

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГБОУ ВПО БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ТРОФИМОВА СВЕТЛАНА ВАЛЕРЬЕВНА

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
кандидат фарм. наук,
доцент С. Р. Хасанова

УФА 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Ботанико-фармакогностическая характеристика рода <i>Crataegus</i> L.	11
1.2. Географическое распространение боярышников и сырьевая база боярышника кроваво-красного	12
1.3. Исследование химического состава боярышников	15
1.4. Стандартизация сырья боярышников в различных фармакопеях.	20
1.5. Современное состояние фармакологических исследований растений рода <i>Crataegus</i> L.	24
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	35
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Объекты исследования	36
2.2. Методы исследования	36
2.2.1. Определение подлинности сырья	36
2.2.2. Методы определения доброкачественности	37
2.2.3. Методы фитохимического анализа	37
2.2.3.1. Методы качественного анализа биологически активных веществ	37
2.2.3.2. Методы количественного анализа биологически активных веществ	42
2.2.4. Методы исследования биологической активности	58
2.2.5. Методы статистической обработки результатов исследований	61
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (<i>CRATAEGUS SANGUINEA</i> PALL.)	62
3.1. Морфологическое исследование листьев боярышника кроваво-красного	62

3.2. Анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного	63
3.3. Анатомическое исследование измельченных листьев боярышника кроваво-красного	70
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	73
ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (<i>CRATAEGUS SANGUINEA</i> PALL.)	74
4.1. Исследование химического состава листьев боярышника кроваво-красного	74
4.1.1. Качественные реакции	74
4.1.2. Изучение фенольных соединений листьев боярышника кроваво-красного	76
4.1.3. Исследование химического состава эфирного масла из листьев боярышника кроваво-красного	81
4.1.4. Изучение химического состава полисахаридного комплекса листьев боярышника кроваво-красного	82
4.1.5. Изучение аминокислотного состава листьев боярышника кроваво-красного	86
4.1.6. Изучение макро- и микроэлементного состава листьев боярышника кроваво-красного	86
4.2. Количественное определение БАВ в листьях боярышника кроваво-красного	87
4.2.1. Сравнительный анализ количественного содержания основных групп БАВ в листьях, плодах и цветках боярышника кроваво-красного.	87
4.2.2. Определение количественного содержания других обнаруженных групп БАВ	93
4.3. Обоснование срока заготовки листьев боярышника кроваво-красного	94

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	97
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (<i>CRATAEGUS SANGUINEA</i> PALL.)	98
5.1. Разработка методики качественного анализа листьев боярышника кровоаво-красного	98
5.2. Разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кровоаво-красного	100
5.2.1. Выбор схемы анализа	100
5.2.2. Оптимизация методики определения	101
5.2.3. Подбор факторов экстракции	104
5.2.4. Валидация методики количественного определения	110
5.3. Определение числовых показателей и сроков годности листьев боярышника кровоаво-красного	114
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	117
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (<i>CRATAEGUS SANGUINEA</i> PALL.)	118
6.1. Определение острой токсичности листьев боярышника кровоаво-красного	118
6.2. Определение антиаритмической активности листьев боярышника кровоаво- красного	118
6.3. Определение кардиопротективной активности листьев боярышника кровоаво-красного	112
6.4. Определение антиоксидантных свойств листьев боярышника кровоаво- красного	125
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	127
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129
ПРИЛОЖЕНИЯ	143

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – артериальная гипертензия
- АОА – антиоксидантная активность
- АФК – активные формы кислорода
- БАВ – биологически активные вещества
- БАД – биологически активная добавка
- БХ – бумажная хроматография
- ВАК – Высшая Аттестационная Комиссия
- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
- ВФС – временная фармакопейная статья
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГОСТ – Государственный отраслевой стандарт
- ГСО – Государственный стандартный образец
- ГФ – Государственная фармакопея
- ГХ/МС – газовая хроматография масс-спектрометрия
- ДЗП – диагностически-значимые признаки
- ЛРС – лекарственное растительное сырье
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛУК – ледяная уксусная кислота
- МК – муравьиная кислота
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- РСО – рабочий стандартный образец
- РФ – Российская Федерация
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УФ – ультрафиолетовый
- ИК – инфракрасный
- ФКК – фенолкарбоновые кислоты
- ФС – фармакопейная статья
- ФСП – фармакопейная статья предприятия

ВВЕДЕНИЕ

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 [27]. 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 [36,39,58,76].

На территории Российской Федерации встречается около 40 видов дикорастущих боярышников [14,56]. Из 12 официальных видов, включенных в действующую Государственную Фармакопею XI издания, на территории Российской Федерации произрастает 9 [27,68], при этом на территории Республики Башкортостан в диком виде встречается только один вид – боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pall.) [51].

Однако существующая сырьевая база боярышников в России не отвечает запросам фармацевтической промышленности [51]. Одним из путей решения данной проблемы является введение в практику нового вида сырья этого растения – 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. В некоторых странах (Франции, Бельгии, Польше, Германии, Болгарии, Израиле) применяются в медицине листья боярышника [108,109,126,127].

Таким образом, введение в медицинскую практику нового вида лекарственного растительного 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:**

1. Провести морфолого-анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного, выявить их анатомо-диагностические признаки.
2. Изучить химический состав основных групп биологически активных веществ листьев боярышника и определить их количественное содержание.
3. Определить оптимальное время заготовки листьев боярышника.
4. Разработать методы стандартизации листьев боярышника кроваво-красного.
5. Изучить биологические свойства листьев боярышника кроваво-красного.
6. Определить критерии подлинности и показатели качества листьев боярышника, разработать проект фармакопейной статьи «Боярышника кроваво-красного листа».

Научная новизна и теоретическая значимость работы. 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 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, суммы дубильных соединений, сапонинов, аскорбиновой кислоты, полисахаридов, каротиноидов.

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

Практическая значимость результатов исследования. 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 и публикация результатов исследования. 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.)

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

Связь задач исследования с проблемами фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Башкирского государственного медицинского университета по проблеме «Фармакология и фармация». Номер госрегистрации 01200507996.

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 биологических исследований боярышника кроваво-красного.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ботанико-фармакогностическая характеристика

Crataegus sanguinea Pall.

Родовое название боярышника *Crataegus* L. происходит от греческих слов *cratatos* - сильный, крепкий; *agein* - вести, действовать. Это название боярышник получил за свою выдающуюся долговечность (до 400 лет), стойкость к неблагоприятным условиям, за твердую древесину. Видовые названия от лат. *sanguineus*- кровавый и греч. *oxus*- острый, *acantha*-колючка, то есть растение остроколючее [31,50].

Применение боярышника в медицине известно давно. Об этом растении писал Диоскорид: «Это дерево, покрытое колючками... Оно имеет небольшие плоды, подобные яблокам, но меньше их. Они красного цвета, сладкие, и в каждом плоде по три зерна». Авиценна также отмечает целебные свойства данного растения: «Плоды этого дерева круглые и съедобные, терпкие на вкус. Боярышник вяжет сильнее, чем рябина, подавляет желчь и запирает истечения сильнее, чем всякие другие плоды» [28,50,61].

Боярышник кроваво-красный *Crataegus sanguinea* Pall. – высокий кустарник, реже небольшое дерево высотой 1-4 м. Побеги крепкие, пурпурно-коричневые, несут прямые колючки, достигающие 5 см длины. Листья обратнояцевидные, трех-, семилопастные, с обеих сторон волосистые. Сверху темно-зеленой окраски, по краю остропильчатые (по данным Куркина В.А. крупнозубчатые) с клиновидным основанием. Снизу листья светло-зеленые. Цветки белые, слегка розоватые, диаметром 12-15 мм, в густом щитковидном соцветии, насчитывают около 20 тычинок с пурпуровыми пыльниками. Соцветия 3-4 см длиной и 4-5 см шириной. Плоды диаметром 8-10 мм, обычно округлые, кроваво-красные, очень редко оранжево-желтые, с 2-4 (1-5) косточками и мучнистой мякотью. Цветет боярышник кроваво-красный в мае-июне, плоды созревают в августе [34,50,52,78].

Размножают боярышник посевом семян в августе-сентябре или весной стратифицированными с осени семенами. В течение первого года или первых двух лет сеянцы боярышника растут медленно, годовой прирост не превышает 20 см, затем прирост увеличивается и достигает 30-40 см в год. После 6-8-летнего возраста рост снова замедляется. Цветение и плодоношение наступает в возрасте 10-15 лет. Корневая система боярышника глубокая и широкая, чувствительная к уплотнению. Живет до 200-300 лет. К почве не требовательны, но лучше развиваются на глубоких, среднеувлажненных, хорошо дренированных, плодородных, тяжелых почвах. Положительно реагируют на присутствие извести в почве [6,31,57].

1.2. Географическое распространение и сырьевая база боярышника кроваво-красного

В природе боярышники встречаются обычно одиночно или группами в зарослях кустарников, по опушкам, на вырубках или полянах, на осыпях, реже они растут в негустых лесах и вовсе не встречаются под густым древесным пологом. Распространены от уровня моря до верхнего предела лесной растительности в горах, в самых различных условиях рельефа и на разных субстратах [31].

Род *Crataegus* L. насчитывает около 1250 видов, произрастающих главным образом в умеренной и, частично, субтропической зонах Северного полушария Америки и Евразии [57,98]. Так, боярышник сглаженный встречается по всей территории Европы. Широко культивируется в садах и парках в средней полосе европейской части стран СНГ и в странах Балтии. Боярышник Королькова - в Средней и Центральной Азии, боярышник желтый - юго-восточных районах США - штатах Алабама, Флорида, Джорджия, Виргиния, Северная и Южная Каролина, боярышник даурский - в южных районах Восточной Сибири, на Дальнем Востоке России, Монголии, северных районах Китая. Боярышник однопестичный - в Европе,

на северо-западе Африки, Ближнем и Среднем Востоке. Боярышник германский в диком виде встречается только на территории Германии. Боярышник пятипестичный произрастает на территории Украины, Венгрии, стран Балканского полуострова и Западной Азии. Боярышник восточно-балтийский, боярышник курземский – в странах Прибалтики. Боярышник отогнуточашелистиковый, боярышник даугавский – в Украине, Беларуси [3,31,98].

На территории России и сопредельных государств встречается 74 вида дикорастущих (Европейская часть, Средняя Азия, Кавказ) и более 90 интродуцированных видов [22]. Несмотря на широкое видовое разнообразие, на территории Республики Башкортостан в диком виде произрастает только один вид боярышника – боярышник кроваво-красный – *Crataegus sanguinea* Pall.[51].

Боярышник кроваво-красный имеет евразийский тип ареала, протяженность которого с запада на восток превышает 5 тыс.км. Растет в разреженных лесах, по лесным опушкам и берегам рек в лесостепной и южной части лесной зоны Западной и Восточной Сибири, восточных районах европейской части СНГ, Забайкалье и частично в Восточном Казахстане, Средней Азии, Китае и Монголии. Довольно часто этот вид боярышника встречается на Южном Урале, в Закамье и Заволжье. В Башкирии он распространен в основном в лесостепной и степной зонах (рис.1.2.1). Часто встречается в лесостепи Предуралья: на северо-западе в Янаульском, Дюртюлинском районах; в западной и центральной части республики (Буздякский, Давлекановский, Чишминский, Иглинский и др. районы), главным образом в поймах рек Белой, Уршака, Демы и др. Изредка боярышник кроваво-красный встречается в Зауралье по склонам холмов – в Учалинском и Баймакском районах. Его произрастание отмечено также в районах западных предгорий Южного Урала (Зилаирский, Гафурийский, Зианчуринский, Кугарчинский районы). Очень редко встречается под

пологом леса, по его опушкам на северо-востоке республики (Белокатайский, Салаватский районы) (рис.1.2.1) [52].

Однако существующая сырьевая база боярышников в России не отвечает запросам фармацевтической промышленности. Боярышник кроваво-красный относится к 4 группе - с недостаточной сырьевой базой (заготовка производится ограниченно, только для нужд местной аптечной сети), ЭЗ от 1 до 0,5 т [63,93]. В Башкортостане плоды и цветки не заготавливаются, однако сбор может быть организован для использования аптеками на местах [51].

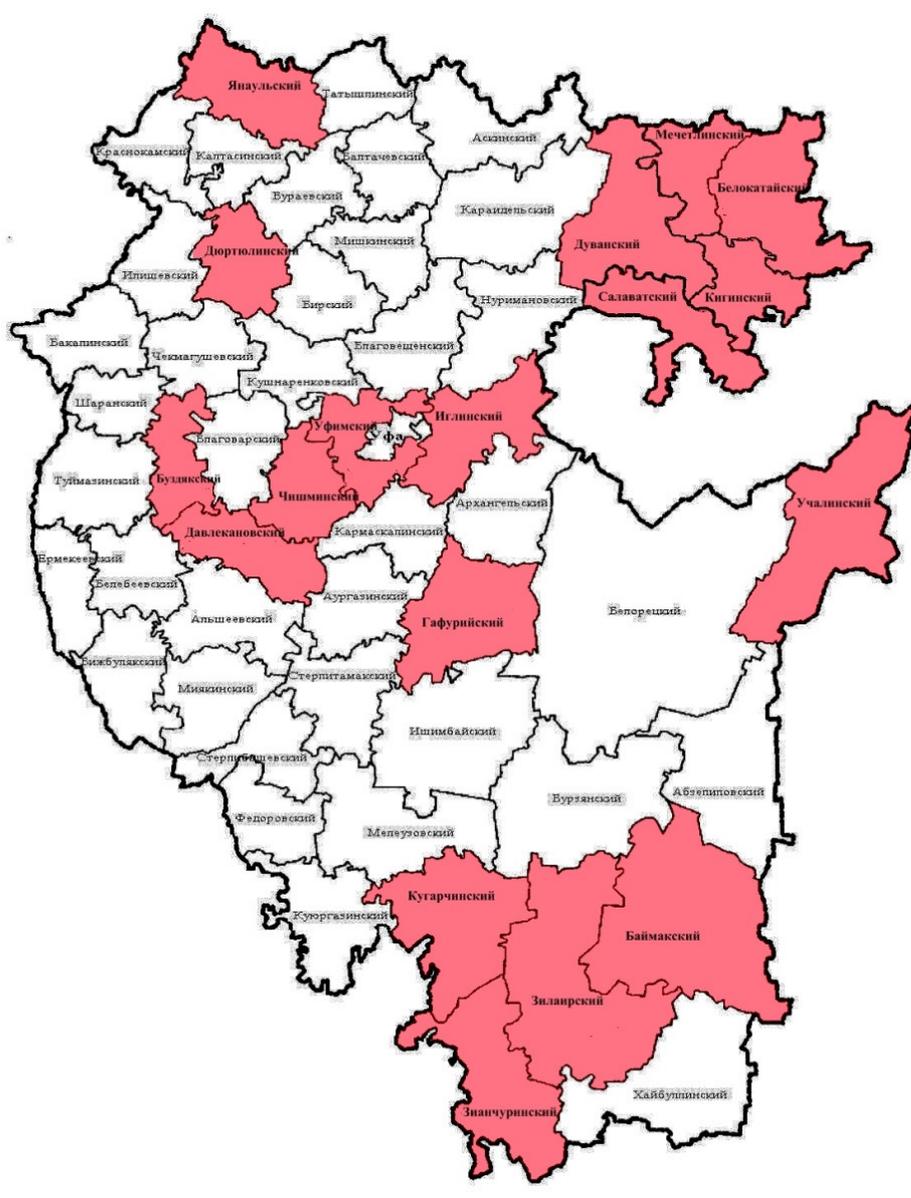


Рис.1.2.1. Схематическая карта распространения боярышника кроваво-красного в Республике Башкортостан

1.3. Исследование химического состава боярышников

Исследованием химического состава различных видов боярышников занимаются ученые таких стран, как Украина, Белоруссия, Литва, Германия, Россия и др. [24,69,70,96,97,117,120,126].

В листьях, цветках, плодах *Crataegus tanacetifolia* Poir. из флавоноидов присутствуют сантин, 5-гидроксиаурнетин, апигенин, кемпферол, кверцетин, 7 - глюкозид апигенина, 3-галактозид кемпферола, гиперозид, витексин, 4`- рамнозид витексина, 4`- рутинозид витексина, а также (-) и (+) эпикатехины [47,116].

Из листьев, цветков и плодов *Crataegus stevenii* Pojark. выделено и охарактеризовано 7 флавоноидов, из которых впервые выделен 4`,7-диметиловый эфир скутеллярина [47,115].

В побегах *Crataegus monogyna* Jacq. установлено присутствие витексин-2``-О-рамнозида, витексина, гиперозида, рутина, кверцетина [120,121]. Содержание флавоноидов в листьях *Crataegus monogyna* Jacq. – до 2,3 %. Также они содержат тритерпеноиды, фитостерины, каротиноиды, алкалоиды, углеводы (до 9,4%), фенолы, фенольные и жирные кислоты, высшие алифатические углеводы и спирты [12].

В пыльце *Crataegus monogyna* Jacq. идентифицированы флавонолгликозиды: 8-метоксикемпферол-3-неогесперидозид и 8-метоксикемпферол-3-глюкозид, 8-метоксикемпферол и кемпферол-3-неогесперидозид [103].

В листьях и цветках *Crataegus* spp. (боярышник одноцветковый (*C. uniflora* Moench.), боярышник круглолистный (*C. rotundifolia* Moench.), боярышник красноплодный (*C. coccinea* L.), боярышник шпорцевый (*C. Crus-Galli* L.), боярышник точечный (*C. punctata* Jagg.), боярышник Дугласа (*C. Douglasii* Lindl.) и боярышник войлочный (*C. tomentosa* Duroi (Non Linne)) определено присутствие процианидинов тетрамеров (процианидины, или конденсированные танины, состоящие из олигомеров или полимеров флаван-3-ол единиц формируют отдельную группу флавоноидов); процианидинов В-

2 и В-5; из листьев и цветков *Crataegus laevigata* Poir. изолированы олигомерные процианидины. Впервые выделен тример (эпикатехин-(4b→8)-эпикатехин-(4b→6)-эпикатехин) и пентамер, состоящий из (-)-эпикатехиновых звеньев. Определены В-2, В-4 и В-5, тример С-1 и эпикатехин-(4b→6)-эпикатехин-(4b→8)-эпикатехин, и тетрамер D-1. Также выделена фракция, содержащая гексамер [111,113].

Из плодов *Crataegus pinnatifida* Bunge выделено 32 летучих соединения, главными компонентами которых были цис-3-гексенол, цис-3-гексенил ацетат, α -терпинеол, фурфурал, гексанол, гексил ацетат, нонанал, цитраль, 3-пентен-2-он, транс-2-деценал [112].

В цветках *Crataegus monogyna* Jacq. обнаружены высшие спирты, альдегиды и жирные кислоты. Сложные эфиры высших спиртов содержат количество углеродных атомов от C₃₆ до C₄₈; тритерпеноиды представлены урсоловой и олеаноловой кислотами [104].

Киселевой Т.Л. с соавторами изучался микроэлементный состав в лекарственных формах плодов и цветков боярышников сглаженного, курземского, дауговского, отогнуточашелистикowego, германского, восточно-балтийского, однопестичного. Содержание микроэлементов (медь, цинк, марганец, хром, кадмий, свинец) в экстракте плодов, настойке и настое цветков было приблизительно одинаково и значительно превышало соответствующие значения для настоя плодов боярышника. Был рассчитан процент перехода микроэлементов в лекарственные препараты из исходного сырья (от 1,1 до 22,7% меди, цинка, марганца)[44,45].

Самылиной И.А. с соавторами было проведено сравнительное исследование флавоноидного, аминокислотного и микроэлементного состава сырья и препаратов из сырья фармакопейных и нефармакопейных видов боярышника (кровоаво-красного, сглаженного, даугавского, отогнуточашелистикowego, германского, курземского, восточно-балтийского, однопестичного, Арнольда, мягковатого, овальнолиственного, пенсильванского, остроколючего, канадского, миссурийского, Прингля, шамплейнского,

шарлахововидного, крупноколочкового, Дугласа, вееровидного). В ходе предварительных хроматографических исследований было установлено, что преобладающим компонентом в сумме флавоноидов цветков и лекарственных препаратов из сырья изучавшихся видов боярышников является гиперозид. Методом ВЭЖХ было определено его количественное содержание, которое составило: в цветках фармакопейных видов – 1,338-1,735%, прибалтийских видов – 0,981-2,504%, североамериканских – 0,304-2,003%. Содержание гиперозида в плодах фармакопейных видов – 0,058-0,080%, прибалтийских – 0,060-0,090%, североамериканских – 0,024-0,110% [74,75,77].

Был изучен аминокислотный состав различных органов боярышника сглаженного. Установлено, что качественный состав идентичен, а количественное содержание различно: в цветках – 52,3 ммоль/кг, в листьях – 22,7 ммоль/кг, в плодах – 6,3 ммоль/кг. Впоследствии изучался качественный состав свободных аминокислот и их количественное содержание у всех указанных выше видов только в цветках. У фармакопейных и прибалтийских видов содержание суммы свободных аминокислот составило $90,7 \pm 46,8$ ммоль/кг, у североамериканских – $82,6 \pm 32,2$ ммоль/кг. У этих же видов боярышника в цветках, листьях и плодах рентгенофлуоресцентным методом был изучен микроэлементный состав. Установлено, что цветки, плоды и листья избирательно накапливают медь и марганец. В цветках содержание меди $18,2 \pm 7,6$ мг/кг, марганца $33,7 \pm 19,1$ мг/кг; в листьях меди $10,7 \pm 2,7$ мг/кг, марганца $39,3 \pm 24,2$ мг/кг; в плодах меди $5,4 \pm 3,0$ мг/кг, марганца $27,5 \pm 18,6$ мг/кг [45,73].

Евдокимовой О.В. с соавторами определялось содержание суммы фосфолипидов (ФЛ) и каротиноидов (К) в плодах боярышников однопестичного (ФЛ – 0,1413%, К – 1,7456 мг/%), отогнуточашелистикowego (ФЛ – 0,0467%, К – 1,0734 мг/%), алтайского (ФЛ – 0,0437%, К – 2,3381 мг/%), Арнольда (ФЛ – 0,0397%, К – 0,5756 мг/%), вееровидного (ФЛ – 0,1770%, К – 3,3905 мг/%) [35].

Этими же авторами изучалась липофильная фракция плодов боярышника, разрешенных к применению ГФ XI. Идентифицированы следующие жирные кислоты: миристиновая (следовые количества), пальмитиновая (15,7 мг/%), стеариновая (4,2 мг/%), олеиновая (22,1 мг/%) и линолевая (58,2 мг/%) [33].

Также изучался химический состав липофильной фракции, полученной из шрота плодов боярышника с целью его использования в качестве дополнительного сырьевого источника получения биологически активных веществ. Установлено присутствие жирных кислот: миристиновой (0,2%), пальмитиновой (14%), пальмитолеиновой (0,1%), стеариновой (4,2%), олеиновой (34,2%), линолевой (41,3%), линоленовой (0,1%). Обнаружены урсоловая кислота, каротиноиды, фосфолипиды, алифатические высшие жирные кислоты [38].

В последнее время более активно изучаются культивируемые в России североамериканские виды боярышников. В плодах боярышников арканзасского, зеленого, Робсона, Джека, Факсона, украинского, однопестичного, шарлаховидного и боярышника петушья шпора Гончаровым Н.Ф. с соавторами обнаружены гидроксикоричные кислоты, гидроксикумарины, флавоноиды, дубильные вещества, тритерпеновые сапонины и аминокислоты. Выделены гиперозид, биоокверцетин, витексин, хлорогеновая, неохлорогеновая и кофейная кислоты [21,22].

В плодах, цветках и листьях боярышника желтого и боярышника круглолистного идентифицированы хлорогеновая, неохлорогеновая, феруловая и кофейная кислоты [19].

Установлен качественный и количественный состав компонентов эфирных масел цветков боярышников канадского и мягковатого. Определено 19 соединений, основными из которых являются ациклические, моноциклические, бициклические монотерпеноиды, ароматические соединения. В основном среди ациклических монотерпеноидов для обоих видов характерны линалоол и его оксиды, α -терпинеол, гераниол, нерол.

Тимол и карвакрол в больших количествах накапливаются в эфирном масле боярышника канадского. Ароматические соединения представлены альдегидами бензола: бензальдегидом, 2-аминобензальдегидом и 4-метоксибензальдегидом. Специфическим для боярышника мягковатого является дигидроэдулан; для боярышника канадского — эвгенол, цисжасмон, ментол, дигидрокарвеол [20].

Современными исследователями изучался химический состав боярышника кроваво-красного – в основном, плодов и цветков. В цветках, плодах и листьях различных видов боярышников, в том числе боярышника кроваво-красного, найдено тридцать три различных флавоноида, включающих 20 флавонов (биокверцетин, апигенин, кетогексофуранозид апигенина, 7-глюкозид апигенина, витексин, витексин-2''-О-рамнозид, ацетилвитексин, 4'-рамнозид витексина, 4'-рутинозид витексина, пиннафидин, лютеолин, глюколитеолин, лютеолин-5-рутинозид, ориентин и др.) и 13 флавонолов (кверцетин, кверцитрин, рутин, гиперозид, кемпферол, 3-галактозид кемпферола, 8-метоксикемпферол и др.). Установлено наличие в плодах антоцианов – пеонидина, цианидина [41,42,43,68,69,70].

Из других фенольных соединений в цветках и плодах боярышников содержатся кофейная и хлорогеновая кислоты, а также дубильные вещества, представляющие собой димеры катехина и L-эпикатехина (процианидины). Тритерпеновые соединения представлены урсоловой, олеаноловой и кратеговой кислотами. В плодах установлено содержание жирного масла (высшие жирные кислоты представлены миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой кислотами (в липофильной фракции), стерин (β-ситостерин, даукостерин), полисахаридов (пектины), лимонной, винной, яблочной, янтарной кислот, оксикумариновой, сахаров, сорбита, витаминов, в частности каротиноидов. Найдены также амины (ацетилхолин, холин, триметиламин, фенилэтиламин, тирамин, ометоксифенилэтиламин).

Запах цветков обуславливается эфирным маслом и некоторыми летучими соединениями [50,68,70,97,129].

1.4. Стандартизация сырья боярышников в различных фармакопеях

В России официальными видами лекарственного растительного сырья из боярышника являются два вида лекарственного растительного сырья «Плоды боярышника – *Fructus Crataegi*» и «Цветки боярышника – *Flores Crataegi*» [27]. Побеги (цветки и листья) боярышника включены в Европейскую, Французскую, Немецкую, Швейцарскую, Британскую фармакопеи и Американскую травяную фармакопею. Листья боярышника применяются в медицине Франции, Бельгии, Польши, Германии, Болгарии, Израиля [108,109,126,127]. В фармакопеях используются различные методы для стандартизации данных видов сырья (табл.1.4.1.).

Таблица 1.4.1.

Нормативная документация и методы анализа на лекарственное растительное сырье боярышников

ЛРС	Фармакопея	Производящие растения	Методы качественного анализа	Методы количественного анализа
«Плоды боярышника – Fructus Crataegi»	ГФ СССР XI издания	<ul style="list-style-type: none"> • боярышник сглаженный - <i>C. laevigata</i> (Poir.) DC. (боярышник колючий - <i>C. oxyacantha sensu Pojark.</i>); • боярышник Королькова - <i>C. korolkowii</i> L. Henry; (боярышник алтайский - <i>C. altaica</i> (Loud.) Lange); • боярышник желтый - <i>C. chlorocarpa</i> Lenne et C. Koch; (боярышник алтайский - <i>C. altaica</i> (Loud.) Lange); • боярышник даурский - <i>C. dahurica</i> Koehne et Schneid.; • боярышник однопестичный - <i>C. monogyna</i> Jacq.; • боярышник германский - <i>C. alemanniensis</i> Cin.; • боярышник восточно - балтийский - <i>C. orientobaltica</i> Cin.; • боярышник отогнуточашелистиковый - <i>C. curvisepala</i> Lindm.; • боярышник курземский - <i>C. curonica</i> Cin.; • боярышник даугавский - <i>C. dunensis</i> Cin.; • боярышник пятипестичный - <i>C. pentagyna</i> Waldst. et Kit. 	Подтверждается присутствие гиперозида методом ТСХ в системе метанол-хлороформ (8:2) восходящим способом в присутствии ГСО гиперозида [27].	Определяется методом спектрофотометрии после предварительного выделения и очистки суммы флавоноидов методом колоночной хроматографии [27].
«Цветки боярышника – Flores Crataegi»	ГФ СССР XI издания	<ul style="list-style-type: none"> • боярышник кроваво - красный - <i>Crataegus sanguinea</i> Pall.; • боярышник сглаженный - <i>C. laevigata</i> (Poir.) DC. (боярышник колючий - <i>C. oxyacantha sensu Pojark.</i>); • боярышник Королькова - <i>C. korolkowii</i> L. Henry; (боярышник алтайский - <i>C. altaica</i> (Loud.) Lange); • боярышник желтый - <i>C. chlorocarpa</i> Lenne et C. Koch; (боярышник алтайский - <i>C. altaica</i> (Loud.) Lange); 	Подтверждается присутствие гиперозида методом ТСХ в системе метанол-хлороформ (8:2) восходящим способом в присутствии ГСО гиперозида [27].	Определяется методом спектрофотометрии после предварительного выделения и очистки методом ТСХ [27].

		<ul style="list-style-type: none"> • боярышник даурский - <i>C. dahurica</i> Koehne et Schneid.; • боярышник однопестичный - <i>C. monogyna</i> Jacq.; • боярышник германский - <i>C. alemanniensis</i> Cin.; • боярышник восточно - балтийский - <i>C. orientobaltica</i> Cin.; • боярышник отогнуточашелистиковый - <i>C. curvisepala</i> Lindm.; • боярышник курземский - <i>C. saronica</i> Cin.; • боярышник даугавский - <i>C. dunensis</i> Cin.; • боярышник пятипестичный - <i>C. pentagyna</i> Waldst. et Kit. 		
«Боярышника листья с цветками – Hawthorn leaf with flower»	Американская травяная фармакопея	<ul style="list-style-type: none"> • боярышник однопестичный - <i>C. monogyna</i> Jacq., • боярышник сглаженный - <i>C. laevigata</i> (Poir.) DC. (боярышник колючий - <i>C. oxycantha</i> L.) 	<p>Методом ТСХ метанольного извлечения сырья в системе этилацетат-вода-ЛУК-МК (10:2,6:1,1:1,1) восходящим способом подтверждается присутствие рутина, хлорогеновой кислоты, гиперозида и витексина (проводится в присутствии раствора стандартных веществ). Пятна проявляются метанольным раствором 2-аминоэтил дифенилбората и метанольным раствором полиэтиленгликоля-4000. После высушивания пятна просматриваются в УФ-свете: рутин – оранжевое пятно, $R_f=0,3$; хлорогеновая кислота – светло-голубая флуоресценция, $R_f=0,4$; гиперозид – желтовато-оранжевое, $R_f=0,55$; витексин – желтовато-зеленое, $R_f=0,65$; витексин-2-рамнозид – желтовато-зеленое, $R_f=0,35$; спиреозид – светло-голубая флуоресценция, $R_f=0,6$; кофейная кислота – светло-голубая флуоресценция, $R_f=0,9$.</p> <p>Качественный анализ флавоноидов проводится методом ВЭЖХ. Относительное время удерживания для основных пиков на хроматограмме: 1,53 - для ацетилвитексин-2`-О-рамнозида, 1,0 - для витексина, 0,73 - для изовитексина, 0,67 - витексин-2`-О-рамнозида. Время удерживания для</p>	<p>Методом ВЭЖХ определяется содержание в листьях с цветками боярышника двух групп флавоноидов: флавоно-С-гликозидов в пересчете на витексин и флавоно-О-гликозидов в пересчете на гиперозид [126].</p>

			хлорогеновой кислоты, витексина, рутина и гиперозида определяется по соответствию пикам на хроматограмме раствора сравнения (используется тот же, что и для ТСХ) [126].	
«Боярышника листья и цветки – Hawthorn leaf and flower»	Европейская фармакопея Британская фармакопея Белорусская фармакопея	<ul style="list-style-type: none"> • боярышник однопестичный - <i>C. monogyna</i> Jacq., • боярышник сглаженный - <i>C. laevigata</i> (Poir.) DC. (боярышник колючий - <i>C. oxyacantha</i> L.) • боярышник пятипестичный - <i>C. pentagyna</i> Waldst. et Kit., • боярышник черный - <i>C. nigra</i> Waldst. et Kit. • боярышник азароль - <i>C. azarolus</i> L. 	Методом ТСХ в системе муравьиная кислота - вода – метилэтилкетон – этилацетат (10:10:30:50) восходящим способом подтверждается присутствие гиперозида и хлорогеновой кислоты в присутствии свидетелей. Пятна проявляются после обработки раствором аминоэтилового эфира дифенилкарбоновой кислоты в метаноле и раствором макрогло-400 в метаноле, а затем пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм (гиперозид – желтовато-оранжевая флуоресценция, хлорогеновая кислота – светло-голубая) [24,108,109].	Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид: определяется методом дифференциальной спектрофотометрии путем добавления к этанольному извлечению смеси борной и щавелевой кислот в безводной муравьиной кислоте (оптическая плотность измеряется через 30 минут при длине волны 410 нм) [24,108,109].
«Боярышника листья – Folia Crataegi»	Белорусская фармакопея	<ul style="list-style-type: none"> • боярышник кроваво - красный - <i>Crataegus sanguinea</i> Pall.; • боярышник сглаженный - <i>C. laevigata</i> (Poir.) DC. (боярышник колючий - <i>C. oxyacantha sensu</i> Pojark.) 	Качественные реакции на флавоноиды (по реакции взаимодействия спиртового экстракта листьев со спиртовым раствором алюминия хлорида – зеленовато-желтое окрашивание) и процианидины (появление после нагревания красного окрашивания при добавлении раствора кислоты хлористоводородной в бутаноле и раствора железоммонийных квасцов) [24].	Спектрофотометрически определяется две группы веществ: флавоноиды в пересчете на рутин и процианидины в пересчете на цианидина хлорид. Определение флавоноидов проводится после реакции комплексообразования с раствором алюминия хлорида в присутствии буферного раствора. Определение процианидинов – после реакции с раствором железоммонийных квасцов в присутствии бутанольного раствора хлористоводородной кислоты [24].

1.5. Современное состояние фармакологических исследований растений рода *Crataegus* L.

Боярышник имеет долгую историю применения, подтвержденную большим количеством свидетельств положительного применения в клинической кардиологии. В разное время использовались лекарственные препараты и биологически активные добавки на основе различных видов сырья боярышника (чаще плоды и цветки) в основном в качестве сердечно-сосудистых и общеукрепляющих средств.

На сегодняшний день в Государственном реестре лекарственных средств России зарегистрированы следующие лекарственные препараты на основе сырья боярышника [100,101]:

Таблица 1.5.1.

Лекарственные препараты, разрешенные к применению в России,
на основе сырья боярышника

№	Наименование ЛП	Сырье	Фармако-терапевтическая группа:	Страна-производитель
1.	Боярышника плоды - цельное сырье - порошок	Плоды боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Россия
2.	Боярышника настойка	Плоды боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Россия
3.	Боярышника плодов экстракт сухой	Плоды боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Россия
4.	Боярышника цветки - сырье - порошок	Цветки боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Россия
5.	Боярышника экстракт сухой	Цветки боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Швейцария
6.	Боярышника экстракт жидкий	Плоды боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Россия
7.	Боярышника таблетки для рассасывания	Плоды боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Нидерланды
8.	Алтайский эликсир	Комплекс экстрактов 24 лекарственных растений	Общетонизирующее средство растительного	Россия

		(в т.ч. плодов бояршника, цветков боярышника)	происхождения	
9.	Ангионорм, таблетки	Экстракт плодов боярышника , экстракт семян каштана конского, экстракт корня солодки голой	Ангиопротекторное средство	Россия
10.	Броменвал, капли	Боярышника плодов настойка, валерианы лекарственной корневищ с корнями настойка	Седативное средство	Россия
11.	Валемидин, капли	Боярышника плодов настойка, валерианы лекарственной корневищ с корнями настойка, мяты перечной листьев настойка, пустырника травы настойка	Седативное средство	Россия
12.	Валеодикрамен, капли	Боярышника плодов настойка, валерианы лекарственной корневищ с корнями настойка, мяты перечной листьев настойка, пустырника травы настойка	Седативное средство	Россия
13.	Герботон, настойка	Плоды боярышника , плоды клюквы, плоды шиповника, корневища с корнями элеутерококка, плоды черной смородины, трава эхинацеи пурпурной	Адаптогенное средство растительного происхождения	Россия
14.	Гипертонплант, сбор	Боярышника плоды , трава сушеницы топяной, трава пустырника корневища с корнями валерианы лекарственной, трава горца птичьего, листья мяты перечной, листья подорожника большого	Не указана	Россия
15.	Доктор Тайсс Геровитал, эликсир	Экстракт плодов, листьев и цветков боярышника , экстракт	Поливитаминозное средство, прочие препараты	Германия

		пустырника, витамины и микроэлементы		
16.	Доппельгерц Виталотоник, раствор	Жидкий экстракт листьев и цветков боярышника жидкий экстракт соплодий хмеля жидкий экстракт корневищ с корнями валерианы лекарственной жидкий экстракт травы мелиссы лекарственной жидкий экстракт корней женьшеня настоящего	Средство растительного происхождения	Германия
17.	Доппельгерц Кардиовитал, таблетки	Сухой экстракт листьев с цветками боярышника	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Германия
18.	Доппельгерц Энерготоник, эликсир	Настойка омелы белой, настойка травы зверобоя продырявленного, настойка травы тысячелистника обыкновенного, настойка плодов боярышника , настойка корней дудника, настойка корневищ с корнями валерианы лекарственной, настойка соплодий хмеля, настойка кожуры померанца, масло листьев шалфея лекарственного, масло листьев и стеблей розмарина, масло листьев мелиссы, ароматическая настойка из коры коричневого дерева, корневищ имбиря, корневищ альпинии, бутонов гвоздики, плодов кардамона	Поливитаминовое средство, прочие препараты	Германия
19.	Кардиовален, капли	Адонизид, боярышника плодов экстракт , валерианы лекарственной корневищ с корнями	Кардиотоническое средство растительного происхождения	Россия

		настойка, желтушника серого сок		
20.	Кардиотрон, раствор	Настойка ландыша, экстракт боярышника жидкий, экстракт листьев крапивы жидкий	Фитопрепарат, применяемый при функциональных нарушениях сердечно-сосудистой системы	Россия
21.	Кедровит, эликсир	Аронии черноплодной плоды, березы почки, боярышника плоды, боярышника цветки , сосны кедровой сибирской орех	Общетонизирующее средство растительного происхождения	Россия
22.	Клиофит, эликсир	Плоды аниса обыкновенного, плоды боярышника , цветки календулы лекарственной, трава кипрея, плоды кориандра, листья мяты перечной, листья подорожника большого, трава пустырника, цветки ромашки аптечной, корни солодки голой, семена сосны кедровой сибирской, плоды тмина обыкновенного, трава тысячелистника обыкновенного, хмелья соплодия, березовый гриб (чага), трава череды трехраздельной, плоды шиповника, корневища с корнями элеутерококка	Противоклиматическое средство растительного происхождения	Россия
23.	Кравалеон, капли	Адонизид, жидкий экстракт боярышника , настойка валерианы, жидкий экстракт травы желтушника	Седативное средство растительного происхождения	Россия
24.	Кратал, таблетки	Экстракт плодов боярышника , экстракт травы пустырника	Фитопрепарат, применяемый при функциональных нарушениях сердечно-сосудистой системы	Украина
25.	Крегиум, таблетки	Сухой экстракт листьев с цветками	Фитопрепарат, применяемый при	Германия

		боярышника	сердечной недостаточности	
26.	Ново-пассит, таблетки, раствор	Корневища с корнями валерианы лекарственной, трава мелиссы лекарственной, трава зверобоя продырявленного, листья и цветки боярышника однопестичного или колючего , трава пассифлоры инкарнатной, соплодия хмеля обыкновенного, цветки бузины черной	Седативное средство растительного происхождения	Чешская Республика
27.	Пассифит, сироп	Густой экстракт валерианы жидкий экстракт шишек хмеля, жидкий экстракт чабреца, настойка боярышника , настойка мяты	Седативное средство растительного происхождения	Россия
28.	Седофлор, настойка	Боярышника плоды , Донника трава, Кориандра плоды Мелиссы лекарственной трава, Овса посевного зерно, Пустырника трава, Хмеля соплодия	Седативное средство растительного происхождения	Украина
29.	Симпатил, таблетки	Сухой экстракт эшшольции, сухой экстракт боярышника	Седативное средство растительного происхождения	Франция
30.	Фито Ново-Сед, жидкий экстракт	Боярышника плоды , Мелиссы лекарственной трава, Пустырника трава, Шиповника плоды, Эхинацеи пурпурной трава	Седативное средство растительного происхождения	Россия
31.	Фиторелакс, таблетки	Сухой экстракт валерианы, сухой экстракт цветков боярышника	Седативное средство растительного происхождения	Нидерланды
32.	Эвалар, эликсир	Цветки бессмертника песчаного, плоды боярышника , трава зверобоя продырявленного, плоды каштана конского, орех кедровый, плоды клюквы, плоды	Общетонизирующее средство растительного происхождения	Россия

		кориандра, слоевища ламинарии, корневища с корнями левзеи сафлоровидной, листья мяты перечной, пантокрин, листья подорожника большого, корневища с корнями родиолы розовой, цветки ромашки аптечной, плоды рябины, корни солодки голой, трава тысячелистника обыкновенного, плоды шиповника, корневища с корнями элеутерококка		
--	--	---	--	--

Несмотря на длительное применение, широкий ассортимент используемых препаратов на основе боярышника, растение до сих пор является объектом физико-химических и фармакологических исследований из-за его большого видового многообразия, сложного химического состава и широкого спектра фармакологической активности.

Боярышник является одним из старейших лекарственных растений, используемых в европейской медицине. Плоды различных видов боярышника давно используются в традиционной европейской фитотерапии [117]. Комиссия Е в 1984 году опубликовала монографию на боярышник, которая включала описание всех наземных частей растения, в основу которой были заложены исторический опыт применения, множество фармакологических исследований различных препаратов из трех различных частей боярышника, около 20 открытых клинических испытаний и частных клинических случаев. В показаниях к применению были указаны 1 и 2 стадия хронической сердечной недостаточности по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца. Другие показания к применению: давление в груди, сердечная недостаточность, не требующая длительной терапии, и легкая форма брадикардии [124]. Однако в 1994 году оригинальная монография

была заменена на 4 утвержденные монографии листья боярышника с цветками и 3 на листья, цветки и плоды соответственно.

Боярышник широко изучался в Германии. Обзор, используемых в кардиологии препаратов боярышника, показывает, что боярышник может применяться в случаях, когда не показано применение препаратов на основе наперстянки [106]. Более поздний обзор терапии показывает эффективность применения его при хронической сердечной недостаточности.

Проводилось плацебо-контролируемое, рандомизированное, двойное слепое исследование экстракта листьев с цветками боярышника (Crataegutt forte) на 30 пациентах в течение 8 недель, в дозе 160 мг в день. В группе, принимавшей боярышник, были статистически значимые результаты, показывающие преимущество экстракта боярышника в сравнении с плацебо: в стандартных испытаниях на выносливость, оценке субъективных жалоб, толерантности к физической нагрузке, изменению артериального давления [114].

Исследования больных на ранней стадии хронической сердечной недостаточности, принимавших экстракт листьев с цветками боярышника в дозе от 160 до 900 мг, показали улучшение функций сердца и толерантность к физической нагрузке, уменьшение одышки [122].

Шульц с соавторами приводит 14 клинических исследований, опубликованные с 1981 по 1994, терапевтической эффективности препаратов боярышника на 808 пациентах [123].

Ройтер описывает 15 клинических испытаний на 872 пациентах, получавших стандартизованный экстракт боярышника (160-900 мг), содержащий до 5% олигомерных процианидинов и до 2,2% флавоноидов. Значительное улучшение стрессоустойчивости и увеличение анаэробного порога наблюдалось при применении суточной дозы экстракта 300-900 мг в течение 4 недель, и в большей степени после 8 недель. Однако субъективные жалобы проходили уже при приеме более низких доз: 160-180 мг [122].

Экстракт боярышника (LI 132) в дозе 900 мг в день сравнивали по действию с препаратом каптоприл (37,5 мг/день) у пациентов со 3 стадией хронической сердечной недостаточностью. Боярышник показал одинаково хорошие результаты снижения артериального давления. Кроме этого, его преимуществом было положительное влияние на работу сердца [125].

Препараты боярышника были показаны для лечения стенокардии, являющейся последствием недостаточности кровоснабжения миокарда. Так, в плацебоконтролируемом исследовании комбинированного препарата «Crataegutt novo», содержащего экстракт листьев, плодов и цветков боярышника, у пациентов, принимавших экстракт боярышника, улучшались показатели ЭКГ, кровоснабжение и приток кислорода к миокарду. Кроме этого у пациентов, длительное время принимавших экстракт боярышника, отсутствовали приступы стенокардии [110].

В Германии листья с цветками боярышника – официальное лекарственное растительное сырье, включенное в Немецкую Фармакопею, и имеющее монографию, утвержденную Комиссией E [107].

Спиртовой жидкий экстракт боярышника входит в Немецкую Фармакопею 10 издания 3 дополнения (DAB 10, 1993).

Боярышник входит в состав более чем 100 зарубежных препаратов, особенно кардиотонических, коронарорасширяющих и антигипертензивных, в различных лекарственных формах, в том числе водно-спиртовых, сухих экстрактах в драже, жидких экстрактах (капли) и водных настоев [107].

Фармакологические исследования боярышников проводились и отечественными исследователями. Так, Гусейновым Д.Я. проводилась сравнительная оценка различных видов боярышников, произрастающих на территории Азербайджанской ССР (согнутостолбиковый, кавказский, восточный, мелколистный, ложноразнолистный, Мейера, Шовица, пятипестичный, волосистоцветковый). В исследуемых видах установлено содержание алкалоидов, гликозидов, эфирных масел, смолистых, дубильных, сахаристых веществ, органических кислот, витамина С и др. Боярышники

пятипестичный и кавказский превосходят другие виды по содержанию основных действующих веществ. Жидкий экстракт плодов боярышника пятипестичного снижал содержание холестерина в крови в пределах 77-86% и увеличивал лецитин-холестериновый коэффициент до исходного состояния, уменьшал артериальное давление на 55 %, замедлял ритм сердечных сокращений на 34%, увеличивал коронарный кровоток на 206% с одновременным понижением поглощения кислорода сердечной мышцей на 109%. Суммы сапонинов, флавоноидов, антоцианов и жидкий экстракт плодов боярышника пятипестичного оказывали отчетливое антиаритмическое действие. Наиболее активными оказались суммы флавоноидов и сапонинов, терапевтический эффект которых наступал быстро и в малых дозах. Жидкий спиртовой экстракт плодов боярышника пятипестичного вызывал значительное увеличение желчеотделения (на 62-141%) [29].

Хаятуллой Насрулла Масуди изучалось влияние экстракта плодов боярышника на мозговое кровообращение. В опытах на крысах экстракт понижал тонус мозговых сосудов, что способствовало увеличению мозгового кровотока при неизменном системном артериальном давлении. У животных с ишемией головного мозга экстракт боярышника способствовал восстановлению нарушений ауторегуляции мозгового кровотока в постишемическом периоде [94].

Проводилось сравнительное изучение специфической антиаритмической активности экстракта плодов, настойки цветков, настойки плодов, настоя цветков, настоя плодов и суммы флавоноидов из плодов и из цветков фармакопейных видов *C. Sanguinea* Pall., *C. laevigata* (Poir.) DC. (*C. oxyacantha* sensu Pojark.), *C. chlorocarpa* Lenneet C. Koch, *C. korolkowii* L. Henry, *C. Dahurica* Koehneet Schneid., *C. monogyna* Jacq., близкородственных им видов, произрастающих на территории Прибалтики, а также интродуцированных северо-американских видов. Выраженное антиаритмическое действие оказывали экстракт плодов боярышника и

настойка цветков. Препараты из всех изученных видов боярышника обладали практически одинаковой специфической антиаритмической активностью [39].

Анцышкиной А.М. с соавторами определялась антиаритмическая активность препаратов из сырья боярышников туркестанского, понтийского, гиссарского, однопестичного. Установлена их специфическая антиаритмическая активность. Максимальный положительный эффект достигался при проведении профилактического курса. Более выраженное антиаритмическое действие оказывал жидкий экстракт плодов [1,2].

Лазуко С.С. с соавторами проводилась сравнительная оценка влияния на электрическую активность миокарда у кроликов настоек боярышника, полученных методами многократной мацерации, путем растворения густого экстракта и экстрагированием с применением вакуума. Все настойки обладали выраженным брадикардическим действием, эффективно увеличивали амплитуду зубца R, увеличивали атриовентрикулярную проводимость. Эффекты настоек, приготовленных различными способами, статистически не различались [53].

Изучалась антиаритмическая активность настоек боярышника, полученных различными способами (классический способ экстрагирования плодов 70% этиловым спиртом, разведением густого экстракта, экстрагирование 70% этиловым спиртом с применением вакуума). Антиаритмическую активность сравнивали на экспериментальной модели нарушений сердечного ритма смешанного характера, воспроизводимой у бодрствующих крыс с помощью аконитина, а также на модели, воспроизводимой интракоронарным введением аконитина на изолированных сердцах крыс. Было установлено, что аконитинзависимая аритмия эффективно блокируется предварительным введением всех серий настоек, и настойки, независимо от способа приготовления, оказывали одинаковое действие на начало возникновения желудочковых аритмий, что проявлялось в удлинении латентного периода [54].

Ляховой Н.С. проводилось фармакологическое изучение суммарных извлечений из плодов боярышника (были получены фракции из шрота). Определена их токсичность – отнесены к 6 классу (относительно безвредные). При пероральном введении белым беспородным крысам фракции 6,7,8 оказывали выраженный гипотензивный эффект. Фракции 2,5 – показали умеренную гипотензивную активность. Фракция 2 вызывала умеренное изменение мозгового кровообращения, а ее профилактическое введение понижало двигательную и поисковую активность у нормотензивных животных (седативный эффект). Выявлен ее антигипоксический эффект, антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие [55].

Сафоновой М.Ю. и Фроловой Н.Ю. в эксперименте установлены антигипоксические и анальгезирующие свойства листьев, плодов и цветков *C. Sanguinea* Pall. [79,88].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Обобщение и анализ данных литературы показал, что, несмотря на длительное применение, растения рода *Crataegus* L. до сих пор являются объектом физико-химических и фармакологических исследований из-за их большого видового многообразия, сложного химического состава и широкого спектра фармакологической активности.

2. Приведенные выше данные показывают, что химический состав листьев боярышника кроваво-красного, в отличие от цветков и плодов, недостаточно исследован, а биологически активные вещества, содержащиеся в листьях боярышника кроваво-красного, обладают разносторонним фармакологическим действием, что представляет несомненный интерес для дальнейших исследований.

3. Широкое применение листьев различных видов боярышников в мировой практике и результаты фармакологических исследований указывают на перспективность углубленного изучения листьев боярышника кроваво-красного с целью расширения ассортимента и внедрения новых видов лекарственного растительного сырья.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Основным объектом исследования стали листья боярышника кроваво-красного (*folia Crataegi sanguineae* Pall.), собранные 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.

В ходе исследования было проанализировано 45 образцов листьев боярышника кроваво-красного и 30 образцов цветков и плодов. Отбор проб для анализа, изучение характеристик подлинности и показателей качества осуществляли, руководствуясь общими статьями ГФ XI [26,27].

2.2. Методы исследования

2.2.1. Определение подлинности сырья

Макроскопический анализ листьев боярышника проводили при осмотре составных компонентов аналитической пробы визуально и с помощью лупы (10х) [26,32].

Микроскопический анализ проводили на микровизоре MVZ-103, предварительно подготовив временные микропрепараты листа с поверхности и поперечные срезы листа и черешка [26].

С использованием микроскопического анализа проводили стандартизацию и контроль качества лекарственного растительного сырья посредством количественной оценки проявления диагностически значимых признаков [65].

Для анализа использовали порошок листьев, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Наблюдение проводили под микроскопом «Минимед - 501» при увеличении 4×0,10×37,5; 10×0,25×7,63; 40×0,65×0,63. Исследование проводили в 15 повторностях: подсчитывали сумму диагностически значимых частиц, сумму диагностически незначимых

частиц, общую сумму частиц (путем сложения двух перечисленных выше сумм). Анализ проб проводили по методике разработанной И. А. Самылиной, О. Г. Потаниной [65].

2.2.2. Методы определения доброкачественности

Определение влажности сырья проводили по ОФС «Потеря в массе при высушивании» [66].

Общую золу исследуемого сырья определяли по ГФ XII (ч. 1) в пересчете на абсолютно сухое сырье, в процентах.

Степень измельченности листьев боярышника и содержание примесей в сырье определяли с помощью методик ГФ XI (ч.1).

Срок годности ЛРС листа боярышника кроваво-красного устанавливался в соответствии со ст.40 ГФ XII «Сроки годности лекарственных средств». Срок годности устанавливался на основании экспериментального изучения стабильности опытных партий листьев боярышника в различных видах упаковки в соответствии с рекомендациями нормативной документации (бумажные пакеты, картонные пачки, тканевые мешки), и оптимальных условиях хранения [25,26]. Стабильность сырья в различных видах упаковки и в разных условиях хранения изучали путем периодического и систематического контроля показателей качества, значения которых могли изменяться в период хранения сырья (влажность сырья, количественное содержание флавоноидов).

Микробиологическую чистоту листьев боярышника кроваво-красного устанавливали согласно ст.32 ГФ XII «Микробиологическая чистота».

2.2.3. Методы фитохимического анализа

2.2.3.1. Методы качественного анализа биологически активных веществ

Качественные реакции

Качественные реакции на *флавоноиды* проводили по известным методикам [16,49,67,95]:

1. Цианидиновая проба (проба *Chinoda*). К 1 мл извлечения прибавляли 2-3 капли хлористоводородной кислоты концентрированной, металлический

магний (цинк). Появление красного или красно-оранжевого окрашивания в присутствии металлического магния (цинка) и концентрированной хлористоводородной кислоты указывало на наличие окисленных форм флавоноидов – флавонов, флавонолов, флаванонов и флаванололов. Реакция основана на восстановлении флавоноидов до антоцианидинов с образованием ярко-розового окрашивания.

2. Реакция с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида. К 1 мл извлечения прибавляли 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида. Появление желтого окрашивания возникало за счет реакции комплексообразования окисленных форм флавоноидов (флавоны, флавонолы, флаваноны и флаванололы) с алюминия хлоридом.

3. Реакция со щелочью. К 1 мл извлечения прибавляли 1-2 капли 10% спиртового раствора калия гидроксида. Флавоны, флавонолы, флаваноны приобретали желтое окрашивание.

На *фенольные соединения* проводили реакцию с железа (III) хлоридом. К 1 мл извлечения прибавляли 2-3 капли 1% спиртового раствора железа хлорида. Образование окраски говорило о наличии флавонолов (темно-зеленая), флавононов (коричневая), флавонов (красновато-бурая).

Для качественного подтверждения *сапонинов* проводили следующие реакции [16,49,67,95]:

1. Реакция пенообразования. 10 мл настоя помещали в пробирку, во вторую пробирку наливали дистиллированной воды (контроль) и обе пробирки, предварительно закрыв пробками, энергично встряхивали в течение 1 мин. Отметили образование пены в пробирке с извлечением.

2. Реакция Лафона. К 2 мл извлечения прибавляли 1 мл серной кислоты концентрированной, 1 мл этилового спирта и 1 каплю 10% раствора меди (II) сульфата. При нагревании появлялось сине-зеленое окрашивание.

3. Реакция осаждения. К 2 мл водного настоя в пробирке прибавляли несколько капель свинца ацетата раствора. Образовался осадок.

Для обнаружения *кумаринов* проводились качественные реакции [16,49,67,95]:

1. Лактонная проба. К 3-5 мл спиртового извлечения добавляют 10 капель 10% спиртового раствора калия гидроксида, раствор нагревают на водяной бане. При наличии кумаринов раствор желтеет. Затем добавляют 5 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают и нейтрализуют 10% раствором хлористоводородной кислоты до кислой реакции. Наблюдают помутнение раствора и выпадение осадка.

2. Диазореакция. К 3-5 мл спиртового извлечения добавляют 10 капель 10% спиртового раствора калия гидроксида и нагревают на водяной бане в течение 5 минут (при наличии кумаринов раствор желтеет), затем прибавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива Паули по Кутачеку. При этом наблюдают окрашивание раствора в вишневый или кроваво-красный цвет.

Для обнаружения *дубильных веществ* к 2-3 мл извлечения прибавляют 4-5 капель раствора железоаммонийных квасцов. В присутствие гидролизуемых дубильных веществ наблюдают черно-синее окрашивание или осадок, а конденсированных – черно-зеленое окрашивание или осадок [49].

Для обнаружения *полисахаридов* около 1 г сырья помещают в коническую колбу со шлифом, прибавляют 10 мл воды и нагревают с обратным холодильником в течение 30 мин, поддерживая слабое кипение. Извлечение декантируют в мерную колбу вместимостью 50 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку. Экстракцию проводят еще 4 раза по 10 мл (каждый раз в течение 30 мин). Фильтр промывают водой и доводят объем извлечения до метки (раствор А). К 10 мл раствора А прибавляют 10 мл спирта этилового 95%, перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии [27].

Водные растворы осадков использовали для проведения реакций с реактивом Фелинга и раствором меди сульфата. Положительные реакции свидетельствовали о наличии в сырье моносахаридов [5,9].

Для выделения *полисахаридов* использовали методику последовательного фракционного выделения полисахаридов [48]. Предварительно лекарственное сырье экстрагировали 70% спиртом этиловым для удаления веществ полифенольной природы. Для получения водорастворимых полисахаридных комплексов (ВРПС) использовали воздушно-сухой шрот сырья после экстракции полифенольных соединений. 100 г воздушно-сухого шрота экстрагировали 2 л горячей воды при нагревании до 95°C в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Повторное извлечение полисахаридов проводили дважды при соотношении сырье - экстрагент 1:10. Растительный материал отделяли центрифугированием, а объединенные экстракты упаривали до 1/5 первоначального объема. Полисахариды осаждали трехкратным (по отношению к извлечению) объемом 95% спирта этилового при комнатной температуре. Выпавшие плотные осадки отфильтровывали, промывали спиртом этиловым, ацетоном, затем высушивали и взвешивали [18,23].

Из шрота, оставшегося после получения ВРПС выделяли пектиновые вещества (ПВ). Экстракцию сырья проводили трехкратно смесью 0,5 % растворов щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) в соотношении 1:20 при 80-85°C в течение 2 часов. Объединенные экстракты концентрировали и осаждали пятикратным объемом 95% спирта этилового. Полученные осадки отфильтровывали, промывали спиртом этиловым, высушивали и взвешивали.

Из шрота, оставшегося после выделения пектиновых веществ, выделили гемицеллюлозы А и Б (ГЦ А и ГЦ Б). Экстракцию проводили 10% раствором натрия гидроксида в соотношении 1:5 при комнатной температуре в течение 12 часов. При добавлении ледяной уксусной кислоты образовался осадок ГЦ А, который отфильтровывали, высушивали и взвешивали. К фильтрату добавляли двукратный объем 96% спирта этилового, при этом

образовался осадок ГЦ Б, который промывали спиртом, высушивали и взвешивали [48].

Алкалоиды извлекали из сырья 1-5% раствором серной (хлористоводородной) кислоты. Кислотное извлечение использовали непосредственно или подщелачивали аммиака раствором и затем алкалоиды извлекали органическим растворителем (хлороформом, этиловым эфиром, дихлорэтаном). Органический растворитель отгоняли и выпаривали в фарфоровой чашке, и с остатком проводили качественные реакции [16,49,67,95]:

1. Реакция с танином. При добавлении к исследуемому раствору раствора танина выпадает осадок: образуется нерастворимая соль алкалоида и танина, имеющего кислотные свойства.

2. Реакция с пикриновой кислотой. Растворы солей алкалоидов дают с пикриновой кислотой желтый осадок.

3. Реакция с фосфорномолибденовой кислотой (реактив Зонненштейна) приводит к выпадению белых и бурых осадков нерастворимых солей алкалоидов с кислотой.

Хромоны обнаруживаются в растениях при помощи микрохимических реакций. Для выделения *хромонов* из растительного сырья используют экстракцию хлороформом, ацетоном, метанолом или этанолом. С концентрированными кислотами (серной, хлористоводородной, о-фосфорной) хромоны образуют оксониевые соли, окрашенные в лимонно-желтый цвет. В реакциях с концентрированными щелочами хромоны приобретают пурпурно-красное окрашивание [49,67].

Для идентификации *антрагликозидов* в лекарственном растительном сырье используется реакция *Борнтрегера* [49,67]. 0,2 г измельченного растительного сырья кипятят в течение 2 мин с 5 мл 10% раствора натрия гидроксида. После остывания смесь разбавляют 5 мл воды и фильтруют. 3 мл фильтрата помещают в пробирку, добавляют 3 мл 10% раствора хлористоводородной кислоты и 10 мл бензола. Осторожно перемешивают и

после расслоения жидкости сливают бензольный слой, фильтруя его через небольшой комочек ваты. Фильтрат встряхивают с 3 мл 10% раствора аммиака. При наличии антраценпроизводных аммиачный слой принимает вишнево-красное (1,8-диоксиантрахиноны), пурпурное (1,4-диоксиантрахиноны) или фиолетовое (1,2-диоксиантрахиноны) окрашивание.

Хроматографический анализ

Методы хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента

Методом ТСХ анализировали извлечения сырья, полученные на 95% и 80% этиловом спирте в соотношении 1:10. Анализ проводился в следующих системах:

- муравьиная кислота - ЛУК - вода - метанол - ацетон - хлороформ (6:6:7,5:12,5:30:60),
- этилацетат - муравьиная кислота - ЛУК - вода (100:11:11:26),
- этилацетат - муравьиная кислота - вода (14:3:3),
- хлороформ - ЛУК - метанол - вода (15:8:3:2),
- бутанол - уксусная кислота-вода (4:1:1),
- бутанол - этанол - вода (7:2:5),
- бутанол - этанол - 25% аммиак (7:2:5),
- хлороформ - метанол - вода (65:35:10),
- этилацетат - этанол - вода - аммиак (65:25:9:1),
- муравьиная кислота - ЛУК - вода - метанол - ацетон - хлороформ (6:6:7,5:12,5:30:60) [7,67,95].

На линию старта пластинки «Silufol UV-254» капилляром наносили 0,02 мл подготовленного извлечения и по 0,02 мл 0,05% растворов стандартных образцов веществ. Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе, затем помещали в предварительно насыщенную смесью растворителей камеру, и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителей проходил около 12 см, пластинку вынимали из камеры, сушили на воздухе в течение 5 минут. Затем просматривали

хроматограммы в УФ-свете при длине волны 365 нм. После проявляли пластинки 3% спиртовым раствором алюминия хлорида и наблюдали изменение окраски пятен.

Установление моносахаридного состава выделенных комплексов полисахаридов проводили методами хроматографического исследования на бумаге (БХ), бумага - «С» Санкт-Петербургской фабрики №2 и восходящей хроматографией в тонком слое сорбента (ТСХ) на пластинке «Silufol UV-254» и в тонком слое силикагеля СТХ-1 А марки Sorbfil [6].

Для разделения моносахаридов использовались системы растворителей [7,67,95]:

- для хроматографии на бумаге:

этилацетат - уксусная кислота - муравьиная кислота-вода (18:3:1:4)

- для хроматографии в тонком слое сорбента:

бутанол – ацетон – вода (4:5:1).

Для приготовления систем использовались ледяная уксусная кислота, вода очищенная. Вещества детектировали просмотром хроматограмм в видимом и УФ-свете - до и после проявления хроматограмм 5% раствором алюминия хлорида в этиловом спирте, 1% раствором железа хлорида и раствором аммиака [67,95].

Для идентификации природных веществ использовали аутентичные образцы веществ: рутин, кверцетин, нарингенин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, физетин, байкалеин, гиперозид, глюкоза, галактоза, фруктоза, манноза, ксилоза, маннит, арабиноза, сахароза, рамноза, полученные из Государственного ботанического сада Сибирского отделения РАН, Института органической химии (г. Иркутск), НПО ВИЛАР.

Примечание:

1. Подготовка пластинок. Пластины «Silufol UV-254» вырезают размером 14*5 см, наносят линию старта на расстоянии 1 см от края и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 часа.

2. Приготовление системы растворителей для хроматографирования. Системы используются свежеприготовленные. Насыщение камеры для хроматографирования системой растворителей проводят в течение 1 часа.
3. Приготовление раствора проявителя. См. раздел 5.2. Разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного.
4. Приготовление растворов стандартных образцов веществ. Растворы стандартных образцов веществ в концентрации 0,05% готовились путем растворения порошков веществ в 95% этиловом спирте.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Анализ флавоноидов листьев боярышника кроваво-красного проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической системе Waters Breeze (Waters, США) со спектрофотометрическим детектором. Колонка с фазой Nova Pak C18, 300x3,9 мм, 4 мкм (Waters, США). В качестве подвижной фазы использовался элюент состава вода (В): ацетонитрил (А). Анализ проводили в градиентном режиме в следующих условиях: элюирование – 5% ацетонитрил 5 мин, 30% - от 5 до 10 мин, 60% - от 10 до 30 мин, 100% - от 30 до 45 мин, 5% - от 45 до 60 мин. Скорость потока составляла 0,9 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 275 нм. Анализируемый образец в виде полученного на 70% этиловом спирте извлечения, предварительно освобожденного от липофильных веществ, объемом 15 мкл вводился микрошприцем в аналитическую петлю объемом 5 мкл и записывалась хроматограмма (рис.1). Количественное определение индивидуальных компонентов в образцах листьев *C.sanguinea* проводили по методу внешнего стандарта как наиболее оптимальному для хроматографического анализа многокомпонентных смесей [105].

Метод газовой хроматографии масс-спектрометрии

Исследование спиртовых извлечений, полученных с использованием 95% этилового спирта, 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 следующих условиях:

- колонка - капиллярная HP-5M8 (30 м × 0.25 мм, толщина пленки фазы 0,25 мкм);
- температура инжектора - 280°C, интерфейса детектора - 280°C; начальная и конечная температура термостата колонки - 50° и 280°C соответственно; температура колонки изменялась со скоростью 10 град/мин;
- газ-носитель - гелий;
- объем вводимой пробы - 1 мкл. Пробу вводили в режиме с делением потока 40:1;
- масс-селективный детектор работал в режиме электронного удара (70 эВ);
- определение веществ в пробе проводили в режиме регистрации по полному ионному току.

Полученные масс-спектры сравнивали с библиотечными масс-спектрами.

Компонентный состав эфирного масла исследовали методом хромато-масс-спектрометрии на приборе фирмы TermoFinnigan (хроматограф Finnigan 800, масс-спектрометр высокого разрешения MAT-95XPЭВМ «Delta» с системой обработки данных «DataSistem») (микрокапиллярная колонка DB-5 длиной 30м, внутренний диаметр – 0.25 мм, привитая фаза содержащая 5% диметилфенилсиликона и 95% диметилсиликона). Условия анализа: газ-носитель – гелий; скорость газа-носителя 1 мл/мин; объем пробы – 0.1–0.5 мкл; программируемый нагрев хроматографической колонки (изотерма 50С°, 2 мин, подъем температуры до 180°C - скорость подъема 25°/мин., подъем температуры до 250°C – скорость подъема 5°/мин; температура инжектора - 250°C). Компоненты эфирных масел идентифицировали в процессе хроматографирования по результатам сравнения масс-спектров химических веществ с данными библиотеки масс-спектров библиотеки масс-спектров NIST-02.

Метод спектрофотометрии

Спектрофотометрическое исследование проводили для качественной и количественной оценки содержания суммы флавоноидов в листьях боярышника, и для оценки антиоксидантной активности. Исследование проводили на спектрофотометрах СФ-46 и UV-1800 (Shimadzu) в кюветах толщиной слоя 1 см.

Использование метода дифференциальной УФ-спектроскопии с ионизирующими и комплексообразующими реагентами позволяет выявить положение заместителей, их относительное расположение, вклад каждого в общее электронное состояние молекул.

Флавоны и флавонолы, в структуре которых нет свободных 3- и (или) 5-ОН-групп, не образуют комплекса при добавлении хлорида алюминия. Свободные 3-, 5-, 3,5-ОН-группы у флавонов, флавонолов, изофлавонов, флаванонов образуют комплексы с хлоридом алюминия, сопровождающиеся батохромным смещением полос [46].

При наличии 5-ОН-группы комплекс с хлоридом алюминия углубляет окраску соединения, вызывает батохромную и часто раздвоение обеих полос. 3-ОН-группа также образует комплекс, устойчивый к добавлению разбавленной соляной кислоты. Комплекс по 3,5-диоксигруппировке устойчив к действию соляной кислоты, а батохромия может достигнуть 50-60 нм.

Кроме того метод дифференциальной УФ-спектроскопии с комплексообразующими реагентами использовался и для количественной оценки содержания флавоноидов.

Рентгенофлуоресцентный метод

Аминокислотный и макро- и микроэлементный состав сырья определяли рентгенофлуоресцентным методом на спектрометре «Pacific Scientific-6520», который предназначен для определения элементного и аминокислотного состава различных материалов. Программное обеспечение установки позволяет анализировать пробы «бесстандартным» методом с

относительной ошибкой 1-10 % в зависимости от соединения. Дополнительная калибровка прибора по эталонным образцам, приводит к уменьшению относительной ошибки меньше ± 0.1 %.

2.2.3.2. Методы количественного анализа биологически активных веществ

Определение суммы *флавоноидов* проводили с использованием нескольких методик:

1. *Методика 1* - спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин [74]. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 5 г (точная навеска) сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл этилового спирта 95 %, содержащего 1% хлористоводородной кислоты концентрированной. Колбу взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение одного часа. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и доводили до первоначальной массы этиловым спиртом 95%.

Содержимое колбы фильтровали через воронку диаметром 7 см с вложенным ватным тампоном толщиной не более 0,5 см, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 4 мл раствора А, прибавляли 5 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводили раствор до метки этиловым спиртом 95%. Через 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 4 мл раствора А, доведенного этиловым спиртом 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{764,6 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора;

764,6 – удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом при длине волны 430 нм;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

2. *Методика 2* – спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид [81]. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 100 мл 70% этилового спирта взвешивали с точностью до 0,01 г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Колбу с содержимым искусственно охлаждали, взвешивали и доводили до первоначальной массы 70% этиловым спиртом. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

2,5 мл фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, и объем раствора доводили 95% этиловым спиртом до метки. Через 30 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,5 мл извлечения, 0,1 мл уксусной кислоты, доведенного до метки 95% этиловым спиртом в мерной колбу вместимостью 25 мл. Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100000}{330 \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора;

330 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 405 нм;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

3. *Методика 3* - количественное определение *процианидинов* проводили спектрофотометрическим методом [95,118]. Около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,25 мм, помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Прибавляли 20 мл этилового спирта 70 %, закрывали пробкой, взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Присоединили к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивали и доводили до первоначальной массы этиловым спиртом 70%. Содержимое колбы центрифугировали в течение 10-15 минут со скоростью 2000-3000 об/мин.

0,1 мл полученного извлечения переносили в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,9 мл этилового спирта 70 %, 6 мл бутанола кислого, 0,2 мл раствора железоммониевых квасцов, присоединяли колбу к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80°C в течение 50 минут. Раствор охлаждали при комнатной температуре.

Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1 мл этилового спирта 70 %, 6 мл бутанола кислого, 0,2 мл раствора железоммониевых квасцов.

Содержание процианидинов в пересчете на цианидина хлорид и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 7,2 \cdot 20 \cdot 100}{136 \cdot m \cdot 0,1 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

136 - удельный показатель поглощения цианидина хлорида;

0,1 – объем спектрофотометрируемого извлечения листьев боярышника;

7,2 – объем спектрофотометрируемого раствора;

m - навеска сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

4. *Методика 4* – спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин, разработанная автором и представленная в гл.5.

Количественное определение *аскорбиновой кислоты* проводили спектрофотометрическим методом [85]. Около 1,0г сырья (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды и перемешивали на механическом встряхивателе в течение 1,5 ч. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр (раствор А).

В колбу вместимостью 50 мл помещали 5мл раствора А, прибавляют 20 мл этанола 95 %, перемешивали и через 10 минут фильтровали через бумажный фильтр (раствор Б).

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5мл раствора Б и доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор В).

В три колбы вместимостью по 50 мл помещали: в первую 10 мл раствора В, во вторую 10 мл раствора 2 рабочего стандартного образца (PCO) аскорбиновой кислоты и в третью 10 мл воды. В каждую колбу прибавляли по 10 мл раствора натрия фосфорномолибдата, нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 минут и быстро охлаждали под струей холодной воды.

Оптическую плотность испытуемого раствора (колба 1) и раствора PCO аскорбиновой кислоты (колба 2) измеряли на спектрофотометре при длине волны 730 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор из третьей колбы.

Содержание аскорбиновой кислоты в % вычисляли по формуле:

$$X = \frac{50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 20 \cdot A \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100}{m \cdot 5 \cdot 5 \cdot 10 \cdot A_0 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 20} = \frac{500 \cdot A \cdot m_0}{A_0 \cdot m}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность раствора PCO аскорбиновой кислоты;

m - навеска сырья, г;

m_0 - навеска аскорбиновой кислоты, г.

Примечание 1. Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO) аскорбиновой кислоты. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 0,05 г (точная навеска) аскорбиновой кислоты (ФС 42-2668-95), высушенной до постоянной массы при температуре от 100 до 105°C, растворяют в 30 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают (раствор 1). Срок годности раствора 1-3 сут.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5 мл раствора 1, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают (раствор 2).

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление раствора натрия фосфорномолибдата.

В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,05 г натрия фосфата двузамещенного (ГОСТ 4172-76), растворяют в 100 мл воды, прибавляют 10 мл серной кислоты концентрированной, 50 мл воды и 0,8 г аммония молибдата. Объем раствора доводят водой до метки и тщательно перемешивают.

Срок годности раствора 3 месяца.

Определение содержания *дубильных веществ* проводили с использованием двух методов:

- титриметрическим методом по ГФ-ХІ (ч.1, с.286 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье»), выраженное в процентах в пересчете на танин [26];

- спектрофотометрическим методом в пересчете на катехин [30]. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3мм. Около 1г (точная навеска) измельченного сырья помещали в плоскодонную колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, прибавляли 50 мл этанола 50%. Колбу закрывали, взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч с момента закипания растворителя. Колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, закрывали пробкой, взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г и доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 50%. Извлечение фильтровали через складчатый беззольный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 0,5 мл фильтрата, прибавляют 10 мл этанола 50% подкисленного, перемешивали, и объем раствора доводили тем же спиртом до метки (раствор А).

Оптическую плотность раствора A измеряли с помощью спектрофотометра при длине волны 279 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 50% подкисленный.

Содержание суммы полифенольных соединений (X) в пересчете на (+)-катехин и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{144 \cdot m \cdot 0,5 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

m - навеска сырья, г;

144 – удельный показатель поглощения (+) - катехина при 279 нм в этаноле 50% подкисленном;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Примечание 1. Приготовление спирта этилового 50% подкисленного. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл этанола 50%, прибавляют 1 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают, объем раствора доводят этанолом 50% до метки, перемешивают.

Количественное определение *тритерпеновых сапонинов* проводили фотоэлектроколориметрическим методом в пересчете на олеаноловую кислоту [37].

Около 5,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды и экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 120 мин. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл и тем же экстрагентом доводили до метки. 5 мл экстракта помещали в колбу с обратным холодильником, прибавляли 3 мл смеси хлористоводородная кислота концентрированная - вода (1:1) и нагревали на водяной бане 30 мин. Затем раствор охлаждали под струей холодной воды и смывали в делительную воронку, прибавляли 20 мл смеси хлороформ – этиловый спирт 95% (5:1) и взбалтывали в течение 10 мин. После расслоения хлороформное

извлечение фильтровали через фильтр с 5 г натрия сульфата безводного в стеклянную колонку с 2 г алюминия оксида. Операцию извлечения смесью хлороформ- этиловый спирт 95% (5:1) повторяли еще три раза, используя по 20 мл смеси. Хлороформный элюат упаривали на кипящей водяной бане до 2 мл, остаток растворителя удаляли продуванием воздуха. Сухой остаток переносили 70% этиловым спиртом в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора этим же растворителем до метки. К 5 мл полученного раствора прибавляли 5 мл серной кислоты концентрированной и тщательно перемешивали. Через 30 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 490 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание тритерпеновых соединений в пересчете на олеаноловую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 100}{22,9 \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

V - объем экстракта, взятого для измерения, мл;

m - навеска сырья, г;

22,9 - удельный показатель поглощения олеаноловой кислоты;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Содержание *полисахаридов* в листьях боярышника кроваво-красного определяли двумя методами:

- гравиметрическим по ГФ-ХІ (ч.2, с.20 «Листья подорожника большого»);
- спектрофотометрическим [10,11]. Аналитическую пробу листьев боярышника измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 40 мл смеси этилового спирта 95 % и воды в соотношении 3:1, 0,3 г кальция карбоната и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Горячее извлечение аккуратно сливали, следя за тем,

чтобы частицы сырья оставались на колбе. Колбу с сырьем промывали дважды, используя по 10 мл смеси этилового спирта 95 % и воды, извлечения сливали. Операцию экстрагирования повторяли, время нагревания 15 минут, промывали трижды, используя по 10 мл той же смеси. Далее в колбу с сырьем приливали 25 мл воды и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, охлаждали при комнатной температуре в течение 5 минут, фильтровали извлечение на воронке Бюхнера под вакуумом через бумажный фильтр, следя за тем, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Экстракцию повторяли с 15 мл воды, время нагревания 15 минут. Переносили сырье на фильтр, промывая колбу 5 мл воды. Экстракт количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, используя 5 мл воды. Доводили объем раствора в колбе водой до метки, перемешивали (раствор А).

20 мл раствора А помещали в коническую колбу, прибавляли 6 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и кипятили с обратным холодильником в течение 10 минут. К полученному извлечению прибавляли 5 мл 40% раствора натрия гидроксида, затем прибавляли тот же раствор щелочи по каплям и кислоту хлористоводородную разведенную по каплям до pH 4,0-4,5. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали. Фильтровали извлечение через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10-15 мл фильтрата (раствор Б).

10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 0,5 мл 10% раствора свинца ацетата, перемешивали. Через 5 мин прибавляли 1,5 мл 5% раствора натрия фосфата, перемешивали, оставляли на 2 мин, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали, фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 5-10 мл фильтрата (раствор В).

В четыре конические колбы на 50 мл помещали по 2,5 мл 1% раствора пикриновой кислоты, затем по 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната. В

первую колбу прибавляют 5 мл раствора Б (анализируемый раствор), во вторую – 5 мл раствор В (раствор сравнения 1), в третью – 5 мл раствора рабочего стандартного образца (РСО) глюкозы (раствор стандарта), в четвертую – 5 мл воды (раствор сравнения 2). Колбы с содержимым погружали на 10 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждали до комнатной температуры и содержимое количественно переносили в мерные колбы вместимостью 25 мл, доводили объем растворов в колбах водой до меток, перемешивали.

Оптическую плотность анализируемого и раствора рабочего стандартного образца глюкозы измеряли в области максимума поглощения при длине волны 470 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно растворов сравнения 1 и 2.

Содержание восстанавливающих сахаров (X) в пересчете на глюкозу и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 20 \cdot 5 \cdot 250 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 5000}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность анализируемого и раствора;

A₀ - оптическая плотность раствора РСО глюкозы;

m - масса сырья, г;

m₀ - масса РСО глюкозы в пересчете на безводную глюкозу, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Примечание. Приготовление раствора рабочего стандартного образца (РСО) глюкозы. 0,15г (точная навеска) глюкозы растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем извлечения водой до метки, перемешивают.

Массу навески глюкозы в пересчете на безводную глюкозу в граммах (m₁) вычисляют по формуле:

$$m_0 = \frac{m \cdot (100 - W)}{100}, \text{ где } m - \text{масса навески глюкозы в граммах; } W - \text{влажность глюкозы в процентах.}$$

Раствор используют свежеприготовленным.

Количественное определение кумаринов проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на кумарин [86]. 0,1 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 200 мл

гексана и экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов. Жидкость декантировали, сырье высушивали на воздухе до исчезновения запаха гексана. Затем к сырью в колбе прибавляли 100 мл хлороформа, взвешивали, и присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1,5 часов. Колбу искусственно охлаждали и доводили до первоначального веса хлороформом. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 5 мл фильтрата помещали в мерную колбу на 25 мл, объем раствора доводили до метки хлороформом и измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 310 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали хлороформ.

Содержание кумаринов (X) в пересчете на кумарин и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{356 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

356 - удельный показатель поглощения кумарина в хлороформе;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Количественное определение *каротиноидов* проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на β-каротин [15]. 5,0 г измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 100 мл, добавляли 25 мл гексана. Экстракцию проводили при периодическом перемешивании в течение 1,5 часов. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр. 0,2 мл экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки гексаном. Определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали гексан. Параллельно определяли оптическую плотность раствора стандартного образца бихромата калия.

Содержание суммы каротиноидов (X) в пересчете на β -каротин и абсолютно сухое сырье в % вычисляли по формуле:

$$X = \frac{K \cdot 100 \cdot V \cdot A \cdot 100}{m \cdot 0,2 \cdot A_0 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

K - количество каротина в 1 мл стандартного раствора 0,00208 мг бихромата калия;

V - объем гексанового раствора каротиноидов, мл;

A - оптическая плотность исследуемого раствора;

A₀ - оптическая плотность раствора стандартного образца бихромата калия;

m – навеска сырья, г;

W- потеря в массе при высушивании сырья, %.

Примечание. Приготовление стандартного образца калия бихромата

0,360 г перекристаллизованного калия бихромата растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Определение содержания свободных *органических кислот* осуществляли титриметрическим методом по ГФ-Х1 (ч.2, с.295 «Плоды шиповника») [27].

Количественное определение *эфирного масла* проводили методом гидродистилляции по ГФ-Х1 (ч.1, статья «Определение содержание эфирного масла в лекарственном растительном сырье» метод 1).

Количественное определение *йода* проводили с помощью аналитического метода, основанного на катализируемой йодом окислительно-восстановительной реакции между роданид- и нитрит-ионом. В прошлифованную пробирку объемом 15–25 мл заливали 4 мл стандартного раствора с концентрацией йода 1–15 мкг/л или пробы с концентрацией йода 0,5–3,5 мкг/л, далее прибавляли 1,6 мл раствора хлорида железа, а затем 0,5 мл раствора роданида калия. Пробирку закрывали прошлифованной пробкой и несколько раз встряхивали. Затем к содержимому пробирки добавлялся 1 мл раствора нитрита натрия. Через 20 минут измерялась оптическая плотность раствора при $\lambda=454$ нм в кювете толщиной слоя 1 см относительно воды очищенной. «Холостой» опыт заключался в проведении

вышеизложенной операции с бидистиллированной водой, взятой в объеме 4 мл [87].

2.2.4. Методы исследования биологической активности

Оценка биологической активности 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 острой токсичности

Острую токсичность настоя листьев боярышника изучали на 24 белых беспородных мышах обоего пола массой 18-22 г при однократном пероральном способе введения, в дозах: 5000, 7500, 10000 мг/ кг. Каждую дозу исследовали на 6 животных.

О степени токсичности водного извлечения листьев боярышника кроваво-красного судили по изменению состояния животных (внешний вид, активность, поведенческая реакция, частота дыхания), наблюдение за которыми продолжалось в течение 14 дней. При работе с животными соблюдались Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1985). Параметры острой токсичности вычислялись по методу Литчфильда и Уилкоксона [8].

Исследование антиаритмической активности

Противоаритмическую активность изучали на экспериментальных моделях аритмий, вызванных химическими веществами аконитином и хлоридом кальция, в соответствии с методическими рекомендациями по экспериментальному (фармакологическому) изучению препаратов, предлагаемых для клинических испытаний в качестве средств для профилактики и лечения нарушений ритма сердца [40]. Опыты проводили на беспородных крысах массой 160-200 г. Исследуемый настой листьев боярышника вводили в желудок крысам по 0,6 мл на 200 г веса животного

через зонд. В качестве препарата сравнения использовали готовый фармакопейный препарат - настойку плодов боярышника (ОАО «Синтез»). Животных данной группы поили настойкой согласно инструкции по применению в пересчете на вес животного: по 0,5 мл из рабочего раствора (4 капли настойки в 10 мл воды). Контрольную группу животных поили водой.

Настойкой плодов и настоем листьев боярышника животных поили курсом в течение 14 дней, а также за 60 мин до воспроизведения аритмии. Критерием положительного эффекта было предотвращение аритмии, или изменения в ее продолжительности и выраженности, а также предотвращение или уменьшение количества случаев гибели от фибрилляции желудочков.

Электрокардиограмму (ЭКГ) регистрировали на протяжении всего опыта во II стандартном отведении с помощью электрокардиографа «Heart Mirror-1» (фирма «Innomed Medical Inc», Будапешт).

При работе с животными соблюдались Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных (1985) [60].

Исследование кардиопротективной активности

Влияние настоя листьев боярышника на биоэлектрическую проводимость сердца изучалось на серии опытов на крысах-самцах линии Вистар после профилактического приема (14 дней) и при экспериментальном адреналин-гипоксическом повреждении миокарда [59].

При профилактическом приеме электрокардиограммы снимали у животных в первый и четырнадцатый день эксперимента. Листья боярышника вводили перорально в виде настоя (1:10) ежедневно в дозе 0,3 г сырья на кг массы тела животного [27]. Анализ электрокардиограмм проводили во II стандартном отведении. Влияние экстракта определяли по изменениям положения сегментов QT, TP, QRS и вольтажа зубцов. При обработке полученных данных обращали внимание на изменение частоты сердечных сокращений, продолжительность интервалов и вольтаж зубцов, а

также на изменение систолического показателя. Достоверность различий между выборками определялась по непараметрическому U-критерию Манна – Уитни [17].

Определение антиоксидантной активности

Антиоксидантную активность листьев боярышника изучали с использованием двух методов:

1. Оценка антиоксидантной активности по способности ингибировать аутоокисление адреналина (*in vitro*) [64].

К 2 мл бикарбонатного буфера (рН=10,65) добавляли 0,1 % раствор адреналина гидрохлорида в количестве 0,1 мл и через 20 мин определяли оптическую плотность в кювете толщиной 10 мм при длине волны 347 нм на спектрофотометре СФ-46 (A_1). Затем к 2 мл бикарбонатного буфера добавляли 0,01 мл исследуемого извлечения и 0,1 мл 0,1 % раствора адреналина гидрохлорида и определяют оптическую плотность через 20 мин при длине волны 347 нм в кювете толщиной 10 мм на спектрофотометре СФ-46 (A_2).

Показатель антиоксидантной активности рассчитывали по формуле:

$$\hat{A} \hat{A} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

A_1 – оптическая плотность пробы в отсутствии экстракта;

A_2 – оптическая плотность пробы в присутствии экстракта.

При расчете антиоксидантной активности учитывали, что водные извлечения имеют собственную окраску, которая способна поглощать в видимой области спектра определенную длину волны.

2. Определение антиоксидантной активности методом хемиллюминесценции [72]. Водные извлечения из листьев боярышника готовили по методике ГФ XI издания (соотношение 1:10) [26].

Водные извлечения (от 0,01 до 0,5 мл) вносили в различные модельные системы, в которых генерировалось образование активных форм кислорода

(АФК) и протекали реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), как наиболее распространенные процессы свободно-радикального окисления.

В качестве первой модельной системы использовали 20 мл фосфатного буфера с добавлением цитрата натрия и люминола (рН=7,5). В качестве инициатора окисления добавляли 1 мл 50 мМ раствора железа (II) сульфата. Окисление солей железа приводит к появлению кислородных радикалов и сопровождается хемилюминесценцией, усиливающейся в присутствии люминола. Регистрацию свечения проводили в течение 5 минут.

В качестве второй модели для оценки действия препаратов на ПОЛ из куриного желтка готовили липопротеиновые комплексы, сходные с липидами крови. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5 и гомогенизировали. Хемилюминесценцию инициировали добавлением 1 мл 50мМ раствора сернокислого железа, запускающего процесс окисления ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов.

Контролем служили модельные системы без добавления исследуемого сырья. Регистрацию свечения проводили на приборе «ХЛМ-003». Антиокислительную активность оценивали по снижению интенсивности свечения.

2.2.5. Методы статистической обработки результатов исследований

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с применением программ «Excel 7.0», «Statistica 5.0», «Statistica 6.0». Для отрицания «нулевой» гипотезы использовали U-тест Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при $P < 0,05$ [17]. Достоверность различий между выборками определялась по непараметрическому U-критерию Манна - Уитни.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (*CRATAEGUSSANGUINEA*PALL.)

Одними из разделов фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье являются «Внешние признаки» и «Микроскопия» (ОСТ 91500.05.001-00). Следовательно, для разработки нормативной документации на листья боярышника кроваво-красного необходимо установить морфолого-анатомические признаки изучаемого сырья.

3.1. Морфологическое исследование листьев боярышника кроваво-красного

При исследовании внешних признаков листьев боярышника кроваво-красного было установлено, что листья очередные, с прилистниками или без них, простые, короткочерешковые, длиной 2-6 см, шириной 2-8 см, яйцевидные с ширококлиновидным основанием, более или менее глубоко-лопастные с крупнозубчатым краем. Жилкование перисто-краевое. Жилки зеленые, выдаются с нижней стороны листа. Цвет листьев зеленый с верхней стороны и светло-зеленый - с нижней (рис. 3.1.1). В месте прикрепления черешка по два прилистника несимметричной серповидной формы, с мелкопильчатым краем, цвет прилистников - зеленый с верхней стороны, и светло-зеленый с нижней. Жилкование прилистников перисто-краевое (рис.3.1.2). Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.



Рис.3.1.1. Внешний вид листа боярышника кроваво-красного (А – верхняя сторона листа, Б – нижняя сторона листа)



Рис.3.1.2. Внешний вид прилистников листа боярышника кроваво-красного

3.2. Анатомическое исследование листьев боярышника кроваво-красного

Микроскопический анализ проводили на микровизоре MVZ-103, предварительно подготовив временные микропрепараты листа и прилистника с поверхности, поперечные срезы листовой пластинки и черешка (по методике ГФ XI).

В ходе микроскопического анализа были установлены анатомо-диагностические признаки исследуемого сырья. Так при микроскопии листьев с поверхности были установлены следующие микродиагностические признаки: клетки верхнего эпидермиса - многоугольные, прямостенные, с четковидными утолщениями (рис. 3.2.2); нижнего – с извилистыми стенками (рис. 3.2.1). Кутикула на обеих сторонах образует складки (рис. 3.2.1, 3.2.2). Устьица крупные, многочисленные, располагаются на нижней стороне листа, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) (рис. 3.2.1). На обеих сторонах листа встречаются многочисленные волоски - простые одноклеточные, толстостенные, с основанием, погруженным в эпидермис (рис. 3.2.1, 3.2.2). На нижней стороне листа волоски располагаются преимущественно по жилкам (рис.3.2.1). В месте прикрепления волоска эпидермис образует розетку из 5-7 округлых клеток, окрашенных в бурый цвет (эфирное масло) (рис. 3.2.1, 3.2.2). 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 (рис. 3.2.1). На верхушке листовой пластинки и сегментах – многоклеточные железки с бурым содержимым (рис.3.2.3). По краю листовой пластинки – редкие простые, длинные, одноклеточные, толстостенные волоски, у основания листа – многочисленные (рис.3.2.4).

При исследовании поперечного среза листовой пластинки было установлено, что лист имеет дорсовентральное строение (рис.3.2.5).

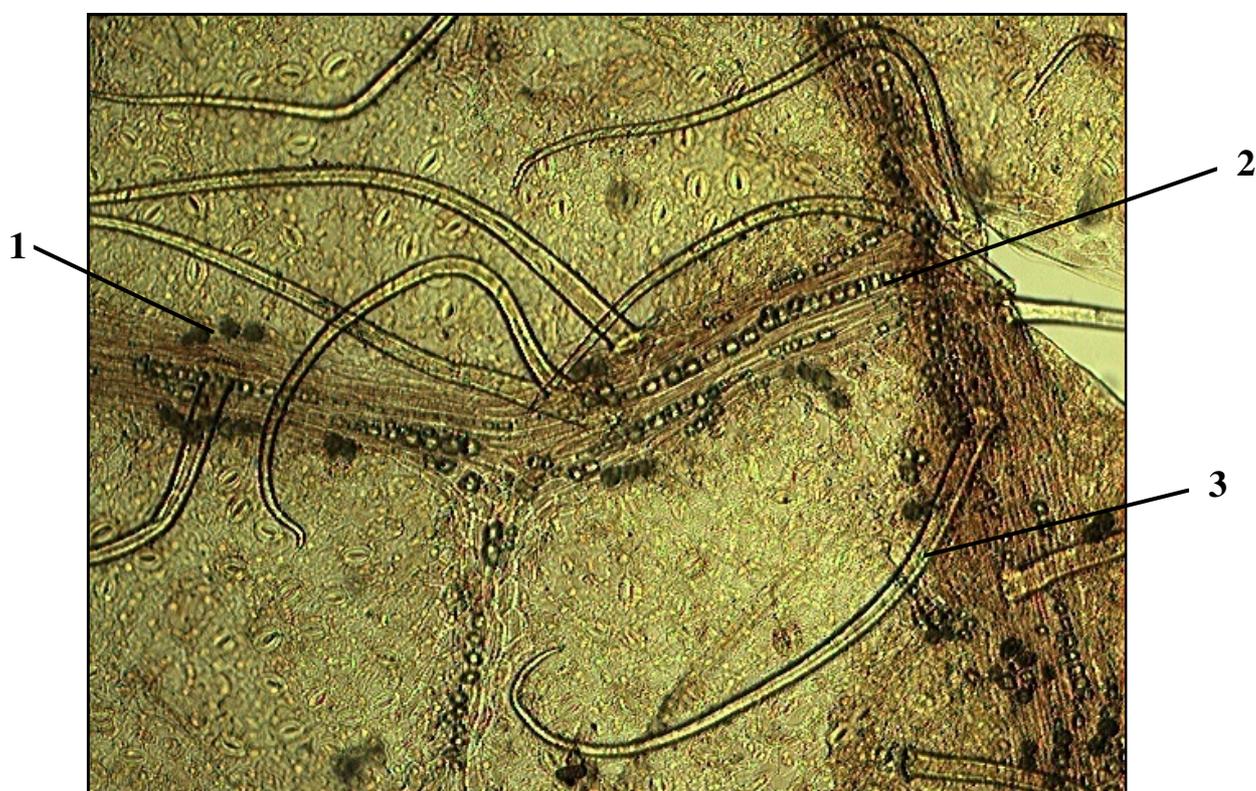
При рассмотрении поперечного сечения черешка листа боярышника (рис. 3.2.16) можно увидеть, что в черешке под эпидермисом наружной стороны находится два ряда уголкового колленхимы, в паренхиме располагается один коллатеральный пучок серповидной формы, и на эпидермисе внутренней стороны встречаются простые одноклеточные волоски (рис. 3.2.16).

При микроскопическом исследовании прилистников с поверхности обнаружены следующие анатомо-диагностические признаки: клетки верхнего и нижнего эпидермиса - многоугольные, со слабоизвилистой стенкой, с четковидными утолщениями (рис. 3.2.11, 3.2.12). Кутикула на обеих сторонах образует складки (рис. 3.2.11), наиболее интенсивно складки образуются вокруг устьиц (рис. 3.2.14). Устьица крупные, многочисленные, располагаются на нижней стороне прилистника небольшими группами, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) (рис. 3.2.14). Очень редко на верхней стороне прилистников встречаются простые одноклеточные, толстостенные волоски, с основанием, погруженным в эпидермис (рис. 3.2.10). В мезофилле прилистника и вдоль жилок встречаются крупные друзы (рис. 3.2.10) и кристаллы оксалата кальция (кубические и цилиндрические) в виде кристаллоносной обкладки жилок (рис. 3.2.13). На верхушке прилистника и по краю – многочисленные железки (многоклеточная головка на многоклеточной ножке) с бурым содержимым (рис. 3.2.6, 3.2.7, 3.2.8). Такие железки очень редко встречаются на

поверхности эпидермиса прилистников (рис. 3.2.9). Жилки прилистника окрашиваются суданом III в розовый цвет (рис. 3.2.13, 3.2.15).

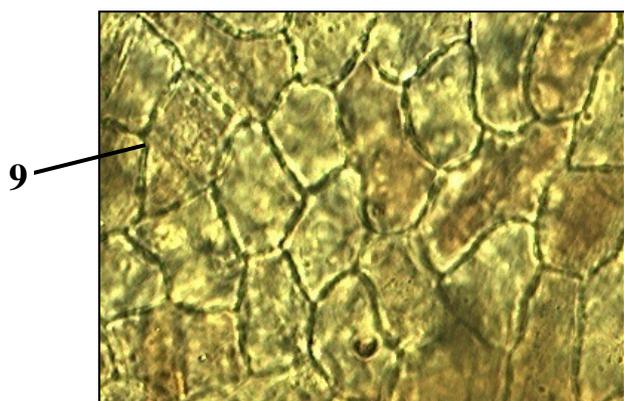
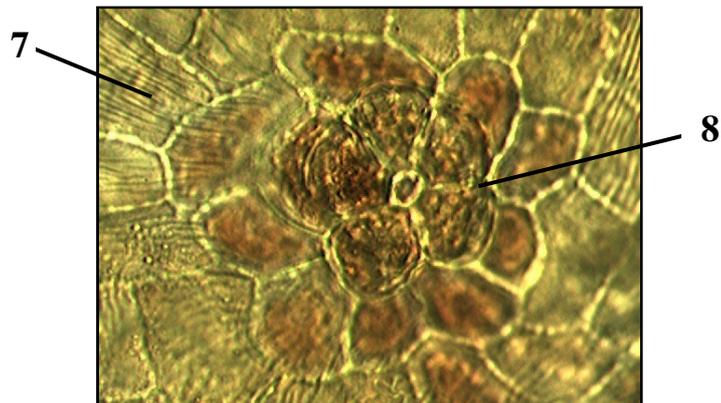
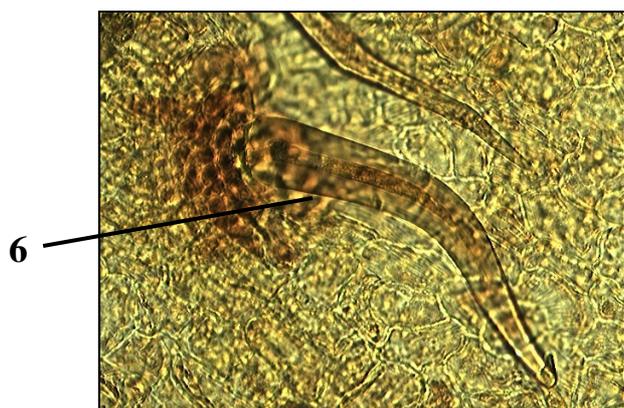
При проведении микроскопического анализа для разработки показателя ДЗП в качестве диагностически значимых учитывали следующие анатомо-диагностические признаки листьев боярышника (глава 2.2.1.):

- простые волоски одноклеточные;
- погруженные устьица аномоцитного типа;
- клетки верхнего эпидермиса со складчатой кутикулой;
- основание волоска с розеткой клеток.



- 1- Друзы оксалата кальция
- 2- Кристаллоносная обкладка жилки листа
- 3- Простые одноклеточные волоски
- 4- Устьица аномоцитного типа
- 5- Складчатость кутикулы на нижней стороне листа

Рис.3.2.1. Эпидермис нижней стороны листа боярышника кроваво-красного



- 6 – простой одноклеточный
волосок верхнего эпидермиса
7 – складчатость кутикулы верхней
стороны листа
8 – основание волоска
9 – четковидные утолщения

Рис.3.2.2. Эпидермис верхней стороны листа боярышника кроваво-красного

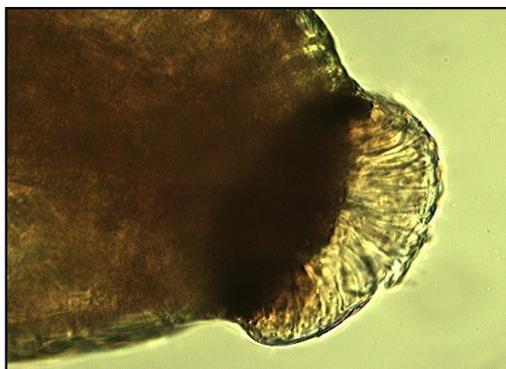


Рис.3.2.3. Многоклеточная железа на верхушке зубца листа боярышника кроваво-красного

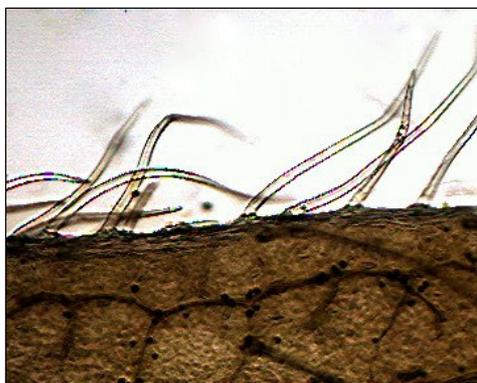


Рис.3.2.4. Край листовой пластинки
(в основании листа)



Рис.3.2.5. Поперечный срез
листовой пластинки



Рис. 3.2.6. Прилистник листа боярышника кроваво-красного



Рис. 3.2.7. Железка на краю прилистника (многоклеточная головка на многоклеточной ножке)



Рис. 3.2.8. Поверхность головки железки

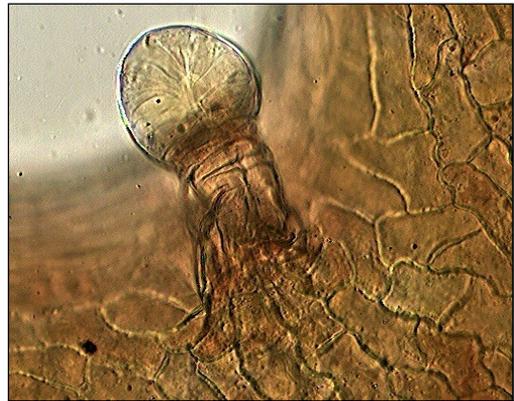


Рис. 3.2.9. Железка на поверхности эпидермиса прилистника

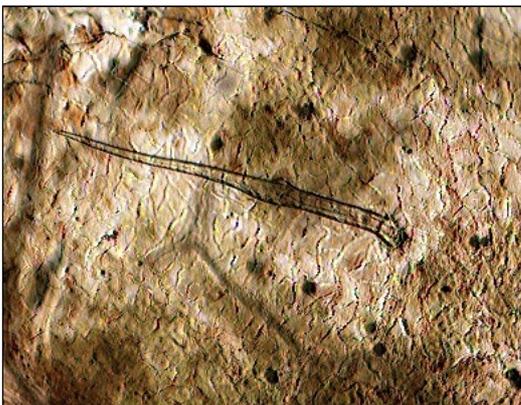


Рис. 3.2.10. Одноклеточный простой волосок на верхней стороне прилистника



Рис. 3.2.11. Эпидермис верхней стороны прилистника (складчатость кутикулы)

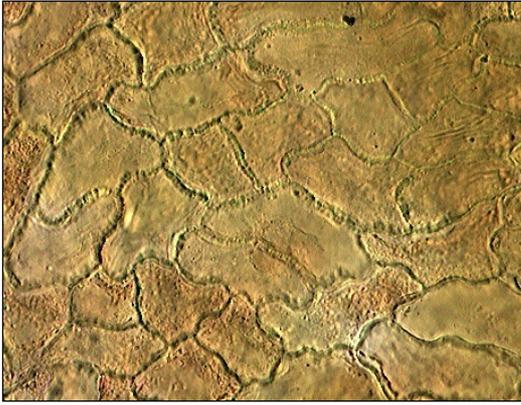


Рис. 3.2.12. Эпидермис верхней стороны прилистника (четковидные утолщения)

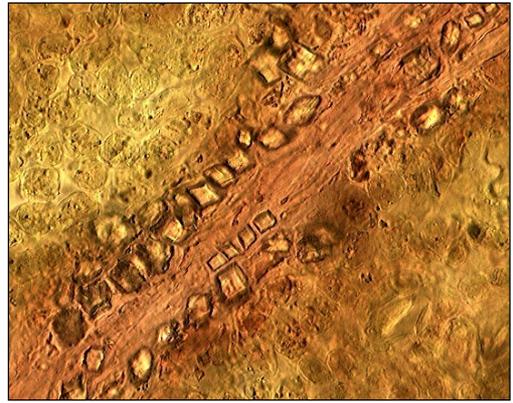


Рис. 3.2.13. Жилка прилистника, окрашенная суданом III (эфирное масло) и кристаллоносная обкладка жилки



Рис. 3.2.14. Устьица на нижней стороне прилистника

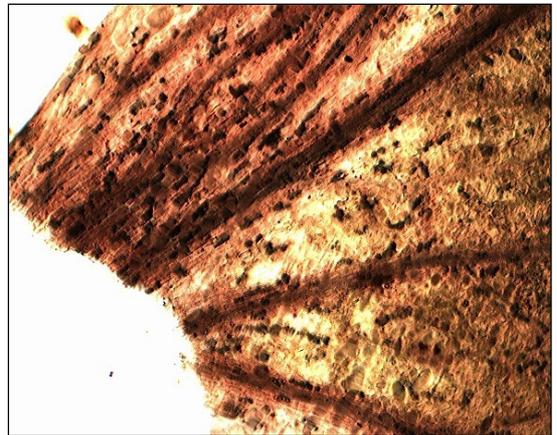


Рис. 3.2.15. Основание прилистника

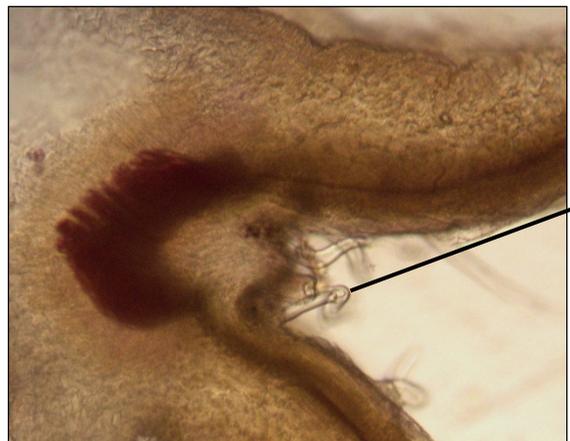
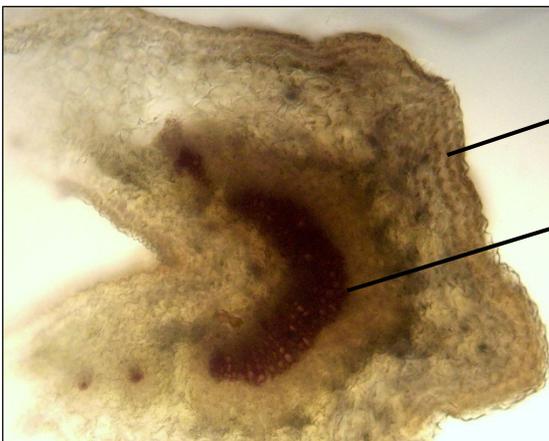


Рис.3.2.16. Поперечный срез черешка

10 – колленхима

11 – проводящий пучок

12 - простые волоски на внутренней поверхности

Среднее значение количества диагностически значимых частиц листьев составило $39,44 \pm 3,85\%$ (табл.3.2.1).

Таблица 3.2.1.

Метрологическая характеристика методики определения диагностически значимых признаков листьев боярышника кроваво-красного

n	X_{cp}	S_x	E_a	$\varepsilon\%$	$X_{cp} \pm \varepsilon_a$
15	39,44	1,79	3,85	9,76	$39,44 \pm 3,85$

3.3. Анатомическое исследование измельченных листьев боярышника кроваво-красного

Анализ измельченного сырья проводили согласно методике ГФ XI издания, предварительно разделив его на фракции ситовым методом. Самая мелкая фракция – прошедшая сквозь сито диаметром 1 мм, средняя – прошедшая сквозь сито 3 мм, крупная – прошедшая сквозь сито 5 мм. Фракции были примерно однородны по составу. Наиболее содержательной по наличию диагностических признаков была мелкая фракция (<1 мм). При микроскопическом анализе измельченного сырья были обнаружены практически все диагностические признаки, установленные при микроскопии цельного сырья.

При просматривании препарата порошка листьев боярышника кроваво-красного встречались фрагменты эпидермиса верхней и нижней стороны листа (рис. 3.3.1, 3.3.5), фрагменты жилок листа, сопровождающихся простыми толстостенными одноклеточными волосками (рис. 3.3.1), фрагменты края листовой пластинки с простыми одноклеточными волосками по краю (рис. 3.3.3), фрагменты верхушки сегментов листа с многоклеточной железкой (рис. 3.3.2), фрагменты эпидермиса с розеткой из 5-7 клеток в основании волоска (рис. 3.3.6). Практически на всех фрагментах присутствуют друзы оксалата кальция, чаще всего вдоль жилок листа (рис. 3.3.1, 3.3.3). Тип устьичного аппарата в измельченном сырье возможно установить при наличии очень тонких обрывков нижнего эпидермиса (рис. 3.3.5). Также встречаются тонкие поперечные обрывки листа, при просматривании которых хорошо различимы столбчатый и губчатый мезофилл, проводящие элементы и друзы оксалата кальция (рис. 3.3.7). Реже встречаются обрывки прилистников, которые можно отличить от обрывков листа по наличию многоклеточных железок с бурым содержимым на многоклеточной ножке по краю прилистника и на поверхности его эпидермиса (рис. 3.3.4).

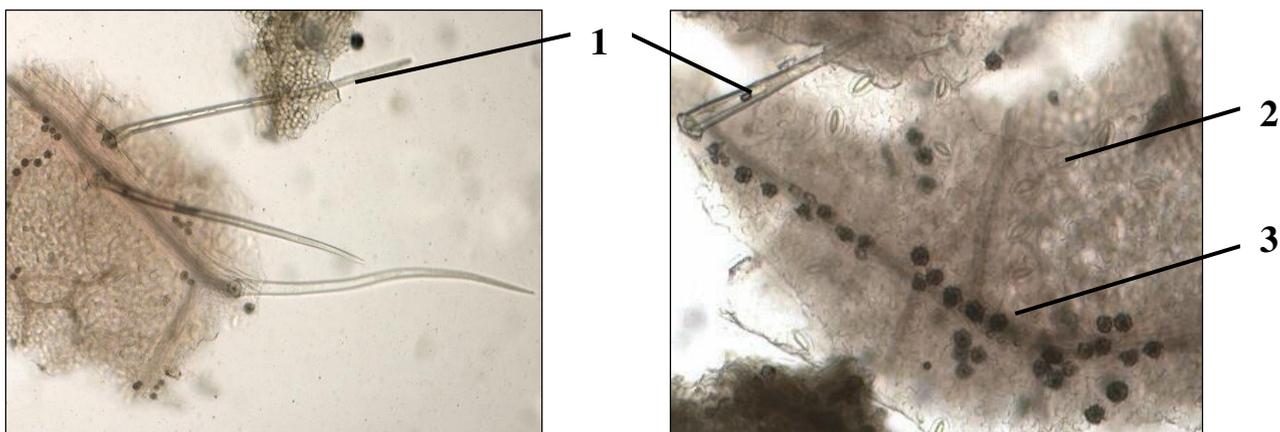


Рис. 3.3.1. Фрагменты листа (1 – простые одноклеточные волоски, 2 – устьица, 3 - друзы оксалата кальция вдоль жилки)



Рис.3.3.2. Фрагменты верхушки сегмента листа (4 - многоклеточная железка)

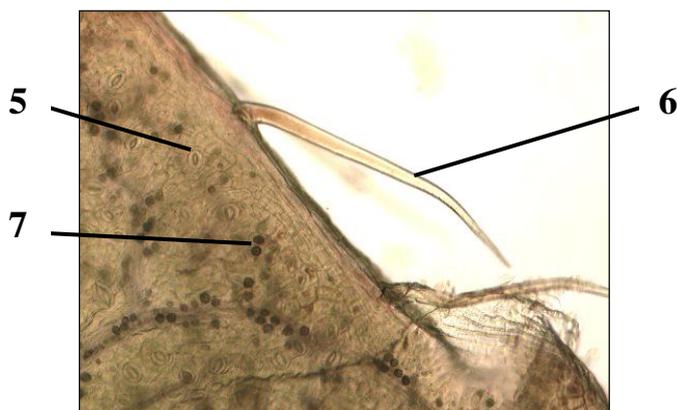
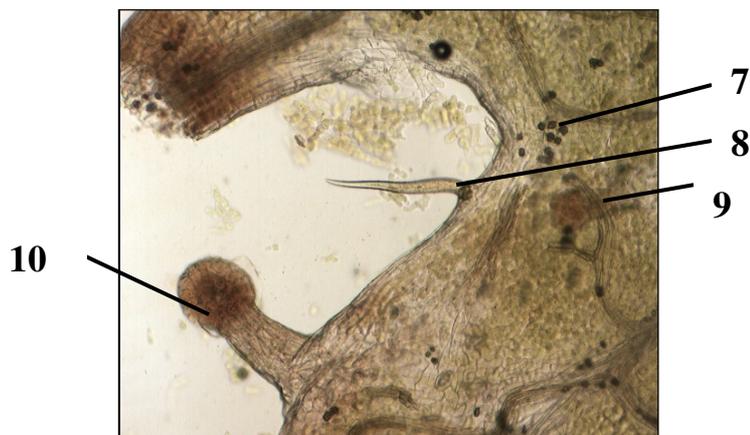


Рис. 3.3.3. Фрагмент края листовой пластинки (5 - устьица на нижней стороне, 6 - простые одноклеточные волоски по краю)



7 – друзы оксалата кальция
8 – простой одноклеточный волосок
9 – железка на поверхности прилистника (многоклеточная головка на многоклеточной ножке)
10 – железка по краю прилистника

Рис. 3.3.4. Фрагмент прилистника листа боярышника кроваво-красного



Рис. 3.3.5. Фрагмент эпидермиса нижней стороны листа (2 – устьице, 11 - складчатость кутикулы)



Рис. 3.3.6. Фрагмент эпидермиса листа (12 - розетка клеток в основании волоска)



Рис. 3.3.7. Фрагмент листа (поперечный)

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3:

1. Проведено морфологическое исследование листьев и прилистников боярышника кроваво-красного. Уточнены морфологические особенности листьев боярышника кроваво-красного, а описание прилистников проводится впервые. В литературе имеются разрозненные сведения о морфологическом строении листьев боярышника кроваво-красного. Так, согласно литературным данным, листья боярышника кроваво-красного обратно-яйцевидные с клиновидным основанием, край листа – остро-пильчатый, а согласно полученным экспериментальным данным – листья яйцевидные с крупно-зубчатым краем с ширококлиновидным основанием.
2. Проведено микроскопическое исследование листьев боярышника, выявлены новые диагностические признаки. Обнаружены четковидные утолщения клеток эпидермиса верхней стороны листа. Установлено, что волоски прикрепляются в центре розетки из 5-7 клеток. Розетка клеток, а также окружающие ее клетки эпидермы окрашены в бурый цвет (эфирное масло). Призматические кристаллы оксалата кальция образуют кристаллоносную обкладку. Анатомические признаки черешка и прилистников установлены впервые.
3. Микроскопический анализ листьев боярышника кроваво-красного предложен не только как качественная характеристика, но также и для количественной оценки диагностически значимых признаков (ДЗП).

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (*CRATAEGUS SANGUINEA* PALL.)

Для внедрения в практическую медицину нового вида лекарственного растительного сырья, помимо доклинических и клинических испытаний, необходимо провести исследования, позволяющие разработать для них нормативы качества. Соответствие лекарственного растительного сырья требованиям нормативной документации является основой их эффективности и безопасности. Решить данную проблему возможно путем детального изучения химического состава лекарственного растительного сырья.

4.1. Исследование химического состава листьев боярышника кроваво-красного

4.1.1. Качественные реакции

В результате проведения качественных реакций (гл. II, п. 2.2.3.1), в водном извлечении листьев боярышника были обнаружены следующие группы БАВ: агликаны и гликозиды флавоноидов (флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванололы, антоцианы); аскорбиновая кислота; дубильные вещества (конденсированные); сапонины (тритерпеновые); органические кислоты; полисахариды; кумарины (табл. 4.1.1.1.).

Таблица 4.1.1.1.

Качественный анализ листьев боярышника кроваво-красного

Группа БАВ	Качественная реакция (реагент)	Ожидаемый аналитический эффект	Результат реакции (+) или (-)
Флавоноиды	Цианидиновая проба	Красное, красно-оранжевое окрашивание	+
	2% спиртовой раствор алюминия хлорида	Желтое окрашивание	+
	10% спиртовой раствор калия гидроксида.	Желтое окрашивание	+
	1% спиртового	Красновато-бурое	+

	раствора железа хлорида	окрашивание	
Сапонины	Реакция пенообразования	Образование пены в пробирке с извлечением	+
	Реакция Лафона	Сине-зеленое окрашивание	+
	Реакция осаждения раствором ацетата свинца	Осадок	+
Кумарины	Лактонная проба.	Желтое окрашивание => помутнение раствора и выпадение осадка	+
	Диазореакция	Вишневое или кроваво-красное окрашивание	+
Дубильные вещества: -гидролизуемые -конденсированные	Раствор железоммонийных квасцов	-Черно-синее окрашивание или осадок	-
		-Черно-зеленое окрашивание или осадок	+
Полисахариды	Реакция осаждения этиловым спиртом 95%	Хлопьевидные сгустки =>осадок	+
	Реактив Фелинга	Осадок красно-оранжевого цвета	+
	Раствор меди сульфата	Синее окрашивание	+
Алкалоиды	Раствор танина	Осадок	-
	Пикриновая кислота	Желтый осадок	-
	Реактив Зонненштейна	Желтоватый осадок	-
Хромоны	Кислота серная конц.	Лимонно-желтое окрашивание	-
	Концентрированные щелочи	Пурпурно-красное окрашивание	-
Антрагликозиды	Реакция Борнтрегера	Окраска аммиачного слоя	
1,8-диоксиантрахиноны		- вишнево-красная	-
1,4- диоксиантрахиноны		- пурпурная	-
1,2- диоксиантрахиноны		- фиолетовая	-

4.1.2. Изучение фенольных соединений листьев боярышника кроваво-красного

Методом ТСХ анализировали извлечения сырья, полученные 95% и 80% этиловым спиртом в соотношении 1:10. Наилучшее разделение было достигнуто при использовании следующих систем растворителей: 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).

Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами (гл. II, п. 2.2.4.).

В исследуемых извлечениях на всех хроматограммах проявляется около 7 пятен. Исходя из хроматографического поведения (свечение в УФ-свете, цвет пятен до и после окраски хромогенными реактивами), обнаруженные вещества относятся к соединениям фенольной природы. Сравнение с аутентичными образцами позволило предположить наличие рутина, гиперозида и хлорогеновой кислоты (подтверждено в присутствии свидетелей) (рис.4.1.2.1).

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 (рис. 4.1.2.2, 4.1.2.3, 4.1.2.4).

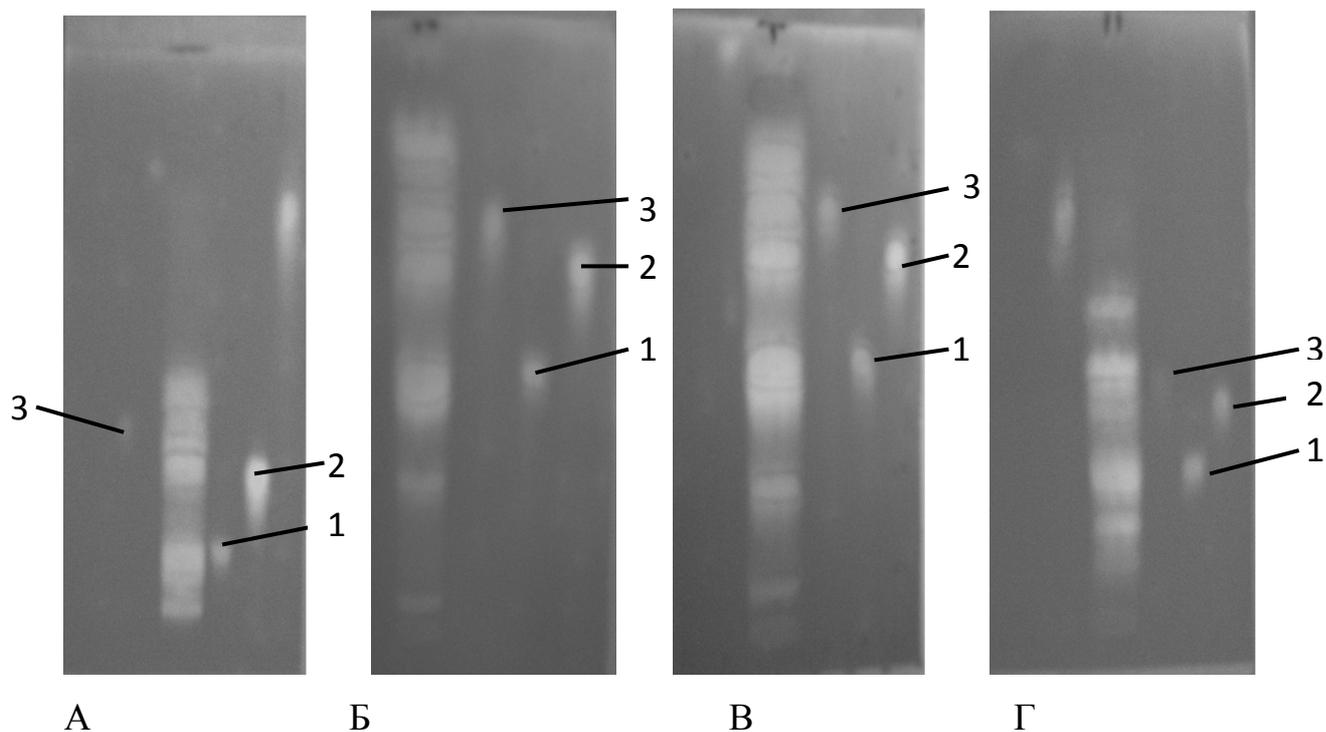


Рис. 4.1.2.1. Фотографии хроматограмм в системах: А - муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота - вода - метанол - ацетон - хлороформ (6:6:7,5:12,5:30:60), Б - этилацетат - муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота - вода (100:11:11:26), В - этилацетат - муравьиная кислота - вода (14:3:3), Г - хлороформ - ледяная уксусная кислота - метанол - вода (15:8:3:2) (1-рутин, 2-гиперозид, 3-хлорогеновая кислота)

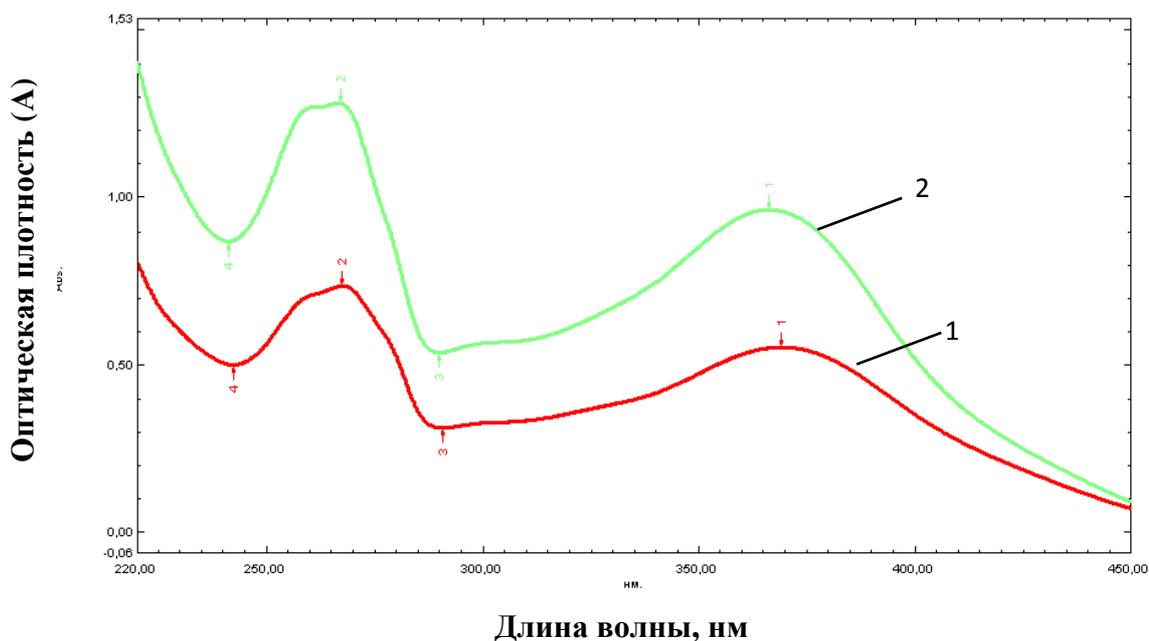


Рис. 4.1.2.2. Спектры поглощения вещества 1 с хроматограмм (1) и РСО рутина (2).

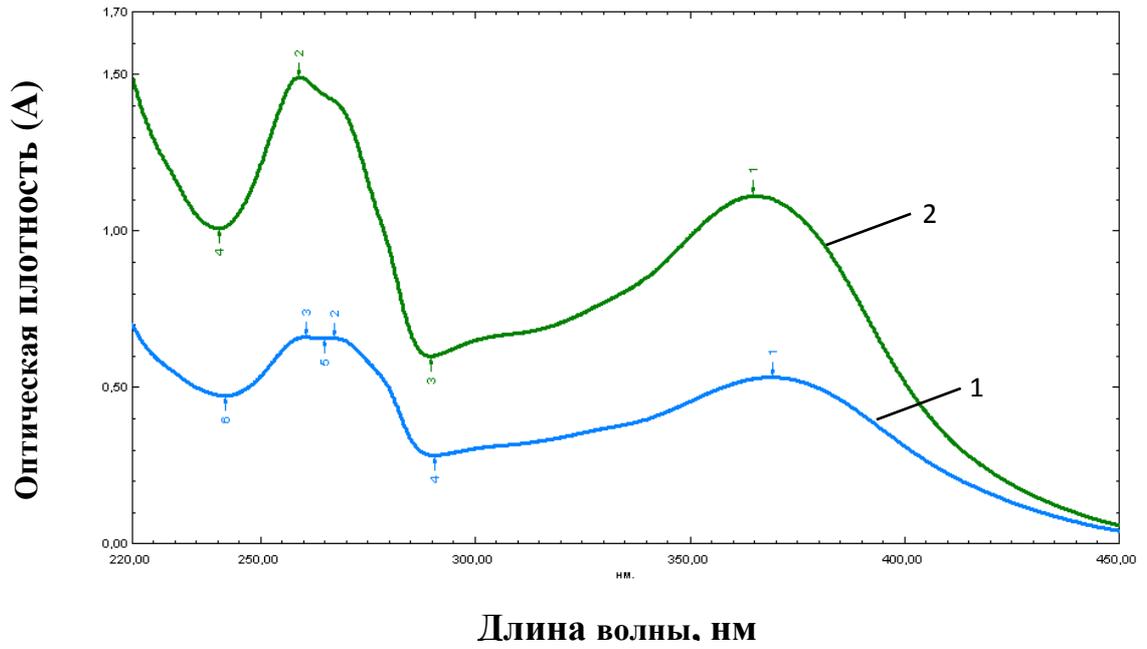


Рис. 4.1.2.3. Спектры поглощения вещества 2 с хроматограмм (1) и РСО гиперозида (2).

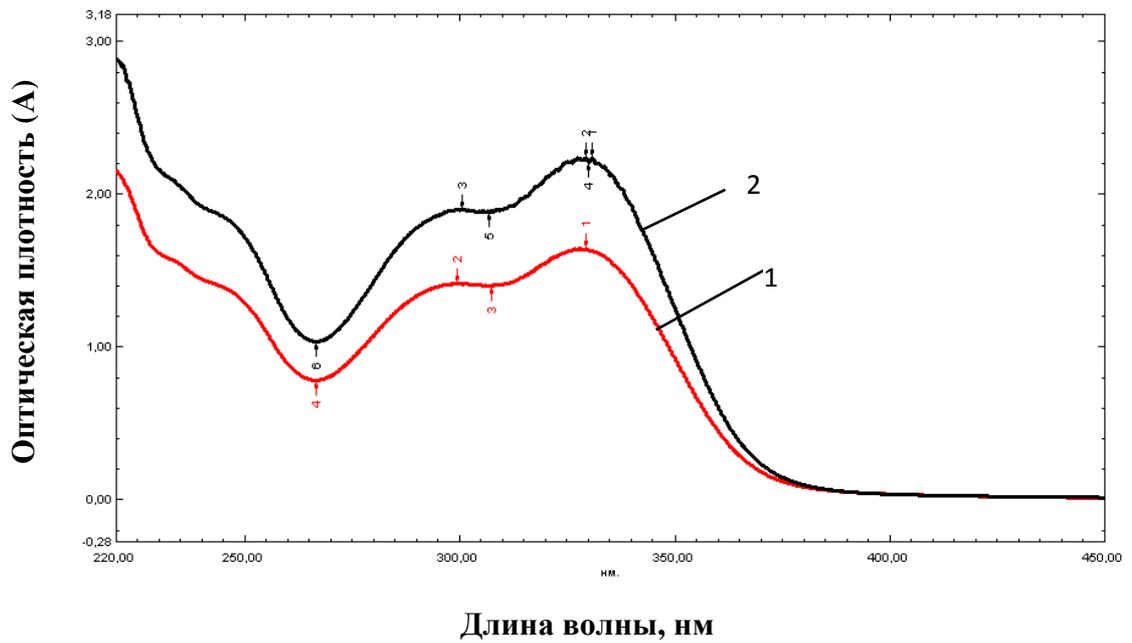


Рис. 4.1.2.4. Спектры поглощения вещества 3 с хроматограмм (1) и РСО хлорогеновой кислоты (2).

Анализ суммы флавоноидов листьев боярышника кроваво-красного проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в хроматографической системе WatersBreeze (Waters, США) со спектрофотометрическим детектором (глава II, п.2.2.4).

При проведении анализа было обнаружено 18 соединений (рис. 4.1.2.5.), из которых идентифицированы при сопоставлении времен удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов с временами удерживания пиков стандартных образцов и УФ-спектрами следующие флавоноиды: флавонолгликозид рутин, а также агликаны: байкалеин, физетин, дигидрокверцетин, кверцетин.

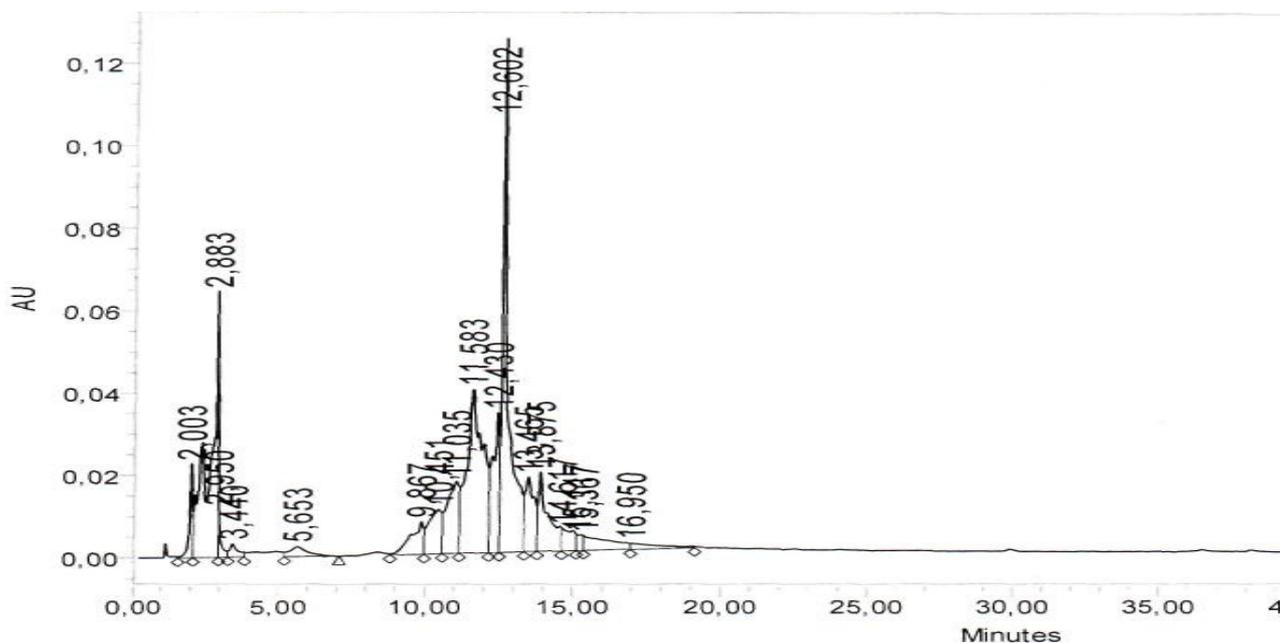


Рис. 4.1.2.5. Хроматограмма экстракта из листьев *C. sanguinea* (11,035 – байкалеин, 12,430 – рутин, 12,602 – физетин, 13,465 – дигидрокверцетин, 16,950 – кверцетин).

Для обнаруженных флавоноидов проведена количественная оценка. Оказалось, что доминирующим флавоноидом является рутин (2,75%) и в порядке убывания содержания расположились дигидрокверцетин (1,07%), байкалеин (0,82%), физетин (0,8%), кверцетин (0,26%) [84].

Исследование извлечений, полученных с использованием 95 % этилового спирта, 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 (глава II, п.2.2.4) (рис.4.1.2.6).

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 (табл.4.1.2.2).

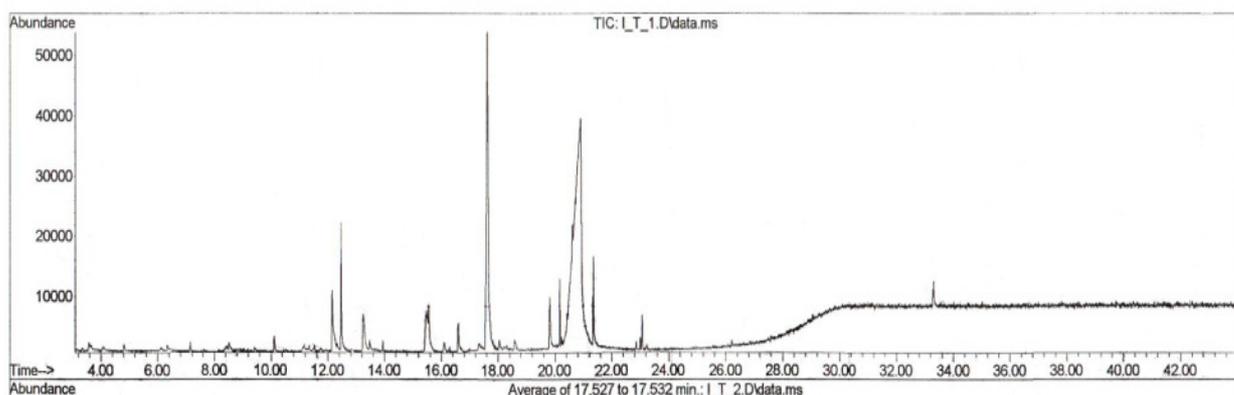


Рис. 4.1.2.6. ГХ/МС-хроматограмма экстракта листьев боярышника кроваво-красного

Таблица 4.1.2.2.

Результаты хромото-масс-спектрометрического анализа листьев боярышника кроваво-красного

Соединение	Время удерживания, мин	Степень совпадения с библиотечным масс-спектром, %
2,3-дигидро-бензофуран (кумаран)	12,472	80
1,4 – бензендиол (α -гидрохинон)	13,245	86
1,2 – бензендиол (пирокатехин)	12,151	87
1,3,4,5 – тетрагидрокси-циклогексанкарбоновая кислота (хинная)	17,613	91

кислота)		
----------	--	--

Таким образом, в листьях боярышника кроваво-красного с использованием различных хроматографических методов и способов детектирования обнаружены следующие соединения фенольной природы: рутин, гиперозид, байкалеин, физетин, дигидрокверцетин, кверцетин, кумаран, α -гидрохинон, пирокатехин, хлорогеновая и хинная кислоты.

4.1.3. Исследование химического состава эфирного масла из листьев боярышника кроваво-красного

Эфирное масло получали методом перегонки с водяным паром (метод 1) по методике ГФ XI. Оно представляло собой густую малоподвижную жидкость с характерным запахом, желто-зеленого цвета. При хромато-масс-спектрометрическом исследовании образцов эфирного масла листьев боярышника выявлено 44 соединения, из них идентифицировано 18. (рис.4.1.3.1). Результаты их идентификации приведены в табл. 4.1.3.1.

Как видно из таблицы, основными компонентами эфирного масла листьев *Crataegus sanguinea* Pall., 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%).

Суммарная доля базовых компонентов в масле составила 37.5%. Масло также содержит 9 компонентов с концентрациями выше 1%, что от общего числа компонентов составляет 17.16% [83].

Таблица 4.1.3.1

Компонентный состав эфирного масла боярышника кроваво-красного

№	Вещество	R _t , мин	Содержание, %
1.	2,4-декадиеналь (E, E)	8.20	0.59
2.	4-(2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-ил)-3-бутен-2-он	9.57	1.02
3.	α -Фарнезен	9.70	2.01
4.	Додекановая кислота	10.14	0.89
5.	3,7,11-триметил-1,6,10-додекатриен	10.27	0.60

6.	Ледол	10.79	7.17
7.	1,2,3,4,4a,5,6,7-октагидро-4a,8-тетраметил-2-нафталинметанол	11.25	1.85
8.	α -Кадинол	11.49	1.87
9.	1-этилиденоктагидро-7a-метил-1H-инден	11.56	8.34
10.	Тетрадекановая кислота	12.46	1.88
11.	Изопропил миристат	13.38	0.83
12.	6,10,14-триметил-2-пентадеканон	13.67	2.43
13.	Метилвый эфир гексадекановой кислоты	14.90	1.27
14.	H-гексадекановая кислота	15.51	9.64
15.	Этиловый эфир гексадекановой кислоты	15.97	1.38
16.	3,7,11,15-тетраметил-1,6,10,14-гексатетраен-3-ол	16.53	1.89
17.	Фитол	17.89	12.35
18.	9,12,15-октадекатриеновая кислота	18.33	1.56

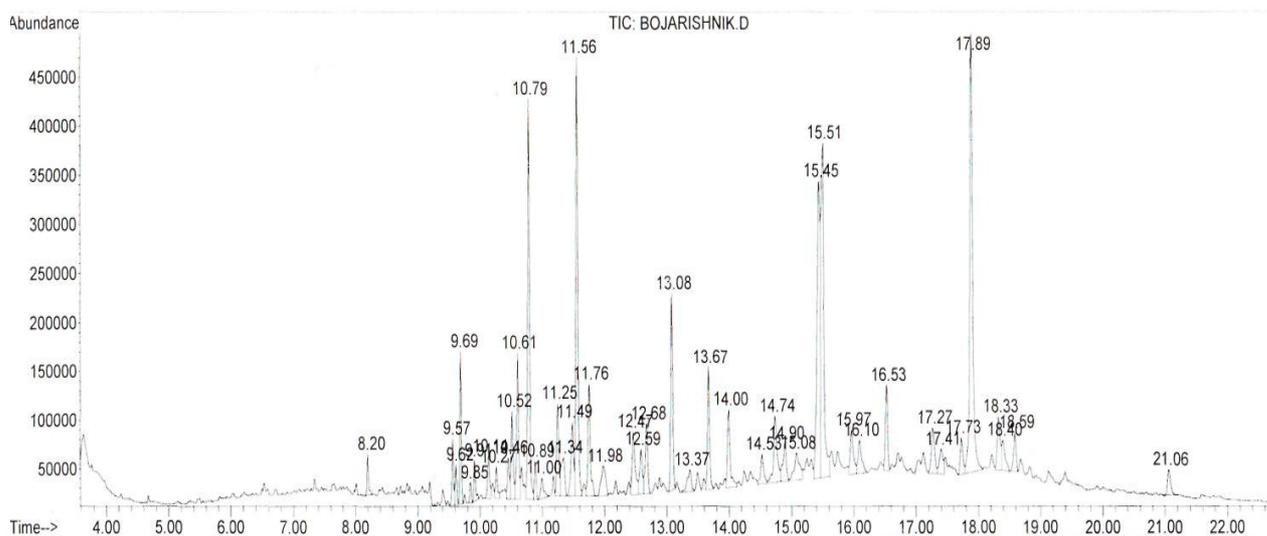


Рис.4.1.3.1 . Хроматограмма эфирного масла боярышника кроваво-красного.

4.1.4. Изучение химического состава полисахаридного комплекса листьев боярышника кроваво-красного

Одной из групп БАВ, которая практически не изучалась в боярышниках, являются полисахариды. При приготовлении водных извлечений из листьев боярышника кроваво-красного оказалось, что настой представляет собой опалесцирующую слизистую жидкость, плохо фильтрующуюся, что косвенно доказывает наличие большого количества полисахаридов. С целью установления состава полисахаридного комплекса

осуществляли последовательное фракционное выделение полисахаридов по методике, разработанной Н.К. Кочетковым (глава II, п.2.2.3.). Полисахаридные комплексы из листьев боярышника были разделены на фракции, содержащие водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, гемицеллюлозу. Затем был проведен кислотный гидролиз для исследования моносахаридного состава.

ВРПС, выделенный из листьев боярышника, представлял собой аморфный порошок светло-коричневого цвета, при растворении в воде образующий опалесцирующий раствор (рН 1% водных растворов находится в пределах 5-6); растворялся также в водных растворах кислот и щелочей и не растворялся в органических растворителях. Полисахаридный комплекс давал положительные реакции осаждения со спиртом, ацетоном, реакцию с реактивом Феллинга после кислотного расщепления полисахаридов. Выход ВРПС составил в среднем 1,65% от воздушно-сухого сырья.

ПВ представляли собой аморфный порошок светло-серого цвета, хорошо растворимый в воде с образованием вязкого раствора (рН 1% водного раствора находится в пределах 3-4). Водный раствор пектиновых веществ осаждался 1% раствором алюминия сульфата с образованием пектатов. Выход ПВ составил в среднем 12 % от воздушно-сухого сырья.

Гемицеллюлозы (ГЦ А и ГЦ Б) представляли собой аморфный порошок желтовато-коричневого цвета, хорошо растворимый в воде и щелочи. Выход ГЦ А составил в среднем 2,2% от воздушно-сухого сырья, а ГЦ Б – 1,5 %.

Исследование мономерного состава полимерного соединения дает информацию, из каких субъединиц построена его макромолекула. Поэтому для установления моносахаридного состава ВРПС, ПВ, ГЦ проводили их гидролиз раствором кислоты серной (1 моль/л) при температуре 100 °С. ВРПС гидролизовали в течение 6 часов, ПВ-24 часа, ГЦ-72 часа [80].

Моносахариды определяли в гидролизатах методом хроматографии на бумаге в системе растворителей этилацетат - уксусная кислота - муравьиная кислота - вода (18:3:1:4) и в тонком слое сорбента (ТСХ) на пластинке

«Silufol UV- 254» в системе растворителей бутанол – ацетон – вода (4:5:1) 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.

Использование ТСХ позволило установить во всех исследуемых образцах присутствие веществ с R_f (0,61; 0,65; 0,53; 0,47; 0,63; 0,70). Хроматографическое поведение, окраска пятен, сравнение с аутентичными образцами позволило установить присутствие веществ углеводной природы (табл.4.1.4.1).

Таблица 4.1.4.1

Результаты тонкослойной хроматографии в системе
бутанол – ацетон – вода (4:5:1)

Исследуемое Вещество	Значение R_f	Окраска в видимом свете после обработки анилинфталатным реактивом
Вещество 1	0,66	Ярко-коричневая
Арабиноза – стандарт	0,65	Ярко-коричневая
Вещество 2	0,60	Светло-коричневая
Глюкоза – стандарт	0,61	Светло-коричневая
Вещество 3	0,48	Коричневая
Галактоза-стандарт	0,47	Коричневая
Вещество 4	0,70	Красновато-коричневая
Ксилоза-стандарт	0,70	Красновато-коричневая
Вещество 5	0,73	Темно-коричневая
Рамноза – стандарт	0,72	Темно-коричневая
Вещество 6	0,64	Темно-коричневая
Фруктоза-стандарт	0,63	Темно-коричневая

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.4.1.4.1).

Анализируя полученные сведения о моносахаридных остатках различных фракций полисахаридов, видно, что в состав сахаров в ВРПС входят в основном фруктозаны, в ПВ – галактозаны, арабаны, рамнозаны, глюканы, ксиланы, в ГЦ – ксиланы, рамнозаны, галактозаны, арабаны, глюканы.

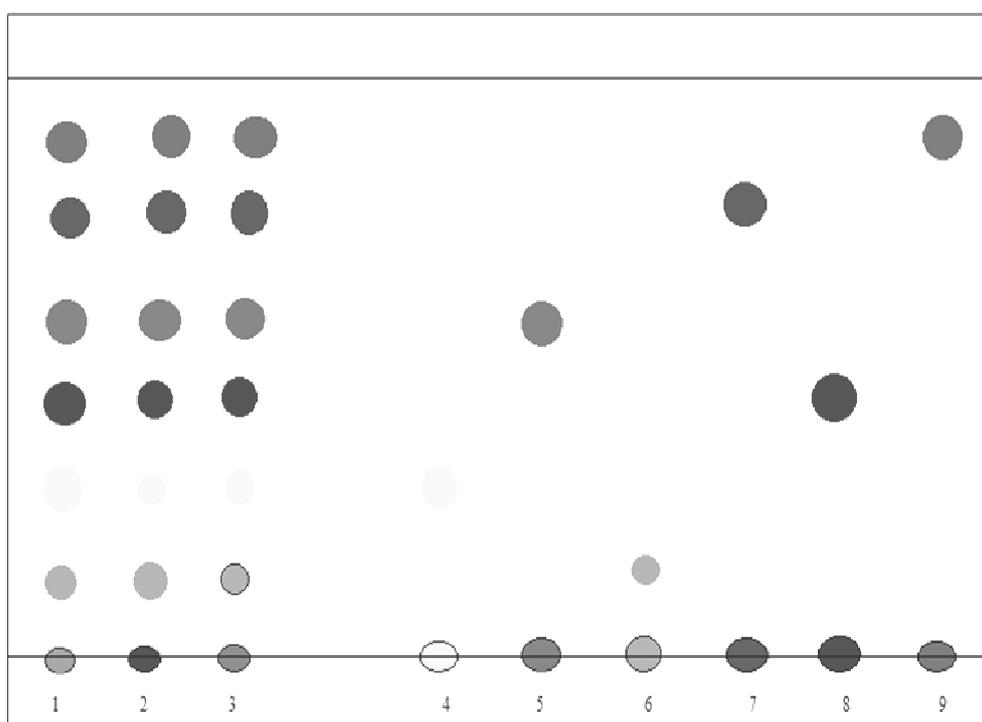


Рис.4.1.4.1. Схема тонкослойной хроматографии фракций полисахаридов в системе бутанол – ацетон – вода (4:5:1)
1-ВРПС, 2-ПВ, 3-ГЦ, 4-глюкоза, 5-арабиноза, 6-галактоза, 7-ксилоза, 8-фруктоза, 9-рамноза.

4.1.5. Изучение аминокислотного состава листьев боярышника кроваво-красного

Аминокислоты содержатся во всех живых организмах. Они являются передатчиками или предшественниками передатчиков нервных импульсов в синапсах, то есть участвуют в работе центральной нервной системы и мозга, позволяя ему принимать и посылать сигналы. Они образуют ядро каждой клетки. Около 80% аминокислот синтезируются в печени, а остальные мы получаем с пищей [99]. С точки зрения патологии сердечно-сосудистой и системы кроветворения наибольший интерес представляют такие аминокислоты, как лизин, аргинин, метионин. Известно, что метионин способен стимулировать ослабленную сердечную деятельность через активацию обменных процессов. Аналогичное действие и положительный инотропный эффект обнаружены и у лейцина. Они влияют непосредственно на сократительную функцию миокарда или на триггерный механизм, обладают липотропным действием, увеличивают усвояемость микроэлементов, понижая их токсичность. Снижение уровня в организме серотонина и L-аргинина в сыворотке крови так же создает условия для вазоконстрикции сосудистого русла, что ведет к повреждению сосудистой стенки и активации активности адгезии тромбоцитов [62,102].

Аминокислоты в листьях боярышника кроваво-красного обнаруживали рентгено-флуоресцентным методом (гл. II, п. 2.2.4). В листьях боярышника кроваво-красного было установлено присутствие четырнадцати аминокислот (лизин, пролин, метионин, глицин, цистеин, валин, гистидин, изолейцин, аргинин, лейцин, треонин, тирозин, серин, фенилаланин), десять из которых являются незаменимыми, три – полузаменимыми и одна – заменимой [90].

4.1.6. Изучение макро-и микроэлементного состава листьев боярышника кроваво-красного

Макро- и микроэлементы играют важную роль в жизнедеятельности человеческого организма, и их дефицит приводит к развитию различных патологических процессов. Известно, что при сердечно-сосудистых

заболеваниях различной этиологии в крови человека наблюдается дефицит меди, цинка, марганца. Лечебные дозы микроэлементов, введенные в организм больного, положительно воздействуют на течение болезни, что позволяет считать коррекцию микроэлементного обмена важной составной частью комплексной терапии заболеваний сердца [36].

Так как растения являются источниками различных макро- и микроэлементов нами были исследован состав некоторых элементов в листьях боярышника кроваво-красного, собранных в различные фазы вегетации и в различных районах Республики Башкортостан.

Образцы исследовали рентгено-флуоресцентным методом (глава II, п. 2.2.4). Обнаружены следующие макроэлементы: фосфор, калий, кальций, натрий, и микроэлементы: цинк, железо, медь, марганец, йод.

4.2. Количественное определение БАВ в листьях боярышника кроваво-красного

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

В листьях боярышника кроваво-красного известными методами было определено содержание основных групп биологически активных веществ. Исследования проводились в сравнении с фармакопейными видами сырья - плодами и цветками боярышника. В качестве основных 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.

Флавоноиды

В действующей нормативной документации на сырье и препараты боярышника стандартизация проводится по флавоноидам, в пересчете на гиперозид. Так как данная методика является трудоемкой и дорогостоящей, нами были использованы другие методики спектрофотометрического анализа

количественного содержания флавоноидов, разработанные для плодов боярышника и других видов ЛРС:

1. Спектрофотометрическая методика в пересчете на кверцетин после проведения предварительного гидролиза, так как кверцетин является агликоном большинства флавоноидов, в том числе и гиперозида (методика 1, глава II, п.2.2.3.2). Данная методика приводится в литературе для цветков и плодов боярышника. Поэтому мы сочли возможным использовать ее и для листьев, проведя также сравнительное определение флавоноидов и в других видах сырья боярышника. Так, содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин в листьях боярышника составило в среднем от $0,074 \pm 0,003$ до $0,086 \pm 0,004$ % (табл.4.2.1.1).

Таблица 4.2.1.1

Количественное содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин в различных видах сырья боярышника кроваво-красного

Объект исследования	Содержание, %
Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	$0,081 \pm 0,004$
Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	$0,086 \pm 0,004$
Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2012)	$0,074 \pm 0,003$
Цветки боярышника	$0,087 \pm 0,005$
Плоды боярышника	$0,063 \pm 0,003$

2. Спектрофотометрическая методика определения флавоноидов в пересчете на гиперозид, основанная на реакции комплексообразования флавоноидов с раствором алюминия хлорида и определении оптической плотности окрашенного комплекса. Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид в листьях боярышника составило в среднем от $2,223 \pm 0,079$ до $2,473 \pm 0,159$ % (табл.4.3.1.2).

Исходя из полученных данных, накопление флавоноидов происходит больше в листьях и цветках боярышника.

Количественное содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид в различных видах сырья боярышника кроваво-красного

Объект исследования	Содержание, %
Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	2,223±0,079
Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	2,473±0,159
Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2012)	2,268±0,123
Цветки боярышника	1,552±0,068
Плоды боярышника	0,089±0,004

Вместе с тем, в мировой литературе содержатся многочисленные данные, свидетельствующие о том, что основными действующими веществами боярышника, обуславливающими кардиотонический и гипотензивный эффект, является не гиперозид или тритерпеновые сапонины, как предполагали ранее, а процианидины. В зарубежной литературе плоды боярышника рассматривают как источник процианидинов и используют для стандартизации количественное определение данной группы флавоноидов [96].

Для количественного определения процианидинов в сырье боярышника нами использован модифицированный метод Porter, в основе которого лежит кислотное расщепление процианидинов до антоцианидинов в присутствии катализаторов (ионов Fe^{3+}) (методика 3, глава II, п.2.2.3.2). Так содержание процианидинов в листьях боярышника кроваво-красного составило в среднем от 3,580±0,152 до 3,792±0,175 % (табл.4.2.1.3).

Таблица 4.2.1.3

Количественное содержание процианидинов в пересчете на цианидин в различных видах сырья боярышника кроваво-красного

Объект исследования	Содержание, %
Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	3,580±0,152
Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	3,792±0,175
Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2012)	3,605±0,164
Цветки боярышника	2,536±0,108
Плоды боярышника	1,674±0,089

При анализе полученных данных, оказалось, что листья боярышника кроваво-красного содержат большее количество процианидинов, чем плоды и цветки боярышника.

Сапонины

Для количественного определения сапонинов использовался метод, основанный на реакции с концентрированной серной кислотой, с последующим измерением оптической плотности с помощью ФЭК при длине волны 490 нм (глава II, п.2.2.3.2). Содержание сапонинов рассчитывали в пересчете на олеаноловую кислоту, и их содержание составило в среднем от 0,078±0,004 до 0,088±0,005 % (табл.4.2.1.4).

Таблица 4.2.1.4

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

Согласно полученным данным содержание тритерпеновых сапонинов в цветках и плодах боярышника выше, чем в листьях.

Аминокислоты

Было определено количественное содержание обнаруженных аминокислот в листьях, плодах и цветках боярышника кроваво-красного рентгено-флуоресцентным методом (гл. II, п. 2.2.4).

Согласно полученным результатам, представленным в таблице 4.2.1.5, наибольшее количество лизина, лейцина и гистидина накапливают плоды боярышника; пролина, аргинина, серина и глицина – цветки боярышника; цистеина и изолейцина – плоды боярышника; валина – листья и плоды боярышника; треонина – цветки боярышника; тирозина – листья и цветки боярышника, фенилаланина – цветки боярышника [90].

Таблица 4.2.1.5

Аминокислотный состав исследуемых видов сырья, %

Аминокислоты	Боярышник кроваво-красный				
	Листья (цветение, Чишм.р-н, 2012 г.)	Листья (цветение, Дув.р-н, 2011 г.)	Листья (цветение, Уфим.р-н, 2010 г.)	Цветки	Плоды
Лизин	0,53±0,03	0,65±0,03	0,45±0,02	0,78±0,04	1,75±0,09
Пролин	1,94±0,01	2,09±0,11	1,91±0,10	2,35±0,12	0,45±0,02
Метионин	0,34±0,02	0,36±0,02	0,31±0,02	0,39±0,02	0,37±0,02
Глицин	1,08±0,05	1,08±0,05	1,03±0,05	1,10±0,06	0,25±0,01
Цистеин	0,22±0,01	0,24±0,01	0,21±0,01	0,30±0,02	0,74±0,04
Валин	1,69±0,08	1,62±0,08	1,63±0,08	1,41±0,07	2,10±0,10
Гистидин	0,09±0,01	0,15±0,01	0,07±0,004	0,17±0,01	0,78±0,04
Изолейцин	0,13±0,01	0,14±0,01	0,09±0,004	0,10±0,005	0,23±0,01
Аргинин	0,81±0,04	0,89±0,04	0,75±0,04	0,95±0,05	0,56±0,03
Лейцин	0,17±0,01	0,27±0,01	0,13±0,007	0,24±0,01	1,43±0,07
Треонин	0,48±0,02	0,52±0,03	0,44±0,02	0,54±0,03	0,43±0,02
Тирозин	0,38±0,02	0,37±0,02	0,35±0,02	0,33±0,02	0,11±0,006
Серин	0,54±0,03	0,59±0,03	0,50±0,03	0,57±0,03	0,37±0,02
Фенилаланин	0,65±0,03	0,70±0,04	0,61±0,03	0,75±0,04	0,31±0,02

Макро- и микроэлементы

Содержание обнаруженных макро- и микроэлементов в исследуемых образцах сырья определяли рентгено-флуоресцентным методом (глава II, п. 2.2.4). Данные представлены в таблице 4.2.1.6.

Таблица 4.2.1.6

Элементный состав в исследуемых образцах сырья

Объект исследования	Макроэлементы				Микроэлементы				
	P, %	K, %	Ca, %	Na, %	Zn, мг/кг	Fe, мг/кг	Cu, мг/кг	Mn, мкг/кг	I, мг/кг
Листья боярышника (цветение, Чишминский р-н, 2010)	0,19± 0,01	0,16± 0,01	2,00± 0,11	0,32± 0,02	42,54 ±2,13	338,23 ±18,94	9,06± 0,45	470,50 ±26,82	0,21± 0,01
Листья боярышника (цветение, Уфимский р-н, 2010)	0,15± 0,01	0,10± 0,005	2,02± 0,11	0,31± 0,02	35,98 ±1,81	333,52 ±18,01	9,55± 0,53	476,46 ±27,63	0,20± 0,01
Листья боярышника (цветение, Дуванский р-н, 2011)	0,25± 0,01	0,15± 0,01	1,96± 0,09	0,33± 0,02	32,67 ±1,63	259,40 ±12,95	10,62 ±0,53	459,88 ±25,75	0,21± 0,01
Цветки боярышника	0,21± 0,01	0,13± 0,007	1,67± 0,08	0,33± 0,02	5,82± 0,30	43,55± 2,13	13,44 ±0,67	388,12 ±19,47	0,19± 0,01
Плоды боярышника	0,11± 0,006	0,13± 0,007	0,06± 0,003	0,01± 0,001	21,55 ±1,25	853,02 ±46,06	10,81 ±0,55	448,83 ±24,24	0,06± 0,003

Проанализировав полученные данные (табл.4.2.1.6), можно сделать вывод, что листья боярышника накапливают большее количество кальция, натрия, цинка, марганца и йода, в сравнении с другими исследуемыми видами сырья.

Также проводилась оценка количественного содержания йода в листьях боярышника кроваво-красного с помощью аналитического метода, основанного на катализируемой йодом окислительно-восстановительной реакции между роданид- и нитрит-ионом. Содержание йода составило $0,060 \pm 0,003$ мг% в пересчете на абсолютно сухое сырье [87].

4.2.2. Определение количественного содержания других обнаруженных групп БАВ

В листьях боярышника кроваво-красного по известным методикам (глава 2, п. 2.2.3.2.) было определено содержание других групп БАВ, обнаруженных с помощью качественных реакций (глава 4, п. 4.1.1). Исследовались образцы листьев, собранных в различных районах Республики Башкортостан в период цветения в 2010-2012 гг. Результаты количественного анализа представлены в таблице 4.2.2.1.

Таблица 4.2.2.1.

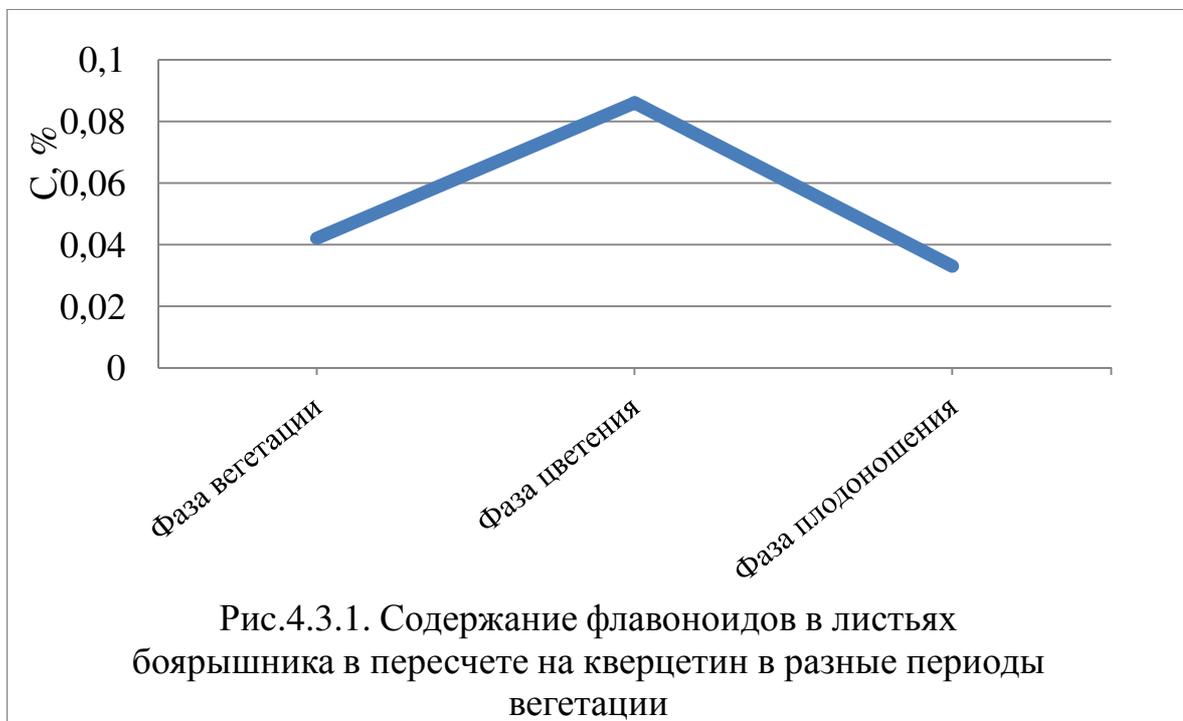
Количественное содержание некоторых групп БАВ в листьях боярышника

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

4.3. Обоснование срока заготовки листьев боярышника кроваво-красного

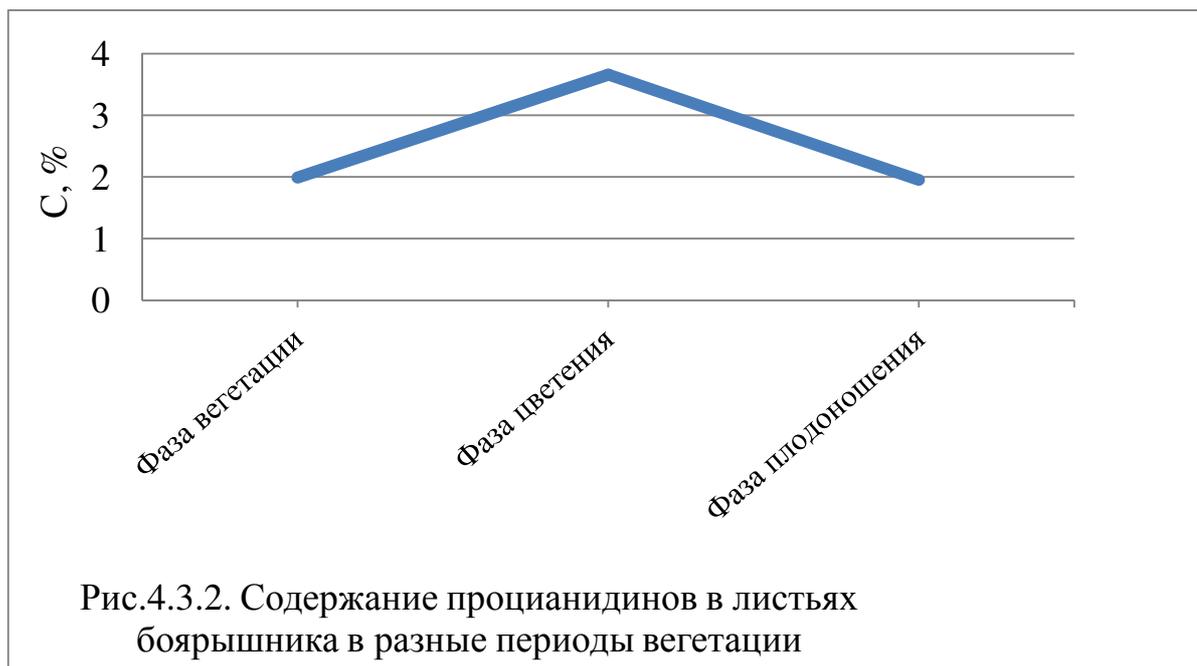
Для выбора оптимального времени заготовки листьев боярышника кроваво-красного в качестве лекарственного растительного сырья изучалась динамика накопления основных групп биологически активных веществ в разные периоды вегетации. В качестве основных групп биологически активных веществ в листьях боярышника были выбраны флавоноиды, процианидины и тритерпеновые сапонины, так как, согласно литературным данным, именно эти группы соединений обуславливают их фармакологические свойства [29,36]. Исследования проводились в период с 2009-2012 гг.

Нами исследована динамика накопления флавоноидов в пересчете на кверцетин после проведения предварительного гидролиза, так как кверцетин является агликоном большинства флавоноидов, и его присутствие было нами установлено методом ВЭЖХ (методика 1, глава II, п. 2.2.3.2).

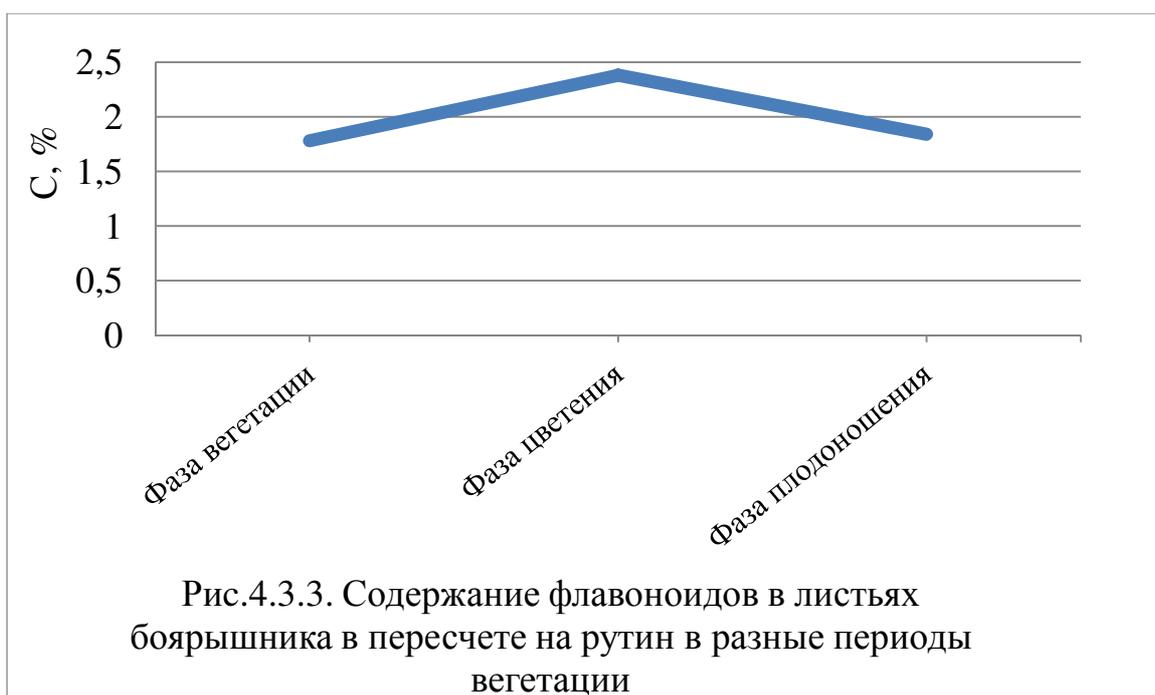


Также исследовалась динамика накопления процианидинов в пересчете на цианидин (методика 2, глава II, п. 2.2.3.2).

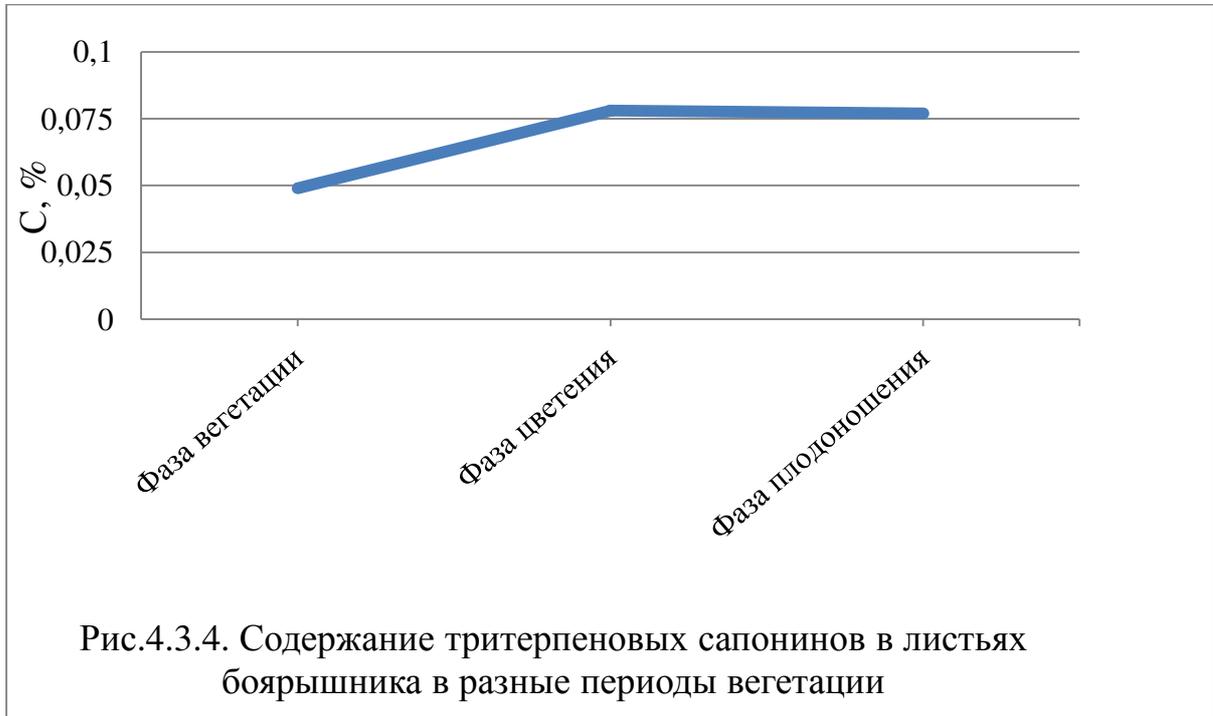
Согласно рис.4.3.2, процианидины максимально накапливаются в листьях боярышника кроваво-красного в период цветения растения.



После разработки методики количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин, которая предложена нами для включения в проект нормативной документации (глава 5, раздел 5.2), было проверено их содержание в листьях боярышника в различные периоды вегетации (рис. 4.3.3). Данные, представленные на рис. 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 свидетельствуют о том, что флавоноиды максимально накапливаются в фазу цветения растения.



Динамика накопления тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту изучалась с использованием фотоэлектроколориметрического метода (глава II, п. 2.2.3.2).



Полученные данные, согласно рис. 4.3.4 свидетельствуют о том, что на накопление сапонинов в листьях боярышника кроваво-красного достигает максимума в период цветения растения, а затем изменяется незначительно.

Таким образом, при проведении сравнительного анализа накопления различных групп БАВ в листьях боярышника кроваво-красного в разные периоды вегетации можно сделать вывод, что заготовку листьев необходимо производить в период цветения.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4:

1. Изучен химический состав основных групп биологически активных веществ листьев боярышника кроваво-красного. Обнаружены: флавоноиды, аскорбиновая кислота, конденсированные дубильные вещества, сапонины тритерпеновой природы, органические кислоты, полисахариды, кумарины, каротиноиды. Определено их количественное содержание.
2. С использованием различных хроматографических методов обнаружено 51 соединение фенольной природы, из которых идентифицированы 11 (рутин, гиперозид, хлорогеновая кислота, байкалеин, физетин, дигидрокверцетин, кверцетин, кумаран, α -гидрохинон, пирокатехин и хинная кислота).
3. Изучен состав полисахаридного комплекса (водорастворимые полисахариды – 1,6%, гемицеллюлоза – 3,7 %, пектиновые вещества – 12%). Преобладающей группой полисахаридов являются пектиновые вещества. Определено количественное содержание полисахаридов: гравиметрическим способом – 11,55 %, спектрофотометрическим – 3,98 %. Определен мономерный состав полисахаридов, так ВРПС состоит, в основном, из фруктозанов, ПВ – из галактозанов, арабанов, рамнозанов, глюканов и ксиланов, ГЦ – из ксиланов, рамнозанов, галактозанов, арабанов и глюканов.
4. Изучен компонентный состав эфирного масла листьев боярышника кроваво-красного. Обнаружено 44 соединения, идентифицировано из них 18, основная часть которых приходится на соединения сесквитерпеновой природы (1-этилиденоктагидро-7 α -метил-1H-инден (8.34%), ледол (7.17%), α -фарнезен (2,01%), α -кадинол (1,87%).
5. Изучен аминокислотный и макро-, микроэлементный состав листьев боярышника кроваво-красного.
6. Установлены сроки заготовки листьев боярышника кроваво-красного – период цветения растения.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (*CRATAEGUSSANGUINEAPALL.*)

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

5.1. Разработка методики качественного анализа листьев боярышника кроваво-красного

Для качественной характеристики листьев боярышника кроваво-красного на основании проведенных исследований в главе IV предлагается использовать метод тонкослойной хроматографии, как высокочувствительный, не требующий сложного оборудования, отличающийся относительно высокой скоростью проведения анализа.

Методика качественного ТСХ-анализа листьев боярышника кроваво-красного. На линию старта пластинки «Silufol UV-254» капилляром наносят 0,02 мл подготовленного извлечения (раздел 5.2.1) и по 0,02 мл 0,05% растворов РСО рутина, гиперозида, хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в предварительно насыщенную смесью растворителей камеру, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут. При просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 365 нм обнаруживаются 7 основных пятен, 3 из которых предположительно с R_f около 0,44 рутин, с R_f около 0,62 гиперозид, с R_f около 0,7 хлорогеновая кислота (рис.5.1.1). После проявления пластинки 3% спиртовым раствором алюминия хлорида происходит изменение окраски пятен (табл.5.1.1).

Таблица 5.1.1

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

Верх хроматографической пластинки	
Хлорогеновая к-та (Флуоресцирующая зона голубого цвета) Гиперозид (Флуоресцирующая зона желто-зеленого цвета) Рутин (Флуоресцирующая зона желтого цвета)	Зона темно-фиолетового цвета (вещество 7) Флуоресцирующая зона голубого цвета (вещество 6) Флуоресцирующая зона голубого цвета (хлорогеновая к-та) Флуоресцирующая зона желто-зеленого цвета (гиперозид) Флуоресцирующая зона желтого цвета (рутин) Флуоресцирующая зона светло-желтого цвета (вещество 2) Флуоресцирующая сиреневого цвета (вещество 1)
Растворы сравнения	Испытуемый раствор

Рис. 5.1.1. Схема хроматограммы листьев боярышника в системе этилацетат - муравьиная кислота - вода (14:3:3)

Примечание:

1. Подготовка пластинок. Пластины «Silufol UV-254» вырезают размером 14×5 см, наносят линию старта на расстоянии 1 см от края и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 часа.
2. Приготовление системы растворителей для хроматографирования. Для проведения ТСХ-анализа рекомендуется система растворителей: этилацетат-муравьиная кислота-вода (14:3:3). Система используется свежеприготовленная. Насыщение камеры для хроматографирования системой растворителей в течение 1 часа.
3. Приготовление раствора проявителя. См. раздел 5.2. Разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного.
4. Приготовление растворов сравнения. См. раздел 5.2. Разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного.

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

5.2.1. Выбор схемы анализа

По литературным данным различные виды сырья боярышника стандартизируют по флавоноидам (гиперозиду, рутину, процианидинам, кверцетину). В основе всех используемых методик количественного определения данной группы веществ - метод спектрофотометрии [24,27,108,109,126].

При исследовании УФ-спектра спиртового извлечения листьев боярышника наблюдались две основные полосы поглощения (максимумы поглощения при длинах волн 332 и 272 нм, минимумы при 300 и 257 нм, и плечо в области 278-284нм). При взаимодействии со спиртовым раствором

хлорида алюминия наблюдалось bathochromное смещение полос поглощения, что доказывает присутствие флавоноидов. (рис.5.2.1.1)

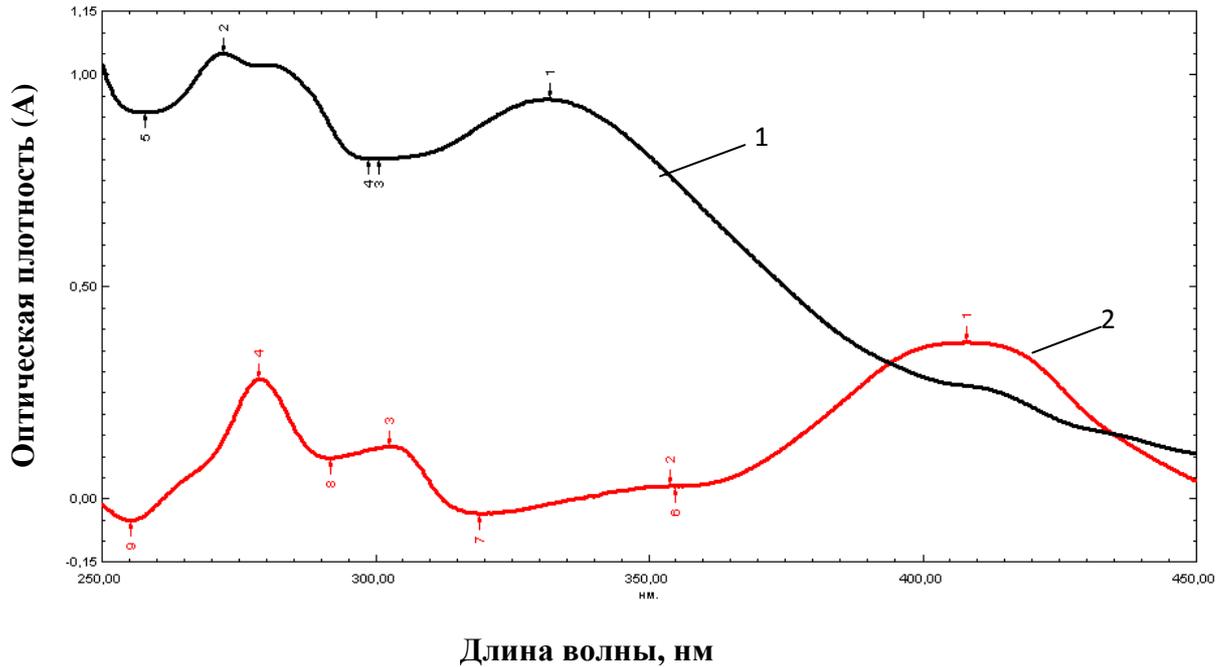


Рис. 5.2.1.1. Спектры поглощения спиртового экстракта листьев боярышника кроваво-красного (1), с добавлением раствора алюминия хлорида (2).

5.2.2. Оптимизация методики определения

Для выбора стандартного вещества проведена сравнительная оценка спектров поглощения спиртового извлечения листьев боярышника кроваво-красного и спиртового раствора рутина. Максимумы поглощения извлечения листьев боярышника и рутина не совпали (рис.5.2.2.1). Поэтому для выявления условной принадлежности полученных спектральных данных конкретным флавоноидам были сняты УФ-спектры с комплексообразующей добавкой (рис.5.2.2.2).

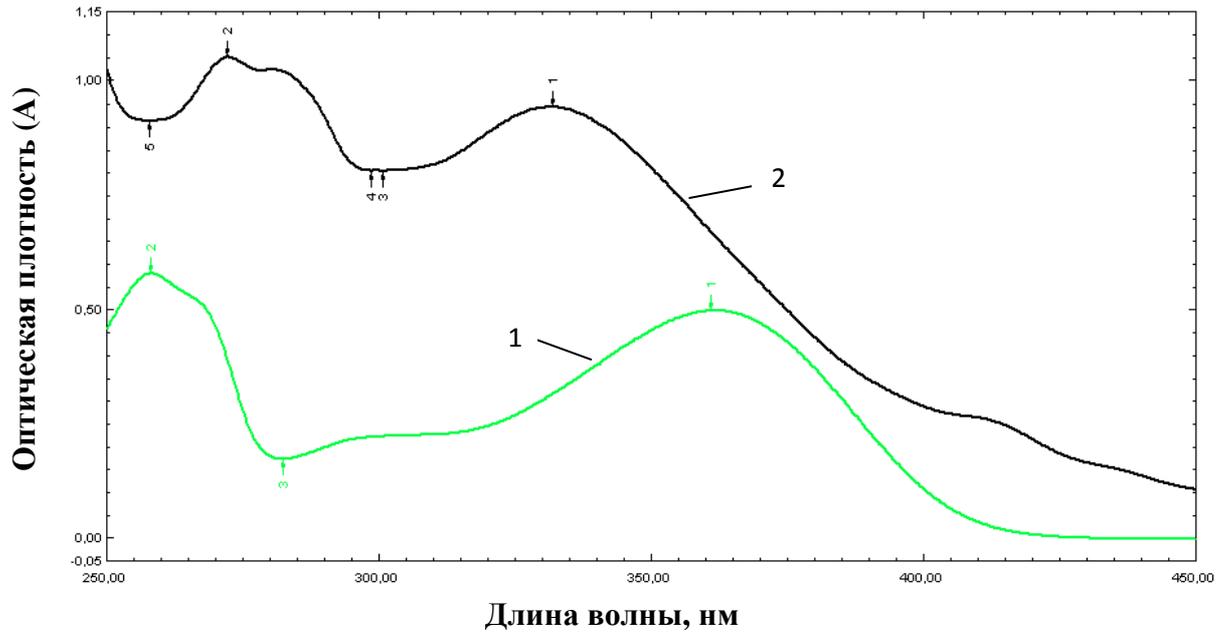


Рис.5.2.2.1. Спектры поглощения раствора рутина (1) и спиртового экстракта листьев боярышника кроваво-красного (2)

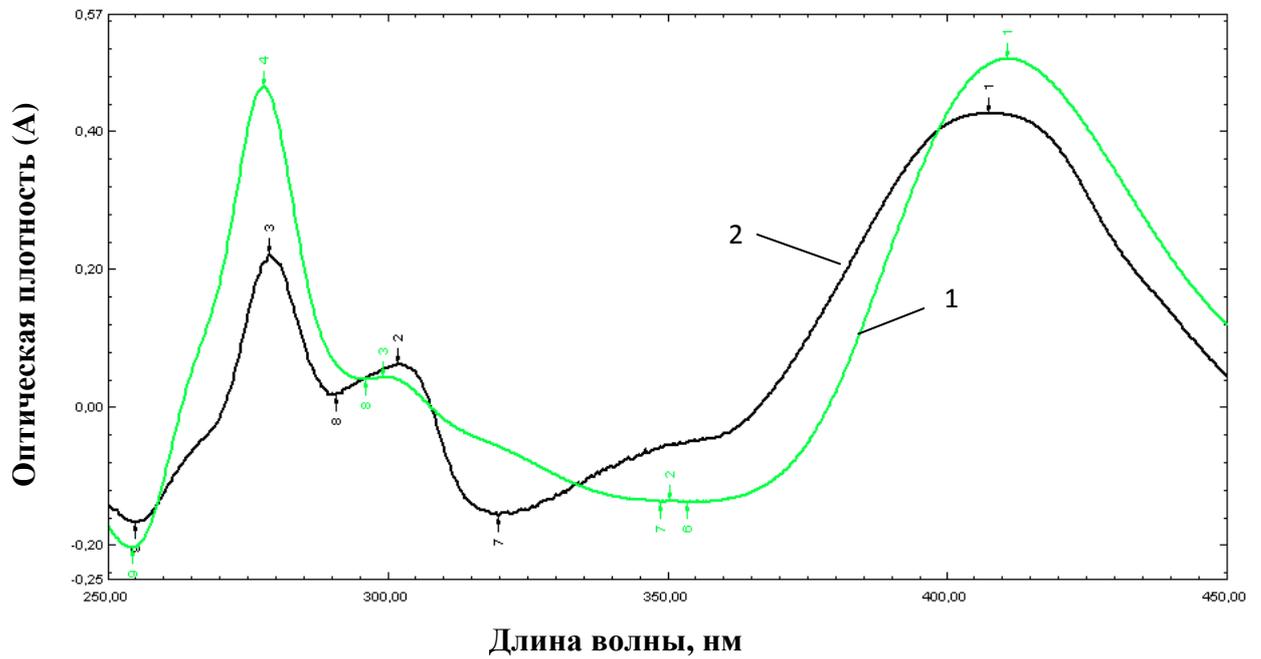


Рис.5.2.2.2. Спектры поглощения раствора рутина (1) и спиртового экстракта листьев боярышника кроваво-красного (2) с добавлением раствора алюминия хлорида.

Анализируя полученные спектры поглощения оказалось, что максимум поглощения комплекса рутин - стандарта с раствором хлорида алюминия совпал с максимумом поглощения продуктов взаимодействия флавоноидов листьев боярышника кроваво-красного с алюминия хлоридом при длине волны 409 нм (рис. 5.2.2.2). Поэтому за основу разрабатываемой методики был взят метод дифференциальной спектрофотометрии с использованием комплексообразующей добавки, аналитические параметры которой позволяют использовать его для определения содержания флавоноидов в растительных объектах.

Важными количественными характеристиками реакций комплексообразования являются концентрация комплексообразователя, время, необходимое для наиболее полного образования комплекса, и продолжительность стабильности оптической плотности полученного соединения. Данные характеристики были определены экспериментально.

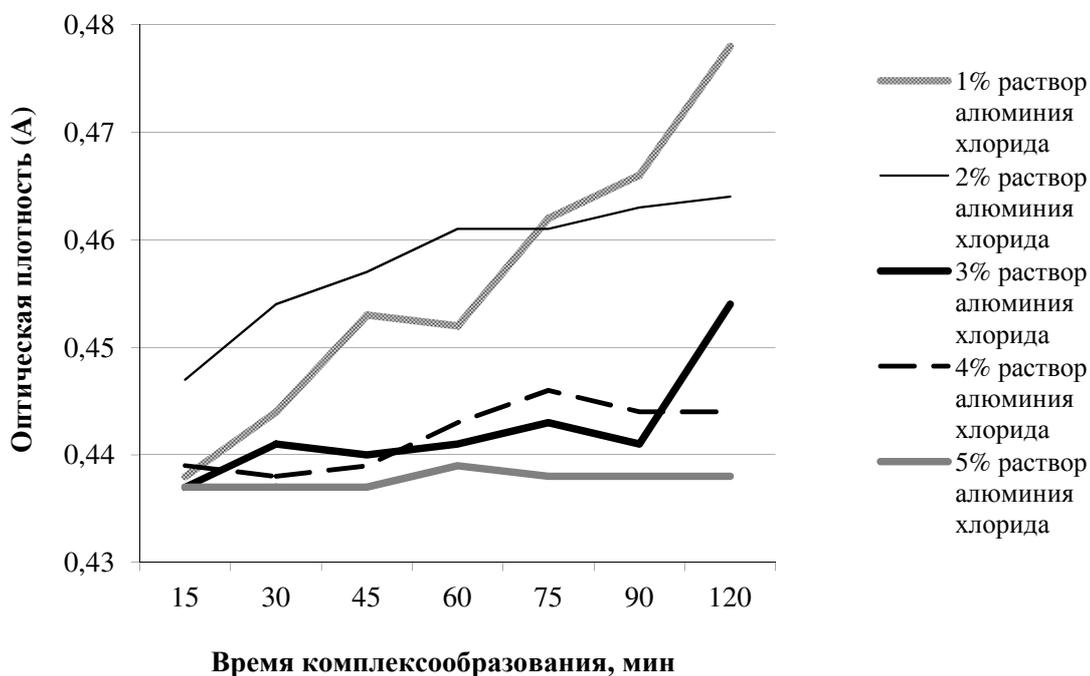


Рис. 5.2.2.3. Зависимость оптической плотности раствора от времени комплексообразования

Время образования комплекса при использовании комплексообразователя в различной концентрации наступает

приблизительно в одно время – через 20 мин. Наиболее стабильно себя ведет комплекс, полученный при добавлении 3% раствора алюминия хлорида, при этом показывая сравнительно высокое значение оптической плотности (рис.5.2.2.3).

После того, как было установлено время комплексообразования и концентрация комплексообразователя необходимо было определить его количество. Согласно рис. 5.2.2.4, максимальная оптическая плотность проявляется при добавлении 2 мл 3% раствора алюминия хлорида.

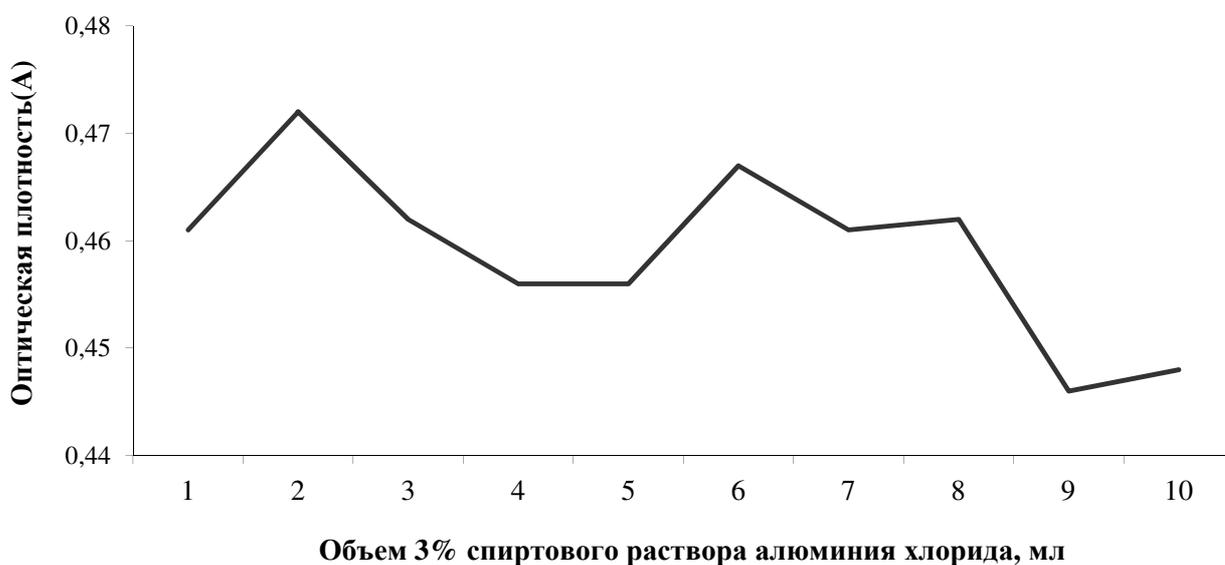


Рис. 5.2.2.4. Изменение оптической плотности в зависимости от количества комплексообразователя

5.2.3. Подбор факторов экстракции.

Следующим этапом разработки методики был подбор факторов экстракции: экстрагент, измельченность сырья, время экстракции, соотношение сырья и экстрагента.

Оптимальным экстрагентом с точки зрения быстроты и полноты извлечения определяемой нами группы веществ являются водно-спиртовые смеси. Были получены экстракты с использованием водно-спиртовых смесей следующих концентраций: 40, 50, 60, 70, 80, 95%. Наибольший выход флавоноидов наблюдался в серии опытов с экстрактами, полученными на 80% этиловом спирте (рис.5.2.3.1).

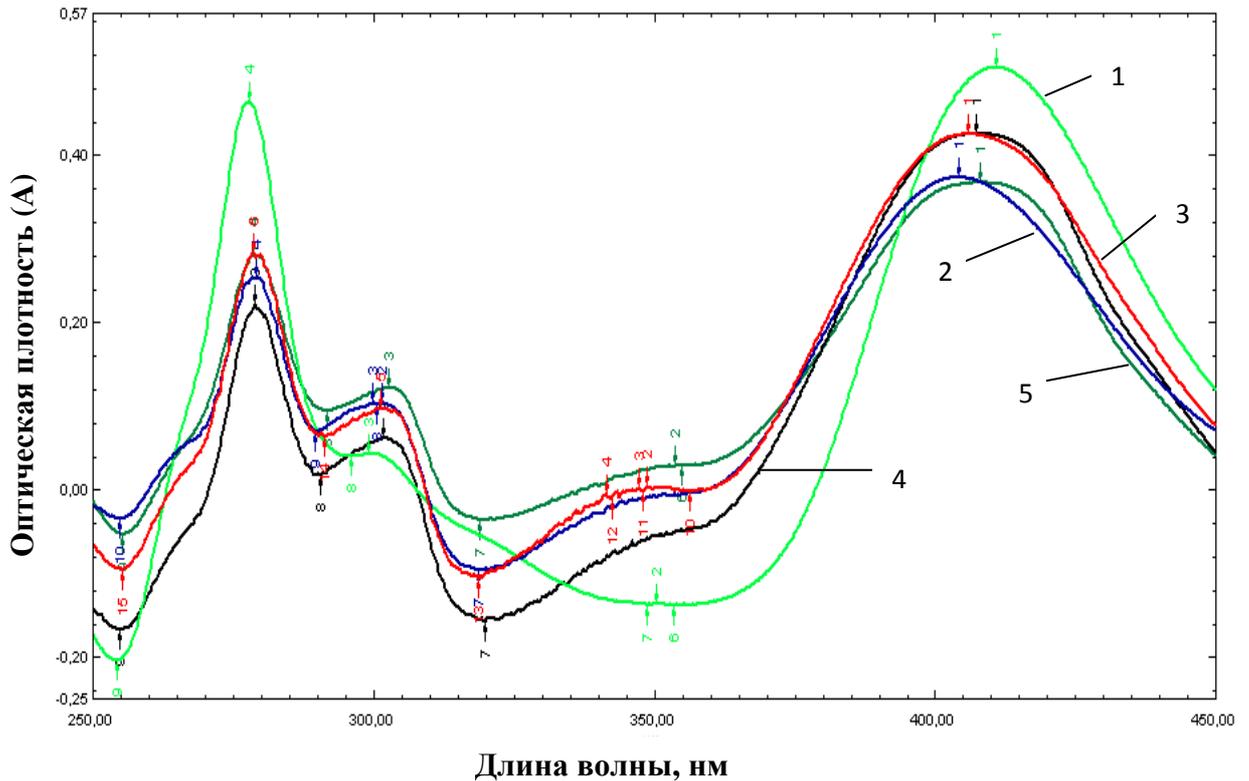


Рис.5.2.3.1. Спектры поглощения раствора рутина (1) и спиртовых экстракта листьев боярышника кроваво-красного, полученных на 40% (2), 70% (3), 80% (4) и 95% (5) этиловом спирте с добавлением раствора алюминия хлорида.

Размер и характер измельченности растительного материала могут влиять на процесс экстрагирования: чем больше поверхность соприкосновения фаз, тем быстрее протекает экстракция. При этом из мелкодисперсных порошков в извлечение переходит большое количество балластных веществ, которые, образуя студенистую массу, могут оказывать сопротивление прохождению экстрагента.

Для определения *оптимальной измельченности*, сырье измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1, 2, 3, 4.5 мм и определяли количественное содержание флавоноидов полученных проб сырья в пересчете на рутин по методике описанной выше. Полученные результаты представлены в таблице 5.2.3.1.

Таблица 5.2.3.1

Количественное содержание флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на рутин в зависимости от измельченности сырья

Измельченность сырья	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
1 мм	2,4261±0,1314
2 мм	2,7154±0,1817
3 мм	2,2930±0,1038
4,5 мм	1,8485±0,0220

По результатам, представленным в таблице, видно, что оптимальной является измельченность сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм.

По закону диффузии, в процессе экстракции лекарственного растительного сырья вещества переходят из раствора с большей концентрацией в раствор с меньшей концентрацией. При этом количество извлеченного вещества прямо пропорционально *времени экстракции*. Так как проводить извлечение до полного выравнивания концентраций нецелесообразно, необходимо установить время, за которое определяемая группа веществ максимально извлекается из раствора.

Таблица 5.2.3.2

Влияние времени экстракции на выход флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного

Время экстракции, мин	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
15	2,1788±0,0789
30	2,2270±0,0320
45	2,2454±0,0958
60	2,1775±0,0364
90	2,2288±0,0426

Согласно полученным данным (табл. 5.2.3.2) оптимальное время экстракции, при котором происходит максимальное извлечение флавоноидов, составило 30 минут.

Для определения оптимального соотношения сырья и экстрагента использовали соотношения 1:10, 1:50, 1:100, 1:150 и 1:200.

Таблица 5.2.3.3

Влияние соотношения сырья и экстрагента на выход флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного

Соотношение сырья и экстрагента	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
1:10	2,0142±0,1802
1:50	2,3198±0,0606
1:100	2,5613±0,0487
1:150	2,6829±0,04336
1:200	2,5632±0,04336

Как видно из таблицы 5.2.3.3, данные, полученные при подборе соотношений сырье – экстрагент, были близки, поэтому было принято решение проверить различную кратность экстракции на трех соотношениях: 1:100, 1:150, 1:200.

Таблица 5.2.3.4

Количественное содержание флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на рутин

Соотношение сырья и экстрагента,	Кратность экстракции	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %
1:100	однократная	2,5613±0,0487
	двукратная	2,4928±0,0114
	трехкратная	2,4844±0,0441
1:150	однократная	2,6829±0,04336
	двукратная	2,6150±0,0746
	трехкратная	2,5652±0,1557
1:200	однократная	2,5632±0,04336

	двукратная	2,6790±0,0591
	трехкратная	2,6836±0,0184

Исходя из полученных результатов (табл.5.2.3.4), нами была выбрана 2-кратная экстракция сырья в соотношении 1:200. Схожие результаты были получены в опыте с однократной экстракцией в соотношении 1:150. Данные условия экстракции не были нами выбраны по причине отсутствия в номенклатуре мерной посуды (мерная колба на 150 мл).

После проведенных исследований предложена следующая *методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье*:

Аналитическую пробу листьев боярышника кроваво-красного измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу термостойкого стекла со шлифом вместимостью 200-250 мл, прибавляют 100 мл 80 % этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Затем полученное извлечение осторожно фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу на 200 мл, избегая попадания частиц сырья в воронку. К оставшемуся в колбе сырью прибавляют 100 мл 80 % этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Колбу охлаждают в течение 15 минут. Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу с первой порцией извлечения через тот же бумажный фильтр. Оставшееся в колбе сырье ополаскивают 20 мл 80 % этилового спирта и фильтруют в мерную колбу. Полученное извлечение доводят в мерной колбе до 200 мл (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 3 мл раствора А, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора хлорида алюминия и доводят раствор до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине

волны 409 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3 мл раствора А, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты, доведенный 95% этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность комплекса раствора РСО рутина с раствором алюминия хлорида: к 1 мл 0,05% раствора рутина прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят раствор этиловым спиртом 95% до 25 мл в мерной колбе (раствор С).

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 200 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 3 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность анализируемого раствора (раствор В);

A₀ – оптическая плотность комплекса РСО рутина с алюминия хлоридом (раствор С);

m – навеска сырья в граммах;

m₀ – навеска РСО рутина в граммах;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Таблица 5.2.3.5

Количественное содержание флавоноидов в растительном сырье, %

№ серии	Содержание флавоноидов в пересчете на РСО рутина, %
1.	2,3820±0,0105
2.	2,4125±0,0851
3.	2,4063±0,0205
4.	2,2576±0,0638
5.	2,3491±0,0189
6.	2,2492±0,0767

Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на рутин

№ серии	n	X_{cp}	P	t (p,f)	S_x	ϵ_a	$\epsilon\%$
1.	5	2,3820	0,95	2,776	0,0024	0,0105	0,4395
2.	5	2,4125	0,95	2,776	0,0198	0,0851	3,5282
3.	5	2,4063	0,95	2,776	0,0048	0,0205	0,8525
4.	5	2,2576	0,95	2,776	0,0148	0,0638	2,8263
5.	5	2,3491	0,95	2,776	0,0044	0,0189	0,8036
6.	5	2,2492	0,95	2,776	0,0178	0,0767	3,4087

Согласно полученным данным (табл.5.2.3.5) содержание флавоноидов составило от $2,2492 \pm 0,0767\%$ и до $2,4125 \pm 0,0851\%$. Согласно приведенной метрологической характеристике методики (табл.5.2.3.6) ошибка опыта в серии не превышает $3,5282\%$, что говорит о достоверности результатов полученных исследований.

Примечание.

1. Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO) рутина: около 0,05 г (точная навеска) PCO рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки и перемешивают.

2. Приготовление 3% спиртового раствора алюминия хлорида: 5,4 г алюминия хлорида б-водного растворяют в 80 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки, перемешивают.

5.2.4. Валидация методики количественного определения

Валидация методики проводилась по следующим параметрам: линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность [4,13].

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от теоретического содержания флавоноидов в пересчете на рутин в листьях боярышника кроваво-красного.

Таблица 5.2.4.1

Определение линейности разработанной методики.

№	Содержание, %	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов в аликвоте, в пересчете на рутин, мг
1.	80	2,4	0,250	0,280
2.	90	2,7	0,285	0,319
3.	100	3,0	0,317	0,355
4.	110	3,3	0,349	0,390
5.	120	3,6	0,377	0,422

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией. Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,99. Коэффициент корреляции составил 0,998. (таб. 5.2.4.1, рис. 5.2.4.1)



Рис.5.2.4.1. Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов

Повторяемость методики оценивали по результатам определения 9 аликвот образца (3 образца сырья в 3 повторностях). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которая составила 0,95%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл.5.2.4.2).

Таблица 5.2.4.2

Определение повторяемости разработанной методики

Повторность	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях боярышника кроваво-красного, %
1.	2,3796
2.	2,3869
3.	2,3796
4.	2,3796
5.	2,4480
6.	2,4100
7.	2,4120
8.	2,4120
9.	2,3968
Среднее значение	2,4005
Относительное стандартное отклонение (RSD) 0,95%	

Определение воспроизводимости методики выполняли 2 химика-аналитика. Исследования проводили на 3 образцах в 3 повторностях (табл. 5.2.4.3). Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, которое не превышает 15%, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости.

Определение воспроизводимости методики

Повторность	Аналитик	Содержание флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного в пересчете на рутин, %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	1	2,3796	2,3796	2,4120
2	1	2,3869	2,4480	2,4120
3	1	2,3796	2,4100	2,3968
4	2	2,2551	2,3415	2,2441
5	2	2,2332	2,3491	2,2823
6	2	2,2844	2,3567	2,2212
Среднее значение		2,3198	2,3808	2,3218
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		3,0232	1,7318	3,8120

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных путем добавления

Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. В разработанной методике процесс восстановления находится в пределах 99,5-101,8% (табл.5.2.4.4).

Определение правильности методики

№	Объем экстракта в аликвоте, мл	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в аликвоте, мг	Добавлено РСО рутина, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, мг (%)
1.	2	0,203	0,5	0,703	0,707	0,004 (0,57%)
2.	2,5	0,248	0,5	0,748	0,744	-0,004 (0,53%)
3.	3,0	0,296	0,5	0,796	0,810	0,041 (1,76%)
4.	3,5	0,345	0,5	0,845	0,846	0,001 (0,12%)
Среднее значение выхода - 100±0,745%						

В ходе исследований установлено, что разработанная методика является прецизионной, правильной, легко воспроизводима и ее выполнение занимает минимум времени.

5.3. Определение числовых показателей и сроков годности листьев боярышника кроваво-красного

Числовые показатели качества листьев боярышника кроваво-красного определяли в аналитических пробах образцов, взятых от пяти партий, изготовленных в лабораторных условиях в трех повторностях по методикам, приведенным в ГФ XI изд. Образцы хранили в мешках тканевых (ГФ XI) в сухом, чистом, хорошо проветриваемом помещении, не зараженном амбарными вредителями, без прямого попадания солнечных лучей.

Согласно требованиям ОСТ 91500.05.001-00 в раздел проекта ФСП «Числовые показатели для цельного и измельченного сырья» должны быть включены нормативы влажности, зольности и примесей, содержание фармакологически активных веществ, допустимых примесей. Определение данных показателей проводили в соответствии с требованиями статей ГФ XII, ГФ XI (гл. II, п. 2.2.2). Результаты определения представлены в таблице 5.3.1.

Таблица 5.3.1

Результаты анализа 5 серий листьев боярышника кроваво-красного

Номер серии	Показатели качества									Соответствие требованиям проекта ФСП
	Качественные реакции	Числовые показатели								
	ТСХ-анализ	Содержание флавоноидов, % (не менее 1,5%)	Влажность не более 10%	Золы общей не более 10%	Орг. примесей не более 1,0%	Мин. примесей не более 0,5%	ДЗП, не менее 30%	Измельченность:		
част., не прох. d=4,5 мм не более 10%								част., прох. d=0,5 мм не более 4%		
1.	соответств.	2,27	3,75	8,14	0,7	0,4	39,4	8,7	3,5	соответств. соответств. соответств. соответств.
	соответств.	2,33	3,78	7,40	0,6	0,3	38,5	8,4	3,3	
	соответств.	2,32	3,69	8,24	0,5	0,3	40,1	8,9	3,5	
	соответств.	2,24	3,87	7,74	0,5	0,3	41,5	8,5	3,1	
2.	соответств.	2,39	3,89	7,40	0,5	0,3	33,6	7,9	2,9	соответств. соответств. соответств. соответств.
	соответств.	2,41	4,13	7,75	0,4	0,3	32,3	7,7	3,0	
	соответств.	2,45	4,29	7,89	0,4	0,3	31,5	7,9	2,9	
	соответств.	2,40	3,95	7,41	0,4	0,3	33,2	7,5	3,1	
3.	соответств.	2,37	3,42	8,88	0,6	0,4	45,3	8,1	2,8	соответств. соответств. соответств. соответств.
	соответств.	2,39	3,35	8,53	0,5	0,3	42,3	8,4	3,0	
	соответств.	2,38	3,76	8,50	0,5	0,5	41,5	7,9	2,9	
	соответств.	2,35	3,56	8,77	0,5	0,5	42,5	8,4	3,0	
4.	соответств.	2,26	3,73	7,72	0,6	0,4	38,5	7,9	3,1	соответств. соответств. соответств. соответств.
	соответств.	2,23	3,96	7,89	0,5	0,4	37,9	7,7	3,2	
	соответств.	2,28	3,79	7,41	0,4	0,3	39,8	8,1	2,9	
	соответств.	2,24	3,81	7,40	0,4	0,3	37,0	7,7	3,1	
5.	соответств.	2,38	4,13	9,37	0,6	0,4	42,3	7,2	2,5	соответств. соответств. соответств. соответств.
	соответств.	2,41	4,43	8,89	0,4	0,3	45,4	6,9	2,4	
	соответств.	2,45	4,35	9,20	0,4	0,3	44,4	7,5	2,4	
	соответств.	2,41	4,29	8,96	0,5	0,4	42,8	7,2	2,5	

Срок годности листьев боярышника кроваво-красного устанавливался на основании экспериментального изучения стабильности опытных партий листьев боярышника в различных видах упаковки и оптимальных условиях хранения в соответствии с рекомендациями нормативной документации (гл. II, п. 2.2.2.). Стабильность сырья изучали путем периодического и систематического контроля показателей качества: влажности сырья, количественного содержания флавоноидов в листьях боярышника кроваво-красного.

Таблица 5.3.2

Определение сроков годности листьев боярышника кроваво-красного

№ серии	Год определения показателей качества	Влажность, %	Содержание флавоноидов, % (в пересчете на рутин)
1	2010	3,12±0,23	2,35±0,02
2	2010	4,39±0,24	2,41±0,09
3	2010	2,77±0,13	2,25±0,08
1	2011	3,52±0,23	2,14±0,08
2	2011	4,10±0,18	2,25±0,08
3	2011	3,13±0,22	2,07±0,06
1	2012	3,82±0,26	1,87±0,07
2	2012	4,65±0,28	1,96±0,08
3	2012	3,56±0,20	1,76±0,08
1	2013	3,96±0,26	1,42±0,05
2	2013	4,78±0,24	1,47±0,07
3	2013	3,75±0,23	1,45±0,05

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5:

1. Разработана методика качественного анализа листьев боярышника кроваво-красного: хроматография в тонком слое сорбента в системе этилацетат – муравьиная кислота – вода (14:3:3).
2. Разработана методика количественного определения флавоноидов в листьях боярышника методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин и проведена ее валидация.
3. Разработаны числовые показатели: содержание флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1,5%, ДЗП – не менее 30%, влажность - не более 10%, золы общей – не более 10%, частиц, не проходящих сквозь сито 4,5 мм – не более 10%, частиц, проходящих сквозь сито 0,5 мм – не более 4%, органической примеси – не более 1%, минеральной примеси – не более 0,5%.
4. Установлены сроки годности листьев боярышника кроваво-красного: 3 года.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО (*CRATAEGUS SANGUINEA* PALL.)

6.1. Определение острой токсичности листьев боярышника кроваво-красного

Острая токсичность листьев боярышника кроваво-красного изучалась на 24 белых мышах обоего пола от 18,0 – 20,0 при введении внутрь в дозах 5000, 7500 и 10000 мг/кг в пересчете на сухой вес сырья. Сырье вводили в виде 10% настоя. Наблюдение вели в течение 14 дней. При введении исследуемых доз настоя листьев боярышника не было отмечено никаких признаков интоксикации, все животные были живы, подвижны, аппетит хороший. Максимальная доза введения настоя составила 10000 мг/кг (табл.6.1.1). Дальнейшие токсикологические исследования не проводились из-за явной нетоксичности сырья.

Таблица 6.1.1

Определение острой токсичности листьев боярышника кроваво-красного

Доза, мг/кг	Путь введения	Наблюд. эффект	Наблюд. эффект, %	Ожид. эффект, %	Разница	Слагаемое для X_2
5000	внутри	0/6	0	-	-	-
7500	внутри	0/6	0	-	-	-
10000	внутри	0/6	0	-	-	-

По классификации ГОСТ 12.1.007.76, листья боярышника кроваво-красного были отнесены к классу малотоксичных соединений, что позволяет судить о безопасности данного вида сырья, и дает возможность дальнейших исследований.

6.2. Определение антиаритмической активности листьев боярышника кроваво-красного

Антиаритмическую активность исследовали на двух моделях аритмий: хлоридкальциевой и аконитиновой - на белых беспородных крысах массой 160-200 г согласно гл. II п. 2.2.5. В эксперименте испытывали настой из

листьев боярышника кроваво-красного, который готовили по общепринятой методике ГФ XI [26]. В качестве препарата сравнения использовали настойку плодов боярышника.

На хлоридкальциевой модели аритмии у животных контрольной группы после внутривенного введения CaCl_2 (250 мг/кг 10% раствора) регистрировали желудочковую экстрасистолию, резкую брадикардию, достигающую до асистолии – временной остановки сердца, и фибрилляцию желудочков, имевшую на ЭКГ вид затухающей синусоиды. Нарушения ритма в контроле сопровождались гибелью всех животных в течение первых 3 минут после введения аритмогена.

После профилактического приема настоя листьев боярышника нарушения ритма были кратковременными и менее тяжелыми - в виде одиночных экстрасистол и коротких периодов фибрилляции желудочков. Число случаев асистолии уменьшилось на 50%. Выживаемость в этой группе с последующим восстановлением синусового ритма составила 40%.

Курсовой прием настойки плодов боярышника не влиял на течение и исход хлоридкальциевой аритмии у 80% животных, т. е. не предупреждал возникновение желудочковых нарушений ритма и, как следствие, гибель животных.

Средняя продолжительность жизни погибших крыс от хлоридкальциевой интоксикации, получавших настой листьев боярышника, составила $17,33 \pm 2,4$ мин против $1,26 \pm 0,18$ мин в контроле и $8,2 \pm 0,8$ мин в группе, получавшей фармакопейную спиртовую настойку (табл. 6.2.1).

На аконитиновой модели аритмии после внутривенного введения аконитина в дозе 50 мкг/кг у животных развивались смешанные формы нарушений сердечного ритма предсердно-желудочкового типа, длительностью более 1,5 часа.

Таблица 6.2.1

Противоаритмическая активность настоя листьев и настойки плодов *Crataegus sanguinea* Pall.
на хлоридкальциевой модели аритмий при пероральном профилактическом введении (14 дней)

Группы	Асистолия, %	Фибрилляция, %	Экстрасистолия, %	Выживаемость, %	Продолжительность жизни животного, мин
Контроль	83,3	100	66,6	0	1,26±0,18
Препарат сравнения (настойка плодов боярышника)	66,6	83,3	50	16,6	8,2 ±0,8*
Настой листьев боярышника	50	66,6	33,3	40	17,33 ±2,4*,**

* – Различия статистически достоверны, в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

** – Различия статистически достоверны, в сравнении со спиртовым настоем ($p < 0,05$).

Таблица 6.2.2

Противоаритмическая активность настоя листьев и настойки плодов *Crataegus sanguinea* Pall.
на аконитиновой модели аритмий при пероральном профилактическом введении (14 дней)

Группы	Абсолютный антиаритмический эффект, %	Частичный антиаритмический эффект, %	Отсутствие антиаритмического эффекта, %	Латентный период возникновения аритмии, мин	Продолжительность аритмии, мин
Контроль	0	0	100	1,5 ± 0,09	120,6 ± 1,02
Препарат сравнения (настойка плодов боярышника)	0	20	80	2,1 ± 0,09*	100,0 ± 8,4*
Настой листьев боярышника	0	100	0	3,0 ± 0,07*,**	68,1 ± 4,2*,**

* – Различия статистически достоверны, в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

** – Различия статистически достоверны, в сравнении со спиртовым настоем ($p < 0,05$).

Абсолютный антиаритмический эффект - полное восстановление синусового ритма за период действия аконитина.

Частичный антиаритмический эффект - подавления частоты эктопических сокращений на 50 %, удлинение времени возникновения аритмии и укорочение длительности аритмии.

Отсутствие антиаритмического эффекта - развитие типичной аконитиновой аритмии.

В обеих группах (получавших настойку плодов и настой листьев боярышника) абсолютного антиаритмического эффекта (полного предотвращения возникновения аритмии) в сравнении с контролем не наблюдалось. Однако в обеих группах наблюдали достоверное увеличение латентного времени возникновения аритмии в среднем в 2 раза. При приеме настоя листьев боярышника латентное время возникновения аритмии увеличилось в 2,5 раза, что по сравнению с контролем было в 1,5 раза выше, чем при приеме настойки плодов боярышника (табл. 6.2.2).

Профилактический прием настоя листьев боярышника значительно облегчал течение аконитиновой аритмии, что выражалось в уменьшении возникновения желудочковой тахикардии и снижении частоты экстрасистол у всех животных. Восстановление сердечного ритма в этой группе наблюдалось в среднем через $68,1 \pm 4,2$ мин, что в 1,8 раза быстрее, чем в контроле ($120,6 \pm 1,02$ мин) и в 1,5 раза - чем в группе, принимавшей настойку плодов боярышника $100 \pm 8,4$ мин ($P \leq 0,001$).

В аналогичных условиях опыта настойка плодов боярышника в 20% случаев предупреждала возникновение желудочковой тахикардии. Не влияя на частоту возникновения экстрасистолии, настойка вызывала некоторое снижение эктопической активности (желудочковая и предсердная экстрасистолия) сердца на ЭКГ, однако у 80% животных это не привело к полному восстановлению нормального синусового сердечного ритма в течение 2 часов наблюдения [82].

6.3. Определение кардиопротективной активности листьев боярышника кроваво-красного

Кардиопротективную активность листьев боярышника кроваво-красного исследовали на белых крысах-самцах линии Вистар после профилактического приема и при экспериментальном адреналин-гипоксическом повреждении миокарда (гл. II п. 2.2.5).

Профилактическое введение в течение 14 дней настоя листьев боярышника изменяло исходные показатели электрокардиограмм опытной группы животных следующим образом. Наблюдалось укорочение интервалов QT и TP, но которое не было достоверным. Достоверно уменьшалась длительность зубца QRS, что свидетельствовало об улучшении проводимости возбуждения по желудочкам. Наблюдалось повышение зубцов R и T (улучшение химических восстановительных процессов, происходящих в мускулатуре желудочков), углубление зубца S. При этом сердечный ритм замедлялся с 358 до 324 ударов в минуту (табл. 6.3.1).

Таблица 6.3.1

Влияние растительных средств на показатели электрокардиограммы
при профилактическом приеме

№	Группа	ЧСС в мин	QT, с	TP, с	QRS, с	R, мВ	S, мВ	T, мВ
1.	Контроль	358,0	0,053	0,084	0,021	3,0	1,52	1,14
2.	Листья боярышника	324,2*	0,049	0,073	0,019*	5,26	1,76*	2,44*

* - различия статистически достоверны в сравнении с контролем ($p \leq 0,05$)

После экспериментального адреналин-гипоксического повреждения миокарда в контрольной группе животных наблюдались изменения исходных показателей электрокардиограммы в виде брадисистолии и мерцательной аритмии. Ритм сердца замедлился с 358 до 293 ударов в минуту, причем интервалы R-R были разные по продолжительности (табл.2). Во II стандартном отведении длительность интервалов составила: QT - 0,084 с (увеличился почти в 1,6 раз), TP - 0,68 с (уменьшился на 19%), QRS - 0,019 с (уменьшился на 10%). Вольтаж зубцов составил R - 2,89 мВ (уменьшился на 4%, что характеризует нарушение процесса деполяризации желудочков вследствие выключения части миокарда из процессов возбуждения), T - 1,5 мВ (увеличился на 31%), S - 1,76 мВ (увеличился на 16%). Это связано с тем, что введение адреналина крысам приводит к гиперполяризации

мембран, увеличению сократительной активности, увеличению содержания внутриклеточного кальция контрактурам миофибрилл, разобщению окислительного фосфорилирования. Перечисленные выше процессы представляют собой одну из форм метаболического и гипоксического стрессов, которые, как известно, приводят к конформационным изменениям внутриклеточного белка [71].

Таблица 6.3.2

Влияние растительных средств на показатели электрокардиограммы при адреналин-гипоксическом повреждении миокарда

№	Группа	ЧСС в мин	QT, с	TP, с	QRS, с	R, мВ	S, мВ	T, мВ
1.	Контроль	292,3	0,084	0,068	0,019	2,89	1,76	1,5
2.	Листья боярышника	291,6	0,108	0,043	0,024*	8,39*	2,76	3,39*

* - различия статистически достоверны в сравнении с контролем ($p \leq 0,05$)

У опытной группы животных на фоне приема настоя листьев боярышника не наблюдалось изменение частоты сердечных сокращений в среднем, но интервалы R-R были одинаковыми по продолжительности и наблюдалось снижение частоты возникновений мерцательной аритмии. Отмечалось также значительное повышение зубцов R и T, углубление зубца S (табл.6.3.2).

Таким образом, листья боярышника кроваво-красного усиливали биоэлектрическую активность сердца, что выразалось в повышении вольтажа зубцов электрокардиограммы, укорочении систолы, снижении или нормализации частоты сердечных сокращений. Это свидетельствует о наличии у листьев боярышника кардиопротективного действия [89].

6.4. Определение антиоксидантных свойств листьев боярышника кроваво-красного

Для исследования антиоксидантных свойств листьев боярышника кроваво-красного использовали две методики *in vitro*: спектрофотометрическую и метод хемилюминесценции.

Оценку антиоксидантной активности спектрофотометрическим методом осуществляли по способности ингибировать аутоокисление адреналина (глава II, п. 2.2.5). При расчете антиоксидантной активности также учитывали то, что водные извлечения имеют свою собственную окраску, которая поглощает определенную длину волны в видимой области спектра.



Согласно рис. 6.4.1. листья боярышника кроваво-красного обладают высокой антиоксидантной активностью (57%), превышающей препарат сравнения (50%).

Определение антиоксидантной активности методом хемилюминесценции проводилось в двух модельных системах, в которых генерировалось образование активных форм кислорода (АФК) и протекали реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), как наиболее распространенные процессы свободно-радикального окисления (глава II, п. 2.2.5).

Таблица 6.4.1

Влияние листьев боярышника в различных концентрациях
на хемилюминесценцию различных модельных систем

	Конц-я, г/мл	Модель АФК		Модель ПОЛ	
		Светосумма свечения	% контроля	Светосумма свечения	% контроля
Контроль		127,33±6,54	100	33,62±2,43	100
Листья боярышника	0,001	75,5±4,67	40,7*	5,66±0,29	83,2*
	0,005	32,17±1,65	74,7*	4,12±0,24	87,6*
	0,01	3,23±0,07	97,5*	0,36±0,01	98,9*
	0,05	1,3±0,03	98,9*	0,32±0,01	99,1*
Плоды шиповника (препарат сравнения)	0,001	106,1±5,41	16,7*	31,43±1,89	6,5
	0,005	63,57±4,23	50,1*	13,37±0,67	60,2*
	0,01	15,2±0,87	88,1*	3,59±0,18	89,3*
	0,05	11,9±6,54	90,7*	2,6±0,65	92,3*

* - $p < 0,05$

При анализе полученных данных (табл. 6.4.1) видно, что листья боярышника кроваво-красного снижали образование активных форм кислорода (светосумму свечения) в дозах от 0,01 до 0,1 мл - от 40,7 до 98,9%, а плоды шиповника в тех же дозах - от 16,7 до 90,7 %. Листья боярышника влияли и на скорость ПОЛ, снижая ее в среднем от 83,2 до 99,1% (плоды шиповника от 60,2 до 92,3 %) в зависимости от дозы [91].

Таким образом, по результатам проведенных исследований, можно сделать вывод о том, что листья боярышника кроваво-красного обладают антиоксидантной активностью.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6:

1. Проведена оценка биологических свойств листьев боярышника кроваво-красного: определена острая токсичность, установлены антиаритмические, кардиопротективные и антиоксидантные свойства.
2. Листья боярышника были отнесены к классу малотоксичных соединений.
3. Листья боярышника усиливают биоэлектрическую активность сердца, что выражается в повышении вольтажа зубцов электрокардиограммы, укорочении систолы, снижении или нормализации частоты сердечных сокращений.
4. Курсовой прием (14 дней) настоя листьев боярышника кроваво-красного оказывал противоаритмический эффект на аконитиновой модели, проявившийся в виде укорочения продолжительности аритмии и уменьшении ее выраженности по сравнению с контролем. На хлоридкальциевой модели настой также обладал противofiбрилляторной активностью и предотвращал гибель 40 % животных. Средняя продолжительность жизни погибших крыс от хлоридкальциевой интоксикации, получавших настой листьев боярышника, составила $17,33 \pm 2,4$ мин против $1,26 \pm 0,18$ мин в контроле и $8,2 \pm 0,8$ мин в группе, получавшей фармакопейную спиртовую настойку.
5. Листья боярышника кроваво-красного обладают высокой антиоксидантной активностью, превышающей препарат сравнения.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено морфологическое исследование листьев боярышника кроваво-красного. Уточнены морфологические признаки листьев. Выявлены новые анатомо-диагностические признаки исследуемого сырья.
2. Изучен химический состав основных групп биологически активных веществ листьев боярышника кроваво-красного, идентифицированы с использованием современных физико-химических методов 11 соединений фенольной природы, установлен состав полисахаридного комплекса, эфирного масла, макро- и микроэлементный состав, аминокислотный состав,. Определено количественное содержание обнаруженных групп биологически активных веществ.
3. Определено время заготовки листьев боярышника – период цветения растения (на основании динамики накопления флавоноидов, процианидинов и 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 антиоксидантная, антиаритмическая и кардиотоническая активности.
7. Разработан проект ФС «Боярышника листья».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анцышкина, А.М. Ботанико-фармакогностическое изучение боярышников Таджикистана (б. туркестанского, б. понтийского, б. гиссарского): автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02. - М, 1990. – 22 с.
2. 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.
3. Ареалы деревьев и кустарников СССР. В 3-х томах. Том 2: Гречишные – Розоцветные / под. ред. С.Я. Соколова [и др.]. - Л.: «Наука», 1980. – 96 с.
4. Арзамасцев, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. - 2006. - № 4. - С. 8-12.
5. Арзамасцев, А.П. Фармакопейный анализ / А.П. Арзамасцев. - М.: Медицина, 1971.
6. Атлас лекарственных растений СССР / под ред. Н.В. Цицина. М.: Госкомиздат, 1962. - С.45-48 .
7. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова -М.: Изд-во «Наука», 1995. - 175 с.
8. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - 2-е изд., перераб. и доп. — Ленинград: Медгиз, 1963. — 146 с.
9. Беликов, В.Г. Фармацевтическая химия. В 2 частях. Часть 1. Общая фармацевтическая химия: Учеб. для фармац. ин-тов и фак. мед. ин-тов. - М.: Высш. шк., 1993. - 432 с.
10. Беляков, К.В. Количественное определение полисахаридов в листьях мать-и-мачехи (*Tussilago farfara* L.) / К.В. Беляков, Д.М. Попов // Фармация. - 1999. - № 1. - С. 23-24.
11. Беляков, К.В. Методологические подходы к определению биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье спектрофотометрическим методом / К.В. Беляков. – М., 2004. - 188 с.

12. Буданцев, А.Л. Дикорастущие полезные растения России / А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская . - СПб.: СПХФА,2001. – 663 с.
13. Валидация аналитических методик: проект ОФС 42-0113-09. - [Б., м.], 2009. – 12 с.
14. Вафин Р. В. Боярышники. Интродукция и биологические особенности. / Р. В. Вафин, В. П. Путенихин. - М., 2003. - 240 с.
15. Ветров, П.П. Определение содержания липофильных веществ и суммы каротиноидов в растительном сырье / П.П. Ветров, С.В. Гарная // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. - №3. – С. 34-38.
16. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, П.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. — Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1990. — 333 с.
17. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. – М.: Бином, 1999. – 459 с.
18. Гончаров, А.Г. Исследование растительного полисахаридного комплекса /А.Г. Гончаров, Т.И. Исакова, Л.Д. Халеева // Актуальные вопросы поиска и технологии лекарств: Тез.докл. Республик. науч. конф. - Харьков,1981. - С.139.
19. Гончаров, Н.Ф. Гидроксикоричные кислоты *Crataegus chlorocarpa* Lenneet С. Koch., *Crataegus rotundifolia* Medic. / Н.Ф. Гончаров. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2009. - №3. – С. 42-43.
20. Гончаров, Н.Ф. Изучение эфирных масел цветков североамериканских видов боярышников / Н.Ф. Гончаров. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. - №5. – С. 52-55.
21. Гончаров, Н.Ф. Сравнительное изучение гидроксикоричных кислот и флавоноидных соединений плодов некоторых видов *Crataegus* L. / Н.Ф. Гончаров. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. - №5. – С. 49-52.
22. Гончаров, Н.Ф. Фенольные соединения североамериканских видов рода боярышник / Н.Ф. Гончаров, А.М. Ковалева, А.Н. Комиссаренко. //

- Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2008. - №3. – С. 150-154.
23. Горин, А.Г. Получение и фитохимическое исследование полисахаридов из лекарственных растений. / Горин, А.Г. // Всерос. съезд фармацевтов: Тез.докл. - Свердловск, 1975. - С.313-314.
 24. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 т. Т. 2: Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общей редакцией А. А. Шерякова. – Молодечно: Тип. «Победа», 2008. – 472 с.
 25. Государственная фармакопея Российской Федерации: ГФ. Ч. 1. – 12 изд. – Москва: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. – 704 с.: ил.
 26. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1: Общие методы анализа. / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – Москва: Медицина, 1989. – 335 с.: ил.
 27. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – Москва: Медицина, 1989. – 400 с.: ил.
 28. Губанов, И.А. Дикорастущие полезные растения СССР / И.А. Губанов, И.Л. Крылова, В.Л. Тихонова. - М.: «Мысль», 1976. - 360с.
 29. Гусейнов, Д.Я. Фармакология боярышника. – Б.: Азернешр. – 1985. – 154с.
 30. Денисова, М.Н. Определение содержания дубильных веществ в цветках и плодах некоторых представителей рода *Crataegus* L. / М.Н. Денисова, Т.Л. Киселева, И.А. Самылина // Ресурсоведческое и фитохимическое изучение лекарственной флоры СССР: Науч. тр. ВНИИФ - М., 1991. - Т. 29. - С. 136 - 144.
 31. Деревья и кустарники СССР: в 6 т. Т.3. - М.: Изд-во АН СССР, 1954. – С. 514-577.

32. Долгова, А.А. Практикум по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. – М.: изд. «Москва», 1966. – 182 с.
33. Евдокимова, О.В. Изучение липофильной фракции плодов боярышника / О.В. Евдокимова, И.А. Самылина, О.В. Нестерова. // Фармация. – 1992. - №3. – С. 60-61.
34. Евдокимова, О.В. О перспективном виде лекарственного растительного сырья - побегах боярышника / О.В. Евдокимова, И.А. Самылина, М.В. Кашникова // Фармация. - Т.43. – №4. – С. 28-30.
35. Евдокимова, О.В. Определение содержания суммы фосфолипидов и каротиноидов в плодах некоторых видов боярышника (*Crataegus*L.) / О.В. Евдокимова, И.А. Самылина, О.В. Нестерова. // Фармация. – 1992. - №6. – С.70-72.
36. Евдокимова, О.В. Фармакологическое действие препаратов боярышника // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: научные труды ВНИИФ. - 1999. - Т. 38, Ч. 2. - С.205-212.
37. Заркуа, Т.Г. Количественное определение тритерпеновых сапонинов в многокомпонентной растительной композиции / Т.Г. Заркуа, Д.М. Попов, А.Д. Бакуридзе. // Научные труды ВНИИФ «Современные аспекты изучения лекарственных растений», т. 34, Москва. - 1995. - С.177-180.
38. Зинченко, Л. А. Изучение промышленных отходов фармацевтического производства как дополнительных источников биологически активных соединений: (на примере шрота плодов боярышника и шрота листьев мяты): автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02. - Пятигорск, 2007. - 23 с.
39. Каверина, Н.В. Изучение специфической антиаритмической активности препаратов боярышника / Н.В. Каверина, З.П. Сеннова, И.А. Самылина [и др.]. // Фармация. – 1988. - №6. - с. 33-36.
40. Каверина, Н.В. Методические рекомендации по экспериментальному (фармакологическому) изучению препаратов, предлагаемых для

клинических испытаний в качестве средств для профилактики и лечения нарушений сердечного ритма / Н.В. Каверина, З.П. Сеннова. - М., 1981. - 154 с.

41. Кашникова, М.В. Ацетилвитексин – новый флавоноид из цветков *Crataegussanguinea* / М.В. Кашникова, В.И. Шейченко, В.И. Глызин [и др.]. // Химия природных соединений. – 1984. - №1. – С.108-109.
42. Кашникова, М.В. Фармакогностическое изучение сырья боярышника: автореф. дисс. ... канд. фарм. наук: 15.00.02. / М.В. Кашникова. – М., 1984. - 20 с.
43. Кашникова, М.В. Флавоноиды цветков *Crataegussanguinea* // Химия природных соединений. – 1984. - №1. – С.108.
44. Киселева, Т.Л. Изучение микроэлементного состава препаратов / Т.Л. Киселева, И.А. Самылина, Л.П. Орлова, В.П. Фролов. // Хим.-фармацевт. журн. - 1989. - №5. - С.614-618.
45. Киселева, Т.Л. Изучение химического состава нефармакопейных видов боярышника и разработка показателей качества сырья: автореф. дис. ... канд. фармацев. наук: 15.00.02. / Т.Л. Киселева. – М., 1988. – 21 с.
46. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина [и др.]; Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. ин-т органической химии. - Новосибирск: Академическое изд-во «Тео», 2007. - 232 с.
47. Котова, Э.Э. Стандартизация плодов боярышника и лекарственных препаратов на их основе по показателю «Количественное определение» / Э.Э. Котова, А.Г. Котов, Н.П. Хованская // Фармаком. - 2004. -№4. - С. 35 – 41.
48. Кочетков, Н.К. Химия биологических активных природных соединений / Н.К. Кочетков. - М.: Химия, 1970. - 378 с.
49. Кудашкина, Н.В. Фитохимический анализ: учеб. пособие по фармакогнозии для студентов. / Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова, С.А.

- Мещерякова. - Уфа.: Издательство ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВа, 2007. - 281 с.
50. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО «Офорт» СамГМУ, 2004. - 1180 с.
 51. Кучеров, Е.В. Лекарственные растения Башкирии, их использование и охрана / Е.В. Кучеров, Д.Н. Лазарева, В.К. Десяткин. - Уфа, 1989. - 272с.
 52. Кучеров Е.В., Лазарева Д.Н. Целебные растения и их применение. - Уфа, 1993. - 288 с.
 53. Лазуко, С.С. Сравнительная оценка влияния настоек боярышника, полученных различными способами, на электрическую активность миокарда у кроликов / С.С. Лазуко, А.А. Красильников, Г.А. Хуткина [и др.] // Вестник фармации. – 2008. - №1 (39). – С. 48-52.
 54. Лазуко, С.С. Сравнительная оценка антиаритмической активности настоек боярышника, полученных различными способами / С.С. Лазуко, А.А. Красильников, Г.А. Хуткина [и др.] // Вестник фармации. – 2009. - №2 (44). – С. 55-64.
 55. Ляхова, Н.С. Фармакологическое изучение суммарных извлечений из плодов боярышника: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 14.00.25. / Н.С. Ляхова. - Пятигорск, 2008. - 22 с.
 56. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е изд. - Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
 57. Мартюшова, Е.Г. Сравнение анатомического строения побегов евроазиатских и североамериканских боярышников. / Е.Г. Мартюшова // Научно-практический журнал "Вестник ИрГСХА" Вып. 44, 2011. - С. 82-87.
 58. Машковский, М. Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. / М.Д. Машковский. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2008. – С. 425.
 59. Меерсон, Ф.З. Нарушение сократительной функции неишемизированного отдела сердца при экспериментальном инфаркте

- миокарда и его предупреждение. / Ф.З. Меерсон, Р.С. Досмагамбетова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1982. – № 6. – с.57-60.
60. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных / Хроника ВОЗ. – 1985. – № 39(3). - С. 3 – 96.
61. Морозова, Е.И. Лекарственные свойства и применение боярышника, облепихи и шиповника. - Донецк, 2006. - 240с.
62. Муравьев, И.А. О природе веществ плодов кроваво-красного боярышника, определяющих их кардиотропную активность / И.А. Муравьев, Н.Д. Бреднева // Фармация. – 1987. – №3. – с.32-34.
63. Никитина, Т.И. Фармакогностические исследования по разработке лекарственных растительных средств противовоспалительного, ранозаживляющего и антиаллергического действия: дисс. ...д-ра фармацевт. наук: 15.00.02. / Т.И. Никитина. – Уфа, 1996. – 335 с.
64. Патент №2144674 (Россия). Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Т.В. Сирота / 20.01.2000.
65. Потанина, О.Г. Оценка доброкачественности лекарственного растительного сырья с учетом диагностически значимых признаков / О.Г.Потанина, И.А.Самылина // Фармация. - 2003. - №4. - С. 12-14.
66. Потеря в массе при высушивании: ОФС 42-0087-08. - [Б., м.], 2008. – 1 с.
67. Практикум по фармакогнозии: учеб. пособие для студ. вузов / В.Н. Ковалев [и др.]. – Харьков: Изд-во НФаУ; Золотые страницы; МТК–Книга, 2004. – 512 с.
68. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.2. / под ред. А.Л. Буданцева. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 513 с.

69. Родионова, Т.В. Сравнительная количественная оценка содержания флавоноидов в растительном сырье боярышника кроваво-красного / Т.В. Родионова, О.М. Хишова. // Вестник фармации. - 2008. - №1 (39). - С.15-18.
70. Родионова, Т.В. Стандартизация листьев боярышника / Т.В. Родионова, О.М. Хишова. // Вестник фармации. – 2008. - №2 (40). - С.70-78.
71. Рунович, А.А. Влияние ксеногенных неонатальных кардиомиоцитов на индукцию белков теплового шока при катехоламиновом повреждении миокарда в эксперименте. / А.А. Рунович [и др.] //Современные наукоемкие технологии. - 2004. - № 3. - С. 117-118.
72. Рыжикова, М.А. Влияние водных извлечений из некоторых лекарственных растений на процессы свободно-радикального окисления. / М.А. Рыжикова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. -1999. - Т.62. - № 2. - С. 36-38.
73. Самылина, И.А. Изучение химического состава нефармакопейных видов боярышника и оценка их фармакологической активности / И.А. Самылина, Т.Л. Киселева. // Фармация – 1990. - №1. – С.12-17.
74. Самылина, И.А. Использование хлорида алюминия для определения суммы флавоноидов в цветках боярышника / И.А. Самылина, О.В. Евдокимова, М.В. Кашникова. // Фармация. – 1994. - №6. – С. 42-45.
75. Самылина, И.А. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах боярышника / И.А. Самылина, Т.Л. Киселева // Фармация. – 1987. - №5. - С. 30 – 32.
76. Самылина, И.А. О фармакологической активности препаратов боярышника / И.А. Самылина // Фармация. – 1990. - №2. - С. 63-65.
77. Самылина, И. А. Разработка показателей качества настоя цветков боярышника / И.А. Самылина, Т.Л. Киселева, О.В. Евдокимова // Хим.-фармацевт. журн. – 1990. - Т.24. - №1. - С. 52-53.
78. Самылина, И.А. Фармакогностическое изучение некоторых представителей рода боярышник / И.А. Самылина, Т.Л. Киселева // Сб.

- научн. тр. ВНИИФ «Ресурсоведческое изучение лекарственной флоры СССР». - М. - 1987. - Т.25. - С. 75-78.
79. Сафонова, М.Ю. Изучение сборов для профилактики и лечения нарушений ритма сердца / М.Ю. Сафонова, Е.И. Саканян, Е.Е. Лесиовская [и др.] // Тез. докл. Всерос. науч. конф. «Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств». – СПб. – 1996. – С. 161.
80. Степаненко, Б. Н. Химия и биохимия углеводов (полисахариды). — М.: Высш. школа, 1978. — 256 с.
81. Точкова, Т.В. Спектрофотометрический метод количественного определения суммы флавоноидов в цветках липы / О.В. Точкова, В.Н. Бубенчикова. // Научные труды ВНИИФ «Ресурсоведческое и фитохимическое изучение лекарственной флоры СССР». – Т.29, Москва. - 1991. - С.150-155.
82. 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.
83. 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. – 103-105.
84. 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.

85. ТУ 9161-037-46865780-03. БАД таблетки «Виратон», рег. уд. 77.99.02.916.Б.000641.0803.
86. Фармакопейная статья предприятия «Донника трава» № 42-0330168301 (Регистрационное удостоверение Р № 001219/01-2002).
87. Фархутдинов, Р.Г. Определение содержания йода в растениях Республики Башкортостан / Р.Г. Фархутдинов, Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова [и др.]. // Растительные ресурсы. – 2013. – Т.49. - №1. – С.139-146.
88. Фролова, Н.Ю. Сравнительная оценка болеутоляющего действия ряда новых средств растительного происхождения / Н.Ю. Фролова, Т.И. Меньшикова, М.Е. Дьякова [и др.] //Тез. докл. 2-й конф. Росс. Ассоциации по изучению боли. – СПб. – 1995. – С. 186-188.
89. 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.
90. 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.
91. Хасанова, С.Р. Исследование антиоксидантной активности листьев боярышника кроваво-красного методом хемиллюминесценции / С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова, Н.В. Кудашкина [и др.]. // Традиционная медицина. – 2012. - № 5. – С. 316-317.
92. 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.

93. Хасанова, С.Р. Фармакогностическое изучение сборов для лечения нейроциркуляторных дистоний: дисс. ...канд. фармац. наук: 15.00.02. / С.Р. Хасанова. – Пермь, 2000. – 161 с.
94. Хаятулла Насрулла Масуди. Влияние экстракта боярышника на мозговое кровообращение и некоторые показатели метаболизма головного мозга: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 14.00.25. - Пятигорск, 1995. - 18с.
95. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармац. вузов / Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова [и др.] // под ред. Гринкевич Н.И., Л.Н. Сафронич - М.: Высш.школа, 1983. - 176 с., ил.
96. Хишова, О.М. Количественное определение процианидинов плодов боярышника / О.М. Хишова, Г.Н. Бузук // Химико-фармацевтический журнал. -2006. – Т. 40. - №2. - С. 20—21.
97. 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.
98. Цвелев, Н.Н. Боярышник – *Crataegus L.* / Флора Восточной Европы. Т.10. - Спб.: Мир и семья; изд. СПХФА, 2001. - С.557-586.
99. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты. Пептиды. Белки.: Пер. с нем. / Х.-Д. Якубке, Ешкайт Х. – М.: Мир, 1985. – 456 с., ил.
100. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / М-во здравоохранения и социал. развития Рос. Федерации – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>. – Загл. с экрана.
101. Электронный справочник лекарственных средств «Видаль» [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.vidal.ru>. – Загл. с экрана.
102. Аминокислоты [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/218.html>. – Загл. с экрана.

103. 8-Methoxykaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna* / Jean-Claude Dauguet [et al.] // *Phytochemistry*. – 1993. – Vol.33 (6). – P. 1503-1505.
104. A comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers / D.W. Griffiths [et al.] // *Phytochemistry*. – 2000. – Vol. 55(2). – P. 111-6.
105. Beek, T.A. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts// *J. of Chromatography A*. - 2002. - № 967. - P.21-35.
106. Blesken, R. *Crataegus* in cardiology / *Fortschr Med* 110(15): 290292, 1992.
107. Braun, R. *Standardzulassungen für Fertigarzneimittel. Text and Kommentar*. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1997.
108. *British Pharmacopeia 2009* / *British Pharmacopoeia Commission*. – London: Crown Copyright. - 2009. – 10952 p.
109. *European Pharmacopeia 6.0* / *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*. – 2008. - P. 2035-2038.
110. Hanack, T. The treatment of mild stable forms of angina pectoris using *Crataegutt novo* / T. Hanack, M.H. Breckel // *Therapiewoche* 33:43314333, 1983.
111. High-performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidins from dimmers up to the hexamer in hawthorn / Ulla Svedström [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2002. – 968. – P. 53-60.
112. Identification of volatile compounds of hawthorn by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) / Chen L. [et al.] // *Se Pu*. – 1997. – 15(3). – P. 219-21.
113. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers / Ulla Svedström [et al.] // *Phytochemistry*. – 2002. – № 60. – P. 821-825.
114. Leuchtgens, H. *Crataegus* special extract WS 1442 in NYHA II heart failure. A placebo controlled randomized double-blind study / *Fortschr Med* 111(2021):352354, 1993.

115. Melikoglu, G. Flavonoids of *Crataegus stevenii* / G. Melikoglu, A.H. Mericli // *Pharmazei*. – 2000. – Vol.55. – N4. – P. 326-327.
116. Mericli, A.H. Flavonoids of *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers. (Rosaceae), an epidemic species from Turkey / A.H Mericli, K. Ergezen // *Sci. Pharm.* – 1994. – Vol.62. – N3. – P. 277-281.
117. Mina K., Chung. Hawthorn leaf with flower / *Cardiology in Review*. – 2004. - Vol.12 (2). – P. 73-80.
118. Mrugasievitcz, K. Badanie swiazkow flawonoidowych w lisciach niektorych gatunkow glogu // *Biul. Inst. Rosl. Leczniczych*. – 1963. – T.9. – N 1-2. – S. 1-11.
119. Porter, L. J. *Phytochemistry* / L. J. Porter, L. N. Hrstich, B. G. Chan.- 1986. – P. 223-230.
120. Research of the amounts of flavonoids accumulated in the crude drug of single-styled hawthorn / Jakstas V. [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. - 2003. – № 39(2). – P.45-9.
121. Research of the amounts of flavonoids accumulated in the buds of single-styled hawthorn / Jakstas V. [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. - 2004. – № 40(8). – P.750-2.
122. Reuter, H. *Crataegus* (Hawthorn): a botanical cardiac agent / *Z Phytother* 15:7381, 1994.
123. Schultz, V. *Rational Phytotherapy: A Physicians Guide to Herbal Medicine* / New York: Springer, 1998.
124. Steinhoff, B. Herbal medicines increasingly preferred / *Pharmazeutische – Zeitung*. – № 142 (49): 44124417.
125. Tauchert, M. Effectiveness of hawthorn extract LI 132 compared with the ACE inhibitor Captopril: Multicenter double-blind study with 132 NYHA Stage II / M. Tauchert, M. Ploch, W.D. Hubner // *Muench Med Wochenschr* 136 suppl: S27S33, 1994.
126. *United States Pharmacopoeia (USP 32 – NF 27)*. – 2009.

127. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants – Vol. 2. World Health Organization. Geneva.– 2004. – P. 142-145.
128. Zhang, P.-Ch. Studies of the chemical constituents of the fruits from *Crataegus sanguinea* / P.-Ch. Zhang, S.-X. Xu, H. Guo // *Shenyang Huagong Xueyuan Xuebao*. - Vol.13.- N2. - P. 87-89.; *Chem. Abstrs.* - 2000. - Vol. 132. - N 248526.
129. Zhang, P. Isolation and structural identification of a new flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* / P. Zhang, S. Xu // *ZhongguoYaowu Huaxue Zazhi*. - Vol. 9. - N3. - P.214-215.;*Chem. Abstrs.* - 1999. - Vol. 132. - N 276627.

ПРИЛОЖЕНИЯ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Директор ЦФиМС ФГБУ
«Научного центра экспертизы средств
медицинского применения» Минздрава
России

Е.И. Саканян
" ____ " _____ 20__ г.

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Производитель: ООО «Травы Башкирии», г.Уфа

Заявитель: ООО «Травы Башкирии», г.Уфа

Разработчик: ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Folia Crataegi sanguineae

ФСП 42-_____- ____

Боярышника кроваво-красного листа

Вводится впервые

Срок введения установлен

« ____ » _____ 20__ года

Срок действия до

« ____ » _____ 20__ года

Настоящая фармакопейная статья распространяется на собранные в фазу цветения и высушенные листья дикорастущего многолетнего растения боярышника кроваво-красного – *Crataegus sanguinea* Pall., сем. розоцветных – Rosaceae, цельные или измельченные, расфасованные в упаковки «ангро» и пачки.

ФСП 42- _____ с.2

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
<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
Упаковка		Цельное сырье упаковывается по 15 кг в мешки бумажные многослойные; в мешки полипропиленовые из пропилена окрашенного; по 20 кг в мешки тканевые продуктовые.
Маркировка		Соответствует ФСП
Транспортирование		
Хранение		В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C
Срок годности		3 года

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Листья очередные, с прилистниками или без них, простые, короткочерешковые, длиной 2-6 см, шириной 2-8 см, яйцевидные с ширококлиновидным основанием, более или менее глубоколопастные с крупнозубчатым краем. Жилкование перисто-краевое. Жилки зеленые, выдаются с нижней стороны листа. Цвет листьев зеленый с верхней стороны и светло-зеленый - с нижней. В месте прикрепления черешка по два прилистника несимметричной серповидной формы, с мелкопильчатым краем, цвет прилистников - зеленый с верхней стороны, и светло-зеленый с нижней. Жилкование прилистников перисто-краевое. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листьев различной формы и размера, обломки черешков, прилистников, проходящие сквозь сито размером 4,5 мм, цвет кусочков листьев зеленый с верхней стороны и светло-зеленый - с нижней. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

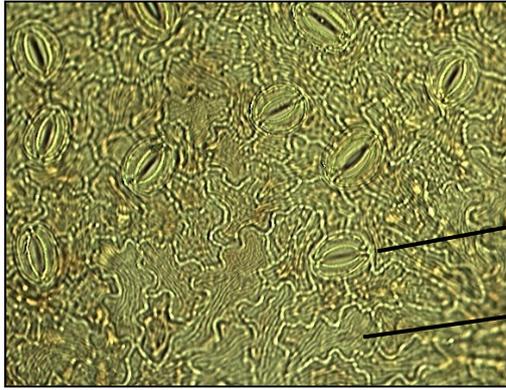
Микроскопия.

Цельное сырье. Клетки верхнего эпидермиса - многоугольные, прямостенные, с четковидными утолщениями (рис.2); нижнего - с извилистыми стенками (рис.1). Кутикула на обеих сторонах образует складки (рис.1, 2). Устьица крупные, многочисленные, располагаются на нижней стороне листа, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) (рис.1). На обеих сторонах листа встречаются многочисленные волоски - простые одноклеточные, толстостенные, с основанием, погруженным в эпидермис (рис.1, 2). На нижней стороне листа волоски располагаются преимущественно по жилкам (рис.1). В месте прикрепления волоска эпидермис образует розетку из 5-7 округлых клеток, окрашенных в бурый цвет (эфирное масло) (рис.1, 2). 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 (рис. 1). На верхушке листовой пластинки и сегментах - многоклеточные железки с бу-

рым содержимым (рис. 3). По краю листовой пластинки – редкие простые, длинные, одноклеточные, толстостенные волоски, у основания листа – многочисленные (рис. 4).

Анатомо-диагностические признаки прилистников: клетки верхнего и нижнего эпидермиса - многоугольные, со слабоизвилистой стенкой, с четковидными утолщениями (рис.11). Кутикула на обеих сторонах образует складки (рис.9), наиболее интенсивно складки образуются вокруг устьиц (рис.10). Устьица крупные, многочисленные, располагаются на нижней стороне прилистника небольшими группами, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) (рис.10). Очень редко на верхней стороне прилистников встречаются простые одноклеточные, толстостенные волоски, с основанием, погруженным в эпидермис (рис.8). В мезофилле прилистника и вдоль жилок встречаются крупные друзы (рис.8) и кристаллы оксалата кальция (кубические и цилиндрические) в виде кристаллоносной обкладки жилок (рис.12). На верхушке прилистника и по краю – многочисленные железки (многоклеточная головка на многоклеточной ножке) с бурым содержимым (рис.5,6). Такие железки очень редко встречаются на поверхности эпидермиса прилистников (рис.7). Жилки прилистника окрашиваются суданом III в розовый цвет (рис.12).





- 1- друзы оксалата кальция
- 2- кристаллоносная обкладка жилки листа
- 3- простые одноклеточные волоски
- 4- устьица аномоцитного типа
- 5- складчатость кутикулы на нижней стороне листа
- 6 – простой одноклеточный волосок верхнего эпидермиса
- 7 – складчатость кутикулы верхней стороны листа
- 8 – основание волоска
- 9 – четковидные утолщения

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

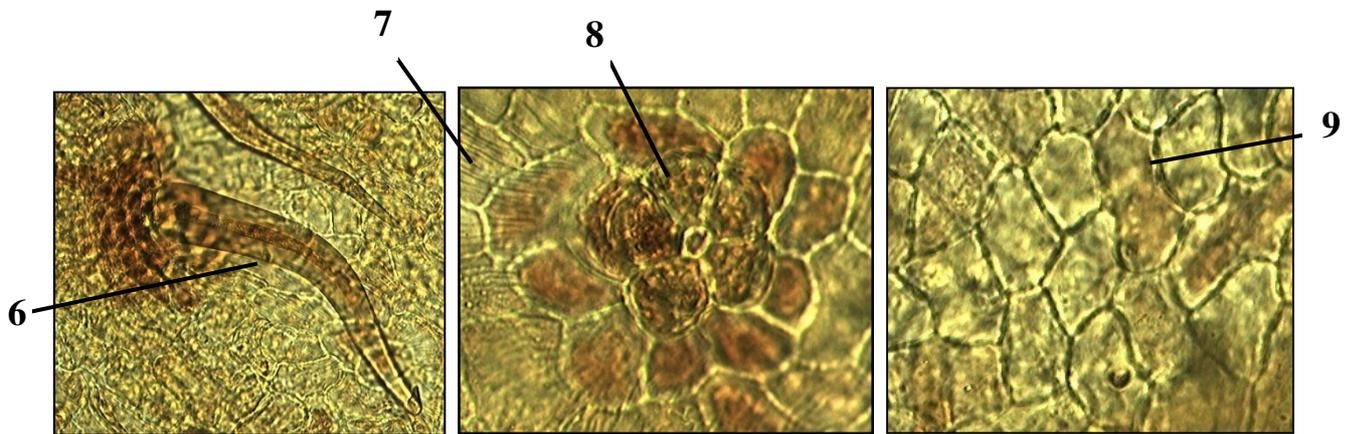


Рис.2. Эпидермис верхней стороны листа боярышника кроваво-красного

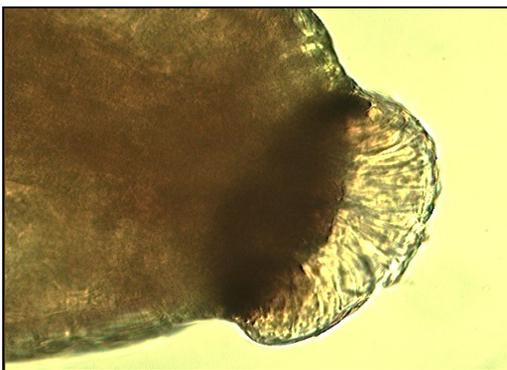


Рис.3. Многоклеточная железа на верхушке зубца листа

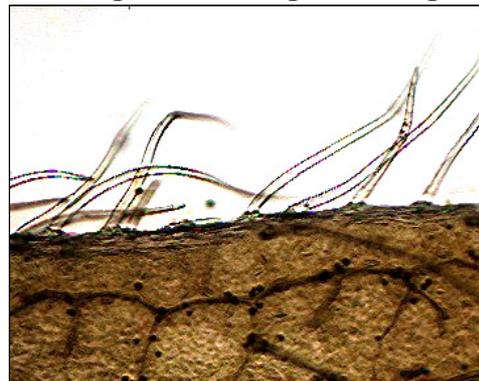


Рис.4. Край листовая пластинки (в основании листа) боярышника кроваво-красного



Рис.5. Прилистник листа боярышника кроваво-красного

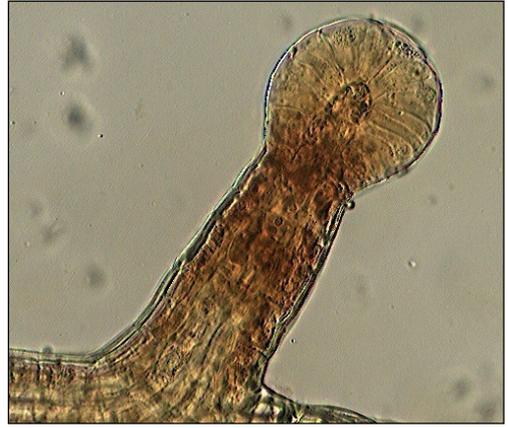


Рис.6. Железка на краю прилистника (многоклеточная головка на многоклеточной ножке)

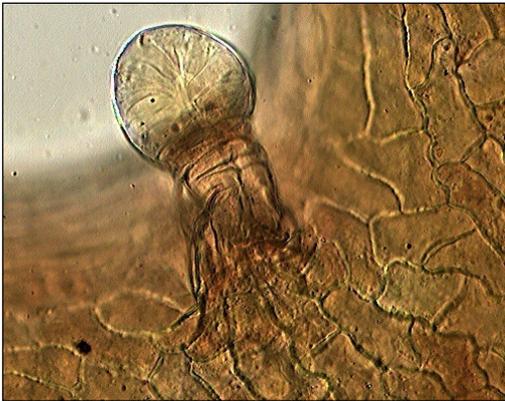


Рис.7. Железка на поверхности эпидермиса прилистника

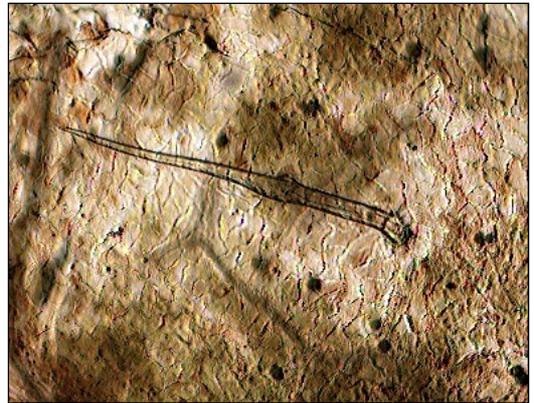


Рис. 8. Одноклочный простой волосок на верхней стороне прилистника

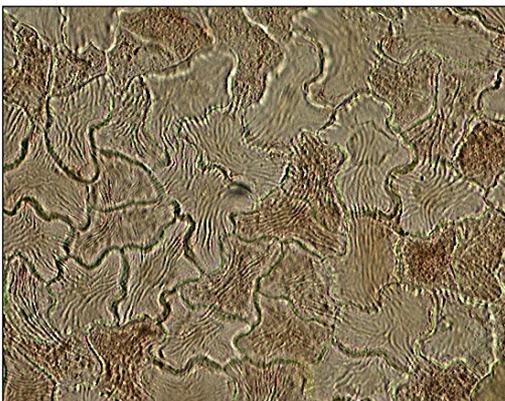


Рис. 9. Эпидермис верхней стороны прилистника (складчатость кутикулы)



Рис. 10. Устыица на нижней стороне прилистника

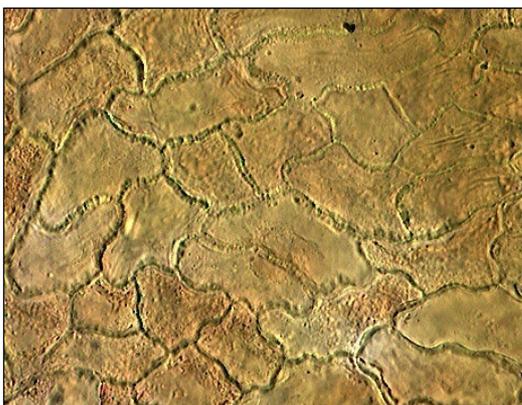


Рис. 11. Эпидермис верхней стороны прилистника (четковидные утолщения)

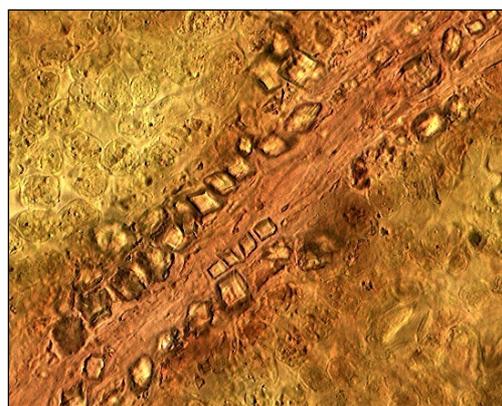


Рис.12. Жилка прилистника, окрашенная суданом III (эфирное масло) и кристаллоносная обкладка жилки

Измельченное сырье.

Представляет собой фрагменты эпидермиса верхней и нижней стороны листа, фрагменты жилок листа, сопровождающихся простыми толстостенными одноклеточными волосками (рис.13), фрагменты края листовой пластинки с простыми одноклеточными волосками по краю (рис.15), фрагменты верхушки сегментов листа с многоклеточной железкой (рис. 14), фрагменты эпидермиса с розеткой из 5-7 клеток в основании волоска (рис.17). Практически на всех фрагментах присутствуют друзы оксалата кальция, чаще всего вдоль жилок листа (рис.13,15). Тип устьичного аппарата - аномоцитный (рис.17). Реже встречаются обрывки прилистников, которые можно отличить от обрывков листа по наличию многоклеточных железок с бурым содержимым на многоклеточной ножке по краю прилистника и на поверхности его эпидермиса (рис.16).



Рис.13. Фрагменты листа



Рис.14. Фрагменты верхушки сегмента листа

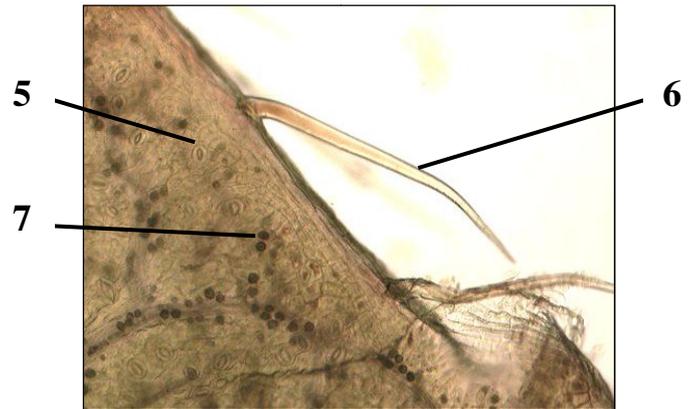


Рис.15. Фрагмент края листовой пластинки

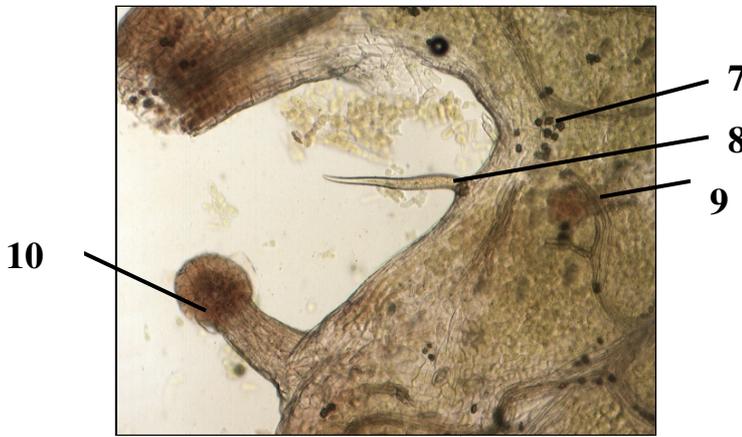


Рис. 16. Фрагмент прилистника листа боярышника кроваво-красного

- 1 – простые одноклеточные волоски,
- 2 – устьица,
- 3 - друзы оксалата кальция вдоль жилки
- 4 - многоклеточная железка
- 5 - устьица на нижней стороне,
- 6 - простые одноклеточные волоски по краю
- 7 – друзы оксалата кальция
- 8 – простой одноклеточный волосок
- 9 – железка на поверхности прилистника (многоклеточная головка на многоклеточной ножке)
- 10 – железка по краю прилистника
- 11 - складчатость кутикулы
- 12 - розетка клеток в основании волоска

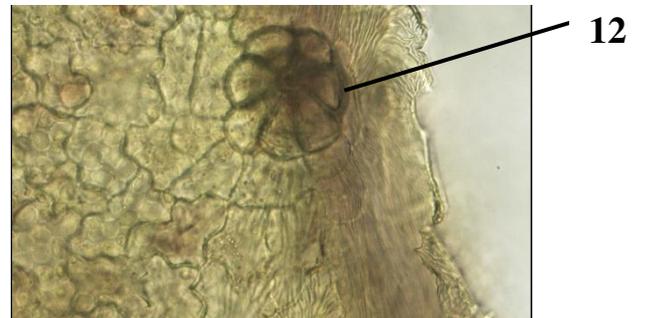
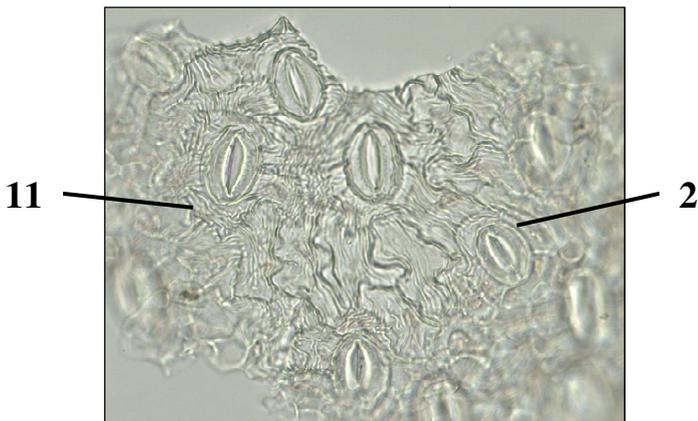


Рис. 17. Фрагмент эпидермиса нижней стороны листа

Качественные реакции.

На линию старта пластинки «Silufol UV-254» капилляром наносят 0,02 мл подготовленного извлечения (раздел 5.2.1) и по 0,02 мл 0,05% растворов РСО рутина, гиперозида, хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в предварительно насыщенную смесью растворителей камеру, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 12 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут. При просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 365 нм обнаруживаются 7 основных пятен, 3 из которых предположительно с R_f около 0,44 рутин, с R_f около 0,62 гиперозид, с R_f около 0,7 хлорогеновая кислота (рис.18). После проявления пластинки 3% спиртовым раствором алюминия хлорида происходит изменение окраски пятен.

Примечание:

1. Подготовка пластинок. Пластины «Silufol UV-254» вырезают размером 14×5 см, наносят линию старта на расстоянии 1 см от края и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 часа.
2. Приготовление системы растворителей для хроматографирования. Для проведения ТСХ-анализа рекомендуется система растворителей: этилацетат-муравьиная кислота-вода (14:3:3). Система используется свежеприготовленная. Насыщение камеры для хроматографирования системой растворителей в течение 1 часа.
3. Приготовление раствора проявителя. 5,4 г алюминия хлорида 6-водного растворяют в 80 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки, перемешивают.
4. Приготовление растворов сравнения.

Растворы рутина и гиперозида: около 0,05 г (точная навеска) РСО, предварительно высушенного при температуре 130-135°С (100-105°С для

гиперозида) в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки и перемешивают.

Раствор хлорогеновой кислоты: около 0,05 г (точная навеска) РСО растворяют в 95% этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят до метки.

Верх хроматографической пластинки	
Хлорогеновая к-та (Флуоресцирующая зона голубого цвета)	Зона темно-фиолетового цвета (вещество 7)
Гиперозид (Флуоресцирующая зона желто-зеленого цвета)	Флуоресцирующая зона голубого цвета (вещество 6)
Рутин (Флуоресцирующая зона желтого цвета)	Флуоресцирующая зона голубого цвета (хлорогеновая к-та)
	Флуоресцирующая зона желто-зеленого цвета (гиперозид)
	Флуоресцирующая зона желтого цвета (рутин)
	Флуоресцирующая зона светло-желтого цвета (вещество 2)
	Флуоресцирующая сиреневого цвета (вещество 1)
Растворы сравнения	Испытуемый раствор

Рис. 18. Схема хроматограммы листьев боярышника в системе этилацетат - муравьиная кислота - вода (14:3:3)

Числовые показатели.

Цельное сырье. Содержание флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,5 %, ДЗП не менее 30%, влажность не более 10%, золы общей не более 10%, органическая примесь не более 1,0%, минеральная примесь не более 0,5%.

Измельченное сырье. Содержание флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,5 %, ДЗП не менее 30%, влажность не более 10%, золы общей не более 10%, органическая примесь не более 1,0%, минеральная примесь не более 0,5%, частиц, не проходящих сквозь сито d=4,5 мм не более 10%, частиц, проходящих сквозь сито d=0,5 мм не более 4%.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии со ст.32 ГФ XII «Микробиологическая чистота». Листья боярышника соответствуют категории 4А.

Количественное определение.

Аналитическую пробу листьев боярышника кроваво-красного измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу термостойкого стекла со шлифом вместимостью 200-250 мл, прибавляют 100 мл 80 % этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Затем полученное извлечение осторожно фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу на 200 мл, избегая попадания частиц сырья в воронку. К оставшемуся в колбе сырью прибавляют 100 мл 80 % этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Колбу охлаждают в течение 15 минут. Содержимое колбы фильтруют в мерную колбу с первой порцией извлечения через тот же бумажный фильтр. Оставшееся в колбе сырье ополаскивают 20 мл 80 % этилового спирта и фильтруют в мерную колбу. Полученное извлечение доводят в мерной колбе до 200 мл (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 3 мл раствора А, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора хлорида алюминия и доводят раствор до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 409 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3 мл раствора А, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты, доведенный 95% этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность комплекса раствора РСО рутина с раствором алюминия хлорида: к 1 мл 0,05% раствора рутина

прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят раствор этиловым спиртом 95% до 25 мл в мерной колбе (раствор С).

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 200 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 3 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность анализируемого раствора (раствор В);

A₀ – оптическая плотность комплекса РСО рутина с алюминия хлоридом (раствор С);

m – навеска сырья в граммах;

m₀ – навеска РСО рутина в граммах;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Примечание.

1. Приготовление раствора рабочего стандартного образца (РСО) рутина: около 0,05 г (точная навеска) РСО рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки и перемешивают.

2. Приготовление 3% спиртового раствора алюминия хлорида: 5,4 г алюминия хлорида б-водного растворяют в 80 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки, перемешивают.

Упаковка. Цельное сырье упаковывается по 15 кг в мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226-88; в мешки полипропиленовые из пропилена окрашенного по ГОСТ 26 996-86, для лекарственных средств или пищевых продуктов; по 20 кг в мешки тканевые продуктовые по ГОСТ 30 090-93. На мешки наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86, бумаги писчей по ГОСТ 18 510-87.

Маркировка. На этикетке указывают: наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес, название лекарственного средства на русском и латинском языках, масса 15 или 20 кг при влажности 10 %, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия хранения, условия отпуска, способ применения и дозы, «Продукция прошла радиационный контроль», штриховой код. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с требованиями ГОСТ 6077-80, ГОСТ 14 192-96.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296. В сухом, защищенном от света месте. Не фасованное сырье в хорошо проветриваемом помещении.

Срок годности. 3 года.

Проректор по научной и
инновационной работе
ГБОУ ВПО «Башкирский
государственный медицинский
университет» Минздрава
России, д.фарм.н., профессор



В.А. Катаев

« 2 » апреля 20¹⁴ г.

Генеральный директор
ООО «Травы Башкирии»



А.А. Иванов

« 2 » апреля 20¹⁴ г.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО БГМУ
Минздрава России, профессор

Павлов В.Н.

« » 2014 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов диссертационной работы Трофимовой Светланы Валерьевны
«Фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного
***Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана»,**

представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук 14.04.02
 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Комиссия в составе: председатель - заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н., профессор Кудашкина Н.В.

члены комиссии: профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н Пупыкина К.А., доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, к.фарм.н. Афанасьева Ю.Г.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Трофимовой Светланы Валерьевны «Фармакогностическое изучение листьев боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall. из флоры Башкортостана», внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. (450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3) применяются при изучении вопросов качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды и при разработке методов стандартизации лекарственного растительного сырья и средств растительного происхождения.

Председатель комиссии

Члены комиссии:

Н.В. Кудашкина

К.А. Пупыкина

Ю.Г. Афанасьева

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО БГМУ

Минздрава России, профессор

Павлов В.Н.



« »

2014 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ ЛИСТЬЕВ
БОЯРЫШНИКА КРОВАВО-КРАСНОГО**

Боярышник кроваво-красный *Crataegus sanguinea* Pall. – высокий кустарник, реже небольшое дерево высотой 1-4 м. Побеги крепкие, пурпурно-коричневые, несут прямые колючки, достигающие 5 см длины. Листья обратнояйцевидные, трех-семилопастные, с обеих сторон волосистые. Сверху темно-зеленой окраски, по краю остропильчатые с клиновидным основанием. Снизу листья светло-зеленые. Цветки белые, слегка розоватые, диаметром 12-15 мм, в густом щитковидном соцветии, насчитывают около 20 тычинок с пурпуровыми пыльниками. Соцветия 3-4 см длиной и 4-5 см шириной. Плоды – диаметром 8-10 мм, обычно округлые, кроваво-красные, очень редко оранжево-желтые, с 2-4 (1-5) косточками и мучнистой мякотью. Цветет боярышник кроваво-красный в мае-июне, плоды созревают в августе.



Рис.1. Боярышник кроваво-красный

Боярышник кроваво-красный имеет евразийский тип ареала. Растет в разреженных лесах, по лесным опушкам и берегам рек в лесостепной и южной части лесной зоны Западной и Восточной Сибири, восточных районах европейской части СНГ, Забайкалье и частично в Восточном Казахстане, Средней Азии, Китае и Монголии. Довольно часто этот вид боярышника встречается на Южном Урале, в Закамье и Заволжье. В Башкирии он распространен в основном в лесостепной и степной зонах. Часто встречается в лесостепи Предуралья: на северо-западе в Янаульском, Дюртюлинском районах; в западной и центральной части республики (Буздякский, Давлекановский, Чишминский, Иглинский и др.), главным образом в поймах

рек Белой, Уршака, Демы и др. Изредка боярышник кроваво-красный встречается в Зауралье по склонам холмов – в Учалинском и Баймакском районах. Его произрастание отмечено также в районах западных предгорий Южного Урала (Зилаирский, Гафурийский, Зианчуринский, Кугарчинский районы). Очень редко встречается под пологом леса, по его опушкам на северо-востоке республики (Белокатайский, Салаватский районы).

В качестве лекарственного сырья используют листья. Основные заготовки листьев боярышника кроваво-красного проводят в мае во время цветения растения. Листья срезают ножом или обдирают вручную и рыхло укладывают в проветриваемую тару (корзины, тканевые мешки). В течение двух часов доставляют к месту сушки. Используют естественную воздушно-теневую сушку, раскладывая сырье на бумаге или ткани не толще 3-5 см по навесам или чердаках с хорошей вентиляцией. Допускается искусственная сушка в сушилках барабанного или конвейерного типа при температуре 50-60⁰С. Выход сырья составляет около 20-25% от массы свежесобранного сырья. После сушки ил листьев боярышника кроваво-красного удаляют остатки стеблей, цветков, а также листьев, утративших естественную окраску, и посторонние примеси.

Готовое лекарственное растительное сырье боярышника кроваво-красного должно соответствовать следующим требованиям проекта ФС: листья с прилистниками или без них, простые, короткочерешковые, длиной 2-6 см, шириной 2-8 см, яйцевидные с ширококлиновидным основанием, более или менее глубоко-лопастные с крупнозубчатым краем. Жилкование перисто-краевое. Жилки зеленые, выдаются с нижней стороны листа. Цвет листьев зеленый с верхней стороны и светло-зеленый - с нижней. В месте прикрепления черешка по два прилистника несимметричной серповидной формы, с мелкопильчатым краем, цвет прилистников - зеленый с верхней стороны, и светло-зеленый с нижней. Жилкование прилистников перисто-краевое. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Числовые показатели: содержание флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,5%, ДЗП не менее 30%, влажность не более 10%, золы общей не более 10%, частиц, не проходящих сквозь сито 4,5 мм не более 10%, частиц, проходящих сквозь сито 0,5 мм не более 4%, органической примеси не более 1%, минеральной примеси не более 0,5%.

Высушенные листья боярышника кроваво-красного упаковывают в тюки по 15 кг. Хранят на стеллажах в сухом, хорошо проветриваемом помещении, защищенном от прямых солнечных лучей месте. Срок годности сырья – 3 года.

Листья боярышника кроваво-красного применяют в качестве антиаритмического, кардиотропного и антиоксидантного средства.

Инструкцию составили:

Заочный аспирант кафедры

фармакогнозии с курсом

ботаники и основ фитотерпии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России



С.В. Трофимова

Доцент кафедры

фармакогнозии с курсом ботаники

и основ фитотерпии ГБОУ ВПО БГМУ

Минздрава России, к.фарм.н.



С.Р. Хасанова