

*На правах рукописи*

Сагарадзе Валентина Андреевна

**Фармакогностическое исследование и стандартизация перспективного лекарственного растительного сырья – «Цветки с листьями» видов рода Боярышник (*Crataegus* L.) флоры Российской Федерации**

14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

**Научные руководители:**

**Каленикова Елена Игоревна**, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «МГУ имени М. В. Ломоносова»

**Бабаева Елена Юрьевна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент Агробиотехнологического департамента Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

**Официальные оппоненты:**

**Боковикова Татьяна Николаевна** – доктор фармацевтических наук, начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Сорокина Алла Анатольевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтического естествознания Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

**Ведущая организация:** Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 201 г в \_\_ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» по фармацевтическим наукам по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета ПДС 0300.001  
кандидат химических наук, доцент

**Успенская Е.В.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** На современном этапе развития мировой и российской медицины наблюдается тенденция к расширению ассортимента фитопрепаратов. Повышение спроса на лекарственные препараты растительного происхождения объясняется их способностью оказывать мягкое комплексное воздействие на организм при низкой вероятности возникновения побочных эффектов, что позволяет применять их при хронических заболеваниях.

Разработка новых отечественных конкурентоспособных импортозамещающих лекарственных средств не только синтетического, но и растительного происхождения является одним из приоритетных направлений фармацевтической практики. В этой связи актуальными задачами стали поиск новых видов ЛРС, совершенствование технологии их получения, а также комплексное использование органов и частей официальных производящих растений, широко произрастающих во флоре России.

ЛРС, заготавливаемое от некоторых представителей рода Боярышник, занимает существенное место среди природных источников препаратов комплексного кардиотонического, антиаритмического и гипотензивного действия. Многолетний опыт изучения и использования препаратов на основе ЛРС боярышника, а также положительные результаты клинических исследований способствовали их широкому применению в мировой медицинской практике (Blumental et al., 2003; Pitler et al., 2003; Zick et al., 2008). Основными видами ЛРС боярышника, согласно зарубежным фармакопеям являются: «Цветки с листьями», «Плоды», «Листья» и «Цветки». В РФ фармакопейный статус из них имеют два вида ЛРС: «Боярышника плоды» и «Боярышника цветки» (ГФ XIV, 2018). Такой вид сырья как «Боярышника цветки с листьями» не является официальным ЛРС. Вместе с этим, по нашим данным, он фактически имеется на фармацевтическом рынке РФ под названием «Боярышника цветки», как за счет импорта, так и за счет выпуска некоторыми отечественными производителями.

Кроме того, несмотря на большое видовое разнообразие рода, в зарубежные Фармакопеи включено небольшое количество видов боярышника, относящихся к секции *Crataegus*, ареал которой занимает территорию Европы, Юго-западной и Центральной Азии. В РФ ареалы этих видов, по сравнению с ареалами видов секции *Sanguineae*, представители которой распространены в азиатской части страны, невелики. В нашей стране нормативная база для стандартизации отечественного сырья «Боярышника цветки с листьями» в данный момент отсутствует, поэтому очевидна необходимость всестороннего изучения такого перспективного вида сырья и разработка соответствующей НД, актуализированной в соответствии с высокими требованиями фармакопейных стандартов к качеству и с принципами современной стандартизации продукции растительного происхождения.

**Степень разработанности темы.** Основные результаты фармакогностического исследования ЛРС дикорастущих и культивируемых видов боярышника (цветки, плоды) за последние 50 лет изложены в работах Самылиной И.А., Киселевой Т.Л., Евдокимовой О.В., Куркина В.А. Анализ литературы показал растущий интерес к изучению таких видов сырья как: «Боярышника листья» и «Боярышника цветки с листьями», как в России (Гончаров Н. Ф. и др., 2011; Трофимова С. В., 2014, Фирсова М.В. и др., 2014; Куркин В.А. и др., 2015, 2017; Волкова Н.А. и др., 2017), так и за рубежом (Rehwald et al., 1994; Rohr et al., 1999; Svedström et al., 2002; Cheng et al., 2007; Ying et al., 2009; Martino et al., 2008; Wang et al., 2011; Mudge, 2016). За рубежом данные виды сырья имеют фармакопейный статус, а содержание в них БАВ, обеспечивающих фармакологические эффекты, является объектом постоянного внимания исследователей.

Вместе с тем, в РФ публикаций по сравнительному фармакогностическому изучению цветков и листьев боярышника с учетом видового разнообразия и вариабельности индивидуальных флавоноидов в настоящее время немного (Аврач А. С. и др., 2013; Морозова Т.В. и др., 2015; Хасанова Д.Р. и др., 2013; Куркин В.А. и др., 2017). Сведений о сравнительном фармакогностическом изучении цветков и листьев боярышника нами в литературе не обнаружено. Согласно данным литературы, экстракты из цветков и листьев боярышника имеют сходную фармакологическую активность, что позволяет рекомендовать их использование как по отдельности, так и в виде комплексного сырья и в РФ.

**Цель исследования** – фармакогностическое изучение перспективного лекарственного растительного сырья «Боярышника цветки с листьями» различных видов рода *Crataegus* флоры РФ и его стандартизация.

**Задачи исследования.**

1. Разработать проект технологии получения нового отечественного вида сырья «Боярышника цветки с листьями», представляющего собой цветущие неодревесневшие побеги дикорастущих растений рода Боярышник флоры РФ;
2. Разработать и валидировать методики количественного определения флавоноидов в сырье «Боярышника цветки с листьями»;
3. Провести сравнительное исследование флавоноидов в цветках с листьями растений рода *Crataegus*, широко произрастающих во флоре РФ;
4. Провести сравнительное морфолого-анатомическое изучение сырья «Боярышника цветки с листьями» исследуемых видов и возможных органических примесей в нем с целью установления диагностических признаков;
5. Разработать методики установления подлинности и показатели качества сырья для включения в проект НД «Боярышника цветки с листьями».

**Научная новизна.** Разработана технология получения нового вида растительного сырья в виде проекта «Инструкция по сбору и сушке ЛРС «Боярышника цветки с

листьями». Получены новые данные об уровнях содержания флавоноидов (витексин, рутин, гиперозид, кверцетин) в сырье «Боярышника цветки с листьями» для 15 видов и одного гибрида рода *Crataegus* флоры России с применением современных физико-химических методов: ВЭЖХ-УФ, ТСХ и спектрофотометрии. Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-УФ для анализа витексина, рутина, гиперозида, кверцетина.

Разработаны новые критерии для установления подлинности нового вида ЛРС «Боярышника цветки с листьями» с использованием палиноморфологического и сравнительного морфолого-анатомического методов. Разработаны методики для выявления вероятных органических примесей в перспективном сырье «Боярышника цветки с листьями».

Выполнены исследования, необходимые для обоснования методов установления подлинности, контроля чистоты и качества сырья в проекте НД на новую для РФ продукцию медицинского применения «Боярышника цветки с листьями».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании полученных результатов обоснованы стадии технологии получения, выработаны подходы к стандартизации сырья и разработаны разделы проекта НД на новый перспективный вид ЛРС «Боярышника цветки с листьями». Представленная в работе методология исследования флавоноидов в ЛРС включена в курс лекций и практических занятий по фармакогнозии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

**Методология и методы исследования.** Методология исследования основывается на анализе данных литературы, оценке степени изученности данной темы, постановке цели и задач исследования по фармакогностическому изучению нового вида сырья «Боярышника цветки с листьями» различных видов рода Боярышник, произрастающих в России. В ходе исследования были применены следующие методы анализа: ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрия, микроскопия, гравиметрия, математические и информатические методы обработки результатов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение возможности расширения ресурсной базы видов боярышника для получения ЛРС.
2. Результаты исследования содержания витексина, рутина, гиперозида и кверцетина в сырье 15 видов и одного гибрида боярышника.
3. Результаты сравнительного морфолого-анатомического изучения ЛРС «Боярышника цветки с листьями» и возможных органических примесей.
4. Валидированная методика ВЭЖХ-анализа для контроля содержания гиперозида, рутина, кверцетина и витексина в ЛРС «Боярышника цветки с листьями».
5. Нормы показателей чистоты и качества нового перспективного вида отечественного сырья «Боярышника цветки с листьями».

**Степень достоверности полученных результатов.** Определение видов рода *Crataegus*, от которых были получены опытные партии сырья для последующего фармакогностического изучения, проведено монографом рода – Уфимовым Р. А. и соответствует «Международному кодексу ботанической номенклатуры» (Уфимов Р.А., 2013; Международный кодекс ботанической номенклатуры, 2009).

Для оценки степени достоверности измерений, показателей точности и характеристик погрешности руководствовались рекомендациями ГФ XIV. Количество измерений для расчета аналитических характеристик соответствовало рекомендациям ГФ XIV, «Руководству по валидации методик анализа лекарственных средств (Методические рекомендации)» (Береговых В.В., 2007). Статистическая обработка результатов измерений проводилась согласно требованиям ГФ XIV с использованием программ MS Excel и Rstudio.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на Международной научно-практической конференции: «От растения к препарату: традиции и современность» (к 95-летию со дня рождения проф. А. И. Шретера), ГНУ ВИЛАР, Москва, 2014 г.; на научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и Фармация XXI века», ФГБНУ ВИЛАР, Москва, 2014, 2015 г.г. Москва; на Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH», РУДН, Москва, 2013, 2015 г.г., (на английском языке); на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2015», МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2015 г.; на IX Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Институт физиологии растений РАН, Москва, 2015 г.; на Международной конференции аспирантов «PhD Scientific Days 2016 Conference», Будапешт, Венгрия, 2016 г.; на Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», СПФХА, Санкт-Петербург, 2017 г.; на Международной научной конференции «Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира», посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, Минск, 2017 г.

**Внедрение результатов исследования.** Разработанная методика ВЭЖХ-УФ определения флавоноидов используется для контроля качества сырья и препаратов боярышника ИЛ ГБУЗ «ЦЛОДЗМ» и ФГБНУ ВИЛАР. Результаты фитохимических и морфо-анатомических исследований используются в учебном процессе кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

**Публикации материалов исследования.** Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 16 печатных работах, включая 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки

России, из них 2 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus, Web of Science).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертационной работы соответствуют пунктам 2, 3, 5, 6 и 7 паспорта специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 194 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц, 64 рисунка, состоит из оглавления, списка сокращений, введения, 5-ти глав, общих выводов, 31 приложения и списка литературы, включающего 176 источников, в т. ч. 106 на иностранных языках.

**Личный вклад автора.** Автор диссертационного исследования принимала участие в выборе объектов и заготовке материалов для исследования, постановке целей и формулировке задач. Вклад автора является определяющим на всех этапах фармакогностического исследования. В работах, проведенных с соавторами, автор принимала непосредственное участие в выполнении экспериментальной части, в научном аргументировании и резюмировании полученных результатов.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования послужили 54 высушенные опытные партии растительного сырья – соцветий (цветки, цветоносы) с прилегающими неодревесневшими стеблями и листьями от производящих растений рода *Crataegus*, поступившие из разных регионов РФ (окрестности гг. Воронеж, Кемерово, Москва, Снежинск (Челябинской обл.); пос. Укладочный Алтайского края, пос. Октябрьский (Республика Башкортостан) и ботанических садов (ГБС РАН; КузБС ИЭЧ ФИЦ УУХ СО РАН, ботанический сад ФГБНУ ВИЛАР, ботанические сады гг. Пензы и Ставрополя) и заготовленные по разработанной технологии. Сбор цветков с листьями осуществляли в фазу массового цветения в мае – начале июня 2012-2016 гг. Для каждой партии был создан гербарий растения, на основании которого в отделе «Гербарий высших растений» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (г. Санкт-Петербург) был определен вид боярышника с присвоением ваучерного номера и депонированием в коллекцию. Среди заготовленного сырья оказалось 18 производящих растений – интродуцированных представителей флоры Северной Америки, не имеющих в РФ дикорастущей сырьевой базы; 5 партий были отбракованы ввиду повреждения их вредителями запасов. Объектом дальнейшего исследования стала 31 партия сырья, полученного от 15 видов и одного гибрида боярышника, относящихся к секциям *Sanguineae* и *Crataegus*, представляющих устойчивую базу для заготовки такого сырья в России.

Для выявления отличий цветков с листьями боярышника от аналогичного вида сырья других растений были изучены цветки с листьями таких представителей семейства *Rosaceae* (Розоцветные) как: *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. (Арония черноплодная),

*Malus domestica* Borkh. (Яблоня домашняя), *Prunus domestica* L. (Слива домашняя), *Prunus subgen. Cerasus* (Mill.) A. Gray (*Prunus vulgaris*) (Вишня обыкновенная), *Pyrus communis* L. (Груша обыкновенная), *Padus avium* Mill. (Черемуха обыкновенная), цветки *Sorbus aucuparia* L. (Рябина обыкновенная). Кроме этого, объектами исследований явились цветки с листьями представителей других семейств, похожих на цветки и листья боярышника, среди которых: *Philadelphus coronarius* L. (Чубушник венечный) – семейство *Hydrangeaceae* (Гортензиевые), *Viburnum opulus* L. (Калина обыкновенная) – семейство *Adoxaceae* (Адоксовые). Органы данных растений, которые могут быть возможной органической примесью к сырью боярышника, заготовлены в окрестностях г. Москвы.

Микропрепараты готовили согласно требованиям ОФС 1.5.1.0004.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ XIII, Т.2. Морфолого-анатомическое исследование проводили, используя микроскоп ЛОМО Микмед -1 с бинокляром АУ-12 1,5х (окуляр 10х и широкоугольный WF10х со шкалой, объективы 8х, 10х, 20х, 40х), а также бинокляр ЛОМО МСП-1. Для изучения морфологии пыльцевых зерен выполняли ацетолиз методом Эрдтмана (Покровская И.М., 1950). Образцы фиксировали на предметном стекле с помощью желатино-глицериновой смеси. Структуру поверхности экзины пыльцевых зерен исследовали под микроскопом AxioPlan 2 imaging Carl Zeiss, Germany, увеличение 1000х и 1250х. Для получения и обработки фотографий использовали программу «Axiovision 3.1». Количественные анатомические характеристики рассчитывали на площади, соответствующей размерам покровного стекла 24×24 мм. Повторность определения 10-кратная.

Исследование флавоноидов сырья боярышника проводили спектрофотометрическим (СФМ) и хроматографическими методами (ТСХ, ВЭЖХ-УФ). В качестве референсных образцов использовались коммерческие высокоочищенные субстанции: рутин (CAS № 153-18-4, >98,5%, «Фитопанацея»), кверцетин (CAS № 117-39-5, >98,5%, «Фитопанацея»), гиперозида (CAS № 482-36-0, >97%, «Phytoplan»), витексина (CAS № 3681-93-4, >95%, «SigmaAldrich»). Для определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид использовали спектрофотометр Cary 100 (Varian, США). Измерения выполнены при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Расчет содержания суммы флавоноидов (%) проводили по градуировочному графику, построенному по гиперозиду в комплексе с 3% хлористым алюминием в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Определение витексина, гиперозида, рутин и кверцетин в спиртовых извлечениях из сырья «Боярышника цветки с листьями» проводили по разработанной и валидированной методике на жидкостном хроматографе «Стайер» («Аквилон», Россия) со спектрофотометрическим детектором 104.1М («Аквилон», Россия); колонка C<sub>18</sub> Luna C<sub>18</sub>(2) 4,6ммх150мм, размер частиц 5мкм («Phenomenex», США). Детектирование велось при 256



нм. Для анализа фармацевтических композиций разработана методика ТФЭ с целью экстракции и концентрирования флавоноидов на патронах Sep-Pak (Waters, США) с обращенно-фазовым сорбентом  $C_{18}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Изучение флавоноидов сырья «Боярышника цветки с листьями»**

Из вторичных метаболитов в сырье боярышника наиболее широко представлен комплекс фенольных соединений, относящихся к различным по химической структуре классам: флавоноиды, процианидины, фенолкарбоновые и гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная и феруловая) (Гончаров Н.Ф. и др., 2011; Сидора Н.В. и др., 2015; Edwards J. et al.; Kumar D. et al., 2012; Svedström U., 2002), дубильные вещества (Фирсова М. В. и др., 2014) и лигнаны (Gao, et al. 2010). Многолетний опыт изучения ЛРС и препаратов боярышника показал, что существенный вклад в фармакологический эффект вносят именно флавоноиды. Их содержание в цветках с листьями боярышника было подробно изучено в данной работе с использованием методов спектрофотометрии и хроматографии.

#### *Спектрофотометрическое изучение флавоноидов в сырье «Боярышника цветки с листьями»*

Суммарное содержание флавоноидов в сырье «Боярышника цветки с листьями» оценивали методом спектрофотометрии с комплексообразователем – 3% спиртовым раствором  $AlCl_3$ . Стандартные образцы гиперозида и рутина, используемые в качестве стандартов пересчета для определения суммы флавоноидов в сырье боярышника, в комплексе с ионами алюминия имеют максимальную оптическую плотность в области 407-412 нм. Спектры поглощения извлечений из сырья с добавлением  $AlCl_3$  характеризуются максимумами в той же области (Рисунок 1). В данном исследовании в качестве стандарта пересчета был выбран гиперозид, и за аналитическую длину волны была принята  $\lambda=410$  нм как наиболее близкая к максимальным значениям оптической плотности как испытуемых извлечений, так и гиперозида.

Для сравнительного анализа содержания флавоноидов в партиях необходимо было оценить вклад сопутствующих факторов (фракционный состав сырья и место произрастания производящего растения), способных оказать влияние на накопление флавоноидов. Сырье «Боярышника цветки с листьями» представляет собой высушенные цветущие олиственные побеги. В изучаемой выборке содержание листьев варьировало в 2 раза (26,8-54,1%), стеблей – в 3 раза (2,6-9,5%). Содержание флавоноидов достоверно убывало в ряду цветки–листья–стебли. При изучении бинарных модельных смесей цветков с листьями с содержанием листьев 25-75% было выявлено, что содержание листьев в пределах 25%-50% значимо не влияло на этот показатель. Добавление до 15% стеблей в смесь цветков и листьев не оказывало значимого влияния на результат определения суммы флавоноидов. Сопоставив полученные результаты и литературные данные (Perschel, 2008)

дальнейший анализ содержания флавоноидов в сырье мы проводили на образцах с долей листьев в пределах от 25% до 55%.

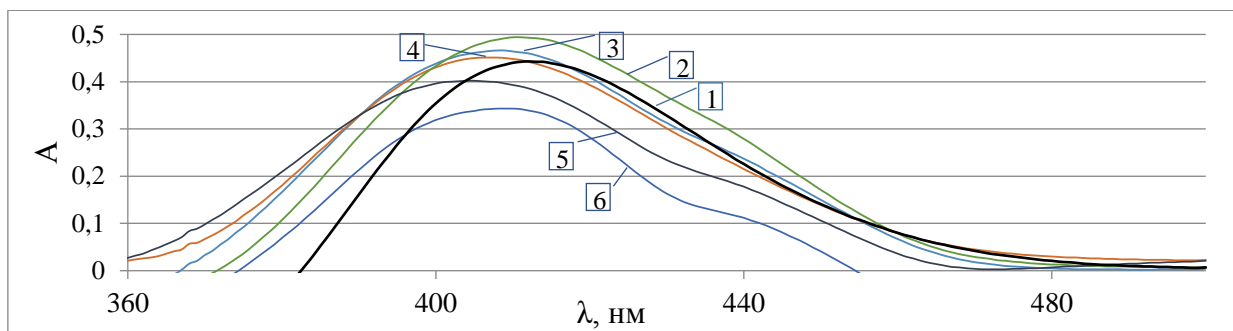


Рисунок 1. Спектры поглощения флавоноидов в условиях комплексообразования с  $AlCl_3$  относительно испытуемого образца без добавления  $AlCl_3$ : 1 – раствор СО гиперозида в 70% спирте; 2 – спиртовые извлечения цветков *C. sanguinea* (Москва), 3 – цветков с листьями *C. sanguinea* (Москва), 4 – цветков с листьями *C. sanguinea* (Кемерово), 5 – цветков с листьями *C. nigra* (Пенза), 6 – цветков с листьями *C. chlorosarca* (Москва).

Сравнение содержания суммы флавоноидов в сырье «Боярышника цветки с листьями» секции *Sanguineae* из разных регионов в пределах нашей выборки не выявило достоверных отличий ни в группе фармакопейных видов, ни в объединенной с нефармакопейными видами группе (Рисунок 2).

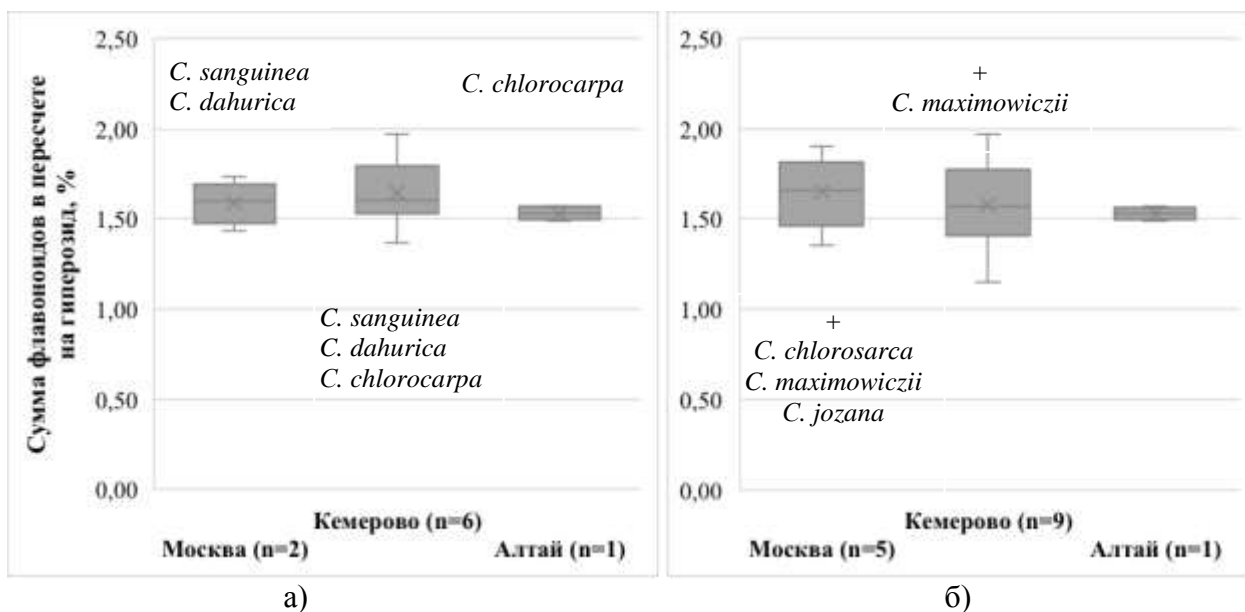


Рисунок 2. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и а.с.с. в сырье «Боярышника цветки с листьями» фармакопейных (а) и с учетом нефармакопейных (б) видов боярышника секции *Sanguineae* в зависимости от региона произрастания. По горизонтальной оси – сортировка по регионам сбора; n – число образцов. Критерий Данна с поправкой на разные мощности выборки при доверительной вероятности 95%.

Исключив влияние географического фактора, мы проанализировали содержание суммы флавоноидов по видам в секциях *Sanguineae* и *Crataegus*, объединив партии разных регионов заготовки с содержанием листьев 26,8–54,1% (n=27). В качестве сравнения использовали ЛРС основного фармакопейного вида – *C. sanguinea*, в сопоставлении с которым у представителей секции *Sanguineae* минимальное содержание флавоноидов

наблюдали в сырье *C. maximowiczii* и *C. chlorocarpa*. В секции *Crataegus* повышенным содержанием флавоноидов отличалось сырье *C. monogyna*. Однако в объединенных по секциям выборках эти различия нивелируются, что открывает возможность одновременной заготовки сырья от видов обеих секций (Рисунок 3).

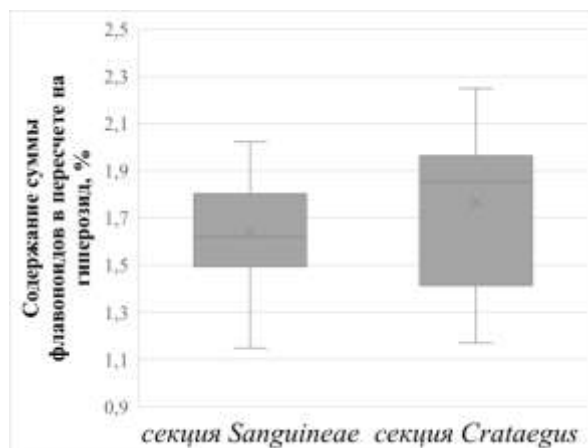


Рисунок 3. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и а.с.с. в сырье «Боярышника цветки с листьями» секций *Sanguineae* и *Crataegus*.

Сопоставимое содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в сырье «Боярышника цветки с листьями» фармакопейных и нефармакопейных видов позволяет рассматривать последние как перспективные для дальнейшего изучения и использования их органов в качестве ЛРС (Рисунок 4).

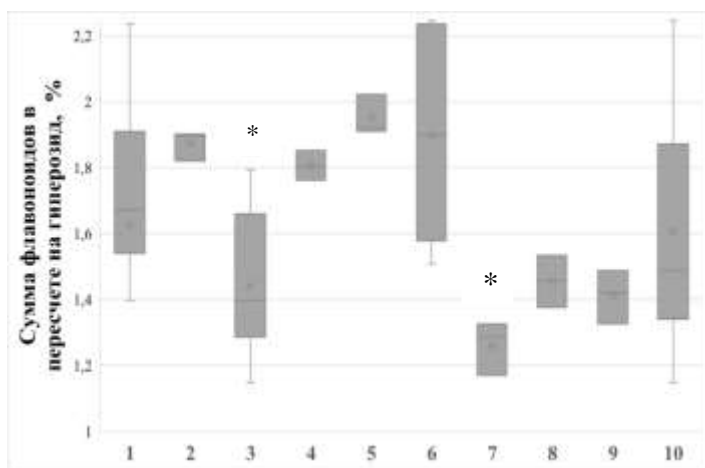


Рисунок 4. Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид в сырье «Боярышника цветки с листьями» разных видов боярышника. 1 – объединенная выборка фармакопейных видов ( $n=15$ ); нефармакопейные виды: 2 – *C. chlorosarca* ( $n=1$ ), 3 – *C. maximowiczii* ( $n=4$ ), 4 – *C. jozana* ( $n=1$ ), 5 – *C. nigra* ( $n=1$ ), 6 – *C. ambigua* ( $n=2$ ), 7 – *C. laciniata* ( $n=1$ ), 8 – *C. pallasii* ( $n=1$ ), 9 – *C. volgensis* ( $n=1$ ), 10 – объединенная выборка нефармакопейных видов ( $n=12$ );  $n$  – число образцов. \*Значимые отличия от фармакопейных видов; критерий Тьюки при доверительной вероятности 95%.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в целом по выборке варьировало от  $1,21 \pm 0,11\%$  до  $2,21 \pm 0,09\%$ , составляя в среднем  $1,65\%$  (медиана –  $1,6\%$ ). Учитывая уровень нижней границы по выборке и возможные колебания параметра от года

к году, рекомендовано установление нормы не менее 1,0%. Для количественных результатов, полученных методами СФМ и ВЭЖХ-УФ, выявлена значимая корреляционная взаимозависимость между значениями суммы флавоноидов и содержанием отдельных флавоноидов в партии ЛРС, подтверждающая основной вклад гиперозида, рутина и кверцетина в результаты СФМ-определения, что свидетельствует об объективности этого метода для оценки содержания флавоноидов в ЛРС «Боярышника цветки с листьями» (Табл. 1).

Таблица 1. Значение коэффициентов корреляции между содержанием индивидуальных флавоноидов (ВЭЖХ-УФ) и суммой флавоноидов в пересчете на гиперозид (СФМ).

Флавоноид	R <sup>2</sup> n=31	Значимость корреляции 1 По Фишеру-Йейтсу (p<0,05) Г <sub>критич.</sub> =0,349	Значимость корреляции 2 По Стьюденту (p<0,05) t <sub>критич.</sub> =2,048
Гиперозид	0,1666	<b>0,4082</b>	<b>2,408</b>
Гиперозид+Рутин	0,2753	<b>0,5247</b>	<b>3,319</b>
Гиперозид +Рутин+Кверцетин	0,3481	<b>0,5895</b>	<b>3,930</b>
Гиперозид+Рутин+Кверцетин+Витексин	0,3019	<b>0,5495</b>	<b>3,541</b>
Витексин	0,0116	0,1077*	0,583*
Рутин	0,0765	0,2766*	1,550*
Кверцетин	0,0315	0,1775*	0,971*

\*Незначимая корреляция

*Разработка методики ВЭЖХ-определения витексина, рутина, гиперозида и кверцетина в сырье*

Для определения специфичных флавоноидов сырья боярышника: рутина, гиперозида, витексина и кверцетина была разработана методика ОФ-ВЭЖХ-УФ и проведена ее валидация по обязательным показателям для количественного определения основного действующего вещества: специфичность, линейность, аналитическая область, правильность и повторяемость в соответствии с требованиями ГФ XIV 1.1.0012.15. С учетом различной полярности изучаемых флавоноидов был подобран градиентный ступенчатый режим элюирования в смеси вода с 0,02% ортофосфорной кислоты (А)-ацетонитрил (В). Флавоноиды детектировали при 256 нм и идентифицировали путем сопоставления времен удерживания (t<sub>R</sub>) пиков стандартов и пиков на хроматограммах извлечений из сырья (Рисунок 5а,б).

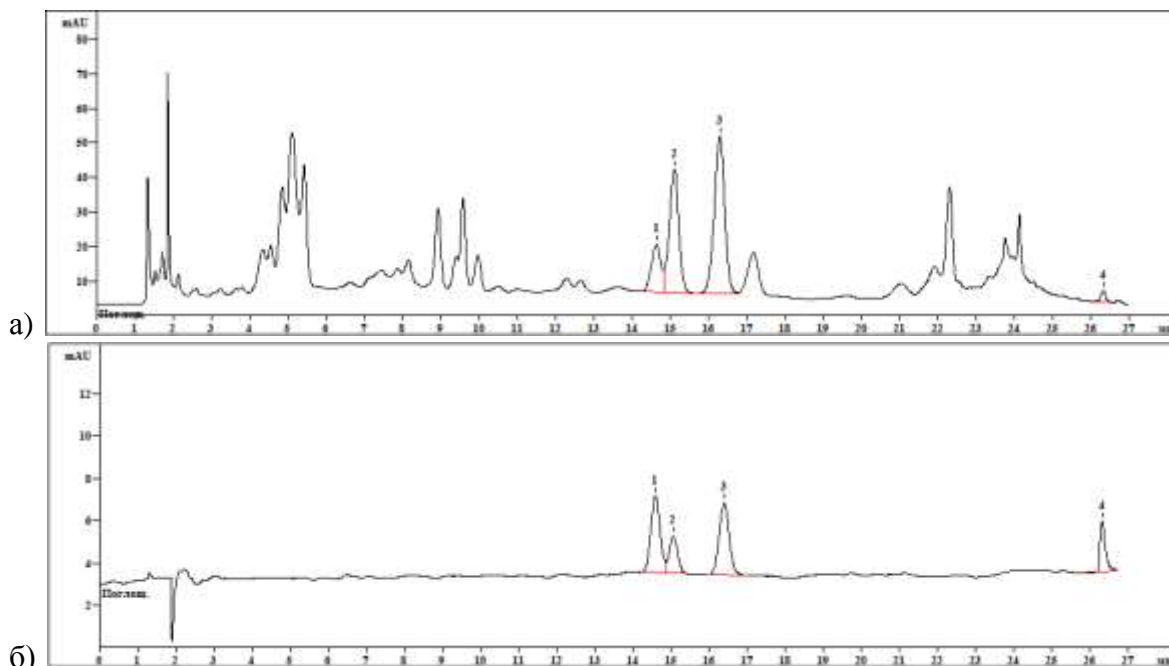


Рисунок 5. Хроматограммы извлечения из образца сырья «Боярышника цветки с листьями» (а) и модельной смеси СО витексина (1), рутина (2), гиперозида (3) и кверцетина (4) в концентрациях 9,1 мкг/мл, 9,2 мкг/мл, 12,5 мкг/мл и 4 мкг/мл соответственно (б).

В подобранных градиентных условиях были достигнуты удовлетворительные параметры пиков: асимметричность находилась в интервале 0,8–1,18, эффективность разделения – число теоретических тарелок для четырех флавоноидов были не ниже 8000, разрешение соседних пиков ( $R_s$ ) было не менее 1,5 для рутина и гиперозида (ГФ XIV, 2018 ОФС 1.2.1.2.0001.15 Хроматография). Для витексина и кверцетина  $R_s$  составляло не менее 1,1, что, согласно рекомендациям AOAC International, является допустимым при количественной оценке индивидуальных веществ в многокомпонентных смесях (AOAC International. Appendix K, 2013). Полученные результаты свидетельствовали о пригодности хроматографической системы и специфичности методики количественного определения флавоноидов в изучаемом ЛРС.

По результатам ВЭЖХ-анализа серий разведений стандартных образцов в подобранных условиях получены линейные градуировочные уравнения (Табл. 2).

Таблица 2. Зависимости площади пика от концентрации флавоноида.

Флавоноид	$t_R$ , мин	Диапазон линейности, мкг/мл	Уравнение	r
Витексин	14,6±0,17*	5-100	$y=4,5403x+3,5261$	0,9994
Рутин	15,1±0,16*	1-50	$y=5,7202x-4,5448$	0,9995
Гиперозид	16,4±0,19*	50-250	$y=7,0721x-19,921$	0,9999
Кверцетин	26,4±0,19*	0,5-10	$y=10,624x-3,3408$	0,9994

\*n=6,  $p \leq 0,05$

Полученные коэффициенты корреляции удовлетворяли условию линейности ( $r > 0,99$ ). Данные по оценке правильности методики находились в интервалах 95,9–104,3% / 95,6–102,9% для витексина, 94,0–102,2% / 93,5–101,5% для рутина, 98,0–102,2% / 97,5–102,9% для гиперозида, 96,0–109,8% / 97,2–111,0% для кверцетина. Величина RSD в течение 1 дня не превышала 2%, в течение недели – 3% что свидетельствует об удовлетворительных правильности и прецизионности методики. Относительная ошибка ( $\varepsilon, \%$ ) единичного определения каждого анализа с доверительной вероятностью 95% не превышала 3% для рутина, гиперозида и витексина и 4% – для кверцетина.

*Количественный анализ витексина, рутина, гиперозида и кверцетина в сырье «Боярышника цветки с листьями»*

ВЭЖХ-УФ анализ извлечений показал, что в партиях сырья боярышников преобладающим по содержанию является гиперозид (от 1,55 до 12,59 мг/г, медиана – 4,47 мг/г). Кверцетин в большинстве партий сырья, включенных в выборку, был обнаружен в меньших по сравнению с остальными флавоноидами количествах: от 0,072 до 0,945 мг/г, медиана 0,144 мг/г. Рутин и витексин содержались в сырье в сопоставимых с гиперозидом количествах: рутин – от 0,21 до 5,37 мг/г, среднее – 1,17 мг/г, витексин – от 0,51 до 3,90 мг/г, медиана – 1,67 мг/г (Табл. 3).

Содержание витексина в изучаемом сырье боярышника секции *Sanguineae* было достоверно, но не намного выше, чем в секции *Crataegus*, тогда как содержание гиперозида, рутина и кверцетина не различалось (Рисунок 6). Соразмерное содержание гиперозида, рутина, кверцетина и витексина в ЛРС боярышников секций *Sanguineae* и *Crataegus* подтверждает перспективность использования российских видов для расширения сырьевой базы боярышника и позволяет осуществлять одновременное получение ЛРС от разных видов боярышника.

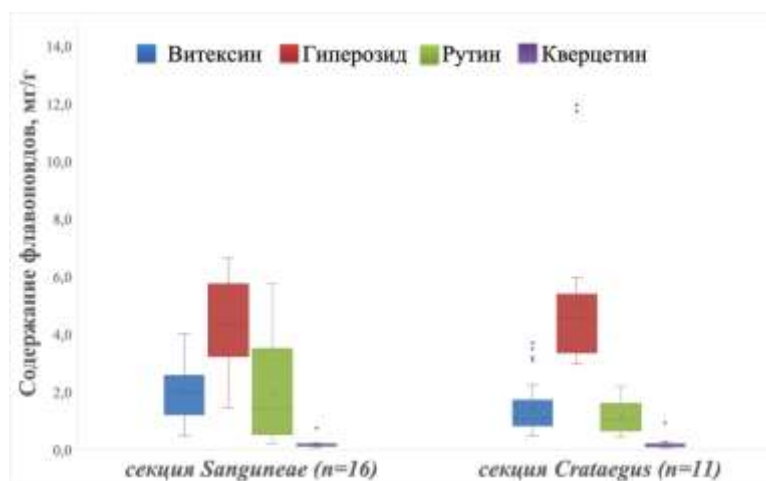


Рисунок 6. Сравнение содержания витексина, рутина, гиперозида и кверцетина в сырье «Боярышника цветки с листьями», заготовленном от представителей секций *Crataegus* и *Sanguineae*, произрастающих в России. U-критерий Манна-Уитни (ненормальное распределение),  $p < 0,05$ .

Таблица 3. Результаты спектрофотометрического и хроматографического определения флавоноидов в сырье «Боярышника цветки с листьями»

№	№ ваучерного образца	Вид	Содержание листьев, %	Содержание стеблей, %	Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид, мг/г	Витексин, мг/г	Рутин, мг/г	Гиперозид, мг/г	Кверцетин, мг/г
1	LE01020969	<i>C. sanguinea</i> Pall.	47,0	6,9	15,10±0,18	3,52±0,11	1,34±0,06	5,81±0,11	0,20±0,01
2	LE01020943	<i>C. sanguinea</i> Pall.	50,2	4,9	16,13±0,07	2,59±0,15	3,96±0,14	3,35±0,14	0,15±0,02
3	LE01020947	<i>C. sanguinea</i> Pall.	50,7	7,2	17,99±0,05	2,07±0,03	4,57±0,31	4,25±0,09	0,15±0,009
4	LE01020944 LE01020945	<i>C. sanguinea</i> Pall.	54,1	5,0	15,58±0,08	2,51±0,20	4,02±0,20	3,09±0,05	0,14±0,01
5	LE01020946	<i>C. sanguinea</i> Pall.	53,5	4,9	19,03±0,08	2,37±0,12	5,37±0,35	4,47±0,24	0,19±0,09
6	LE01020783	<i>C. sanguinea</i> Pall.	19,3	4,7	19,26±0,20	1,89±0,11	4,93 ±0,20	4,80±0,10	0,15±0,01
7	LE01020981	<i>C. dahurica</i> C.K. Schneid.	44,3	6,4	16,46±0,12	1,91±0,09	0,96±0,04	5,90±0,09	0,19±0,004
8	LE01020939	<i>C. dahurica</i> C.K. Schneid.	50,7	7,1	15,82±0,11	1,56±0,29	0,46±0,07	6,36±0,28	0,07±0,01
9	LE01020942	<i>C. chlorocarpa</i> Lenné et C. Koch	52,0	5,7	14,01±0,05	0,80±0,05	0,22±0,04	4,50±0,09	0,13±0,004
10	LE01020938	<i>C. chlorocarpa</i> Lenné et C. Koch.	35,0	8,3	15,29±0,06	0,51±0,07	0,38±0,03	4,49±0,05	0,11±0,01
11	LE01020970	<i>C. maximowiczii</i> C.K. Schneid.	43,8	8,2	14,05±0,15	1,74±0,07	1,74±0,04	3,24±0,15	0,11±0,01
12	LE01020948	<i>C. maximowiczii</i> C.K. Schneid.	51,2	7,6	12,09±0,11	3,39±0,06	1,25±0,16	2,43±0,06	0,09±0,01
13	LE01020941	<i>C. maximowiczii</i> C.K. Schneid.	37,2	3,0	17,65±0,06	1,14±0,21	0,58±0,12	5,27±0,06	0,142±0,005
14	LE01020940	<i>C. maximowiczii</i> C.K. Schneid.	38,4	3,7	13,92±0,09	1,15±0,23	0,35±0,06	6,55±0,09	0,124±0,001
15	LE01020971 LE 01021005 LE 01021006	<i>C. jozana</i> C. K. Schneid.	47,1	5,7	18,06±0,08	2,13±0,20	2,31±0,16	3,81±0,07	0,14±0,01

16	LE01020980	<i>C. chlorosarca</i> Maxim.	44,9	8,4	18,73±0,08	0,95±0,08	1,78±0,04	4,24±0,06	0,18±0,02
17	LE 01023999	<i>C. jozana</i> C. K. Schneid.	22,7	2,6	19,96±0,22	2,27±0,06	0,72±0,06	3,34±0,03	3,23±0,06
18	LE 01023989	<i>C. wattiana</i> Hemsl. et Lace	21,8	6,1	18,89±0,14	1,84±0,14	0,70±0,04	5,18±0,16	0,37±0,002
19	LE 01020781	<i>C. wattiana</i> Hemsl. et Lace	63,3	6,9	12,51±0,56	1,30±0,06	0,20±0,02	1,38±0,04	0,57±0,01
20	LE01020984	<i>C. nigra</i> Waldst. et Kit.	37,2	7,4	19,52±0,11	3,90±0,11	1,49±0,02	1,55±0,08	0,74±0,001
21	LE01020972	<i>C. monogyna</i> Jacq.	35,3	6,9	22,04±0,11	2,06±0,29	0,91±0,07	12,58±1,28	0,15±0,03
22	LE01020973	<i>C. × subsphaerica</i>	32,4	5,5	19,43±0,02	0,52±0,04	1,09±0,06	5,22±0,13	0,19±0,01
23	LE01020974	<i>C. rhipidophylla</i> Gand.	36,7	8,6	19,25±0,04	1,09±0,12	1,61±0,08	5,78±0,22	0,11±0,01
24	LE01020975	<i>C. rhipidophylla</i> Gand.	43,3	7,8	14,30±0,09	1,08±0,07	0,63±0,06	4,52±0,13	0,95±0,02
25	LE01020976	<i>C. rhipidophylla</i> Gand.	53,4	9,2	19,11±0,12	0,91±0,08	1,92±0,26	3,13±0,12	0,09±0,01
26	LE01020937	<i>C. ambigua</i> C.A. Mey. ex A.K. Becker	41,9	9,5	15,87±0,13	3,65±0,14	2,04±0,13	5,46±0,14	0,09±0,09
27	LE01020977	<i>C. ambigua</i> C.A. Mey. ex A.K. Becker	43,3	8,3	22,12±0,09	1,63±0,12	1,36±0,25	5,33±0,32	0,15±0,03
28	LE01020978	<i>C. pentagyna</i> Waldst. et Kit. ex Willd.	26,8	5,0	18,14±0,01	3,15±0,06	1,09±0,17	4,41±0,02	0,20±0,01
29	LE01020979	<i>C. laciniata</i> Ucria	49,0	4,8	12,60±0,15	1,36±0,11	0,61±0,02	3,42±0,09	0,28±0,002
30	LE01020983	<i>C. volgensis</i> Pojark.	44,8	7,6	13,95±0,20	0,56±0,04	1,02±0,02	3,22±0,09	0,07±0,01
31	LE01020982	<i>C. pallasii</i> Griseb.	28,7	8,5	13,94±0,15	0,54±0,02	0,45±0,01	3,43±0,10	0,21±0,01



Разработанная ВЭЖХ-методика определения флавоноидов была применена для анализа коммерческих образцов «Настойка боярышника плодов» (ЛС) и таблеток для рассасывания «Боярышника цветки с листьями экстракт сухой» (БАД). Установлено, что в этих образцах присутствуют витексин, рутин, гиперозид и кверцетин, а их соотношение близко к соотношению флавоноидов в извлечениях из сырья «Боярышника цветки с листьями». Вместе с тем, концентрации флавоноидов в настойке оказались ниже рабочего диапазона методики, поэтому для их количественного анализа была разработана методика ТФЭ на патронах Sep-Pak (Waters) с обращенно-фазовым сорбентом  $C_{18}$ . Подобраны оптимальные условия сорбции и элюирования, в которых испытуемые образцы настойки концентрируются в 5 раз, что позволило улучшить характеристики пиков флавоноидов и провести их количественный анализ.

### **Микроскопические признаки листьев, цветков и стеблей боярышника и возможных органических примесей**

Анатомические диагностические признаки чашечки и венчика цветка боярышника подробно изучены Самылиной И.А., Аносовой О.Г., Киселевой Т.Л. (Киселева Т.Л., 1988; Самылина И.А., Аносова О.Г., 2007) и приведены в частной фармакопейной статье «Боярышника цветки» ГФ XI и XIV. Признаки листа *C. sanguinea* изучены С.В. Трофимовой (Трофимова, 2014). Петиолярные признаки *C. sanguinea* и *C. monogyna* приведены в работе Н.А. Волковой (Волкова Н.А. и др., 2017).

Нами проведено изучение диагностических признаков в анатомическом строении венчика, чашечки, ЛП и черешка листа боярышника в сравнении с таковыми у вероятных органических примесей – частях других неядовитых растений напоминающих по внешним признакам сырье боярышника.

Эпидермальные клетки лепестка боярышника имеют прямые или слабоизвилистые стенки. На верхней стороне присутствуют сосочковидные выросты. Отличительные особенности венчика вероятных примесей: характер извилистости стенок эпидермальных клеток венчика, направление складчатости кутикулы, клетки эпидермиса с пигментом (арония, калина), наличие устьичных комплексов (калина). У некоторых изученных видов на верхнем эпидермисе лепестка найдены одиночные простые одноклеточные волоски или их скопления. Волоски отличались по толщине, заостренности. У венчика боярышника описанные выше трихомы, включения и устьичные комплексы не были найдены.

На эпидермисе чашелистика боярышника обнаружены крупные сидячие железки с желто-коричневым содержимым по краю. Железки обнаружены на чашелистике и у других представителей семейства *Rosaceae*, их можно отличить по форме и размерам, они могут иметь многоклеточную ножку (Рисунок 7а,б). У чашелистика чубушника и калины железки отсутствуют. Опушение чашелистика у возможных примесей – частей растений семейства *Rosaceae* представлено простыми гладкими заостренными одноклеточными волосками. Степень опушения и локализация волосков имеют диагностическое значение. У боярышников это многочисленные длинные толстостенные гладкие простые одноклеточные волоски, заостренные на верхушке, прямые или слегка извилистые. На чашелистике груши и аронии волоски могут иметь рыжеватое содержимое. Эпидермис чашелистика калины отличают головчатые волоски с многоклеточной головкой на

многоклеточной ножке, внутри которой находится красноватое содержимое, и простые одноклеточные прямые волосы со слабо-бородавчатой поверхностью (Рисунок 8а,б). У чубушника на эпидермисе чашелистика волосы имеют грубобородавчатую поверхность и выступающее основание. (Рисунок 9).



а)

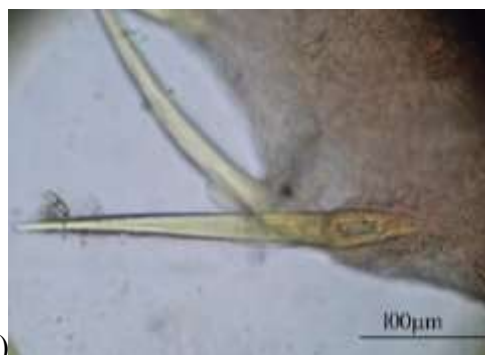


б)

Рисунок 7. Фрагменты края чашелистика: а) *Prunus domestica* (360x), б) *Pyrus communis* (900x).



а)



б)

Рисунок 8. Фрагмент эпидермиса чашелистика *Viburnum opulus*: а) головчатые волосы (900x), б) простые одноклеточные волосы (900x)

Обнаружено различие по типу, форме, размеру и характеру расположения кристаллических включений в мезофилле чашелистика. В таковом у боярышников вдоль жилок найдены друзы и призматические кристаллы  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ . У других представителей *Rosaceae* наблюдались отдельно друзы (у рябины и сливы – кластеры, у черемухи и вишни – друзы одиночные) или призматические кристаллы (у груши). У калины кристаллические включения не обнаружены, а мезофилл чашелистика чубушника имеет одиночные друзы.

Эпидермис ЛП боярышников (у большинства видов) опушен длинными простыми одноклеточными заостренными волосками с выступающим основанием. Простые одноклеточные волосы найдены и у других представителей семейства *Rosaceae*. Однако ЛП груши, яблони и сливы имеют густое опушение, и волосы заметно тоньше. У черемухи волосы простые одноклеточные остроконусовидные, расположены в области крупной жилки. У аронии простые одноклеточные толстые прямые волосы с коричневатым содержимым на нижнем эпидермисе и длинные волосы, расположенные группами, у основания ЛП или одиночно по краю. У рябины ЛП опушена с нижней стороны простыми длинными слабоизвилистыми одноклеточными волосками, в области крупных жилок найдены волосы с коричневым содержимым. У калины на ЛП обнаружены прямые

простые одноклеточные заостренные волоски с бородавчатой поверхностью и вздутиями и головчатые волоски с многоклеточной головкой на 1-3 клеточной ножке. У чубушника встречаются простые одноклеточные волоски с грубобородавчатой поверхностью. ЛП вишни не опушена. На эпидермисе некоторых изученных представителей семейства *Rosaceae*, как и у боярышника (Рисунок 9), были обнаружены многоклеточные железки, отличавшиеся по форме: мелкие шарообразные – у сливы, треугольные – у вишни, груши и аронии, овальные, вытянутые в длину – у яблони, шарообразной или продолговато-вытянутой в ширину – у боярышника.

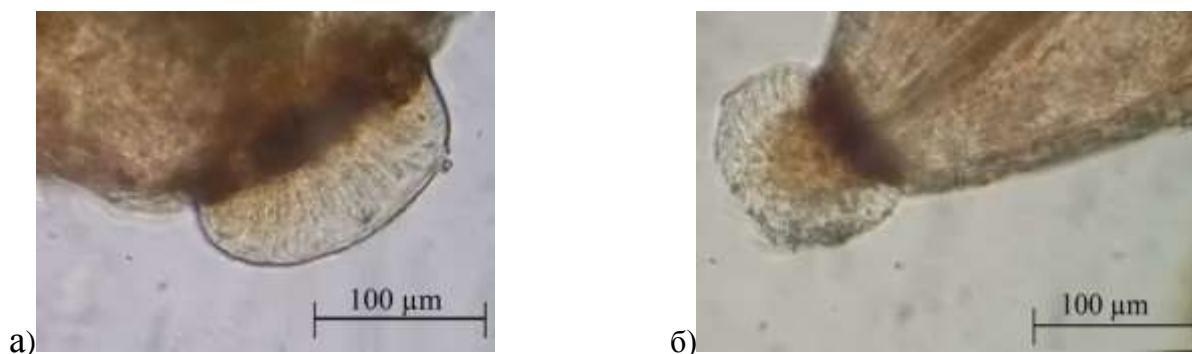


Рисунок 9. Фрагменты края листа боярышника, многоклеточные железки: а) *C. sanguinea* (900x), *C. rhipidophylla* (900x).

В мезофилле ЛП боярышника были найдены вместилища с коричневым содержимым и кристаллические включения  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ , представленные друзами и призматическими кристаллами. Преимущественно они локализируются в области крупных жилок, у основания и в центральной части ЛП. В мезофилле ЛП вишни присутствуют только крупные скопления друз. У груши – скопления друз и призматических кристаллов. У аронии, рябины и чубушника – одиночные друзы. Мезофилл ЛП черемухи отличаются крупные призматические кристаллы  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  полигональной формы. ЛП аронии отличается вместилищами с коричневым содержимым, расположенными вдоль крупных жилок.

Рассчитаны некоторые количественные характеристики анатомических структур ЛП боярышника. Определены размеры устьичных комплексов и установлено, что их длина и ширина у изученных видов в пределах секции *Sanguineae* не изменялись. ЛП исследованных видов секции *Crataegus* характеризовались отсутствием различий по длине устьичного комплекса, но имели разницу по его ширине: у *C. monogyna* она достоверно (на 7,5 мкм) меньше, чем таковая у *C. rhipidophylla* и *C. pallasii*. Проведено изучение размеров железок на эпидермисе листовой пластинки растений секции *Sanguineae*: *C. sanguinea*, *C. maximowiczii* и *C. dahurica* в сравнительном аспекте по двум регионам: окрестности г. Москвы (Центральный район Нечерноземной зоны) и Кемерово (юг Западной Сибири). Обнаружено, что для всех исследованных видов как длина, так и ширина железки растений боярышника из Кемерово были существенно выше. Другая закономерность получена при изучении размеров железок ЛП растений секции *Crataegus*. Существенных отличий по длине и ширине как между видами, так и между одним видом из разных регионов (*C. rhipidophylla* из ГБС РАН, Москва, и ботанического сада г. Ставрополя) не обнаружено. У

видов с опушенной ЛП обнаружены простые одноклеточные волоски длиной от 117 до 660 мкм.

Нами изучены в сравнительном аспекте анатомические диагностические признаки черешка листа боярышника. Поперечный срез его имеет округлую форму с крупноволнистым краем. Имеются два выступа, соответствующие ребрам. Проводящая система черешка и ребер непучкового строения (Рисунок 10). На эпидермисе черешка встречаются головчатые чаще сидячие коричневые многоклеточные железки. На верхней стороне эпидермиса присутствуют короткие простые одноклеточные волоски.



Рисунок 10. Фрагмент поперечного среза черешка листа боярышника (360х).

Поперечный срез черешка листа боярышника можно отличить от такового у органических примесей по наличию в ребрах небольших открытых коллатеральных круглых проводящих пучков. У черешка листа черемухи небольшие пучки в ребрах тоже есть, но они продолговатой формы. Поперечный срез черешка чубушника также характеризуется наличием в проводящей системе отдельных пучков по краям, но они не заходят в ребра.

Морфология пыльцы является стабильной характеристикой таксонов надвидового ранга (Покровская, И. М., 1950). Описание пыльцы боярышника и других изученных видов приведено в литературе, (Куприянова Л.А., Алешина Л.А., 1978). Подробное описание пыльцы цветков боярышника представлено в монографии И.А. Самылиной, О.Г. Аносовой (И.А. Самылина, О.Г. Аносова, 2007).

Упоминание пыльников и пыльцы боярышника впервые появилось в ГФ XIV, фармакопейная статья ФС. 2.5.0062.18 «Боярышника цветки», раздел «Внешние признаки» при описании порошка. При этом описание особенностей пыльцевого зерна не дается.

Мы выявили отличительные признаки пыльцы боярышника на примере *C. sanguinea* и вероятных органических примесей. Форма в проекциях с полюса и экватора, скульптура и структура экзины и особенности строения апертуры (борозды, оры/поры) имеют диагностическое значение и могут использоваться как дополнительный критерий при установлении подлинности цветков и цветков с листьями боярышника. Палиноморфологический метод не позволяет отличить примеси к сырью частей растений из семейства Розоцветные от ЛРС боярышника, но может быть использован для отличия примесей из других семейств (Рисунок 11а,б).

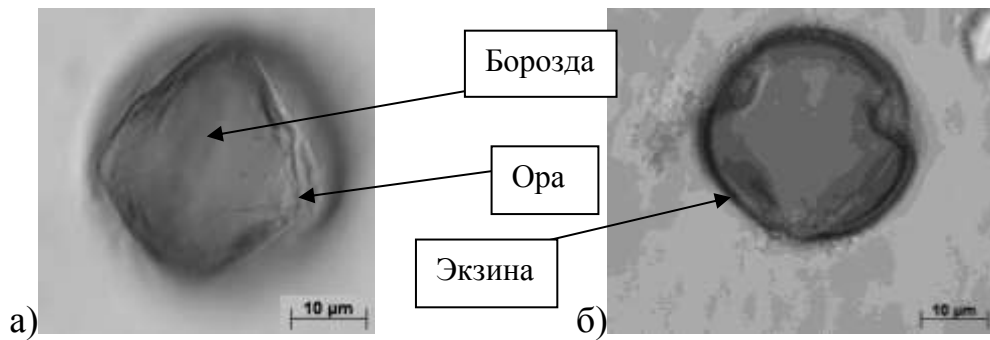


Рисунок 11. Пыльцевое зерно *C. sanguinea* (1000x): а) в очертании с экватора, б) оптический срез очертании с полюса .

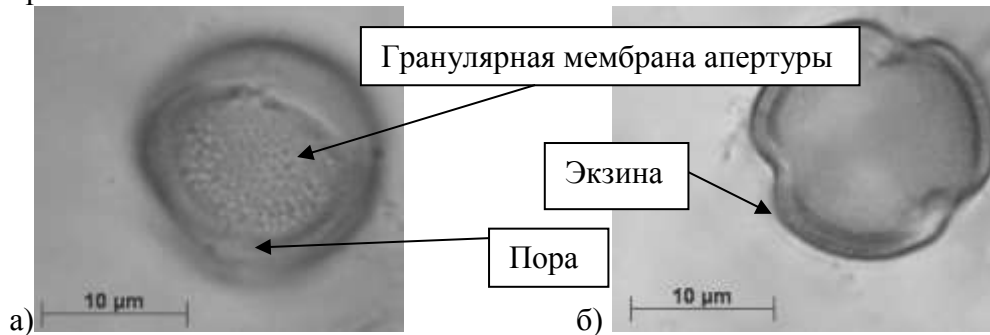


Рисунок 12. Пыльцевое зерно *Philadelphus coronarius* (1250x): а) в очертании с экватора, б) оптический срез.

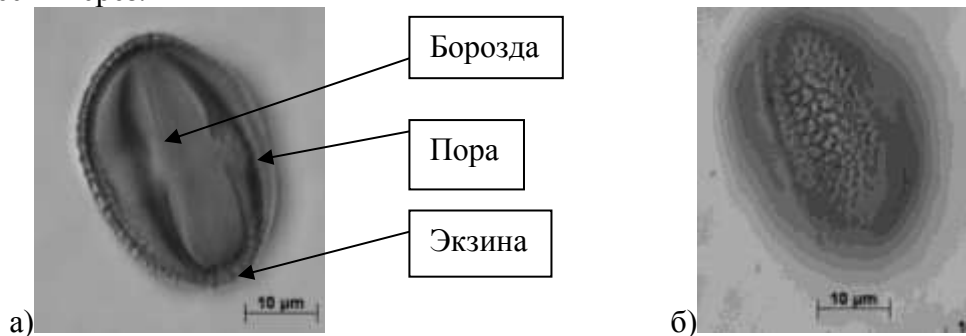


Рисунок 13. Пыльцевое зерно *Viburnum opulus* (1000x) в очертании с экватора.

Для пыльцевых зерен растений других семейств (калины и чубушника) характерен другой тип апертуры – они трехбороздно-поровые. Пыльцевые зерна калины отличаются от боярышника эллиптической формой в очертании с экватора. Пыльцевые зерна калины и чубушника имеют сетчатую скульптуру экзины (Рисунок 12-13), в отличие от струйчатой скульптуры пыльцы боярышника.

#### **Стандартизация и разработка НД на сырье «Боярышника цветки с листьями»**

На основании полученных результатов были разработаны разделы «Подлинность», «Испытания» проекта НД для сырья «Боярышника цветки с листьями».

Раздел «Подлинность» содержит характеристику макро- и микроскопических признаков цельного и измельченного сырья «Боярышника цветки с листьями» изученных видов; описание общегрупповых реакций на флавоноиды (с 3% раствором  $AlCl_3$  и цианидиновой пробы), методики ТСХ для идентификации флавоноидов рутина, витексина, гиперозида в системе растворителей: этилацетат-кислота уксусная ледяная-вода (5:1:1). При детектировании флавоноидов на ТСХ-пластинах в УФ-свете (365нм) после обработки 1% этиламиновым эфиром дифенилборной кислоты и ПЭГ 400 обнаруживаются зоны флуоресценции: оранжевые – рутин (R<sub>f</sub>=0,37±0,05) и гиперозида (R<sub>f</sub>=0,56±0,05) и

желтовато-зеленая – витексина ( $R_f=0,67\pm 0,05$ ), голубая, соответствующая хлорогеновой кислоте ( $R_f=0,46\pm 0,05$ ), а также ВЭЖХ-идентификацию флавоноидов рутина, витексина, гиперозида, кверцетина по разработанной методике.

В Таблице 4 представлены разработанные показатели качества в раздел «Испытания».

Таблица 4. Результаты испытания ЛРС «Цветки с листьями боярышника» и предлагаемые нормы.

	Экспериментальные данные	Предлагаемая норма
Влажность, %	7,99 – 9,30	Не более 14
Зола общая, %	4,81 – 6,83	Не более 7
Зола нерастворимая в 10% HCl, %	0,08 – 0,36	Не более 0,5
Содержание стеблей, %	3,0 – 9,5	Не более 10
Содержание листьев, %	19,1 – 54,1	Не более 55
Содержание цветков, %	37,3 – 75,3	Не менее 35
Содержание побуревших частей, %	Отсутствуют	Отсутствуют
Содержание одревесневших частей, %	Отсутствуют	Отсутствуют
Органическая примесь, %	Отсутствует	Не более 1,5
Минеральная примесь, %	Отсутствует	Не более 1,0
Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид, % (СФ-УФ)	1,2 – 2,24	Не менее 1,0
Сумма витексина, гиперозида и рутина, % (ВЭЖХ-УФ)	0,442 – 1,56	Не менее 0,4

В проект НД также включены нормы по показателям: «Тяжелые металлы», «Остаточные количества пестицидов», «Микробиологическая чистота», «Радионуклиды», согласно требованиям соответствующих ОФС ГФ XIV.

Установлено, что коэффициент усушки ЛРС «Боярышника цветки с листьями» сопоставим по величине с таковым для фармакопейного вида сырья «Боярышника цветки». Расчеты показали, что использование перспективного сырья «Боярышника цветки с листьями» в определенной степени способствует увеличению выхода сухого сырья по сравнению с ЛРС «Боярышника цветки». Эти данные могут быть использованы для расчета ресурсов изучаемого вида сырья, что позволит более рационально организовать процесс заготовки.

Проведены групповые качественные реакции, подтверждающие присутствие флавоноидов, сахаров, танинов, сапонинов.

Установлены некоторые технологические параметры (в случае использования сырья «Боярышника цветки с листьями» в качестве источника получения лекарственных растительных препаратов): насыпная масса от  $0,144\pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>; угол естественного откоса –  $37,7\pm 2,9^\circ$ .

### ВЫВОДЫ

1. Разработанный проект инструкции по заготовке нового вида сырья боярышника, включающий сведения о номенклатуре видов, ботанических особенностях и ареалах их произрастания, технологии заготовки, описание и показатели качества сырья, возможные примеси других растений, условия хранения, позволяет стандартизовать технологию получения ЛРС.
2. Разработанная и валидированная в соответствии с требованиями ГФ XIII, XIV методика ВЭЖХ-УФ пригодна для идентификации сырья «Боярышника цветки с листьями» и определения в

нем содержания витексина, рутина, гиперозида и кверцетина.

3. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в сырье «Боярышника цветки с листьями» не различалось между секциями *Sanguineae* и *Crataegus* и между группами фармакопейных и нефармакопейных видов: 1,40–2,20% и 1,21–2,21%, соответственно. В сырье видов секции *Sanguineae* содержание гиперозида составило от 1,55 до 6,55 мг/г; кверцетина – от 0,07 до 0,74 мг/г; рутина – от 0,12 до 5,37 мг/г; витексина – от 0,51 до 3,90 мг/г; а в сырье видов секции *Crataegus* – от 3,13 до 12,59 мг/г; от 0,45 до 2,04 мг/г; от 0,07 до 0,95 мг/г и от 0,52 до 3,65 мг/г, соответственно. Сопоставимое видовое содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в сырье «Боярышника цветки с листьями», а также сходное содержание отдельных флавоноидов в сырье секций *Sanguineae* и *Crataegus* в исследуемой выборке обосновывают возможность одновременного получения ЛРС от разных видов боярышника этих секций.

4. Описаны макроскопические и анатомические диагностические признаки перспективного ЛРС «Боярышника цветки с листьями», полученного от растений секций *Sanguineae* и *Crataegus* флоры РФ, необходимые для установления подлинности, в сравнительном аспекте с возможными органическими примесями. В качестве дополнительного диагностического признака, позволяющего отличить ЛРС боярышника от примесей других семейств, предложены морфологические признаки пыльцы: форма в проекциях с полюса и экватора, скульптура и структура экзины.

5. С целью расширения сырьевой базы для получения ЛРС «Боярышника цветки с листьями» в дополнение к фармакопейным видам (ГФ XIV) рекомендуем следующие: *C. maximowiczii*, *C. jozana*, *C. chlorosarca*, *C. nigra*, *C. ambigua*, *C. laciniata*, *C. volgensis*, *C. pallasii*. Разработаны признаки подлинности, а также общие (влажность, зола общая и нерастворимая в 10% НСІ, посторонние примеси) и специфические показатели качества ЛРС изученных фармакопейных и нефармакопейных видов и предложены нормы для включения в проект НД «Боярышника цветки с листьями»: содержание листьев – не более 55%, стеблей – не более 10%, цветков – не менее 35%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид – не менее 1,0%; содержание суммы витексина, гиперозида и рутина – не менее 0,4%.

#### Практические рекомендации

Результаты исследования в виде проекта НД на новый вид ЛРС аналитические методики могут быть предложены для включения в ГФ. Разработанные аналитические методики позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации растительного сырья, содержащего флавоноиды, и могут быть использованы в Центрах контроля качества и сертификации лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

#### Список сокращений

**а.с.с.** – абсолютно сухое сырье  
**БАД** – биологически активная добавка  
**БАВ** – биологически активные вещества  
**ВЭЖХ-УФ** – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием  
**ГФ** – Государственная Фармакопея  
**ЛРС** – лекарственное растительное сырье  
**ЛС** – лекарственное средство

**НД** – нормативная документация  
**РФ** – Российская Федерация  
**СО** – стандартный образец  
**СФМ** – спектрофотометрия

**ТСХ** – тонкослойная хроматография  
**ТФЭ** – твердофазная экстракция  
**ФС** – фармакопейная статья

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Kiryanova (Sagaradze) V. A., Babaeva N. Y.** Pharmacognostical study of raw materials of *Crataegus* // Материалы V Международной научной конференции “SCIENCE4HEALTH 2013”. — 2013. — С. 152–153 (на английском языке).
2. **Кирьянова (Сагарадзе) В. А., Бабаева Е. Ю., Северова Е. Э.** Фармакогностический и

- палиноморфологический анализ цветков с листьями боярышника и его примесей // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2014. — №4. — С.50.
3. **Kiryanova (Sagaradze) V. A.**, Babaeva H. Y. Comparison of anatomical characteristics of leaves and flowers of *Crataegus* and some species of *Rosacea* family // *Modern Phytomorphology*. — 2014. — Vol. 6. — P.123–124 (на английском языке).
  4. **Кирьянова (Сагарадзе) В. А.** «Фармакогностический и палиноморфологический анализ цветков с листьями боярышника и его примесей» // Сборник трудов конференции «От растения к препарату: традиции и современность». — М.: Щербинская типография, 2014. - С. 215-217
  5. **Кирьянова (Сагарадзе) В. А.**, Бабаева Е. Ю. К определению коэффициента усушки различных видов сырья боярышника // *Материалы II Научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и Фармация XXI века»*. — М.: Щербинская типография Москва, 2014. — С. 76–78.
  6. **Кирьянова (Сагарадзе) В. А.**, Бабаева Е. Ю. Палиноморфологический анализ при установлении подлинности цветков боярышника // *Сборник материалов Всероссийского съезда фармацевтических работников*. — М.: ООО "Бионика Медиа", 2014. — С. 120–121.
  7. **Кирьянова (Сагарадзе) В. А.**, Бабаева Е. Ю., Каленикова Е. И. Определение флавоноидов в цветках с листьями боярышника // *Сборник материалов IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты»*. — М.: ООО "ИПЦ "Маска", 2015. — С. 564–569.
  8. **Кирьянова (Сагарадзе) В. А.** Твердофазная экстракция флавоноидов из спиртовых извлечений лекарственного растительного сырья // *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015»* / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2015. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM)
  9. **Kiryanova (Sagaradze) V. A.**, Babaeva H. Y. Authenticity criteria some quality characteristics development for promising raw material “flowers with leaves” of *Crataegus* // *Материалы Международной VI научной конференции “SCIENCE4HEALTH 2015”*. — М.: РУДН, 2015. — С. 30–31 (на английском языке).
  10. **Сагарадзе В. А.**, Бабаева Е. Ю. Определение некоторых технологических параметров сырья боярышника // *Материалы III Научно-практической конференции с международным участием: Молодые учёные и фармация XXI века*, М.: Щербинская типография, 2015. — С. 352–354.
  11. **Sagaradze V. A.** Flowering tops of *Crataegus*: general quality evaluation // *PhD Scientific Meeting 2016 - Abstract book*, Semmelweis University, Budapest, Hungary, 2016. — p.115.
  12. **Сагарадзе В. А.**, Бабаева Е. Ю., Каленикова Е.И. Установление подлинности перспективного вида лекарственного сырья – цветков с листьями боярышника // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2017. – Т. 20. – №. 2. – С. 26-31.
  13. **Сагарадзе В. А.**, Бабаева Е. Ю., Каленикова Е. И. Определение флавоноидов в цветках с листьями боярышника методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2017. – Т. 51. – №. 4. – С. 30-34.
- Sagaradze V. A.**, Babaeva E. Y., and Kalenikova E. I. HPLC-UV method for determining flavonoids in hawthorn flowers and leaves. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2017. – Vol. 51 – Iss. 4 – p. 277–280 – переводная версия.
14. **Сагарадзе В. А.** Сравнительное изучение сырья "цветки с листьями" некоторых видов боярышника. // *Сб. трудов VII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего»*. – С.Пб: СПХФА, 2017 – с. 750–753.
  15. **Сагарадзе В. А.**, Бабаева Е. Ю., Каленикова Е. И., Трусов Н. А., Ростовцева М. В. Сравнительная оценка содержания флавоноидов в цветках с листьями некоторых видов рода *Crataegus*. // *Сб. науч. конф. "Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира"* материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси, Т.2., Медисонт Минск, 2017. — с. 117–119.
  16. **Сагарадзе В. А.**, Бабаева Е.Ю., Уфимов Р. А., Загурская Ю. В., Трусов Н. А., Коротких И. Н., Маркин В. И., Пешанская Е. В., Можаяева Г.Ф., Каленикова Е. И. Содержание флавоноидов в цветках с листьями боярышников (*Crataegus L.*) флоры РФ. // *Химия растительного сырья*. – 2018. №4. – с 95-104. (ВАК, Scopus).



**Сагарадзе Валентина Андреевна  
(Российская Федерация)**

**«Фармакогностическое исследование и стандартизация перспективного лекарственного растительного сырья – «Цветки с листьями» видов рода Боярышник (*Crataegus* L.) флоры Российской Федерации»**

Проведено сравнительное фармакогностическое изучение сырья «Боярышника цветки с листьями» 15 видов и одного гибрида рода Боярышник флоры России. Для анализа флавоноидов в исследуемом сырье были применены современные физико-химические методы (ТСХ, ВЭЖХ-УФ, СФМ). Разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в сырье боярышника. Проведено сравнительное морфолого-анатомическое изучение сырья «Боярышника цветки с листьями» исследуемых видов и возможных органических примесей в нем, определены характеристики подлинности, критерии отличия от примесей.

По результатам диссертационного исследования разработаны показатели качества сырья для включения в проект НД на новый вид сырья боярышника, подготовлен проект Инструкции по сбору и сушке сырья боярышника.

**Sagaradze Valentina Andreevna  
(Russian Federation)**

**Pharmacognostic study and standardization of perspective herbal raw material – "flowers with leaves" of Hawthorn (*Crataegus* L.) species of Russian flora**

A comparative pharmacognostic study of the raw material "Hawthorn flowers with leaves" of 15 species and one hybrid of the genus Hawthorn of the flora of Russia has been carried out. Modern physicochemical methods (TLC, HPLC-UV, SFM) were used to analyze the flavonoids in the raw materials under study. Methods for the qualitative and quantitative analysis of flavonoids in hawthorn raw materials have been developed. A comparative morphological-anatomical study of the raw material "Hawthorn flowers with leaves" of the studied species and possible organic impurities in it was carried out, the characteristics of authenticity, the criteria for difference from impurities were determined.

According to the results of the dissertation research, indicators of the quality of raw materials have been developed for inclusion in the Pharmacopoeial Monograph project for a new type of raw material of hawthorn, a draft Instruction on the collection and drying of hawthorn raw materials has been prepared.