III (x400)

Обозначения: 1 – кутикула; 2 – ксилема; 3 - основная паренхима;
4 – колленхима ребра

Клетки паренхимы черешка боярышника кроваво-красного также могут люминесцировать, в основном, за счет протопластов, содержащих фенольные соединения. С поверхности черешок покрыт эпидермой. Эпидермальные

клетки мелкие, округлые, со значительно утолщенной кутикулой. При освещении эпидермы УФ-светом кутикула люминесцирует ярко-желтым светом, цитоплазма и пластиды эпидермы люминесцируют ярко-оранжевым цветом (рис. 16). Кроме того, кутикула окрашивается Суданом III вместе с липофильными протопластами клеток эпидермы в розовый цвет (рис. 16).

Клетки эпидермы черешка боярышника кроваво-красного вытянутые, угловатые, почти прямоугольной формы (рис. 17).

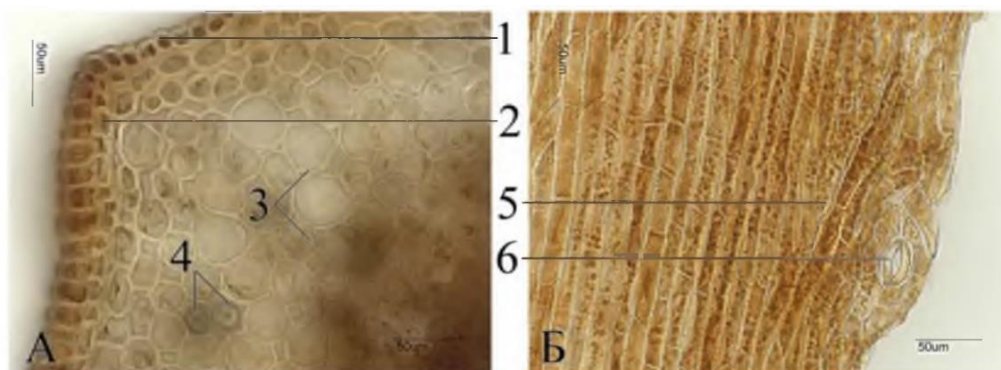


Рисунок 17 – Черешок боярышника кроваво-красного. Поперечный срез: А - ребро апикальной части черешка (х400); Б – эпидермис (х400)

Обозначения: 1 - эпидермис с кутикулой; 2 – колленхима; 3 – основная паренхима; 4 – друзы; 5 - клетки эпидермиса; 6 - устьичный аппарат

Поверхность черешка боярышника кроваво-красного неоднородно опушена простыми кроющими трихомами бичевидной формы. Клеточные стенки трихом утолщенные, целлюлозные. Внутри клеток протопласт не диагностируется, люминесценция клеточных стенок слабая. У основания черешка трихомы отсутствуют. Наибольшее количество трихом отмечается в апикальной части черешка (рис. 18).

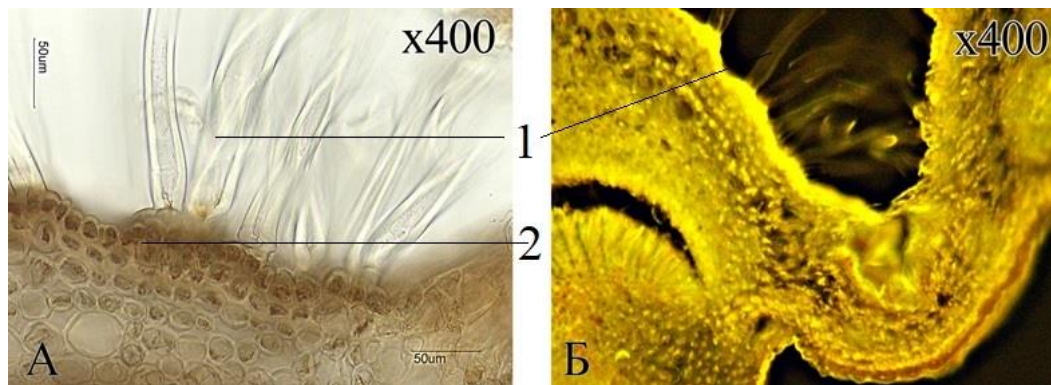


Рисунок 18 – Апикальная часть черешка боярышника кроваво-красного.

Поперечный срез: А – фрагмент черешка (x400);

Б – фрагмент черешка, люминисценция (x400)

Обозначения: 1 – трихомы; 2 - эпидермис с кутикулой

Проводящая система черешка боярышника однопестичного представлена закрытым коллатеральным пучком в форме полумесяца, который расположен в центре и утраивается к апикальной части из-за жилкования листовой пластинки (рис. 19), кроме того, черешок армирован колленхимой.

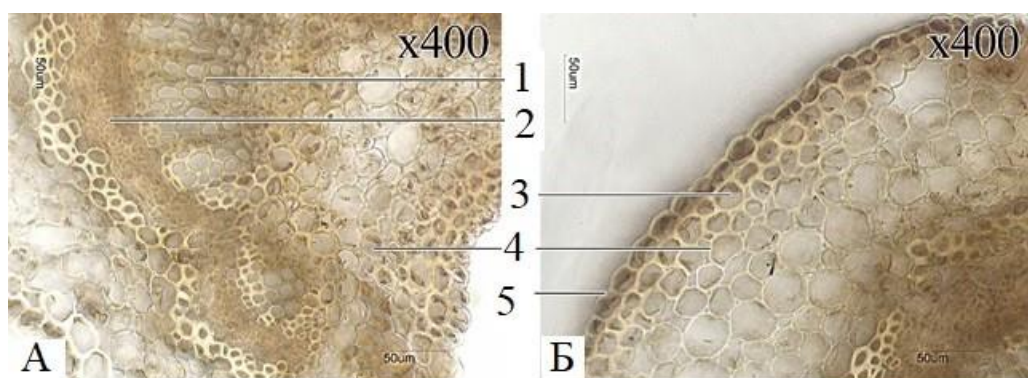


Рисунок 19 - Апикальная часть черешка боярышника однопестичного.

Поперечный срез: А - Фрагмент проводящего пучка (x400);

Б – Фрагмент (x400)

Обозначения: 1 – ксилема; 2 – флоэма; 3 – колленхима; 4 – основная паренхима, 5 – эпидермис

Проводящие элементы ксилемы черешка боярышника однопестичного лигнифицированы, что подтверждается качественной реакцией с раствором сернокислого анилина (рис. 20). Микроскопирование в УФ-свете позволяет выявить ксилемные элементы по ярко-желтой флуоресценции лигнифицированных клеточных стенок (рис. 21).

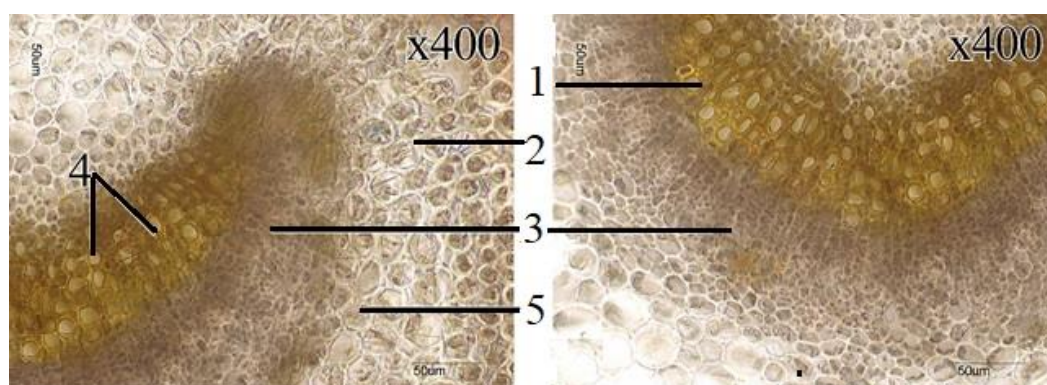


Рисунок 20 – Базальная часть черешка боярышника однопестичного.

Поперечный срез: А - Фрагмент проводящего пучка (х400), окрашенный раствором сернокислого анилина; Б – Фрагмент проводящего пучка, окрашенный раствором сернокислого анилина (х400)

Обозначения: 1 - ксилемный луч; 2 - основная паренхима; 3 – флоэма; 4 – проводящие элементы ксилемы; 5 - друзы.

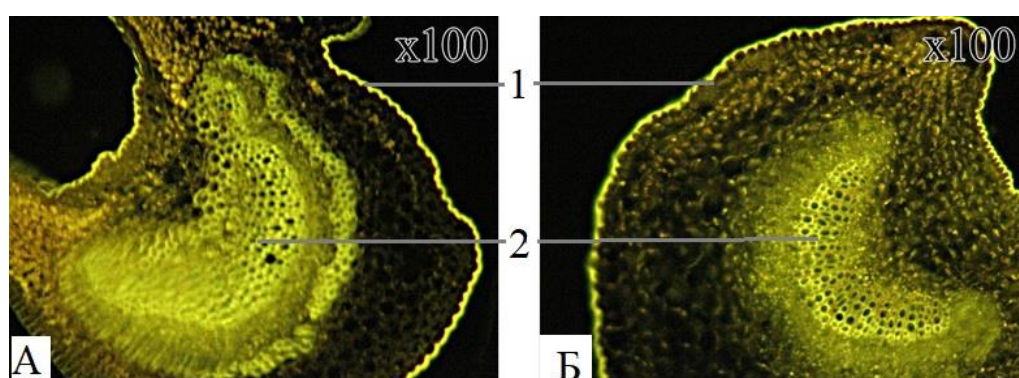


Рисунок 21 – Базальная часть черешка боярышника однопестичного.

Поперечный срез: А, Б – люминесценция, фрагмент (х100);

Обозначения: 1 – эпидермис; 2 – проводящие элементы ксилемы

Поверхность черешка боярышника однопестичного покрыта эпидермой со слабомаркированной кутикулой, окрашивающейся раствором Суданом III вместе с протопластами клеток эпидермы в розовый цвет (рис. 22). Черешок листа боярышника однопестичного не опушен, что отличает его от боярышника кроваво-красного (рис. 23).

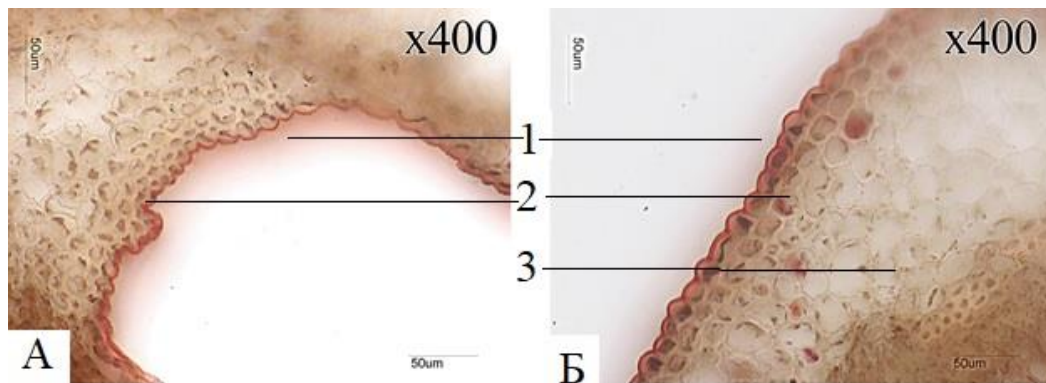


Рисунок 22 – Медиальная часть черешка боярышника однопестичного.

Поперечный срез: А – Фрагмент, окрашенный Суданом III (x400);

Б – Фрагмент, окрашенный Суданом III (x400)

Обозначения: 1 - эпидермис с кутикулой; 2 – колленхима; 3 основная паренхима

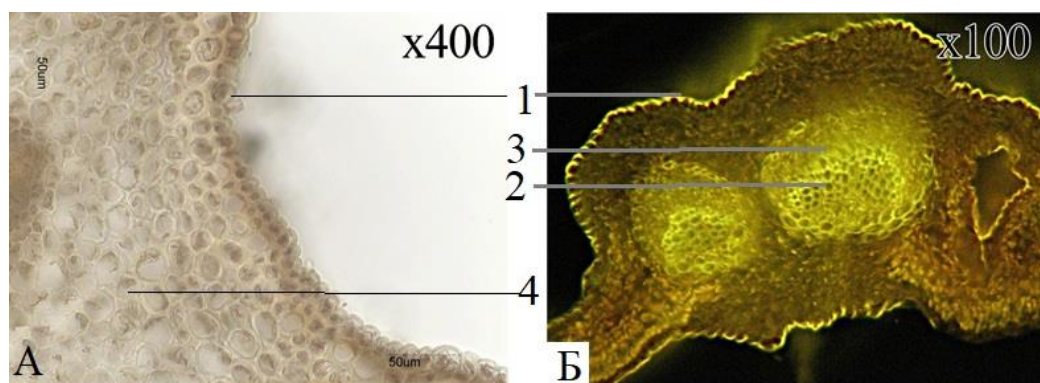


Рисунок 23 – Апикальная часть черешка боярышника однопестичного.

Поперечный срез: А – Фрагмент (x400); Б – Фрагмент, люминесценция (x400)

Обозначения: 1 - эпидермис с кутикулой; 2 – элементы ксилемы; 3 – флоэма; 4 – основная паренхима

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Основными петиолярными признаками боярышника кроваво-красного являются: особенности очертания в базальной, медиальной и апикальной части, значительная кутинизация эпидермы, характер люминесценции кутина и протопласта, опушение, локализованное, в основном, в апикальной части черешка.
2. Основными признаками петиолярной анатомии черешка боярышника однопестичного являются: армирование проводящего пучка уголкового колленхимой; слабозаметная кутинизация эпидермы; отсутствие опушения.
3. Результаты анатомо-морфологического исследования черешка боярышника кроваво-красного включены в проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Боярышника кроваво-красного листа».

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА БОЯРЫШНИК

Фитохимический состав фармакопейных видов сырья (цветки и плоды) боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) хорошо изучен и описан в большом количестве литературных источников [6, 40, 42, 55, 59, 70, 72, 74, 79]. Исследование и описание фитохимического состава листьев боярышника кроваво-красного нашло отражение в работах отечественных ученых [65, 81, 86, 88], однако на сегодняшний день пока не сформировано единое мнение касательно БАС, доминирующих в листьях боярышника кроваво-красного. Химический состав листьев боярышника полумягкого (*Crataegus submollis* Sarg.) в отличие от боярышника кроваво-красного в России подробно не изучался.

4.1. Предварительное фитохимическое исследование сырья растений рода Боярышник

С целью предварительной фитохимической оценки качественного состава листьев боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого были проведены качественные реакции, а также исследования хроматографическим и спектрофотометрическим методами.

Для подтверждения присутствия флавоноидных соединений в листьях боярышника кроваво-красного и листьях боярышника полумягкого использовали следующие качественные реакции: цианидиновую пробу (проба Shinoda), цианидиновую пробу по Брианту, реакцию с алюминия хлоридом. Для обнаружения гидроксикоричных кислот использовали реакцию с щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК). Для обнаружения сапонинов и стеридов использовали реакцию Сальковского, для обнаружения стероидного цикла использовали реакцию Либермана-Бурхарда.

4.1.1. Метод тонкослойной хроматографии

После получения положительных результатов описанных выше реакций проводилось хроматографическое исследование листьев вышеуказанных видов боярышника в тонком слое сорбента. Предварительный анализ сырья позволил выявить, что оптимальной системой растворителей для разделения биологически активных соединений листьев боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого является система хлороформ – этанол 96% – вода (26:16:3). Пластинку помещали в хроматографическую камеру. Хроматографировали восходящим способом до прохождения фронтом растворителя около 7-8 см, после чего пластинку доставали и высушивали. Вещества флавоноидной природы детектировали в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм, после чего пластинку обрабатывали щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Образцами свидетелями являлись СО рутина и гиперозида (рис. 24).

На полученной хроматограмме для извлечения из листьев боярышника кроваво-красного обнаруживались зоны веществ с R_f около 0,5, соответствующие гиперозиду и доминирующему компоненту с R_f около 0,6. Проведенные фитохимические исследования листьев боярышника кроваво-красного позволили выявить, что обнаруженным доминирующим веществом в сырье является 2''-О-рамнозид витексина (см. пункт 4.2).

На полученной хроматограмме для извлечения из листьев боярышника полумягкого пятно с R_f около 0,6 не наблюдалось, однако присутствовали пятна, соответствующие гиперозиду (R_f около 0,5) и рутину (R_f около 0,4).

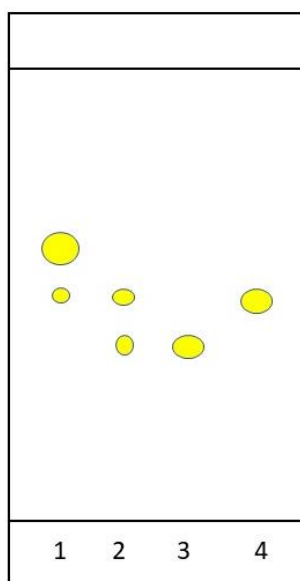


Рисунок 24 - Схема хроматограммы водно-спиртовых извлечений из листьев боярышника кроваво-красного и листьев боярышника полумягкого. Система хлороформ – этиловый спирт – вода (26:16:3). Обработка щелочным раствором диазобензолсульфокислоты

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из листьев боярышника кроваво-красного; 2 – водно-спиртовое извлечение из листьев боярышника полумягкого; 3 – СО рутина; 4 – СО гиперозида

4.1.2. Метод УФ-спектроскопии

Для дополнительного подтверждения результатов анализа, полученных методом тонкослойной хроматографии, было проведено исследование извлечений из листьев боярышника кроваво-красного и листьев боярышника полумягкого методом УФ-спектроскопии.

Для приготовления раствора А около 1,0 г измельченных листьев боярышника кроваво-красного или листьев боярышника полумягкого помещали в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл экстрагента (спирта этилового 70%), взвешивали и регистрировали изначальную массу. Колбу с подсоединенным обратным холодильником нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Затем извлечение остужали, взвешивали и при необходимости доводили массу до первоначального значения путем

добавления экстрагента. Готовое извлечение фильтровали во флакон темного стекла (раствор А).

1 мл раствора А переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70%. Оптическую плотность полученного раствора Б оценивали на фоне 70% этилового спирта.

Полученные дифференциальные спектры отличаются по значению длинноволнового максимума (около 392 нм для листьев боярышника кроваво-красного и около 412 нм для листьев боярышника полумягкого) (рис. 25, 26).

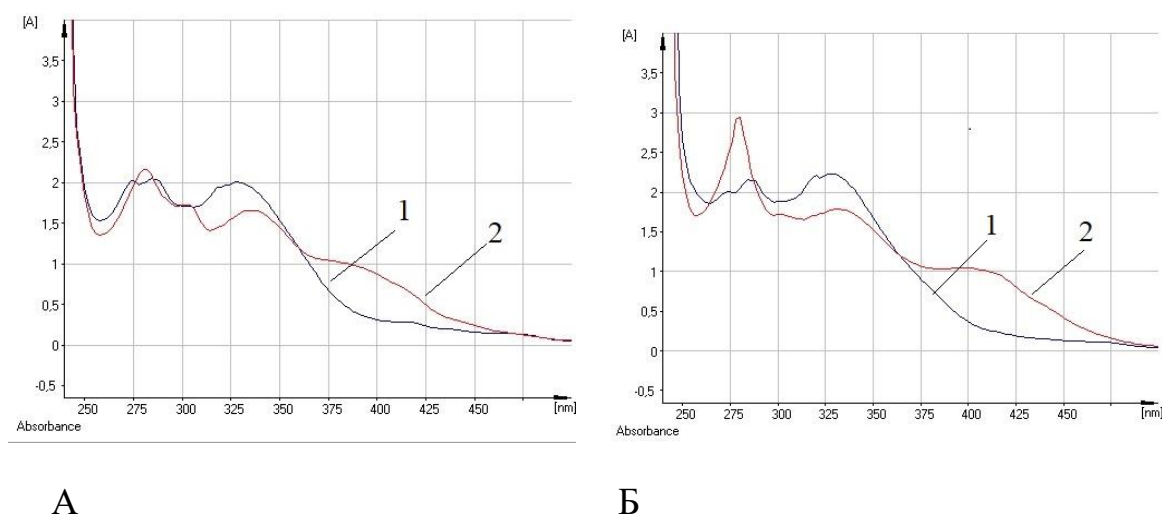


Рисунок 25 – Электронные спектры растворов водно-спиртовых извлечений из листьев боярышника кроваво-красного (А) и листьев боярышника полумягкого (Б)

Обозначения: 1 – электронный спектр водно-спиртового извлечения;
2 – электронный спектр водно-спиртового извлечения в присутствии алюминия хлорида

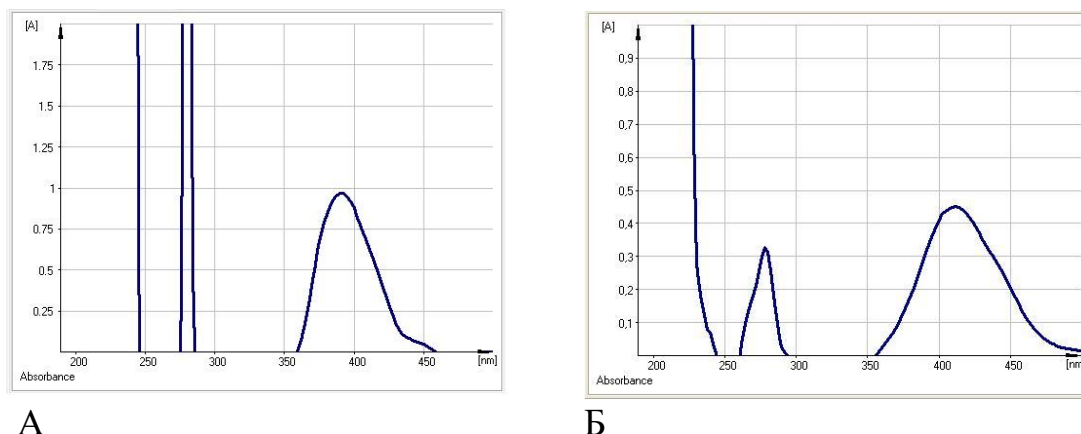


Рисунок 26 – Дифференциальные спектры растворов водно-спиртовых извлечений из листьев боярышника кроваво-красного (А) и листьев боярышника полумягкого (Б)

4.2. Выделение индивидуальных веществ из листьев боярышника кроваво-красного

В ходе исследования проводилось выделение индивидуальных веществ из листьев боярышника кроваво-красного.

Для этого 100 г воздушно-сухих листьев боярышника кроваво-красного, заготовленных в июне 2016 г. в Самарской области, экстрагировали 70% спиртом этиловым, проводя вначале две экстракции при комнатной температуре в течение 24 ч, а затем при нагревании на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Объединенное водно-спиртовое извлечение упаривали под вакуумом 5 раз до объема 50 мл. Полученный продукт смешивали с 30 г силикагеля L 40/100 (КСКГ измельченный, фр. 0,04 – 0,10 мм ГОСТ 39 56-76 Sorbis Group 05.2012) и высушивали. Для пробы понадобилась навеска сорбента в 70,0 г, что составило 70% от взятой массы сырья (100 г). Высушенный порошок, состоящий из сухого экстракта и силикагеля, наносили на слой силикагеля с диаметром 8 см, высотой 5 см, сформированный в виде взвеси в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесями хлороформ- спирт этиловый и спирт этиловый -вода в различных соотношениях. Схема элюирования представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Схема элюирования веществ из экстракта листьев боярышника кроваво-красного методом колоночной хроматографии

№ фракции	Хлороформ	Спирт	Объем
1-2	100%	0%	200 мл
3-5	97%	3%	500 мл
6-9	95%	5%	500 мл
10-15	90%	10%	1000 мл
16-25	85%	15%	1500 мл
26-35	80%	20%	1000 мл
36-41	70%	30%	1000 мл
42-44	60%	40%	500 мл
45-53	50%	50%	500 мл
54-56	40%	60%	500 мл
57-63	Вода	96%	1000 мл
64-68	Вода	0%	1000 мл

Фракции собирали в предварительно промаркированные колбы и упаривали на роторной вакуумной установке до объема 8-10 мл. Концентрированные фракции переносили в пенициллиновые флаконы и подвергали дальнейшему изучению. Ход элюирования оценивали визуально по интенсивности окраски раствора, а также с применением тонкослойной хроматографии. Использовали хроматографические пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», на которые капилляром наносили упаренные фракции. Для оценки хода элюирования использовали следующие системы растворителей: хлороформ – спирт этиловый 96% – вода (26:16:3), хлороформ – спирт этиловый (9:1), н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2).

Хроматографические пластины детектировали в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм, а также после обработки раствором ДСК и ФМК. В качестве стандарта использовали настойку листьев боярышника кроваво-красного 1:10 на 70% этиловом спирте, стандартные образцы гиперозида и рутина.

4.2.1. Исследование фракций, содержащих перспективные индивидуальные вещества, выделенные из листьев боярышника кроваво-красного

ТСХ анализ позволил выявить фракции, содержащие перспективные индивидуальные вещества, в том числе доминирующие в сырье.

Соединение 1 и 4 (таблица 5) были получены из маточника фракций 34-38 (элюент – смесь хлороформа и этилового спирта 80:20 и 70:30), данные фракции элюировали смесью спирта этилового и воды, 40:60. Соединение 2 было получено из 23 фракции (элюент смесь хлороформа и этилового спирта 15:85), в которую после упаривания добавили воду и поместили в холодильник на 24 часа, после чего образовавшийся осадок промыли ацетоном, затем добавили воду и поместили в холодильник на 24 часа, после чего отделили выпавший осадок. Соединение 3 получено из 35 фракции (элюент – смесь хлороформа и спирта этилового 20:80), данную фракцию растворили в спирте, после чего отделили образовавшийся осадок. Соединение 5 было получено из объединенных фракций 40-42 (элюент – смесь хлороформа и этилового спирта 3:70 и 40:60), которые элюировали смесью спирта этилового и воды 40:60, а затем промыли спиртом и отделили образовавшийся осадок. Соединение 6 было получено из 37 и 38 фракций (элюент смесь хлороформа и этилового спирта 30:70), которые объединили, промыли спиртом и отобрали получившийся осадок. Соединение 7 получено из объединенного маточника фракций 22-24 (элюент смесь хлороформа и спирта этилового 15:85), который затем элюировали смесью этилового спирта и воды 60:40. Соединение 8 получено из объединенного маточника фракций 22-24 (элюент смесь

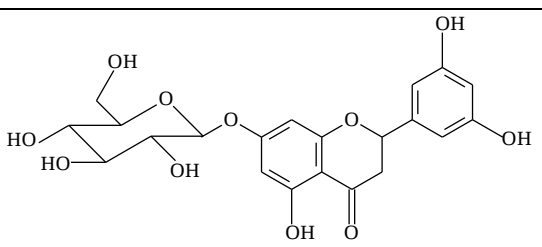
хлороформа и спирта этилового 15:85), который затем элюировали смесью этилового спирта и воды 70:30. Образовавшуюся фракцию промыли ацетоном и водой, а затем растворили в спирте, после чего отделили маточник. Соединение 9 было получено из 18 фракции (элюент смесь хлороформа и спирта этилового 15:85). Соединение 10 получено из 7 фракции (элюент смесь хлороформа и спирта этилового 95:5).

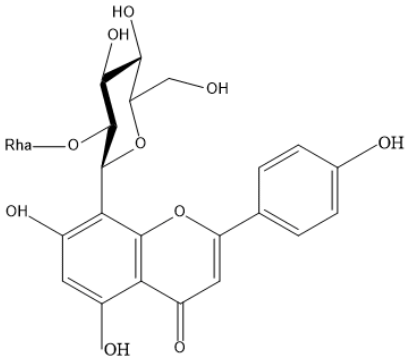
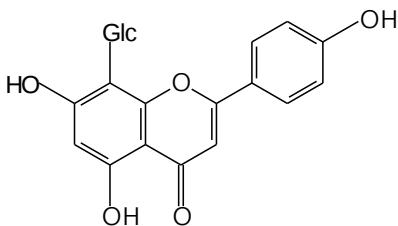
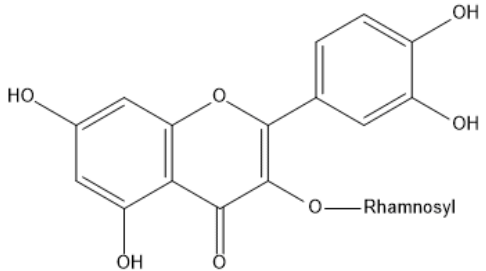
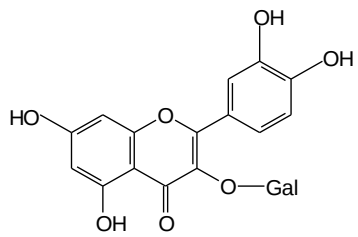
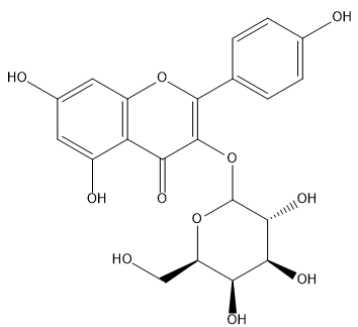
4.2.2. Идентификация выделенных веществ и их характеристики

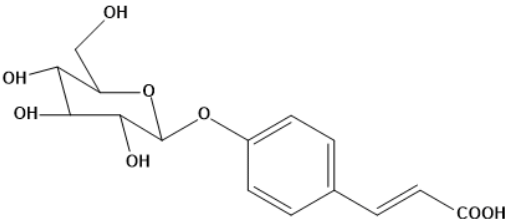
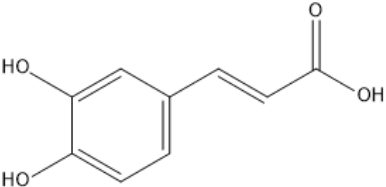
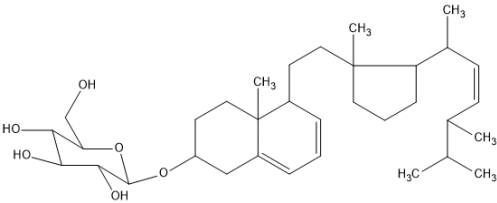
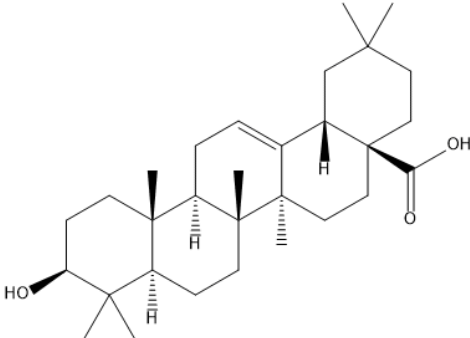
После пробоподготовки индивидуальные вещества были выделены из фракций № 7, 18, 22-24, 34-38, 40-42. Выделенные соединения анализировали методами ТСХ, УФ-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также с использованием различных химических превращений (кислотного и ферментативного гидролиза).

Физико-химические и спектральные характеристики веществ, выделенных из листьев боярышника кроваво-красного, представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристики веществ, выделенных из экстракта листьев боярышника кроваво-красного методом колоночной хроматографии

№ п/п	Название соединения	Химическая формула	Характеристики
1.	Сангвинеозид $C_{21}H_{22}O_{11}$		Аморфное вещество светло-желтого цвета.

2.	2''-О-рамнозид витексина $C_{27}H_{30}O_{14}$		Светло-желтый кристаллически й порошок.
3.	Витексин $C_{21}H_{20}O_{10}$		Светло-желтый кристаллически й порошок.
4.	Кверцитрин $C_{21}H_{20}O_{12}$		Светло-желтое кристаллическо е вещество.
5.	Гиперозид $C_{21}H_{20}O_{12}$		Светло-желтое аморфное вещество.
6.	Трифолин $C_{21}H_{20}O_{11}$		Светло-желтое кристаллическо е вещество.

7.	4-O-β-D- глюкопиранозид <i>n</i> -кумаровой кислоты $C_{15}H_{18}O_6$		Кристаллы белого цвета.
8.	Кофейная кислота $C_9H_8O_4$		Кристаллическое вещество светло-желтого цвета.
9.	3-O-β-D- глюкопиранозид эргостерина $C_{34}H_{54}O_6$		Аморфное вещество белого цвета.
10.	Олеаноловая кислота $C_{30}H_{48}O_3$		Кристаллы белого цвета.

Сангвинеозид (7-O-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванон) (**1**).

Аморфное вещество светло-желтого цвета состава $C_{21}H_{22}O_{11}$. Масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): M^+ агликаона 288 (100 %), 153 (67), 137 (8); $\lambda_{\max}$ EtOH 290, 336 (пл.) нм; +AlCl₃ 285, 304, 344, 394(пл.) нм.

¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.07 (1H, с, 5-OH), 9,17 (1H, с, 7-OH), 9,05 (2H, уш .с, 3¹-OH и 5¹-OH), 6,88 (1H, с, H-4¹), 6,77 (2H,

с, Н-2¹ и Н-6¹), 6.15 (2Н, J = 2.5, Н-6 и Н-8), 5.43 (дд, 4 и 12 Гц, Н-2ах), 3.15 (1Н, дд, 12 и 17 Гц, Н-3ах), 2.76 (1Н, дд, 4 и 17 Гц, 3-е_к), 4,98 (д, 7 Гц, Н-1¹¹ глюкозы), 3.1-5.2 (м, 6Н глюкозы).

¹³С-ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО-d₆, δ_с, м.д.): С-4 (197,17), С-2 (78,71), С-7 (165,30), С-3¹ (145,81), С-5¹ (145,81), С-4¹ (118,07, С-5 (162,94), С-9 (162,71), С-2¹ (115,36,94), С-6¹ (115,16), С-1¹ (129,22), С-10 (103,28), С-8 (96,43), С-6 (95,44), С-1¹¹ глюкозы (99,60), С-3¹¹ (78,71), С-5¹¹ (77,09), С-2¹¹ (73,03), С-4¹¹ (70,06), С-6¹¹ (60,78), С-3 (42,19).

2''-О-рамнозид витексина (2) (2¹¹-О-α-L-рамнопиранозил-8-С-β-D-глюкопиранозид 5,7,4¹-тригидроксифлавоны).

Светло-желтый кристаллический порошок состава C₂₇H₃₀O₁₄ с т. пл. 213-215⁰С; УФ- спектр: λ_{max}^{EtOH} – 272 и 334 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): М⁺ 579 (578 + Н), М⁺ 601 (578 + Na), М⁺ 617 (578 + K).

¹Н-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 1.70 (3Н, с, CH₃ рамнозы), 3,2-5,25 (10Н сахаров), 4,84 (1Н, д, 9,9, Гц, Н-1¹¹ глюкопиранозы), 5,33 (1Н, уш. с, Н-1¹¹¹ рамнопиранозы), 6,25 (1Н, с, Н-6), 6,83 (1Н, с, Н-3), 6,92 (2Н, д, 9 Гц, Н-3¹ и Н-5¹), 8,21 (2Н, д, 9 Гц, Н-2¹ и Н-6¹), 10,37 (1Н, уш. с, ОН-группа при С-4¹), 11,03 (1Н, уш. с, ОН-группа при С-7), 13,21 (1Н, с, 5-ОН группы).

¹³С-ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО-d₆, δ_с, м.д.): С-4 (182,05), С-2 (169,22), С-7 (164,05), С-4¹ (162,08, С-5 (161,23), С-9 (156,44), С-2¹ (129,04), С-6¹ (129,04), С-1¹ (121,58), С-3¹ (116,21), С-5¹ (115,80), С-10 (104,01), С-8 (103,98), С-6 (97,81), С-1¹¹¹ рамнозы (102,45), С-2¹¹ глюкозы (97,81), С-5¹¹ (82,02), С-3¹¹¹ (75,68), С-5¹¹ (75,68), С-1¹¹ глюкозы (72,52), С-2¹¹¹ (70,93), С-4¹¹ (70,93), С-5¹¹¹ (70,46), С-6¹¹ (60,99), CH₃ (20,44).

Витексин (3) (8-С-β-D-глюкопиранозид 5,7,4¹-тригидроксифлавоны) (2).

Светло-желтый кристаллический порошок состава C₂₁H₂₀O₁₀ с т. пл. 273-275⁰С; УФ- спектр: λ_{max}^{EtOH} – 272 и 334 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): М⁺ 433 (432 + Н).

^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 3,1-4,6 (6H глюкозы), 4,84 (1H, д, 9,9 Гц, H-1 11 глюкопиранозы), 6,27 (1H, с, H-6), 6,85 (1H, с, H-3), 6,78 (2H, д, 9 Гц, H-3 1 и H-5 1), 8,04 (2H, д, 9 Гц, H-2 1 и H-6 1), 9,04 (1H, уш. с, OH-группа при C-4 1), 10,37 (1H, уш. с, OH-группа при C-7), 13,18 (1H, с, 5-OH группы).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , $\delta_{\text{с}}$, м.д.): C-4 (182,07), C-2 (165,27), C-7 (162,68), C-4 1 (162,08), C-5 (161,11), C-9 (160,36), C-2 1 (128,94), C-6 1 (128,94), C-1 1 (121,59), C-3 1 (115,78), C-5 1 (115,32), C-10 (104,01), C-8 (104,59), C-6 (98,12), C-3 11 (81,02), C-5 11 (81,02), C-1 11 глюкозы (73,35), C-2 11 (70,82), C-4 11 (70,52), C-6 11 (61,27).

Кверцитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3 1 ,4 1 -пентагидроксифлавона) (**4**).

Светло-желтое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ с т. пл. 224-226 °C (водный спирт). Масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): 302 (M^+ агликона, 100 %), 153 (12), 152 (43), 137 (8). λ_{max} EtOH 257, 268 нм, 361 нм; + NaOAc 273, 380 нм; + NaOAc + H_3BO_3 262, 378 нм; + AlCl_3 274, 415 нм; + AlCl_3 + HCl 270, 404 нм.

^1H -ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,65 (1H, с, 5-OH), 9,82 (1H, с, 7-OH), 9,27 (1H, с, 4 1 -OH), 7,65 (д, 2,5 Гц, H-2 1), 7,61 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6 1), 6,88 (1H, д, 9 Гц, H-5 1), 6,82 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,42 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,58 (1H, д, 1,5 Гц, H-1 11 рамнозы), 3,1-5,2 (м, 4H рамнозы), 1,25 (3H, д, 6 Гц, CH_3 рамнозы).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , $\delta_{\text{с}}$, м.д.): C-4 (177,60), C-7 (161,57), C-5 (160,86), C-9 (160,12), C-2 (156,66), C-4 1 (149,44), C-3 1 (148,65), C-3 (131,00), C-6 1 (122,13), C-1 1 (121,71), C-2 1 (116,21), C-5 1 (115,23), C-10 (101,62), C-1 11 рамнозы (100,86), C-8 (98,41), C-6 (94,30), C-2 11 (116,21), C-6 11 (75,93), C-3 11 (74,07), C-5 1 (73,16), C-4 11 (70,24), C-2 11 (70,07), CH_3 (17,93).

Гиперозид (3-О-β-D-галактопиранозид 3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлавона) (5).

Светло-желтое аморфное вещество состава C₂₁H₂₀O₁₂ с т.пл. 230-232 °С (водный ацетон). Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 302 (M⁺ агликона, 100 %), 153 (23), 137 (64), λ_{max} EtOH 258, 266 нм, 363 нм.

¹H-ЯМР-спектр (50 МГц, ДМСО-d₆, δ_с, м.д.): 12,65 (с, 5-ОН), 9,73 (с, 7-ОН), 9,52 (с, 4¹-ОН), 7,58 (д, 2,5 Гц, Н-2¹), 7,53 (дд, 2,5 и 9 Гц, Н-6¹), 6,80 (д, 9 Гц, Н-5¹), 6,42 (д, 2,5 Гц, Н-8), 6,19 (д, 2,5 Гц, Н-6), 5,48 (д, 7,5 Гц, Н-1¹¹ галактозы), 3,5-4,0 (6Н, м, галактозы).

Трифолин (6) (3-О-β-D-галактопиранозид 3,5,7,4¹-тетрагидроксифлавона).

Светло-желтое кристаллическое вещество состава C₂₁H₂₀O₁₁ с т.пл. 240-242 °С (водный спирт). Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 286 (M⁺ агликона, 100 %), 153 (11), 152 (20), 121 (10). λ_{max} EtOH 270, 338 нм; + NaOAc 280, 371 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 280, 371 нм; + AlCl₃ и + AlCl₃ + HCl 275, 305, 396 нм.

¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 13,18 (1Н, с, 5-ОН), 10,85 (1Н, с, 7-ОН), 10,36 (1Н, с, 4¹-ОН), 8,05 (2Н, д, 9 Гц, Н-2¹,6¹), 6,91 (2Н, д, 9 Гц, Н-3¹,5¹), 6,78 (д, 2,5 Гц, Н-8), 6,26 (д, 2,5 Гц, Н-6), 5,02 (д, 7 Гц, Н-1¹¹ галактозы), 3.2-5,0 (6Н, м, галактозы).

4-О-β-D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты (7).

Кристаллы белого цвета состава C₁₅H₁₈O₆, т.пл. 206-208 (этиловый спирт). Масс-спектр (EI-MS, 180 °С, m/z): M⁺ агликона 164 (54%). λ_{max} EtOH 285, 316 (пл) нм. ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 7,68 (2Н, д, 9 Гц, Н-2, Н-6), 7,01 (2Н, д, 9 Гц, Н-3, Н-5), 6,85 (1Н, д, 16 Гц, Н-7), 5,83 (д, 16 Гц, Н-8), 4,88 (д, 7 Гц, Н-1¹ глюкозы), 3,1-4,6 (м, 6Н глюкозы).

¹³C-ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО-d₆, δ_с, м.д.): С-9 (176,00), С-4 (167,82), С-2 (131,97), С-6 (131,97), С-3 (128,00), С-5 (128,00), СС-7 (118,95), С-8 (115,63), С-1¹ глюкозы (100,10), С-3¹ (77,89), С-5¹ (77,15), С-2¹ (77,11), С-4¹ (73,40), С-6¹ (60,71).

Кофейная кислота (8). Кристаллическое вещество светло-желтого цвета состава $C_9H_8O_4$, т. пл. 200-202° (вода). $\lambda_{\max}$ EtOH 217, 243, 299 пл, 328 нм.

1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 9,60 и 9,20 (с, 2 ароматические OH), 7,47 (д, 16 Гц, H-7), 7,11 (д, 2,5 Гц, H-2), 7,05 (дд, 2,5 и 9 Гц, H-6), 6,83 (д, 9 Гц, H-5), 6,23 (д, 16 Гц, H-8).

3-О- β -D-глюкопиранозид эргостерина (9).

Аморфное вещество белого цвета состава $C_{34}H_{54}O_6$, УФ-спектр (EtOH, $\lambda_{\max}$): 271 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): 396 (M^+ , 18), 215 (5), 164 (23), 149 (19), 120 (31), 95 (24), 85 (17), 81 (33), 73 (58), 60 (100), 43 (84).

1H -ЯМР-спектр (300 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д., J/Гц): 5,34 (2H, м, H-6, H-7), 4,87 (2H, д, 7,7 Гц, H-22, H-23), 4,22 (1H, д, 7 Гц, H-1¹ глюкозы), 3,65 (1H, м, H-3), 1,0-3,5 (26H, м, в том числе 6H глюкозы), 0,65-0,95 (18H, м, шести CH_3).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , δ_C , м.д.): C-8 (140,52), C-22 (133,59), C-23 (129,26), C-6 (121,26), C-7 (121,26), C-3 (76,81), C-1¹ глюкозы (100,86), C-3¹ (76,99), C-5¹ (76,84), C-2¹ (73,59), C-4¹ (70,19), C-6¹ (61,17), C-17 (56,24), C-14 (54,50), C-9 (49,67), C-24 (45,21), C-13 (41,92), C-4 (40,51), C-20 (40,51), C-12 (38,38), C-5 (36,89), C-1 (36,28), C-10 (35,53), C-2 (33,42), C-C-25 (31,49), C-16 (29,33), C-16 (28,78), C-10 (23,92), C-11 (22,68), C-21 (22,68), C-21 (20,66), C-26 (19,77), C-27 (19,16), C-19 (19,00), C-28 (18,68), C-18 (11,50).

Олеаноловая кислота (10).

Кристаллы белого цвета из этилового спирта, состава $C_{30}H_{48}O_3$, т.пл. 303-305 (спирт). Масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): M^+ 456 (23), 341 (9), 248 (100), 219 (14), 208 (44), 203 (68), 135 (33), 121 (37), 107 (30), 81 (30), 55 (25).

1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 0,71 (3H, с, CH_3 -25), 0,74 (3H, с, CH_3 -26), 0,82 (3H, с, CH_3 -23), 0,88 (6H, с, CH_3 -24 и CH_3 -30), 1,02 (3H, с, CH_3 -29), 1,21 (3H, с, CH_3 -27), 1,4-2,0 (23H, м), 2,12 (1H, д, 10 Гц, H-18), 3,02 (1H, уш.с, H-3), 5,13 (1H, с, H-12), 11,93 (1H, уш.с, COOH).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , δ_C , м.д.) (фрагмент): C-1 (30,23), C-2 (23,32), C-3 (76,88), C-4 (36,36), C-5 (47,07), C-6 (18,06), C-7 (32,77, C-8

(39,68), C-9 (46,88), C-10 (38,43), C-11 (22,90), C-12 (124,63), C-13 (138,25), C-14 (41,70), C-15 (28,31), C-16 (23,86), C-17 (48,88), C-18 (40,08), C-19 ((47, 07), C-20 (29,04), C-21 (30,23), C-22 (32,75), C-23 (27,59), C-24 (21,12), C-25 (16,12), C-26 (16,97), C-27 (27,04), C-28 (178,32), C-29 (28,31), C-30 (22,90).

4.2.3. Изучение химической структуры выделенных веществ

Идентификацию выделенных веществ осуществляли с использованием УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также различных химических превращений (химический и ферментативный гидролиз).

В ^1H -ЯМР-спектре соединения **1** при 6.15 м.д. (2H, д, $J = 2.5$ Гц, H-6 и H-8), 6.88 м.д. (1H, с, H-4¹), 6.77 м.д. (2H, с, H-2¹ и H-6¹) обнаружены сигналы ароматических протонов, принадлежащих молекуле флавоноида. Флаваноновая природа соединения **1** подтверждается характером сигналами протонов H-2ах (1H, дд, 4 и 12 Гц), H-3ах (1H, дд, $J = 12$ и 17 Гц) и 3eq (1H, дд, $J = 4$ и 17 Гц) при 5.43 м.д., 3.15 м.д. и 2.76 м.д. соответственно, а также данными УФ-спектров [113].

Кроме того, в ^1H -ЯМР-спектре соединения **1** при 12.07 м.д. обнаружен однопротонный синглетный сигнал 5-ОН-группы, а также дублетный сигнал аномерного протона глюкозы с константой спин-спинового взаимодействия 7 Гц при 4.98 м.д. Синглетный характер двухпротонного сигнала протонов H-2¹ и H-6¹ при 6.77 м.д. позволяет сделать вывод о гликозилировании 7-ОН-группы. При кислотном и ферментивном гидролизе β -глюкозидазой соединения **1** образуются глюкоза и агликон (5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона), структура которого подтверждается данными масс-спектра (M^+ 288, 100 %) и ^{13}C -ЯМР-спектра (рис. 27-29).

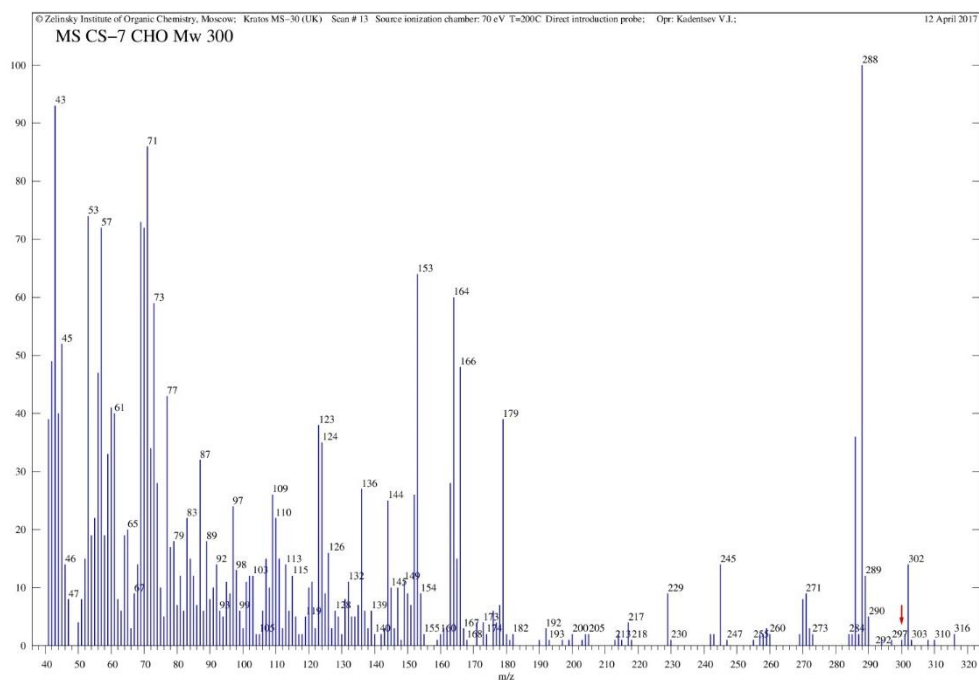


Рисунок 27 – Масс спектр 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона

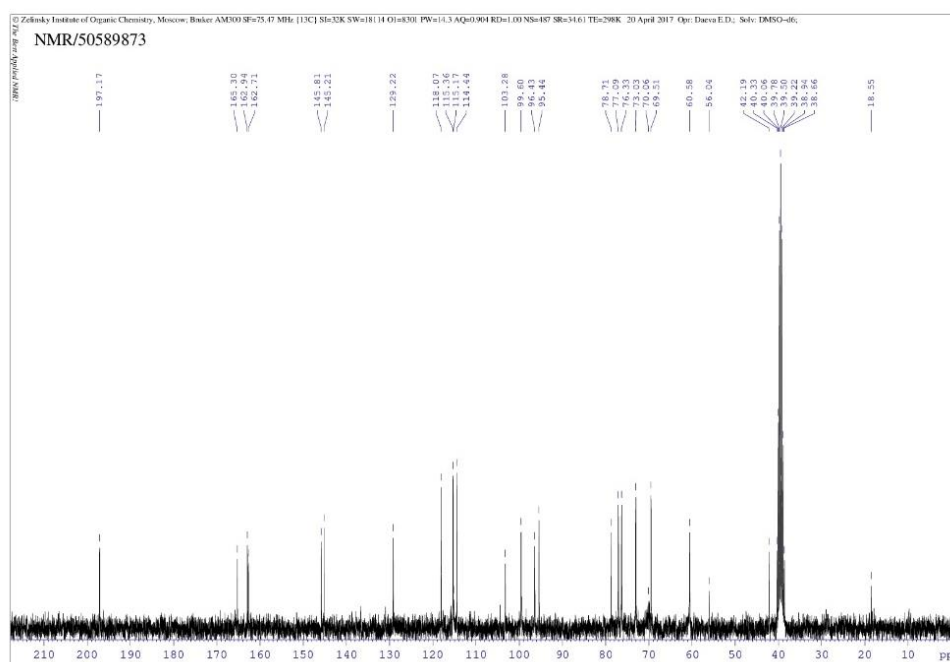


Рисунок 28 – ¹³C-ЯМР спектр 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона в DMSO-d₆

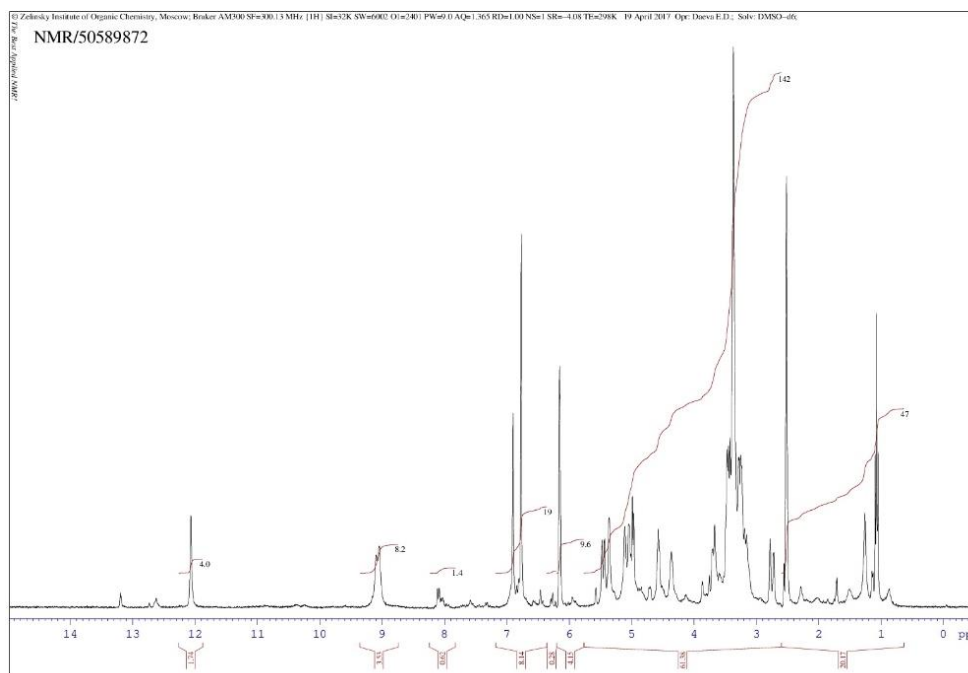


Рисунок 29 – ^1H -ЯМР спектр 7-О-β-D-глюкопиранозида 5,7,3',5'-тетрагидроксифлаванона в DMSO-d_6

Таким образом, вещество **1**, названное нами сангвинеозидом, имеет структуру 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3',5'-тетрагидроксифлаванона и является новым природным соединением.

Флавоноидные соединения **2-6** идентифицированы нами на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и масс-спектров как 2''-О-рамнозид витексина (**2**) (рис. 30-32), витексин (**3**), кверцитрин (**4**), гиперозид (**5**) и трифолин (**6**) [88, 94, 102, 119, 124, 125], причем флавоноиды трифолин и кверцитрин впервые выделены из листьев боярышника кроваво-красного. Кроме того, было выявлено, что 2''-О-рамнозид витексина является доминирующим и диагностически значимым веществом для листьев боярышника кроваво-красного и именно он распознается на хроматограмме как пятно с величиной R_f 0,6.

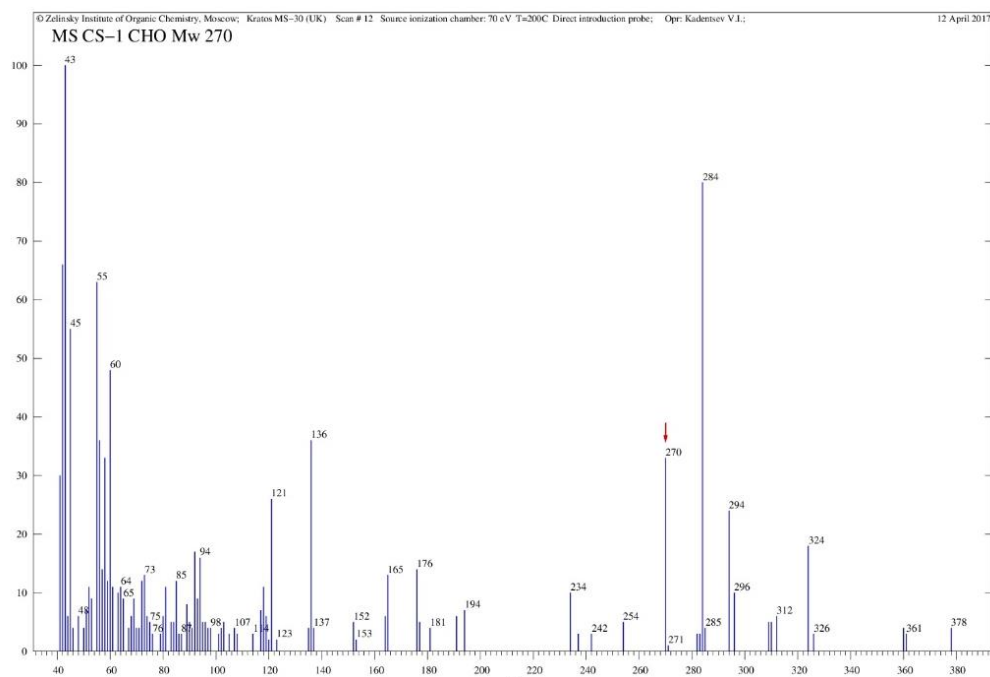


Рисунок 30 – Масс спектр 2''-О-рамнозид витексина

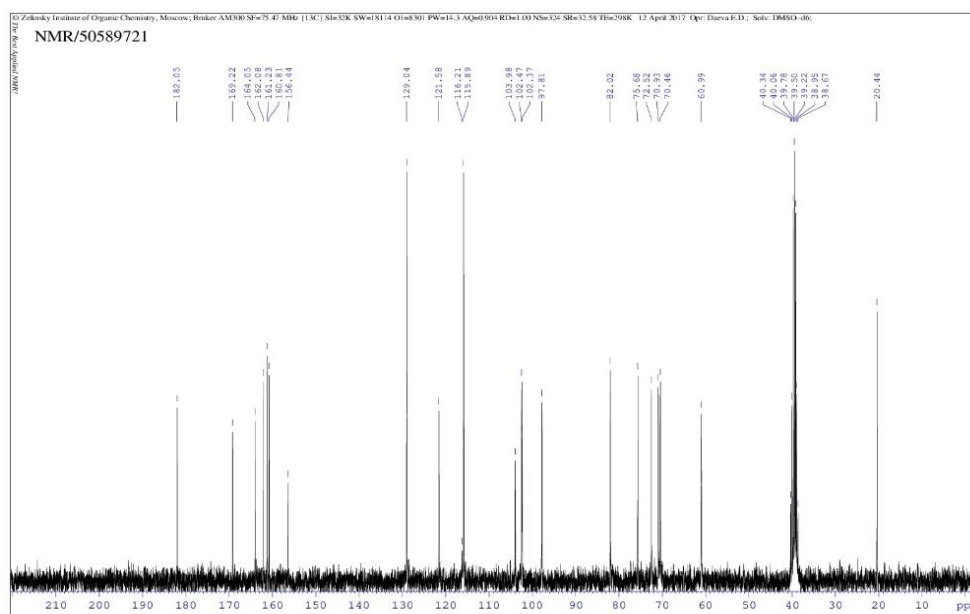


Рисунок 31 – ^{13}C -ЯМР спектр 2''-О-рамнозид витексина в DMSO-d_6

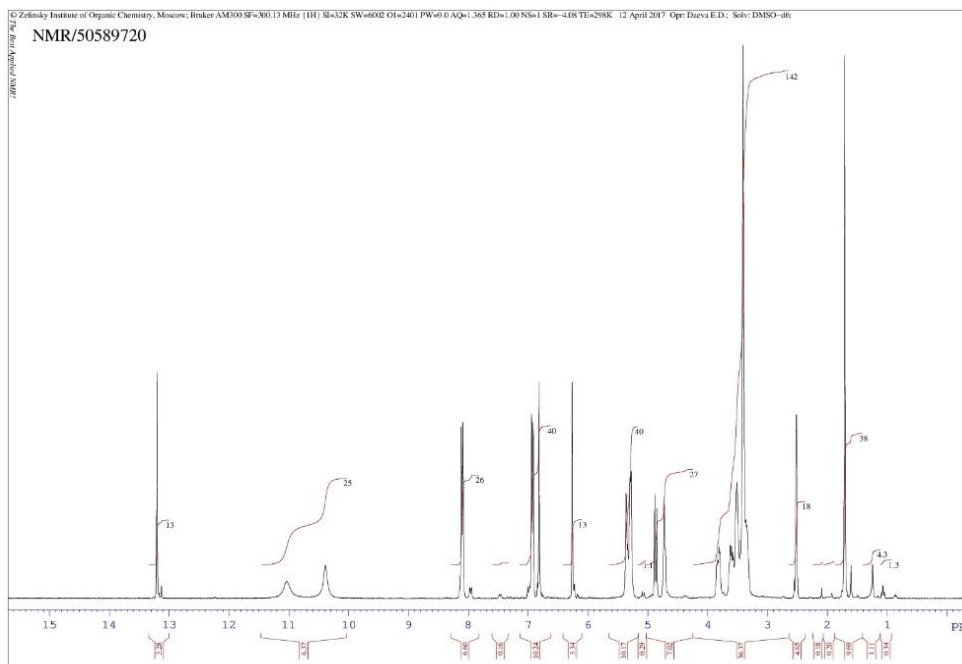


Рисунок 32 – ^1H -ЯМР спектр 2''-О-рамнозид витексина в DMSO-d_6

Фенилпропаноиды **7** и **8** идентифицированы как кофейная кислота (**8**), описанная ранее для листьев боярышника кроваво-красного [88], и 4-О- β -D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты (**7**), выделенный ранее из биомассы родиолы розовой [107]. Соединение **10** идентифицировано как олеаноловая кислота [108], известная для видов рода *Crataegus* L. [64, 88].

3-О- β -D-глюкопиранозид эргостерина (**9**), выделен впервые из листьев боярышника кроваво-красного и сырья других видов *Crataegus* L.

Таким образом, в ходе исследования химического состава листьев боярышника кроваво-красного методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии впервые для листьев боярышника кроваво-красного выделены и идентифицированы 4-О- β -D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты, 3-О- β -D-глюкопиранозид эргостерина, трифоллин и кверцитрин, а также выделены известные для данного растения вещества – витексин, 2''-О-рамнозид витексина, гиперозид, кофейная кислота и олеаноловая кислота. Кроме того, впервые были выделено новое вещество, названное нами сангвинеозидом, которое имеет структуру 7-О- β -D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Предварительный анализ фитохимического состава извлечений из листьев боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого методом тонкослойной хроматографии позволил определить, что состав листьев данных видов рода Боярышник не идентичен, причем данный факт был также подтвержден результатами УФ-спектроскопии.

2. В ходе исследования методом тонкослойной хроматографии в извлечении из листьев боярышника кроваво-красного было обнаружено доминирующее вещество с величиной R_f около 0,6, которое отсутствует в листьях боярышника полумягкого. Далее в ходе колоночной хроматографии данное доминирующее вещество листьев боярышника кроваво-красного было идентифицировано как 2''-О-рамнозид витексина.

3. Из листьев боярышника кроваво-красного впервые выделены и идентифицированы 4-О-β-D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты, 3-О-β-D-глюкопиранозид эргостерина, трифолин и кверцитрин, а также выделены известные для плодов данного растения вещества – витексин, 2''-О-рамнозид витексина, гиперозид, кофейная и олеаноловая кислота.

Кроме того, впервые были выделено новое вещество, названное нами сангвинеозидом, который имеет структуру 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО

В рамках обоснования возможности использования нового вида сырья – «Боярышника кроваво-красного листа» в медицинской практике необходима разработка методик качественного и количественного анализа. В рамках данной диссертационной работы в ходе фитохимического исследования листьев боярышника кроваво-красного было обнаружено доминирующее вещество флавоноидной природы с величиной R_f около 0,6 - 2''-О-рамнозид витексина. Следовательно, на данное вещество целесообразно опираться при разработке методик качественного и количественного анализа листьев боярышника кроваво-красного.

5.1. Разработка методики качественного анализа листьев боярышника кроваво-красного

Сырьё, представляющее собой смесь листьев и цветков, описано в фармакопее США, Европейской фармакопее и фармакопее Республики Беларусь [16, 101, 126]. В государственной фармакопее США для целей качественного анализа предлагается метод ТСХ со стандартными образцами рутина, хлорогеновой кислоты, гиперозида и витексина в системе растворителей: этилацетат – вода – ледяная уксусная кислота - муравьиная кислота (10:2,6:1,1:1,1), а также ВЭЖХ определение со стандартами рутина, хлорогеновой кислоты, гиперозида и витексина [126]. Европейская и белорусская фармакопеи в разделе подлинности описывают метод ТСХ со стандартными образцами хлорогеновой кислоты и гиперозида, растворенных в метаноле в системы растворителей: безводная кислота муравьиная-вода-метилэтилкетон-этилацетат (10: 10: 30: 50). [16, 101]. Кроме того, в фармакопее Республики Беларусь в отдельной ФС на листья боярышника предлагается определять подлинность, используя химические реакции на

флавоноиды: реакцию с аммония хлоридом, с раствором железа (III) аммония сульфата в присутствии кислоты хлористоводородной в бутаноле [16].

На наш взгляд, в случае определения подлинности листьев боярышника кроваво-красного в дополнение к химическим реакциям целесообразно использовать метод тонкослойной хроматографии с применением стандартных образцов, специфичных для данного вида ЛРС, а также метод УФ-спектроскопии с последующей интерпретацией полученных спектральных характеристик.

5.1.1. Качественный анализ методом тонкослойной хроматографии

Предварительный фитохимический анализ показал, при определении подлинности листьев боярышника кроваво-красного методом ТСХ в системе хлороформ – спирт этиловый – вода (26:16:3) на хроматограмме обнаруживаются зоны вещества с R_f около 0,5, соответствующая гиперозиду, и зона с R_f около 0,6, соответствующая 2¹¹-О-рамнозиду витексина. В связи с этим, в качестве раствора свидетеля мы использовали ГСО гиперозида и выделенный нами в ходе колоночной хроматографии образец 2¹¹-О-рамнозида витексина.

Исследованию подвергались листья боярышника кроваво-красного, заготовленные в 2015-2017 гг. на территории Ботанического сада Самарского университета в г. Самара.

Качественный анализ методом ТСХ проводили следующим образом. 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 2 мм, переносили в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл спирта этилового 70%, затем колбу взвешивали. Колбу с подсоединенным обратным холодильником нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Затем колбу остужали, взвешивали и при необходимости доводили массу до первоначального значения путем добавления экстрагента. Полученное извлечение фильтровали во флакон темного стекла.

Извлечение наносили на предварительно активированные хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». На линию старта пластинки микропипеткой наносили 0,02 мл полученного водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного. В качестве вещества-свидетеля наносили спиртовой раствор СО гиперозида и образец 2''-О-рамнозид витексина. Для разделения использовали систему растворителей хлороформ – этанол – вода (26:16:3). Пластинку помещали в хроматографическую камеру, которая предварительно была насыщена парами растворителей в течение 24 часов. Хроматографировали восходящим способом до прохождения фронтом растворителя около 7-8 см, после чего пластинку доставали и высушивали. Затем хроматограммы оценивали визуально при дневном свете, а также просматривали в УФ-свете при длинах волн 254 нм и 366 нм. После чего пластинки для проявления фенольных соединений обрабатывали щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Схема хроматограммы представлена на рисунке 33.

На полученной хроматограмме для извлечения из листьев боярышника кроваво-красного обнаруживаются зоны веществ с величиной R_f около 0,5 (гиперозид) и R_f около 0,6 (2''-О-рамнозид витексина).

Вследствие отсутствия стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина не представляется возможным использовать данное вещество в качестве раствора-свидетеля при определении подлинности листьев боярышника кроваво-красного. По этой причине нами предложен показатель R_{st} , который равняется отношению коэффициента удерживания (R_f) 2''-О-рамнозид витексина к коэффициенту удерживания гиперозида. Данный показатель должен равняться 1,2. Наличие 2''-О-рамнозид витексина в извлечении из листьев боярышника кроваво-красного определяют по наличию доминирующего пятна желто-оранжевого, величина R_f которого равняется примерно 0,6.

$$R_{st} = \frac{R_f (2'' - O - \text{рамнозид витексина})}{R_f (\text{гиперозида})} = \frac{0,6}{0,5} = 1,2$$

Разработанная нами методика включена нами в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Боярышника кроваво-красного листа» (приложение 4).

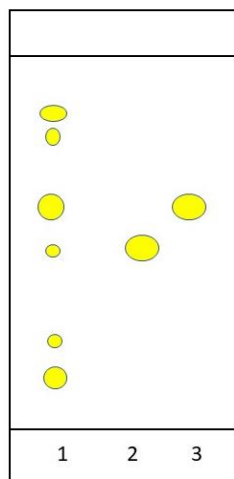


Рисунок 33 – Схема хроматограммы водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного. Система хлороформ – спирт этиловый - вода (26:16:3). Обработка щелочным раствором диазобензолсульфокислоты

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из листьев боярышника кроваво-красного; 2 – СО гиперозида; 3 – образец 2''-О-рамнозид витексина

5.2.2. Качественный анализ методом УФ-спектроскопии

Для разработки методики оценки подлинности методом УФ-спектроскопии использовали листья боярышника кроваво-красного, заготовленные в 2015-2017 гг. на территории Ботанического сада Самарского университета в г. Самара.

Оценку подлинности методом УФ-спектроскопии осуществляли следующим образом: 1,0 г измельченных листьев боярышника кроваво-красного (точная навеска), проходящего через сито с диаметром отверстий 2

мм, помещали в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл экстрагента (спирта этилового 70%). Взвешивали. Колбу с подсоединенным обратным холодильником нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Затем извлечение остужали, взвешивали и при необходимости доводили массу до первоначального объема путем добавления экстрагента. Готовое извлечение фильтровали во флакон темного стекла (раствор А).

1 мл раствора А переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70%. Оптическую плотность полученного раствора Б оценивали на фоне 70% этилового спирта.

Полученный спектр листьев боярышника кроваво-красного имеет два максимума поглощения: коротковолновый при длине волны 260 ± 2 нм и длинноволновый – при длине волны 330 ± 2 нм (рис. 34).

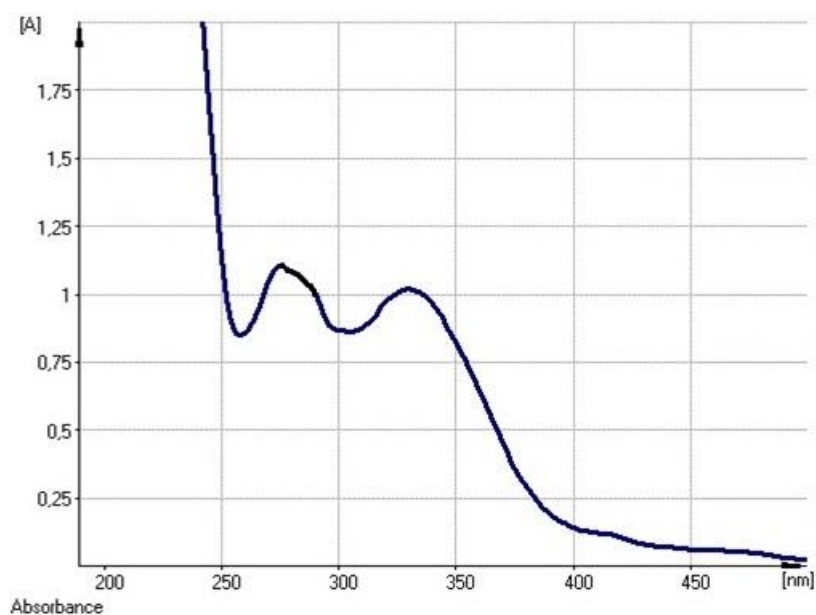


Рисунок 34 – Общий вид кривой поглощения водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного

5.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного

Листья с цветками боярышника описаны в фармакопее США, Европейской фармакопее и фармакопее Республики Беларусь [16, 101, 126].

В фармакопее США количественная оценка листьев с цветками боярышника включает определение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) С-гликозилированных флавонов в пересчете на витексин, содержание которых должно быть не менее 0,6% и О-гликозилированных флавоноидов в пересчете на гиперозид, содержание которых должно быть не менее 0,45%. Количественное определение целевых веществ в листьях с цветками по Европейской фармакопее и фармакопее Республики Беларусь включает спектрофотометрическое определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид, которого в сырье должно быть не менее 1,5%, при длине волны 405 нм (Европейская фармакопея) и 410 нм (фармакопея Республики Беларусь) [16, 101]. Рядом иностранных авторов предложены методики количественного определения флавоноидов в листьях боярышника методом жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием, а также методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием [97, 114, 130].

Отдельно как вид лекарственного растительного сырья листья представлены в фармакопее Республики Беларусь, где для количественного определения действующих веществ в листьях боярышника описано спектрофотометрическое определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 0,25%) при длине волны 409 нм и спектрофотометрическое определение содержания суммы процианидинов в пересчете на цианидина хлорид (не менее 5,0%) при длине волны 550 нм [21]. Хасановой С.Р. описан способ количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях боярышника кроваво-красного с

использованием дифференциальной спектрофотометрии, содержание которых в сырье должно быть не менее 1,5% [88].

Принимая во внимание то обстоятельство, что характерными флавоноидами листьев боярышника кроваво-красного являются 2''-О-рамнозид витексина, витексин и гиперозид, которые относятся к флавонам и флавонолам, нам представляется не совсем объективно определения в сырье данного растения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Кроме того, важным также является обоснование, по какой группе флавоноидов – флавонолов или флавонов - необходимо осуществлять стандартизацию сырья данного растения. Решение данного вопроса возможно только путем изучения компонентного состава флавоноидов листьев боярышника кроваво-красного, причем, несмотря на достигнутые успехи в области стандартизации листьев с цветками, а также плодов боярышника с использованием метода ВЭЖХ [1, 67, 68, 126], актуальным остается вопрос изучения возможности использования спектрофотометрии для целей стандартизации сырья данного растения.

Нами было выявлено, что выделенный из листьев боярышника кроваво-красного 2''-О-рамнозид витексина (см. главу 4) во многом определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного (рис. 35-37), особенно в дифференциальном варианте (рис. 38 и 39), а значит, является диагностически значимым веществом для данного вида сырья. Принимая во внимание тот факт, что максимумы поглощения раствора 2''-О-рамнозид витексина и водно-спиртового извлечения листьев боярышника кроваво-красного находятся в области 392 нм, целесообразным является определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина при длине волны 392 нм.

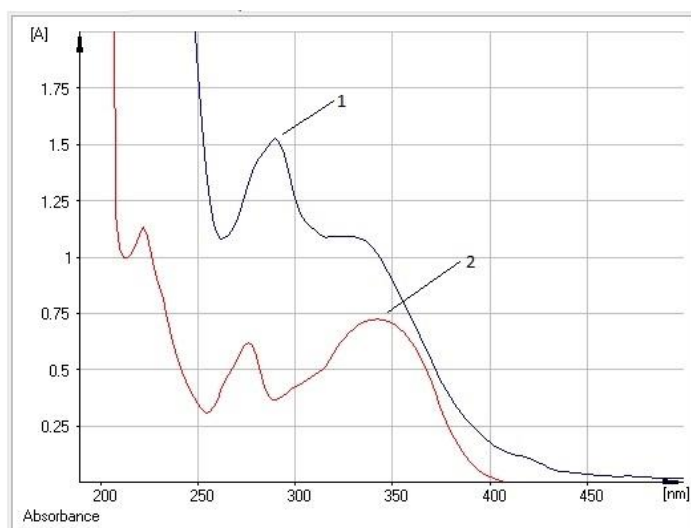


Рисунок 35 - Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного (1) и раствора 2''-О-рамнозид витексина (2)

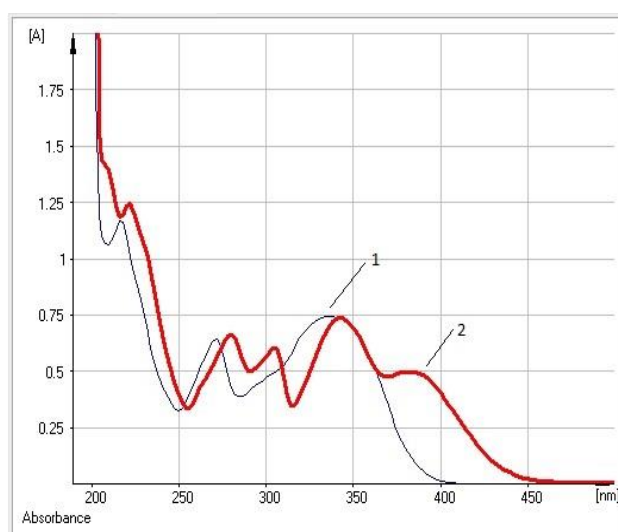


Рисунок 36 - Электронные спектры исходного раствора 2''-О-рамнозид витексина (1) и раствора 2''-О-рамнозид витексина в присутствии алюминия хлорида (2)

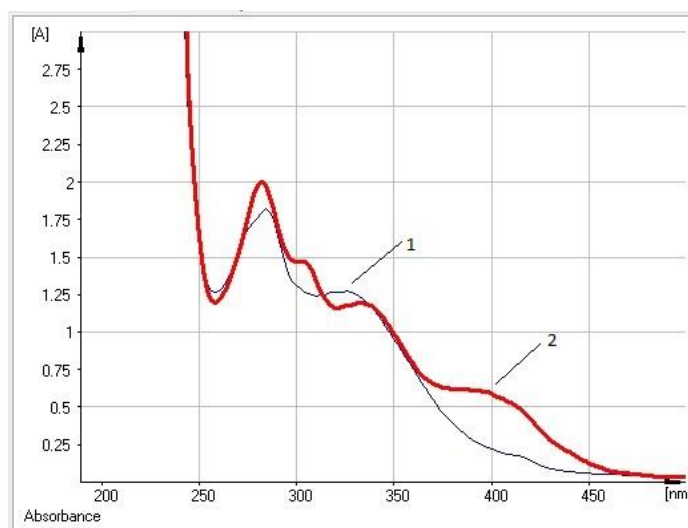


Рисунок 37 - Электронные спектры исходного раствора водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного (1) и водно-спиртового извлечения из листьев боярышника в присутствии алюминия хлорида (2)

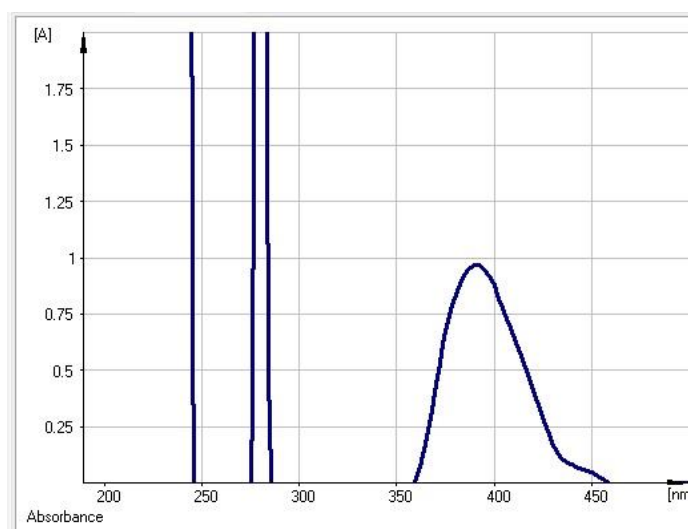


Рисунок 38 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного в условиях дифференциальной спектрофотометрии

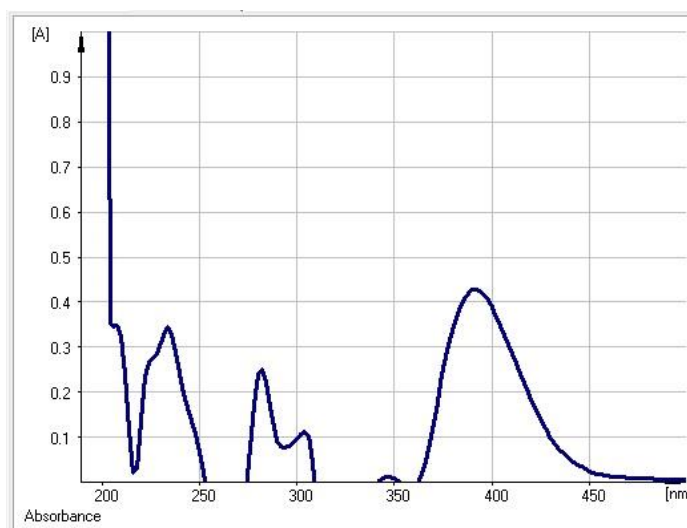


Рисунок 39 - Электронный спектр раствора 2''-О-рамнозид витексина в условиях дифференциальной спектрофотометрии

Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья показали, что оптимальными параметрами экстракции являются: измельчение сырья до размера частиц 2 мм, однократное извлечение 70% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:50 (табл. 6).

Таблица 6 - Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из листьев боярышника кроваво-красного

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение сырье:экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельченности сырья, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О- рамнозид витексина и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент				
40	1:50	60	2	2,82 ± 0,04
60	1:50	60	2	2,85± 0,04

70	1:50	60	2	$3,12 \pm 0,05$
80	1:50	60	2	$2,87 \pm 0,05$
95	1:50	60	2	$2,73 \pm 0,04$
Время экстрагирования				
70	1:50	45	2	$2,83 \pm 0,04$
70	1:50	60	2	$3,13 \pm 0,05$
70	1:50	90	2	$3,18 \pm 0,04$
Соотношение «сырье: экстрагент»				
70	1:25	60	2	$2,85 \pm 0,04$
70	1:50	60	2	$3,14 \pm 0,05$
70	1:100	60	2	$3,20 \pm 0,04$
Степень измельченности				
70	1:50	60	1	$3,14 \pm 0,05$
70	1:50	60	2	$3,16 \pm 0,05$
70	1:50	60	3	$2,95 \pm 0,05$

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного.

Аналитическую пробу сырья боярышника кроваво-красного измельчали до размера частиц 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через рыхлый комочек ваты или фильтр с красной полосой и остужают в течение 30 минут (извлечения из листьев).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовили следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (раствор сравнения).

Для расчета содержания суммы флавоноидов готовят раствор стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина, добавляют к нему 3% спиртовой раствор алюминия хлорида, измеряют оптическую плотность окрашенного комплекса при аналитической длине волны 392 нм и определенное значение оптической плотности используют в формуле расчета.

Приготовление раствора стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина.

Около 0,02 г (точная навеска) 2''-О-рамнозид витексина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 96% этиловом спирте. Затем содержимое колбы доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор А 2''-О-рамнозид витексина). После чего 1 мл раствора А 2''-О-рамнозид витексина помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида, затем доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом. Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 392 нм через 40 минут после приготовления всех растворов.

Содержание суммы флавоноидов (X в процентах) в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 50 \times 1 \times 25 \times (100 - W)},$$

где:

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина для расчета целесообразно использовать теоретическое значение его удельного показателя поглощения, равное 232:

$$X = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{m \times 232 \times 1 \times (100 - W)},$$

где:

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина, г;

232 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина при 392 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 1,57$ %. Содержание суммы флавоноидов варьировало от $2,65 \pm 0,05\%$ до $3,53 \pm 0,06\%$. Следовательно, в качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного следует рекомендовать значение не менее 2,5%, причем в пересчете на доминирующий,

диагностически значимый флавоноид - 2''-О-рамнозид витексина, а не на другие флавоноиды.

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного отражены в таблице 7.

Таблица 7 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина

n	F	$\bar{X}$	S^2	S	P (%)	T (P, f)	ΔX	$\epsilon, \%$
11	10	3,38	0,00623	0,0789	95 %	2,23	$\pm 0,053$	$\pm 1,57\%$

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев боярышника кроваво-красного и 2''-О-рамнозид витексина с алюминия хлоридом.

Линейность методики определяли для серии растворов 2''-О-рамнозид витексина (с концентрациями в диапазоне от 0,00250 до 0,03904 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99997.

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора 2''-О-рамнозид витексина с известной концентрацией (25%, 50% и 75 %) к испытуемому раствору. При этом открываемость методики находилась в пределах от 98% до 102%.

Следовательно, предложенная методика количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного отвечает параметрам валидации и может быть использована для оценки доброкачественности нового вида лекарственного растительного сырья «Боярышника кроваво-красного листа».

5.3. Числовые показатели для нового вида лекарственного растительного сырья «Боярышника кроваво-красного листа»

Для разработки проекта нормативной документации необходимо определение числовых показателей для нового вида ЛРС [18, 19, 20, 21, 22, 33].

В соответствии с ГФ РФ XIV издания для цельного и измельченного сырья листьев боярышника кроваво-красного производилось определение следующих показателей: содержание действующих веществ, влажность, содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, измельченность и содержание примесей. Испытания проводили в соответствии с методиками, описанные в ГФ РФ XIV издания.

Полученные результаты отражены в таблице 8.

Таблица 8 – Числовые показатели цельного и измельченного сырья листьев боярышника кроваво-красного

Показатель	Значение для цельного сырья	Значение для измельченного сырья
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина	От 2,65% до 3,53%	От 2,65% до 3,53%
Влажность	От 8% до 12%	От 8% до 12%
Зола общая	От 7 до 10%	От 7 до 10%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	От 1 до 3%	От 1 до 3%
Частиц, проходящих сквозь сито с	От 3 до 5%	-

отверстиями размером 3 мм		
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм	-	От 2 до 5%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм	-	От 3 до 5%
Цветки и соцветия	От 3 до 5%	От 3 до 5%
Органические примеси	От 0 до 1%	От 0 до 1%
Минеральные примеси	От 0 до 1%	От 0 до 1%

Таким образом, для листьев боярышника кроваво-красного были рассчитаны следующие числовые показатели, которые включены в проект ФС на новый вид лекарственного растительного сырья.

Для цельного сырья: содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина не менее 2,5%, влажность не более 12%, золы общей не более 10%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более 5%; цветков и соцветий не более 5%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1 %.

Для измельченного сырья: содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина не менее 2,5%, влажность не более 12%; золы общей не более 10%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с

отверстиями, размером 0,5 мм не более 5%; цветков и соцветий не более 5%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1 %.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана методика качественного анализа листьев боярышника кроваво-красного методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ – этанол - вода (26:16:3) с использованием стандартного образца гиперозида. Путем обнаружения доминирующего и диагностически значимого флавоноида - 2''-О-рамнозида витексина в присутствии стандартного образца гиперозида происходит последующий расчет величины R_{st} , которая должна быть равна 1,2.

2. Определены характеристики кривой поглощения водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного: два максимума поглощения при длине волны около 260 ± 2 нм и 330 ± 2 нм.

3. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина. Содержание суммы флавоноидов варьировало от $2,65 \pm 0,05\%$ до $3,53 \pm 0,06\%$. Следовательно, в качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного следует рекомендовать значение не менее 2,5%. Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 1,57\%$.

4. Предложенные методики качественного и количественного анализа и числовые показатели для листьев боярышника кроваво-красного включены в проект ФС на предлагаемый новый вид ЛРС – «Боярышника кроваво-красного листа».

ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ОБОСНОВАНИЮ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО И БОЯРЫШНИКА ПОЛУМЯГКОГО

Препараты на основе лекарственного растительного сырья становятся все более и применяются как для лечения, так и для профилактики заболеваний различной нозологии [36, 71, 100], что, возможно, связано с низкой токсичностью данных препаратов при достаточно высокой эффективности, а также их сравнительной дешевизной по сравнению с синтетическими аналогами [33, 42, 69, 70, 72, 116].

В соответствии с данными литературных источников лекарственные препараты на основе боярышника обладают не только кардиотоническими и кардиопротекторными свойствами, но и при длительном применении оказывают умеренное диуретическое и антидепрессантное действие, что, возможно, связано с наличием флавоноидных соединений. Кроме того, некоторыми авторами отмечается наличие противомикробной активности препаратов боярышника в отношении ряда микроорганизмов.

Для обоснования применения препаратов боярышника в комплексном лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы нами было проведено исследование антидепрессантного, диуретического, противомикробного действия жидких экстрактов на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого, а также изучение острой токсичности указанных препаратов.

6.1. Изучение антидепрессантного действия препаратов на основе плодов, цветков, листьев и побегов боярышника

6.1.1. Боярышник кроваво-красный

В опытах по исследованию антидепрессантной активности препарат сравнения амитриптилин в дозе 5 мг/кг вызывал увеличение двигательной активности лабораторных животных на 54% по сравнению с водным контролем (табл. 9). При этом жидкий экстракт листьев боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг не вызывал достоверных изменений двигательной активности животных по сравнению с водно-спиртовым контролем. Жидкий экстракт плодов боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг увеличивал двигательную активность животных на 31% по сравнению с водно-спиртовым контролем, несколько уступая амитриптилину в пороговой дозе 5 мг/кг. Жидкий экстракт побегов боярышника кроваво-красного в аналогичной дозе достоверно увеличивал двигательную активность крыс на 68% по сравнению с водно-спиртовым контролем, действуя аналогично амитриптилину в вышеуказанной дозе. Жидкий экстракт цветков боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг значительно увеличивал двигательную активность животных на 101% по сравнению с водно-спиртовым контролем, данный эффект сопоставим с действием амитриптилина в дозе 5 мг/кг.

Таблица 9 - Антидепрессантная активность жидких экстрактов боярышника кроваво-красного

Препарат	Время активного движения, с	Время активного движения, %
Контроль (Вода)	91,14±8,62	100%
Амитриптилин	140,00±10,02 *	154%
Контроль (этанол 70%)	87,14±3,11	100%
Жидкий экстракт цветков	174,86±5,98 Δ	201%
Жидкий экстракт побегов	146,14±10,88 Δ	168%

Жидкий экстракт листьев	100,86±5,94	116%
Жидкий экстракт плодов	113,86±7,59 Δ	131%

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p<0,05$;

Δ - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших этанол 70%, $p<0,05$

6.1.2. Боярышник полумягкий

При исследовании антидепрессантной активности водно-спиртовых извлечений из сырья боярышника полумягкого было выявлено, что жидкий экстракт листьев боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг увеличивал двигательную активность животных на 30% по сравнению с водно-спиртовым контролем, несколько уступая амитриптилину в пороговой дозе 5 мг/кг. Жидкий экстракт плодов в дозе 100 мкл/кг увеличивал двигательную активность животных на 45% по сравнению с водно-спиртовым контролем, данный эффект был сравним с действием амитриптилина в дозе 5 мг/кг (табл. 9). Жидкий экстракт побегов боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг увеличивал двигательную активность животных на 49% по сравнению с водно-спиртовым контролем, действуя аналогично амитриптилину в вышеуказанной дозе. Жидкий экстракт цветков боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг значительно увеличивал двигательную активность животных на 86% по сравнению с водно-спиртовым контролем, данный эффект сравним с действием амитриптилина в дозе 5 мг/кг (табл. 10). Возможно, наличие данного эффекта связано с содержанием в сырье боярышника полумягкого флавоноида гиперозида, для которого характерно антидепрессантное действие [37, 42].

**Таблица 10 – Антидепрессантная активность жидких экстрактов
боярышника полумягкого**

Препарат	Время активного движения, с	Время активного движения, %
Контроль (Вода)	91,14±8,62	100%
Амитриптилин	140,00±10,02 *	154%
Контроль – этанол 70%	86,71±6,03	100%
Жидкий экстракт плодов	125,57±15,19 Δ	145%
Жидкий экстракт цветков	161,00±14,19 Δ	186%
Жидкий экстракт побегов	128,86±11,34 Δ	149%
Жидкий экстракт листьев	113,14±10,16 Δ	130%

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p < 0,05$;

Δ - достоверность отличий показателей опытной группы относительно показателей контрольной группы животных, получавших этанол 70%, $p < 0,05$

6.2. Изучение диуретического действия препаратов на основе плодов, цветков, листьев и побегов боярышника

6.2.1. Боярышник кроваво-красный

В ходе исследований установлено, что в течение 4-х часового эксперимента один лишь жидкий экстракт листьев боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг способствовал достоверному возрастанию диуреза (на 20%), натрийуреза (на 38%) и калийуреза (на 77%) в опытной группе животных относительно показателей водно-спиртового контроля, причем данный эффект был достигнут в основном за счет снижения канальцевой реабсорбции. Жидкие экстракты цветков, побегов и плодов боярышника кроваво-красного не вызвали достоверных изменений исследуемых показателей экскреторной функции почек у опытных животных относительно водно-спиртового контроля (табл. 11). В то же время препарат сравнения

фуросемид при однократном внутрижелудочном введении в пороговой дозе 1 мг/кг способствовал достоверному возрастанию диуреза (на 23%) и натрийуреза (на 31%) за 4 часа эксперимента в опытной группе животных относительно показателей водного контроля, данный эффект был достигнут преимущественно за счет снижения канальцевой реабсорбции (табл. 12).

Таким образом, можно сделать вывод, что жидкий экстракт листьев боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг при однократном внутрижелудочном введении в течение 4-х часового эксперимента способствовал возрастанию диуреза и натрийуреза, действуя аналогично фуросемиду в пороговой дозе 1 мг/кг. На наш взгляд, диуретическая активность жидкого экстракта на основе листьев боярышника кроваво-красного обусловлена вкладом 2''-О-рамнозида витексина, для которого нами была выявлена диуретическая активность [61].

Таблица 11 - Влияние жидких экстрактов боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг на экскреторную функцию почек крыс за 4 ч эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатини нурез, мг
Контроль (этанол 70%)	1,48±0,13	216,15±30,58	114,77±13,17	2,35±0,22
Жидкий экстракт цветков	1,10±0,08	226,21±20,95	143,03±13,81	2,68±0,28
Жидкий экстракт листьев	1,77±0,11*	297,94±26,37*	168,74±10,58*	2,80±0,19
Жидкий экстракт побегов	1,41±0,06	255,45±21,36	150,31±13,16*	2,47±0,21

Жидкий экстракт плодов	1,24±0,09	229,40±21,01	108,09±6,06	2,59±0,21
------------------------------	-----------	--------------	-------------	-----------

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших этанол 70%, $p<0,05$

Таблица 12 - Влияние внутрижелудочного введения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг на выделительную функцию почек крыс за 4 ч эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатининуриез, мг
Контроль (вода)	1,98±0,11	403,68±32,08	104,10±10,7 2	2,73±0,29
Фуросемид	2,44±0,13*	529,24±43,46 *	123,76±6,83	3,14±0,25

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p<0,05$

За 24 часа эксперимента введение жидкого экстракта листьев боярышника кроваво-красного привело к увеличению почечной экскреции воды (на 29%), натрия (на 30%) и креатинина (на 36%) относительно показателей водно-спиртового контроля, данный факт говорит о снижении канальцевой реабсорбции и повышении клубочковой фильтрации. При этом жидкие экстракты цветков, побегов и плодов боярышника кроваво-красного не вызывали достоверных изменений исследуемых параметров экскреторной функции почек у опытных животных (табл. 13). Препарат сравнения гипотиазид, введенный однократно внутрижелудочно в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг, способствовал значительному достоверному возрастанию диуреза (на 40%), натрийуреза (на 54%) и калийуреза (на 55%)

относительно водного контроля за 24 часа эксперимента преимущественно за счет канальцевого компонента механизма действия (табл. 14).

Из вышесказанного следует, что однократное внутрижелудочное введение жидкого экстракта листьев боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг за 24 часа эксперимента способствовало умеренному, несколько уступающему действию гипотиазиду в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг увеличению диуреза и натрийуреза. Отличительной особенностью действия жидкого экстракта листьев боярышника кроваво-красного являлось наличие креатининуретических свойств, нехарактерных для гипотиазида (табл. 14).

Таблица 13 - Влияние жидких экстрактов боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг на экскреторную функцию почек крыс за 24 часа эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатинину рез, мг
Контроль (этанол 70%)	1,70±0,14	303,15±26,88	140,03±16,55	3,29±0,38
Жидкий экстракт цветков	1,41±0,13	316,37±35,27	139,03±16,74	3,23±0,31
Жидкий экстракт листьев	2,19±0,11*	392,55±29,20 *	167,98±18,34	4,49±0,32*
Жидкий экстракт побегов	1,65±0,14	309,74±36,82	156,40±18,67	3,86±0,42
Жидкий экстракт плодов	1,67±0,14	364,89±33,45	146,86±20,97	3,37±0,30

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших этанол 70%, $p < 0,05$

Таблица 14 - Влияние внутрижелудочного введения гипотиазида в средней терапевтической дозе 20 мг/кг на выделительную функцию почек крыс за 24 часа эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатинин урез, мг
Контроль (вода)	2,73±0,17	462,88±52,16	155,86±20,70	5,27±0,55
Гипотиазид	3,83±0,22 *	711,31±90,84*	241,60±19,26*	6,85±0,59

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p < 0,05$

6.2.2. Боярышник полумягкий

В ходе экспериментов по изучению влияния жидких экстрактов боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг на выделительную функцию почек было установлено, что за 4 и 24 часа исследования жидкие экстракты цветков, побегов, плодов и листьев боярышника полумягкого не привели к росту исследуемых параметров экскреторной функции почек у опытных животных относительно водно-спиртового контроля. Напротив, за 4 часа опыта жидкий экстракт цветков боярышника полумягкого достоверно уменьшал показатели диуреза (на 30%) и креатининуреза (на 33%) у животных опытной группы относительно водно-спиртового контроля. Жидкий экстракт побегов боярышника полумягкого способствовал изолированному снижению почечной экскреции воды в опытной группе (на 34%) (табл. 15).

Однократное внутрижелудочное введение препарата сравнения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг за 4 часа эксперимента привело к достоверному увеличению диуреза (на 23%) и натрийуреза (на 31%) в опытной группе животных относительно показателей водного контроля, данный факт

был достигнут преимущественно за счет снижения канальцевой реабсорбции (табл. 12).

Таблица 15 - Влияние жидких экстрактов боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг на экскреторную функцию почек крыс за 4 часа эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатини нурез, мг
Контроль (этанол 70%)	1,66±0,12	235,55±23,65	130,27±14,14	2,64±0,23
Жидкий экстракт цветков	1,17±0,15 *	187,71±17,77	111,42±14,74	1,82±0,24 *
Жидкий экстракт побегов	1,09±0,11 *	204,85±23,79	97,05±10,71	2,25±0,17
Жидкий экстракт плодов	1,44±0,24	266,39±50,93	150,70±24,82	2,45±0,39
Жидкий экстракт листьев	1,46±0,09	265,13±15,20	172,81±19,34	2,82±0,21

* - достоверность отличий показателей опытной группы относительно показателей контрольной группы животных, получавших этанол 70%, $p < 0,05$

Также в ходе экспериментов по изучению влияния жидких экстрактов боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг за 24 часа эксперимента на выделительную функцию почек было установлено следующее: жидкий экстракт цветков боярышника полумягкого уменьшал диурез (на 38%), натрийурез (на 37%), калийурез (на 47%) и креатининурез (на 33%); жидкий экстракт побегов боярышника полумягкого способствовал уменьшению почечной экскреции воды (на 46%), натрия (на 34%), калия (на 42%) и креатинина (на 42%); жидкий экстракт листьев боярышника полумягкого

приводил к изолированному снижению диуреза (на 26%) в опытной группе относительно водно-спиртового контроля (табл. 16). В свою очередь за 24 часа эксперимента препарат сравнения гипотиазид, введенный однократно внутрижелудочно в дозе 20 мг/кг, способствовал значительному достоверному возрастанию диуреза (на 40%), натрийуреза (на 54%) и калийуреза (на 55%) относительно водного контроля (табл. 14).

Таблица 16 - Влияние жидких экстрактов боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг на экскреторную функцию почек крыс за 24 часа эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатининур ез, мг
Контроль (этанол 70%)	2,27±0,16	402,75±27,21	187,49±24,63	4,33±0,32
Жидкий экстракт цветков	1,41±0,15 *	254,18±35,29 *	106,12±14,93 *	2,90±0,37 *
Жидкий экстракт побегов	1,23±0,17 *	267,64±35,97 *	109,42±20,61 *	2,53±0,41 *
Жидкий экстракт плодов	1,80±0,29	332,82±61,83	175,98±36,40	4,22±0,75
Жидкий экстракт листьев	1,68±0,09 *	374,71±26,88	163,74±10,84	3,87±0,26

* - достоверность отличий показателей опытной группы относительно показателей контрольной группы животных, получавших этанол 70%, $p < 0,05$

6.3. Изучение антимикробной активности препаратов плодов, цветков и листьев боярышника

В рамках данной диссертационной работы изучали антимикробную активность водно-спиртовых извлечений из сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого. Для приготовления жидких экстрактов использовали спирт этиловый с концентрацией 70%, так как данный экстрагент считается наиболее оптимальным для извлечения веществ флавоноидной природы [42]. В качестве препарата сравнения использовали экстрагент – 70% спирт этиловый.

6.3.1. Боярышник кроваво-красный

В ходе микробиологического анализа препаратов на основе сырья боярышника кроваво-красного было установлено, что жидкие экстракты плодов и цветков боярышника кроваво-красного активны в отношении *Pseudomonas aeruginosa* при разведении в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, при этом жидкий экстракт листьев оказывает антимикробное действие в разведении в 2, 4, 8 и 16 раз. Причем спирт этиловый 70% концентрации обладает подавляющим действием на данные микроорганизмы только при разведении в 2 и 4 раза.

Все препараты снижают рост *Bacillus cereus* и *Candida albicans* при разведении в 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 раз, в то время как чистый экстрагент оказывает ингибирующее действие на рост только при разведении в 2, 4 и 8 раз. В отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* все исследуемые экстракты не оказались активны. Рост данных микроорганизмов подавляется в пределах действия чистого экстрагента или даже ниже контрольных значений (табл. 17-20).

Таблица 17 – Результаты исследования антимикробной активности 70% этилового спирта

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

Таблица 18 – Результаты исследования антимикробной активности жидкого экстракта плодов боярышника кроваво-красного 1:1 (70% спирт)

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

Таблица 19 – Результаты исследования антимикробной активности жидкого экстракта цветков боярышника кроваво-красного 1:1 (70% спирт)

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

Таблица 20 – Результаты исследования антимикробной активности жидкого экстракта листьев боярышника кроваво-красного 1:2 (70% спирт)

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

6.3.2. Боярышник полумягкий

При анализе жидких экстрактов плодов, цветков и листьев боярышника полумягкого было выявлено, что жидкий экстракт плодов боярышника проявляет антимикробную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa* при разведении в 8 и 16; в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*

в разведении 16 и 32; в отношении *Candida albicans* в разведении 32, что не на много превышает действие этилового спирта 70% концентрации.

При этом жидкий экстракт листьев боярышника полумягкого превышает действие чистого растворителя только в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, рост которой он подавляет при разведении 8 и 16. Жидкий экстракт цветков боярышника полумягкого показал антимикробную активность на уровне стандарта, даже несколько уступая ему (табл. 21-23).

Таблица 21 – Результаты исследования антимикробной активности
жидкого экстракта плодов боярышника полумягкого 1:1 (70% спирт)

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

Таблица 22 – Результаты исследования антимикробной активности жидкого экстракта цветков боярышника полумягкого 1:1 (70% спирт)

[illegible]

<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

Таблица 23 – Результаты исследования антимикробной активности жидкого экстракта листьев боярышника полумягкого 1:2 (70% спирт)

Микроорганизм	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: «-» - роста нет; «+» - наблюдается рост

6.4. Изучение острой токсичности препаратов на основе плодов, цветков и листьев боярышника

Для введения в официальную медицинскую практику нового вида рода боярышник (*Crataegus submollis* Sarg.) и нового вида лекарственного растительного сырья (боярышника листья) целесообразно проведение испытаний по изучению острой токсичности препаратов на его основе. Нами были изучены острая токсичность жидких экстрактов сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого.

6.4.1. Боярышник кроваво-красный

В ходе диссертационной работы проводили оценку острой токсичности водно-спиртовых извлечений из сырья боярышника кроваво-красного [84]. Первая группа животных получала однократно внутрижелудочно жидкий экстракт цветков боярышника кроваво-красного в дозе 3 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, вторая группа – жидкий экстракт листьев боярышника кроваво-красного в дозе 3 г/кг, третья группа - жидкий экстракт побегов боярышника кроваво-красного в дозе 3 г/кг, четвертая группа – этиловый спирт 70% в дозе 0,5 г/кг на фоне 3% водной нагрузки. Эксперимент длился 14 дней, причем в первый день за лабораторными животными вели непрерывное наблюдение. В результате проведенного исследования летальных случаев зарегистрировано не было. За все время наблюдения нарушений в поведенческой активности крыс контрольной и опытной групп не было зафиксировано.

6.4.2. Боярышник полумягкий

В ходе диссертационной работы проводили оценку острой токсичности водно-спиртовых извлечений из сырья боярышника полумягкого [84]. Первая группа животных получала однократно внутрижелудочно жидкий экстракт цветков боярышника полумягкого дозе 0,5 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, вторая группа – жидкий экстракт листьев боярышника полумягкого, третья группа – жидкий экстракт плодов боярышника полумягкого, четвертая группа – 70% этиловый спирт аналогичном объеме. За все время наблюдения нарушений в поведенческой активности крыс контрольной и опытной групп не было зафиксировано.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Жидкие экстракты цветков и побегов боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг обладают антидепрессантной активностью, сравнимой с действием amitriptyline в пороговой дозе 5 мг/кг:

А) Антидепрессантная активность жидких экстрактов боярышника кроваво-красного увеличивается в следующем ряду: экстракт плодов – экстракт побегов – экстракт цветков;

Б) Антидепрессантная активность жидких экстрактов боярышника полумягкого увеличивается в следующем ряду: экстракт листьев – экстракт плодов – экстракт побегов – экстракт цветков.

2. Жидкие экстракты на основе сырья боярышника кроваво-красного и полумягкого при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг способствуют изменению экскреторной функции почек:

а) Жидкий экстракт листьев боярышника кроваво-красного в дозе 100 мкл/кг обладает коротким латентным периодом, длительным диуретическим и салуретическим действием (канальцевый эффект), проявляя к концу 24 часового эксперимента дополнительно креатининуретические свойства (клубочковый эффект). Жидкие экстракты плодов, цветков и побегов боярышника кроваво-красного не обладают диуретическими свойствами. На наш взгляд, диуретическая активность жидкого экстракта на основе листьев боярышника кроваво-красного обусловлена в большей степени вкладом 2''-О-рамнозида витексина, для которого нами было выявлено наличие диуретической активности.

б) Жидкие экстракты цветков, побегов и листьев боярышника полумягкого в дозе 100 мкл/кг угнетают экскреторную функцию почек.

3. Жидкие экстракты плодов, цветков и листьев боярышника кроваво-красного в несколько раз превышают антимикробное действие чистого экстрагента и подавляют рост *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*. Жидкие экстракты на основе сырья боярышника полумягкого практически не оказывают антимикробного действия.

4. На основании данных, полученных в результате проведенных исследований по изучению острой токсичности, жидкие экстракты цветков, листьев и побегов боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого можно отнести к III классу токсичности (ГОСТ 12.1.007-76) [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование некоторых видов рода Боярышник (*Crataegus* L.) позволило сделать следующие **общие выводы**:

1. Проведенное сравнительное морфолого-анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного и боярышника однопестичного позволило выявить основные отличительные признаки черешка обоих видов боярышника. Основными петиолярными признаками боярышника кроваво-красного являются: особенности очертания в базальной, медиальной и апикальной части, значительная кутинизация эпидермы, характер люминесценции кутина и протопласта, опушение, локализованное, в основном, в апикальной части черешка. Основными признаками петиолярной анатомии черешка боярышника однопестичного являются: армирование проводящего пучка уголковой колленхимой; слабозаметная кутинизация эпидермы; отсутствие опушения.

2. В результате проведенного сравнительного фитохимического исследования листьев боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого методом ТСХ в листьях боярышника полумягкого не обнаружено 2''-О-рамнозида витексина, доминирующего в листьях боярышника кроваво-красного. С помощью метода дифференциальной УФ-спектроскопии выявлено, что листья боярышника кроваво-красного и листья боярышника полумягкого имеют различные значения длинноволнового максимума.

3. Из листьев боярышника кроваво-красного с использованием колоночной хроматографии, реакций кислотного и ферментативного гидролиза, ТСХ, УФ-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии впервые для данного вида сырья выделены и идентифицированы 4-О- β -D-глюкопиранозид *n*-кумаровой кислоты, 3-О- β -D-глюкопиранозид эргостерина, трифолин и кверцитрин, а также выделены известные для плодов боярышника кроваво-красного вещества – витексин, 2''-О-рамнозида витексина, гиперозид, кофейная и олеаноловая кислота.

Впервые выделено новое природное вещество, названное нами сангвинеозидом, которое имеет структуру 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,5¹-тетрагидроксифлаванона.

4. Разработана методика качественной оценки листьев боярышника кроваво-красного методом тонкослойной хроматографии с использованием стандартного образца гиперозида. Путем обнаружения доминирующего и диагностически значимого флавоноида - 2''-О-рамнозида витексина в присутствии стандартного образца гиперозида происходит последующий расчет величины R_{st} , которая должна быть равна 1,2. Кроме того, оценка подлинности листьев боярышника кроваво-красного возможна при использовании УФ-спектроскопии, кривая поглощения спирто-водного извлечения из листьев боярышника кроваво-красного имеет два максимума: при длине волны 260 ± 2 нм и 330 ± 2 нм.

5. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина в листьях боярышника кроваво-красного методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 392 нм. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина в качественном сырье «Боярышника кроваво-красного листа» варьирует в пределах от $2,65\% \pm 0,05\%$ до $3,53\% \pm 0,05\%$.

6. Разработаны показатели качества листьев боярышника кроваво-красного. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина в качественном сырье листьев боярышника кроваво-красного должно быть не менее 2,5%.

7. В результате изучения диуретической активности жидких экстрактов на основе сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого было выявлено, что только жидкий экстракт листьев боярышника кроваво-красного при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг обладает диуретическим действием.

8. В результате изучения антидепрессантной активности жидких экстрактов сырья боярышника кроваво-красного и боярышника полумягкого обнаружено, что для жидких экстрактов боярышника кроваво-красного при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг антидепрессантная активность увеличивается в следующем ряду: экстракт плодов – экстракт побегов – экстракт цветков. Антидепрессантная активность жидких экстрактов боярышника полумягкого при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг увеличивается в следующем ряду: экстракт листьев – экстракт плодов – экстракт побегов – экстракт цветков.

9. В соответствии с результатами фармакогностических исследований разработан проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья – «Боярышника кроваво-красного листья».

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии в том числе с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих флавоноиды, а также разработки объективных методик анализа и подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ – Государственная Фармакопея

ДСК – диазобензолсульфоокислота

НД – нормативная документация

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ОФС – общая фармакопейная статья

РФ – Российская Федерация

СО – стандартный образец

США – Соединенные штаты Америки

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврач, А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение флавоноидов в плодах боярышника / А.С. Аврач, Е.В. Сергунова, И.А. Самылина // Фармация. – 2013. - № 3. – С. 14-16.
2. Анцышкина, А.М. Ботанико-фармакогностическое изучение боярышников Таджикистана (б. туркестанского, б. понтийского, б. гиссарского): автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02/ Анцышкина Алла Михайловна. - М, 1990. - 22 с.
3. Анцышкина, А.М. О фармакологической активности препаратов боярышника / А.М. Анцышкина, Е.И. Барабанов, И.А. Самылина, Н.В. Каверина // Фармация. - 1990. - № 2. - С. 63-65.
4. Ареал боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) [Электронный ресурс] / URL: http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Crataegus_sanguinea/map/index.html - 20.12.2018.
5. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. М.: ГУГК, 1980. С. 242-243.
6. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений / под ред. Г.П. Яковлева. – 3-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 759 с.
7. Буданцев, А.Л. Дикорастущие полезные растения России / А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. - СПб.: СПХФА, 2001. - 663 с.
8. Валягина-Малютина, Е.Т. Деревья и кустарники Средней полосы Европейской части России: Определитель / Е.Т. Валягина-Малютина. – СПб.: Специальная литература, 1998. – 112 с.
9. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Книга 2: Физико-химические метода анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.- 5-е изд., стереотип. / В.П. Васильев. – М.: Дрофа, 2005. – 383 с.

10. Васюков, В.М. Обзор дикорастущих и дичающих боярышников (*Crataegus* L., *Rosaceae*) Среднего и Нижнего Поволжья / В.М. Васюков, С.В. Саксонов // Вестник Мордовского университета. – 2013. - № 3-4. – С. 9-13.
11. Виноградов, В.М. Лекарственные растения в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы / В.М. Виноградов, В.К. Мартынов, В.В. Чернакова. – Л.: Знание, 1990. – 112 с.
12. Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения (Растения-целители): справочное пособие. – 4-е изд. перераб. и доп. – Москва: Высшая школа, 1990. – 544 с.
13. Гончаров, Н.Ф. Изучение эфирных масел цветков североамериканских видов боярышника / Н.Ф. Гончаров // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. - № 5 (104). – С. 52-55.
14. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
15. Государственная фармакопея Республики Беларусь. 1-е издание. Том 2. Министерство здравоохранения Республики Беларусь: Минск, 2007. - 471 с.
16. Государственная фармакопея Республики Беларусь. 2-е издание. Том 2. Министерство здравоохранения Республики Беларусь: Типография «Победа», 2016. – 1368 с.
17. Государственная фармакопея Республики Казахстан. 1-е издание. Том 2. Министерство здравоохранения Республики Казахстан: Астана, 2009. - 803 с.
18. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.1 / Москва, 2018. – 1814 с. [Электронный ресурс] / URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/index.html - 15.01.2019
19. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.2 / Москва, 2018. – 1448 с. [Электронный ресурс] / URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/index.html - 15.01.2019
20. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.3 / Москва, 2018. – 1925 с. [Электронный ресурс] / URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_3/HTML/index.html - 15.01.2019

21. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.4 / Москва, 2018. – 1832 с. [Электронный ресурс] / URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.html - 15.01.2019.
22. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
23. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
24. Гринкевич, Н.И. Фармакогнозия. Атлас / Н.И. Гринкевич, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
25. Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения: справочное пособие / Н.И. Гринкевич, И.А. Баландин, В.А. Ермакова, Е.Б. Зорин, Е.Я. Ладыгина, И.А. Самылина, И.Н. Сокольский. – М.: Высшая школа, 1992. – 398 с.
26. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрывтосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов. – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. – С.496.
27. Губергриц, А.Я. Лекарственные растения Донбасса / А.Я. Губергриц, Н.И. Соломченко. – 5-е изд., перераб. и доп. – Донецк: Донбас, 1990. – 280 с.
28. Деревья и кустарники СССР. Том 3 / Под ред. С.Я. Соколова. – Москва-Ленинград: Издание Академии наук СССР, 1954. - 872 с.
29. Дикорастущие растения СССР: Справ. / Под ред. А.Ф. Гаммермана, И.И. Грома. – М.: Медицина, 1976. – 288 с.
30. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1977. – 275 с.
31. Евдокимова, О.В. Фармакологическое действие препаратов боярышника / О.В. Евдокимова // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: научные труды ВНИИФ. - 1999. - Т. 38, Ч. 2. - С. 205-212.

32. Киселева, Т.Л. Изучение химического состава нефармакопейных видов боярышника и разработка показателей качества сырья: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02 / Киселева Татьяна Леонидовна. - М., 1988. - 21 с.
33. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
34. Киселева, Т.Л. Лечебные свойства пищевых растений / Т.Л. Киселева, А.А. Карпеев, Ю.А. Смирнова и др. – М.: Изд-во ФНКЭЦ NVLK Росздрава, 2007. – 533 с.
35. Кузнецов, П.В. Именные (цветные) реакции в фармацевтическом и химико-токсикологическом функциональном анализе: учебное пособие / П.В. Кузнецов. – Кемерово: АИ «Кузбассвуиздат», 2016. – 167 с.
36. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Фундаментальные исследования. – 2014. – №11. – С. 366-371.
37. Куркин, В.А., Диуретическая и антидепрессантная активность густого экстракта боярышника кроваво-красного / В.А. Куркин, А.В. Куркина, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева, Т.В. Морозова // Бюллетень сибирской медицины. - 2015. - № 14 (3). - С. 18-22.
38. Куркин, В.А. Иллюстрированный словарь терминов и понятий в фармакогнозии: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников / В.А. Куркин, В.Ф. Новодранова, Т.В. Куркина. – Москва; Самара: ГП «Перспектива», СамГМУ, 2002. – 188 с.
39. Куркин, В.А. Исследование по разработке методики стандартизации листьев боярышника кроваво-красного / В.А. Куркин, Т.В. Морозова, О.Е. Правдивцева // Химия растительного сырья. - 2017. - № 3. - С 169-173.
40. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.

41. Куркин, В.А. Сравнительное исследование диуретической активности водно-спиртовых извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. Т. 159. - № 3. - С. 348-352.
42. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с.
43. Куркин, В.А. Этимология названий лекарственных растений: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин, Е.В. Бекишева, Т.В. Куркина. – Москва, 2000. – 44 с.
44. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография/ А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
45. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ...докт. фарм. наук: 14.04.02 / Куркина Анна Владимировна. – Самара, 2013. – 48 с.
46. Лекарственные растения: Справ. / Под ред. Чикова П.С. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 431 с.
47. Лекарственные растения Донбасса / Под ред. А.Я. Кобзарь. – 5-е изд., перераб. и доп. – Донецк, 1990. – 280 с.
48. Лекарственные растения Костромской области: Справ. / Под ред. А.И. Шретера, В.В. Шутова, А.М. Задорожного. – М.: Экология, 1992. – 365 с.
49. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е издание / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
50. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е издание / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 635 с.

51. Макаренко, Н.В. Исследование острой токсичности и диуретической активности металлопроизводных гуминовых, фульвовых и гумусовых кислот / Н.В. Макаренко, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, Д.А. Андриянов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17. – № 5-3. – С. 925-929.
52. Махлаюк, В.П. Лекарственные растения в народной медицине / В.П. Махлаюк. – Саратов: Приволж. кн. изд-во, 1991. – 544 с.
53. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
54. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
55. Носаль, М.А. Лекарственные растения и способы их применения в народе / М.А. Носаль, И.М. Носаль. – Мн.: Полымя, 1993. – 272 с.
56. Оганесян, Э.Т. О механизме реакции тритерпеноидов с серной кислотой / Э.Т. Оганесян // Химия природных соединений. – 1980. – №5. – С. 647-651.
57. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. Т.6. – № 4. – С. 306-359.
58. Палов, М. Энциклопедия лекарственных растений. Пер. с немец. под ред. И.А. Губанова / М. Палов. – М.: Мир, 1998. – С. 467.
59. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту / Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков. – Л.: Лениздат, 1990. – 384 с.
60. Патент РФ № 2494703. Способ получения диуреза у лабораторных животных / Зайцева Е.Н.; заявл. 02.06.2012; опубл. 10.10.2013 // Бюл. № 28.
61. Патент РФ на изобретение № 2677284. Способ получения вещества, обладающего диуретической и антидепрессантной активностью / Куркин В.А. [и др.]; заявл. 19.03.2018; опубл. 16.01.2019 // Бюл. № 2.

62. Попова, И.А. Анатомогистологическое исследование листочков сложного листа *Hedysarum grandiflorum* Pall. / И.А. Попова, Т.И. Плаксина, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Вестник Самарского государственного университета. - 2011. - № 8 (89). - С. 196-201.
63. Производственная практика по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: Учеб. пособие для студентов фармацев. вузов / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева и др. – Самара: Офорт, 2007. – 126 с.
64. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. — Санкт-Петербург, Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – Т.2. - 513 с.
65. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Hydrangeaceae-Haloragaceae*. – Ленинград: Наука, 1987. – 326 с.
66. Родионова, Т.В. Стандартизация листьев боярышника / Т.В. Родионова, О.М. Хишова // Вестник Фармации (Витебск). – 2008. - № 2 (40). – С. 70-79.
67. Сагарадзе, В.А. Определение флавоноидов в цветках с листьями боярышника методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием / В.А. Сагарадзе, Е.Ю. Бабаева, Е.И. Каленикова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. - № 51 (4). – С. 30-33.
68. Сагарадзе, В.А. Установление подлинности перспективного вида лекарственного сырья – цветков с листьями боярышника / В.А. Сагарадзе, Е.Ю. Бабаева, Е.И. Каленикова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2017. - № 20. - С. 26-31.
69. Самбукова, Т.В., Овчинников, Б.В., Ганапольский, В.П., Ятманов, А.Н., Шабанов, П.Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии / Т.В. Самбукова, Б.В. Овчинникова, В.П. Ганапольский, А.Н. Ятманов, П.Д. Шабанов // Фитофармакология. - 2017. - Т. 15. - № 2. - С. 56–63.
DOI: https://elibrary.ru/download/elibrary_29811244_45106484.pdf

70. Самылина, И.А. Атлас лекарственных растений и сырья. Учебное пособие по фармакогнозии / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – М.: Авторская Академия; Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 318 с.
71. Самылина, И.А. Перспективы создания сухих экстрактов / И.А. Самылина, О.А. Блинова, Л.А. Кумышева, С.Д. Марченко, А.И. Иванов // Фармация. – 2006. - № 2. – С. 43-46.
72. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 39-41.
73. Самылина, И.А. О фармакологической активности препаратов боярышника / И.А. Самылина // Фармация. - 1990. - №2. - С. 63-65.
74. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.2. – С. 384.
75. Самылина, И.А. Боярышник (*Crataegus*): возможности медицинского применения / И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская // Фарматека. - 2010. - № 8. - С. 83-85.
76. Сдобнина, А.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии. Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: Материалы Международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина. - Пенза: Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 2008. - 420 с.
77. Сидора, Н.Ф. Изучение фенольных соединений плодов североамериканских видов боярышников / Н.Ф. Сидора, Н.В. Ковалева, А.М. Комиссаренко, А.Н. Гончаров // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2006. – Т 9 (2). – С. 149-155.
78. Силаева, Т.Б. О боярышниках (*Crataegus* L.) в Республике Мордовия / Т.Б. Силаева, А.М. Агеева, И.В. Кирюхин, И.И. Матвиенко // Фиторазнообразие Восточной Европы. - 2007. - №4. - С.216-218.

79. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – Москва: Медицина, 1984. – 464 с.
80. Трофимова, С.В. Изучение антиаритмической активности листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, Н.Ж. Басченко, Т.А. Сапожникова, Р.Ю. Хисамутдинова // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. - № 2. – С. 299-302.
81. Трофимова, С.В. Фармаконостическое изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана: дисс. ...кандидат фарм. наук. – Уфа: Башкирский государственный медицинский университет, 2014. – 362 с.
82. Флора Восточной Европы. Том 10 / Отв. ред. Н.Н. Цвелев. – СПб.: Мир и семья; Издательство СПХФА, 2001. – 670 с.
83. Флора СССР / Под ред. В.Л. Комарова. – Москва-Ленинград: Издательство академии наук СССР, 1939. – Т. 9. – С. 416-468.
84. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. - Москва, 2005. - 832 с.
85. Хасанова, С.Р. Изучение кардиопротективных свойств листьев боярышника кроваво-красного и сбора «Кардиофит» / С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова, А.П. Потанина и др. // Медицинский вестник Башкортостана. - 2012. - Т.7, № 5. - С. 112-114.
86. Хасанова, С.Р. Определение флавоноидного состава листьев боярышника кроваво-красного из флоры РБ методом ВЭЖХ / С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова, Н.В. Кудашкина // Современная медицина и фармацевтика: анализ и перспективы развития: материалы 8 Международной научнопрактической конференции. - М., Изд-во «Спутник». - 2013. - С. 36.
87. Хасанова, С.Р. Фитотерапия артериальной гипертензии. Библиотека практикующего врача: монография / С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, К.А. Пупыкина и др. - Уфа, Изд. «Травы Башкирии», 2010.- 93 с.

88. Хасанова, С.Р. Экспериментально-теоретическое обоснование создания и стандартизации лекарственных растительных препаратов с антиоксидантной активностью: дисс. ...доктор фарм. наук. – Уфа: Башкирский государственный медицинский университет, 2016. – 462 с.
89. Хишова, О.М. Количественное определение процианидинов плодов боярышника / О.М. Хишова, Г.Н. Бузук // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 48. - № 12. – С. 27-30.
90. Хишова, О.М. Сравнительная количественная оценка содержания флавоноидов в растительном сырье боярышника кроваво-красного / О.М. Хишова, Т.В. Родионова // Вестник фармации. – 2008. - № 1 (39). – С. 15-17.
91. Черепнин, В.Л. Пищевые растения Сибири / В.Л. Черепнин. – Новосибирск: Наука, 1987. – 192 с.
92. Шамрук, С.Г. Лекарственные растения: сбор, заготовка, применение. Справочное пособие / С.Г. Шамрук. – Минск: Ураджай, 1988. – 287 с.
93. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М.: Мир, 1980. – Т. 1, 2. – С. 20.
94. Begmatov, N.B. Low-Molecular-Weight Compounds from Flowers of *Apocynum lancifolium* / N.B. Begmatov, Kh.M. Bobakulov, X. Xin, H.A. Aisa // Chemistry of Natural Compounds. – 2014. - No 50 (6). – P. 1116-1117.
95. Chang, Q. Hawthorn / Q. Chang, Z. Zuo, F. Harrison, M.S Chow // Journal Clinical Pharmacology. – 2002. – No. 42. – P. 605-612.
96. Chen, Z.Y. The Change and the impact of IFHL on oxidative stress in the formation of NASH in rats / Z.Y. Chen, M.X. Yan // The Journal of Medical Research. - 2007. - Vol. 36. - P. 33–36.
97. Cheng, S. Simultaneous determination of vitexin-2"-O-glucoside, vitexin-2"-O-rhamnoside, rutin, and hyperoside in the extract of hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.) leaves by RP-HPLC with ultraviolet photodiode array detection / S. Cheng, F. Qiu, J. Huang, J. He // Journal of Separation Science. – 2007. - No 30(5). – P. 717-721.

98. *Crataegus monogyna* [Электронный ресурс] / URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16496> - 10.10.2018.
99. *Crataegus submollis* Sargent [Электронный ресурс] / URL: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=250100176 – 20.10.2018.
100. Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety / M. Ekor // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. - No. 4. – Article 177.
101. European Pharmacopoeia Online 9.0 [Электронный ресурс] / URL: <http://online6.edqm.eu/ep900/> - 26.02.2019.
102. Gupta, J. Isolation and characterization of flavonoid glycoside from leaves of *Abrus precatorius* / J. Gupta, A. Gupta // *International Journal of Chemical Studies*/ - 2016. – Vol. 4 (1). – P. 14-17.
103. Hu, M. Evaluation of a *Crataegus*-based multiherb formula for dyslipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / M. Hu, W. Zeng, B. Tomlinson // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. - 2014. [Электронный ресурс] / URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009229/> – 20.10.2018.
104. Ji, Y.S. Protective effect and its molecular mechanism of FMCL on PC 12 cells apoptosis induced by H₂O₂ / Y.S. Ji, H. Li, S.J. Yang // *Chin. Pharmacol. Bull.* - 2006. - Vol. 22. - P. 760–762.
105. Jalaly, L. Comparison of the effects of *Crataegus oxyacantha* extract, aerobic exercise and their combination on the serum levels of ICAM-1 and E-Selectin in patients with stable angina pectoris / L. Jalaly, G. Sharifi, M. Faramarzi et al. // *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol. 23:54. DOI 10.1186/s40199-015-0137-2.
106. Kumar, D. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives / D. Kumar, V. Arya, Z.A. Bhat, A.K. Nisar, N.P. Deo // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2012. – No. 22(5). – P. 1187-1200.

107. Kurkin, V.A. Phenylpropanoids of a callus culture of *Rhodiola rosea* / V.A. Kurkin, G.G. Zapesochaya, A.G. Dubichev et al. // Chemistry of Natural Compounds. – 1991. – No. 27. – P. 419-425.
108. Kwon, H.C. Cytotoxic constituents of *Pilea mongolica* / H.C. Kwon, K.R. Lee, O.P. Zee // Archives of Pharmacal Research. – 1999. – No. 20 (2). – P. 180-183.
109. Li, C.Q. Study on germicidal efficacy of extract of hawthorn fruit pit and its influencing factors / C.Q., Li, W. Wu, Y. Tong // Chin. J. Disinfect. - 2007. - Vol. 24. - P. 50–52.
110. Li, L. Anti-aging effect of total flavone of hawthorn leaf / L. Li, H. Lv, H. Pang // Lishizhen Med. Mater. Med. Res. - 2007. - Vol. 9. - P. 2143–2144.
111. Lin, L. Experimental observation on germicidal efficacy of hawthorn liquid and its influencing factors / L. Lin, Y.J. Chen, L. Li, Y. Cao, Q.X. Sun // Chin. J. Disinfect. - 2000. - Vol. 17.- P. 85–88.
112. Liu, X.Y. Study on lipid regulation mechanism of total flavonoids from *Folium crataegi* by 3T3-L1 cells / X.Y. Liu, L. Zhou, R.Y. Liang // Chin. Arch. Tradit. Chin. Med. – 2009. – No. 27. – P. 1066–1068.
113. Mabry, The Systematic Identification of Flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas. - New York: Springer Verlag, Berlin–Heidelberg, 1970, 354 p.
114. Mudge, E.M. Single-Laboratory Validation for the Determination of Flavonoids in Hawthorn Leaves and Finished Products by LC-UV / E.M. Mudge, Y. Liu, J.A. Lund, P.N. Brown // Planta Medica. - 2016. – No. 82(17). – P. 1487-1492.
115. Mustapha, N. Crataegus azarolus Leaves Induce Antiproliferative Activity, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human HT-29 and HCT-116 Colorectal Cancer Cells / N. Mustapha, A. Pinon, Y. Limami, A. Simon, K. Ghedira, T. Hennebelle, L. Chekir-Ghedira // Journal of Cellular Biochemistry. – 2016. – No. 117(5). - P. 1262-1272.
116. Pal, S.K. Herbal medicine: current status and the future / S.K. Pal, Y. Shukla // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. - 2003. – No. 4(4). - P. 281-288.

117. Pengzhan, L. Composition of hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits and leaves and Emblic leafflower (*Phyllanthus emblica*) fruits: PhD Thesis. – Turku, Finland: University of Turku, 2012. – 96 p.
118. Pittler, M.H. Hawthorn extract for treating chronic heart failure: meta-analysis of randomized trials / M.H. Pittler, K. Schmidt, E Ernst // American Journal of Medicine. – 2003. – No. 114 (8). - P. 665-774.
119. Raghu, M.G. The Isolation and Structural determination of Flavonoids from *Justicia gendarussa* and Pushpa Agrawal / M.G. Raghu, A. Pushpa // IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. – 2016. - Vol. 11-6, P. 73-79.
120. Rastogi, S. Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders / S Rastogi, M.M. Pandey, A.K. Rawat // Phytomedicine. – 2016. -No. 23(11). – P. 1082-1089.
121. Schmidt, U. Efficacy of the hawthorn (*Crataegus*) preparation LI 132 in 78 patients with chronic congestive heart failure defined as NYHA functional class II / Schmidt U., Kuhn U., Ploch M., Hubner W.D. // Phytomedicine. – 1994. – Vol. 1. - P. 17-24.
122. Sydora, N.V. Phytochemical research of *Crataegus submollis* Sarg. leaves lipophilic complex and study of its antibacterial activity / N.V. Sydora, A.M. Kovaleva, V.K. Iakovenko, T.V. Ilyina, E.V. Krivoruchko // Der Pharmacia Lettre. – 2016. – No. 8 (21). – P. 19-23.
123. Sydora, N.V. Research the antimicrobial activity of *Crataegus submollis* Sarg. fruits lipophylic extract / N.V. Sydora, O.V. Demechko // Topical issues of new drugs development: abstracts of XXIII international scientific and practical conference of young scientists and student. - 2016. - Vol. 1. - P. 124-125.
124. Taha, K.F. Phytochemical profile of *Sequoia sempervirens* grown in Egypt / K.F. Taha, Z.T. Shakour // international journal of pharmaceutical sciences and research. – 2017. – No. 8(3). – P. 1081-1091.
125. Thenmozhi, S. Isolation, characterization and in-vitro cytotoxic study of vitexin from *Vitex pinnata* Linn. Leaves / S. Thenmozhi, U. Subasini // International

Journal of Research in Pharmacology and Pharmacotherapeutics. – 2016/ - No. 1. – P. 84-89.

126. United States Pharmacopeia 32 ed. [Электронный ресурс] / URL: <http://www.uspbpep.com/> -25.02.2019.

127. Wang, C.L. Chemical constituent, pharmacological effects and clinical application of *Crataegus pinnatifida* / C.L. Wang, B.Z. Lu, G.L. Hou // Strait Pharm. J. - 2010. - Vol. 3. - P. 75–78.

128. Wang, J. Effect of *Crataegus* Usage in Cardiovascular Disease Prevention: An Evidence-Based Approach / J. Wang, B. Feng // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2013. - Article ID 149363.

129. Yang, R.M. Mechanism of early atherosclerosis in guinea pig: abnormal metabolism of LDL-C / R.M. Yang, H.M. Chen, N.N. Gao, X. Song, J.L. Li, D.Y. Cai// Acta Lab. Anim. Sci. Sin. - 2011. - Vol. 23. - P. 237–241.

130. Zhe, G. Quantification of Ten Polyphenols in the Leaves of Chinese Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E. Br.) by HPLC / G. Zhe, Y.N. Jia, T.Y. Cui et al. // Asian Journal of Chemistry. – 2013. - Vol. 25. – No. 18. - P. 10344-10348.

131. Zorniak, M. *Crataegus* special extract ws 1442: up-to-date review of experimental and clinical experiences / M. Zorniak, B. Szydło, T.F. Krzeminski // Journal of physiology and pharmacology. – 2017. – No. 68 (4). - P. 521-526.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор  И.Л. ДАВЫДКИН

« 20 » декабря 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Морозовой Татьяны Владимировны «Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии: зав. кафедрой фармацевтической технологии, д. фарм. н., профессора С.В. Первушкина, доцента, к. фарм. н. Л.Д. Климовой, старшего преподавателя, к. фарм. н. О.В. Бер подтверждает использование материалов диссертационного исследования Морозовой Т.В., посвященного изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и препаратов на основе растений рода боярышник в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по производству лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья растений рода боярышник.

Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья являются методической и методологической основой для научного обоснования создания препаратов на основе сырья растений рода боярышник.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии,
д. фарм. н., профессор

 С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.

 Л.Д. КЛИМОВА

Старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.

 О.В. БЕР

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. ДАВЫДКИН

« 20 » декабря 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Морозовой Татьяны Владимировны «Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д. фарм. н., профессора В.А. Куркина, д. фарм. н., профессора Е.В. Авдеевой, доцента, д. фарм. н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Морозовой Т.В., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) растений рода боярышник, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и аспирантами, а также в научно-исследовательской работе.

Внедренные результаты способствуют разработке объективных методик диагностики и определения качества сырья растений рода боярышник и препаратов на основе данного растения.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., профессор

В.А. КУРКИН

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

Е.В. АВДЕЕВА

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

О.Е. ПРАВДИЦЕВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. ДАВЫДКИН

« 20 » декабря 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Морозовой Татьяны Владимировны «Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, профессора, д. фарм. н. И.К. Петрухиной, профессора, д. фарм. н. Е.П. Гладуновой, доцента, к. фарм. н. Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Морозовой Т.В., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья растений рода боярышник в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований кардиотонических, антидепрессантных и диуретических лекарственных препаратов.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья «Боярышника листья» и создания конкурентоспособных лекарственных средств, обладающих комплексным кардиотоническим, антидепрессантным и диуретическим действием.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации,
к. фарм. н., профессор



И.К. ПЕТРУХИНА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
д. фарм. н.



Е.П. ГЛАДУНОВА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
к. фарм. н.



Е.Л. АБДУЛМАНОВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. ДАВЫДКИН

« 20 » декабря 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Морозовой Татьяны Владимировны «Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета: зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, доцента к.фарм.н. А.В. Воронина, доцента, к.б.н. Н.В. Расцвевой, доцента, к.х.н С.Х. Шариповой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Морозовой Т.В., посвященного изучению химического состава и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья растений рода боярышник в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе растений рода боярышник.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,
к. ф. н., доцент



А.В. ВОРОНИН

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. б. н.



Н.В. РАСЦВЕТОВА

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. х. н.



С.Х. ШАРИПОВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Руководитель ГБУЗ

«Центр контроля качества лекарственных
средств Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

2018 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Морозовой Татьяны Владимировны «Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» и.о. заместителя руководителя центра Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Ибадовой М.А., провизора-аналитика Ждамировой О.К. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Морозовой Т.В., посвященного фармакогностическому исследованию некоторых видов рода боярышник при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы Центра. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии в присутствии ГСО гиперозида, РСО рутина. Методики определения подлинности, а также методики определения суммы флавоноидов в сырье боярышника воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Морозовой Т.В. будет способствовать повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья видов рода боярышник, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

И.о. заместителя руководителя ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области», к. фарм. н.

Л.Е. ЖНЯКИНА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области»

М.А. ИБАДОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области»

О.К. ЖДАМИРОВА

«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»



Н.Д. ЛУЖНОВ

24 декабря 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Морозовой Татьяны Владимировны «Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н.Загорянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Морозовой Т.В., посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа сырья растений рода боярышник, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья – «Боярышника листья» в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа сырья растений рода боярышник апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе растений рода боярышник.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»  А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»  А.В. НИКИТЕНКОВ

446554, Самарская обл., Сергиевский район, с. Антоновка, ул. Полевая, д. 19А

Приложение 2. Патент на изобретение «Способ количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного»



**Приложение 3. Патент на изобретение «Способ получения
вещества, обладающего диуретической и антидепрессантной
активностью»**



**Приложение 4. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС
«Боярышника кроваво-красного листа»**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения», доктор
фармацевтических наук, профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Боярышника кроваво-красного
листа

ФС.2.5. .
Вводится впервые

Crataegi sanguineae folia

Срок введения установлен
с «__» _____ 20__ г.
до «__» _____ 20__ г.

Собранные в фазу цветения и высушенные листья дикорастущего многолетнего растения боярышника кроваво-красного – *Crataegus sanguinea* Pall., сем. Розоцветных – *Rosaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье изучается невооруженным глазом, с помощью лупы (х10) или под микроскопом (8х, 16х, 20х, 40х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье.

Цельные или частично измельченные листья, простые, короткочерешковые, с прилистниками. Листовые пластины яйцевидной или обратнояйцевидной формы, длиной от 2,0 до 6,5 см, шириной от 2,0 до 8,0 см. Верхушка листа заостренная, основание ширококлиновидное. Край листовой пластинки дважды крупнозубчатый. Жилкование перисто-краевое. Листовая пластинка, слабо опушенная по всей поверхности с обеих сторон, жилки зеленого цвета.

Цвет листьев с верхней стороны темно-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый. У основания листа имеются прилистники несимметричной серповидной формы зеленого и светло-зеленого цвета.

Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Измельченное сырье.

Кусочки листовой пластины, черешков и прилистников различной формы и размера, проходящие сквозь сито размером 5 мм, цвет кусочков листьев с верхней стороны зеленый и с нижней - светло-зеленый.

Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Микроскопические признаки. Сырье исследуется с помощью микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье.

При рассмотрении верхнего эпидермиса листа с поверхности должны быть видны эпидермальные многоугольные клетки со слабоизвилистой клеточной стенкой и четковидными утолщениями, складки кутикулы. На обеих сторонах листа встречаются простые, одноклеточные, толстостенные, заостренные волоски, основание которых погружено в эпидермис.

С нижней стороны листа должны быть видны эпидермальные клетки с сильно извилистыми тонкими стенками, крупные, многочисленные устьица аномоцитного типа, расположенные неравномерно. В мезофилле листа и вдоль жилок встречаются крупные друзы и кристаллы оксалата кальция.

Анатомо-диагностические признаки черешка: базальная часть черешка на поперечном сечении почти округлая с незначительной впадиной с верхней стороны листа, срез медиальной части черешка боярышника кроваво-красного неровный с двумя сильно оттянутыми ребрами, апикальная часть черешка угловатая, ребристая, со значительным жестким опушением.

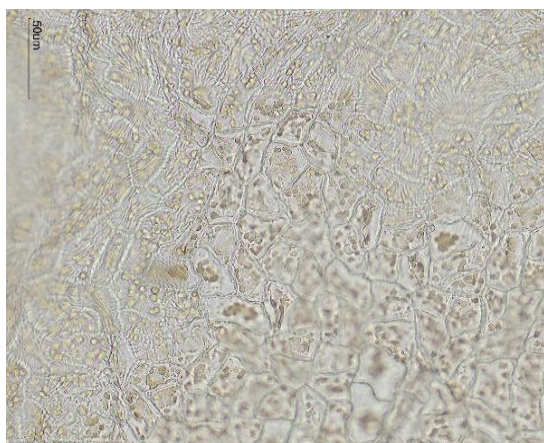
При рассмотрении среза базальной части черешка в центре обнаруживается закрытый коллатеральный пучок в форме полумесяца. Проводящие элементы ксилемы лигнифицированы, что подтверждается реакцией с раствором сернокислого анилина. Элементы ксилемы в проводящем пучке черешка боярышника кроваво-красного можно идентифицировать по ярко-желтой флуоресценции лигнифицированных клеточных стенок в УФ-свете. Клетки паренхимы черешка также люминесцируют в УФ-свете.

С поверхности черешок покрыт эпидермой. Эпидермальные клетки мелкие, округлые, со значительно утолщенной кутикулой. При освещении УФ-светом кутикула люминесцирует ярко-желтым светом, цитоплазма и пластиды эпидермы люминесцируют ярко-оранжевым цветом. Кутикула окрашивается Суданом III вместе с липофильными протопластами клеток эпидермы в розовый цвет.

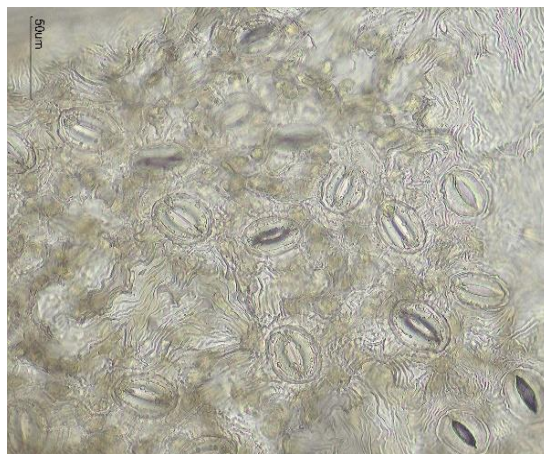
Клетки эпидермы черешка вытянутые, угловатые, почти прямоугольной формы. Поверхность черешка неоднородно опушена простыми кроющими трихомами бичевидной формы. У основания черешка трихомы отсутствуют. Наибольшее количество трихом отмечается в апикальной части черешка.

Измельченное сырье.

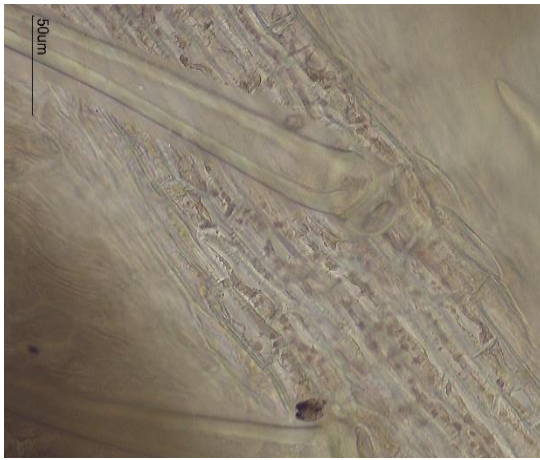
При рассмотрении препаратов измельченного сырья должны быть видны фрагменты жилок листа с толстостенными одноклеточными волосками, друзы оксалата кальция, расположенные вдоль жилок листа, устьица аномоцитного типа с нижней стороны листа.



1.



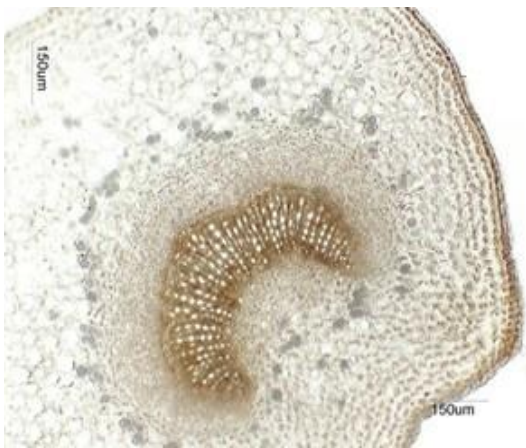
2.



3.



4.



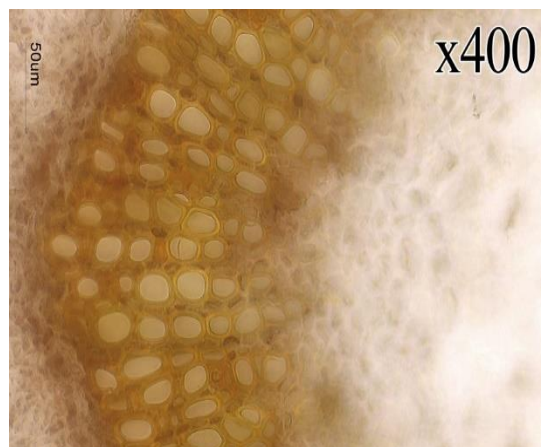
5



6.



7.



8.



Определение основных групп биологически активных веществ:

1. К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют прибавляли 2 мл 3% раствора алюминия (III) хлорида спиртового, через 20-30 минут появляется зеленовато-желтое окрашивание.

2. УФ-спектроскопия

Раствор А, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет два максимума поглощения: коротковолновый при длине волны 260 ± 2 нм и длинноволновый – при длине волны 330 ± 2 нм (рис. 2).

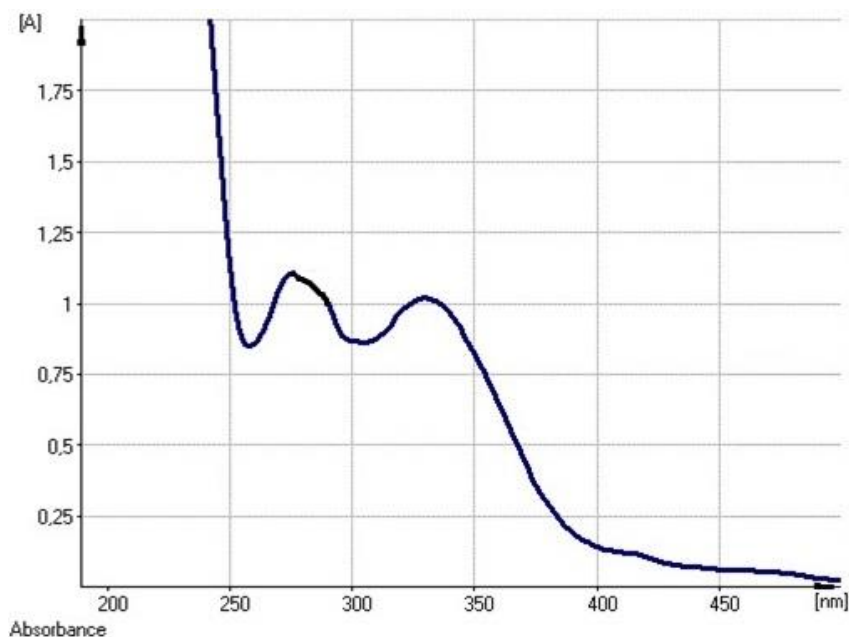


Рисунок 2 – Электронный спектр водно-спиртового извлечения из листьев боярышника кроваво-красного

3. Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) гиперозида. Около 0,02 г (точная навеска) гиперозида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20-30 мл спирта этилового 70% при нагревании на водяной бане, доводят спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» предварительно активируют в сушильном шкафу при температуре 100-105°C (1 час). На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения, полученного в разделе «Количественное определение». В качестве вещества-свидетеля используют спиртовой раствор СО гиперозида. Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами смеси растворителей *хлороформ – спирт этиловый – вода (26:16:3)*. Хроматографируют восходящим способом.

После того, как фронт растворителя проходит около 8 см, пластинку достают из камеры, высушивают и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм. При этом на хроматограмме обнаруживается темно-бурое пятно (254 и 366 нм) с величиной R_f около 0,5 (СО гиперозида), а также темно-синее (254 нм) и желто-оранжевое пятно (366 нм) с величиной R_f около 0,6 (2''-О-рамнозид витексина). Затем хроматограмму проявляют щелочным раствором диазобензолсульфокислоты и высушивают. Пятна приобретают желто-оранжевое окрашивание. Допускается обнаружение других окрашенных зон. После происходит расчет величины R_s , равной отношению коэффициента удерживания (R_f) 2''-О-рамнозид витексина к коэффициенту удерживания гиперозида. Величина R_{st} должна быть равна 1,2.

$$R_{st} = \frac{R_f (2'' - \text{О} - \text{рамнозид витексина})}{R_f (\text{гиперозида})} = \frac{0,6}{0,5} = 1,2$$

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12%.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3%.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более 5%. *Измельченное сырье:* проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 5%.

Посторонние примеси.

Цветков и соцветий. *Цельное, измельченное сырье:* не более 5%.

Органическая примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1%.

Минеральная примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина не менее 2,5%.

Аналитическую пробу сырья боярышника кроваво-красного измельчали до размера частиц 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через рыхлый комочек ваты или фильтр с красной полосой и остужают в течение 30 минут (извлечения из листьев).

ФС 42-_____ с.10

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовили следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (раствор сравнения).

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 392 нм через 40 минут после приготовления всех растворов.

Для расчета содержания суммы флавоноидов используют теоретическое значение удельного показателя поглощения 2''-О-рамнозид витексина при длине волны 392 нм, равное 232.

Содержание суммы флавоноидов (X в процентах) в пересчете на 2''-О-рамнозид витексина и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{m \times 232 \times 1 \times (100 - W)}$$

где:

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_o – масса стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина, г;

232 - удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) стандартного образца 2''-О-рамнозид витексина при 392 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

ФС 42- c.11

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Проректор по научной
и инновационной работе,
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор



И.Л. Давыдкин
2019 г.

Заведующий кафедрой
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

В.А. Куркин
«25» января 2019 г.

Очный аспирант кафедры
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России

«25» января 2019 г. Т.В. Морозова