

ТРОФИМОВА СВЕТЛАНА ВАЛЕРЬЕВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА
КРОВАВО-КРАСНОГО *CRATAEGUS SANGUINEA* PALL. ИЗ ФЛОРЫ
БАШКОРТОСТАНА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

**Хасанова Светлана
Рашитовна**

кандидат фармацевтических наук, доцент ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

**Ханина Миниса
Абдуллаевна**

доктор фармацевтических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники

**Решетникова Мария
Дмитриевна**

кандидат фармацевтических наук, доцент ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Защита состоится «23» сентября 2014 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46.

Текст диссертации размещен на сайте ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России <http://www.pfa.ru> «03» апреля 2014 г.

Дата размещения объявления о защите диссертации на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.mon.gov.ru> «___» _____ 2014 г.

Автореферат, отзыв научного руководителя и объявление о защите диссертации размещены на сайте ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России <http://www.pfa.ru> «___» _____ 2014 г.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Н.В. Слепова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Расширение ассортимента лекарственных средств на основе отечественной растительной сырьевой базы является одной из актуальных задач современной фармации. Возможным решением данной задачи является внедрение в практику новых видов лекарственного растительного сырья уже изученных растений. Одним из таких растений является боярышник кроваво-красный.

Лекарственным растительным сырьем боярышника, разрешенным к применению в медицинской практике на территории России, являются плоды и цветки. Ценность препаратов боярышника заключается в том, что они содержат большое число биологически активных веществ, влияющих на сердечно-сосудистую систему, усиливающих кровообращение в венечных сосудах сердца, участвующих в окислительно-восстановительных процессах, обладающих способностью уменьшать проницаемость и ломкость капилляров. Плоды и цветки боярышника применяют при функциональных расстройствах сердечной деятельности, ангионеврозах, при гипертонической болезни, мерцательной аритмии, пароксизмальной тахикардии.

На территории Российской Федерации встречается около 40 видов дикорастущих боярышников. Из 12 официальных видов, включенных в действующую Государственную Фармакопею XI издания, на территории Российской Федерации произрастает 9, при этом на территории Республики Башкортостан в диком виде встречается только один вид – боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall.).

Однако существующая сырьевая база боярышников в России не отвечает запросам фармацевтической промышленности. Одним из путей решения данной проблемы является введение в практику нового вида сырья – листьев боярышника. За рубежом изучают данный вид сырья для качественной замены или совместного использования наравне с плодами и цветками. Побеги (цветки и листья) боярышника включены в Европейскую, Французскую, Немецкую, Швейцарскую, Британскую фармакопеи и Американскую травяную фармакопею. Листья боярышника применяются в медицине во Франции, Бельгии, Польше, Германии, Болгарии, Израиле.

Таким образом, введение в медицинскую практику нового вида сырья – листьев боярышника кроваво-красного является актуальным.

Цель и задачи исследования. Целью наших исследований явилось фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного, произрастающего на территории Республики Башкортостан, в качестве нового вида лекарственного растительного сырья.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- Провести морфолого-анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного, выявить их анатомо-диагностические признаки.
- Изучить химический состав основных групп биологически активных веществ листьев боярышника и определить их количественное содержание.
- Определить оптимальное время заготовки листьев боярышника.
- Разработать методы стандартизации листьев боярышника кроваво-красного.
- Изучить биологические свойства листьев боярышника кроваво-красного.

- Определить критерии подлинности и показатели качества листьев боярышника.
- Разработать проект фармакопейной статьи «Боярышника кроваво-красного листа».

Научная новизна. Уточнены морфологические особенности листьев боярышника кроваво-красного. Впервые проведено морфологическое исследование прилистников боярышника кроваво-красного. При проведении микроскопического исследования листьев боярышника выявлены новые анатомо-диагностические признаки. Впервые проведено микроскопическое исследование прилистников и черешка листа боярышника кроваво-красного. На основе выявленных диагностически-значимых признаков сырья разработан показатель качества для стандартизации листьев боярышника кроваво-красного.

С использованием современных физико-химических методов анализа (газовая хроматография масс-спектрометрия, ВЭЖХ, спектрофотометрия) изучен состав биологически активных веществ листьев боярышника кроваво-красного. Методом ВЭЖХ обнаружено 18 фенольных соединений, из которых впервые в листьях боярышника обнаружены и идентифицированы байкалеин, физетин, дигидрокверцетин. Методом ГХ/МС установлено присутствие 31 соединения, из которых идентифицированы по сравнению с библиотечными масс-спектрами 6 веществ, 4 из них - соединения фенольной природы: кумаран, α -гидрохинон, пирокатехин и хинная кислота.

Впервые изучен химический состав эфирного масла листьев боярышника кроваво-красного. При хромато-масс-спектрометрическом исследовании образцов эфирного масла листьев боярышника выявлено 44 соединения, из которых идентифицировано 18. Установлен качественный состав моносахаридов полисахаридного комплекса. Впервые изучен аминокислотный, микро- и макроэлементный состав листьев боярышника кроваво-красного.

Определено количественное содержание флавоноидов, органических кислот, кумаринов, дубильных веществ, сапонинов, аскорбиновой кислоты, полисахаридов, каротиноидов.

Определены сроки годности и время заготовки листьев боярышника кроваво-красного.

Практическая значимость. Теоретические и экспериментальные исследования биологических свойств показали целесообразность дальнейшего фармакологического исследования листьев боярышника кроваво-красного в качестве средства для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Установлены антиоксидантные, кардиопротективные, антиаритмические свойства листьев боярышника кроваво-красного. Определена острая токсичность, на основании данных исследований листья боярышника были отнесены к классу малотоксичных соединений.

Разработанные методики качественного анализа методом хроматографии в тонком слое сорбента и количественного содержания суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин внедрены в учебный процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России.

Выявленные диагностически-значимые признаки листьев боярышника кроваво-красного предложены для стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья.

На основе проведенных исследований разработан проект фармакопейной статьи «Боярышника кроваво-красного листа» и «Инструкция по сбору и сушке листьев боярышника кроваво-красного».

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции ученых Республики Башкортостан с международным участием «Научный прорыв-2009», посвященной Году поддержки и развития молодежных инициатив, Дню Республики (г. Уфа, 2009 г.), Республиканской конференции молодых ученых Республики Башкортостан с международным участием «Медицинская наука – 2009», посвященной Году поддержки и развития молодежных инициатив, Дню Медицинского работника (г. Уфа, 2009 г.), Республиканской научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной Году молодежи в России и Году поддержки и развития молодежных инициатив в РБ (г. Уфа, 2009 г.), конкурсе работ молодых ученых по программе «У.М.Н.И.К.» (г. Уфа, 2009 г.), Всероссийской молодежной конференции «Фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности. Доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов» (г. Уфа, июль 2012 г.), Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Итоги и перспективы молодежной медицинской и фармацевтической науки» (г. Уфа, ноябрь 2012 г.), Всероссийском конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, апрель 2012 г.), Молодежном форуме Приволжского федерального округа «iВолга-2013» (Самарская область, июнь 2013 г.)

Личное участие автора. Автор лично участвовала в планировании и проведении экспериментов, выявила новые микродиагностические признаки листьев боярышника кроваво-красного, определила качественный и количественный состав биологически активных веществ, разработала методику количественного определения флавоноидов, показатели качества листьев, проводила статистическую обработку и интерпретацию результатов исследований, подготовила научные публикации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 8 статей – в изданиях из перечня, рекомендованных ВАК.

Исследования выполнены в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, номер государственной регистрации 01.9.50 007426.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты морфологического и анатомо-диагностического исследования листьев боярышника кроваво-красного.
- Данные фитохимического исследования листьев боярышника кроваво-красного.
- Данные по времени заготовки и срокам годности листьев боярышника кроваво-красного.
- Методики качественного и количественного анализа листьев боярышника кроваво-красного и числовые показатели качества сырья.

– Данные исследований биологических свойств листьев боярышника кроваво-красного.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, пунктам 6 и 7 паспорта специальности «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 161 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», 4 экспериментальных глав, выводов, списка литературы и приложений, 33 таблиц, 47 рисунков. Список литературы включает 129 библиографических источников, из которых 27 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования.

Основным объектом исследования стали листья боярышника кроваво-красного (*folia Crataegi sanguineae* Pall.), собранные в разные сроки вегетации растения в районах Республики Башкортостан в течение 2008-2012 годов. Объектами сравнительного исследования служили цветки и плоды боярышника, собранные в соответствии с требованиями нормативной документации.

Для изучения химического состава исследуемого сырья, использовали как классические, так и современные методы анализа: хроматография на бумаге и в тонком слое сорбента, титриметрические методы, спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография масс-спектрометрия (ГХ/МС), рентгенофлуоресцентный метод.

Морфолого-анатомический анализ проводили в соответствии с требованиями ГФ XI с использованием микровизора MVZ-103, микроскопа «Минимед - 501».

Определение числовых показателей осуществляли, руководствуясь методиками ГФ XI (вып.1,2) и XII, разработку проекта нормативной документации - в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00.

Оценка биологической активности листьев боярышника кроваво-красного проводилась совместно с Лабораторией биоорганической химии УНЦ РАН (доцент Н.Ж. Басченко), кафедрой фармакологии №2 Башкирского государственного медицинского университета (профессор Л.А. Валеева), ЦНИЛ Башкирского государственного медицинского университета (профессор Р.Р. Фархутдинов). Исследование биологической активности проводили на мышах, крысах, а также *in vitro* в модельных системах. При работе с животными соблюдались Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1985). Определение острой токсичности проводили по известной методике (Беленький, 1963). Противоаритмическую активность изучали на экспериментальных моделях аритмий, вызванных химическими веществами аконитином и хлоридом кальция. Влияние настоя листьев боярышника на биоэлектрическую проводимость сердца изучалось после

профилактического приема (14 дней) и при экспериментальном адреналин-гипоксическом повреждении миокарда. Антиоксидантную активность листьев боярышника изучали с использованием двух методов (*in vitro*): по способности ингибировать аутоокисление адреналина и методом хемилюминесценции.

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с применением программ «Excel 7.0», «Statistica 5.0», «Statistica 6.0». Достоверность различий между выборками определялась по непараметрическому U-критерию Манна - Уитни.

Морфолого-анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.)

При исследовании внешних признаков листьев боярышника кроваво-красного были установлены следующие особенности: листья яйцевидные с ширококлиновидным основанием, более или менее глубоко-лопастные с крупнозубчатым краем. Жилкование перисто-краевое. Жилки зеленые, выдаются с нижней стороны листа. В месте прикрепления черешка по два прилистника серповидной формы, с мелкопильчатым краем, цвет прилистников - зеленый с верхней стороны, и светло-зеленый с нижней. Жилкование прилистников перисто-краевое.

В ходе микроскопического анализа были установлены анатомо-диагностические признаки исследуемого сырья (рис.1,2): клетки верхнего эпидермиса - многоугольные, прямостенные, с четковидными утолщениями; нижнего – с извилистыми стенками. Кутикула на обеих сторонах образует складки. Устьица крупные, многочисленные, располагаются на нижней стороне листа, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). На обеих сторонах листа встречаются многочисленные волоски - простые одноклеточные, толстостенные, с основанием, погруженным в эпидермис. На нижней стороне листа волоски располагаются преимущественно по жилкам. В месте прикрепления волоска эпидермис образует розетку из 5-7 округлых клеток, окрашенных в бурый цвет (эфирное масло). Клетки эпидермиса, окружающие розетку клеток также окрашены в бурый цвет. В мезофилле листа и вдоль жилок встречаются крупные друзы и кристаллы оксалата кальция (кубические и цилиндрические) в виде кристаллоносной обкладки жилок. На верхушке листовой пластинки и сегментах – многоклеточные железки с бурым содержимым. По краю листовой пластинки – редкие простые, длинные, одноклеточные, толстостенные волоски, у основания листа – многочисленные.

При исследовании поперечного среза листовой пластинки было установлено, что лист имеет дорсовентральное строение. На поперечном срезе черешка листа боярышника под эпидермисом наружной стороны находятся два ряда уголкового колленхимы, в паренхиме располагается один коллатеральный пучок серповидной формы, и на эпидермисе внутренней стороны встречаются простые одноклеточные волоски.

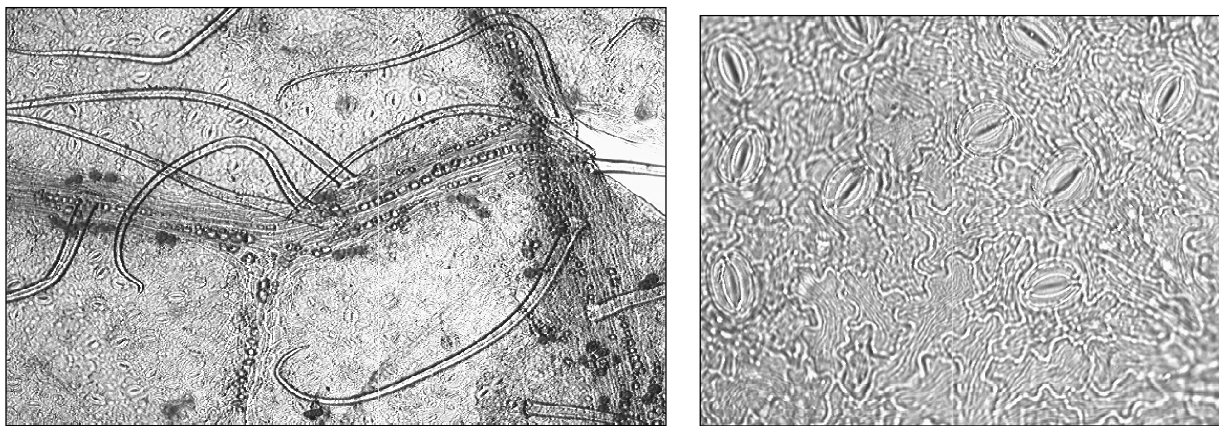


Рис.1. Эпидермис нижней стороны листа боярышника кроваво-красного

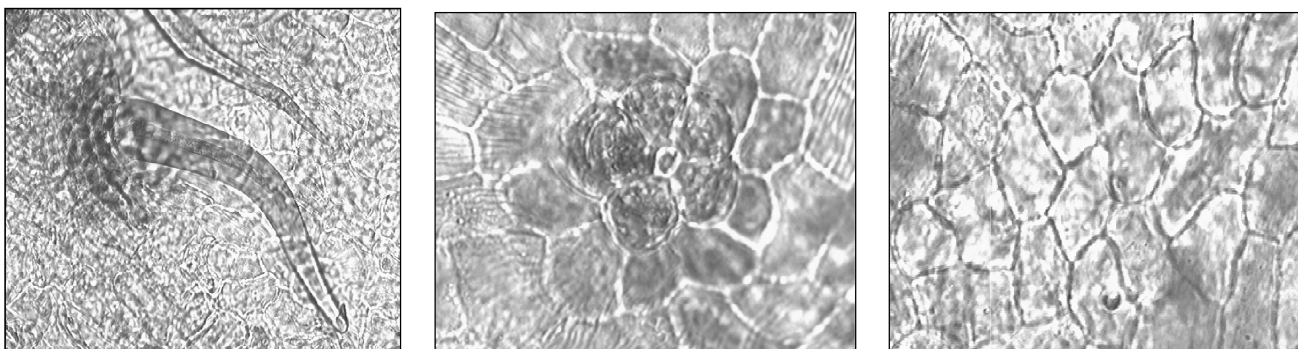


Рис.2. Эпидермис верхней стороны листа боярышника кроваво-красного

При микроскопическом исследовании прилистников с поверхности обнаружены следующие анатомо-диагностические признаки (рис.3): клетки верхнего и нижнего эпидермиса - многоугольные, со слабоизвилистой стенкой, с четковидными утолщениями. Кутикула на обеих сторонах образует складки, наиболее интенсивно складки образуются вокруг устьиц. Устьица крупные, многочисленные, располагаются на нижней стороне прилистника небольшими группами, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Очень редко на верхней стороне прилистников встречаются простые одноклеточные, толстостенные волоски, с основанием, погруженным в эпидермис. В мезофилле прилистника и вдоль жилок встречаются крупные друзы и кристаллы оксалата кальция (кубические и цилиндрические) в виде кристаллоносной обкладки жилок. На верхушке прилистника и по краю – многочисленные железки (многоклеточная головка на многоклеточной ножке) с бурым содержимым. Железки иногда встречаются и на поверхности эпидермиса прилистников. Жилки прилистника окрашиваются суданом III в розовый цвет.

В ходе микроскопического анализа были выявлены диагностически-значимые признаки (ДЗП) и проведена их количественная оценка. Среднее значение ДЗП листьев боярышника кроваво-красного составило $39,44 \pm 5,85\%$.

Также для включения в проект нормативной документации проведено микроскопическое исследование измельченных листьев боярышника кроваво-красного.

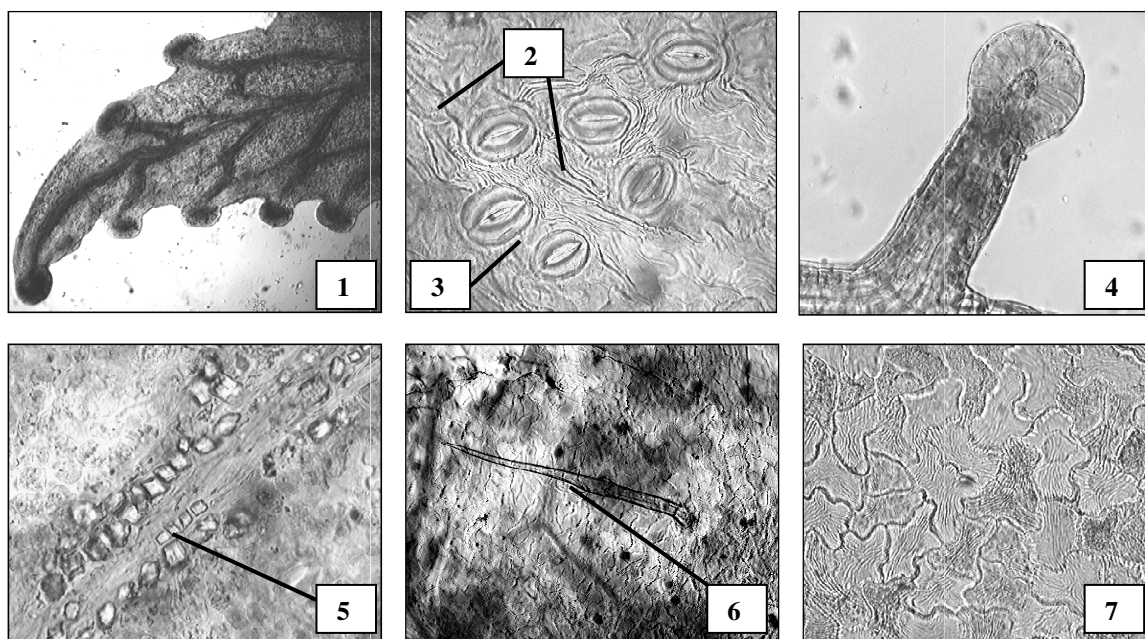


Рис.3. Прилистник листа боярышника кроваво-красного (1 - внешний вид прилистника, 2 - складчатость кутикулы нижней стороны листа, 3 – устьица, 4 - железка по краю прилистника, 5 – кристаллоносная обкладка жилки, 6 – простой волосок, 7 – складчатость кутикулы верхней стороны листа)

Фитохимическое исследование листьев боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.)

Сложный состав биологически активных веществ лекарственного растительного сырья делает актуальным вопрос о стандартизации по комплексу биологически активных соединений, доминирующих в сырье и преимущественно обуславливающих его лечебное действие. Поэтому важным является установление качественного и количественного состава этих веществ.

В результате проведения качественных реакций, в водном извлечении листьев боярышника были обнаружены следующие группы биологически активных веществ (БАВ): агликоны и гликозиды флавоноидов, аскорбиновая кислота, конденсированные дубильные вещества, сапонины (тритерпеновой природы), органические кислоты, полисахариды, кумарины и каротиноиды.

Исследование химического состава листьев боярышника проводилось с использованием различных физико-химических и инструментальных методов.

Методом ТСХ анализировали извлечения сырья, полученные с использованием 95% этилового спирта в соотношении 1:10. Наилучшее разделение было достигнуто в следующих системах: муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота – вода – метанол – ацетон-хлороформ (6:6:7,5:12,5:30:60), этилацетат-муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода (100:11:11:26), этилацетат - муравьиная кислота - вода (14:3:3), хлороформ – ЛУК – метанол - вода (15:8:3:2). В исследуемых извлечениях на всех хроматограммах проявляется около 7 пятен. Судя по хроматографическому поведению (свечению в УФ-свете, цвету пятен и окраске хромогенными реактивами) выявленные вещества относятся к фенольным соединениям. Сравнение с аутентичными образцами позволило

предположить наличие рутина, гиперозида и хлорогеновой кислоты (подтверждено в присутствии свидетелей). Вещества, соответствующие аутентичным образцам были элюированы с хроматографических пластин. Кристаллизацию и перекристаллизацию осуществляли этиловым спиртом. У выделенных веществ были сняты УФ-спектры. Спектральные характеристики данных соединений совпали с характеристиками свидетелей.

Компонентный состав флавоноидов листьев боярышника кроваво-красного устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в хроматографической системе Waters Breeze (Waters, США) со спектрофотометрическим детектором. Было обнаружено 18 соединений, из которых идентифицированы при сопоставлении времени удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов со временем удерживания пиков стандартных образцов и УФ-спектрами следующие флавоноиды: рутин, байкалеин, физетин, дигидрокверцетин, кверцетин (рис.4).

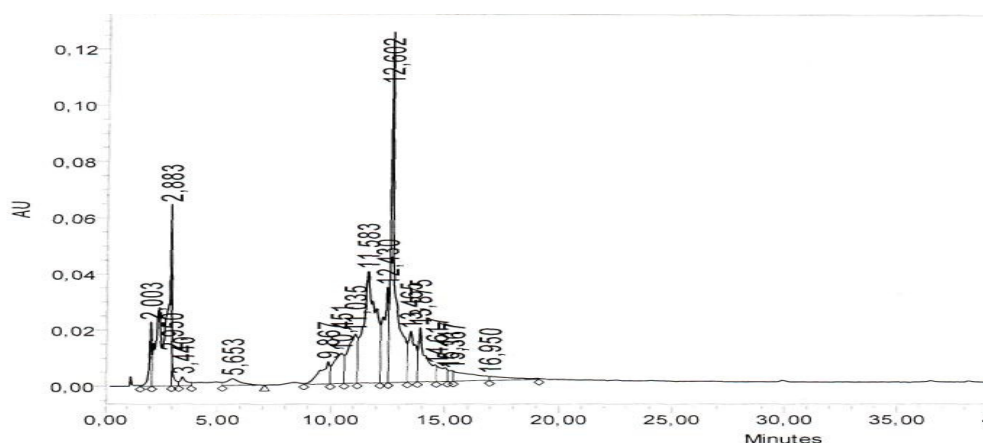


Рис. 4. Хроматограмма экстракта из листьев *C.sanguinea* (11,035 – байкалеин, 12,430 – рутин, 12,602 – физетин, 13,465 – дигидрокверцетин, 16,950 – кверцетин).

Исследование химического состава листьев боярышника кроваво-красного также проводили методом газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ/МС). Приготовленные пробы анализировали с использованием газового хроматографа «Agilent» (США) модели 6890 N с масс-селективным детектором модели 5973. При анализе полученных данных ГХ/МС было обнаружено 31 соединение, из которых идентифицированы по сравнению с библиотечными масс-спектрами 6 веществ, из них 4 фенольной природы: кумаран, α -гидрохинон, пирокатехин и хинная кислота (рис.5).

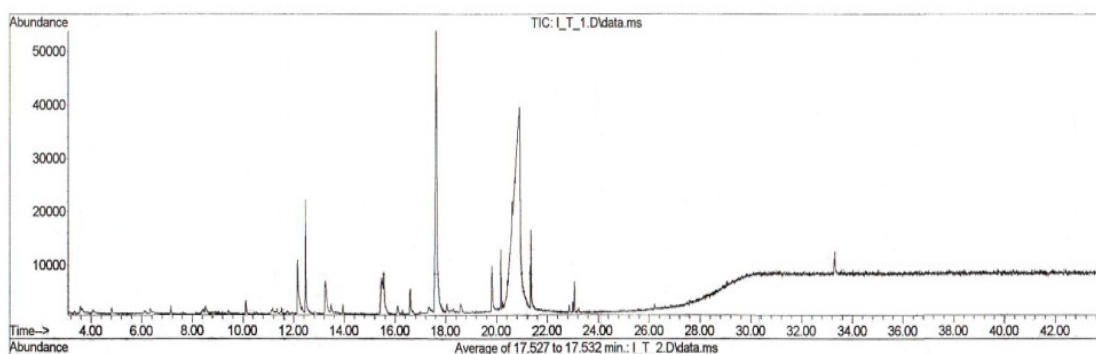


Рис.5. ГХ/МС-хроматограмма экстракта листьев боярышника кроваво-красного

Изучение компонентного состава эфирного масла, полученного из листьев боярышника кроваво-красного методом гидродистилляции (метод 1) по методике ГФ XI, проводили методом хромато-масс-спектрометрии на приборе фирмы TermoFinnigan (хроматограф Finnigan 800, масс-спектрометр высокого разрешения MAT-95XPЭВМ «Delta» с системой обработки данных «DataSistem»). Компоненты эфирных масел идентифицировали в процессе хроматографирования по результатам сравнения масс-спектров химических веществ с данными библиотеки масс-спектров NIST-02.

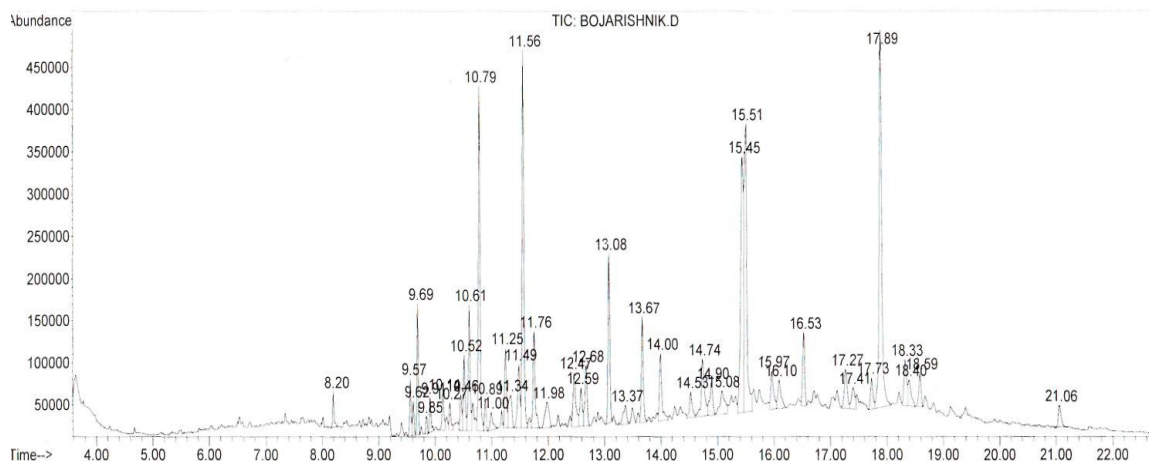


Рис.6. Хроматограмма эфирного масла боярышника кроваво-красного.

При хромато-масс-спектрометрическом исследовании образцов эфирного масла листьев боярышника выявлено 44 соединения, из них идентифицировано 18 (рис.6). Основными компонентами эфирного масла листьев боярышника кроваво-красного, произрастающего в Республике Башкортостан, являются соединения сесквитерпеновой природы: 1-этилиденоктагидро-7 α -метил-1H-инден (8,34%), ледол (7,17%), α -фарнезен (2,01%), α -кадиол (1,87%).

Одной из групп БАВ, которая практически не изучалась в боярышниках, являются полисахариды. С целью установления состава полисахаридного комплекса осуществляли последовательное фракционное выделение полисахаридов по методике, разработанной Н.К. Кочетковым. Полисахаридные комплексы из листьев боярышника были разделены на фракции, содержащие водорастворимые полисахариды (ВРПС), пектиновые вещества (ПВ), гемицеллюлозу (ГЦ). Выход ВРПС составил-1,7%, ПВ-12%, ГЦ-3,7%.

Для установления моносахаридного состава ВРПС, ПВ, ГЦ проводили их гидролиз. Моносахариды определяли в гидролизатах методами хроматографии: на бумаге в системе растворителей этилацетат - уксусная кислота - муравьиная кислота - вода (18:3:1:4) и в тонком слое сорбента параллельно с достоверными образцами моносахаридов. Хроматограммы после высушивания на воздухе обрабатывали анилинфталатным реактивом и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C; моносахариды проявлялись в виде красновато-коричневых пятен (рис.7). Во всех полисахаридных фракциях были обнаружены глюкоза, арабиноза, галактоза, ксилоза, фруктоза, рамноза, но, преобладающими мономерными звеньями ВРПС является фруктоза, в ПВ - галактоза, арабиноза, глюкоза, рамноза, ксилоза, в ГЦ - ксилоза, рамноза, арабиноза, глюкоза, галактоза

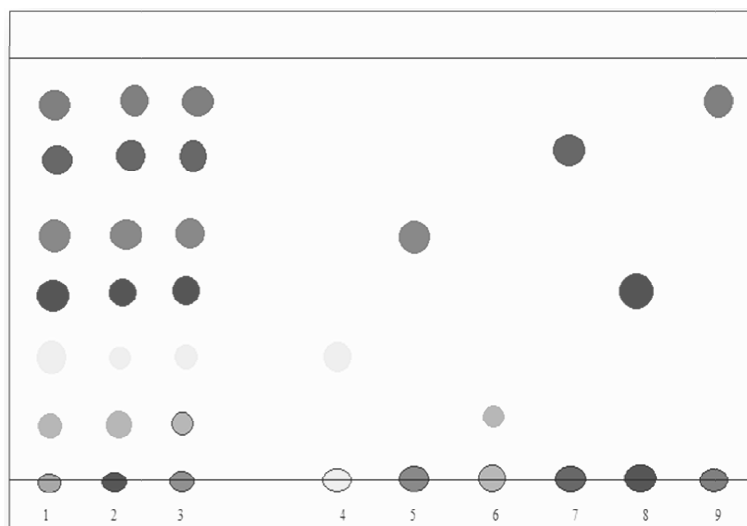


Рис.7. Схема тонкослойной хроматографии фракций полисахаридов в системе бутанол – ацетон – вода (4:5:1)

1-ВРПС, 2-ПВ, 3-ГЦ, 4-глюкоза, 5-арабиноза, 6-галактоза, 7-ксилоза, 8-фруктоза, 9-рамноза.

Рентгенофлуоресцентным методом в листьях боярышника кроваво-красного установлено наличие и определено количественное содержание 14 аминокислот, 9 макро- и микро- элементов.

Сравнительный анализ количественного содержания некоторых основных групп БАВ в листьях, плодах и цветках боярышника кроваво-красного

В листьях боярышника кроваво-красного известными методами было определено содержание некоторых обнаруженных групп биологически активных веществ. Исследования проводились в сравнении с фармакопейными видами сырья - плодами и цветками боярышника. В качестве исследуемых групп БАВ были взяты флавоноиды, процианидины, тритерпеновые сапонины, что связано с выбором приоритетного маркера для последующей разработки методов стандартизации сырья. Также проводилось сравнительное исследование обнаруженных аминокислот, макро- и микроэлементов.

Таблица 1. Количественное содержание флавоноидов в различных видах сырья боярышника кроваво-красного

Объект исследования	Содержание в пересчете на кверцетин, %	Содержание в пересчете на гиперозид, %	Содержание процианидинов в пересчете на цианидин, %
Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	0,081±0,004	2,223±0,079	3,580±0,152
Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	0,086±0,004	2,473±0,159	3,792±0,175
Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2012)	0,074±0,003	2,268±0,123	3,605±0,164
Цветки боярышника	0,087±0,005	1,552±0,068	2,536±0,108
Плоды боярышника	0,063±0,003	0,089±0,004	1,674±0,089

Таблица 2. Количественное содержание сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту в различных видах сырья боярышника кроваво-красного

Объект исследования	Содержание, %
Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	0,078±0,004
Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	0,082±0,005
Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2012)	0,088±0,005
Цветки боярышника	0,105±0,006
Плоды боярышника	0,120±0,007

Для выбора оптимального времени заготовки листьев боярышника кроваво-красного изучалась динамика накопления основных групп БАВ в разные периоды вегетации (флавоноиды, процианидины и тритерпеновые сапонины). Исследования проводились в период с 2009-2012 гг.

Так, при исследовании динамики накопления различных групп флавоноидов оказалось, что они максимально накапливаются в фазу цветения растения (рис.8).

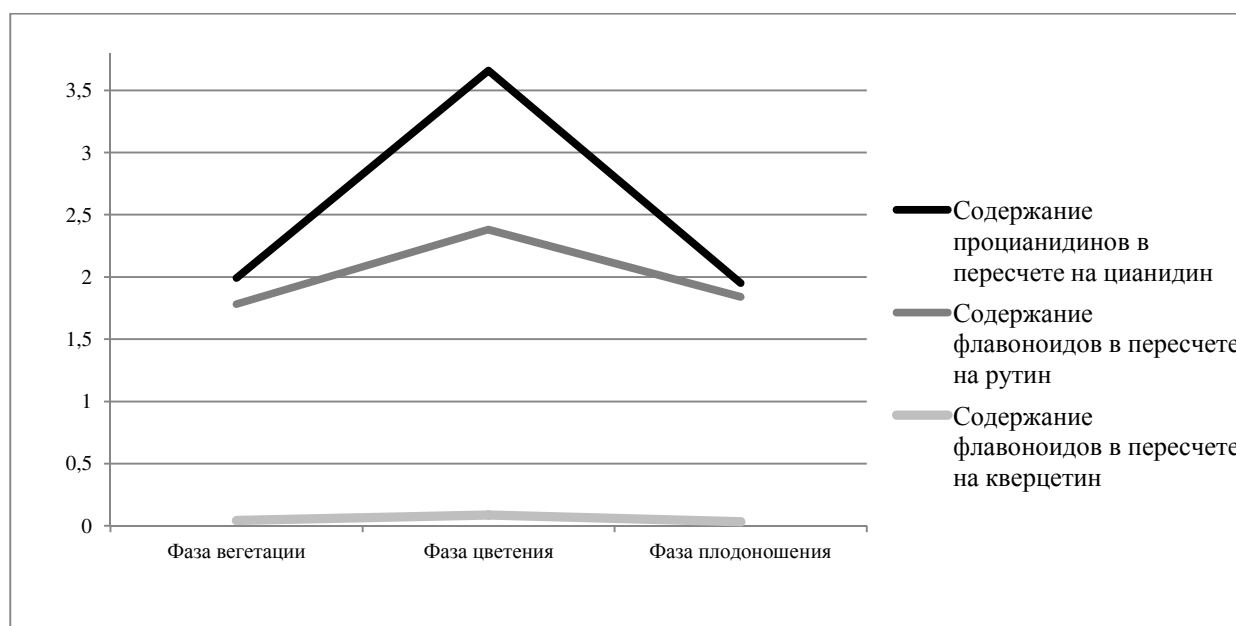


Рис.8. Динамика накопления флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного

Динамика накопления тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту изучалась с использованием фотоэлектроколориметрического метода. Полученные данные, согласно рис. 5, свидетельствуют о том, что накопление сапонинов в листьях боярышника кроваво-красного достигает максимума в период цветения растения, а затем изменяется незначительно.

При проведении сравнительного анализа накопления различных групп БАВ в листьях боярышника кроваво-красного в разные периоды вегетации установлено, что заготовку листьев необходимо производить в период цветения.

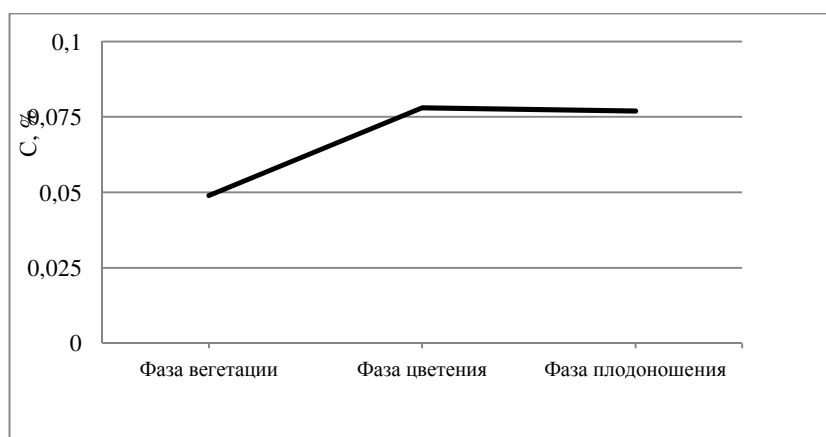


Рис.9. Содержание тритерпеновых сапонинов в листьях боярышника в разные периоды вегетации

В листьях боярышника кроваво-красного, собранных в период цветения в различных районах РБ с 2010 по 2012 гг. было определено содержание различных групп БАВ (таб.3).

Таблица 3. Количественное содержание некоторых групп БАВ в листьях боярышника

Метод количественного определения \ Объект исследования	Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2012)
	<i>Полисахариды</i>		
Гравиметрический	10,40±0,25%	11,55±0,10%	10,81±0,38%
Спектрофотометрический	3,586±0,086%	3,980±0,183%	3,726±0,131%
<i>Аскорбиновая кислота</i>			
Спектрофотометрический	0,532±0,024%	0,550±0,018%	0,538±0,021%
<i>Дубильные вещества</i>			
Спектрофотометрический, в пересчете на катехин	12,14±0,55	12,85±0,71	12,52±0,49
Титриметрический, в пересчете на танин	4,55±0,29	4,85±0,35	5,20±0,42
<i>Кумарины</i>			
Спектрофотометрический, в пересчете на кумарин	4,432±0,111	4,480±0,048	4,455±0,085
<i>Каротиноиды</i>			
Спектрофотометрический, в пересчете на β-каротин	0,067±0,003	0,064±0,003	0,061±0,002
<i>Органические кислоты</i>			
Титриметрический, в пересчете на яблочную кислоту	3,16±0,31	2,35±0,22	2,85±0,23

**Исследования по стандартизации листьев
боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.)**

Для внедрения в практику нового вида лекарственного растительного сырья необходимо создание нормативной документации, что включает себя разработку показателей подлинности и доброкачественности.

На основании проведенных хроматографических исследований для качественной характеристики листьев боярышника нами предлагается методика хроматографического анализа в тонком слое сорбента в системе растворителей этилацетат-муравьиная кислота-вода (14:3:3) для включения в раздел «Качественные реакции» в проект ФСП. На хроматограмме до и после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида должны быть видны 7 основных пятен, 3 из которых с R_f около 0,44- рутин, с R_f около 0,62 - гиперозид, с R_f около 0,7 - хлорогеновая кислота.

Таблица 4. Результаты хроматографического исследования в тонком слое сорбента листьев боярышника в системе этилацетат-муравьиная кислота-вода (14:3:3)

Цвет пятен до обработки	Цвет пятен после обработки раствором алюминия хлорида	R_f	R_s	Вещество
Светло-голубой	Сиреневый	0,07	0,16	Вещество 1
Светло-коричневый	Светло-желтый	0,25	0,57	Вещество 2
Коричневый	Желтый	0,44	1	Рутин
Коричневый	Желто-зеленый	0,62	1,41	Гиперозид
Голубой	Голубой	0,70	1,59	Хлорогеновая кислота
Светло-голубой	Голубой	0,78	1,77	Вещество 6
Темно-фиолетовый	Темно-фиолетовый	0,89	2,02	Вещество 7

Для оценки количественного содержания суммы флавоноидов в листьях боярышника была разработана методика дифференциальной спектрофотометрии. Данная методика была выбрана на основании предварительного анализа спиртового извлечения листьев боярышника. Полученные спектральные характеристики экстракта листьев боярышника составили максимумы 332 и 272 нм, минимумы при 300 и 257 нм, и плечо в области 278-284 нм. Данные показатели не совпали с максимумами поглощения флавоноидов, обнаруженных в наших исследованиях, поэтому были исследованы спектры поглощения боярышника с добавлением комплексообразователя спиртового раствора алюминия хлорида. Максимумы поглощения экстракта с добавлением комплексообразователя совпали с максимумами поглощения раствора РСО рутина. Исходя из полученных данных, была разработана методика количественного определения флавоноидов и подобраны следующие условия: стандартный образец – рутин, аналитическая длина волны - 409 нм, комплексообразователь – алюминия хлорида спиртовый раствор 3%, количество комплексообразователя - 2 мл, экстрагент - спирт этиловый 80%, режим экстракции – двухкратная мацерация на кипящей водяной бане по 15 минут на каждой

стадии, соотношение сырья и экстрагента 1:200, оптимальный размер частиц сырья – 2 мм, время комплексообразования – 30 минут.

Проведена валидация разработанной методики в соответствии с ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик» по следующим параметрам: линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность. Установлено, что методика отвечает современным требованиям: является прецизионной, правильной, легко воспроизводима и ее выполнение занимает минимум времени. Относительная ошибка опыта не превышает 5%.

Таблица 5. Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин в листьях боярышника

n	X_{cp}	S_x	ε_a	$\varepsilon\%$	$X_{cp} \pm \varepsilon_a$
9	2,3198	0,0262	0,0606	2,6122	2,3198±0,0606

Исследование биологических свойств листьев боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.)

Острая токсичность листьев боярышника определена на белых беспородных мышах. Параметры острой токсичности вычислялись по методу Литчфильда и Уилкоксона. Листья боярышника были отнесены к классу малотоксичных соединений, что позволяет судить о безопасности данного вида сырья.

Антиаритмическую активность настоя листьев изучали на экспериментальных моделях аритмий, вызванных химическими веществами аконитином и хлоридом кальция. Животных поили настоем листьев и настойкой плодов боярышника (препарат сравнения) в течение 14 дней, а также за 60 мин до воспроизведения аритмии. Оказалось, что настой листьев боярышника обладает более выраженной антиаритмической и противофибрилляторной активностью по сравнению с препаратом сравнения.

Влияние настоя листьев боярышника на биоэлектрическую проводимость сердца изучалось на серии опытов на крысах-самцах линии Вистар после профилактического приема (14 дней) и последующем экспериментальном адреналин-гипоксическом повреждении миокарда. Влияние настоя на сердце животных определяли по изменениям положения сегментов QT, TP, QRS, вольтажа зубцов и ЧСС. Оказалось, что листья боярышника усиливают биоэлектрическую активность сердца, что выражалось в повышении вольтажа зубцов электрокардиограммы, укорочении систолы, снижении или нормализации частоты сердечных сокращений, т.е. на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что листья боярышника оказывают кардиопротективный эффект.

Антиоксидантную активность листьев боярышника кроваво-красного определяли *in vitro* двумя методами: спектрофотометрией и хемилюминесценцией.

Согласно спектрофотометрическому методу, основанному на аутоокислении адреналина в щелочной среде при длине волны 347 нм листья боярышника кроваво-красного обладают высокой антиоксидантной активностью (57,32±1,39%), превышающей препарат сравнения (плоды шиповника) (50±0,09 %).

При определении антиоксидантной активности методом хемилюминесценции в качестве иницирующих агентов применялись ионы Fe^{2+} как наиболее вероятные индукторы свободно-радикальных процессов *in vivo*. По изменению хемилюминесценции (ХЛ) модельных систем, возникающей при рекомбинации радикалов, оценивалась суммарная АОА. Регистрация ХЛ проводилась на приборе ХЛМ-003. Водные извлечения вносили в 2 модельные системы, в которых генерировалось образование активных форм кислорода (АФК) и протекали реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ). Листья боярышника предотвращали образование активных форм кислорода в большей степени, чем препарат сравнения (в дозах от 0,01 до 0,1 мл в от 41 до 99%, а плоды шиповника в тех же дозах от 17 до 91%). Листья боярышника значительно снижали скорость ПОЛ в наименьшей используемой концентрации (0,01мл), в среднем от 83 до 99 % (плоды шиповника от 60 до 92 %).

Таким образом, на основании проведенных фармакогностических, фитохимических и биологических исследований можно рекомендовать в качестве нового вида лекарственного растительного сырья листья боярышника кроваво-красного. Для введения в проект ФС предлагаются следующие показатели качества (табл.6).

Таблица 6. Показатели качества листьев боярышника кроваво-красного

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
<i>Внешние признаки</i>	Визуальный (с помощью микроскопа и лупы), органолептический, ГФ XI	Соответствует ФСП
<i>Микроскопия</i>	ГФ XI, вып. 1	Соответствует ФСП
<i>Качественные реакции</i>	ТСХ	Соответствует ФСП
<i>Числовые показатели:</i> Содержание флавоноидов в пересчете на рутин ДЗП Влажность Золы общей Органическая примесь Минеральная примесь Измельченность: частиц, не проходящих сквозь сито d=4,5 мм частиц, проходящих сквозь сито d=0,5 мм	Дифференциальная спектрофотометрия Микродиагностический ГФ XI, вып. 1 ГФ XI, вып. 1 ГФ XI, вып. 1 ГФ XI, вып. 1 ГФ XI, вып. 1	Не менее 1,5 % не менее 30% не более 10% не более 10% не более 1,0% не более 0,5% не более 10% не более 4%
Микробиологическая чистота	ГФ XII, ст.32	Соответствует категории 4А
Хранение		В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C
Срок годности		3 года

Основные результаты и выводы:

1. Проведено морфолого-анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного. Уточнены морфологические признаки и выявлены новые анатомо-диагностические признаки.
2. Изучен химический состав основных групп биологически активных веществ листьев боярышника кроваво-красного, установлен состав полисахаридного комплекса, эфирного масла, макро- и микроэлементный состав, аминокислотный состав, идентифицированы с использованием современных физико-химических методов 11 соединений фенольной природы. Определено количественное содержание обнаруженных групп биологически активных веществ.
3. Определено время заготовки листьев боярышника – период цветения растения (на основании динамики накопления флавоноидов, процианидинов и тритерпеновых сапонинов в листьях в разные периоды вегетации).
4. Разработана методика качественного анализа листьев боярышника кроваво-красного – хроматография в тонком слое сорбента в системе этилацетат – муравьиная кислота – вода (14:3:3).
5. Разработана методика количественного определения флавоноидов в листьях боярышника методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин и проведена ее валидация.
6. Проведена оценка биологических свойств листьев боярышника кроваво-красного: определена острая токсичность, установлены антиоксидантные, антиаритмические и кардиопротективные свойства.
7. Разработан проект ФСП «Боярышника кроваво-красного листа».

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Иванова, Е.В. Изучение химического состава листьев боярышника кроваво-красного / Е.В. Иванова, С.В. Трофимова, Д.А. Мунасипова [и др.] // Вопросы теоретической и практической медицины: Материалы 74-й Республиканской научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной Году молодежи в России и Году поддержки и развития молодежных инициатив в РБ. – Уфа: БГМУ, 2009. – С. 208-210.
2. Трофимова, С.В. Изучение острой токсичности листьев боярышника кроваво-красного / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Сборник научных трудов конференции ученых Республики Башкортостан с международным участием «Научный Прорыв - 2009», посвященной Году Поддержки и развития молодежных инициатив, Дню Республики. – Уфа: БГМУ, 2009. – С. 22.
3. Трофимова, С.В. Поиск новых источников антиоксидантов / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Материалы Республиканской конференции молодых ученых Республики Башкортостан с международным участием «Медицинская наука - 2009», посвященной Году Поддержки и развития молодежных инициатив, Дню Медицинского работника. – Уфа: БГМУ, 2009. – С. 261-263.
4. Трофимова, С.В. Изучение тритерпеновых гликозидов в листьях боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Сборник научных трудов конференции ученых РБ с международным участием «Научный прорыв-2010», посвященной Году Республики, Дню Республики. - Уфа: Изд-во БГМУ, 2010. – С. 57-58.
5. Трофимова, С.В. Исследование листьев боярышника кроваво-красного из флоры Республики Башкортостан / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Вестник Пермск. гос. фармацев. Академии. – Материалы Российской научно-практической конференции «Создание лекарственных средств на основе продуктов природного происхождения». - Пермь: ПГФА. - 2010. - №7. – С. 198-200.
6. Хасанова, С.Р. Динамика накопления флавоноидов в боярышника кроваво-красного листьях / С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова, Н.В. Кудашкина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Вып. 65. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2010.– С. 138-139.
7. Трофимова, С.В. Изучение антиаритмической активности листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина [и др.]. // Медицинский вестник Башкортостана. - 2011. - Т.6. - № 2. – С. 299 – 302.
8. Хасанова, С.Р. Определение содержания йода в некоторых дикорастущих и культивируемых лекарственных растениях Республики Башкортостан и в сборах / С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, С.В. Трофимова // Традиционная медицина. - 2011. - №5. – С. 294-297.
9. 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.
10. Хасанова, С.Р. Исследование антиоксидантной активности листьев боярышника кроваво-красного методом хемилюминесценции / С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова, Н.В. Кудашкина [и др.]. // Традиционная медицина. – 2012. - № 5. – С. 316-317.
 11. Трофимова, С.В. Накопление веществ в листьях боярышника кроваво-красного из флоры республики Башкортостан / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова // Материалы Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины». – Иркутск: ИГМУ, 2012. – С. 230.
 12. Штанько, М.И. Обоснование применения полиэкстракта боярышника кроваво-красного в комплексном лечении ксеростомии у лиц пожилого возраста / М.И. Штанько, С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова [и др.] // Актуальные вопросы современной стоматологии: материалы республиканской конференции стоматологов. - Уфа, 2012. - С. 60-63.
 13. Трофимова, С.В. Изучение компонентного состава эфирного масла листьев *Crataegus sanguinea* Pall. и травы *Conium maculatum* L. из флоры Башкортостана / С.В. Трофимова, Т.В. Булгаков, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т.20. - №2. – С. 103-105.
 14. Трофимова, С.В. Определение флавоноидного состава листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Республики Башкортостан методом ВЭЖХ / С.В. Трофимова, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина [и др.]. // Современная медицина и фармацевтика: анализ и перспективы развития: Материалы VIII Международной научно-практической конференции (20.05.2013). - М.: Изд. «Спутник+». – 2013. – С.27-29.
 15. Фархутдинов, Р.Г. Определение содержания йода в растениях Республики Башкортостан / Р.Г. Фархутдинов, Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова // Растительные ресурсы. – 2013. – Т.49. - №1. – С.139-146.
 16. Хасанова, С.Р. Исследование аминокислотного состава некоторых дикорастущих растений из флоры Республики Башкортостан / С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, С.В. Трофимова [и др.]. // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т.20. - №1. – 108-110.
 17. Хасанова, С.Р. Изучение влияния листьев боярышника кроваво-красного на биоэлектрическую активность сердца / С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова, Н.В. Кудашкина [и др.] // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Международной научной конференции. – Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. – С. 414-416.

Трофимова Светлана Валерьевна (Россия)

«Фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана».

С использованием современных физико-химических методов проведен качественный и количественный анализ биологически активных веществ листьев боярышника кроваво-красного (полисахариды, аминокислоты, аскорбиновая кислота, фенолкарбоновые кислоты, тритерпеновые сапонины, кумарины, флавоноиды, эфирные масла и др.). Осуществлена оценка безопасности применения (острая токсичность) и изучена биологическая активность (кардиопротективная, антиаритмическая и антиоксидантная) извлечений листьев боярышника кроваво-красного.

Разработаны методики качественного и количественного анализа. Определены показатели подлинности и качества листьев боярышника. По результатам проведенных исследований разработан проект фармакопейной статьи предприятия «Боярышника кроваво-красного листа».

Svetlana Trofimova (Russian Federation)

«Pharmakognostic studying Redhaw Hawthorn leaves *Crataegus sanguinea* Pall. of flora of Bashkortostan»

Using modern physic – chemical methods conducted qualitative and quantitative analysis of biologically active substances Redhaw Hawthorn leaves (polysaccharides, amino acids, ascorbic acid, phenol carboxylic acids, triterpenoid saponins, coumarins, flavonoids, essential oils, etc.). The estimation of the safety of use (acute toxicity) and studied the biological activity (cardioprotective, antiarrhythmic and antioxidant) extract of Redhaw Hawthorn leaves.

The techniques of qualitative and quantitative analysis. Identify indicators of authenticity and quality hawthorn leaves. As a result of the research drafted pharmacopoeial monograph «Redhaw Hawthorn leaves».