

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПАВЛОВА АЛИЯ АЛИКОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
БОЯРЫШНИКА ПЕНСИЛЬВАНСКОГО *CRATAEGUS*
PENNSYLVANICA ASHE**

3.4.2 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
доктор фармацевтических наук,
профессор С. Р. Хасанова

УФА 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. CRATAEGUS PENNSYLVANICA ASHE КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ВИД РОДА CRATAEGUS L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 Морфологическая характеристика, ареал, особенности интродукции <i>Crataegus pennsylvanica</i> Ashe	12
1.2 Современные исследования химического состава <i>C. pennsylvanica</i>	17
1.3 Современные исследования фармакологической активности основных биологически активных веществ <i>C. pennsylvanica</i>	29
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	38
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	39
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Объекты исследования	39
2.2 Методы исследования	39
2.2.1 Макроскопический и микроскопический анализ сырья	39
2.2.2 Определение числовых показателей	40
2.2.3 Методы фитохимического анализа	40
2.2.3.1 Методики качественного анализа	40
2.2.3.2 Методики количественного анализа	46
2.2.4 Методы исследования фармакологической активности	49
2.2.5 Методы статистической обработки результатов исследований	52
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ CRATAEGUS PENNSYLVANICA ASHE	53
3.1 Морфологическое исследование побегов <i>C. pennsylvanica</i>	53
3.2 Анатомио-диагностические исследования побегов и плодов <i>C. pennsylvanica</i>	55
3.3 Изучение диагностически значимых признаков в побегах <i>C. pennsylvanica</i>	61
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	63
ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ CRATAEGUS PENNSYLVANICA ASHE	64
4.1 Качественный анализ побегов <i>C. pennsylvanica</i>	64
4.1.1 Качественные реакции	64
4.1.2 Хроматографические исследования <i>C. pennsylvanica</i>	65
4.1.2.1 Результаты тонкослойной хроматографии	65
4.1.2.2 Исследование липофильной фракции сырья <i>C. pennsylvanica</i> методом газовой хроматографии	70
4.2 Количественное определение БАВ в побегах <i>C. pennsylvanica</i>	90
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	91
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ	92

CRATAEGUS PENNSYLVANICA ASHE	
5.1 Стандартизация цветков и плодов <i>C. pennsylvanica</i>	92
5.2 Разработка методики качественного анализа флавоноидов в побегах <i>C. pennsylvanica</i>	95
5.3 Разработка методики количественного анализа сапонинов в побегах <i>C. pennsylvanica</i>	98
5.4 Валидационная оценка методики количественного анализа флавоноидов в побегах <i>C. pennsylvanica</i>	100
5.5 Разработка методики качественного анализа сапонинов в побегах <i>C. pennsylvanica</i>	110
5.5.1 Выбор метода количественного определения	110
5.5.2 Выбор условий экстракции	112
5.5.3 Валидационная оценка методики количественного определения	117
5.6 Определение числовых показателей и сроков годности	122
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	127
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОБЕГОВ CRATAEGUS PENNSYLVANICA ASHE	128
6.1 Изучение антиоксидантной активности	128
6.2 Изучение влияния на систему гемостаза	130
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	133
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	137
ПРИЛОЖЕНИЯ	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Одной из проблем современной российской фармацевтической отрасли является проблема импортозамещения и создания в стране эффективных и безопасных лекарственных средств. Одним из путей решения этой проблемы является исследование в области интродукции и культивировании лекарственных растений. Ботанические сады Российской Федерации имеют большие коллекции интродукционных видов растений, которые можно использовать в лекарственном растениеводстве в качестве культивируемых производящих растений для получения лекарственного растительного сырья. Одним из примеров таких растений являются многочисленные виды рода *Crataegus* L., широко используемые в медицине для лечения патологии сердечно-сосудистой системы. Во всем мире произрастает более 300 видов рода *Crataegus* L., из них в России интродуцировано около 90 видов [72], которые имеют потенциал для использования в фармацевтической промышленности. Поскольку боярышник растет отдельно и не образует зарослей, он не удовлетворяет спрос фармацевтической промышленности, поэтому изучение интродуцированных видов поможет расширить доступную сырьевую базу. Так же необходимо изучить другие органы растений рода *Crataegus* L. Например, в странах Евросоюза, Америке, Израиле, Китае, Беларуси кроме плодов и цветков, официальным сырьем являются побеги и листья [17, 97, 101, 102, 133, 147, 148, 151].

Таким образом, фармакогностическое изучение интродуцированных видов растений рода *Crataegus* L. является актуальным. *Crataegus pennsylvanica* Ashe является одним из перспективных видов боярышника, который легко интродуцируется в условиях нашей страны [108, 110].

Степень разработанности проблемы. Фармакогностические исследования представителей рода *Crataegus* L. широко публикуются в отечественных и зарубежных изданиях. В Российской Федерации в данной области работали такие отечественные авторы, как И.А. Самылина (1992), О.Г. Потанина (2003), Н.Ф. Гончаров (2008), В.А. Куркин (2013), С.Р. Хасанова (2016), Н.С. Ляхова (2018), С.В. Трофимова (2014), Т.В. Морозова (2019), В.А. Гусакова (2023) и др. Разработка различных методик стандартизации сырья и фитопрепаратов из боярышников описаны в работах В.А. Куркина (2013), С.В. Трофимовой (2014), И.А. Самылиной (2016), В.А. Гусаковой (2023), К.И. Еникеевой (2023) и др. Фармакологические исследования проводились О.В. Евдокимовой (1999), В.А. Куркиным (2017), В.А. Гусаковой (2023) и др.

Однако обзор литературы по теме диссертации показывает, что ранее не проводилось исследований по фитохимическому анализу *Crataegus pennsylvanica* Ashe, поэтому выбор темы и цели диссертационного исследования, обосновывается недостаточным уровнем научных исследований, а так же значительной практической значимостью данного направления для отечественной фармации и медицины.

Цели и задачи. Целью диссертационной работы является фармакогностическое изучение сырья боярышника пенсильванского (*Crataegus pennsylvanica* Ashe), интродуцированного в Республике Башкортостан.

Для достижения поставленной цели были выявлены следующие задачи:

1. Изучить и изложить в виде литературного обзора уже известные сведения научной литературы изучения химического состава и биологических свойств *C. pennsylvanica*.

Провести морфолого - анатомические исследования побегов *C. pennsylvanica* и установить диагностически - значимые признаки данного вида сырья.

2. Установить соответствие плодов и цветков *C. pennsylvanica* фармакопейным требованиям.
3. Исследовать химический состав побегов *C. pennsylvanica* и определить качественный состав и количественное содержание основных групп биологически активных веществ.
4. Установить стандарты подлинности и показатели качества побегов *C. pennsylvanica* и разработать на их основе проект фармакопейной статьи «Боярышника пенсильванского побеги».
5. Исследовать возможные фармакологические свойства *C. pennsylvanica*.

Научная новизна. С использованием современных методов анализа (ТСХ, ГХ/МС, УФ-спектроскопия) был изучен химический состав *C. pennsylvanica*. В побегах боярышника пенсильванского методом ТСХ идентифицированы рутин, кверцетин, гиперозид, лютеолин, витексин, лютеолин-7-О-гликозид, кофейная, синаповая, хлорогеновая, олеаноловая и урсоловая кислоты; методом ГХ/МС впервые обнаружены 43 соединения из различных групп (тритерпеновые сапонины, монотерпеноиды, сесквитерпеноиды, каротиноиды, токоферолы, фитостерины, флавоноиды, жирные кислоты, сложные эфиры и кетоны, алканы). В исследуемом сырье *C. pennsylvanica* установлено количественное содержание флавоноидов, дубильных веществ, сапонинов, процианидинов, аскорбиновой кислоты.

Впервые проведен микроскопический анализ побегов, цветков, листьев и плодов *C. pennsylvanica*, установлены диагностически – значимые признаки.

Установлено соответствие плодов и цветков *C. pennsylvanica* параметрам стандартизации, описанным в ОФС 2.5.0061.18 «Боярышника плоды» и ОФС 2.5.0062.18 «Боярышника цветки».

Разработаны показатели подлинности и качества побегов *C. pennsylvanica* и проведена их стандартизация. Разработаны числовые показатели и установлены сроки годности сырья.

Изучены фармакологические свойства побегов, цветков и плодов *C. pennsylvanica*, впервые определены их антиоксидантные и антиагрегантные свойства.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны параметры подлинности и качества побегов *C. pennsylvanica* для их стандартизации. Разработаны методики анализа: ТСХ для качественного анализа, методики количественного определения суммы флавоноидов и суммы сапонинов. Данные исследования дают возможность расширения номенклатуры официального сырья - побегов *C. pennsylvanica*. Результаты исследований подтверждают целесообразность внедрения *C. pennsylvanica* в качестве дополнительного производящего растения для включения в ФС «Боярышника плоды», «Боярышника цветки».

Внедрение в практику. Проведенные исследования стали основой разработанного проекта ФС «Боярышника пенсильванского побеги».

Результаты исследований используются в учебном процессе кафедры фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. На основании исследований оформлен патент по разработке методики количественного определения сапонинов.

Методология и методы исследований. Методология диссертационной работы основана на поиске и анализе научных литературных источников по выбору объектов исследования на основе перспективных растительных объектов, степени изученности их химического состава, ресурсов, возможности культивирования, перспективы использования в научной медицине; постановке цели и задач по введению в медицинскую практику нового вида лекарственного растительного сырья; целенаправленном изучении химического состава и биологических свойств; разработке дополнений к имеющимся НД и разработке НД на новый вид ЛРС; формулировку выводов, определяющих теоретическую и практическую значимость материалов диссертационной работы.

Основные методы фитохимических исследований - методы ТСХ, ГХ/МС, УФ-спектрофотометрия, титриметрия. Анатомические исследования проводились с применением микроскопов «Минимед-501» и «Микровизор» с цифровой камерой. Изучение биологической активности проводили методами спектрофотометрии и Борна.

Положения, выносимые на защиту

результаты макро и микроскопического анализа побегов *C. pennsylvanica*;

- результаты изучения химического состава побегов *C. pennsylvanica*;
- результаты исследований о возможности применения *C. pennsylvanica* в качестве производящего растения для лекарственного растительного сырья - плоды и цветки боярышника;
- результаты по разработке методик стандартизации побегов *C. pennsylvanica*;
- результаты исследования антиоксидантной и антиагрегантной активности *C. pennsylvanica*;
- результаты по разработке проекта ФС «Боярышника пенсильванского побеги».

Степень достоверности. Степень достоверности диссертационного исследования определяется большим количеством исследуемых выборок (32 образца). Для статистической обработки данных результатов исследований использовалась методика математической статистики. Обработка полученных данных проводилась по методу вариационной статистики и использовалась программа «Statistica 10,0». Проверка на нормальность распределения экспериментальных данных проводилась по критерию Шапиро-Уилка, а дисперсионный анализ выборок рассчитывалась по критерию Краскела-Уоллиса. Статистически значимыми считались различия между группами при доверительной вероятности 0,05. Достоверность различий между выборками определялась двум критериям: по t-критерию Стьюдента (параметрический) и U-критерию Манна - Уитни (непараметрический). Разработанные методики для стандартизации были

проверены на пригодность. Выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы, логически обоснованы и сложены из результатов многоуровневого анализа значительного объёма выборок и результатов выполненных исследований.

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международной научной конференции, ФГБНУ ВИЛАР (Москва, 2021), X международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2022), международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», приуроченной к 30-летию Независимости Республики Казахстан (Астана, 2021), I международной научно-практической конференции по традиционной (народной) медицине «Абу Али Ибн Сино (Авицена) и Великий шелковый путь» (Самарканд, 2022), IX международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Казахстан, 2022), Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Иркутск, 2022), конференции «Фармация - движения вперед!» (Караганда, 2023), XXIV международном конгрессе РНУТОРНАРМ 2023 (Санкт-Петербург, 2023), III международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», посвященной 70-летнему Юбилею Лауреата Государственной премии РК, д.фарм.н., профессора Арыстановой Танагуль Акимбаевны (Астана, 2023), международной научной конференции «Гаммермановские чтения» (Пермь, 2023).

Связь задач исследования с проблемами фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств».

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования отражены в 17 научных работах. Из них 3 статьи в отечественных изданиях, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, получена справка на приоритет изобретения РФ.

Личный вклад автора. Автор самостоятельно определил научное направление и цель исследования, спланировал и провел экспериментальные исследования. Все результаты были получены лично автором. В работах, выполненных в соавторстве, автор лично проводил научное обоснование, подготовку образцов, расчет данных и интерпретацию полученных результаты. Участие автора в сборе, анализе и обобщении результатов является решающим.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия пункту 2 «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 пункту «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства, потребления»; 6 пункту «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Работа представляет итог исследований, выполненный автором в научном сотрудничестве с кафедрой фармакогнозии и ботаники, кафедрой фармакологии и лабораторией ЦНИЛ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 173 странице печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 экспериментальных глав, общих выводов, списка литературы и приложений. В работе содержатся 33

таблицы, 76 рисунков и 7 схем. Список цитируемой литературы включает 157 библиографических источников, 70 из которых на иностранных языках.

ГЛАВА 1. *CRATAEGUS PENNSYLVANICA* ASHE КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ВИД РОДА *CRATAEGUS* L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Морфологическая характеристика, ареал, особенности интродукции *Crataegus pennsylvanica* Ashe

Род *Crataegus* L. занимает большую территорию в северном полушарии в Европе, Азии и Северной Америке, и является одним из самых сложных в таксономическом отношении родов. Согласно современным генетическим исследованиям род *Crataegus* L. состоит из трех подродов, хорошо различимых по генетическим и морфологическим признакам, а также географически: подрод *Crataegus* (европейские виды), подрод *Sanguineae* Ufimov subgen. nov. (азиатские виды) и подрод *Americanae* El Gazzar. (североамериканские виды), каждый из которых разделен еще на многочисленные секции [71, 113, 114].

Боярышник пенсильванский *Crataegus pennsylvanica* Ashe, так же называемый *Crataegus tatanalliana* Sargent. относится к подроду *Americanae* El Gazzar. секции *Coccineae*. *C. pennsylvanica* - широколиственное дерево высотой 5-10 метров [149], имеет открытую, раскидистую крону [131], относится к семейству розоцветных *Rosaceae* [149]. Кора ствола оранжево-коричневая, разделена на продольные пластины [134], на крупных ветках встречаются шипы длиной 3-5 см [108]. Черешки длиной 2-3 сантиметра, листья цельные, широкояйцевидной формы, края зубчатые, основание широко-клиновидное [134]. Прилистники зубчатые, округлые могут опоясывать стебли под листьями. Молодые листья густо-опушенные, на старых листьях волоски имеются только вдоль жилок с нижней стороны листовой пластинки. *C. pennsylvanica* цветет в мае, а иногда в июне [108]. Щитковидные соцветия состоят из 8-20 цветков, диаметр которых может

достигать до 2 сантиметров. Цветки имеют 5 белых лепестков и 5 узко-треугольных чашелистиков, 5-10 тычинок, пыльники бледно-розового цвета [134]. Цветоносы волосистые, как и прикорневые части цветков, а чашелистики и нижележащие прицветники снабжены железистыми зубцами [108]. Плод – яблоко, образованное из гинецея, обросшего снаружи гипантием [34], они круглой формы диаметром 10-12 миллиметров, ярко красного цвета [108], густо ворсинчатые, внутри 4-5 косточек [134] (рисунок 1.1.1, 1.1.2).



Рисунок 1.1.1 – Цветки *C. pennsylvanica*



Рисунок 1.1.2 - Внешний вид побегов *C. pennsylvanica*

C. pennsylvanica произрастает в диком виде в основном в восточной и юго-восточной части Северной Америки: в Онтарио, Пенсильвании, Делавэре, Северной Каролине, Огайо, Нью Йорке (рисунок 1.1.3) [134]. Средой обитания являются опушки подлеска [131], открытые леса, заросли на влажных плодородных почвах [132], иногда селится на сукцессионных полях или вдоль изгородей [134]. Растение может произрастать на высотах от 10 до 200 метров [149]. *C. pennsylvanica* непривередливое растение, может расти в легких (песчаных), средних (суглинистых) и тяжелых (глинистых) почвах [132]. После укоренения может переносить ряд сложных условий: засуху, чрезмерно влажные почвы, открытые, ветренные морские условия и загрязнение атмосферы [110]. Например, Нью-Джерси расположен в сухом, каменистом, открытом лесном массиве [128], а средой обитания в Огайо

являются влажные леса. Данный вид боярышника может быть полезен для стабилизации и борьбы с эрозией, поскольку он способен переносит самые разнообразные условия [108].



Рисунок 1.1.3 - Ареал произрастания *C. pennsylvanica* в Северной Америке

C. pennsylvanica очень морозостойкое растение, способное переносить температуры примерно до -25°C в состоянии полного покоя [110]. Это очень легко выращиваемое растение и мало беспокоится вредителями и болезнями, свободно гибридизуется с другими представителями этого рода [132]. Он также требует очень мало внимания, после укоренения практически единственной необходимой работой является ежегодный сбор плодов [110]. Саженцам требуется от 5 до 8 лет, прежде чем они начнут плодоносить, а

привитые деревья часто обильно цветут на третий год. Саженцы не следует оставлять на грядке более 2 лет без пересадки [132]. Деревья, растущие на солнечном месте, обычно дают больше плодов лучшего качества, чем деревья, растущие в тени [110].

C. pennsylvanica цветет в мае – июне [134], однако повышение температуры может повлиять на его цветение. Боярышники, растущие в более прохладных понижениях, зацветают позже, чем те, что расположены выше по склону, а ветви, обращенные на юг, зацветают раньше чем ветви обращенные на север, и цветы на верхушках деревьев раскрываются раньше, чем на нижних ветвях. По мере потепления климата цветки *C. pennsylvanica* могут зацвести раньше, что может привести к потере синхронности с основными опылителями. Данный вид боярышника опыляется мошками и для привлечения этих насекомых в цветках образуется триметиламин [108], имеющий специфичный запах «тухлой рыбы», который заметен даже при низких концентрациях этого вещества. Данное соединение является специфическим для рода *Crataegus* L. и накапливается во всех видах рода [121]. Самая высокая концентрация данного вещества наблюдается в бутонах и свежих цветках. Помимо мошек в опылении могут участвовать мухи, которых привлекает гнилостный запах цветков *C. pennsylvanica*. Более поздние опылители медоносные пчелы, шмели и некоторые виды бабочек. У цветков *C. pennsylvanica* есть нектарники, выделение концентрации сахара в нектаре может колебаться в течение дня, что приводит к разным наборам насекомых-опылителей в разное время. Оплодотворяемость улучшается в присутствии другой цветущей флоры, так как увеличивается разнообразие опылителей [108].

Плоды *C. pennsylvanica* созревают в сентябре - начале октября [134, 149]. Плодоядные птицы являются важными распространителями семян боярышника. Их преимущественно привлекают деревья с многочисленными плодами, более крупными плодами и высоким соотношением мякоти к косточкам. Плоды относительно невелики по пищевой ценности, поэтому,

хотя осеннее время плодоношения *C. pennsylvanica* совпадает с пиком миграции, потребление и расселение продолжатся и в зимние месяцы, поскольку мигрирующие птицы избирательно отдают предпочтение плодам тех видов растений, которые обеспечивают более высокую питательную ценность. Птицы, которые живут зимой, обычно разбрасывают семена на меньшей площади. Так же к распространителям семян можно отнести ряд млекопитающих, которые могут употреблять плоды боярышника и разбрасывать семена, включая черных медведей, енотов, лис, койотов, куниц и скунсов [108]. После расселения семенам *Crataegus* часто требуется период теплой стратификации, за которым следует период холодной стратификации, прежде чем они смогут прорасти, поэтому для прорастания может потребоваться два или более года [96].

Эта культура размножается отводками, корневыми черенками, семенами, а формы для сада – прививкой [13]. Семена - лучше всего высевать осенью, как только они созреют, в холодное время года. Часть семян прорастет весной, хотя большинству, вероятно, потребуется еще год. Хранящиеся семена могут прорасти очень медленно и неустойчиво, поэтому их следует стратифицировать в тепле в течение 3 месяцев при 15 °С, а затем в холодном состоянии еще 3 месяца при 4 °С. Для прорастания может потребоваться еще 18 месяцев, но скарификация семян перед их стратификацией либо ферментация семян в собственной мякоти может сократить это время. Еще одна возможность - собрать семена "зелеными" (как только эмбрион полностью разовьется, но до того, как семенная оболочка затвердеет) и сразу же посеять их в холодную рамку. При правильном выборе времени он может прорасти весной. Если выращивать только небольшое количество растений, лучше всего рассаживать саженцы, как только они станут достаточно большими, чтобы с ними можно было обращаться, и выращивать их в отдельных горшках в течение первого года, высаживая их поздней весной на грядки или на их конечные позиции. При выращивании в больших количествах, возможно, лучше всего высевать их

прямо на открытом воздухе в грядку для семян, но с защитой животных, поедающих семена [132].

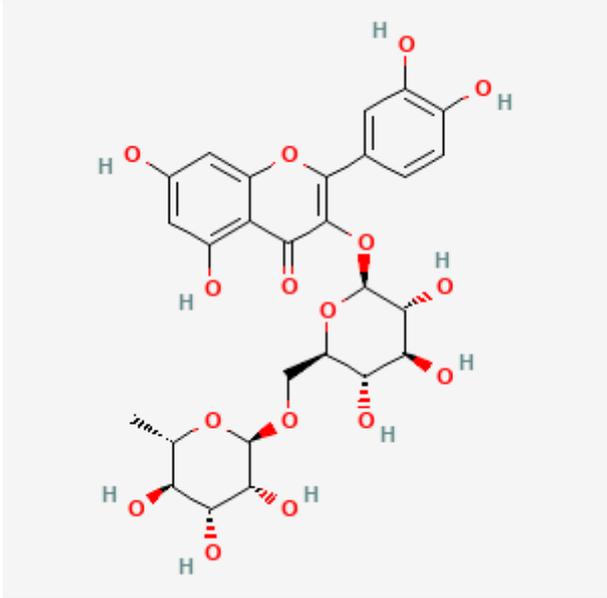
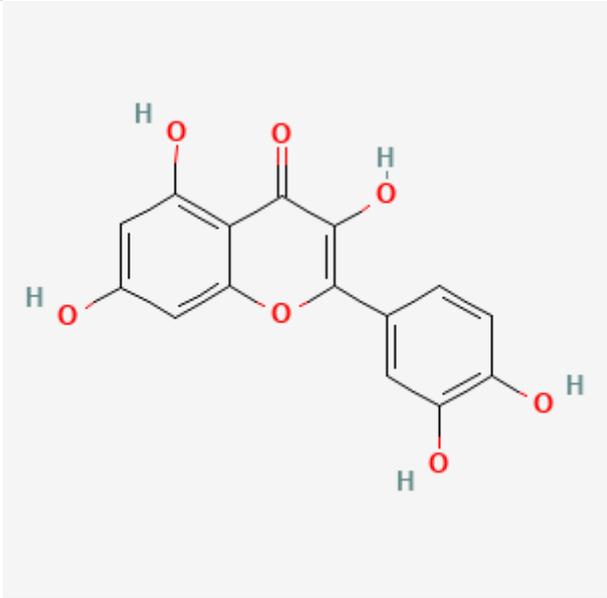
В России данный вид интродуцирован в условиях ботанических садов, расположенных в различных климатических условиях: в Главном ботаническом саду РАН (г. Москва), в ботаническом саду Петра Великого (г. Санкт-Петербург), в Южно-Уральском ботаническом саду-институте (г.Уфа) [8], в ботаническом саду УрО РАН (г. Екатеринбург).

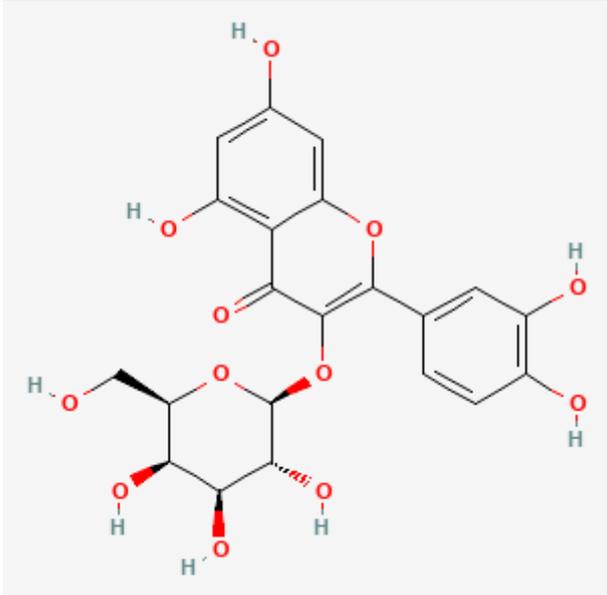
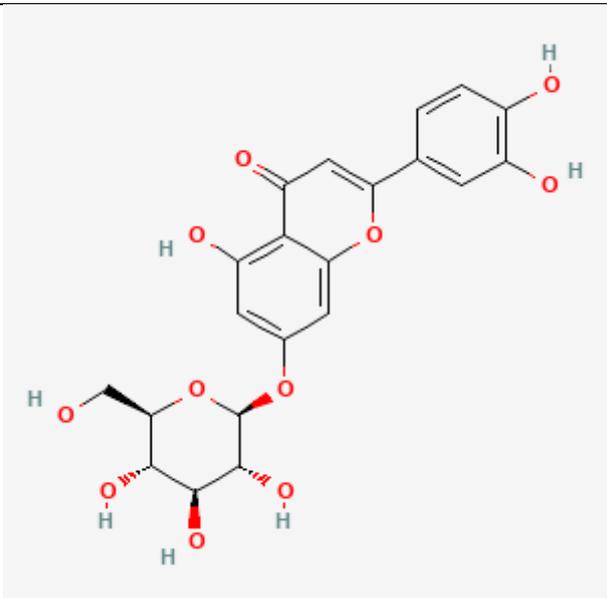
1.2 Современные исследования химического состава

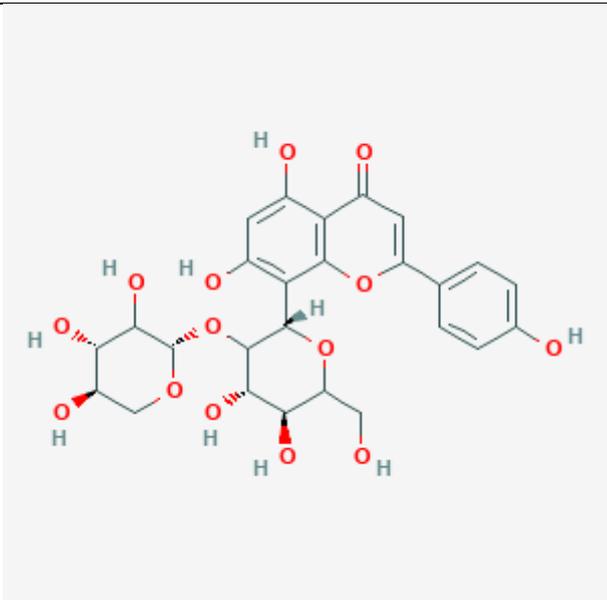
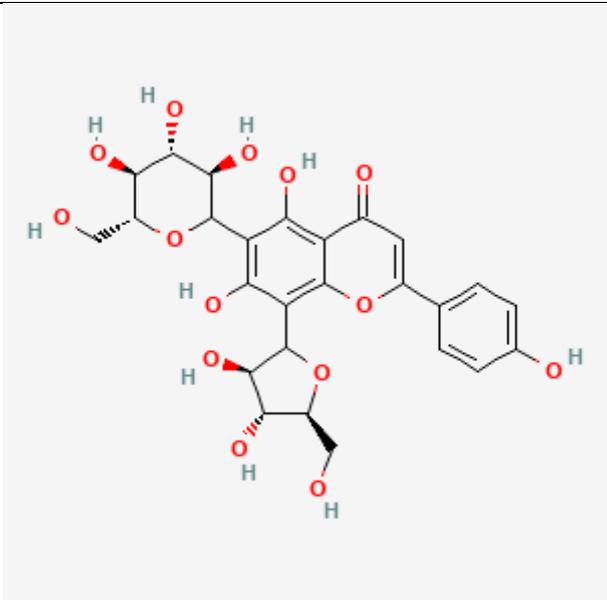
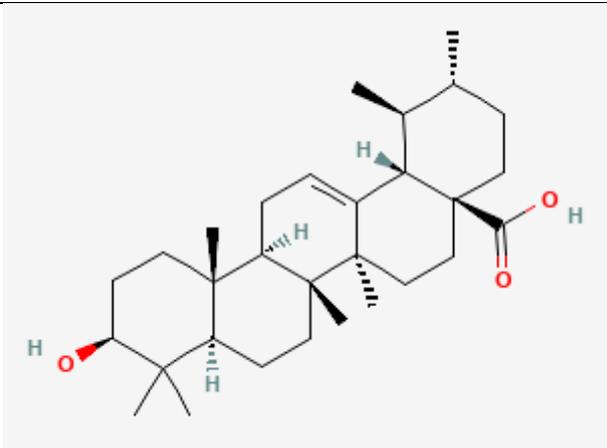
C. pennsylvanica

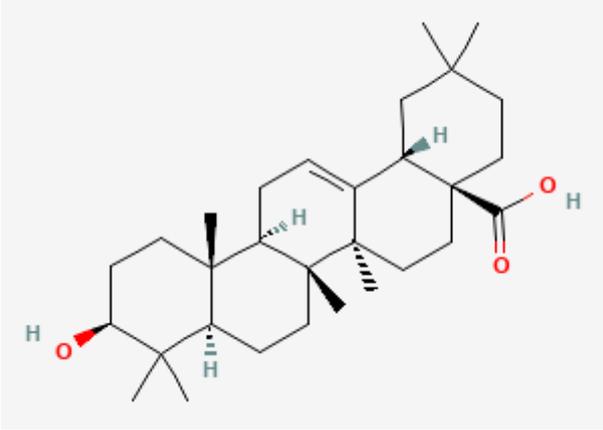
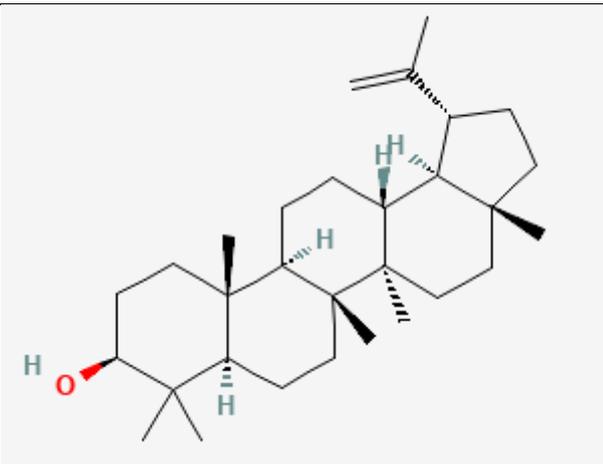
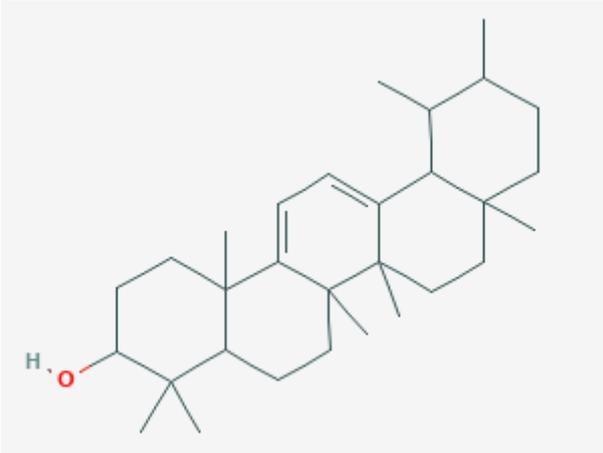
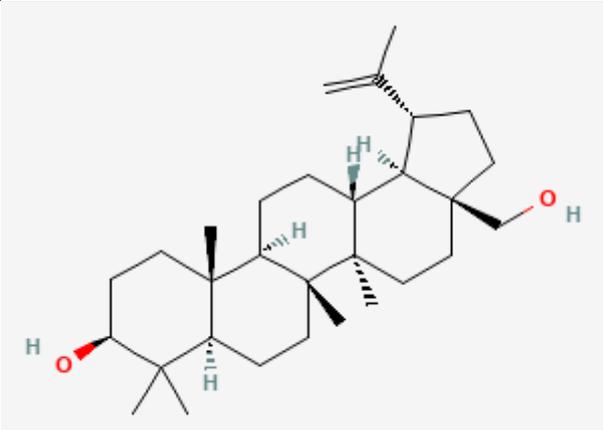
В настоящее время химический состав *C. pennsylvanica* практически не изучен. Согласно данным исследованиям в *C. pennsylvanica* обнаружены такие группы химических веществ, как дубильные вещества [50], флавоноиды [41, 44, 48, 52, 77, 130], процианидины [14], сапонины [41, 84], каротиноиды [41, 47], кумарины [43], оксикоричные кислоты [49], аскорбиновая кислота [42, 46]. Методом тонкослойной хроматографии в побегах *C. pennsylvanica* были обнаружены флавоноиды - рутин, кверцетин, гиперозид, лютеолин, витексин, лютеолин-7-О-гликозид; сапонины - урсоловая кислота и олеаноловая кислота; оксикоричные кислоты - кофейная, синаповая и хлорогеновая кислоты. В ходе проведения ГХ-МС анализа в составе *C. pennsylvanica* были обнаружены 76 веществ, из них идентифицировано 43 веществ различных классов соединений (таблица 1.2.1) [14, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 50, 52, 77, 84, 130].

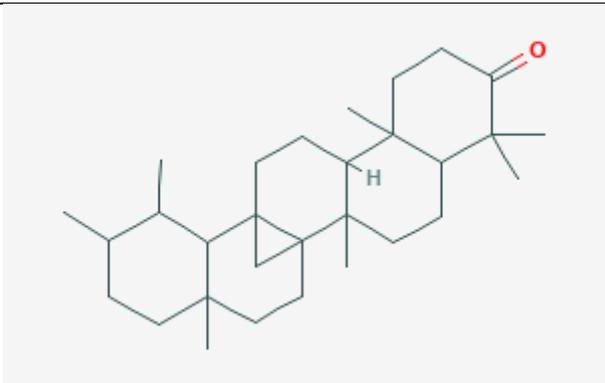
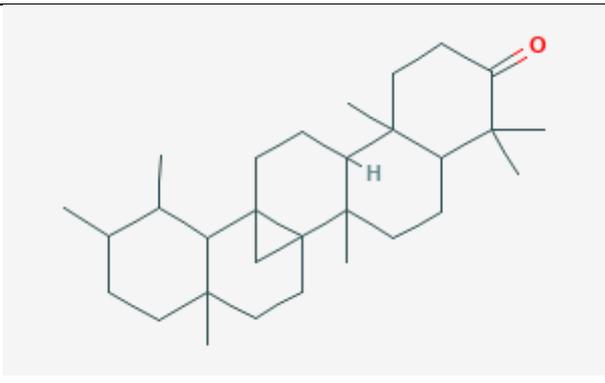
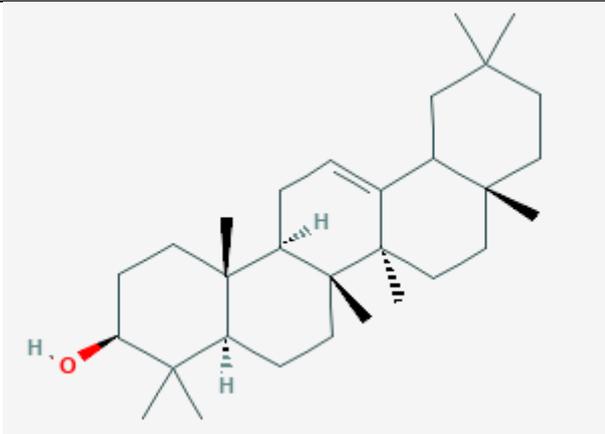
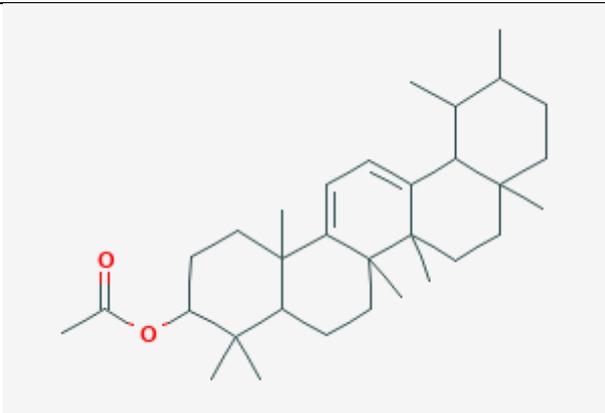
Таблица 1.2.1 – Идентифицированные вещества в побегах *C. pennsylvanica*

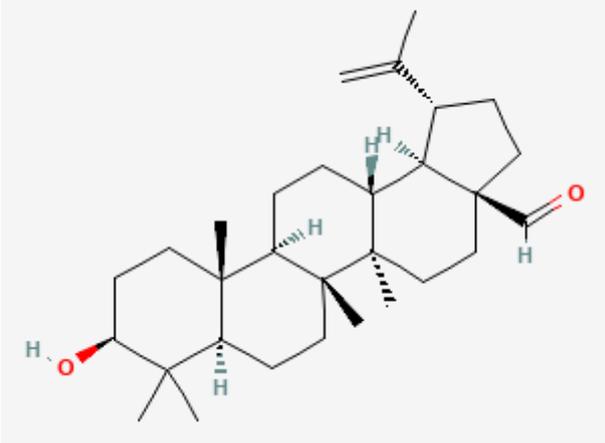
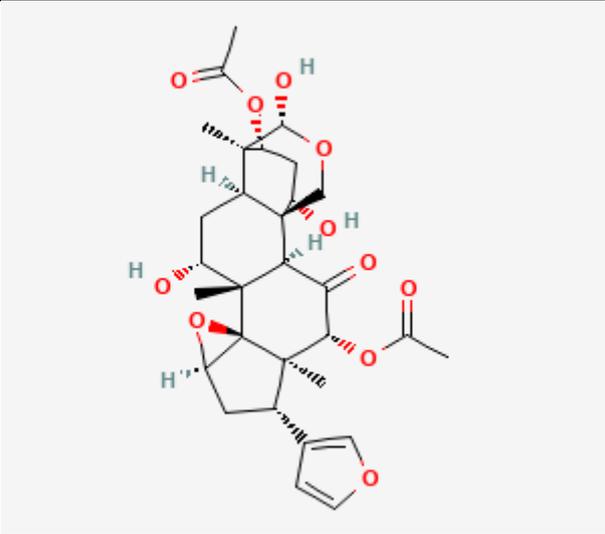
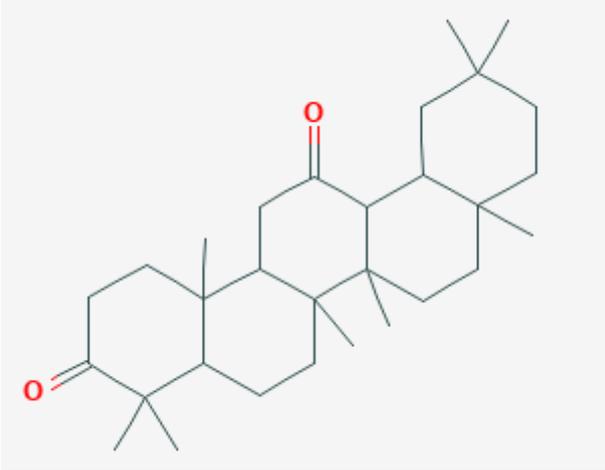
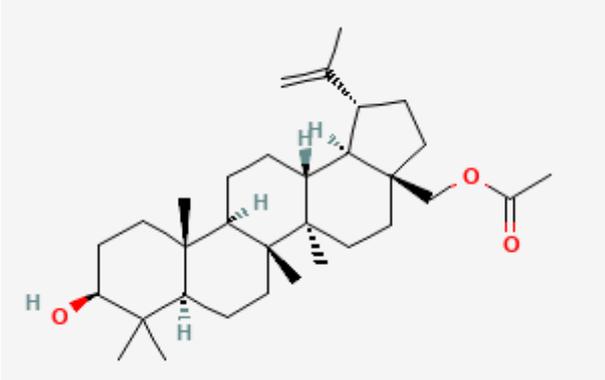
Флавоноиды	
Рутин	 <p>The image shows the chemical structure of Rutin, a flavonoid. It consists of a flavanone core (quercetin) linked to a disaccharide (rutinoside) at the C-3 position. The quercetin part has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3'. The rutinoside part is composed of a glucose molecule linked to a rhamnose molecule. The hydroxyl groups on the rhamnose are shown with stereochemistry: the C-1 hydroxyl is on a wedge, and the C-2 and C-3 hydroxyls are on dashes.</p>
Кверцетин	 <p>The image shows the chemical structure of Quercetin, a flavonoid. It consists of a flavanone core with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3'. The 3' hydroxyl group is shown with a wedge bond, indicating its stereochemistry.</p>

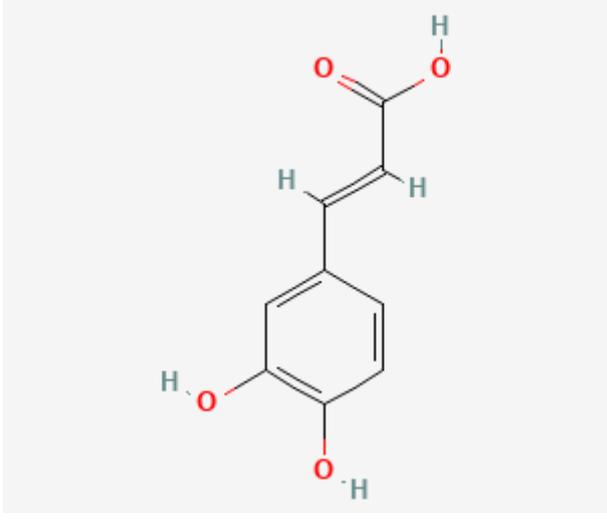
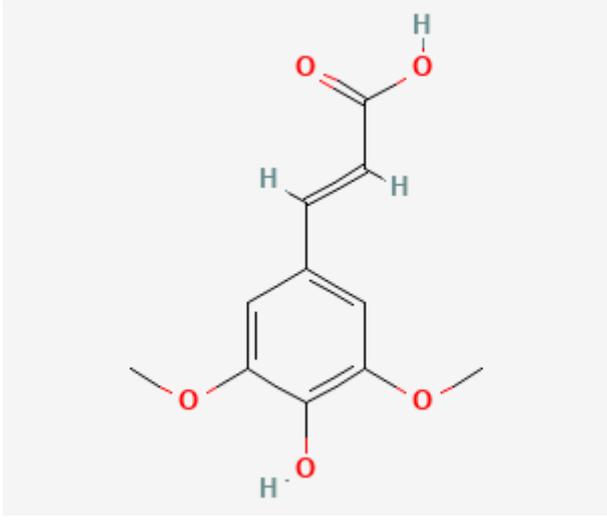
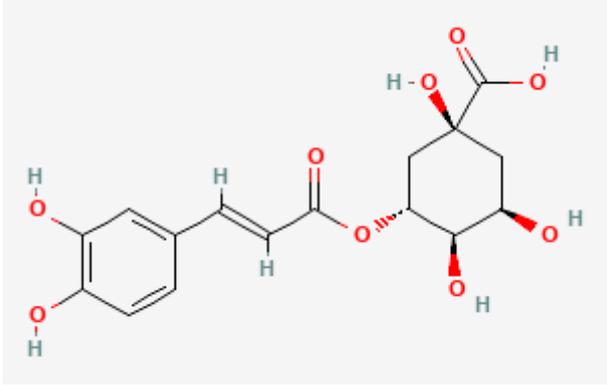
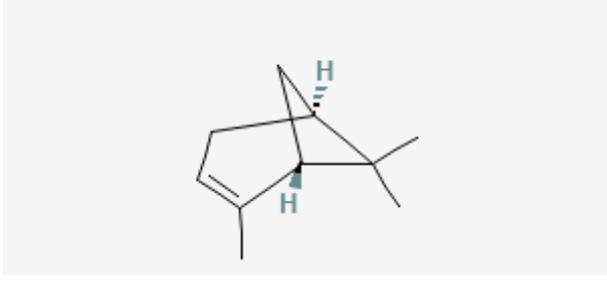
Гиперозид	 <p>The chemical structure of Hyperoside is a flavonoid glycoside. It consists of a central flavone core (3,5,7-trihydroxyflavone) where the 7-hydroxyl group is linked via an oxygen atom to a glucose molecule. The glucose is shown in its cyclic pyranose form with specific stereochemistry at the anomeric carbon (C1) and other positions (C2, C3, C4, C5, C6).</p>
Лютеолин	 <p>The chemical structure of Luteolin is a flavone. It features a central flavone core (3,5,7-trihydroxyflavone) with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group attached to the 2-position of the flavone ring. All hydroxyl groups are shown in their neutral form.</p>
Лютеолин-7-О-гликозид	 <p>The chemical structure of Luteolin-7-O-glucoside is a flavonoid glycoside. It consists of a central flavone core (luteolin) where the 7-hydroxyl group is linked via an oxygen atom to a glucose molecule. The glucose is shown in its cyclic pyranose form with specific stereochemistry at the anomeric carbon (C1) and other positions (C2, C3, C4, C5, C6).</p>

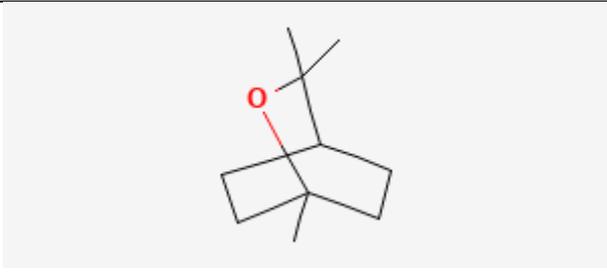
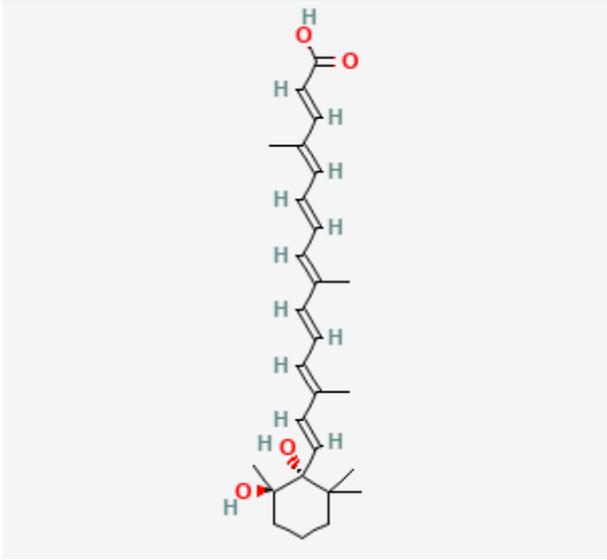
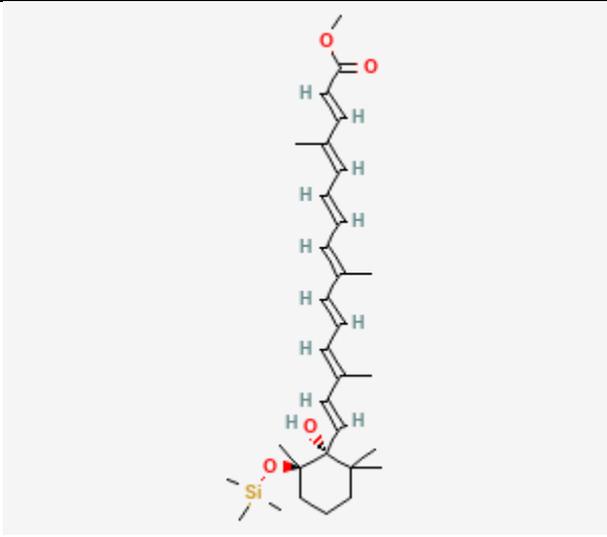
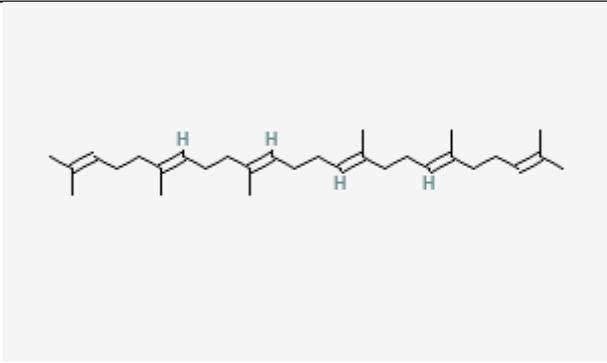
Витексин	 <p>The image shows the chemical structure of Vitexin, a flavonoid glycoside. It consists of a flavone aglycone (vitexin) linked to a disaccharide (glucose and galactose) via a glycosidic bond. The structure is shown in a 3D perspective with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>
Изо-витексин	 <p>The image shows the chemical structure of Isovitexin, a flavonoid glycoside. It is similar to Vitexin but with the glucose and galactose units in the disaccharide chain swapped. The structure is shown in a 3D perspective with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>
Сапонины	
Урсоловая кислота	 <p>The image shows the chemical structure of Ursolic acid, a pentacyclic triterpene. It features a complex ring system with multiple methyl groups and a carboxylic acid group. The structure is shown in a 3D perspective with stereochemistry indicated by wedges and dashes.</p>

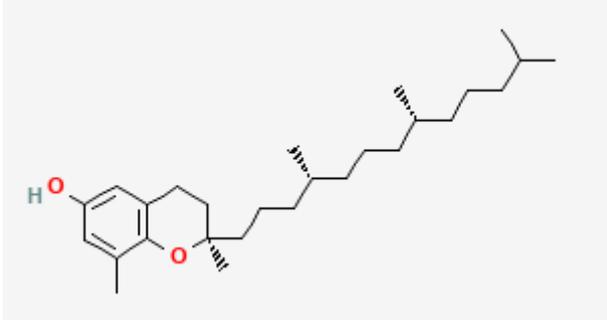
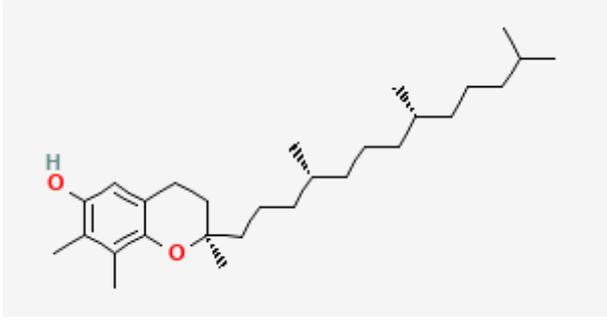
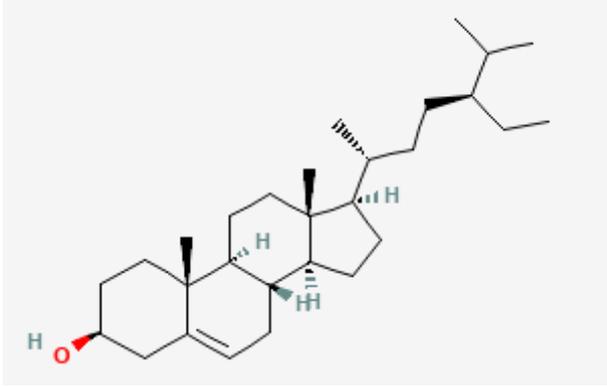
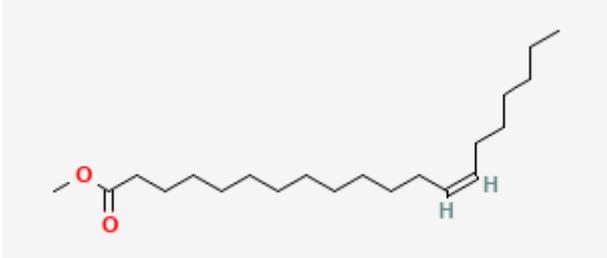
Олеаноловая кислота	 <p>The image shows the chemical structure of oleanolic acid, a pentacyclic triterpene. It features a four-ring core with a fifth ring fused to the C-13 position. The structure includes a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-12, and a carboxylic acid group at C-28. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
Лулеол	 <p>The image shows the chemical structure of lupeol, a pentacyclic triterpene. It has a four-ring core with a five-membered ring fused to the C-13 position. The structure includes a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-12, and a trimethylallyl group at C-19. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
Урса-9 (11), 12 диен-3-ол	 <p>The image shows the chemical structure of a ursane-type diene. It features a four-ring core with a double bond at C-12 and another double bond at C-9. The structure includes a hydroxyl group at C-3 and various methyl groups. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
Бетулин	 <p>The image shows the chemical structure of betulin, a pentacyclic triterpene. It has a four-ring core with a five-membered ring fused to the C-13 position. The structure includes a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-12, and a trimethylallyl group at C-19. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>

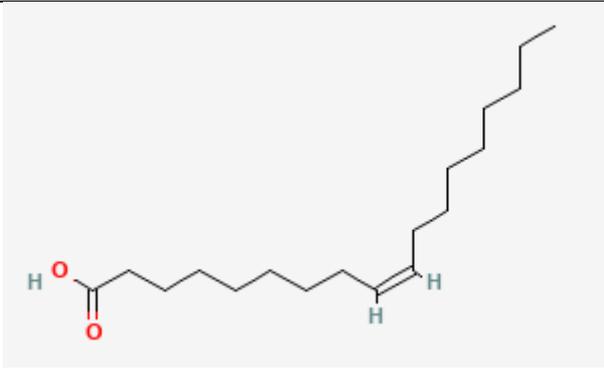
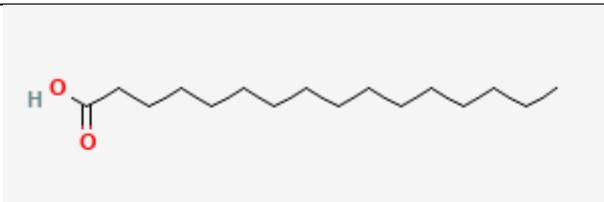
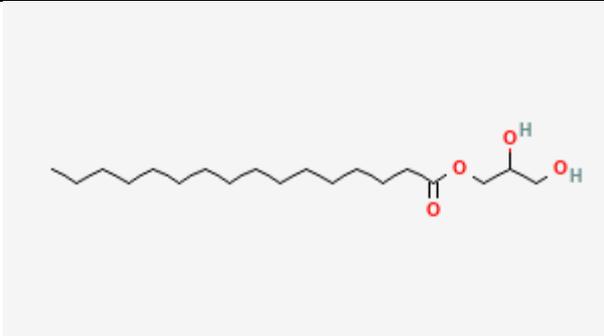
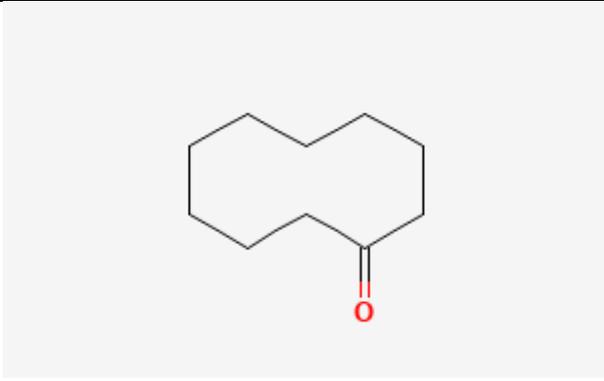
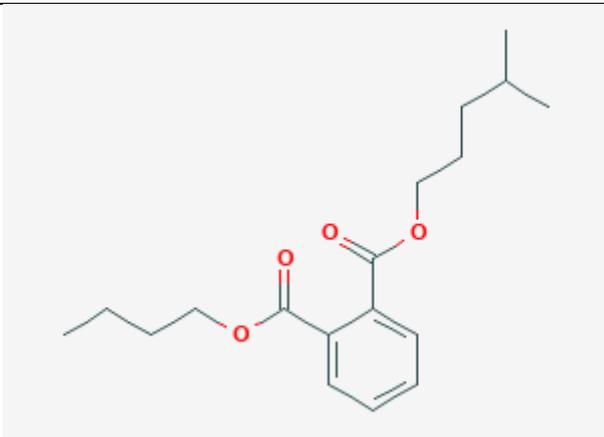
13, 27 – циклоурсан	
альфа-Амирин	
бетта-Амирин	
Сложный эфир уксусной кислоты	

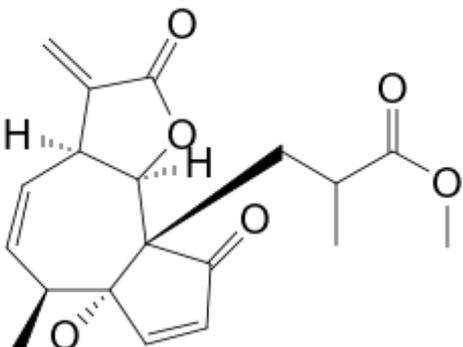
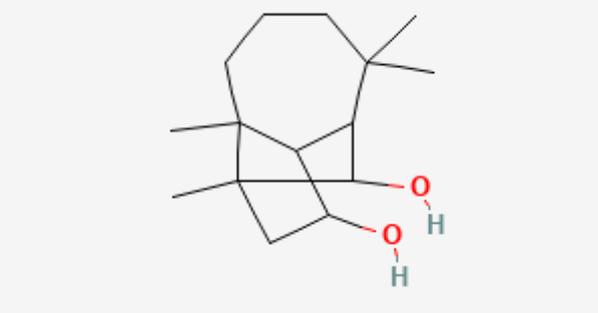
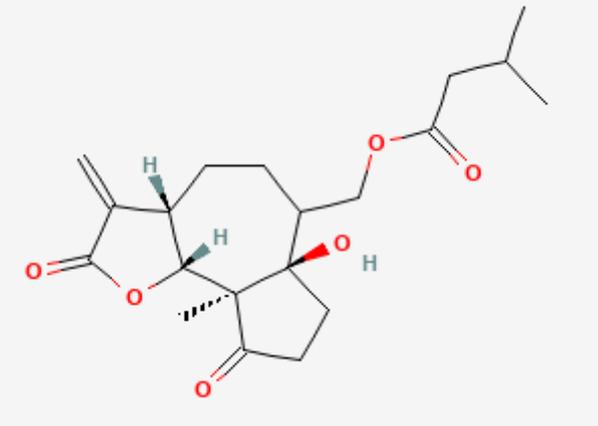
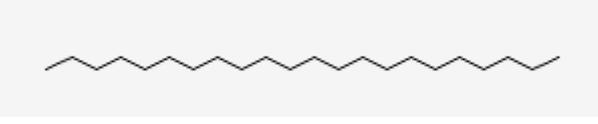
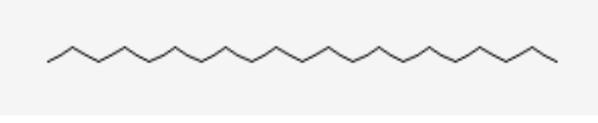
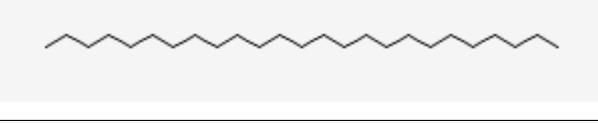
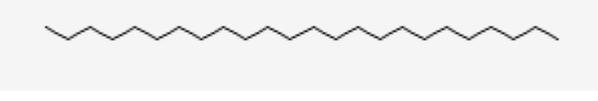
Бетулинальдегид	
Тусенданин	
3, 12 олеандион	
Бетулина 28 – О – ацетат	

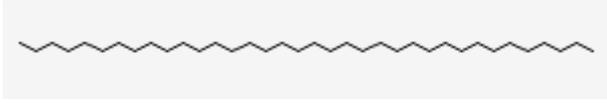
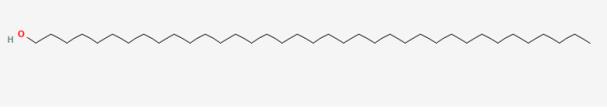
Оксикоричные кислоты	
Кофейная кислота	 <chem>O=C(O)/C=C/c1ccc(O)c(O)c1</chem>
Синаповая кислота	 <chem>O=C(O)/C=C/c1cc(OC)c(O)c(OC)c1</chem>
Хлорогеновая кислота	 <chem>O=C(O)[C@@H]1[C@@H](OC(=O)/C=C/c2ccc(O)c(O)c2)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H]1O</chem>
Монотерпеноиды	
<i>альфа</i> -пинен	 <chem>CC1=C(C)CC2=C1C=CC2</chem>

Эвкалиптол	
Каротиноиды	
Азафрин	
Метилловый эфир психаротеновой кислоты	
Сквален	

Токоферолы	
<i>дельта</i> – токоферол	 <p>The structure shows the chromanol ring of delta-tocopherol with a hydroxyl group at the 6-position and a phytyl side chain at the 2-position. The phytyl chain is a saturated hydrocarbon chain with a branched end.</p>
<i>гамма</i> – токоферол	 <p>The structure shows the chromanol ring of gamma-tocopherol with hydroxyl groups at the 5 and 6 positions and a phytyl side chain at the 2-position. The phytyl chain is a saturated hydrocarbon chain with a branched end.</p>
Фитостерины	
<i>гамма</i> – ситостерол	 <p>The structure shows the steroid nucleus of gamma-sitosterol with a hydroxyl group at the 3-position, a double bond at the 5-position, and a phytyl side chain at the 17-position. The phytyl chain is a saturated hydrocarbon chain with a branched end.</p>
Жирные кислоты	
Эйкозеновая кислота	 <p>The structure shows the structure of eicosenoic acid, a long-chain monounsaturated fatty acid with a carboxyl group at one end and a double bond at the 11-position.</p>

Олеиновая кислота	
Гексадекановая кислота	
Сложные эфиры и кетоны	
Дигидроксипропиловый эфир гексадекановой кислоты	
Циклодеканон	
Сложный эфир фталиевой кислоты	

Сесквитерпеноиды	
Изоциапин В	
Кулмарин	
Амброзонолид-В	
Алканы	
Докозан	
Генейкозан	
Пентакозан	
Тетракозан	

Нонакозан	
Гексатриаконтан	
1-гептатриакотанол	

1.3 Современные исследования фармакологической активности основных биологически активных веществ *C. pennsylvanica*

Согласно проведенным исследованиям [14, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 50, 52, 77, 84, 130] *C. pennsylvanica* в своем составе содержит такие группы БАВ как флавоноиды, сапонины, оксикоричные кислоты, эфирные масла, каротиноиды, токоферолы и жирные кислоты. Данные вещества определяют фармакологические свойства *C. pennsylvanica*.

Одним из основных флавоноидов в составе *C. pennsylvanica* является гиперозид. В медицине широко используются его фармакологические эффекты как антидепрессивный и диуретический [28]. Так же активно изучается нейропротекторное действие гиперозида [157]. Fan H. с соавторами [103] воспроизводили нейродегенеративный фенотип болезни Паркинсона, обрабатывая культуру нейронов ротеноном, цитотоксическим соединением, который ингибирует комплекс I митохондриальной дыхательной цепи. Гиперозид воздействовал на процессы аутофагии и апоптоза, тем самым препятствовал процессу действия ротенона [103]. В исследованиях Воронкова А. В. и соавторов [10] была изучена способность гиперозида к восстановлению метаболических реакций в мозговой ткани при церебральной ишемии, которая выражалась в снижении концентрации

молочной кислоты при повышении уровня пирувата. Поздняков Д. И. [57] исследовал нейропротекторный эффект гиперозида на крысах и отметил не только смягчение эффектов блокады митохондриального комплекса IV, но и повышение энергосинтетической функции митохондрий клетки. Ronald Ross Watson и Victor R. Preedy [137] отметили антитромботическое, противодиабетическое и противовоспалительное действие гиперозида. На основе собственных исследований, был описан процесс проявления противовоспалительного эффекта гиперозида при коллагениндуцированном артрите. Так же широко известно влияние гиперозида на сердечно-сосудистую систему. Xiaofang Wang и соавторы [153] в своей статье отмечают улучшение сердечной функции и предотвращение развития гипертрофии сердца, индуцированную ангиотензином II.

Рутин обладает широким спектром фармакологических свойств и его применение возможно при лечении таких заболеваний как атеросклероз и гипертония [23]. Рутин является одним из лучших природных антиоксидантов [137]. Биохимические исследования показали, что он обладает антиоксидантными свойствами и подавляет высвобождение противовоспалительного медиатора и экспрессию воспалительных белков [138]. Активно изучается влияние рутина на сосуды, так например, при клинических исследованиях [125] у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями рутин оказывал значительное положительное действие при отеках, увеличении объема голени, болях и тяжести в ногах. Баратов К. Р. с соавторами [2] изучали методы увеличения биодоступности рутина и провели исследования по сравнению противовоспалительной активности рутина и биорутина.

Кверцетин – ещё одно соединение с хорошей антиоксидантной активностью [35]. Это связано с содержанием 5 гидроксильных групп, за счёт которых кверцетин передает электроны свободным радикалам, стабилизируя разрушительный процесс [154]. Данный флавоноид так же обладает противовоспалительной и противоаллергической активностью [122]. Он

ингибирует высвобождение гистамина и активацию ядерного фактора NF-κB [109], снижает выработку провоспалительных цитокинов и лейкотриенов [106]. Так же активно изучается применение кверцетина при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [95]. Liu Н с соавторами [111] отмечают улучшение состояния сердца при ишемической болезни сердца после применения данного флавоноида. Противоопухлевая активность кверцетина давно интересует ученых. Опытным путем было установлено влияние кверцетина на ароматазу, которая играет большую роль в развитии рака молочной железы [88]. В исследованиях Murakami А. и соавторов, описывается его взаимодействие с рецепторами арильных углеводов, участвующих в формировании опухолей [124]. У производных кверцетина в эксперименте также выявлены антикоагулянтные свойства [7].

Известно, что лютеолин и лютеолин-7-О-гликозид обладают противовирусным [26, 58], провоспалительным [107] и антиоксидантным [1] фармакологическими эффектами, а так же их противоопухолевой активностью, которая активно изучается по сей день [1, 4, 92]. Yong Lin и соавторы в своей научной статье [155] связывают противораковое свойство лютеолина с индукцией апоптоза и ингибированием клеточной пролиферации, метастазирования и ангиогенеза. В исследовательской работе Arnab Roy Chowdhury [92] проведены опыты, основанные на способности лютеолина полностью ингибировать каталитическую активность эукариотической ДНК-топоизомеразы I, что подтверждают его терапевтический потенциал в качестве противоракового соединения. У лютеолина так же выявлены противоаллергические и провоспалительные свойства [107]. Так, среди выделенных соединений из листьев периллы только лютеолин проявлял активность *in vivo*: ингибировал продукцию фактора некроза опухоли-альфа сыворотки, ингибировал отек уха, индуцированного арахидоновой кислотой, ингибировал 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата, индуцированный отеком уха и ингибировал аллергический отек, индуцированный оксазолоном

[109]. Zuyi Weng и соавторы [158] изучали влияние лютеолина на культивируемые кератиноциты человека, что может в дальнейшем способствовать использованию данного флавоноида в лечении псориаза.

Витексин используется для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, благодаря своему кардиопротекторному действию [115], так же он обладает мощным гипотензивным эффектом, обусловленный ганглиоблокирующими свойствами [123]. Благодаря данным исследованиям известно, что витексин улучшает восстановление памяти [89], обладает противосудорожной [90] и противоопухлевой [129] активностью. Активно изучается гепатопротекторная активность в отношении повреждении печени, вызванного колитом [143]. Введение витексина снижало уровни АЛТ и ТК в печени у мышей и снижало количество высвобождаемых 4% декстрана натрия сульфатом цитокинов, которые образуются при противовоспалительных реакция организма, индуцируемых TNF- α , IL-6 и IL-1 β . В исследовании витексин продемонстрировал ингибирующую активность сигнального пути TLR4/NF- κ B, индуцированного DSS [143].

В составе сырья *C. pennsylvanica* было найдено разнообразное количество сапонинов, которые обладают различными фармакологическими свойствами [41]. Например, бетулин проявляет мощные противовирусные свойства [53], а лупеол обладает противопрозоной, противомикробной, противовоспалительной активностью [118, 119]. Лупеол в высоких концентрациях может ингибировать дипептидилпептидазу-4 и пролилוליгопептидазу [120], а ряд проведенных исследований на мышах доказал его профилактическое действие на повреждение ДНК, вызванное алкилированием диметилбутановой кислотой [126], что свидетельствует о наличии противоопухлевой активности. Пентациклические тритерпеноиды лупанового ряда – производные бетулина и бетулиновой кислоты так же обладают противораковой активностью [9], они способны дестабилизировать митохондрии тем самым вызывая апоптоз опухолевых клеток [105]. Ещё одно соединение из группы сапонинов, обладающее противоопухлевой

активностью – тусенданин, он является мощным ингибитором аутофагии на поздних стадиях рака, путем ухудшения подкисления лизосом и активности гидролаз [140]. Тусенданин в проведенных исследованиях [144] ингибировал экспрессию противовоспалительных цитокинов и улучшал окислительный стресс при колите у мышей, так же он проявляет противовирусный эффект [156]. Тритерпеновые сапонины обладают ингибирующим действием на коагуляционный компонент гемостаза [7].

Урсоловая и олеаноловая кислоты – вещества из группы тритерпеновых сапонинов, которые обладают широким спектром действия [73, 87], таких как гепатопротекторный, антимикробный, противовирусный, противовоспалительный и противоопухолевый [112]. Богданов А. Р. и соавторы [6] изучали антиатеросклеротическое действие растительных сапонинов, путем улучшения функционального состояния эндотелия сосудов. Олеаноловую кислоту китайские врачи в клинических условиях используют при лечении гепатитов [98]. Активно изучается механизм действия противораковой активности данных сапонинов [117], так например, в статье [5] описывают процесс активации белка-онкосупрессора PTEN и бурого жира урсоловой кислотой, а Морозкина С. Н. с соавторами [37] связывают противоопухолевую активность данного сапонины ингибированием процессов ангиогенеза и усилением апоптоза в клетках опухолей. Автором Безверхняя Е. А. изучено влияние урсоловой кислоты на значение трансмембранного напряжения, частоту и амплитуду потенциала действия, что может применяться при лечении эпилепсии [3]. Так же в побегах *C. pennsylvanica* были обнаружены предшественники урсоловой и олеаноловой кислот - α -амирин и β -амирин [41]. Исследования Simão da Silva и соавторов продемонстрировали антиноцицептивные и противовоспалительные свойства амиринов в 2 моделях персистирующей ноцицепции посредством активации каннабиноидных рецепторов, а также путем ингибирования продукции цитокинов и экспрессии NF- κ B, CREB и циклооксигеназы 2 [142].

Ещё одна из ведущих групп БАВ в составе *C. pennsylvanica* это оксикоричные кислоты. Лукашов Р. И. с соавторами [31] экспериментально доказали иммуномодулирующую, антибактериальную, антимикотическую и антиоксидантную активность кофейной кислоты. Поздняков Д. И. в своих исследовательских работах [55, 56] изучал влияние оксикоричных кислот на изменение митохондриальной функции в ткани головного мозга крыс в условиях экспериментальной гиперцитокинемии [55] и на активность NOX4 в мозговой ткани животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера [56]. Ивашев М. Н. и Чуклин Р. Е. [22] экспериментально установили влияние кофейной и феруловой кислот при патологии мозгового кровообращения. Также установлено, что хлорогеновая кислота обладает более мощными антиоксидантными свойствами, чем аскорбиновая кислота, она способна эффективно удалить ДФПГ радикал, гидроксильный радикал и супероксид анион радикалы и снижать концентрацию липопротеинов низкой плотности окисления [30]. Чуклин Р. Е. в ряде исследовательских работ [80, 81, 82, 83] выявил влияние кофейной кислоты на процесс сжигания жиров и регуляцию обменных процессов [81], определил антиоксидантную активность данной гидроксикоричной кислоты, что в дальнейшем способствует использованию ее в профилактике мутагенной активности и развитии опухолей, отметил повышение эластичности стенок сосудов и улучшение состояния кожи за счет нормализации процессов снабжения клеток кислородом [80, 82], определил противовоспалительную и антибактериальную активность [83]. Также у производных коричных кислот установлены *in vitro* антикоагулянтные свойства [7].

Эфирные масла α -пинен и эвкалиптол имеют широкое применение при лечении острых респираторных заболеваниях дыхательных путей [61]. Изучение механизмов противовирусной и противовоспалительной активности данных веществ до сих пор является актуальным [100].

Сквален и азафрин – вещества из группы каротиноидов, обнаруженные в составе сырья *C. pennsylvanica*. Научные исследования показали лечебное

воздействие сквалена на сердечно-сосудистую систему [116] и наличие мощных антиоксидантных свойств [33]. Луценко М. Т.[32] исследовал влияние сквалена на синтез холестерина и отметил его высокую интенсивность окисления, что повлияло на увеличение выведения желчных кислот из долек печени по желчным капиллярам. Shuyu Yang и соавторы [141] доказали кардиопротекторные эффекты азафрина в отношении поврежденного миокарда и рекомендуют его к использованию для профилактики и лечения болезней сердца.

Токоферолам, содержащимся в *C. pennsylvanica* помимо антиоксидантной активности, присущей всем представителям данной группы, γ – токоферол обладает рядом уникальных свойств, таких как противоопухолевая активность [24], противовоспалительная активность, вследствие ингибирования активности ЦОГ-2 [64].

Помимо основных групп БАВ, в *C. pennsylvanica* встречаются фитостерины, жирные кислоты и их эфиры, сесквитерпены, которые обладают рядом фармакологических свойств. Например, γ – ситостерол снижает уровень общего холестерина в крови [74], а ряд проведенных исследований доказывает, что жирные кислоты обеспечивают необходимый баланс в организме человека эндогормонов – эйкозаноидов, которые нужны для нормального функционирования сосудов и сердца [16]. Так же известно их участие в лечении атеросклероза [67]. Активно изучаются механизмы влияния жирных кислот на организм человека. Например, олеиновая кислота подавляет выработку мочевой кислоты и повышает активность декарбоксилазы ароматических кислот [135], пропиловый эфир гексадекановой кислоты является ингибитором арахидоновой кислоты [94], а эйкозеновая кислота улучшает деятельность головного мозга [99].

Представителями сесквитерпенов, обнаруженных в *C. pennsylvanica*, являются изочиапин В, известный антибактериальными свойствами [117], и кулмарин, который подавляет глюкуронирование микотоксина

дезоксиниваленола *in vitro* [150] и проявляет противогрибковую активность [152].

Проведен литературный обзор по фармакологическим свойствам идентифицированных веществ методом ГХ/МС (таблица 1.3.1). В основном, анализируемые вещества обладают антибактериальными, противовоспалительными, капилляроукрепляющими, антиоксидантными, антитромбоцитарными, гипогликемическими свойствами.

Таблица 1.3.1 – Фармакологические свойства некоторых веществ, идентифицированных в *S. pennsylvanica* методом ГХ/МС

№	Наименование вещества	Фармакологическое действие
1.	1-Heptatriacotanol	антигиперхолестеримический [94]
2.	α - pinene	антибактериальный, противовоспалительный [139]
3.	Eucalyptol	антибактериальный, антивирусный, противозудный [139]
4.	cis-13-Ecosenoic acid	улучшает деятельность головного мозга [99]
5.	Oleic acid	подавляет выработку мочевой кислоты, повышает активность декарбоксилазы ароматических кислот [135]
6.	Hexadecanoic acid 2, 3 - dihydroxypropyl ester	ингибитор арахидоновой кислоты, подавляет выработку мочевой кислоты [94]
7.	Isochiapin B	антибактериальный [117]
8.	Culmorin	противогрибковый, подавляет глюкуронирование микотоксина дезоксиниваленола <i>in vitro</i> [150, 152]
9.	Luteolin 7-O-D-glucoside	гипоазетемическое, антиоксидантное [11]
10.	Apigenin 6-C-glucoside	антиоксидантный, противовоспалительный, антиканцерогенный [85]
11.	δ – tocopherol	антиоксидантный [40]
12.	Squalane	пролиферативная, иммунокорректирующая, антиоксидантная активность [54]
13.	γ – tocopherol	антиоксидантный [40]
14.	Lupeol	антиканцерогенная, антимуtagenная активность [146]
15.	Betulin	противовоспалительный, антиоксидантный, противогрибковый, гипополипидемический, антисептический [94, 139]

16.	γ – sitosterol	помогает снизить уровень ЛПНП, способствует уменьшению гиперплазии предстательной железы [74]
17.	13, 27 – cycloursane	антиоксидантный, противовоспалительный [104]
18.	β – amyriin	противовоспалительный, антиоксидантный, гиполипидемический [91, 135, 136]
19.	α – amyriin	противовоспалительный, антиоксидантный, гипогликемический [91, 135, 136]
20.	Betulinaldehyde	антибактериальный, противогрибковый [8,25]
21.	Azafrin	антиоксидантный, антитромбоцитарный, гипогликемический [93]
22.	Toosendanin	индуцирует апоптоз в различных раковых клетках, противовирусный [144, 145]
23.	Betulin 28 – O - acetate	антиоксидантный, противовоспалительный [9, 25]

Таким образом, богатый химический состав *C. pennsylvanica* обуславливает широкий спектр фармакологических эффектов данного вида боярышника и его изучение является актуальным.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. *C. pennsylvanica* является одним из хорошо интродуцируемых видов рода *Crataegus* L. Он зимостойчивый, не требователен к плодородности почвы, имеет крупные плоды.
2. *C. pennsylvanica* содержит широкий спектр БАВ, таких как флавоноиды, сапонины, оксикоричные кислоты, каротиноиды, эфирные масла, токоферолы, фитостерины, жирные кислоты, алканы и сесквитерпены.
3. Согласно литературным данным, за счет содержания БАВ сырье *C. pennsylvanica* может обладать широким спектром фармакологических свойств, таких как противовоспалительный, противомикробный, антидепрессивный, диуретический, антиатеросклеротический, противоопухолевый, антиоксидантной и др., поэтому фармакогностическое исследование данного вида на данный момент актуально.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования стали побеги, цветки и плоды *C. pennsylvanica*, заготовленные в период с 2020 по 2023 гг. в различные периоды вегетации в Южно-Уральском ботаническом саду-институте – обособленном структурном подразделении федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук (32 образца). Побеги представляют собой верхушки ветвей, содержащие цветки и листья. Плоды сушили на электросушилке при 60°C, а цветки и побеги - воздушно – теневым методом. Хранение производили в бумажных пакетиках при комнатной температуре воздуха, при влажности не более 50% [18].

2.2 Методы исследования

2.2.1 Макроскопический и микроскопический анализы

Макроскопический анализ сырья *C. pennsylvanica* проводился невооруженным глазом и с помощью бинокулярного микроскопа (10x) [18].

Микроскопический анализ был проведен в соответствии с ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного

происхождения»[19]. С помощью микровизуального изображения МВЗ-103 были сделаны снимки микроскопических признаков исследуемых объектов.

2.2.2 Определение числовых показателей (доброкачественность) сырья

Определение числовых показателей устанавливали в соответствии с методиками ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая»; ОФС 1.5.3.0005 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»; ОФС 1.5.3.0004 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС 1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», ОФС 1.5.3.0007 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» [19].

2.2.3 Методы фитохимического анализа

2.2.3.1 Методики качественного анализа

Качественные реакции

Качественные реакции на определение наличия *флавоноидов* производили по общепринятым в литературе методикам:

1. Цианидиновая проба (проба Шинода). Реакция исследуемого извлечения с HCl (конц.) и металлическим магнием или цинком. При наличии флавоноидов появляется красное или красно-оранжевое

окрашивание. К полученному окрашенному раствору продукта цианидиновой реакции прибавляли равный объём бутанола, разбавляли водой до разделения слоёв и встряхивали (цианидиновая проба по Брианту). Гликозиды остаются в воде, а агликоны переходят в слой органического растворителя.

2. Реакция с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида. Наличие флавоноидов определяется появлением желто-зеленого окрашивания [27, 60].

Для качественного определения *сапонинов* проводили следующие реакции:

1. Реакция пенообразования. Водное извлечение помещали в пробирку и встряхивали. Наличие большого количества пены, которая не исчезает в течение нескольких минут, доказывает присутствие сапонинов.

2. Реакция Санье. Реакция с 0,5% спиртовым раствором ванилина в присутствии H_2SO_4 (конц.) при нагревании. Красное окрашивание раствора свидетельствует о присутствии тритерпеновых сапонинов.

3. Реакция осаждения. Образование осадка со средним ацетатом свинца определяет наличие сапонинов [27, 60].

Реакции использованные для обнаружения *кумаринов*:

1. Лактонная проба. Реакция проводится с использованием 10 % $K(OH)$ (спиртовый), раствор нагревается и при наличии кумаринов становится желтым, затем его разбавляют водой и добавляют 10 % раствор хлористоводородной кислоты до $pH < 7$. Выпадение осадка доказывает наличие кумаринов.

2. Диазореакция. Исследуемый раствор с 10% $K(OH)$ (спиртовый) при нагревании становится желтого цвета. К полученному раствору добавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива. Образование вишневого или кроваво-красного раствора свидетельствует о наличии кумаринов [27, 60].

Дубильные вещества обнаруживаются с применением раствора железоаммонийных квасцов. Черно-синее окрашивание или осадок характеризует присутствие гидролизуемых дубильных веществ, а черно-

зеленое окрашивание или осадок - конденсированных дубильных веществ [27, 60].

Полисахариды обнаруживают путем осаждения их из водных растворов трехкратным объёмом этилового спирта. Полученный раствор перемешивают и наблюдают появление хлопьевидных сгустков, которые при стоянии начинают выпадать в осадок [27, 60].

Для определения *гидроксикоричных кислот* была проведена следующая реакция: к 50% спиртовому экстракту исследуемого сырья добавляют 3% раствор FeCl_3 , при наличии гидроксикоричных кислот наблюдают синее-зеленое окрашивание раствора [79].

Тонкослойная хроматография

Качественный анализ различных групп БАВ проводили методом ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «Имид», г. Краснодар). Растворители для приготовления систем удовлетворяли требованиям «х.ч» и «ч.д.а». Для исследования использовали следующие системы:

1. этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5);
2. этилацетат – муравьиная кислота – ЛУК – вода (100:11:11:26);
3. этилацетат – муравьиная кислота – вода (14:3:3);
4. этилацетат – муравьиная кислота – вода (88:6:6);
5. этилацетат – метанол – вода – муравьиная кислота;
6. бутанол – 96% этиловый спирт - аммиак (7:2:5);
7. гексан – бензол – метанол (5:4:1);
8. аммиак – вода – 96% этиловый спирт (14:5:50);
9. хлороформ – метанол – вода (26:14:3);
10. петролейный эфир – хлороформ – ацетон (8:8:2) (в статье есть);
11. толуол – этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:20:5:2)
12. этилацетат – бутанон-2 – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5)

13. этилацетат - ацетон - толуол - муравьиная кислота – вода
(20:10:10:5:5) [20, 38, 41, 68].

После хроматографирования проводили обработку пластин, соответствующими растворами для идентификации (таблица 2.2.3.1.1) и наблюдали появление окраски при дневном свете и/или появление флуоресценции при УФ – свете на облучателе УФС-254/365 (ООО «Имид», г. Краснодар) при длине волны 365 нм. Для идентификации БАВ использовали стандартные образцы, сравнивали с их коэффициентом подвижности (R_f) и окраской пятен.

Таблица 2.2.3.1.1 – Условия проведения ТСХ анализа основных групп БАВ в извлечениях из побегов боярышника пенсильванского

Группа БАВ (извлечение, система)	Раствор проявитель	Стандартные образцы
Органические кислоты (водное извлечение, системы 2, 8)	0,2% спиртовый раствор бромкрезолового зеленого	водные растворы кислот: яблочной, сорбиновой, янтарной, лимонной, винной, щавелевой (С=0,1%, ООО «Сигмабиосинтез»); спиртовые растворы кислот: сиринговой, салициловой, ванилиновой, анимовой, 4-гидроксibenзойной, миндальной (С=0,1%, ООО «Сигмабиосинтез»)
Фенольные соединения (96% спиртовое извлечение, система 4)	флуоресценция в УФ-свете	спиртовый раствор галловой кислоты (С=2,0 мг/мл, ООО «Сигмабиосинтез»)

<p>Флавоноиды (96% спиртовое извлечение, системы 1, 2, 5, 12, 13)</p>	<p>0,5% спиртовый раствор алюминия хлорида, флуоресценция в УФ-свете</p>	<p>спиртовые растворы рутина (C=0,05 мг/мл), кверцетина (C=0,05 мг/мл), гиперозида (C=0,05 мг/мл), лютеолина (C=0,1 мг/мл), апигенина (C=0,1 мг/мл), генистеина (C=0,1 мг/мл), кемпферола (C=0,05 мг/мл), витексина (C=0,2 мг/мл), нарингенина (C=0,1 мг/мл), физетина (C=0,1 мг/мл), лютеолин-7-О-гликозида (C=0,1 мг/мл, НПО «Вилар»))</p>
<p>Гидроксикоричные кислоты (70% спиртовое извлечение, системы 1, 3, 11)</p>	<p>флуоресценция в УФ – свете, обработка парами аммиака</p>	<p>спиртовые растворы кислот: кофейной, синаповой, коричной, хлорогеновой (C=1,0 мг/мл, ООО «Сигмабиосинтез»)</p>
<p>Сапонины (96% спиртовое извлечение, системы 6, 9, 10)</p>	<p>20%раствор серной кислоты, флуоресценция в УФ - свете</p>	<p>спиртовые растворы эсцина (C=0,5 мг/мл), олеаноловой кислоты (C=0,98 мг/мл), урсоловой кислоты (C=1,0 мг/мл, НПО «Вилар»)</p>
<p>Кумарины (96% спиртовое извлечение, системы 6, 7)</p>	<p>флуоресценция в УФ - свете</p>	<p>Спиртовые растворы бергаптена (C=1,0 мг/мл), кстантоксина (C=1,0 мг/мл), эскулетина (C=0,5 мг/мл, НПО «Вилар»)</p>

Газовая хроматография

Из плодов, побегов, цветков и листьев были получены липофильные фракции путем однократной мацерации. 5,0 г сырья (точная навеска), измельченных в железной ступке с пестиком до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстия 2 мм экстрагировали с петролейным эфиром 40–70 °С (фирма производитель ЭКОС-1, ТУ 2631-074-44493179-01) в соотношении 1:10 в течении недели при температуре не выше 25 °С в защищенном от света месте [41, 75].

С помощью метода ГХ-МС на газовом хроматографе Agilent 8890 GC System с массселективным детектором Agilent Technologies 5977 исследовали метаболомный профиль полученных извлечений *C. pennsylvanica*. Условия хроматографирования следующие: колонка капиллярная HP- 5MS 30 м × 0.25 мм × 0.25 мм (сорбент- полидиметилсилоксан), скорость потока гелия – 1 мл/мин, градиент температур: 80 °С – 2 мин, затем скорость нагрева составляла – 5°/мин до 290 °С, время выдержки при исходной температуре – 2 мин, время выдержки при конечной температуре – 10 мин; температура инжектора 280 °С, объем вводимой пробы 1 мкл. Детектор применяли в режиме электронного удара (70 эВ), спектры регистрировались в режиме сканирования по ионному току [41, 75,76].

Анализ липофильных метаболитов проводили в сравнении с библиотечными масс-спектрами (данные идентифицированных соединений с коэффициентом подобия библиотечным спектрам не менее 80).

2.2.3.2 Методики количественного анализа

Методики для количественного анализа *C.pennsylvanica* взяты из современных источников:

Содержание флавоноидов в побегах определяли спектрофотометрически по авторской методике [21, 48]. 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих через сито №2, вносят в колбу объемом 250 мл, добавляют 50 мл 80 % этилового спирта и выдерживают на кипящей водяной бане с обратным стеклянным холодильником 30 минут. После первое извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 100 мл, наблюдая за тем, чтобы сырье не попало в фильтрат. Далее проводят вторичную экстракцию - оставшееся сырье в колбе опять заливают 50 мл этилового спирта используемой концентрации и снова нагревают на кипящей водяной бане с обратным стеклянным холодильником еще раз 30 минут. Потом колбу со вторым извлечением охлаждают и фильтруют в ту же мерную колбу на 100 мл, объединяя с первым извлечением. К сырию, которое осталось в термостойкой стеклянной колбе, добавляют 20 мл этилового спирта той же концентрации, ополаскивают сырье и фильтруют в ту же мерную стеклянную колбу. Потом после данных манипуляций, полученное извлечение доводят до метки (раствор А).

Для приготовления раствора В берут мерную колбу на 25 мл, прибавляют туда 3 мл полученного извлечения (раствор А), 3 мл 3% спиртового раствора хлорида алюминия и 0,1 мл 30% уксусной кислоты. Полученный раствор перемешивают и доводят до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Измерение оптической плотности раствора В проводят через 45 минут на спектрофотометре при длине волны 410 нм с использованием стеклянной кюветы 10 мм. Раствором сравнения является смесь, которая состоит из 3 мл раствора А, 0,1 мл 30 % раствора уксусной

кислоты. Ее готовят в мерной колбе на 25 мл и доводят этиловым спиртом, который используют для приготовления раствора В.

Концентрацию содержания суммы флавоноидов (X) в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{380 \times m \times 2 \times (100 - W)} \quad (1), \text{ где}$$

A - Оптическая плотность анализируемого раствора (раствор В);

380 - удельный показатель поглощения гиперозида с алюминия хлоридом;

m - навеска сырья в граммах;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %.

Определение концентрации флавоноидов в плодах и цветках производили согласно методике, описанной в ОФС 2.5.0061.18 «Боярышника плоды» и ОФС 2.5.0062.18 «Боярышника цветки» [20].

Количественное содержание дубильных веществ определяли согласно статье ОФС.1.5.3.0008 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах растительного происхождения» (метод 1). Данный титриметрический метод основан на окислительно – восстановительных свойствах дубильных веществ. Перманганат калия в кислой среде имеет фиолетовый цвет, в восстановленном состоянии, в присутствии индигосульфоновой кислоты, он обесцвечивается, и раствор становится золотисто-желтым [20, 50].

Концентрацию аскорбиновой кислоты в побегах определяли по методике в ОФС 2.5.0106.18 «Плоды шиповника», выраженную в процентах.

Анализ количественного содержания процианидинов в *C.pennsylvanica* проводили спектрофотометрическим методом [14, 78]. Навеску сырья побегов боярышника 0,1 г, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,25 мм, помещали в 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 градусов в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивали и доводили до первоначальной массы этиловым спиртом 70%. 0,1 мл полученного извлечения переносили в колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,9 мл этилового спирта 70%, 6 мл бутанола кислого, 0,2 мл железосодержащего реактива, присоединяли колбу к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80 градусов в течении 50 минут. Раствор охлаждали при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 550 нм в кювете толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1,9 мл этилового спирта 70%, 6 мл бутанола кислого, 0,2 мл железосодержащего реактива.

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

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

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

136 - удельный показатель поглощения цианидина хлорида;

0,1 - объем спектрофотометрируемого извлечения побегов боярышника;

7,2 - объем спектрофотометрируемого раствора;

m - навеска сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Содержание *сапонинов* проводили следующим образом [36, 86]: сапонины извлекали из навески воздушно-сухого сырья экстракцией смесью: этанол-ацетон (1:4), с последующим осаждением суммы сапонинов подкисленной водой (pH=1,0). Осадок отфильтровывали и растворяли в смеси аммиачный буфер - вода (1:1). У полученного извлечения измеряли оптическую плотность при 210 нм, соответствующий максимуму поглощения олеаноловой кислоты. Раствор сравнения - аммиачный буфер - вода (1:1).

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

$$X = \frac{A \times 10 \times 100}{311 \times m \times (100 - W)} \quad (3), \text{ где}$$

A - оптическая плотность исследуемого раствора;

311 - удельный показатель поглощения олеаноловой кислоты;

m - навеска сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %

2.2.4 Методы исследования фармакологической активности

Определение антиоксидантной активности

Для исследования антиоксидантной активности готовили водные (настои и отвары) и спиртовые (настойки) извлечения из всех изучаемых видов сырья. Настои из листьев, цветков и побегов и отвары из плодов готовили в соотношении 1:10, на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут, настойки - с использованием 70% этилового спирта методом мацерации в соотношении 1:10, на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут [45]. Антиоксидантную активность исследовали по методике, основанной на способности исследуемого раствора ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода [45, 66]. При определении антиоксидантной активности водных и спиртовых извлечений в раствор сравнения добавляли по 0,01 мл водного или спиртового извлечения для исключения влияния окраски полученных извлечений на полученные

результаты. Антиоксидантную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$AOA = \frac{(A_0 - A_1) \times 100}{A_0} \quad (4)$$

В качестве препарата сравнения использовали 0,05% раствор аскорбиновой кислоты [45].

Определение антиагрегационной и антикоагуляционной активности

Для изучения антиагрегационной и антикоагуляционной активности из сырья получали водные извлечения, которые готовили в соотношении 1:10, для этого сырье измельчали до размера частиц 3 мм, на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Из плодов, стеблей и семян получали отвары, из побегов, травы и листьев готовили настои.

Эксперименты для определения антикоагуляционной и антиагрегационной активности в условиях *in vitro* выполнялись на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18–24 лет [15, 63]. Общее количество доноров составило 25 человек. Забор крови для исследования соединений в отношении системы гемостаза проводился из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора венозной крови использовался 3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. В тесты проводились на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 минут, бестромбоцитарной плазмы – при 3000 об/мин в течение 20 минут. В работе использовалась центрифуга ОПН-3.02 (ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия) [62].

Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born [70] на агрегометре «АТ-02» (НПФ «Медтех», Россия). В качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (Россия). В эксперименте оценивали максимальную амплитуду агрегации, скорость агрегации, время достижения максимальной амплитуды и дезагрегацию в присутствии изучаемых соединений при агрегации тромбоцитов. При коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивали латентный период, во время которого происходит активация фосфолипазы С (что приводит к образованию вторичных посредников, вследствие чего развивается секреция тромбоцитарных гранул и синтез тромбоксана А₂).

Определение антикоагуляционной активности проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на оптическом двухканальном автоматизированном анализаторе свертывания крови АСКа 2-01-«Астра» (НПЦ «Астра», Россия). Изучались показатели активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени (ПВ) и концентрации фибриногена по А. Clauss. В работе использовались реактивы производства «Технология-Стандарт» (г. Барнаул, Россия).

Для оценки фармакологической активности исследуемые водные извлечения вносили в плазму крови из расчета 5 % от объема реакционной смеси. В качестве препаратов сравнения использовали: 2-ацетилоксибензойная кислота («Ацетилсалициловая кислота», Фармацевтическая фабрика Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД, Китай); «Гепарин натрия» (ОАО «Синтез», Россия). Антиагрегационная активность препарата сравнения – ацетилсалициловой кислоты представлена для концентрации 2×10^{-3} М/л, антикоагуляционная активность гепарина натрия – для концентрации 5×10^{-4} г/мл [15, 69].

2.2.5 Методы статистической обработки результатов исследований

Результаты биологических исследований обработаны с применением статистического пакета Statistica 10,0 (StatSoft Inc, США). Проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. После того, как было установлено, что вид распределения данных исследования не является нормальным, для исследований были использованы непараметрические методы статистики. Данные антиагрегационной активности представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей. Дисперсионный анализ исследований проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Для статистических критериев критический уровень значимости p принимали 0,05 [11].

Статистическую обработку химических экспериментальных данных проводили при помощи критерия Стьюдента, используя различные методики [18].

ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ *CRATAEGUS PENNSYLVANICA* ASHE

3.1 Морфологические исследования побегов *C. pennsylvanica*

В ходе проведения морфологического исследования установлено, что побеги *C. pennsylvanica* представляют собой смесь зеленых стеблей, листьев и соцветий. Листья данного вида имеют простую, цельную, яйцевидную форму листовой пластинки, без прилистников, черешок 2,5 – 3 см, край листа мелкозубчатый, верхушка острая, основание широко – клиновидное, жилкование перисто-краевое. Цвет листьев зеленый с верхней стороны и бледно-зеленый с нижней. Расположение листьев очередное, у основания черешков имеются крупные колочки длиной 6-10 см. Длина побегов равна 10-15 см. Соцветие у *C. pennsylvanica* щитки с 7-10 цветками, покрыты войлочным опушением. Цветки обоеполые, 20-25 мм в диаметр, тычинок 10-12, завязь нижняя с 3–5 стилодиями, лепестков венчика 5, белые. Чашелистиков 5, они яйцевидной формы с острой верхушкой и зубчатым краем. Стебли цилиндрические, темно-зеленого цвета с серо-войлочным опушением (рис. 3.1.1- 3.1.4).

Таким образом, уточнены морфологические признаки *C. pennsylvanica* и установлены форма листовой пластинки, длина черешка, расположение листьев, описаны венчик и чашелистик цветка.



Рисунок 3.1.1 – Цветки *C. pennsylvanica*



Рисунок 3.1.2 – Побеги *C. pennsylvanica*



Рисунок 3.1.3 – Плоды *C. pennsylvanica*



Рисунок 3.1.4 - Листья *C. pennsylvanica*

3.2 Анатомо-диагностические исследования побегов и плодов *C. pennsylvanica*

Микроскопический анализ проводили на микровизоре μ Vizo®-103. Предварительно приготовили микропрепараты листа, цветков (венчика и чашелистиков), плодов, поперечные срезы черешка (по методике ОФС.1.5.3.0003.15).

Микроскопия листа. Эпидермис верхней стороны листа *C. pennsylvanica* имеет слегка извилистую форму клеток, обнаружена ярко выраженная складчатость кутикулы (рисунок 3.2.1); нижний эпидермис с более извилистыми клетками, устьичный аппарат аномоцитного типа, окруженный 4-5 околоустьичными клетками (рисунок 3.2.2), устьица встречаются на обеих сторонах листовой пластинки (преимущественно на нижней стороне). На рисунках 3.2.3, 3.2.4. представлены простые, одноклеточные, толстостенные волоски, которые у основания образуют розетку из 5 клеток. По жилкам листовой пластинки располагается большое количество друз оксалата кальция и имеется кристаллоносная обкладка (рисунок 3.2.5), а на кончике листа на рисунке 3.2.6 можем увидеть железку с бурым содержимым. Клетки черешка продолговато-удлиненные, с чётковидными утолщениями. Устьица на черешке крупные, устьичный аппарат аномоцитного типа. Волоски простые, одноклеточные, толстостенные (рисунок 3.2.7, 3.2.8). На поперечном срезе черешка листа наблюдали один слой клеток эпидермиса, несколько слоев уголкового колленхимы, паренхиму коры, центральный цилиндр с открытым коллатеральным серповидно-изогнутым пучком, который имеет склеренхимную обкладку (рисунок 3.2.9) [51].

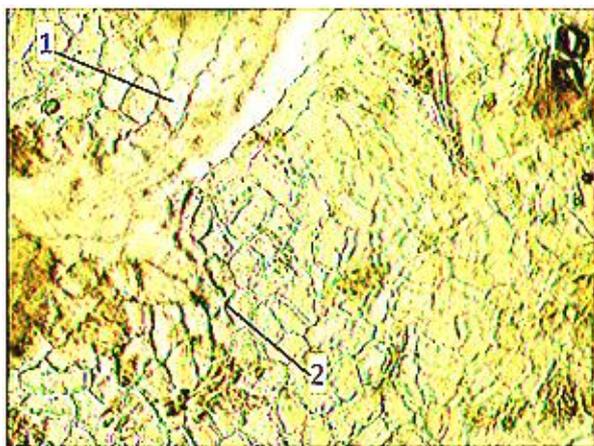


Рисунок 3.2.1 - Верхний эпидермис листа (1- складчатость кутикулы, 2 - четковидные утолщения клеточной стенки) (ув.20×40)

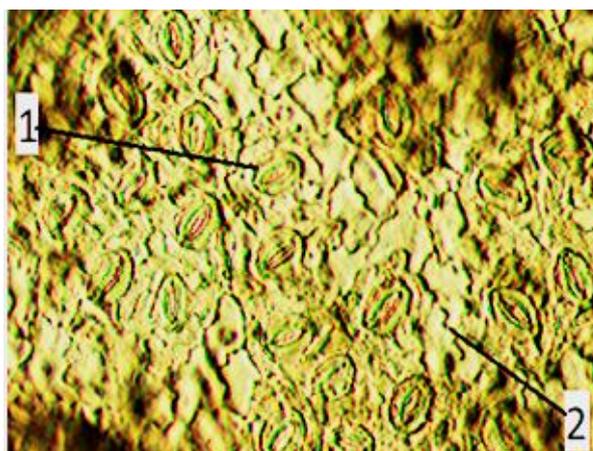


Рисунок 3.2.2 - Нижний эпидермис листа (1 - устьица, 2 - извилистые стенки клеток) (ув.20×40)

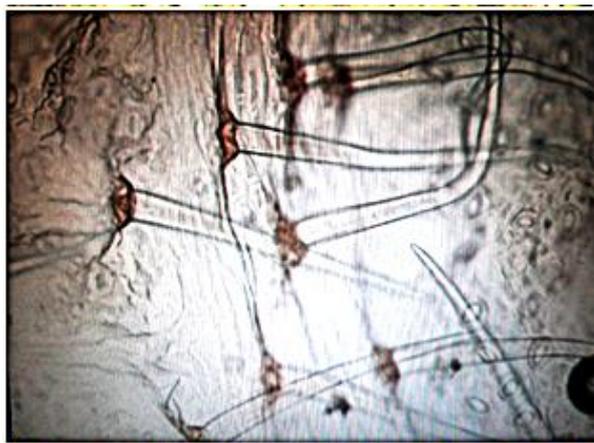


Рисунок 3.2.3 - Простые одноклеточные волоски листа (ув.20×40)



Рисунок 3.2.4 - Основание волоска с розеткой из 5 клеток (ув.20×80)

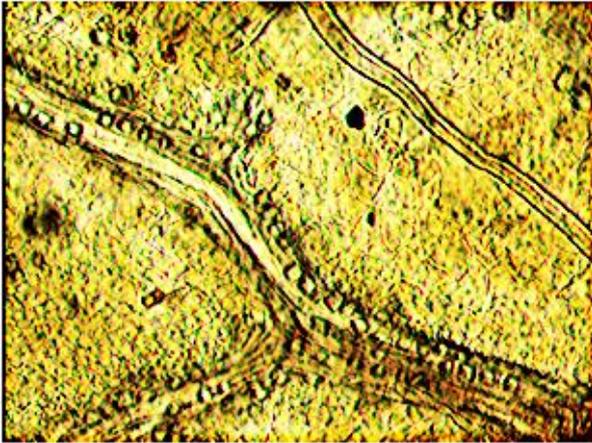


Рисунок 3.2.5 - Друзы оксалата кальция (ув.20×40)

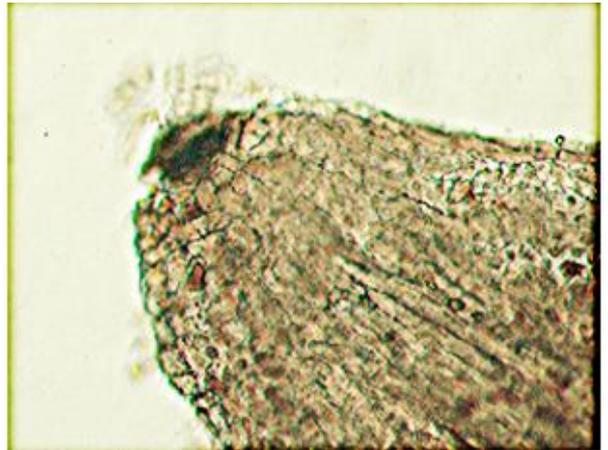


Рисунок 3.2.6 - Желёзка с бурым содержимым (ув.20×40)

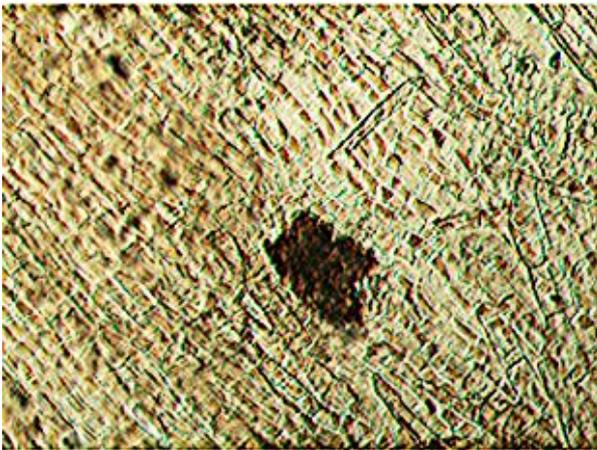


Рисунок 3.2.7 – Простые одноклеточные волоски на чашелистике (ув.20×40)

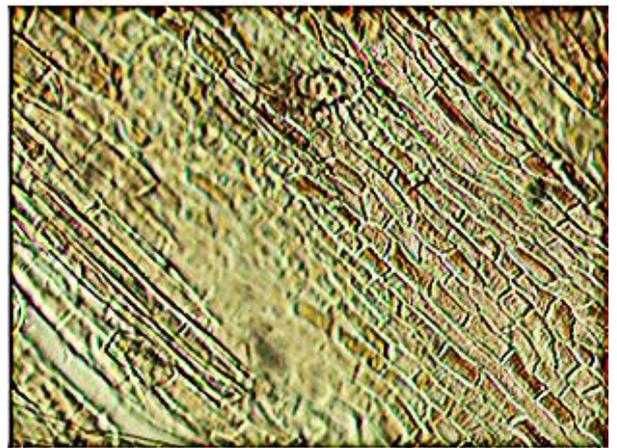


Рисунок 3.2.8 – Аномоцитный тип устьичного аппарата чашелистиков (ув.20×40)

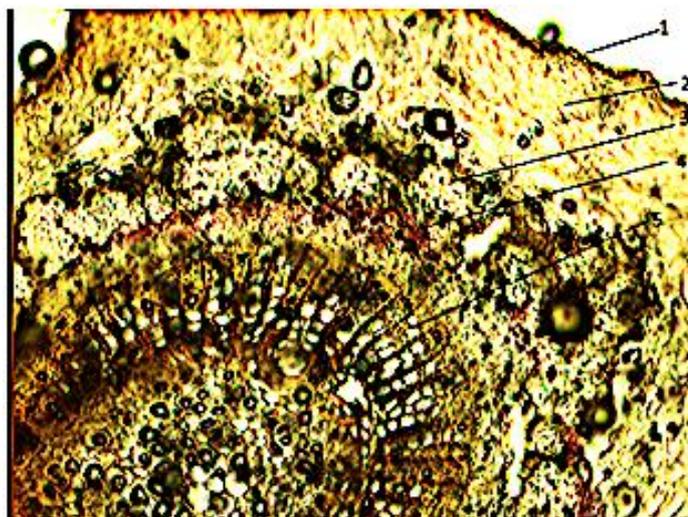


Рисунок 3.2.9 - Поперечный срез черешка (1- эпидермис, 2 - уголковая колленхима, 3 - паренхима коры, 4 - склеренхимная обкладка, 5 - серповидно-изогнутый коллатеральный проводящий пучок) (ув.20×10)

Микроспония цветков. Клетки эпидермиса венчика продолговато-удлиненные, прямостенные, со складчатостью кутикулы, так же встречаются сосочковидные клетки. Устьица крупные, с аномоцитным типом устьичного аппарата, окруженного 3-5 околоустьичными клетками. Некоторые клетки содержат коричневое содержимое (рисунок 3.2.10). Клетки эпидермиса чашелистика продолговатые, многоугольные, со складчатостью кутикулы с таким же устьичным аппаратом, как на венчике (рисунок 3.2.11). Присутствуют крупные друзы оксалата кальция. Волоски одноклеточные, простые, толстостенные, с бурым содержимым в местах прикрепления (рисунок 3.2.12) [51].

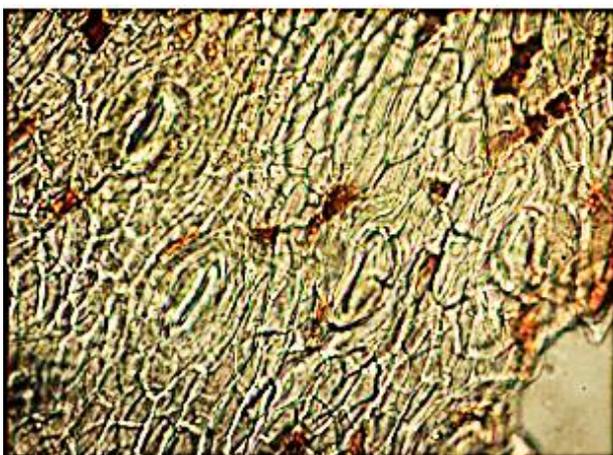


Рисунок 3.2.10 – Клетки эпидермиса венчика (ув.20×40)

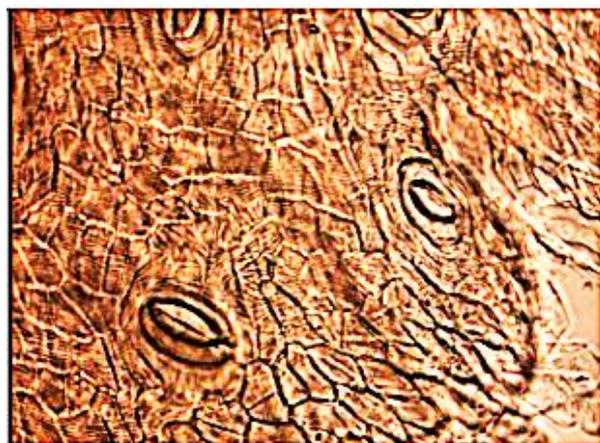


Рисунок 3.2.11 – Клетки эпидермиса чашелистика (ув.20×40)



Рисунок 3.2.12 – Одноклеточные волоски (ув.20×10)

Микроскопия плодов. Плоды боярышника имеют окончатovidные 4-6 угольные клетки эпидермиса, толстостенные, неизвилистые с желто-бурым содержимым. Склерейды образуют скопления или встречаются поодиночке (рисунок 3.2.13). На эпидермисе имеются одноклеточные, толстостенные волоски (рисунок 3.2.14). Клетки мякоти продолговатые овальной формы с тонкими стенками, с бурым содержимым (рисунок 3.2.15) [51].

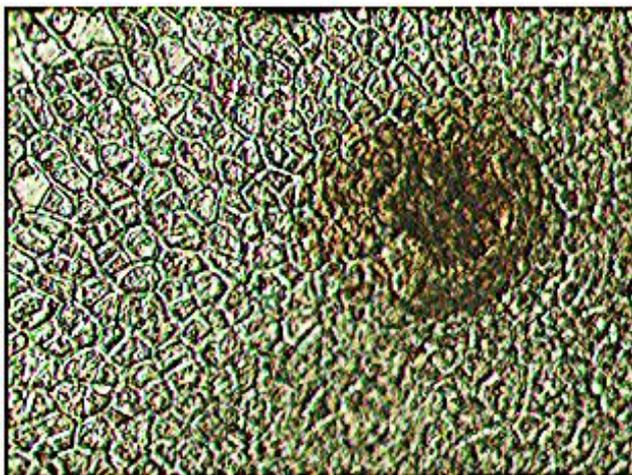


Рисунок 3.2.13 – Клетки эпидермиса
плода (ув.20×40)

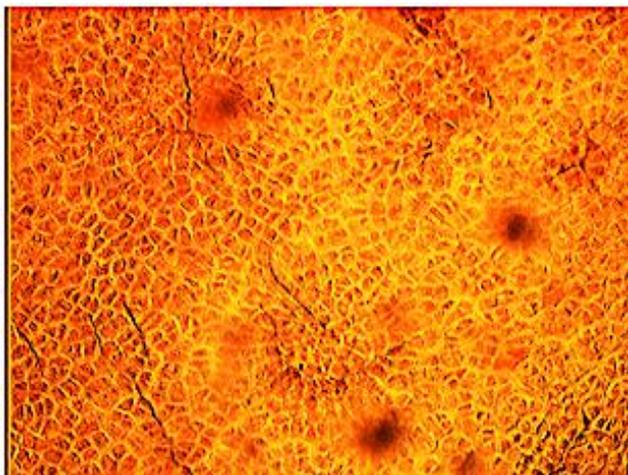


Рисунок 3.2.14 – Простые
одноклеточные волоски (ув.20×10)

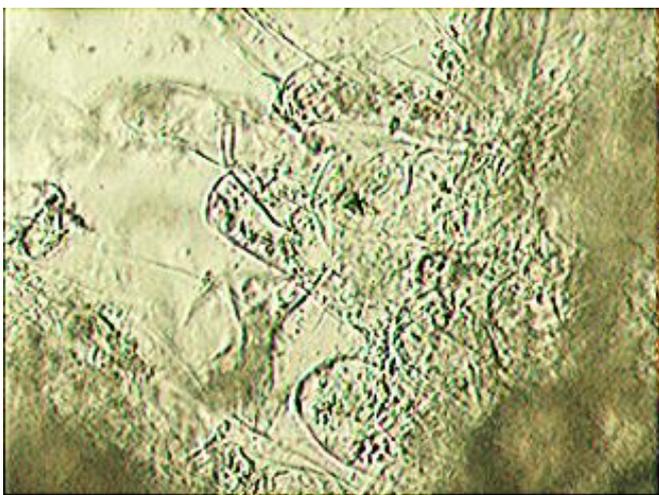


Рисунок 3.2.15 – Клетки мякоти плода (ув.20×80)

Таким образом, впервые проведен микроскопический анализ различных частей *C. pennsylvanica*. Полученные данные можно использовать для стандартизации сырья данного вида боярышника.

3.3 Изучение диагностически значимых признаков в побегах *C. pennsylvanica*

Для идентификации лекарственного растительного сырья при фармакогностическом анализе традиционно применяется микроскопический анализ. Авторы методики [59] Потанина О. Г. и Самылина И. А. предлагают выделить и подсчитать основные анатомические признаки растительного сырья, по которым можно идентифицировать его и судить о качестве данного сырья.

Для разработки показателя диагностически значимых признаков (ДЗП) в качестве диагностически значимых выделены следующие анатомо-диагностические признаки побегов *C. pennsylvanica* (рисунок 3.3.1):

- извилистые клетки эпидермиса;
- аномоцитный устьичный аппарат;
- простые одноклеточные волоски;
- розетка клеток у основания волоска;
- железки с бурым содержимым;
- друзы оксалата кальция и кристаллоносная обкладка;



Рисунок 3.3.1 - ДЗП в порошке побегов *C. pennsylvanica* (ув.20×40)

Результаты подсчетов ДЗП приведены в таблице 3.3.1. Среднее значение количества диагностически значимых частиц побегов составило $78,10 \pm 7,26\%$.

Таблица 3.3.1 - Метрологическая характеристика методики определения диагностически значимых признаков побегов *C. pennsylvanica*

N	$\bar{X}_{\text{ср}}$	S_y	t_{α}	ϵ_{α}	$\epsilon_{\text{отн}}$
15	78,10	3,36	2,16	7,26	9,30

Согласно проведенным исследованиям, рекомендуется в проект НД включить показатель качества - ДЗП не менее 70%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Проведен макроскопический анализ побегов *C. pennsylvanica*. Дополнены описания внешних признаков цветков, листьев и стеблей изучаемого растения.
2. Впервые проведен микроскопический анализ побегов *C. pennsylvanica*. Выделены в качестве диагностически значимых признаков следующие анатомо-диагностические признаки: извилистые клетки эпидермиса, аномоцитный тип устьичного аппарата, простые одноклеточные волоски, розетка, железки с бурым содержимым, друзы оксалата кальция и кристаллоносная обкладка, количество которых рекомендуется использовать в качестве критерия стандартизации. Диагностически значимые признаки плодов и цветков практически совпадают с признаками, описанными в ОФС 2.5.0061.18 и ОФС 2.5.0062.18, что свидетельствует о возможности использования *C. pennsylvanica* для замены фармакопейных видов боярышников.
3. Показатель диагностически значимых частиц составил $78,10 \pm 7,26\%$. Для включения в проект НД, данный показатель должен быть не менее 70%.
4. Данные исследования могут быть включены в проект НД для определения подлинности и качества данного вида сырья.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА *CRATAEGUS PENNSYLVANICA* ASHE

4.1 Качественный анализ побегов *C. pennsylvanica*

4.1.1 Качественные реакции

Для проведения качественных реакции использовали водные и спиртовые извлечения побегов *C. pennsylvanica*. Исследования проводились согласно методикам, описанным в главе II, п. 2.2.3.1. Все полученные результаты представлены в таблице 4.1.1.1.

Таблица 4.1.1.1.- Качественный анализ побегов *C. pennsylvanica*

Группа веществ	Качественная реакция	Результат (+) или(-)
Флавоноиды	проба <i>Chinoda</i> (Zn +HCl конц)	+
	Проба Брианта	окрасились оба слоя
	Реакция с 2% AlCl ₃	+
Сапонины	Реакция образования пены	+
	Реакция Санье	+ (тритерпеновые сапонины)
	(CH ₃ COO) ₂ Pb	+
Кумарины	Лактонная проба	+
	Диазореакция	+
Дубильные вещества:	Реакция с ЖАК	+ (конденсированные танины)
Полисахариды	95% этиловый спирт	+
Гидроксикоричные кислоты	Реакция с 3% хлоридом железа (III)	+

В результате исследования в побегах *C. pennsylvanica* обнаружены флавоноиды (в виде агликонов и гликозидов); конденсированные дубильные вещества; тритерпеновые сапонины; кумарины; полисахариды и гидроксикоричные кислоты.

4.1.2 Хроматографические исследования побегов *C.pennsylvanica*

4.1.2.1 Результаты тонкослойной хроматографии

Условия проведения тонкослойной хроматографии побегов *C.pennsylvanica* описаны в главе II п. 2.2.3.1.

Флавоноиды. Идентификацию флавоноидов проводили в условиях, описанных в таблице 2.2.3.1.1. Наиболее лучшее разделение зон адсорбции произошло в системе 1. На рисунке 4.1.2.1.1 представлены результаты ТСХ – анализа в УФ – свете, $\lambda = 365$ нм. Оценивали и сравнивали такие показатели как окраска пятен и коэффициент подвижности (Rf) (таблица 4.1.2.1.1). По полученным данным можно предположить, что побеги *C. pennsylvanica* содержат в своем составе кверцетин, рутин, гиперозид, лютеолин, витексин, лютеолин-7-О-гликозид [130].

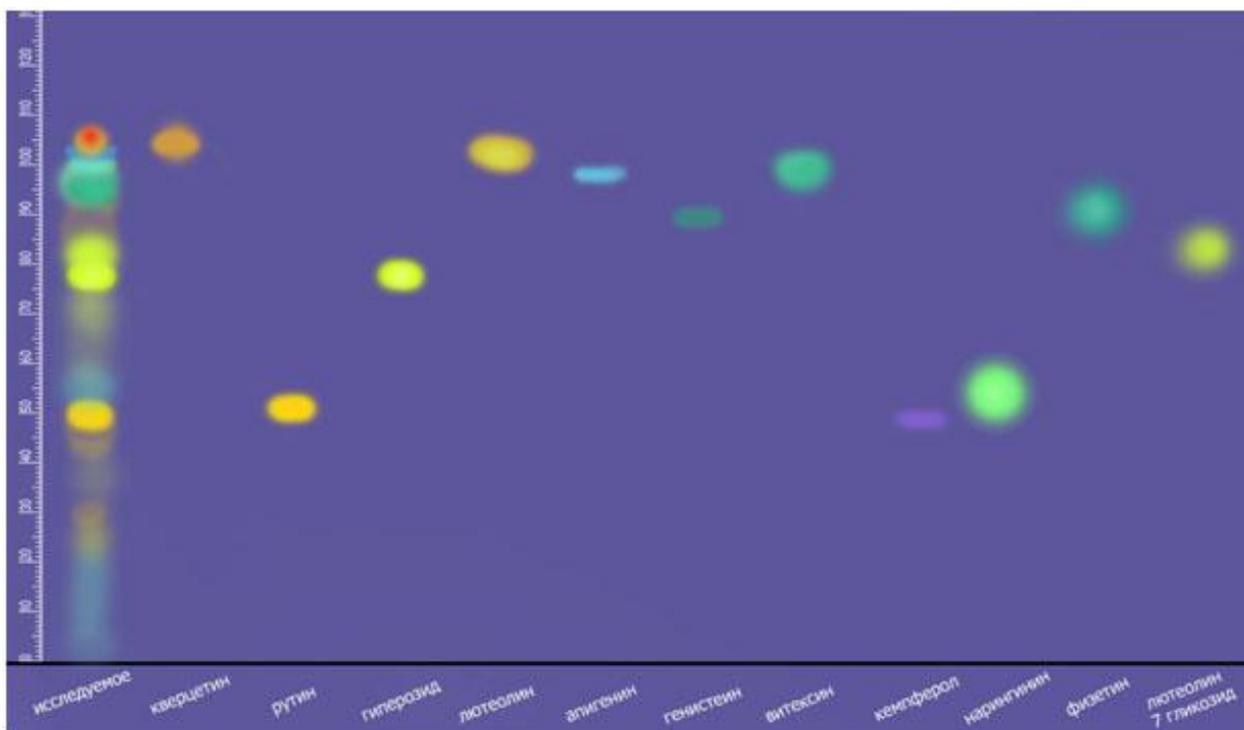


Рисунок 4.1.2.1.1 – Хроматограмма спиртового извлечения побегов *S. pennsylvanica* со СО флавоноидов (система 1) в УФ – свете, $\lambda = 365$ нм.

Таблица 4.1.2.1.1 - Коэффициенты подвижности и окраска пятен флавоноидов.

№	Флавоноид	Флуоресценция стандартного образца	Rf стандартного образца	Флуоресценция пятен в исследуемом растворе	Rf в исследуемом растворе
1	кверцетин	оранжевый	0,94	оранжевый	0,93
2	рутин	желтый	0,46	желтый	0,45
3	гиперозид	ярко - желтый	0,71	ярко-желтый	0,71
4	лютеолин	темно-желтый	0,93	темно-желтый	0,92
5	апигенин	голубой	0,89	-	-
6	генистеин	зеленый	0,81	-	-
7	витексин	сине - зеленый	0,90	сине - зеленый	0,88
8	кемпферол	фиолетовый	0,45	-	-
9	нарингенин	ярко - зеленый	0,49	-	-
10	физетин	зеленый	0,83	-	-
11	лютеолин-7-О-гликозид	желтый	0,75	желтый	0,76

Гидроксикоричные кислоты. Для проведения ТСХ анализа гидроксикоричных кислот использовали спиртовые извлечения с 70% этиловым спиртом в системах 1, 3, 11. Оценка качественного состава проводилась в системе 11, так как она имеет наиболее оптимальную разделяющую способность. Хроматограмму до и после обработки парами аммиака просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм (рисунок 4.1.2.1.2). Результаты оценки коэффициента подвижности и окраски пятен представлены в таблице 4.1.2.1.2. В побегах *C. pennsylvanica* содержатся следующие гидроксикоричные кислоты: кофейная, синаповая, хлорогеновая [49].

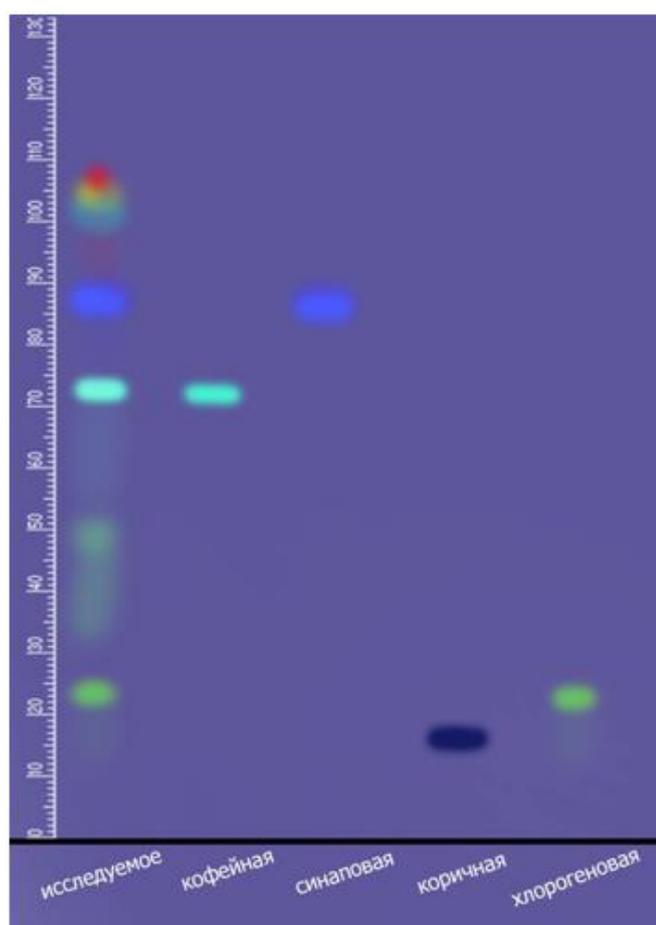


Рисунок 4.1.2.1.2 – Хроматограмма спиртового извлечения побегов *C. pennsylvanica* со СО гидроксикоричных кислот (система 11) в УФ – свете, $\lambda = 365$ нм.

Таблица 4.1.2.1.2 - Коэффициенты подвижности и окраска пятен гидроксикоричных кислот

№	Гидроксикоричная кислота	Флуоресценция стандартного образца	Rf стандартного образца	Флуоресценция пятен в исследуемом растворе	Rf в исследуемом растворе
1	кофейная	голубой	0,66	голубой	0,67
2	синаповая	темно-синий	0,80	темно-синий	0,80
3	коричная	синий	0,11	-	-
4	хлорогеновая	зеленый	0,20	светло-зеленый	0,21

Сапонины определяли в 96% спиртовых извлечениях из побегов *C. pennsylvanica* в системах 6, 9, 10. После хроматографирования хроматограммы обрабатывали 20% серной кислотой и нагревали в сушильном шкафу при 105 °С и наблюдали появление розовых пятен при дневном свете. Для качественного определения сапонинов анализировали хроматограмму в системе 9 (рисунок 4.1.2.1.3) и 10 (рисунок 4.1.2.1.4) в УФ-свете при длине волны 365 нм. Результаты исследования представлены в таблицах 4.1.2.1.3 и 4.1.2.1.4. В исследуемом извлечении были обнаружены урсоловая и олеаноловая кислоты.

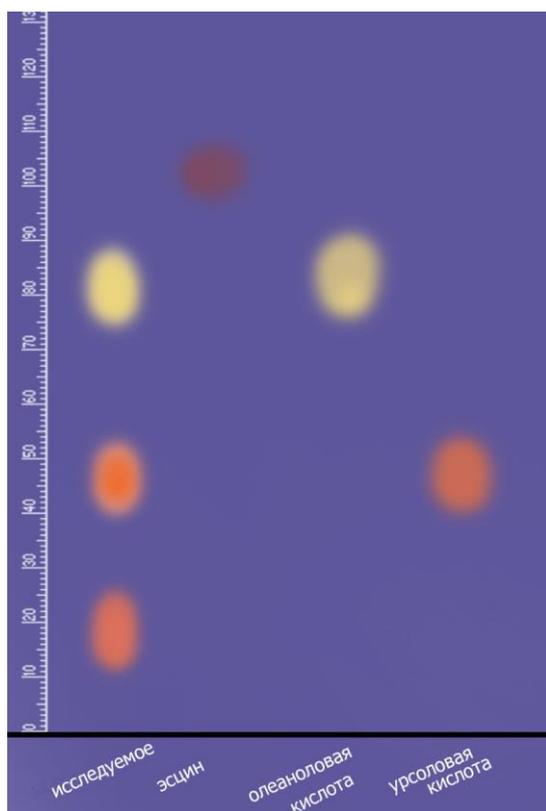


Рисунок 4.1.2.1.3 – Хроматограмма спиртового извлечения побегов *C. pennsylvanica* со СО сапонинов (система 9) в УФ – свете, $\lambda = 365$ нм

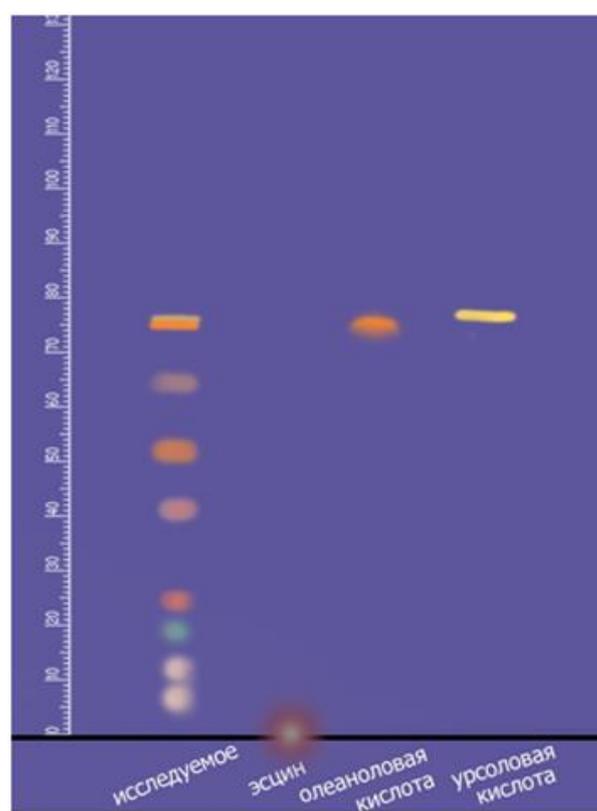


Рисунок 4.1.2.1.4 – Хроматограмма спиртового извлечения побегов *C. pennsylvanica* со СО сапонинов (система 10) в УФ – свете, $\lambda = 365$ нм

Таблица 4.1.2.1.3 - Коэффициенты подвижности и окраска пятен сапонинов в системе 9

№	Сапонины	Флуоресценция стандартного образца	Rf стандартного образца	Флуоресценция пятен в исследуемом растворе	Rf в исследуемом растворе
1	эсцин	фиолетовый	0,86	-	-
2	олеаноловая кислота	светло-желтый	0,68	светло-желтый	0,7
3	урсоловая кислота	оранжевый	0,40	оранжевый	0,39

Таблица 4.1.2.1.3 - Коэффициенты подвижности и окраска пятен сапонинов в системе 10

№	Сапонины	Флуоресценция стандартного образца	Rf стандартного образца	Флуоресценция пятен в исследуемом растворе	Rf в исследуемом растворе
1	эсцин	фиолетовый	-	-	-
2	олеаноловая кислота	желтый	0,79	желтый	0,84
3	урсоловая кислота	ярко-оранжевый	0,84	оранжевый	0,85

Исследуемые методом ТСХ кумарины, органические кислоты, фенольные соединения в побегах *C. pennsylvanica* обнаружены не были.

4.1.2.2 Исследование липофильной фракции сырья *C. pennsylvanica* методом газовой хроматографии

Газовая хроматография проводилась согласно главе II п. 2.2.3.1. В результате проведенных исследований получены следующие хроматограммы (рисунок 4.1.2.2.1-4.1.2.2.4).

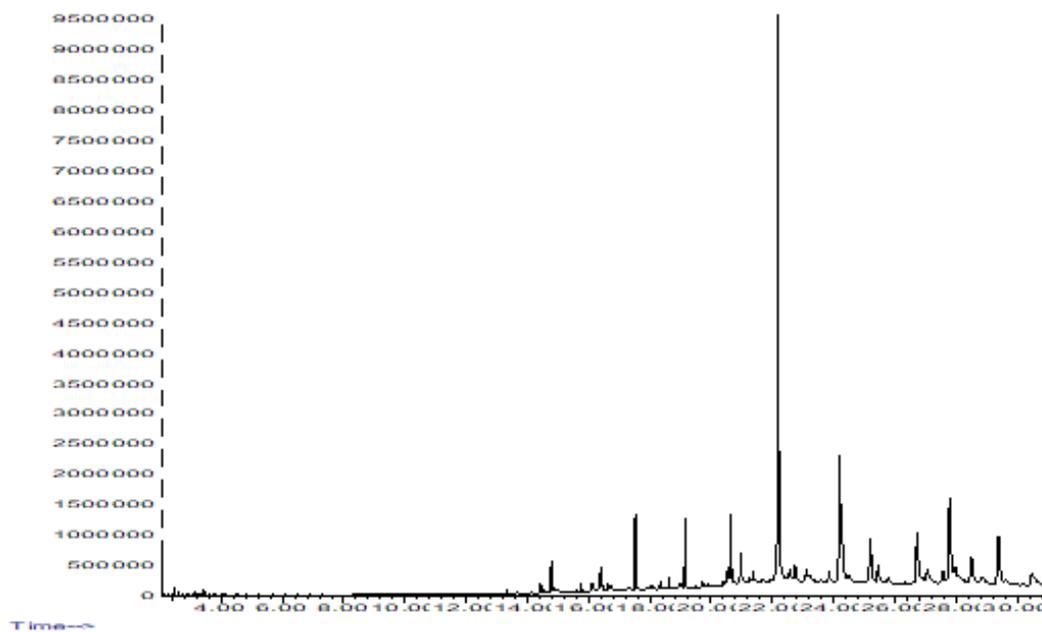


Рисунок 4.1.2.2.1 - Хроматограмма петролейного извлечения побегов *S. pennsylvanica*

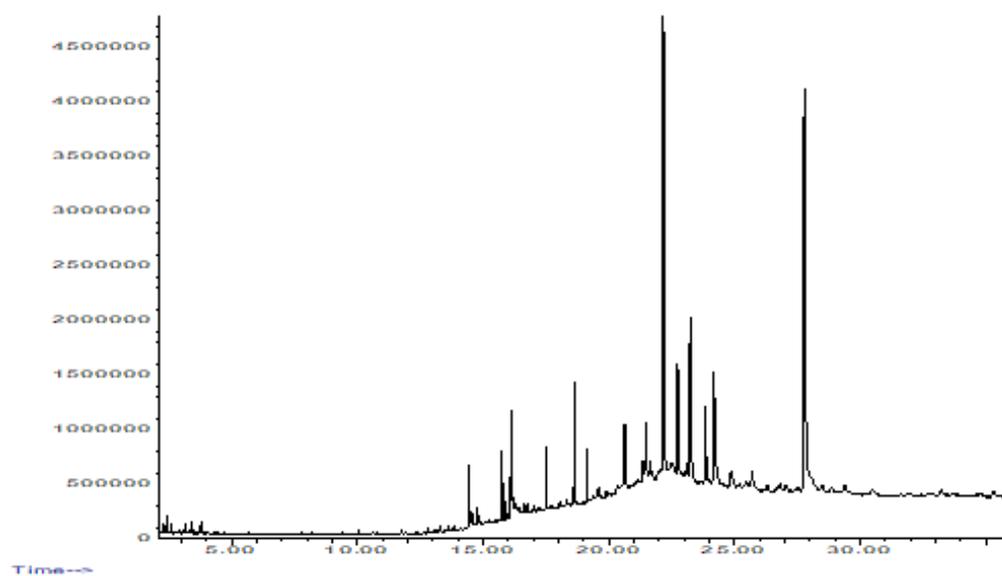


Рисунок 4.1.2.2.2 - Хроматограмма петролейного извлечения листьев *S. pennsylvanica*

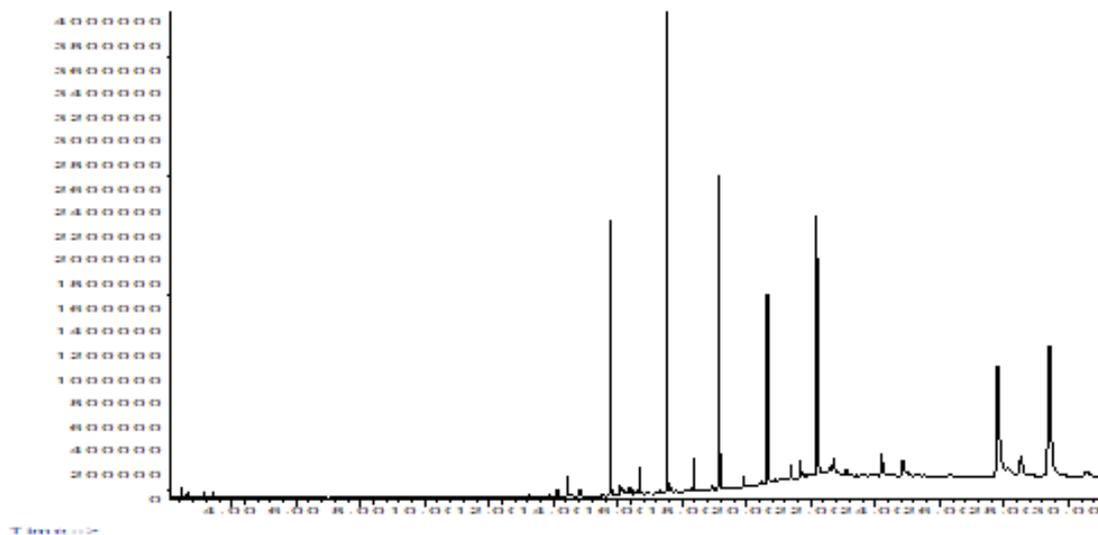


Рисунок 4.1.2.2.3 - Хроматограмма петролейного извлечения цветков *C. pennsylvanica*

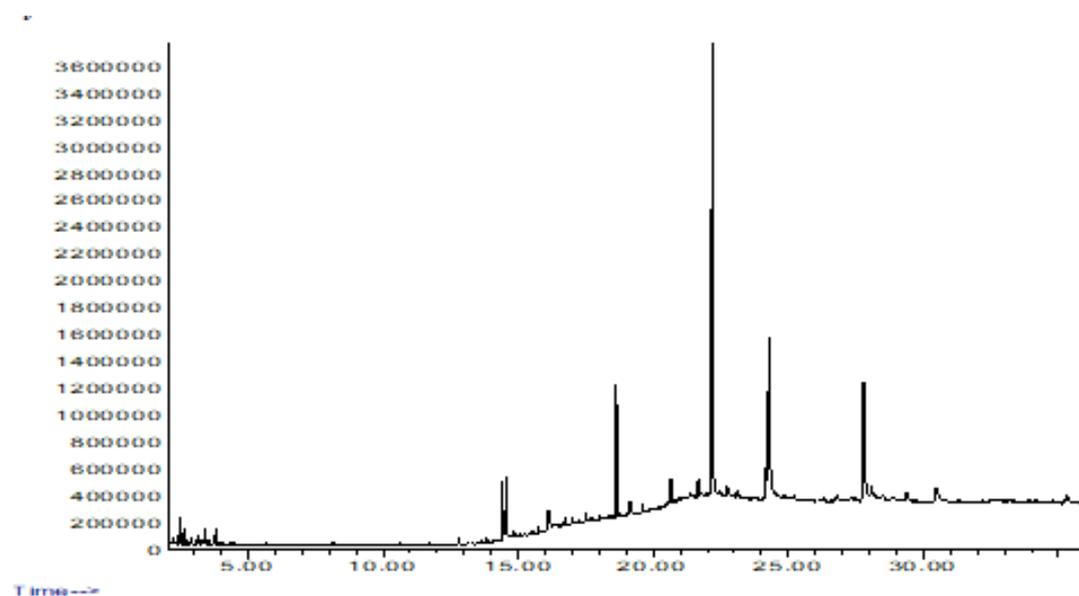


Рисунок 4.1.2.2.4 - Хроматограмма петролейного извлечения плодов *C. pennsylvanica*

В побегах *C. pennsylvanica* (рисунок 4.1.2.2.1, таблица 4.1.2.2.1) обнаружено 76 соединений, из них идентифицировано 43. Основными соединениями явились алканы, жирные кислоты, токоферолы, каротиноиды, флавоноиды, эфирные масла, тритерпеновые сапонины, кетоны, лактоны, сложные эфиры карбоновых кислот, фитостерины [41].

В листьях *C. pennsylvanica* (рисунок 4.1.2.2.2, таблица 4.1.2.2.1) обнаружено 36 соединений, из них идентифицировано 25. Основными

соединениями явились алканы, сложные эфиры карбоновых кислот, эфирные масла, токоферолы, жирные кислоты, флавоноиды, жирные кислоты, лактоны, фитостерины, тритерпеновые сапонины [41].

В цветках *C. pennsylvanica* (рисунок 4.1.2.2.3, таблица 4.1.2.2.1) обнаружено 32 соединения, из них идентифицировано 23. Основными соединениями явились алканы, сложные эфиры карбоновых кислот, эфирные масла, кетоны, флавоноиды, фитостерины, тритерпеновые сапонины [41].

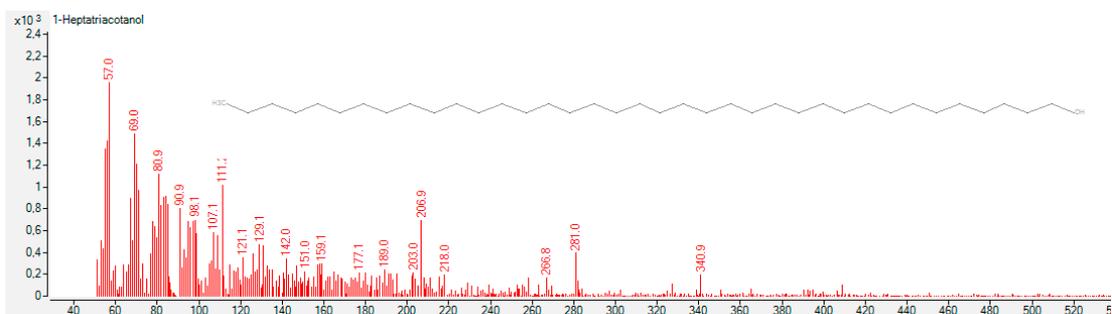
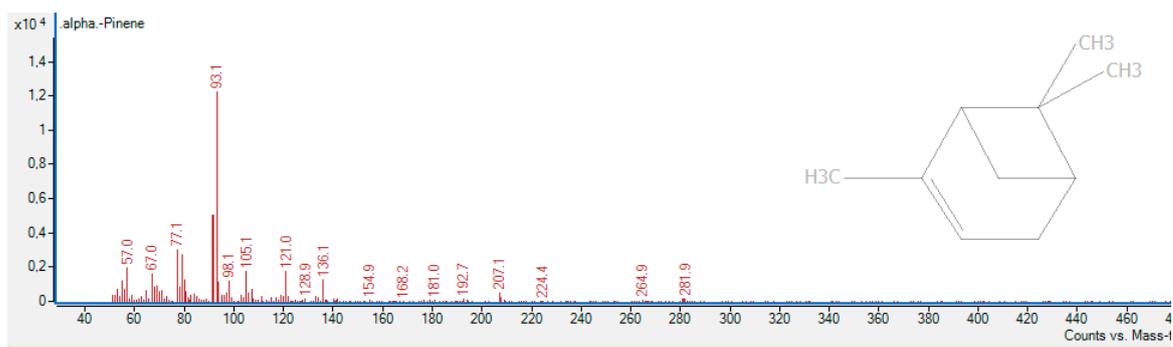
В плодах *C. pennsylvanica* (рисунок 4.1.2.2.4, таблица 4.1.2.2.1) обнаружено 18 соединений, из них идентифицировано 17. Основными соединениями явились алканы, жирные кислоты, углеводы, флавоноиды, эфирные масла, сложные эфиры карбоновых кислот, каротиноиды, фитостерины [41].

Таблица 4.1.2.2.1 – Результаты анализа ГХ-МС.

№	Время удерживания, мин	Наименование вещества	Площадь пика, x 10 ⁶			
			Побеги	Листья	Цветки	Плоды
1	2,46	1-Heptatriacontanol	2,96	2,39	3,77	2,76
2	2,62	α - pinene	2,39	1,59	2,52	2,31
3	3,44	Cyclodecanone	2,40		2,03	
4	3,44	2, 5 octadecadienoic acid, methyl ester	4,21	2,88		2,18
5	3,83	Eucalyptol	4,21	3,46	5,02	3,99
6	12,82	cis-13-Ecosenoic acid	14,71			
7	13,85	Docosane	4,37		2,94	
8	14,15	Oleic acid	4,46	13,01		
9	14,43	Hexadecanoic acid 2, 3 -dihydroxypropyl ester				8,97
10	14,44	n - Hexadecanoic acid	53,77	6,61	13,39	
11	14,85	Phthalic acid, butyl – 3 - (2 methoxyethyl) heptyl ester	97,58	6,16	6,43	8,96
12	15,77	Isochiapin B	30,48	11,23	49,09	2,04

13	15,92	Linderenolide	16,07	2,96	1,65	7,64
14	16,14	Culmorin	95,20	33,82	28,60	
15	16,31	Heneicosane	53,23	7,11	9,41	
16	16,66	(2R, 3S, 4R, 4aR, 7R, 8S) – 8 – [2(furan – 3yl) ethyl] 4a, 7, 8 – trimethyspirol [2, 3, 5, 6, 7, 8a – hexahydro – 1H – naphtolene – 4, 2 – oxirone] – 2, 3 – diol	58,04	2,04	7,91	1,47
17	17,52	Pentacosane	81,95	85,73		2,04
18	17,92	Luteolin 7-O-D-glucoside	80,88	12,33	8,92	18,17
19	18,06	3a, 6b, 8a – trihydroxy – 2a – (hydromethyl) – 1, 1, 5, 7 tetramethyl – 4 oxo – 1a, 1b, 1e, 2a, 3, 3a, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a – dodecahydro – 1H – cyclopropa [5`, 6] benzo [1, 2, 7, 7] azuleno [5, 6 – b] oxiren 8 yl acetate	63,72	4,01	6,96	
20	18,35	8, 14 Seco – 3, 19 – epoxyandrostane – 8, 14 – dione, 17 acetoxy – 3 beta methoxy 4, 4 – dimethyl – 1, 1, 5, 7 – tetramethyl 4 oxo – 1a, 1b, 1c, 2a, 3, 3a, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a – dodecahydro – 1H – cyclopropa [5`, 6] benzo [1, 2, 7, 8] azuleno [5, 6 – b] oxiren - 8yl acetate	39,33	4,01	62,76	3,58
21	19,01	Ambrosanolide-B	78,67			
22	19,15	Tetracosane	110,85	10,63	62,76	3,58
23	19,91	9a (acetyloxy) – 3 [(acetyloxy) methyl] – 2, 3, 4a, 7b – tetrahydroxy – 1, 1, 6, 8 tetramethyl – 5 oxo – 1a, 1b, 2, 3, 4, 4a, 5, 7a, 7b, 8, 9, 9a – dodecahydro – 1H – cyclopropa [3, 4] benzo [1, 2 – E] azulen – 9yl acetate	33,84	37,66	4,30	
24	21,38	Apigenin 6-C-glucoside	101,46	16,60	4,70	
25	22,18	Nonacosane	573,86	179,08	95,75	94,88
26	22,75	δ – tocopherol	68,42	62,01		
27	23,22	Squalane	132,50	77,33		102,53
28	23,86	γ - tocopherol	53,09	40,88		

29	24,19	Hexatriacontane	227,80	80,34	12,04	
30	25,21	Lupeol	147,15			
31	26,73	Ursa – 9 (11), 12 dien – 3ol	183,09			
32	26,92	Betulin	31,04			
33	27,79	γ – sitosterol	184,26	203,27	140,18	47,29
34	27,97	13, 27 – cycloursane	83,46			
35	28,51	β – amyryn	93,02		36,46	
36	28,85	Acetic acid 4, 4, 6a, 6b, 8a, 11, 12, 14b – octamethyl – 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 14b – octa – hydroipicen – 3yl ester	99,03			
37	29,39	α - amyryn	123,31		96,46	
38	30,49	10 – apo – beta – psicaratenic acid 5, 6 – dihydroxy – methyl ester (5R, 6R)	135,15			8,30
39	32,43	Betulinaldehyde	73,45			
40	33,24	Azafrin	222,34			
41	33,73	Toosendanin	95,22			
42	34,09	3, 12 oleandione	157,96			
43	34,92	Betulin 28 – O – acetate	49,15			

Рисунок 4.1.2.2.5 – Масс спектр *1-Heptatriacotanol*Рисунок 4.1.2.2.6 – Масс спектр α - pinene

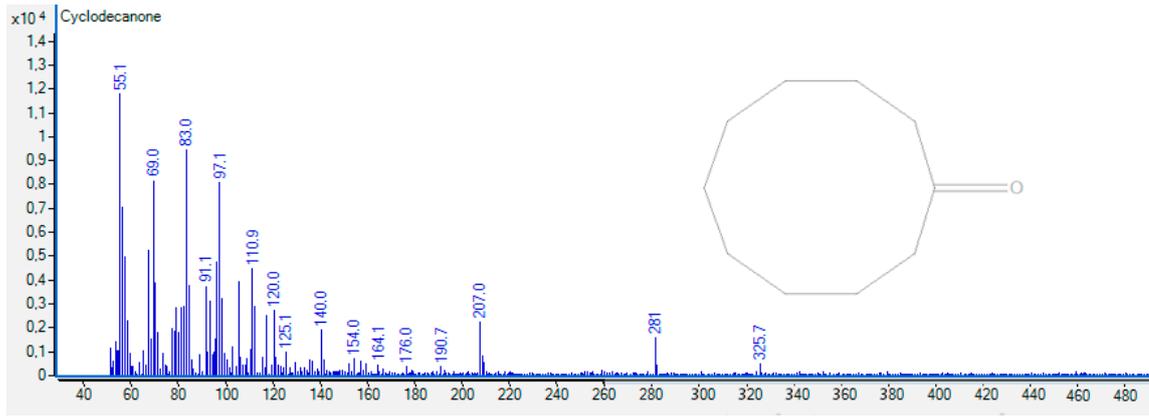
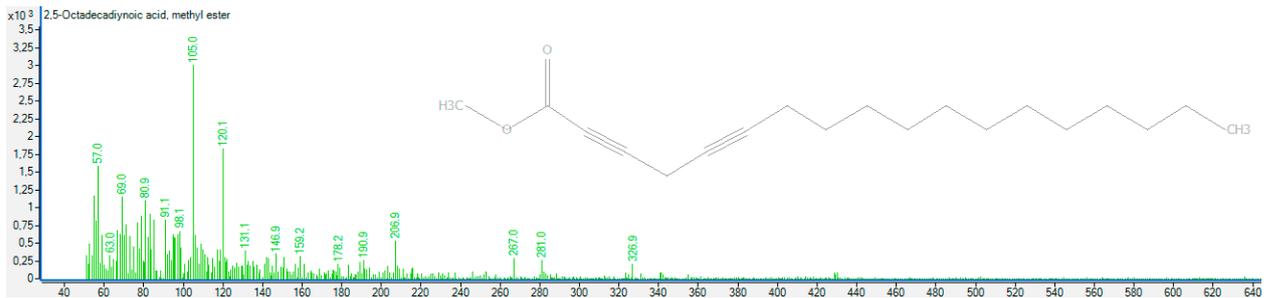
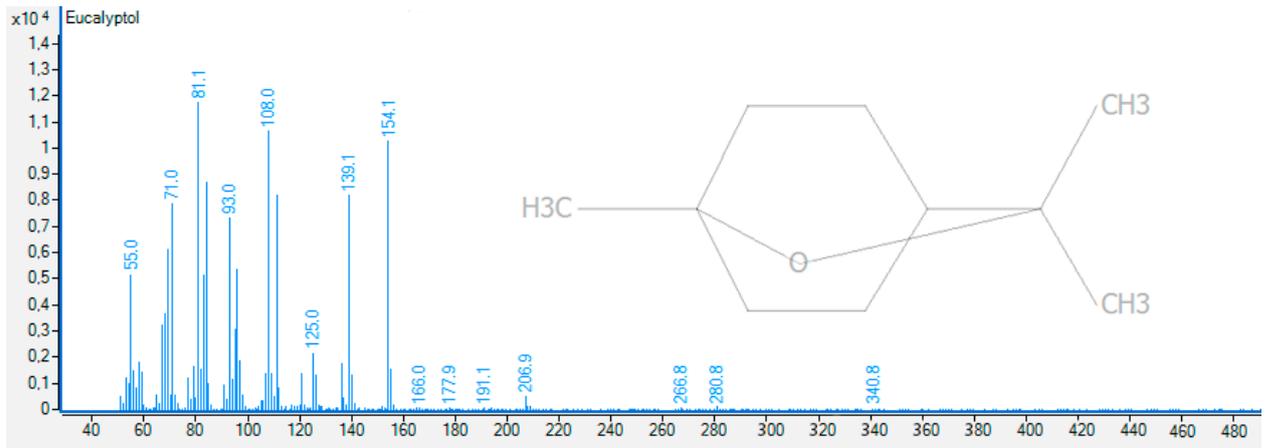
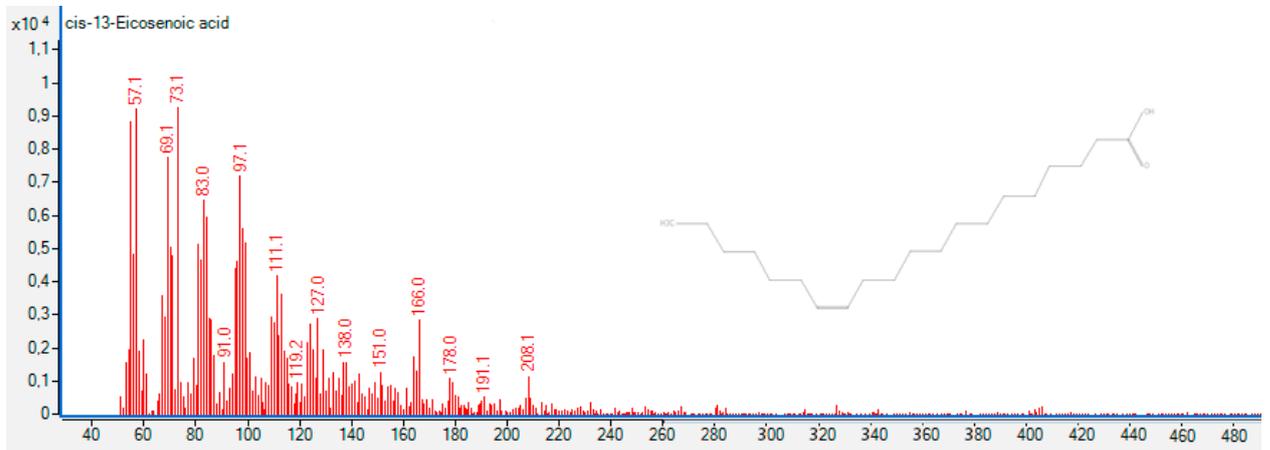
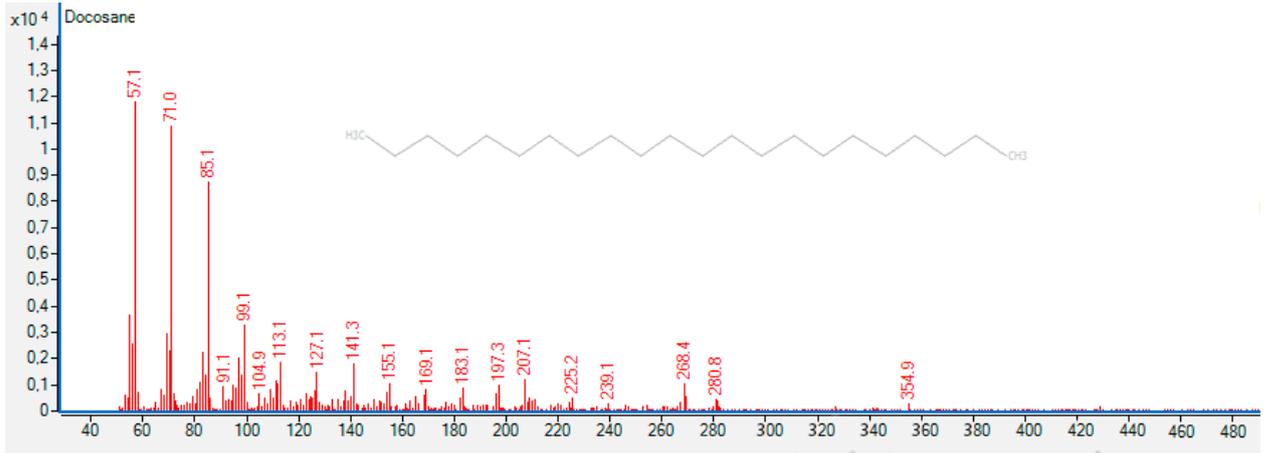
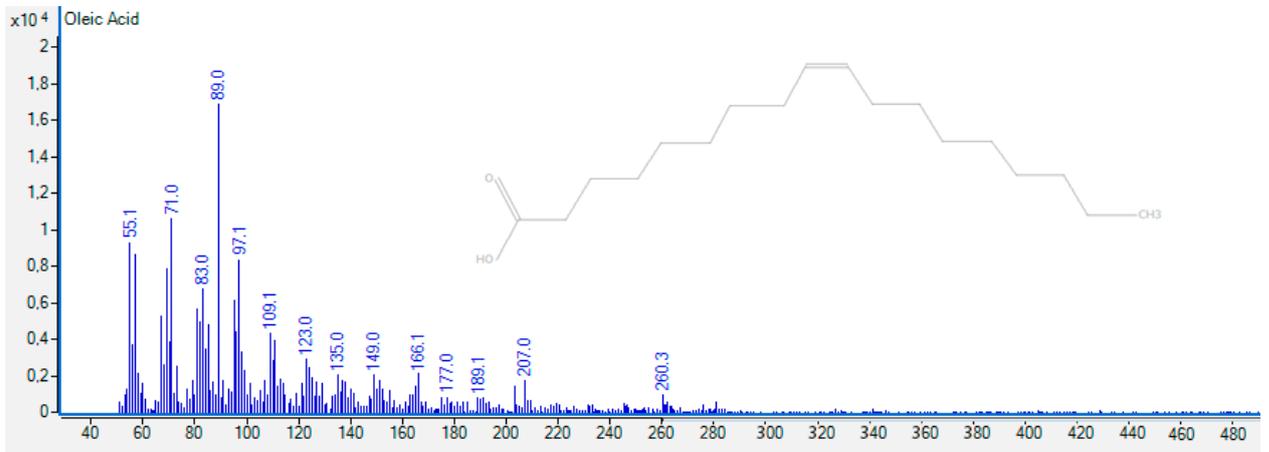
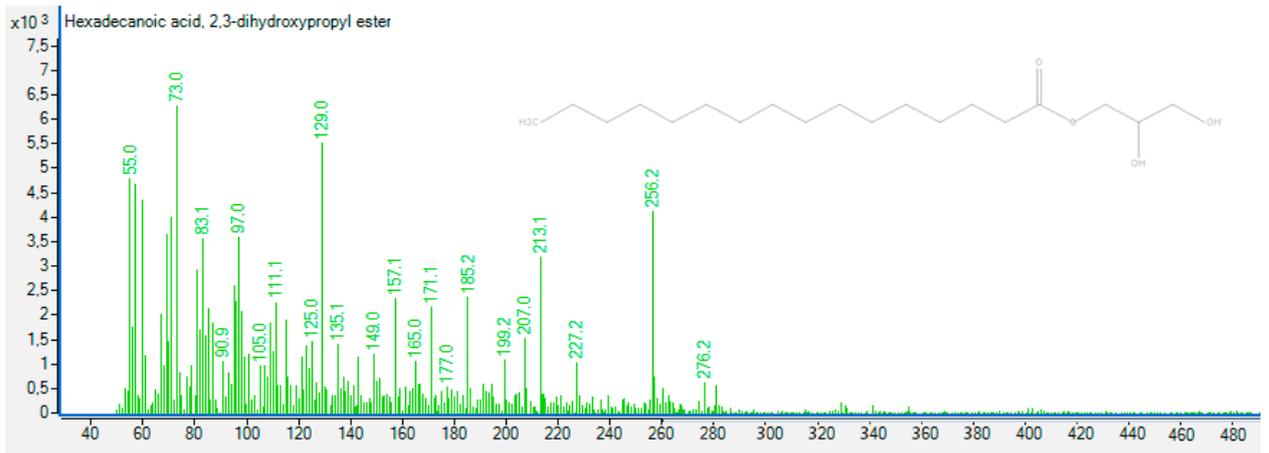
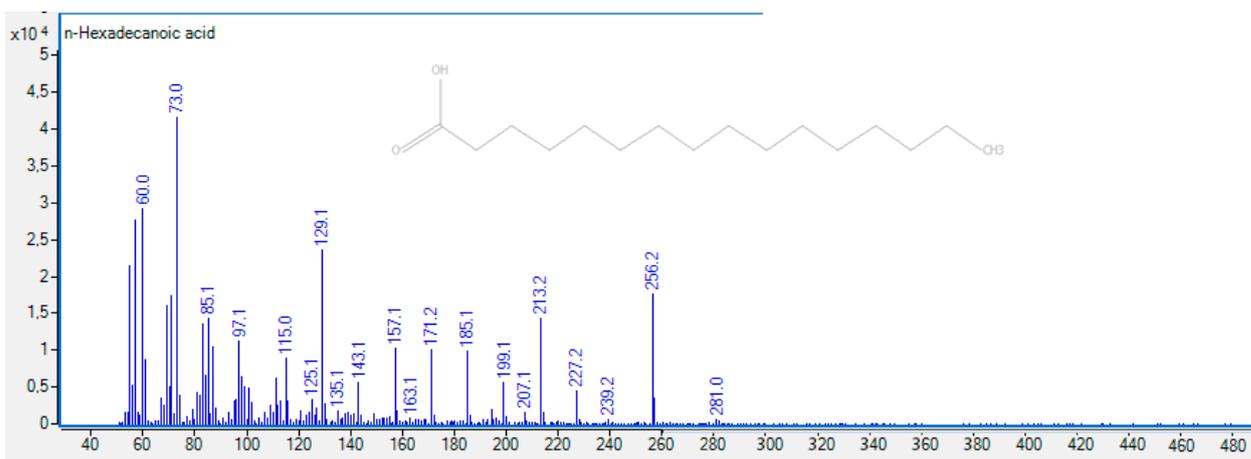
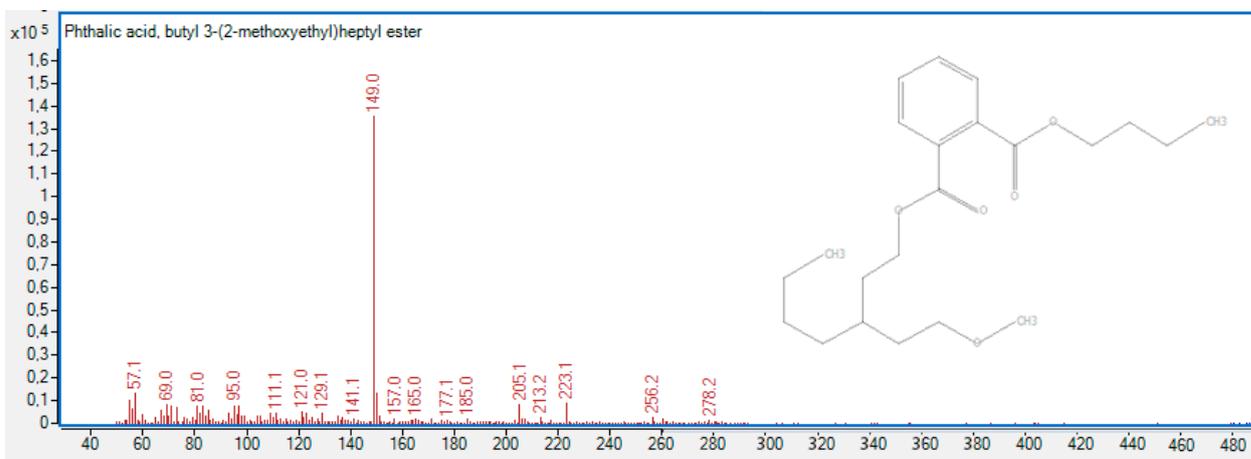
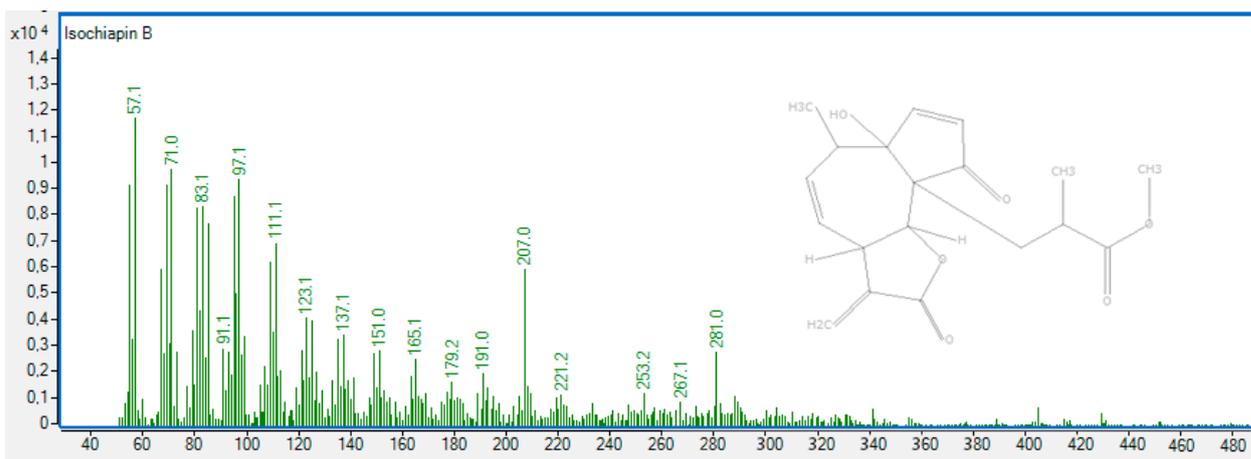
Рисунок 4.1.2.2.7 – Масс спектр *Cyclodecanone*

Рисунок 4.1.2.2.8 – Масс спектр 2, 5 octadecadienoic acid, methyl ester

Рисунок 4.1.2.2.9 – Масс спектр *Eucalyptol*Рисунок 4.1.2.2.10 – Масс спектр *cis-13-Eicosenoic acid*

Рисунок 4.1.2.2.11 – Масс спектр *Docosane*Рисунок 4.1.2.2.12 – Масс спектр *Oleic acid*Рисунок 4.1.2.2.13 – Масс спектр *Hexadecanoic acid 2, 3 -dihydroxypropyl ester*

Рисунок 4.1.2.2.14 – Масс спектр *n* - Hexadecanoic acidРисунок 4.1.2.2.15 – Масс спектр *Phthalic acid, butyl – 3 - (2 methoxyethyl) heptyl ester*Рисунок 4.1.2.2.16 – Масс спектр *Isochiapin B*

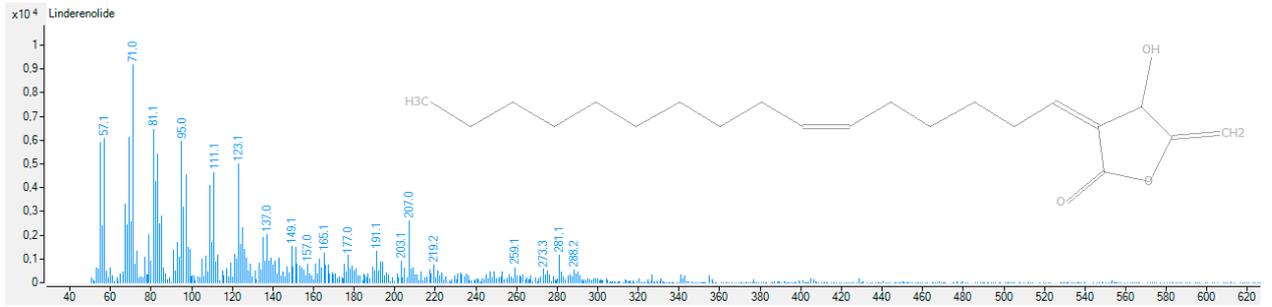
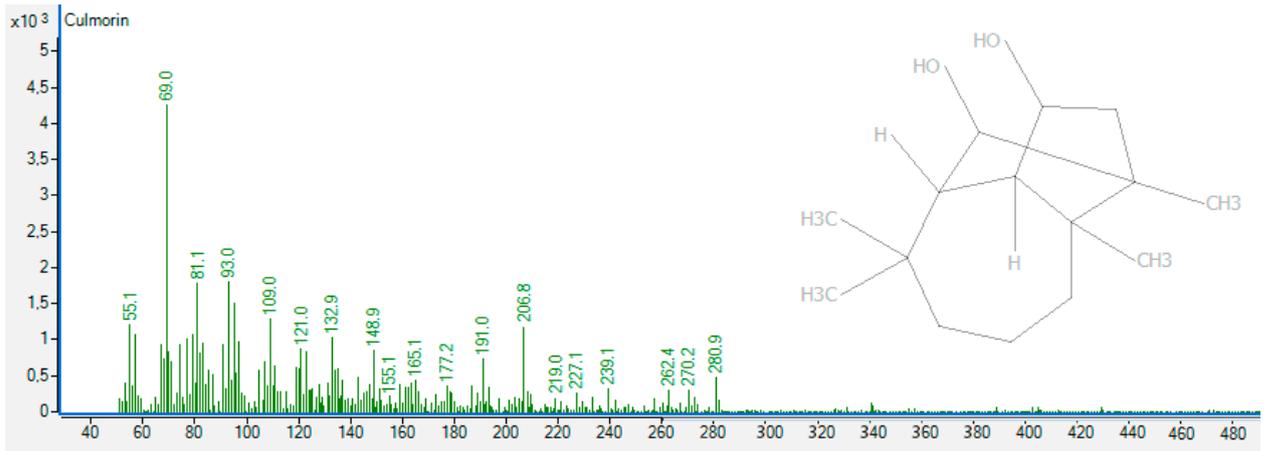
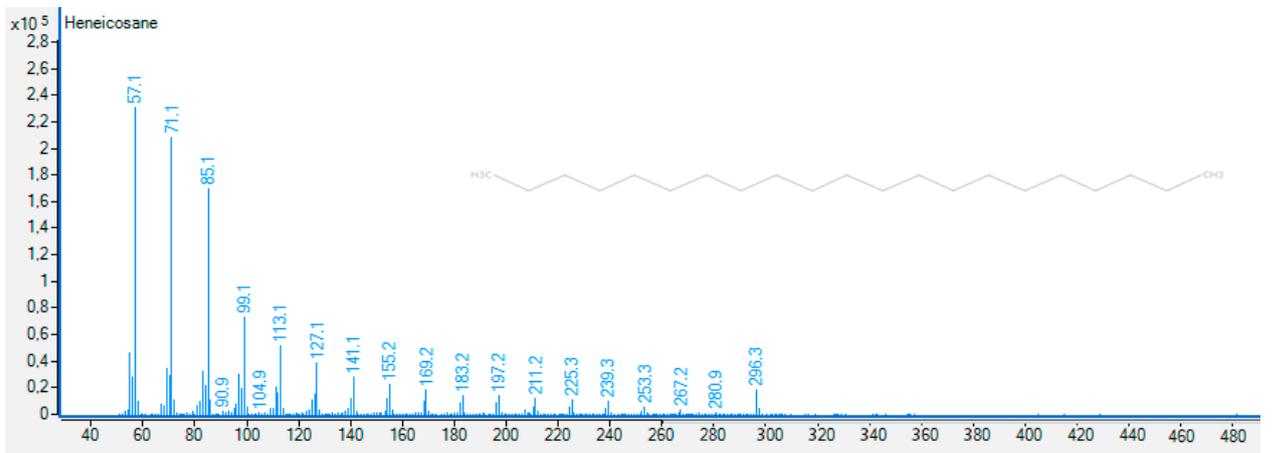
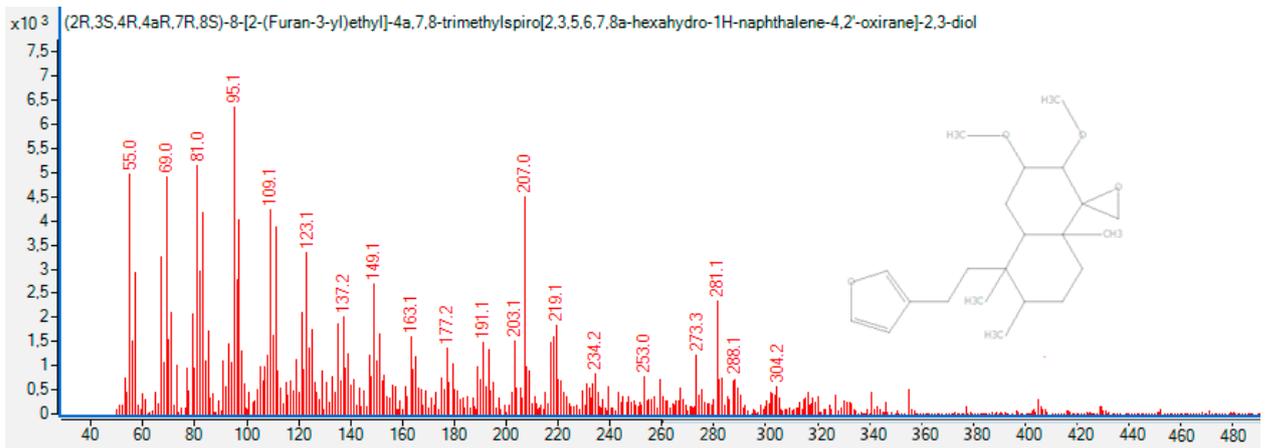
Рисунок 4.1.2.2.17 – Масс спектр *Linderenolide*Рисунок 4.1.2.2.18 – Масс спектр *Culmorin*Рисунок 4.1.2.2.19 – Масс спектр *Heneicosane*

Рисунок 4.1.2.2.20 – Масс спектр $(2R, 3S, 4R, 4aR, 7R, 8S) - 8 - [2(\text{furan} - 3\text{yl}) \text{ethyl}] 4a, 7, 8 - \text{trimethylspirol} [2, 3, 5, 6, 7, 8a - \text{hexahydro} - 1H - \text{naphhtolene} - 4, 2 - \text{oxirone}] - 2, 3 - \text{diol}$

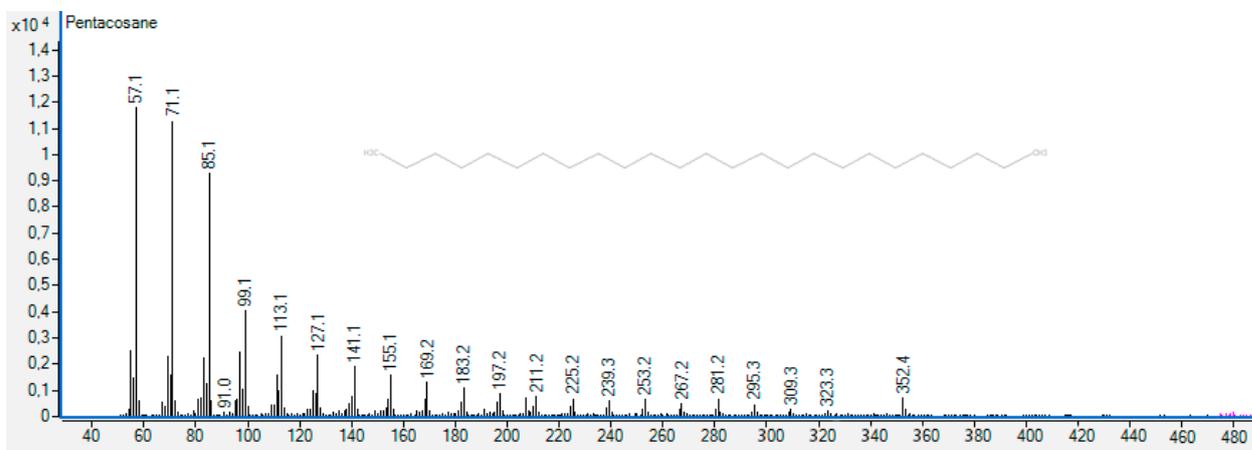


Рисунок 4.1.2.2.21 – Масс спектр *Pentacosane*

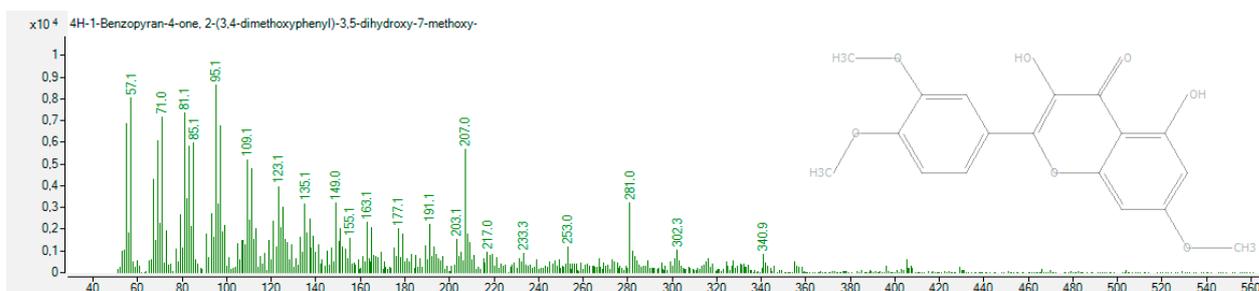


Рисунок 4.1.2.2.22 – Масс спектр *Luteolin 7-O-D-glucoside*

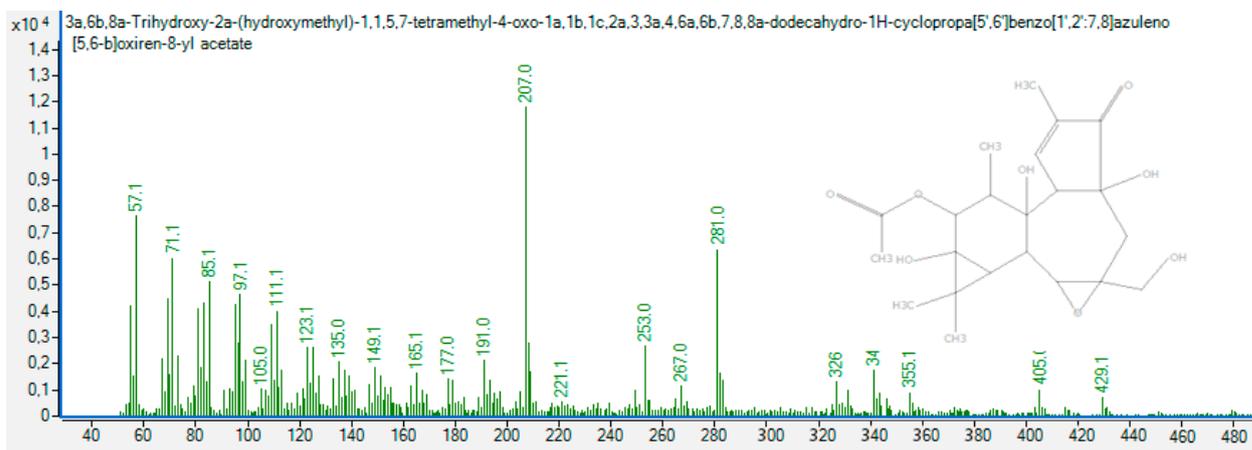


Рисунок 4.1.2.2.23 – Масс спектр $3a, 6b, 8a - \text{trihydroxy} - 2a - (\text{hydromethyl}) - 1, 1, 5, 7 \text{ tetramethyl} - 4 \text{ oxo} - 1a, 1b, 1e, 2a, 3, 3a, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a - \text{dodecahydro} - 1H - \text{cyclopropa} [5', 6] \text{ benzo} [1, 2, 7, 7] \text{ azuleno} [5, 6 - b] \text{ oxiren} 8 \text{ yl acetate}$

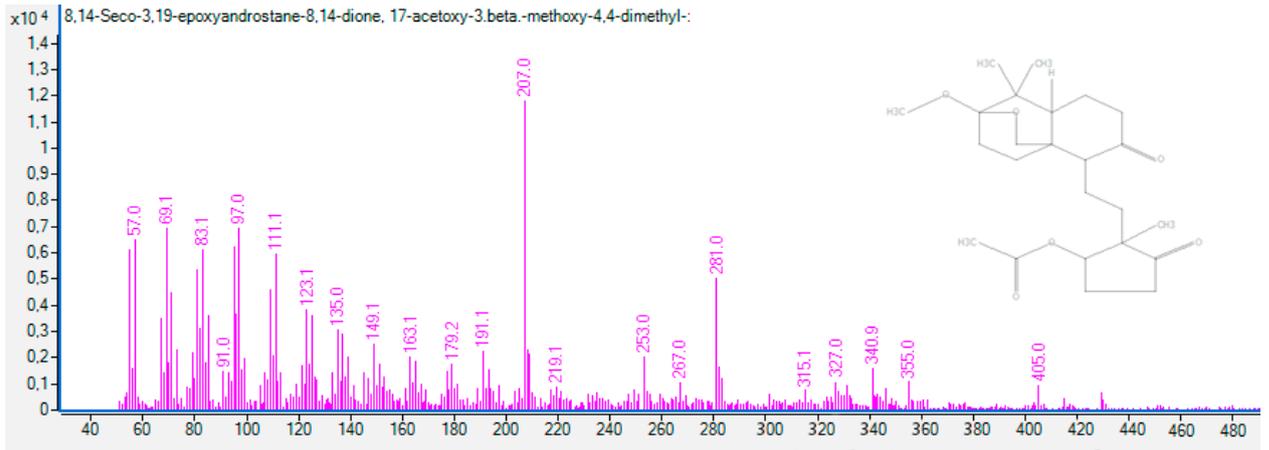


Рисунок 4.1.2.2.24 – Масс спектр 8, 14 Seco – 3, 19 – эпоxyandrostane – 8, 14 – dione, 17 acetoxy – 3 beta methoxy 4, 4 – dimethyl – 1, 1, 5, 7 – tetramethyl 4 oxo – 1a, 1b, 1c, 2a, 3, 3a, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a – dodecahydro – 1H – cyclopropa [5', 6] benzo [1, 2, 7, 8] azuleno [5, 6 – b] oxiren -8yl acetate

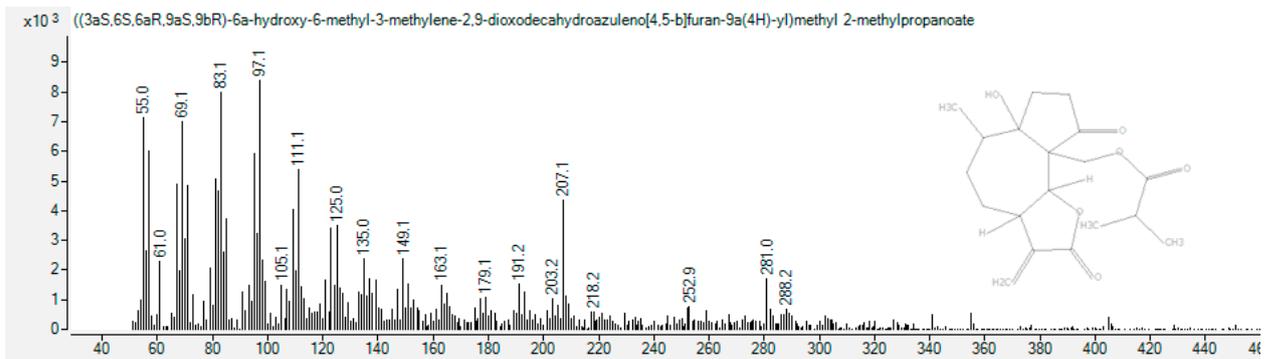


Рисунок 4.1.2.2.25 – Масс спектр Ambrosanolide-B

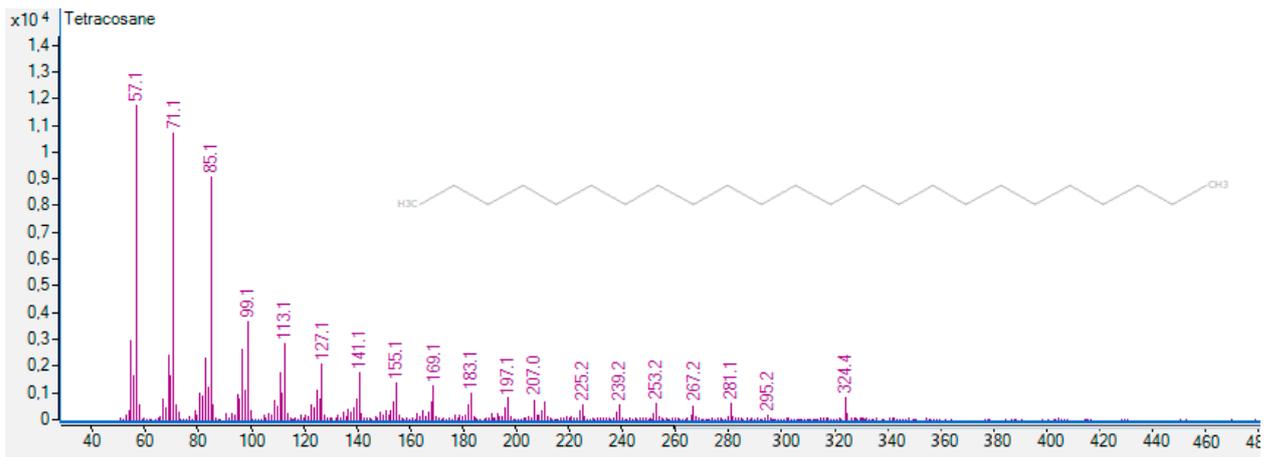


Рисунок 4.1.2.2.26 – Масс спектр Tetracosane

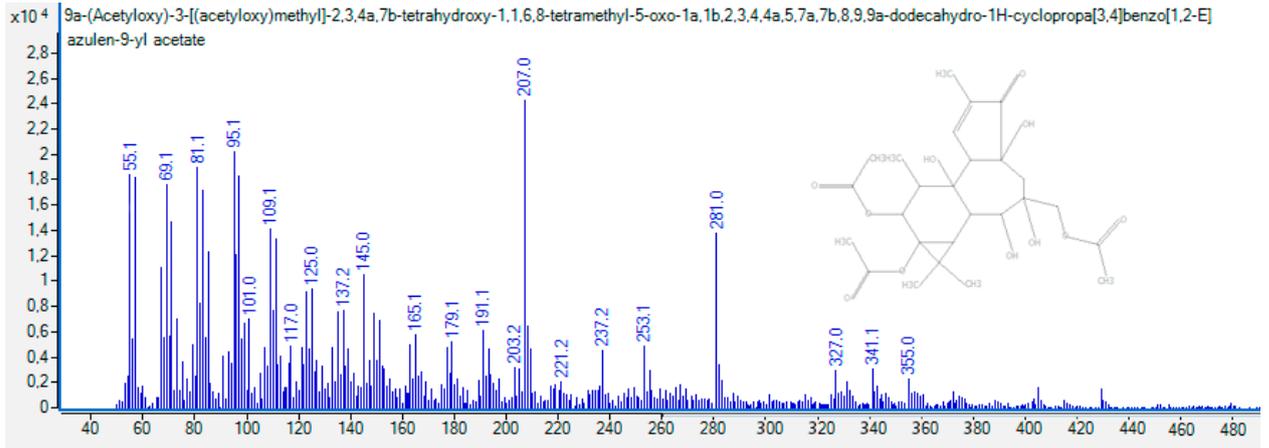


Рисунок 4.1.2.2.27 – Масс спектр 9a (acetyloxy) – 3 [(acetyloxy) methyl] – 2, 3, 4a, 7b – tetrahydroxy – 1, 1, 6, 8 tetramethyl – 5 oxo – 1a, 1b, 2, 3, 4, 4a, 5, 7a, 7b, 8, 9, 9a – dodecahydro – 1H – cyclopropa [3, 4] benzo [1, 2 – E] azulen – 9yl acetate

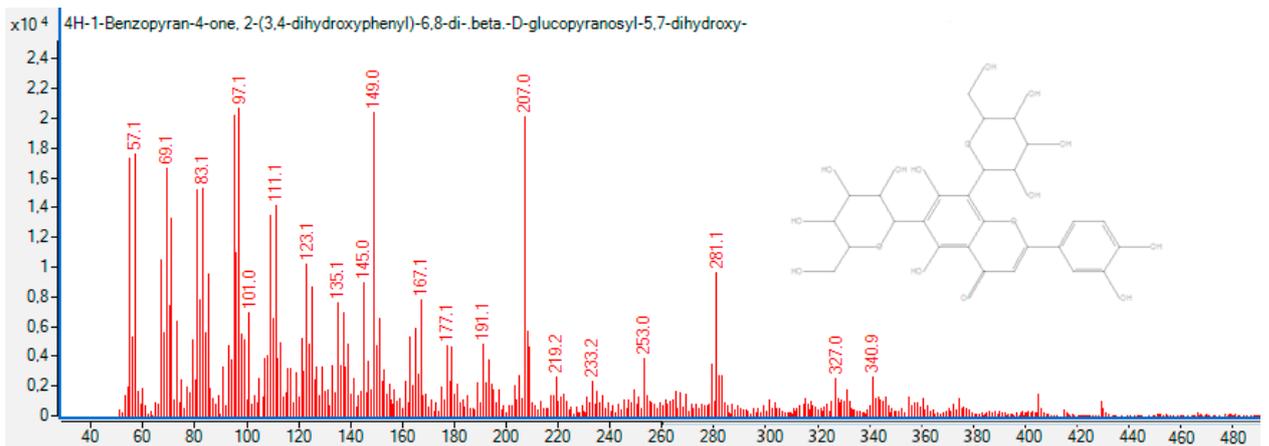


Рисунок 4.1.2.2.28 – Масс спектр Apigenin 6-C-glucoside

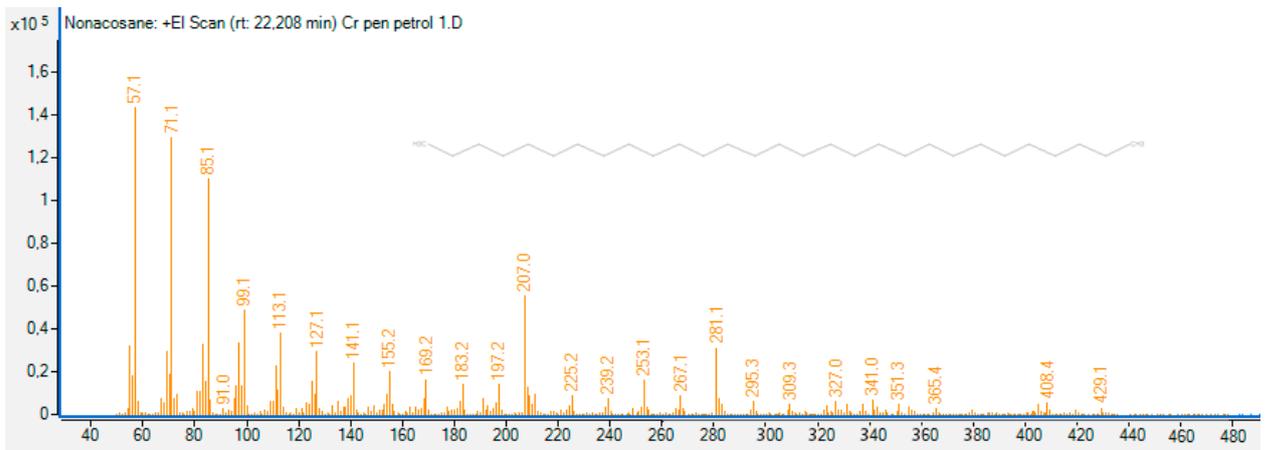
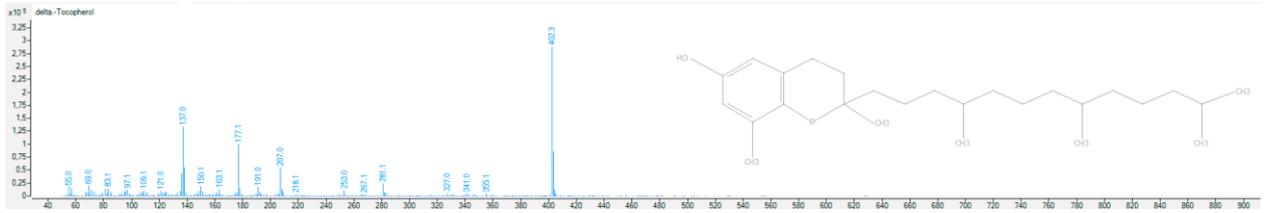
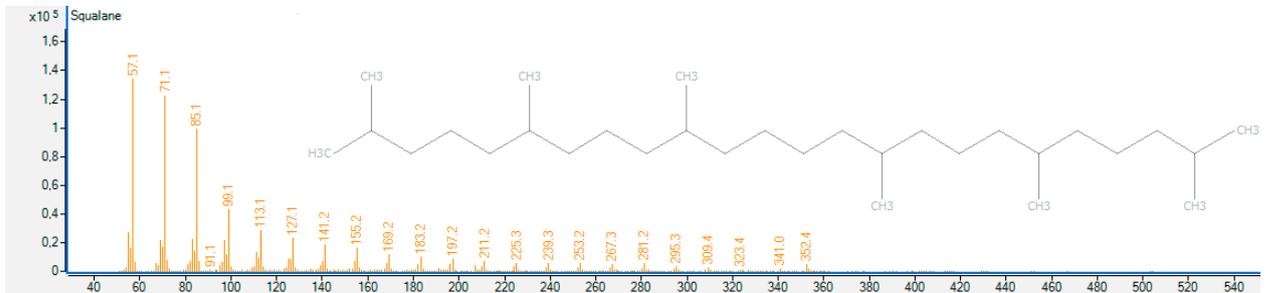
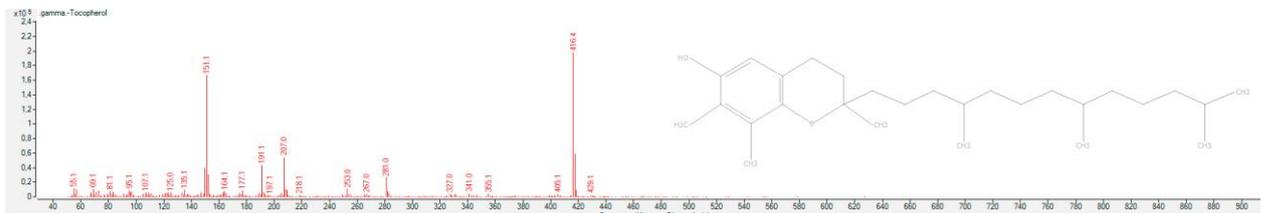
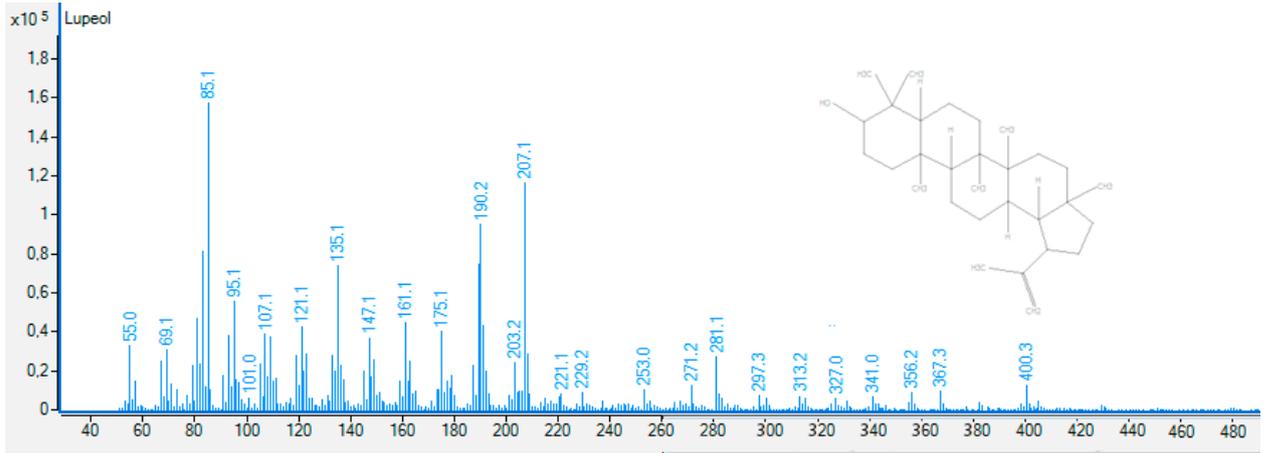
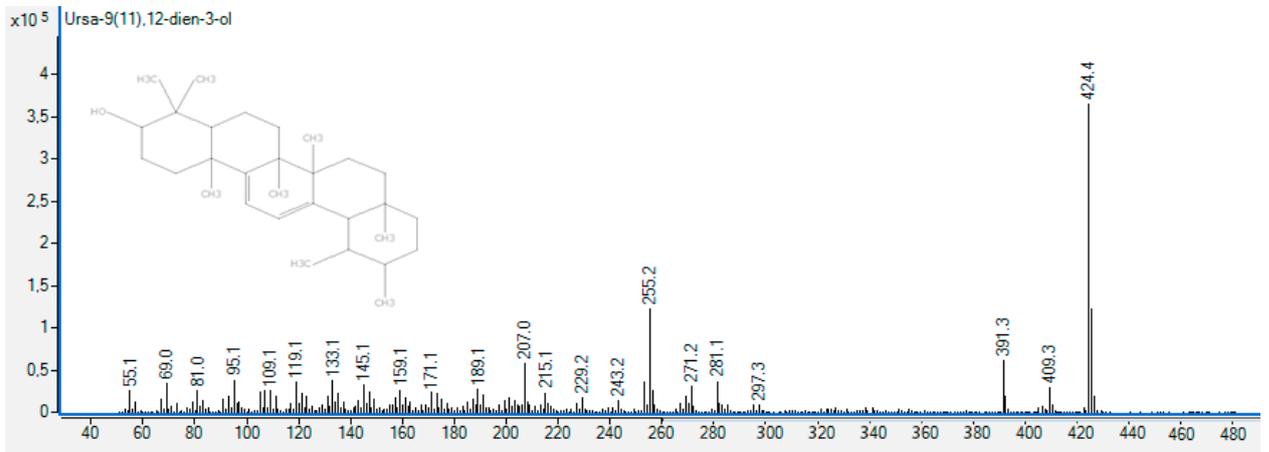
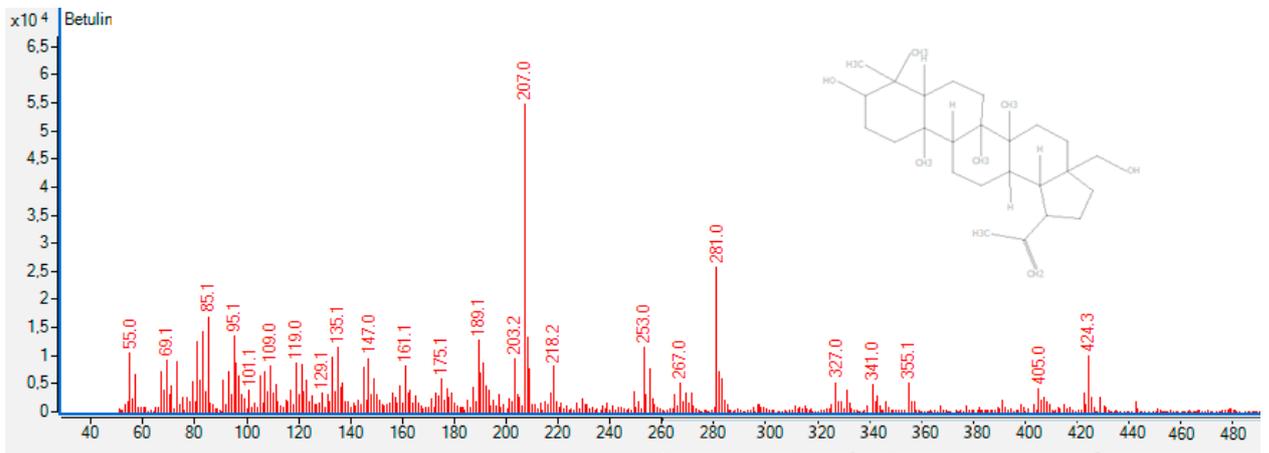
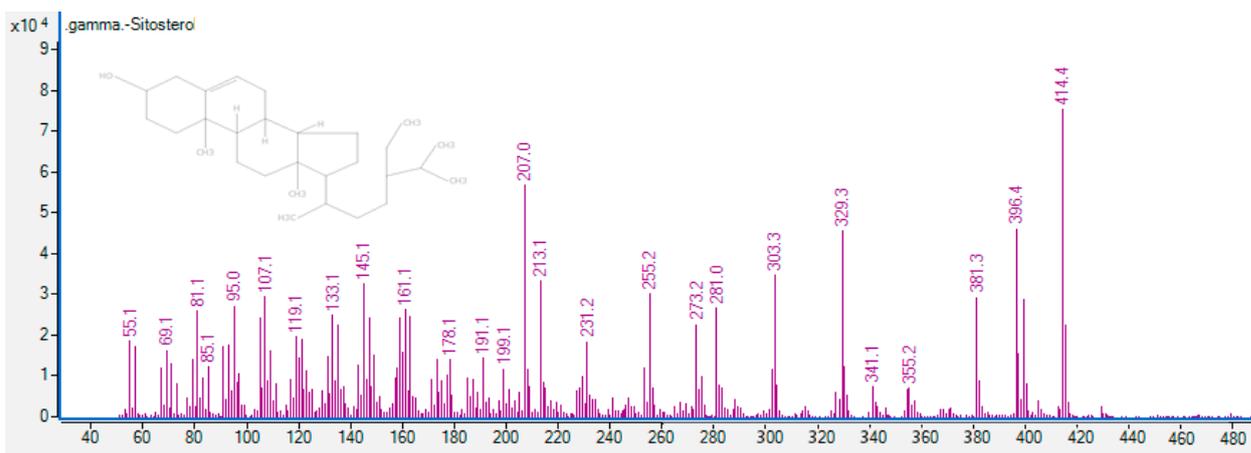
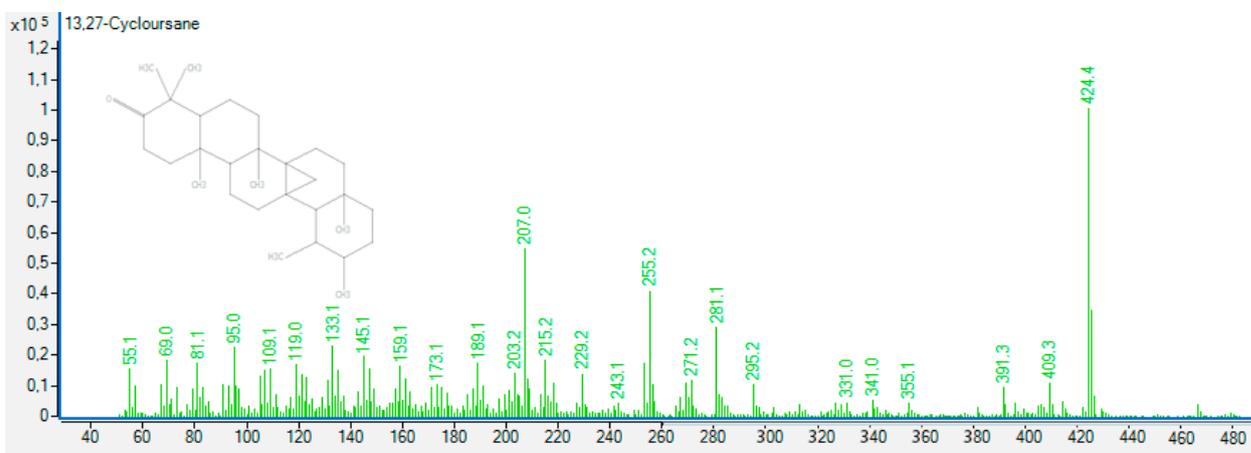
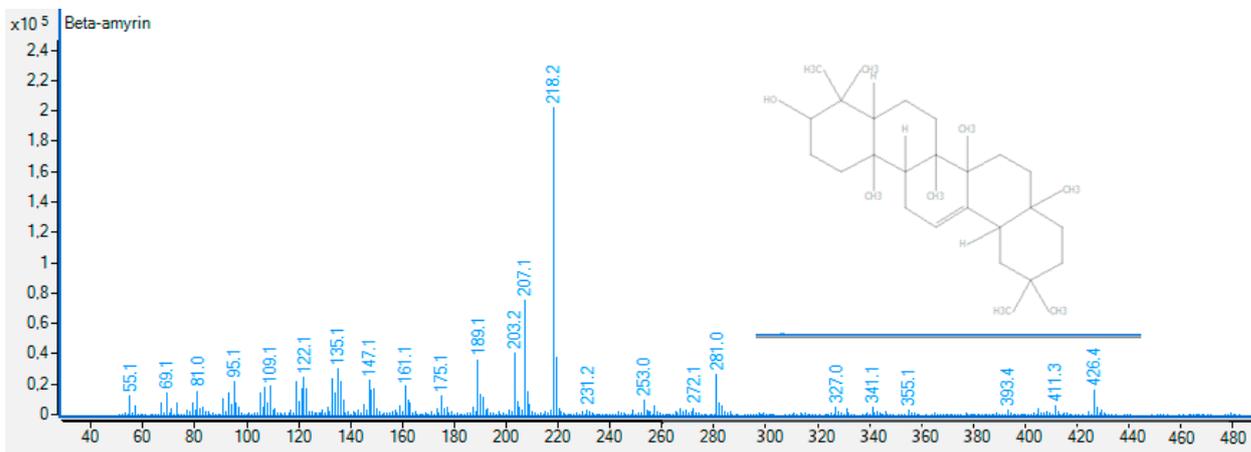


Рисунок 4.1.2.2.29 – Масс спектр Nonacosane

Рисунок 4.1.2.2.30 – Масс спектр δ – *tocopherol*Рисунок 4.1.2.2.31 – Масс спектр *Squalane*

Рисунок 4.1.2.2.34 – Масс спектр *Lupeol*Рисунок 4.1.2.2.35 – Масс спектр *Ursa – 9 (11), 12 dien – 3ol*Рисунок 4.1.2.2.36 – Масс спектр *Betulin*

Рисунок 4.1.2.2.37 – Масс спектр γ – *sitosterol*Рисунок 4.1.2.2.38 – Масс спектр 13, 27 – *cycloursane*Рисунок 4.1.2.2.39 – Масс спектр β – *amyrin*

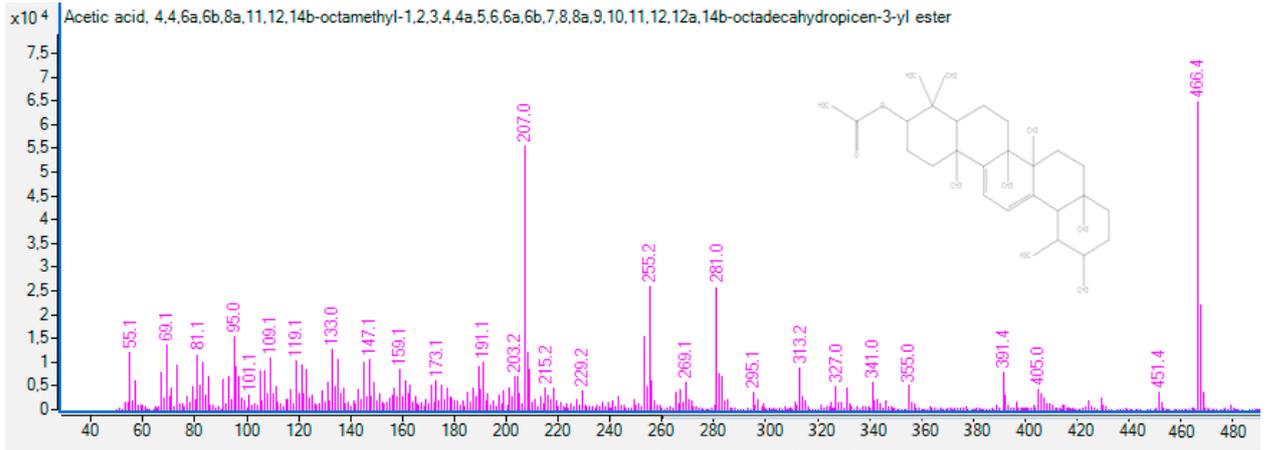


Рисунок 4.1.2.2.40 – Масс спектр *Acetic acid 4, 4, 6a, 6b, 8a, 11, 12, 14b – octamethyl – 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 14b – octa – hydricen – 3yl ester*

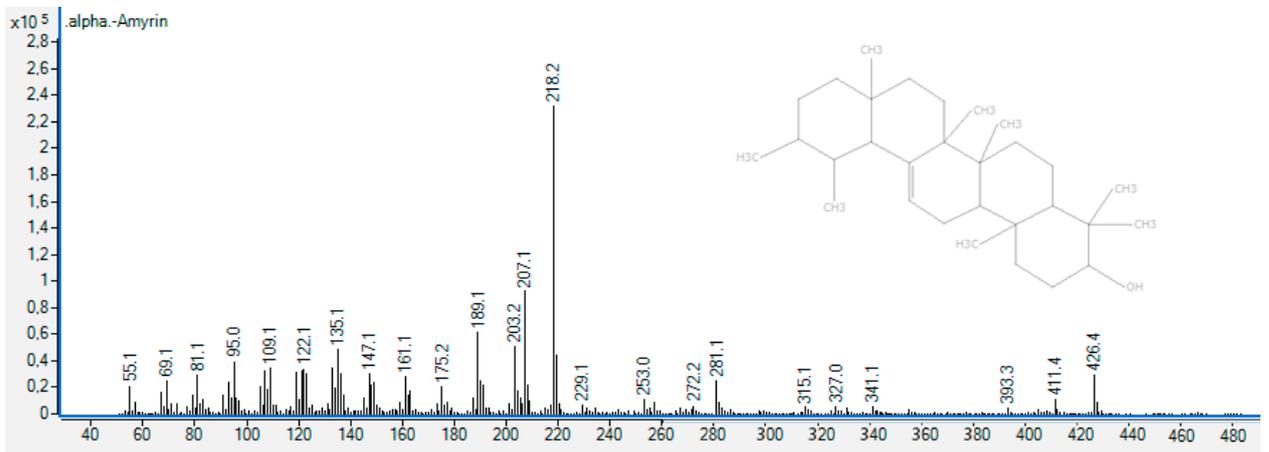


Рисунок 4.1.2.2.41 – Масс спектр *α- amyrin*

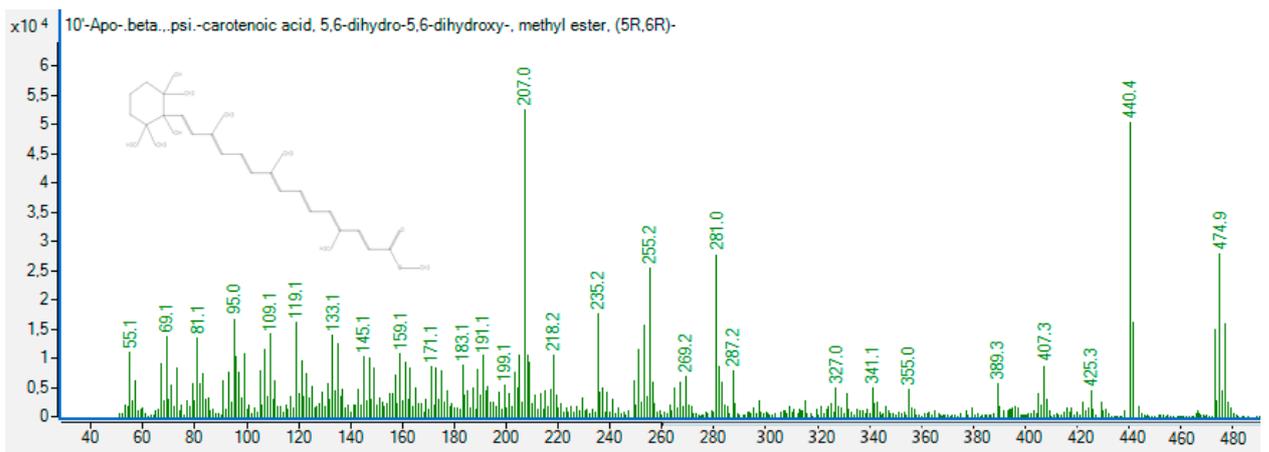
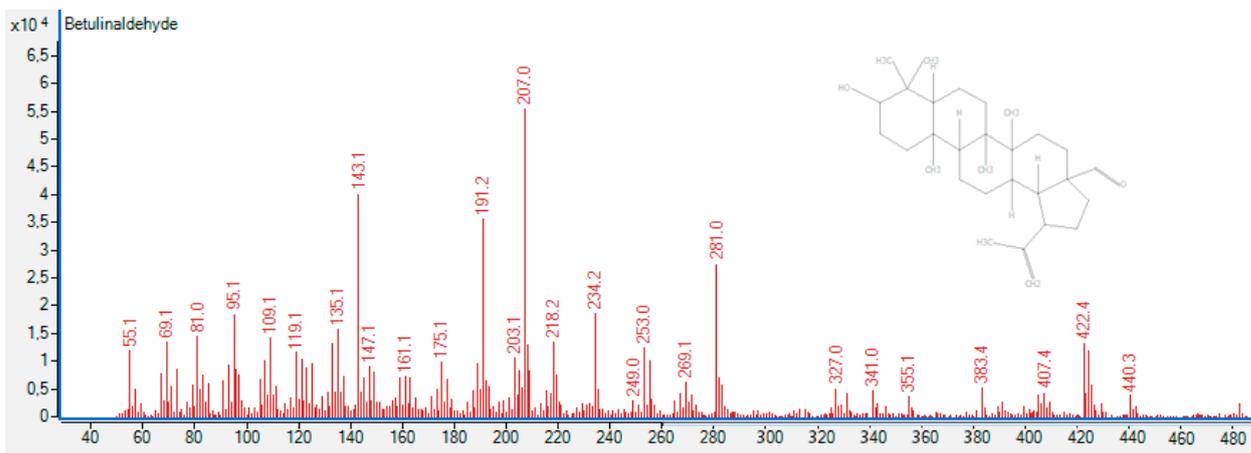
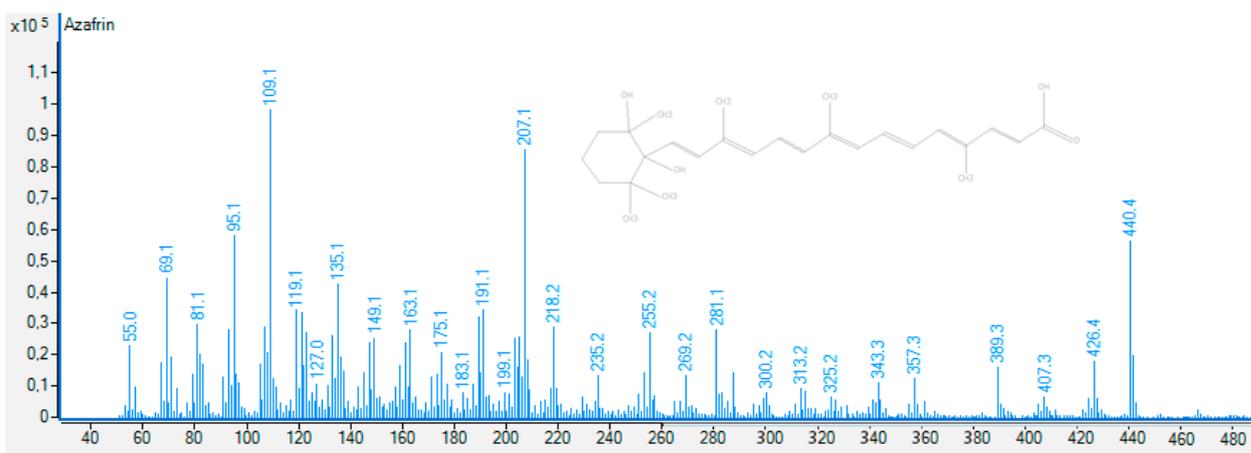
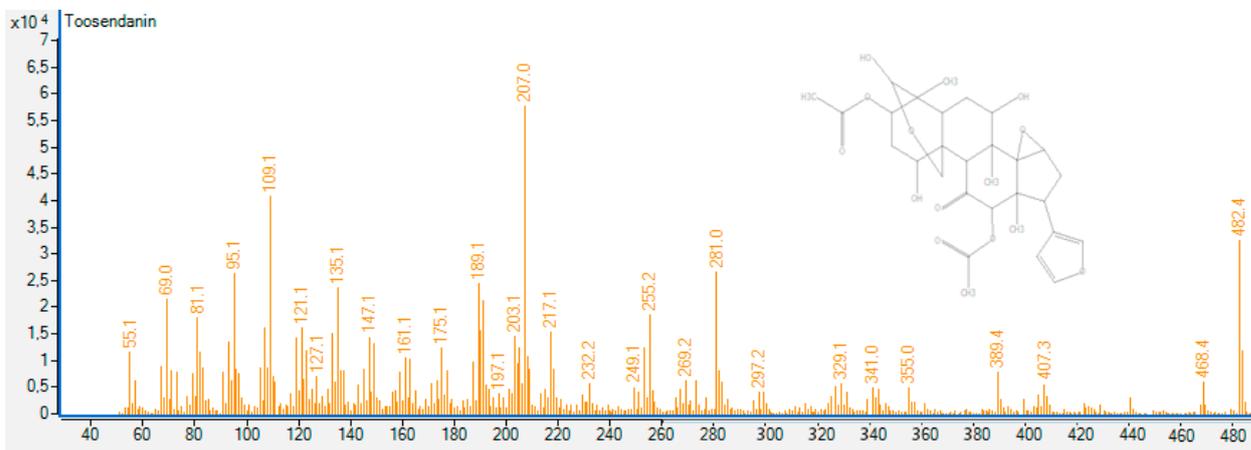
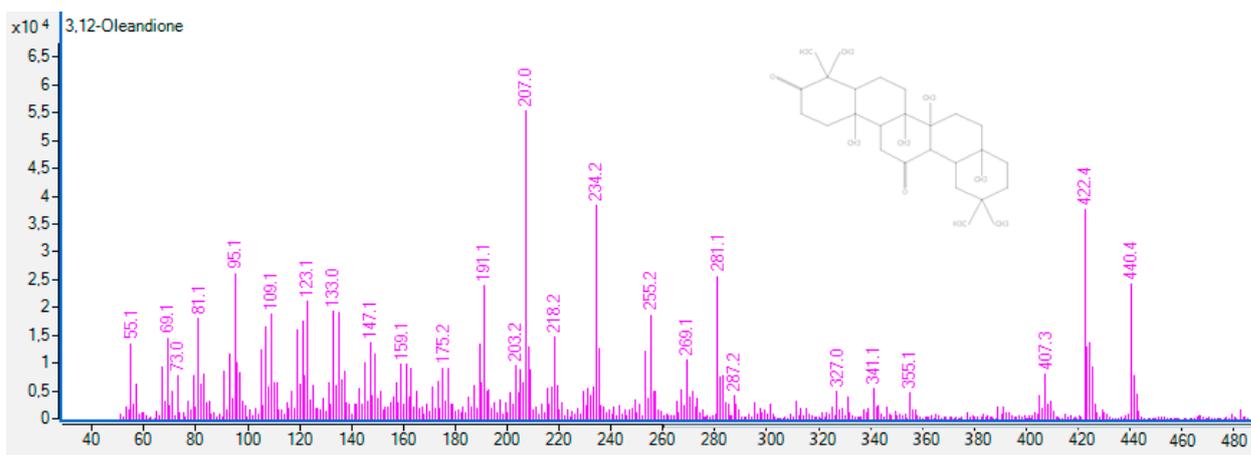
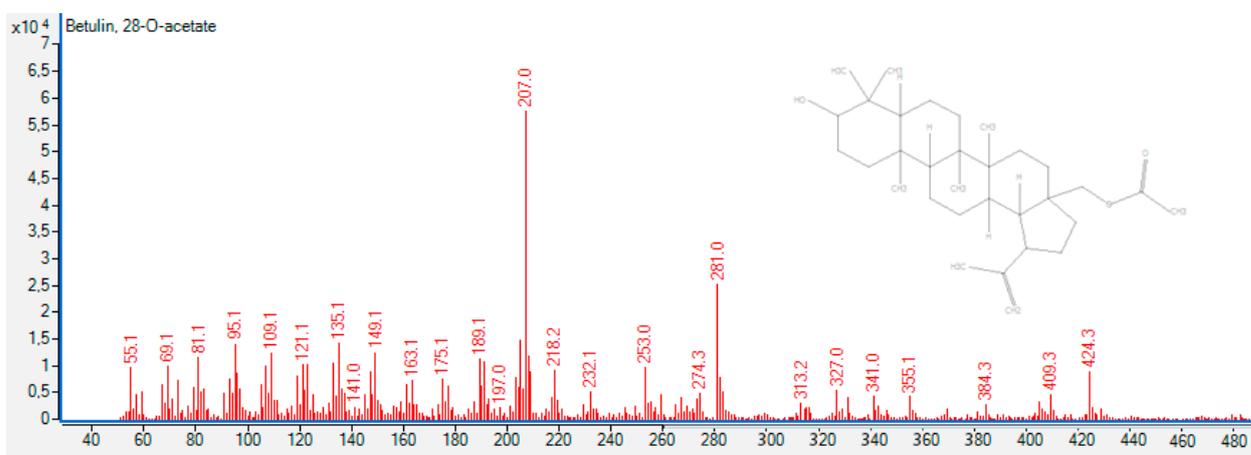


Рисунок 4.1.2.2.42 – Масс спектр *10 – apo – beta – psicaratenic acid 5, 6 – dihydroxy – methyl ester (5R, 6R)*

Рисунок 4.1.2.2.43 – Масс спектр *Betulinaldehyde*Рисунок 4.1.2.2.44 – Масс спектр *Azafrin*Рисунок 4.1.2.2.45 – Масс спектр *Toosendanin*

Рисунок 4.1.2.2.46 – Масс спектр 3, 12 *oleandione*Рисунок 4.1.2.2.47 – Масс спектр *Betulin 28 – O - acetate*

При сравнении полученных данных, оказалось, что алканы (нонакозан, тетракозан), фитостерины (γ -ситостерол), флавоноиды (лютеолин - гликозид), эфирные масла (α - пинен, эвкалиптол) встречаются во всех пробах. Самое большое количество веществ обнаружено в побегах *S. pennsylvanica*, что свидетельствует о целесообразности его дальнейшего изучения [41].

Был проведен сравнительный анализ по содержанию веществ, обладающих фармакологическими свойствами согласно таблице 4.1.2.2.2, в извлечениях сырья *S. pennsylvanica*. Мажорными компонентами в плодах в основном являются сквален, 10 – *apo – beta – psicaratenic acid* 5, 6 – *dihydroxy – methyl ester (5R, 6R)*, нанакозан, тетракозан, γ -ситостерол, лютеолин-7-О-гликозид.

В цветках *C. pennsylvanica* преобладают γ -ситостерол, α - и β -амирин, нонакозан, тетракозан, генейкозан, докозан, гентриоконтан.

В листьях *C. pennsylvanica* мажорные компоненты - γ - ситостерол, алканы нонакозан, пентакозан, гентриоконтан, тетракозан, генейкозан, сквален, токоферол, калморин, лютеолин гликозид, апигенин.

Основными веществами побегов *C. pennsylvanica* явились нонакозан, гентриоконтан, тетракозан, пентакозан, генейкозан, докозан, азафрин, *10* – *apo* – *beta* – *psicaratenic acid 5, 6* – *dihydroxy* – *methyl ester (5R, 6R)*, сквален, γ -ситостерол, лупеол, тоосенданин, α - и β -амирин, циклоурсан, лютеолин гликозид, апигинин. Извлечение побегов *C. pennsylvanica* содержит самое большее количество БАВ. Это связано, на наш взгляд, с наличием в сырье не только листьев и цветков, но и стеблей, поэтому актуально их дальнейшее изучение. При сравнении количественного состава веществ плодов, листьев, цветков и побегов, так же оказалось, что побеги содержат наибольшую концентрацию мажорных компонентов, что ещё раз доказывает актуальность изучения данного вида сырья (рисунок 4.1.2.2.5) [41].

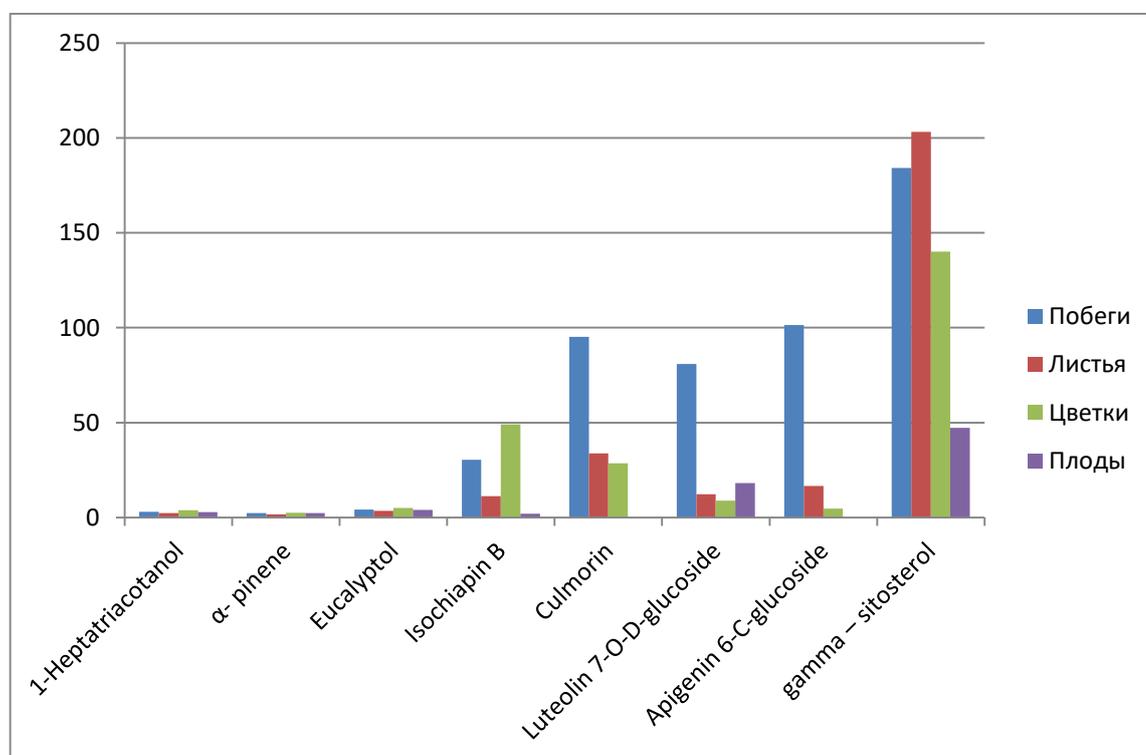


Рисунок 4.1.2.2.48 – Содержание мажорных компонентов в *C. pennsylvanica*

4.2 Количественное определение БАВ в побегах *C. pennsylvanica*

В побегах *C. pennsylvanica* по различным методикам (глава II, п. 2.2.3.2) установлено количественное содержание различных групп БАВ. Согласно полученным результатам (таблица 4.2.1), установлено, что в содержание БАВ варьирует: флавоноиды (флавонолы) – от $2,2\pm 0,05\%$ до $2,23\pm 0,09\%$, дубильные вещества – от $4,19\pm 0,05\%$ до $4,22\pm 0,02\%$, аскорбиновая кислота – от $0,28\pm 0,07\%$ до $0,30\pm 0,06\%$, процианидины – от $1,97\pm 0,03\%$ до $2,00\pm 0,02\%$, сапонины – от $1,34\pm 0,05\%$ до $1,41\pm 0,02\%$ [14, 42, 48, 50, 65, 86].

Таблица 4.2.1 - Количественное содержание некоторых групп БАВ в побегах *C. pennsylvanica*

Группа БАВ	Количественное содержание, % 2020 г.	Количественное содержание, % 2021 г.	Количественное содержание, % 2022 г.	Количественное содержание, % 2023 г.
Флавоноиды	$2,20\pm 0,05$	$2,20\pm 0,07$	$2,23\pm 0,09$	$2,21\pm 0,05$
Дубильные вещества	$4,20\pm 0,12$	$4,22\pm 0,02$	$4,19\pm 0,05$	$4,20\pm 0,04$
Аскорбиновая кислота	$0,30\pm 0,06$	$0,29\pm 0,06$	$0,30\pm 0,04$	$0,28\pm 0,07$
Процианидины	$1,97\pm 0,03$	$1,98\pm 0,05$	$2,00\pm 0,02$	$1,98\pm 0,01$
Сапонины	$1,34\pm 0,05$	$1,40\pm 0,01$	$1,36\pm 0,03$	$1,41\pm 0,02$

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. В ходе проведения тонкослойной хроматографии в побегах *C. pennsylvanica* обнаружены флавоноиды: кверцетин, рутин, гиперозид, лютеолин, витексин, лютеолин-7-О-гликозид; гидроксикоричные кислоты: кофейная, синаповая, хлорогеновая; сапонины: урсоловая и олеаноловая кислоты.
2. Методом газовой хроматографии масс-спектрометрии в липофильных фракциях *C. pennsylvanica* идентифицировано 76 веществ в побегах, 36 веществ в листьях, 32 вещества в цветках и 18 веществ в плодах *C. pennsylvanica*, проведена сравнительная характеристика мажорных компонентов, а так же литературный обзор фармакологических свойств обнаруженных соединений.
3. Установлено содержание основных групп биологически активных веществ: флавоноидов, дубильных веществ, процианидинов, сапонинов и кумаринов.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ *CRATAEGUS PENNSYLVANICA* ASHE

5.1 Стандартизация цветков и плодов *C. pennsylvanica*

Проверку на пригодность плодов и цветков *C. pennsylvanica* в качестве производного растения проводили методом определения качественного и количественного определения флавоноидов, согласно ОФС.2.5.0061.18 «*Боярышника плоды*» и ОФС.2.5.0062.18 «*Боярышника цветки*».

Для качественного определения использованы спиртовые экстракты плодов и цветков *C. pennsylvanica*. Стандартный образец гиперозида и испытуемый раствор плодов хроматографировали на пластинке Сорбфил в системе этилацетат - ацетон - толуол - муравьиная кислота – вода (20:10:10:5:5). После высыхания пластинку опрыскивали 1% спиртовым раствором дифенилборилоксиэтиламина и 5% спиртовым раствором полиэтиленгликоля, выдерживали при температуре 100-105°C в течении 1-3 минут в сушильном шкафу и просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора наблюдали зону флуоресценции желтого цвета на уровне зоны СО гиперозида; зону флуоресценции синего цвета выше уровня зоны СО гиперозида, а также зоны флуоресценции голубого и желто - зеленого цвета ниже уровня СО гиперозида (рисунок 5.1.1) [46, 52].

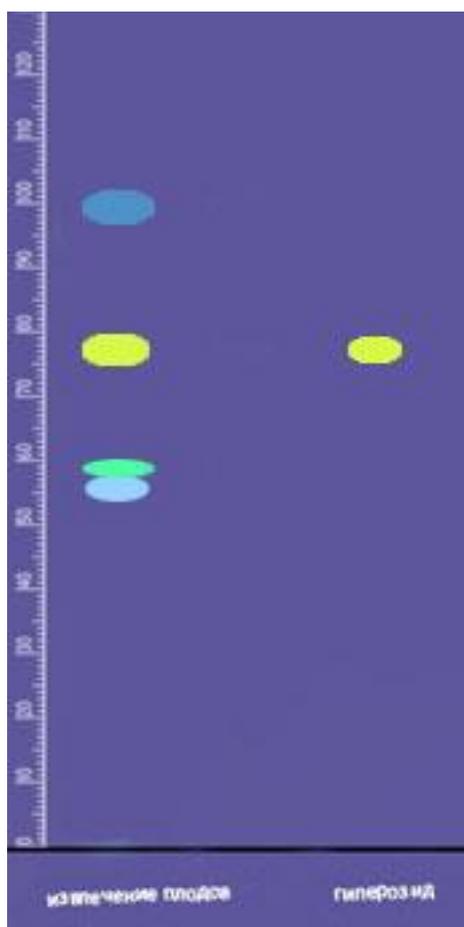


Рисунок 5.1.1 – Хроматограмма спиртового раствора плодов *C. pennsylvanica*

Для качественного определения флавоноидов в цветках боярышника на пластинку Сорбфил наносили СО гиперозида, кверцетина, рутина и исследуемый раствор. Хроматографирование проводили в системе этилацетат – бутанон-2 – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5), после проводили обработку 1% спиртовым раствором дифенилборолоксиптиламина и 5% спиртовым раствором полиэтиленгликоля, выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течении 2-5 минут и просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме наблюдали зону флуоресценции оранжевого цвета на уровне адсорбции СО кверцетина; две зоны флуоресценции желтого цвета, одна из которых на уровне адсорбции СО гиперозида, а другая выше него; зона флуоресценции желтого цвета на уровне адсорбции СО рутина; ниже уровня адсорбции СО гиперозида уровень флуоресценции голубого цвета и

ниже уровня адсорбции СО кверцетина уровень флуоресценции синего цвета (рисунок 5.1.2).

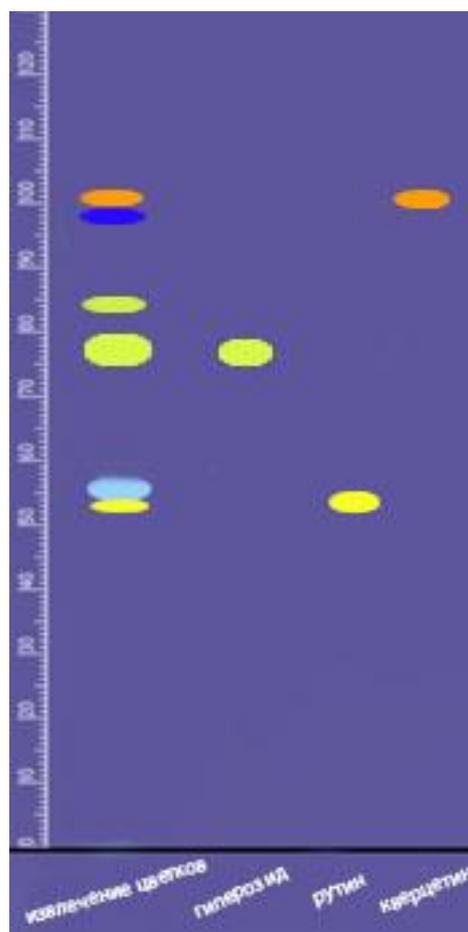


Рисунок 5.1.2 – Хроматограмма спиртового извлечения цветков *C. pennsylvanica*

Для количественного определения флавоноидов в плодах боярышника пенсильванского использовали спектрофотометрический метод. Сумма флавоноидов была извлечена 96% этиловым спиртом (точная навеска сырья 5,0 г), 10 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу на 25 мл, к нему прибавляли 6 мл раствора алюминия хлорида 2% (спиртового) и доводили до метки этиловым спиртом 96%. Измеряли УФ-спектр полученного раствора в интервале с 350 до 450 нм, чтобы узнать максимум поглощения, он составил 410 ± 2 нм. Процентное содержание флавоноидов в плодах составило $0,053 \pm 0,002\%$. Сумма флавоноидов в плодах *C. pennsylvanica* в пересчете на гиперозид удовлетворяет требования ГФ РФ XIV(ФС.2.3.0061.18), так как показания не меньше 0,04% [46, 52].

Для количественного определения флавоноидов в цветках боярышника пенсильванского использовали метод тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Для исследования сумму флавоноидов извлекали 96% спиртом (точная навеска сырья 2,0 г) на водяной бане с обратным холодильником, упаривали и хроматографировали на пластинках Сорбфил с СО гиперозида. Отметили зоны адсорбции гиперозида на хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО гиперозида, вырезали их и извлекали смесью диоксан-вода (1:1). К извлечениям добавляли спиртовой раствор 2% алюминия хлорида и измеряли УФ-спектр в интервале с 350 до 450 нм. Максимум поглощения составил 410 ± 2 нм. После проведенных расчетов сумма флавоноидов в цветках *C. pennsylvanica* в пересчете на гиперозид составляет $0,64 \pm 0,003\%$ и удовлетворяет требованиям ГФ РФ XIV (ФС.2.3.0061.18), так как процентное содержание не менее 0,5% [52].

Таким образом, качественное и количественное содержание БАВ в цветках и плодах *C. pennsylvanica* удовлетворяют требованиям ГФ РФ XIV.

5.2 Разработка методики качественного анализа флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica*

В настоящее время для проведения качественного анализа растительного сырья чаще всего используется тонкослойная хроматография. После проведения серии ТСХ анализов, которые описаны в главе IV, были выбраны наилучшие условия для определения подлинности в побегах *C. pennsylvanica*. В качестве системы растворителей выбрана система, в которой наблюдалось лучшее разделение веществ. В качестве стандартных образцов для определения флавоноидов предлагается применение стандартных образцов гиперозида, рутина и кверцетина.

Методика ТСХ-анализа флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica*

1,0 г сырья добавляют 50 мл 80 % этилового спирта и выдерживают на кипящей водяной бане с обратным холодильником 30 минут. 0,02 мл полученного извлечения и по 0,02 мл 0,05% СО гиперозида, рутина и хлорогеновой кислоты наносят с использованием капилляра на линию старта пластинки марки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «Имид», г. Краснодар). Далее хроматографическую пластинку подсушивают и хроматографируют восходящим способом в стеклянной камере в системе этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5). После прохождения растворителя около 11-12 см, пластинку вынимают, подсушивают и опрыскивают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, полученную хроматограмму просматривают в УФ-свете при 365 нм. На хроматограмме должны быть видны 6 основных зон: зона флуоресценции желтого цвета на уровне адсорбции СО рутина; две зоны флуоресценции желтого цвета, одна из которых на уровне адсорбции СО гиперозида, а другая ниже него; зона флуоресценции светло-голубого цвета на уровне адсорбции СО хлорогеновой кислоты; ниже уровня адсорбции СО гиперозида уровень флуоресценции сине-зеленого цвета и ниже уровня адсорбции СО хлорогеновой кислоты уровень флуоресценции оранжевого цвета (таблица 5.2.1, рисунок 5.2.1).

Таблица 5.2.1 - Данные хроматограммы извлечения побегов *C. pennsylvanica* и растворов СО гиперозид, рутин и хлорогеновой кислоты в системе № 1

Зоны	R _f	Цвет зон в <u>УФ-свете</u>
Рутин	0,45±0,02	желтый
Гиперозид	0,71±0,03	желтый
Зона 1	0,76±0,01	желтый
Зона 2	0,88±0,04	сине-зеленый
Хлорогеновая кислота	0,89±0,03	светло-голубой
Зона 3	0,92±0,04	оранжевый

Верх хроматографической пластинки	
Хлорогеновая кислота (Флуоресцирующая зона светло-голубого цвета)	Флуоресцирующая зона оранжевого цвета (вещество 3)
	Флуоресцирующая зона светло-голубого цвета (хлорогеновая кислота)
	Флуоресцирующая зона сине-зеленого цвета (вещество 2)
	Флуоресцирующая зона желтого цвета (вещество 1)
Гиперозид (Флуоресцирующая зона желтого цвета)	Флуоресцирующая зона желтого цвета (гиперозид)
Рутин (Флуоресцирующая зона желтого цвета)	Флуоресцирующая зона желтого цвета (рутин)
Растворы сравнения	Испытуемый раствор

Рисунок 5.2.1 - Схема хроматограммы извлечения побегов *C. pennsylvanica* в системе № 1

Примечание:

1. *Подготовка пластинок.* Пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ вырезают размером 14×10 см, активируют перед использованием в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 часа и наносят линию старта на расстоянии 1 см от края.
2. *Приготовление системы растворителей для хроматографирования.* Для проведения ТСХ используется система растворителей: этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5)
3. *Приготовление 3% спиртового раствора алюминия хлорида:* 5,4 г алюминия хлорида 6-водного вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 80 мл 95 % этилового спирта, растворяют при нагревании и доводят этиловым спиртом до метки.
4. *Приготовление стандартных образцов.* Готовят 0,05% спиртовые растворы СО рутина, гиперозида и хлорогеновой кислоты с использованием 95% этилового спирта.

5.3 Разработка методики качественного анализа сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*

После проведения серии ТСХ анализа, который описаны в главе IV, были выбраны наилучшие условия для определения сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*. В качестве системы растворителей выбрана система, в которой наблюдалось лучшее разделение веществ. В качестве стандартных образцов для определения сапонинов предлагается применение стандартных образцов олеаноловой и урсоловой кислот.

Методика ТСХ-анализа сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*

0,02 мл извлечения, полученного для количественного определения сапонинов, и по 0,02 мл 0,05% растворов СО олеаноловой кислоты и

урсоловой кислоты наносят с использованием капилляра на линию старта пластинки марки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «Имид», г. Краснодар). Далее хроматографическую пластинку подсушивают и опускают в стеклянную камеру, наполненную системой: хлороформ – метанол – вода (26:14:3) [39]. Хроматографию проводят восходящим способом. После прохождения растворителя около 11-12 см, пластинку вынимают, подсушивают, обрабатывают 20% серной кислотой и нагревают в сушильном шкафу при 105 °С. Наблюдают появление розовых пятен при дневном свете, далее просматривают полученную хроматограмму в УФ-свете при 365 нм, наблюдают 3 основные зоны, 2 из которых должны быть на уровне зон стандартных образцов олеаноловой и урсоловой кислот (рисунок 5.3.1., таблица 5.3.1.).

Таблица 5.3.1 - Данные хроматограммы извлечения побегов *C. pennsylvanica* и растворов СО олеаноловой и урсоловой кислот в системе № 9

Зоны	R _f	Цвет зон в <u>УФ-свете</u>
Олеаноловая кислота	0,68±0,03	Светло-желтый
Урсоловая кислота	0,40±0,01	Оранжевый
Зона 1	0,14±0,01	Кирпично-красный

Верх хроматографической пластинки	
Олеаноловая кислота (флуоресцирующая зона светло – желтого цвета)	Флуоресцирующая зона светло – желтого цвета (олеаноловая кислота)
Урсоловая кислота (флуоресцирующая зона оранжевого цвета)	Флуоресцирующая зона оранжевого цвета (урсоловая кислота)
	Флуоресцирующая зона кирпично-красного цвета (вещество 1)
Растворы сравнения	Испытуемый раствор

Рисунок 5.3.1 - Схема хроматограммы извлечения побегов *C. pennsylvanica* в системе № 9

Примечание:

1. *Подготовка пластинок.* Пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ вырезают размером 14×10 см, активируют перед использованием в сушильном шкафу при 100-105 °С в течение 1 часа и наносят линию старта на расстоянии 1 см от края.
2. *Приготовление системы растворителей для хроматографирования.* Для проведения ТСХ используется система растворителей: хлороформ – метанол – вода (26:14:3).
3. *Приготовление раствора проявителя.* Для приготовления 20% серной кислоты нужно взять 13 мл концентрированной серной кислоты и разбавить водой в мерной колбе до 100 мл.
4. *Приготовление стандартных образцов.* Готовят 0,05% спиртовые растворы олеаноловой кислоты и урсоловой кислоты с использованием 96% этилового спирта.

5.4 Валидационная оценка методики количественного анализа флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica*

Для выбора методики количественного определения флавоноидов был измерен УФ-спектр спиртового извлечения побегов *C. pennsylvanica* и раствор СО гиперозида, максимумы поглощения их не совпали. После добавления спиртового раствора хлорида алюминия в УФ-спектрах наблюдалось bathochrome смещение полос поглощения и максимумы поглощения сместились в видимую область спектра и совпали при 410 нм (рисунок 5.4.1)

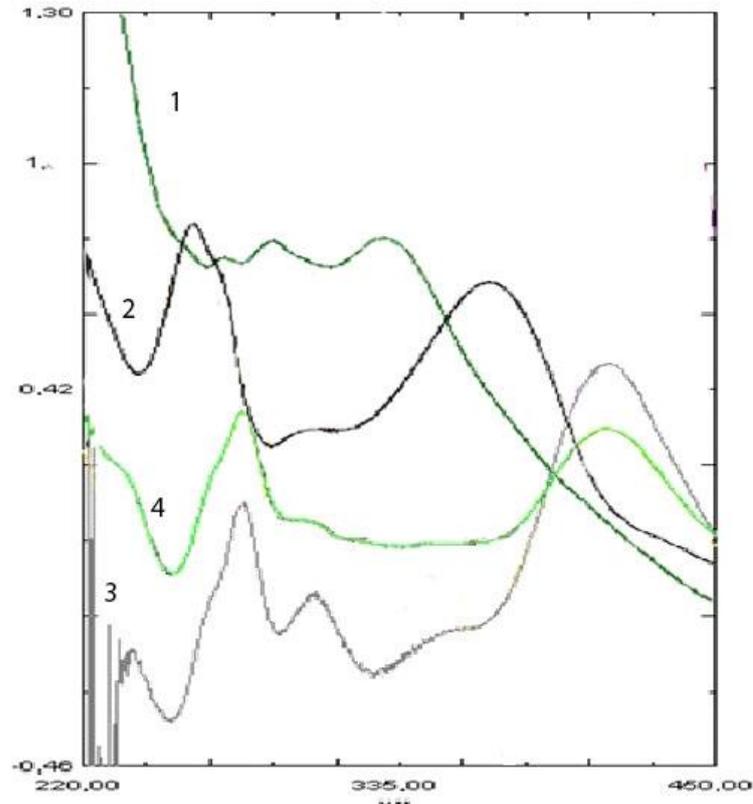


Рисунок 5.4.1 - Спектры поглощения спиртового раствора побегов *C. pennsylvanica* (1); раствор СО гиперозида (2); спиртового раствора побегов *C. pennsylvanica* с добавлением раствора алюминия хлорида (3); раствор СО гиперозида с добавлением раствора алюминия хлорида (4)

Затем была исследована экстракционная способность этилового спирта различных концентраций 60%, 70%, 80%, 90% и 96% (рисунок 5.4.2), максимальная экстракция флавоноидов достигается при концентрации 80% этилового спирта.

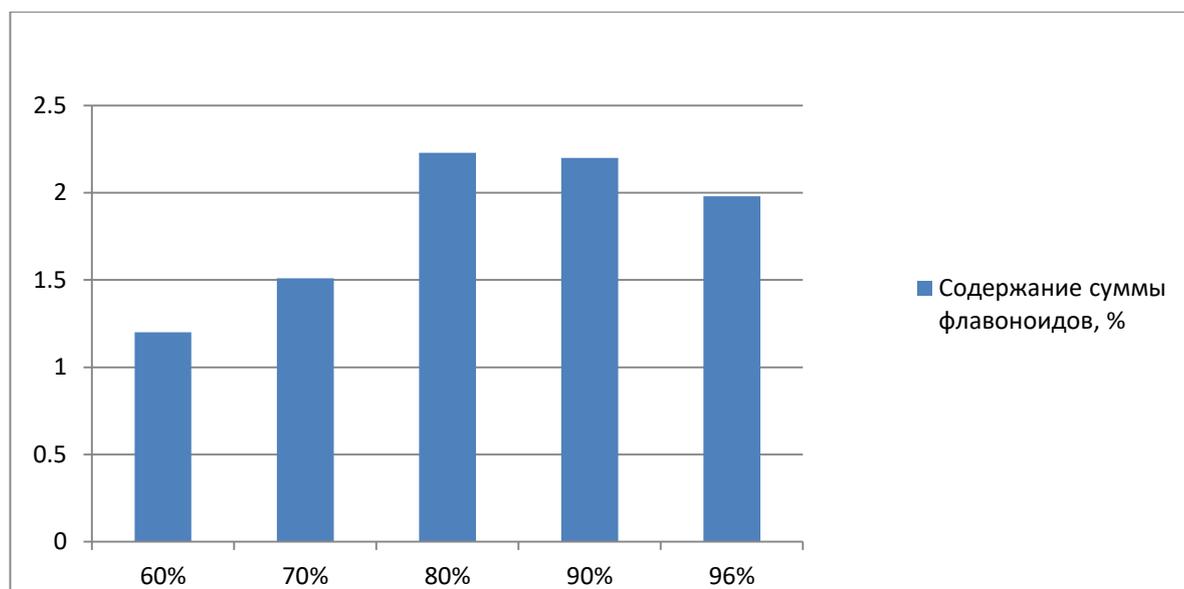


Рисунок 5.4.2 - Содержание суммы флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica*, полученных с использованием различных концентрации этилового спирта

На основании этого в качестве методики количественного анализа флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica* выбрана методика, предложенная для количественной оценки флавоноидов в побегах *C. submollis* [21]:

1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих через сито №2, вносят в колбу объемом 250 мл, добавляют 50 мл 80 % этилового спирта и выдерживают на кипящей водяной бане с обратным стеклянным холодильником 30 минут. После первое извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 100 мл, наблюдая за тем, чтобы сырье не попало в фильтрат. Далее проводят вторичную экстракцию - оставшееся сырье в колбе опять заливают 50 мл этилового спирта используемой концентрации и снова нагревают на кипящей водяной бане с обратным стеклянным холодильником еще раз 30 минут. Потом колбу со вторым извлечением охлаждают и фильтруют в ту же мерную колбу на 100 мл, объединяя с первым извлечением. К сырью, которое осталось в термостойкой стеклянной колбе, добавляют 20 мл этилового спирта той же концентрации, ополаскивают сырье и фильтруют в ту же мерную стеклянную колбу. Потом

после данных манипуляций, полученное извлечение доводят до метки (раствор А).

Для приготовления раствора В берут мерную колбу на 25 мл, прибавляют туда 2 мл полученного извлечения (раствор А), 2 мл 3% спиртового раствора хлорида алюминия и 0,1 мл 30% уксусной кислоты. Полученный раствор перемешивают и доводят до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Измерение оптической плотности раствора В проводят через 45 минут на спектрофотометре при длине волны 410 нм с использованием стеклянной кюветы 10 мм. Раствором сравнения является смесь, которая состоит из 2 мл раствора А, 0,1 мл 30 % раствора уксусной кислоты. Ее готовят в мерной колбе на 25 мл и доводят этиловым спиртом, который используют для приготовления раствора В.

Концентрацию содержания суммы флавоноидов (X) в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{380 \times m \times 2 \times (100 - W)} \quad (1), \text{ где}$$

A - оптическая плотность анализируемого раствора (раствор В);

380 - удельный показатель поглощения гиперозида с алюминия хлоридом;

m - навеска сырья в граммах;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %.

Было исследовано 5 серий опытов (таблица 5.4.1), в каждой серии по 5 навесок сырья, и процентное содержание флавоноидов в различных сериях составило от $2,09 \pm 0,06\%$ до $2,34 \pm 0,06\%$.

Таблица 5.4.1 - Количественное содержание флавоноидов, %

№ серии	Количественное содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид, %
1	2,34±0,06
2	2,15±0,10
3	2,21±0,02
4	2,20±0,03
5	2,09±0,06

Статистическая обработка результатов проводилась для каждой серии экспериментов (таблица 5.4.2).

Таблица 5.4.2 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica*

№ серии	n	X _{ср}	P	t (p,f)	S _x	ε _а	ε%
1	5	2,34	0,95	2,776	0,02	0,06	2,57
2	5	2,15	0,95	2,776	0,03	0,10	4,73
3	5	2,21	0,95	2,776	0,01	0,02	0,95
4	5	2,20	0,95	2,776	0,01	0,03	1,72
5	5	2,09	0,95	2,776	0,02	0,06	3,32

После обработки статистических данных (таблица 5.4.2) погрешность эксперимента в серии колеблется от 0,95% до 4,73%, что доказывает достоверность полученных результатов.

Валидационную оценку данной методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность [18].

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов. Для её определения был снят УФ – спектр спиртового извлечения побегов *C. pennsylvanica* и спиртового раствора СО гиперозида с добавлением раствора алюминия хлорида в оба раствора (рисунок 5.4.3). Максимумы поглощения совпали при длине волны 410 нм, что доказывает специфичность данной методики.

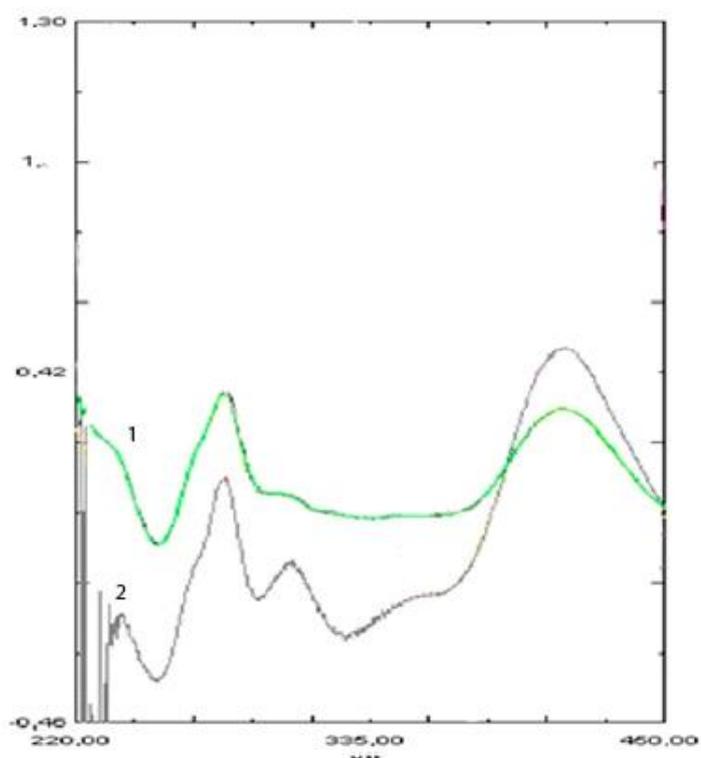


Рисунок 5.4.3 – 1- УФ-спектр спиртового раствора побегов *C. pennsylvanica* с добавлением раствора алюминия хлорида, 2 - раствор СО гиперозида с добавлением раствора алюминия хлорида

Линейность – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для его определения готовили 5 концентраций флавоноидов (от 60% до 140%) в

пересчете на гиперозид от теоретического содержания в побегах *S. pennsylvanica* (таблица 5.4.3).

Таблица 5.4.3- Определение линейности

№	Содержание, %	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность	Содержание сапонинов, в пересчете на гиперозид, мг
1.	60	1,2	0,372	1,325
2.	80	1,6	0,496	1,767
3.	100	2,0	0,621	2,213
4.	120	2,4	0,745	2,655
5.	140	2,8	0,869	3,097

Для подтверждения линейности разработанной методики, необходимо рассчитать коэффициент корреляции. Данный коэффициент стремится к 1 и его размер должен быть не меньше 0,99. В нашем случае, данный коэффициент составил 0,9998 (рисунок 5.4.4, таблица 5.4.4), что является доказательством о линейности разработанной методики.

Рисунок 5.4.4 - Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов в исследуемом растворе

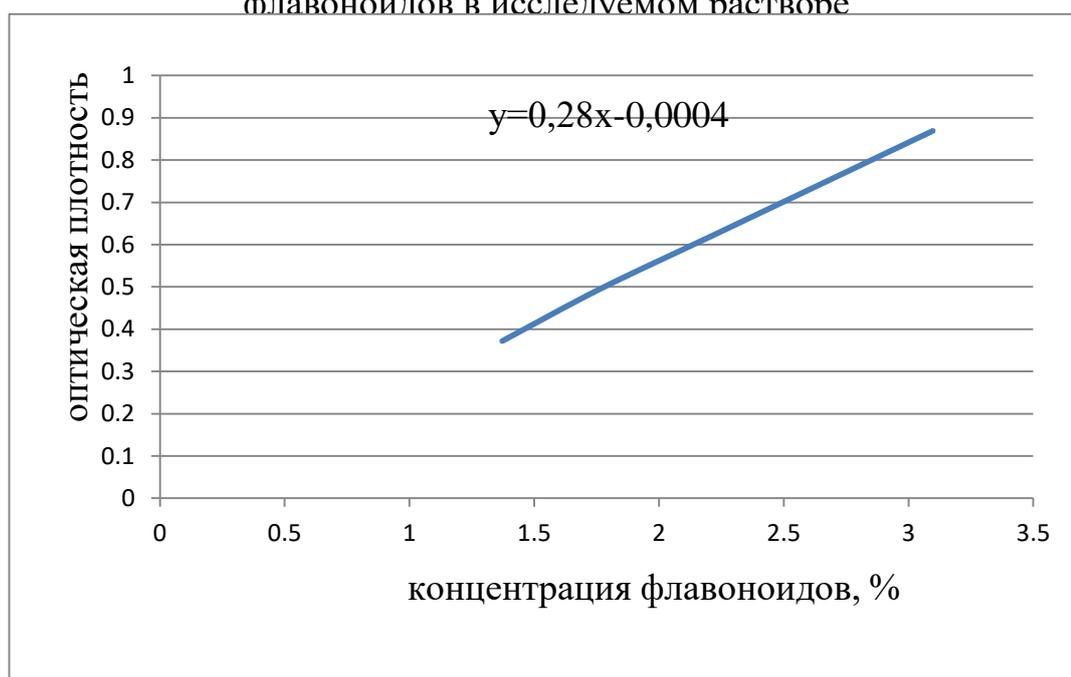


Таблица 5.4.4 - Данные для вычисления коэффициента корреляции

X	Y	XY	X ²	Y ²
1,325	0,372	0,4929	1,7556	0,1384
1,767	0,496	0,8764	3,1223	0,2461
2,213	0,621	1,3743	4,8974	0,3856
2,655	0,745	1,9780	7,0490	0,5550
3,097	0,869	2,6913	9,5914	0,7552
$\Sigma X=11,057$	$\Sigma Y=3,103$	$\Sigma XY=7,4129$	$\Sigma X^2=26,4157$	$\Sigma Y^2= 2,0803$
Коэффициент корреляции	0,9998			

Повторяемость методики определяли измеряя оптическую плотность 9 аликвот (получали извлечения из 3 образцов сырья в 3 повторностях). Затем вычисляется относительное стандартное отклонение, в данном случае это критерий приемлемости воспроизводимости методики. Для повторяемости

данный показатель должен быть не более 10%, по данным таблицы 5.4.5 он составил 2,87%, что свидетельствует о прецизионности методики.

Таблица 5.4.5- Данные по определению повторяемости методики

№ пробы	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в побегах <i>C. pennsylvanica</i> , %
1	2,30
2	2,31
3	2,39
4	2,24
5	2,26
6	2,27
7	2,28
8	2,30
9	2,29
Среднее значение	2,35
Относительное стандартное отклонение	2,87%

Следующий критерий – воспроизводимость определяется следующим образом: разрабатываемую методику определения проводят два исследователя, на двух проверенных приборах – спектрофотометрах, в двух независимых лабораториях (таблица 5.4.6). Для определения является ли методика воспроизводимой, рассчитывали относительное стандартное отклонение. Он должен быть не более 15%. Данный показатель находился в пределах от 0,782 % до 1,470%. Исходя из полученных данных, можно судить о выполнении условия данного критерия.

Таблица 5.4.6 - Данные по определению воспроизводимости методики

Повторность	Аналитик	Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид в побегах <i>C. pennsylvanica</i> , %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	1	2,30	2,31	2,26
2	1	2,26	2,29	2,27
3	1	2,29	2,30	2,28
4	2	2,21	2,23	2,23
5	2	2,22	2,22	2,24
6	2	2,22	2,23	2,22
Среднее значение		2,25	2,28	2,25
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		1,32	1,47	0,78

Для определения следующего критерия валидации - правильности, к извлечениям добавляли раствор стандартного образца с известной концентрацией, в данном случае гиперозида. Далее проводили расчет ожидаемой и фактически полученной концентрации флавоноидов в сырье и рассчитывали относительное стандартное отклонение, которое является критерием приемлемости разработанной методики. Он был в пределах от 99,78% до 100,12% (таблица 5.4.7), что свидетельствует о правильности использованной методики.

Таблица 5.4.7 - Определение правильности методики

Объем аликвоты, мл	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид, мг	Добавлено СО гиперозида, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %
1,6	1767,48	1,5	1768,98	1765,23	-3,75 (99,78%)
2,0	2212,98	1,5	2214,48	2215,28	0,8 (100,03%)
2,4	2651,35	1,5	2652,85	2656,21	3,36 (100,12%)

Проведенные исследования доказывают, что этот метод высокоточен в соответствии со всеми критериями проверки, и что его можно использовать для количественного определения флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica*.

5.5 Разработка методики количественного анализа сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*

5.5.1 Выбор метода количественного определения

Согласно литературным данным количественное определение сапонинов чаще всего проводят по следующим сапонинам: олеаноловая кислота, урсоловая кислота, эсцин [29, 36, 86]. Во всех данных статьях используется спектрофотометрический метод.

При изучении УФ-спектральных характеристик извлечений из побегов *C. pennsylvanica* выявлено, что именно урсоловая кислота определяет

характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из побегов *C. pennsylvanica* (рисунок 5.5.1.1). Изучение УФ-спектров спирто-ацетоновых извлечений из побегов *C. pennsylvanica* показало максимум собственного поглощения сапонинов 214 ± 2 нм. Спирто-ацетоновый раствор стандартного образца урсоловой кислоты так же имеет максимум поглощения при 214 ± 2 нм. Максимумы поглощения исследуемого извлечения из побегов боярышника пенсильванского и раствора стандартного образца урсоловой кислоты совпадают, что делает целесообразным проведение пересчета суммы сапонинов на урсоловую кислоту при использовании метода прямой спектрофотометрии. Данный факт позволяет также проводить спектрофотометрическое определение суммы сапонинов в побегах *C. pennsylvanica* при длине волны равной 214 ± 2 нм. За основу разработанной методики был взят количественный метод определения сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту [36, 65].

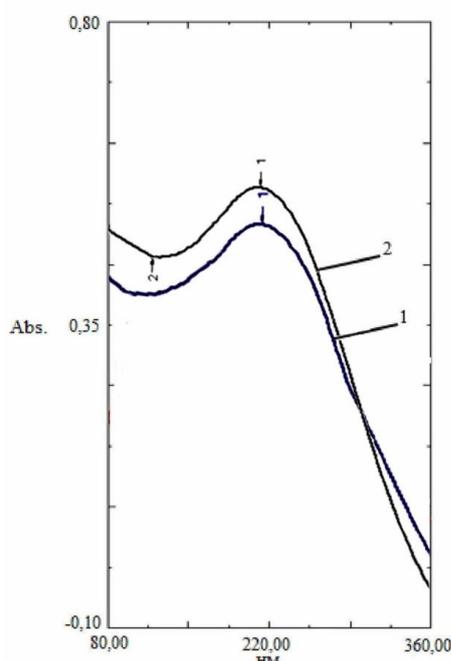


Рисунок 5.5.1.1 - УФ-спектр: 1 – извлечение побегов боярышника пенсильванского, 2 – раствор урсоловой кислоты

5.5.2 Выбор условий экстракции

Одним из важнейших этапов разработки методики количественного определения является выбор условий экстракции. Сюда относится выбор экстрагента, его концентрация, измельченность сырья, время и количество экстракции, соотношение сырья и экстрагента [4].

Согласно выбранной методике [36], экстрагентом является смесь 70% этилового спирта с ацетоном. Проведен подбор оптимального соотношения компонентов экстрагента, результаты которого представлены на рисунке 5.5.2.1. Наибольшая оптическая плотность была при использовании экстрагента 70% этиловый спирт:ацетон в соотношении 1:3.

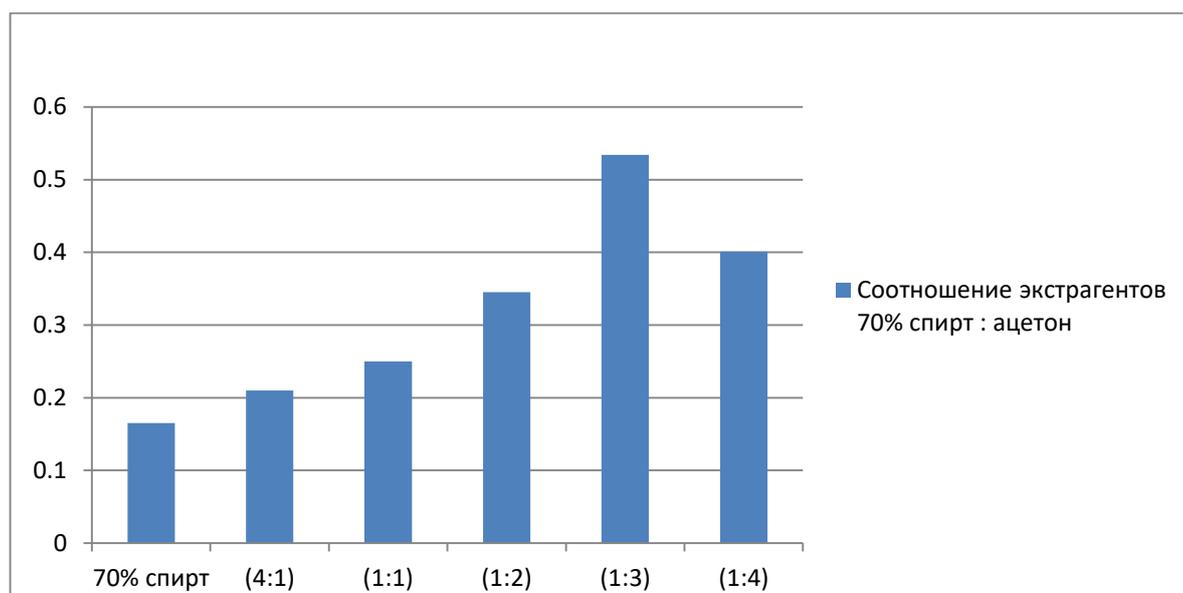


Рисунок 5.5.2.1 - Оптическая плотность извлечений побегов *C. pennsylvanica*, полученных с использованием различных соотношений компонентов экстрагента

Извлечение веществ из сырья зависит от измельченности сырья. Чем мельче размеры частиц, тем больше поверхности соприкосновения и тем быстрее происходит процесс, но при этом могут выделяться сопутствующие вещества, которые образуют студенистую массу и замедляют выход действующих компонентов.

Для определения оптимального размера частиц, использовали сырье, которое проходит через сито с размерами отверстия 1, 2, 3, 4, 5 мм и определяли оптическую плотность в полученных извлечениях. По результатам, представленным в таблице 5.5.2.1, оптимальной является размер частиц сырья, проходящих через сито с отверстиями диаметром 2 мм.

Таблица 5.5.2.1 - Количественное содержание сапонинов в побегах *S. pennsylvanica* с использованием различной степени измельченности

№	Размер отверстий сита	Содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту, %
1	1 мм	1,24±0,01
2	2 мм	1,40±0,03
3	3 мм	1,25±0,01
4	4 мм	1,03±0,04
5	5 мм	1,06±0,02

Переход биологически активных веществ происходит по закону диффузии. Был проведен подбор времени экстракции и кратности. От этих двух параметров зависит общее время анализа. Согласно данным таблицы 5.5.2.2 и 5.5.2.3 минимальное время, при котором происходит максимальный выход сапонинов - равен 45 минутам и достаточно однократной экстракции.

Таблица 5.5.2.2 - Влияние времени экстракции на выход сапонинов в побегах
C. pennsylvanica

№	Время экстракции, мин	Содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту, %
1	30	1,32±0,04
2	45	1,41±0,02
3	60	1,40±0,02
4	75	1,40±0,01
5	90	1,39±0,03

Таблица 5.5.2.3 - Влияние кратности экстракции на выход сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*

№	Количество экстракции	Содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту, %
1	1	1,42±0,01
2	2	1,40±0,03
3	3	1,41±0,01

Далее определяли количество сырья и экстрагента в соотношениях 1:50, 1:100, 1:150. По результатам анализа таблицы 5.4.2.4 наилучшее извлечение сапонинов происходит в соотношении 1:100.

Таблица 5.5.2.4 - Содержание сапонинов в зависимости от соотношения сырья и экстрагента в побегах *C. pennsylvanica*

№	Соотношение сырья и экстрагента	Содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту, %
1	1:50	1,07±0,04
2	1:100	1,40±0,02
3	1:150	1,38±0,02

Таким образом, на основании всех проведенных исследований можно составить методику количественного определения сапонинов в побегах *C. pennsylvanica* в пересчете на урсоловую кислоту и абсолютно сухое сырье:

побеги *C. pennsylvanica* измельчают до размера частиц, проходящие через сито № 2. В колбу объемом 50 мл вносят 0,1 г сырья, добавляют 10 мл смеси 70% этилового спирта с ацетоном в соотношении 1:3. Выдерживают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Экстракт фильтруют в колбу на 150 мл и добавляют к нему 100 мл подкисленного раствора воды (Ph=1). Полученный раствор фильтруют и к осадку добавляют 25 мл смеси аммиачный буфер : вода (1:1). 25 мл полученного раствора перемещают в мерную колбу на 50 и доводят до метки смесью аммиачный буфер : вода (1:1). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 214 нм с использованием кюветы 10 мм. В качестве раствора сравнения используется смесь аммиачного буфера с водой в соотношении 1:1.

Для расчёта концентрации с использованием стандартного вещества измеряют оптическую плотность спирто-ацетонового раствора СО урсоловой кислоты в смеси 70% этиловый спирт:ацетон (1:3). Содержание суммы сапонинов (X) в пересчете на урсоловую кислоту и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times m_0 \times 50 \times 100}{A_0 \times m \times V_0 \times (100 - W)} \quad (5), \text{ где}$$

A - оптическая плотность анализируемого раствора;

A₀ - оптическая плотность СО урсоловой кислоты в смеси 70% этиловый спирт : ацетон (1:3);

m - навеска сырья в граммах;

m₀ - навеска СО урсоловой кислоты в граммах;

V₀ – объем раствора СО урсоловой кислоты в миллилитрах;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %.

Было исследовано 5 серий опытов (таблица 5.5.2.5), в каждой серии по 5 навесок сырья, и процентное содержание сапонинов в различных сериях составило от $1,32 \pm 0,06\%$ до $1,42 \pm 0,06\%$.

Таблица 5.5.2.5 - Количественное содержание сапонинов, %

№ серии	Количественное содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту, %
1	$1,36 \pm 0,08$
2	$1,42 \pm 0,06$
3	$1,34 \pm 0,03$
4	$1,32 \pm 0,06$
5	$1,40 \pm 0,03$

Для каждой серии опытов проведена статистическая обработка результатов (таблица 5.5.2.6).

Таблица 5.5.2.6 - Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения суммы сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*

№ серии	n	$\bar{X}_{ср}$	P	t (p,f)	S_x	ϵ_a	$\epsilon\%$
1.	5	1,36	0,95	2,776	0,03	0,08	6,12
2.	5	1,42	0,95	2,776	0,02	0,06	4,29
3.	5	1,34	0,95	2,776	0,01	0,03	2,23
4.	5	1,32	0,95	2,776	0,02	0,06	4,54
5.	5	1,40	0,95	2,776	0,01	0,03	2,14

По данным статистической обработки данных (таблица 5.4.2.6), ошибка опыта в серии составила от 2,14% до 6,12%, что свидетельствует о достоверности полученных результатов [65].

Примечание.

1. Приготовление раствора стандартного образца (СО) урсоловой кислоты: 0,05 г СО урсоловой кислоты, сначала высушивают при температуре 130-135°C 3 часа, потом вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 85 мл 95 %

этилового спирта, растворяют при нагревании и доводят этиловым спиртом до метки.

5.5.3 Валидационная оценка методики количественного определения

Для определения пригодности разработанной методики была проведена валидационная оценка по следующим критериям: специфичность, линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность [18].

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов. Для её определения был снят УФ – спектр спирто-ацетонового извлечения побегов *C. pennsylvanica* и раствора СО урсоловой кислоты в том же растворителе (рисунок 5.5.3.1). Максимумы поглощения совпали при длине волны 214 нм, что доказывает специфичность данной методики.

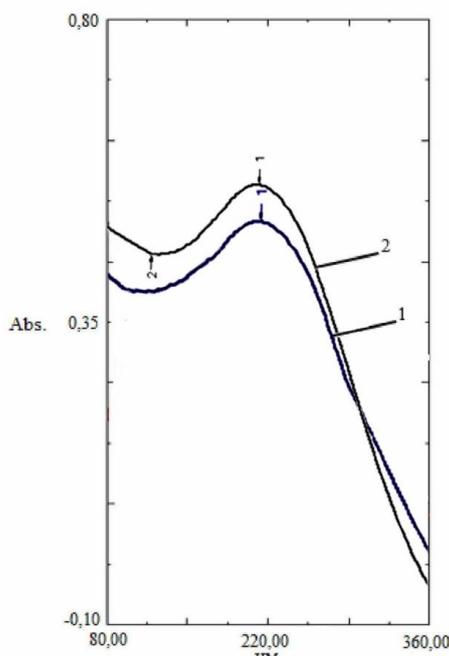


Рисунок 5.5.3.1 - УФ-спектр: 1 – извлечение побегов боярышника пенсильванского, 2 – раствор урсоловой кислоты

Для определения линейности готовили 5 концентраций сапонинов (от 60% до 140%) в пересчете на урсоловую кислоту от теоретического содержания в побегах *C. pennsylvanica* (таблица 5.4.4.1).

Таблица 5.5.3.1- Определение линейности

№	Содержание, %	Объем аликвоты, мл	Оптическая плотность	Содержание сапонинов, в пересчете на урсоловую кислоту, %
1	60	15	0,332	0,851
2	80	20	0,443	1,134
3	100	25	0,553	1,418
4	120	30	0,664	1,702
5	140	35	0,792	1,985

Для подтверждения линейности разработанной методики, необходимо рассчитать коэффициент корреляции, который должен быть не меньше 0,99. В нашем случае, данный коэффициент составил 0,9997 (рисунок 5.5.3.2, таблица 5.5.3.2), что является доказательством о линейности разработанной методики.

Рисунок 5.5.3.2 - Зависимость оптической плотности от концентрации сапонинов в исследуемом растворе

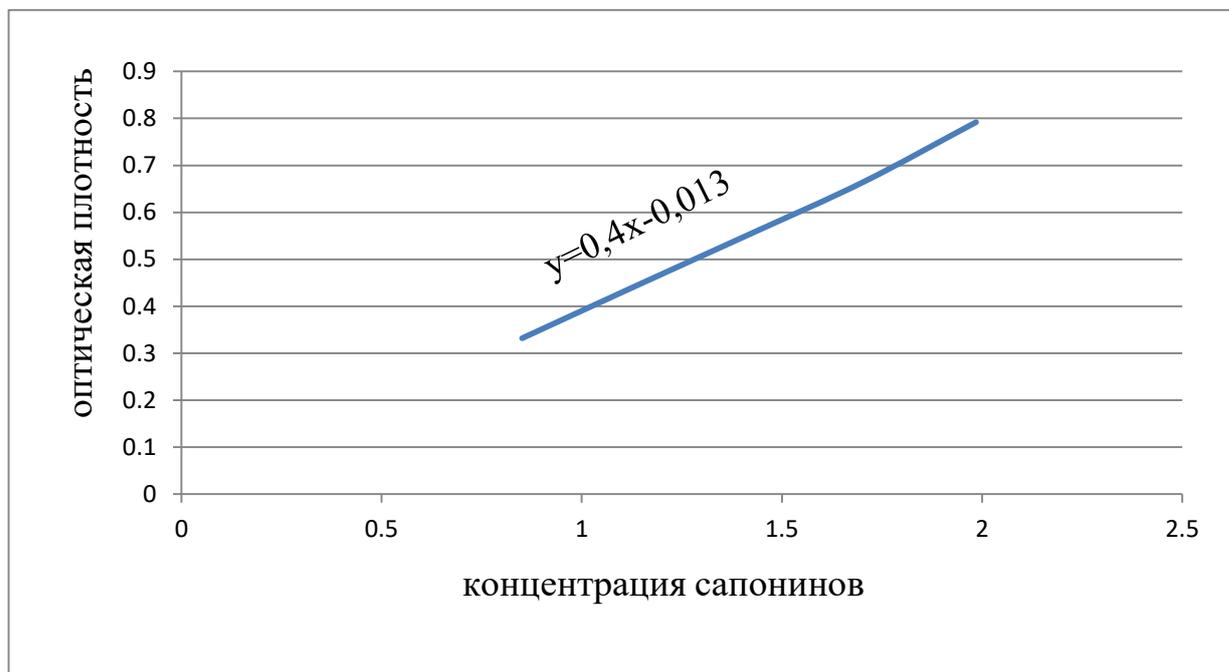


Таблица 5.5.3.2 - Данные для вычисления коэффициента корреляции

X	Y	XY	X ²	Y ²
0,851	0,332	0,2825	0,7242	0,1102
1,134	0,443	0,5024	1,2859	0,1962
1,418	0,553	0,7842	2,0107	0,3058
1,702	0,664	1,1301	2,8968	0,4409
1,985	0,792	1,5721	3,9402	0,6273
$\Sigma X=7,090$	$\Sigma Y=2,784$	$\Sigma XY=4,2713$	$\Sigma X^2=10,8578$	$\Sigma Y^2= 1,6804$
Коэффициент корреляции	0,9997			

Повторяемость методики определяли измеряя оптическую плотность 9 аликвот (получали извлечения из 3 образцов сырья в 3 повторностях). Затем вычисляется относительное стандартное отклонение, в данном случае это критерий приемлемости воспроизводимости методики. Для повторяемости

данный показатель должен быть не более 10%, по данным таблицы 5.5.3.3 он составил 1,43%, что свидетельствует о прецизионности методики.

Таблица 5.5.3.3- Данные по определению повторяемости методики

№ пробы	Содержание суммы сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту в побегах <i>C. pennsylvanica</i> , %
1	1,40
2	1,39
3	1,35
4	1,41
5	1,39
6	1,37
7	1,41
8	1,40
9	1,31
Среднее значение	1,39
Относительное стандартное отклонение	1,43%

Для определения воспроизводимости разрабатываемую методику определения проводили два исследователя, на двух проверенных приборах – спектрофотометрах, в двух независимых лабораториях (таблица 5.5.3.4). Для определения является ли методика воспроизводимой, рассчитывали относительное стандартное отклонение. Он должен быть не более 15%. Данный показатель находился в пределах от 0,56 % до 1,80%. Исходя из полученных данных, можно судить о выполнении условия данного критерия.

Таблица 5.5.3.4 - Данные по определению воспроизводимости методики

Повторность	Аналитик	Содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту в побегах <i>C. pennsylvanica</i> , %		
		Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	1	1,40	1,41	1,39
2	1	1,38	1,40	1,41
3	1	1,39	1,39	1,39
4	2	1,37	1,38	1,39
5	2	1,36	1,38	1,38
6	2	1,34	1,38	1,39
Среднее значение		1,37	1,39	1,39
Относительное стандартное отклонение (RSD), %		1,80	1,02	0,56

Правильность характеризует близость результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению. Для определения следующего критерия валидации - правильности, к извлечениям добавляли раствор известной концентрации СО, в данном случае урсоловой кислоты. Процент восстановления при использовании концентрации 80, 100 и 120%, скорректированный на 100%, должен находиться в пределах от 98,0% до 102,0%. Согласно таблице 5.4.4.5 данные подтверждают правильность разрабатываемой методики.

Таблица 5.5.3.5 - Определение правильности методики

Объем аликвоты, мл	Содержание суммы сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту, мг	Добавлено СО урсоловой кислоты, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %
30	1134,31	1,5	1135,81	1148,30	13,45 (101,1%)
25	1418,23	1,5	1419,73	1408,37	-11,36 (99,2%)
20	1702,44	1,5	1703,94	1712,46	8,52 (100,5%)

Проведенные исследования доказывают, что этот метод высокоточен в соответствии со всеми критериями проверки, и что его можно использовать для количественного определения сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*.

5.6 Определение числовых показателей и сроков годности

Срок годности побегов *C. pennsylvanica* анализировали по изменениям показателей влажности сырья и содержанию флавоноидов и сапонинов (таблица 5.6.1), определение проводилось согласно ОФС 1.1.0009.18: в первый год измерения проводили каждые 3 месяца, во второй год каждые 6 месяцев, далее 1 раз в год. Хранение производилось согласно ОФС 1.1.0011.15 [18]. По полученным данным, установлен срок годности – 3 года.

Таблица 5.6.1 - Определение сроков годности побегов *C. pennsylvanica*, собранных в мае 2020 года

№ серии	Год определения показателей качества	Влажность, %	Содержание флавоноидов, %	Содержание сапонинов, %
1	Июль, 2020	7,12±0,04	2,32±0,12	1,41±0,06
2	Июль, 2020	7,39±0,02	2,26±0,08	1,35±0,07
3	Июль, 2020	7,07±0,01	2,24±0,02	1,41±0,09
4	Июль, 2020	6,95±0,02	2,22±0,09	1,36±0,08
5	Июль, 2020	7,13±0,08	2,31±0,06	1,34±0,09
1	Октябрь, 2020	6,81±0,03	2,29±0,03	1,35±0,07
2	Октябрь, 2020	7,11±0,07	2,26±0,01	1,41±0,07
3	Октябрь, 2020	6,76±0,01	2,31±0,09	1,30±0,08
4	Октябрь, 2020	6,81±0,06	2,28±0,08	1,33±0,09
5	Октябрь, 2020	6,94±0,05	2,22±0,10	1,34±0,09
1	Январь, 2021	7,23±0,02	2,17±0,03	1,22±0,08
2	Январь, 2021	7,12±0,03	2,18±0,05	1,36±0,07
3	Январь, 2021	7,08±0,06	2,20±0,03	1,32±0,07
4	Январь, 2021	7,24±0,01	2,18±0,08	1,28±0,07
5	Январь, 2021	7,19±0,06	2,15±0,12	1,29±0,09
1	Апрель, 2021	6,96±0,02	2,17±0,03	1,21±0,03
2	Апрель, 2021	7,98±0,02	2,23±0,08	1,26±0,09
3	Апрель, 2021	7,56±0,09	2,29±0,01	1,31±0,08
4	Апрель, 2021	7,44±0,10	2,31±0,03	1,28±0,04
5	Апрель, 2021	7,12±0,04	2,12±0,08	1,23±0,06
1	Октябрь, 2021	7,08±0,07	2,24±0,09	1,18±0,02
2	Октябрь, 2021	7,46±0,08	2,15±0,05	1,20±0,02
3	Октябрь, 2021	6,96±0,02	2,31±0,06	1,16±0,07
4	Октябрь, 2021	7,05±0,03	2,27±0,03	1,10±0,09
5	Октябрь, 2021	7,16±0,03	2,19±0,04	1,16±0,09

1	Апрель, 2022	7,46±0,05	2,14±0,09	1,08±0,10
2	Апрель, 2022	7,52±0,04	2,12±0,07	1,06±0,08
3	Апрель, 2022	7,38±0,08	2,09±0,09	1,05±0,05
4	Апрель, 2022	7,46±0,03	2,16±0,01	1,08±0,08
5	Апрель, 2022	7,35±0,07	2,15±0,03	1,15±0,07
1	Октябрь, 2022	7,56±0,07	2,11±0,10	1,10±0,01
2	Октябрь, 2022	7,16±0,04	2,09±0,07	1,09±0,05
3	Октябрь, 2022	7,72±0,01	2,15±0,03	1,07±0,08
4	Октябрь, 2022	7,45±0,06	2,08±0,07	1,12±0,02
5	Октябрь, 2022	7,12±0,03	2,13±0,01	1,10±0,05
1	Апрель, 2023	7,88±0,09	2,07±0,04	1,11±0,06
2	Апрель, 2023	7,79±0,09	2,02±0,05	1,09±0,02
3	Апрель, 2023	7,98±0,02	2,10±0,08	1,11±0,08
4	Апрель, 2023	7,86±0,06	2,06±0,10	1,02±0,07
5	Апрель, 2023	7,95±0,03	2,08±0,04	1,05±0,09
1	Октябрь, 2023	6,08±0,09	1,87±0,04	0,95±0,03
2	Октябрь, 2023	7,13±0,04	1,95±0,10	0,88±0,02
3	Октябрь, 2023	7,56±0,06	1,74±0,03	0,97±0,02
4	Октябрь, 2023	7,48±0,02	1,69±0,08	0,87±0,06
5	Октябрь, 2023	7,21±0,03	1,82±0,02	0,89±0,01

Согласно полученным данным (таблица 5.6.1) числовые показатели остаются в пределах разработанных норм качества в течение 3 лет.

Качество растительного сырья побегов *C. pennsylvanica* определялось вычислением числовых показателей. Для их подсчета использовались аналитические пробы побегов *C. pennsylvanica*. Каждая проба была взята из отдельной серии сырья, которые были заготовлены в различные годы. Анализировались в 5 повторностях. Все исследуемые образцы сырья

поместили в тканевые мешки и хранили в сухом, проветриваемом помещении с влажностью не более $60 \pm 5\%$ [18].

Таблица 5.6.2 - Результаты анализа 5 серий побегов *C. pennsylvanica*

№ се р и	Показатели качества											Соот ветс твие треб ован иям	
	ТСХ	Числовые показатели									Измельчен ность:		
		Содержани е сапонинов, % не менее 1,0%	Содержан ие флавонои дов, % не менее 2,0%	Влажно сть не более 10%	Золы общей не более 10%	Золы не раствори мой в 10% HCl не более 3,5%	Орг. приме сей не более 1,0%	Мин. приме сей не более 0,5%	ДЗ П, не мен ее 70 %	част., не прох. d=5 мм не боле е 10%	час т., пр ох. d= 0,5 мм не бо лее 4%		
1	Соотве тствует	1,38	2,32	7,05	9,12	3,1	0,6	0,2	78,6	7,8	2,7	Соот ветст вует	
		1,41	2,36	7,23	8,78	3,3	0,7	0,3	77,8	6,9	2,4		
		1,39	2,29	7,16	8,67	3,3	0,5	0,2	71,4	7,4	3,1		
		1,35	2,34	6,98	9,05	3,2	0,6	0,2	73,1	6,8	2,8		
		1,38	2,33	7,32	8,90	2,9	0,5	0,3	76,1	7,1	2,6		
2	Соответ ствует	1,25	2,29	7,08	8,88	3,1	0,5	0,4	75,3	7,6	2,9	Соот ветс твует	
		1,31	2,23	7,16	8,76	2,8	0,6	0,3	70,8	7,8	3,2		
		1,26	2,21	7,36	8,56	2,9	0,5	0,3	71,7	6,9	3,3		
		1,26	2,26	7,01	8,82	2,9	0,6	0,4	70,7	7,2	2,9		
		1,31	2,21	6,95	8,78	3,0	0,6	0,4	74,8	7,4	3,2		
3	Соответ ствует	1,41	2,30	6,92	8,88	2,7	0,4	0,2	74,5	8,1	2,8	Соот ветст вует	
		1,39	2,22	6,88	9,13	2,8	0,5	0,3	71,8	8,0	3,1		
		1,38	2,21	6,85	9,08	2,9	0,4	0,2	80,5	7,8	3,2		
		1,37	2,23	6,76	8,92	2,8	0,5	0,2	78,8	7,8	3,0		
		1,35	2,27	6,94	8,97	2,7	0,5	0,3	78,4	7,6	2,7		
4	Соответ ствует	1,31	2,31	7,13	8,89	3,0	0,4	0,3	80,3	7,2	2,2	Соот ветст вует	
		1,32	2,29	7,36	8,76	3,1	0,5	0,3	81,1	6,7	2,5		
		1,32	2,25	7,17	9,08	2,9	0,5	0,4	79,9	6,9	2,7		
		1,32	2,23	7,20	9,11	2,8	0,5	0,4	78,2	7,3	2,4		
		1,29	2,28	7,16	8,98	2,9	0,5	0,4	78,4	7,4	2,5		
5	Соответ ствует	1,29	2,29	7,14	8,87	2,7	0,5	0,2	79,1	6,7	3,1	Соот ветст вует	
		1,27	2,22	7,06	8,93	2,8	0,5	0,2	75,4	7,1	2,8		
		1,31	2,29	6,86	9,02	3,0	0,4	0,2	70,9	7,2	3,0		
		1,26	2,21	7,23	8,85	2,9	0,5	0,3	72,7	7,3	2,7		
		1,32	2,25	7,18	8,79	3,1	0,4	0,3	74,6	6,9	2,9		

Такие показатели как влажность, зола общая, зола, не растворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, органическая и минеральная примеси определялись согласно гл. II, п. 2.2.2. Стандартизацию проводили согласно разработанным методикам качественного и количественного анализа флавоноидов и сапонинов в побегах *C. pennsylvanica* (таблица 5.6.2). Разработаны следующие числовые показатели для включения в проект НД: содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид - не менее 2,0%, содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту - не менее 1,0%, ДЗП - не менее 70%, влажность - не более 10%, золы общей - не более 10%, зола, не растворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3,5%, частиц, не проходящих сквозь сито 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%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

На основе фитохимических исследований цветков и плодов *C. pennsylvanica* согласно требованиям ОФС.2.5.0061.18 и ОФС.2.5.0062.18 установлена пригодность *C. pennsylvanica* в качестве производящего растения.

1. Разработана методика ТСХ для проведения качественного анализа флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica* система - этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5) и выбраны стандартные образцы для ТСХ гиперозид, рутин и кверцетин.
2. Проведена валидация методики количественного определения флавоноидов в пересчете на гиперозид в побегах *C. pennsylvanica*.
3. Разработана методика ТСХ для проведения качественного анализа сапонинов в побегах *C. pennsylvanica*: система - хлороформ – метанол – вода (26:14:3) и выбраны стандартные образцы для ТСХ - олеаноловая и урсоловая кислоты.
4. Разработана методика количественного определения сапонинов в побегах *C. pennsylvanica* спектрофотометрическим методом в пересчете на урсоловую кислоту. Экспериментально установлен удельный показатель урсоловой кислоты. Проведена валидация разработанной методики.
5. Разработаны числовые показатели для включения в проект НД: содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид - не менее 2,0%, содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту - не менее 1,0%, ДЗП - не менее 70%, влажность - не более 10%, золы общей - не более 10%, зола, не растворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3,5%, частиц, не проходящих сквозь сито 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%.
6. Установлены сроки годности побегов *C. pennsylvanica* - 3 года.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОБЕГОВ *CRATAEGUS PENNSYLVANICA* ASHE

6.1 Изучение антиоксидантной активности

Антиоксидантные свойства определялись методом, описанным в главе II п. 2.2.4. В исследовании использовали водные (настои и отвары) и спиртовые извлечения различных видов сырья *C. pennsylvanica*. В качестве препаратов сравнения использовали 0,05% раствор аскорбиновой кислоты. Данные изученной антиоксидантной активности представлены в таблице 6.1.1. [45].

Таблица 6.1.1 - Данные исследования антиоксидантной активности

C. pennsylvanica

Наименование исследуемого раствора	АОА, %
Отвар плодов	33,40±1,68
Настойка плодов	35,20±1,02
Настой цветков	47,60±2,68
Настойка цветков	50,20±2,66
Настой побегов	61,20±2,86
Настойка побегов	62,00±3,95
0,05% раствор аскорбиновой кислоты	96,10±5,21

По данным, представленным в таблице 6.1.1., можно утверждать, что все извлечения обладают антиоксидантной активностью (показатель выше 10%) и больше всего показатель наблюдался у настоев и настоек побегов и цветков.

Так же был проведен сравнительный анализ антиоксидантной активности для водных извлечений и настоек *C. pennsylvanica* (рисунок 6.1.1.) Согласно диаграмме, увеличение АОА наблюдается в ряду Плоды>Цветки>Побеги. При этом АОА спиртовых извлечений, полученных из всех видов сырья *C. pennsylvanica*, незначительно выше, чем у водных, однако эти отличия недостоверны [45].

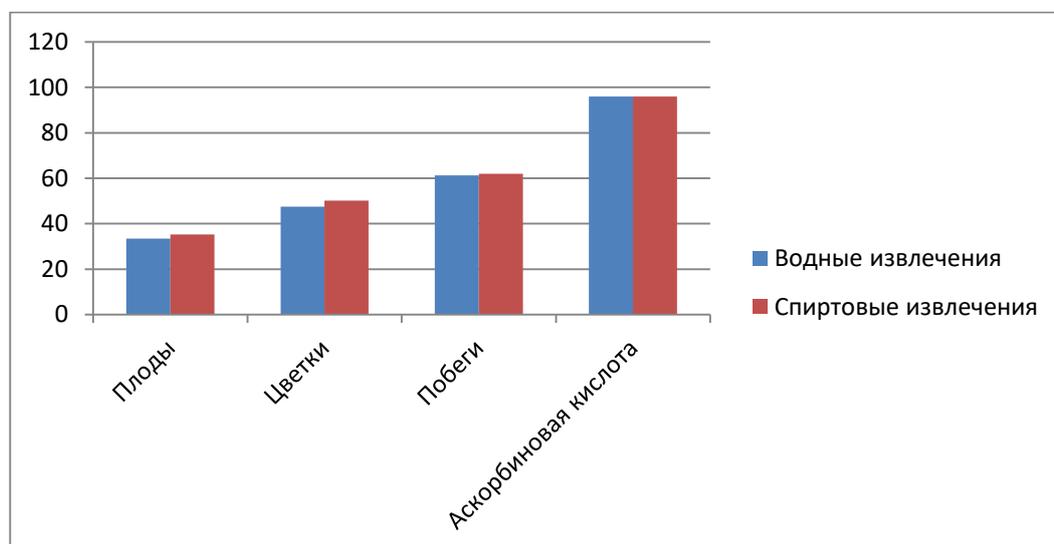


Рисунок 6.1.1- Антиоксидантная активность сырья *C. pennsylvanica*

6.2 Изучение влияния на систему гемостаза

Антиагрегантную и антикоагуляционную активность исследовали согласно методикам, приведенным в главе II, п.2.2.4.

Полученные данные изучения антикоагуляционной активности побегов, цветков и плодов *C. pennsylvanica* и препарата сравнения, которым являлся гепарин, представлены в таблице 6.2.1. Согласно полученным данным, все исследуемые виды влияют на показатель плазменного звена гемостаза, однако уступают по силе действия препарату сравнения [15].

Таблица 6.2.1 - Влияние водных извлечений сырья *C. pennsylvanica* на показатели плазменного звена гемостаза, Me (0,25–0,75)

Вещество	АПТВ, % к контролю	ПВ, % к контролю	Фибриноген, % к контролю
Побеги <i>C. pennsylvanica</i>	+4,1 (3,7-5,2)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Цветки <i>C. pennsylvanica</i>	+3,2 (2,9-4,7)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Плоды <i>C. pennsylvanica</i>	+ 3,8 (2,1–5,6)*	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)
Гепарин натрия	+ 20,3 (19,7–21,4)	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)

Примечание: * $p > 0,05$ – в сравнении с контролем; соединения vs гепарин натрия при $p \leq 0,05$; $n = 6$

Показатели антиагрегационной активности различных видов сырья *C. pennsylvanica* и препарата сравнения, которым являлась ацетилсалициловая кислота, представлены в таблице 6.2.2 [15].

Таблица 6.2.2 - Влияние водных извлечений сырья *C. pennsylvanica* на показатели агрегации тромбоцитов, Me (0,25-0,75)

Объект исследования	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к контролю	Дезагрегация, % к контролю
Побеги <i>C. pennsylvanica</i>	+7,6 (6,1-8,5)*, #	-6,5 (6,1-7,7)*, #	-9,3 (7,5-10,8)*	+10,3 (10,1-13,4)*, #	0,0 (0,0-0,0)
Цветки <i>C. pennsylvanica</i>	+3,4 (2,7-3,8)#	-3,4 (2,8-4,5)#	-17,4 (16,9-19,4)*, #	+7,1 (6,3-8,5)*, #	0,0 (0,0-0,0)
Плоды <i>C. pennsylvanica</i>	+4,1 (3,8-5,3)#	-6,7 (5,2-8,3)**	-9,3 (8,3-12,6)*	+9,7 (7,5-13,2)*, #	0,0 (0,0-0,0)
Ацетилсалициловая кислота	-2,1 (1,1-2,6)	-13,7 (10,8-16,4)*	-10,5 (7,6-12,3)*	+10,5 (8,7-13,4)*	0,0 (0,0-0,0)

Примечание: Латентный период представлен для агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, остальные параметры для АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$ - в сравнении с контролем; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.001$ - в сравнении с ацетилсалициловой кислотой. $n=4$.

Согласно полученным данным, побеги, цветки и плоды *C. pennsylvanica* уменьшают максимальную амплитуду, что говорит об их влиянии на агрегацию тромбоцитов. По влиянию на скорость агрегации тромбоцитов водные извлечения побегов и плодов *C. pennsylvanica*, сравнимы с препаратом сравнения. Однако, оценивая максимальную амплитуду, можно сделать вывод, что побеги и цветки *C. pennsylvanica* достоверно снижают данный показатель и обладают антиагрегантной активностью, но уступают по силе активности препарату сравнения [15].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Установлены антиоксидантные свойства водных и спиртовых извлечений побегов, цветков и плодов *C. pennsylvanica*. Наибольшее значение антиоксидантной активностью наблюдается у настоев и настоек побегов и цветков, наименьший у отвара и настойки плодов *C. pennsylvanica*. Антиоксидантная активность не зависит от растворителя.
2. Установлена антикоагуляционная антиагрегационная активность водных извлечений побегов, цветков и плодов *C. pennsylvanica*. Все исследуемые образцы влияли на показатель плазменного звена гемостаза, но по силе воздействия уступали препарату сравнения.
3. Исследована антиагрегационная активность водных извлечений побегов, цветков и плодов *C. pennsylvanica*. Побеги и цветки *C. pennsylvanica* значительно снижали максимальную амплитуду и проявляли антиагрегантную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных результатов экспериментальных исследований в диссертационной работе и обзору литературных данных, обоснована возможность внедрения в медицинскую практику нового вида сырья «Боярышника пенсильванского побеги» в качестве антиоксидантного и антиагрегантного средства и включения боярышника пенсильванского в качестве производящего растения к официальным видам сырья «Боярышника плоды» и «Боярышника цветки».

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

Изучены современные сведения научной литературы изучения химического состава и биологической активности *C. pennsylvanica*.

1. Проведено морфологическое исследование побегов *C. pennsylvanica*. Установленные анатомо-диагностические признаки побегов *C. pennsylvanica* говорят об общности микроскопических признаков растений рода *Crataegus* L.
2. Установлено, что плоды и цветки *C. pennsylvanica* соответствуют требованиям ОФС 2.5.0061.18 «Боярышника плоды» и ОФС 2.5.0062.18 «Боярышника цветки», предъявляемым к плодам и цветкам боярышника.
3. На основании исследования химического состава побегов *C. pennsylvanica* установлен состав преобладающих флавоноидов, сапонинов, идентифицированы методом ГХ/МС 43 соединения. Установлено количественное содержание обнаруженных групп биологически активных веществ.

4. Разработаны методики ТСХ для установления подлинности побегов *C. pennsylvanica* с использованием системы: этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5) и трех стандартных образцов – гиперозида, рутин и кверцетин; с использованием системы: – метанол – вода (26:14:3) и двух стандартных образцов – олеаноловая кислота и урсоловая кислота. Проведена валидация методики количественного определения флавоноидов в побегах *C. pennsylvanica* спектрофотометрическим методом. Разработана методика количественного определения сапонинов в побегах *C. pennsylvanica* спектрофотометрическим методом и проведена ее валидация.
5. Установлены числовые показатели: содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид - не менее 2,0 %, содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту - не менее 1,0%, ДЗП - не менее 70%, влажность - не более 10%, золы общей - не более 10%, зола, не растворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3,5%, частиц, не проходящих сквозь сито 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% и разработан проект ФС «Боярышника пенсильванского побеги».
6. Установлены биологические свойства побегов (антиоксидантная, антикоагулянтная и антиагрегационная активность) и проведен сравнительный анализ с другими видами сырья *C. pennsylvanica*. Наибольшая антиоксидантная и антикоагулянтная активность наблюдалась у побегов, а наибольшая антиагрегантная активность наблюдалась у плодов и побегов *C. pennsylvanica*.

Рекомендации

Результаты данной диссертационной работы возможно применить для новых разработок в сфере фармации и медицины. Разработанные методики качественного и количественного анализа могут использоваться в учебном процессе при освоении специальной дисциплины «Фармакогнозия» специальности Фармация, а также в работе аналитических лабораторий.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейшей разработки темы проведенных исследований состоят из таких направлений, имеющих важное теоретическое и практическое значение: введение в отечественную медицину нового вида сырья – побегов боярышника пенсильванского; дальнейшее изучение фармакологической активности данного вида и разработанных в будущем препаратов на его основе и проведения их доклинических и клинических испытаний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОА – антиоксидантная активность

БАВ - биологически активные вещества

ГФ - Государственная фармакопея

ГХ - газовая хроматография

ГХ/МС - газовая хроматография с масс-спектрометрией

ДЗП - диагностически значимые признаки

ЖАК - железоммониевые квасцы

ЛРС - лекарственное растительное сырье

ЛУК - ледяная уксусная кислота

НД - нормативная документация

СО - стандартный образец

ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолетовый

ФС - фармакопейная статья

Список литературы

1. Асраров М.И. Механизм действия флавонола лутеолина на функции митохондрий печени крыс / Асраров М. И., Комилов Э. Дж., Эргашев Н. А., Позиллов М. К., Эшбакова К.А., Тошматов З.А., Ташбекова М. Х. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, №12, 2015 (с. 38-43)
2. Баратов К. Р. Оценка противовоспалительного и антиоксидантного действия супрамолекулярного комплекса рутина / Баратов К. Р., Рахмонова Г. Г., Махмудов Л. У., Кузиев Ш. Н., Матчанов У. Д., Выпова Н. Л., Якубова Р. А., Тагайалиева Н. А. // Universum: химия и биология. 2020. №9 (75).
3. Безверхняя Е. А. Исследование электрофизиологических свойств урсоловой кислоты, выделенной из водяники черной, методом локальной фиксации мембранного потенциала клетки пуркинью в срезах мозжечка // Материалы XXII Международной конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» Том I 2022 г. (с. 341-342)
4. Беляков, К.В. Методологические подходы к определению биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье спектрофотометрическим методом / К.В. Беляков. - М., 2004. - 188 с.
5. Берштейн Л.М. Урсоловая кислота как противоопухолевое средство и активатор белка-онкосупрессора pten и бурого жира // Вопросы онкологии. 2012. №6.
6. Богданов А.Р. Влияние растительных сапонинов на показатели эластичности магистральных артерий у больных с мультифокальным атеросклерозом / Богданов А.Р., Пыко М.Е., Романова Т.А., Федулаев Е.Н. // CardiaСоматика. 2021; 12 (1); 41-47.
7. Бояринцев Д.И. Природные соединения с антикоагулянтным действием / Бояринцев Д.И., Калинин Е.П., Ральченко И.В., Рудзевич Е.Л. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, №2, т. 22, 2019; 3-10.

8. Боярышник пенсильванский. Уфимский ботанический сад. [Электронный ресурс]. - URL: <https://xn--80aacn2csgej.xn--p1ai/2014/08/crataegus-pennsylvanica-ashe-boyary-shnik-pensil-vanskij/?ysclid=lpjeel7c9a385997726> (дата обращения 12.02.2022).
9. Воробьева О. А. Производные бетулина. Биологическая активность и повышение растворимости / Воробьева О. А., Малыгина Д. С., Грубова Е. В., Мельникова Н. Б. // Химия растительного сырья. 2019. №4.
10. Воронков А.В. Церебро-протекторная активность мальвидина, гиперозида и глицитеина в условиях фокальной ишемии головного мозга. / Воронков А.В., Нигарян С.А., Поздняков Д.И // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2020; 83(7): 3–6.
11. Воронов И.В. Ресурсный потенциал по лютеолин-7-глюкозиду *Veronica incana* (scrophulariaceae) в Центральной Якутии / Воронов И.В., Поскачина Е.Р., Данилова Н.С., Семенова В.В. // Научный журнал КубГАУ. 2016. №120. С 1364 – 1377.
12. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. - Женева, 2021. - URL: <http://www.who.int.ru>. (дата обращения 21.02.2023).
13. Выращивание различных видов боярышника. [Электронный ресурс]. - URL: <https://dolva.ru/health/kust-boyaryshnika-opisanie-vidy-boyaryshnika-vyrashchivanie-i-uhod-za.html> (дата обращения 12.02.2022).
14. Гайнетдинова А.А. Исследование содержания процианидинов в различных видах рода *Crataegus* L. / Гайнетдинова А.А., Хасанова С.Р., Хисматуллина А.А., Шубина Т.В. // Материалы Международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», приуроченной к 30-летию Независимости Республики Казахстан. – 2021 (С. 94 -96)
15. Галиахметова Э.Х. Влияние некоторых видов лекарственного растительного сырья на систему гемостаза *in vitro* / Галиахметова Э.Х., Баширова Л.И., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Низамова А.А., Жалалова Н.К., Гусакова В.А., Еникеева К.И., Павлова А.А., Шубина Т.В., Хисматуллина А.А.,

- Мураталиева А.Д., Капаров Б.М., Дуйшеналиев Н.К., Нугуманова Р.И., Авылзаде С.Р., Дербала А.М. // Традиционная медицина. – 2021. - №1 с. 64 (С. 38 – 42)
16. Гладышев М. И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека // Журнал СФУ. Биология. 2012. №4.
 17. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 т. / под общ. ред. А. А. Шерякова. - Молодечно: Победа, 2008. - Т. 2. - 472 с.
 18. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Москва, 2018. Т. 1. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.rosminzdrav.ru/news/2018/11/02/9441-opublikovano-xiv-izdanie-gosudarstvennoy-farmakopei-rossiyskoy-federatsii>
 19. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Москва, 2018. Т. 2. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.rosminzdrav.ru/news/2018/11/02/9441-opublikovano-xiv-izdanie-gosudarstvennoy-farmakopei-rossiyskoy-federatsii>
 20. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Москва, 2018. Т. 4. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.rosminzdrav.ru/news/2018/11/02/9441-opublikovano-xiv-izdanie-gosudarstvennoy-farmakopei-rossiyskoy-federatsii>
 21. Гусакова В.А. Фитохимическое изучение и перспективы использования боярышника мягковатого (*Crataegus Submollis* Sarg.) [Текст]: дис.,... канд. фарм. наук / Гусакова Валерия Андреевна, - Пермь, 2023.- 151 с.
 22. Ивашев М. Н. Влияние оксикоричных кислот на систему мозгового кровообращения / Ивашев М. Н., Чуклин Р. Е. // Фармация и фармакология: 2013;1(1):44-48. DOI:[10.19163/2307-9266-2013-1-1-44-48](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2013-1-1-44-48)
 23. Ковальский И. В. Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия / Ковальский И. В., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Никулина О. И., Беляцкая А. В., Харитонов Ю. Я., Фельдман Н. Б., Луценко С. В. // Химико-фармацевтический журнал. Том 48, №2, 2014

24. Коденцова, В. М. Токоферолы: биологическая роль, критерии витаминной обеспеченности, физиологическая потребность организма и рекомендуемые нормы потребления / Коденцова, В. М., Рисник, Д. В. // Вопросы диетологии, 2018, 8(2), 22-31.
25. Композиция на основе бетулина и слоевищ лишайников, обладающая антибактериальным, противовирусным и детоксикационным действием Патент № 2710236 (Россия). / Шашурин М. М., Кершенгольц Б.М. // Дата публикации: 25.12.2019.
26. Крылова Н. В. Сравнительное изучение противовирусной активности лютеолина и 7,3'-дисульфата лютеолина / Крылова Н. В., Попов А. М., Леонова Г. Н., Артюков А. А., Майстровская О. С. // Антибиотики и химиотерапия. 2011. №11-12.
27. Кудашкина, Н.В. Фитохимический анализ: учеб. пособие по фармакогнозии для студентов / Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова, С.А. Мещерякова. – Уфа: Издательство ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2019. - 124 с.
28. Куркин В. А. Диуретическая и антидепрессивная активность густого экстракта из плодов боярышника кроваво-красного / Куркин В. А., Куркина А. В., Зайцева Е. Н., Дубищев А. В., Правдивцева О. Е., Морозова Т. В. // Бюллетень сибирской медицины. 2015. №3.
29. Латыпова Г.М. Содержание урсоловой кислоты в растениях рода первоцвет / Латыпова Г.М., Бубенчикова В.Н., Катаев В.А. // Фармация. 2015. № 4 (21).
30. Левицкий А.П. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология / Левицкий А.П., Вертикова Е.К., Селиванская И.А. // Мікробіологія і біотехнологія. 2010. № 2. С. 6-20.
31. Лукашов Р. И. Фармакологическая активность кофейной кислоты / Лукашов Р. И., Моисеев Д. В., Столярова В. Н., Макаренко М. Н. // Вестник фармации. 2012. №3 (57).
32. Луценко М. Т. Включение экзогенно поступающего в организм сквалена в синтез холестерина в печени // Сибирский научный медицинский журнал. 2010. №6.

33. Магомедов И.М. Сквален – как антигипоксант в организмах животных и растений / Магомедов И.М., Чиркова Т.В., Чиркова А.И. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 5 (часть 1) – С. 90-92
34. Маркин А. А. Химический состав и видовое разнообразие боярышника в ботаническом саду им. И.И. Спрыгина / Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение «Средняя общеобразовательная школа № 65/23» г. Пензы, 2021
35. Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. / Меньщиков Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., и др // Москва: Слово, 2006. 556 с.
36. Мироненко, Н.В. УФ-спектрофотометрическое определение тритерпеновых сапонинов - производных олеаноловой кислоты / Н.В. Мироненко, Т.А. Брежнева, В.Ф. Селеменев // Химия растительного сырья. - 2011. - №3.- С. 153-157.
37. Морозкина С. Н. Некоторые биологические свойства урсоловой и бетулиновой кислот / Морозкина С. Н., Антимонова О. И., Шавва А. Г. // Российский биотерапевтический журнал. 2008. №2.
38. Низамова А. А. Фармакогностическое изучение травы гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb.) [Текст]: дис.,... канд. фарм. наук / Гусакова Альфина Ансафовна, - Пермь, 2022.- 168 с
39. Низамова А.А. Высокоэффективная тонкослойная хроматография при анализе тритерпеновых сапонинов *Gynostemma Pentaphyllum* / Низамова А.А., Галиахметова Э.Х., Кудашкина Н.В., Хасанова С.Р., Булгаков Т.В., Хакимова Э.Р. // Медицинский вестник Башкортостана. 2021. №5 (95 с.).
40. Нилова Л.П. Токоферолы и токотриенолы: свойства, функции, природные источники. аналитический обзор / Нилова Л.П., Пилипенко Т.В., Потороко И.Ю. // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2021. №1. С. 68 – 81.

41. Павлова А. А. Исследование метаболомного профиля сырья боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe / Павлова А. А., Хасанова С. Р. Кудашкина Н. В., Булгаков Т. В., Мураталиева А. Д. // Башкирский химический журнал. 2023. Том 30. № 3 (с. 130 – 136) DOI: 10.17122/bcj-2023-3-130-136
42. Павлова А. А. Количественное определение аскорбиновой кислоты в побегах боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe / Павлова А. А., Хасанова С. Р., Кудашкина Н. В., Низамутдинов Т. Р., Фазлыяхметова К. Ш. // Материалы III Международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», посвященной 70-летию Юбилею Лауреата Государственной премии РК, д.фарм.н., профессора Арыстановой Танагуль Акимбаевны 2023 г. (с. 106 -108)
43. Павлова А. А. Количественное определение кумаринов в плодах боярышника пенсильванского / Павлова А. А., Кудашкина Н. В., Хасанова С. Р. // Природные соединения и здоровье человека: сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Иркутск : ИГМУ, 2023. – Вып. 5. – 239 с. (С. 81 -83)
44. Павлова А.А. Боярышник пенсильванский, как новый перспективный вид сырья / Павлова А.А., Хасанова С.Р. // Сборник материалов I Международной научно-практической конференций по традиционной (народной) медицине «Абу Али Ибн Сино (Авицена) и Великий шелковый путь» Самарканд – 2022, том 2.SP (С. 45 - 46)
45. Павлова А.А. Исследование антиоксидантной активности некоторых интродуцированных видов рода *Crataegus* L. / Павлова А.А., Шубина Т. В., Хисматуллина А. А., Кудашкина Н. В., Хасанова С. Р., Потанина А. П. // Медицинский вестник Башкортостана. Том 18, № 3 (105), 2023 – (с. 59 -62)
46. Павлова А.А. Исследование содержания аскорбиновой кислоты в плодах боярышника пенсильванского / Павлова А.А. // Природные соединения и

здоровье человека: сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Иркутск : ИГМУ, 2022. – Вып. 4. – 153 с. (С. 71 - 73)

47. Павлова А.А. Исследование содержания каротиноидов в плодах боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe / Павлова А.А., Хасанова С.Р. // Сборник X Международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» 15 -16 декабря 2022 года, Москва – 2022. DOI:10.52101/9785870191058_313 (С. 313-316)
48. Павлова А.А. Исследование содержания флавоноидов в побегах боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe / Павлова А.А., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В. // Сборник материалов XI международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» 2023 г. (с.284-287)
49. Павлова А.А. Качественное определение гидроксикоричных кислот в побегах боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe методом тонкослойной хроматографии / Павлова А.А., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Низамутдинов Т.Р., Фазлыхметова К.Ш. // V Гаммермановские чтения. Сборник научных трудов по материалам научно-методической конференции (9-10 ноября 2023 г.): сборник статей/кол. Авторы; под общ. Ред. М.Н. Пovyдыш. – Москва: РУСАЙНС, 2023.-328 с.
50. Павлова А.А. Количественное определение дубильных веществ в побегах боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe / Павлова А. А., Хасанова С. Р., Кудашкина Н. В. // Материалы III Международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», посвященной 70-летию Юбилею Лауреата Государственной премии РК, д.фарм.н., профессора Арыстановой Танагуль Акимбаевны 2023 г. (с.108)
51. Павлова А.А. Микроскопический анализ побегов боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe / Павлова А.А., Кудашкина

- Н.В. // Сборник конференции «Фармация - движения вперед!», Казахстан, город Караганда 2023 г. (С. 276-279)
52. Павлова А.А. Стандартизация плодов и цветков боярышник пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe. / Павлова А.А., Кудашкина Н.В., Хасанова С.Р. // Сборник материалов IX международная научная конференция молодых ученых и студентов «ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ» 8-9 декабря 2022 года, Журнал « Вестник Южно - Казахстанской медицинской академии» (С. 45 -46)
53. Переславцева А. В. Бетулин как перспективный источник для получения противовирусных препаратов / Переславцева А. В., Галайко Н. В. // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. 2013. №3.
54. Писарев Д.И. Разработка методики определения содержания сквалена в некоторых растительных жирных маслах / Писарев Д.И., Новиков О.О., Бочарникова М.А., Васильева Ю.Г., Малютин А.Ю. // Научные результаты биомедицинских исследований. 2016. №4. С. 43 – 53. DOI: 10.18413/2313-8955-2016-2-4-43-53
55. Поздняков Д. И. Коррекция митохондриальной дисфункции коричневыми кислотами при экспериментальной гиперцитокинемии // Научные результаты биомедицинских исследований. 2022. №3.
56. Поздняков Д. И. Оксикоричные кислоты как ингибиторы pox^4 в терапии болезни Альцгеймера. Экспериментальное исследование // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2023; (6): 45- DOI:10.29296/25877313-2023-06-07
57. Поздняков Д.И. Нейропротекторные эффекты гиперозида в условиях дефицита активности митохондриального комплекса IV / Поздняков Д.И. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, №8, т.25, 202 С. 48 -52.
58. Попова Н.В. Антибиотические свойства лютеолина / Попова Н.В. , Дихтярев С.И. , Маслова Н.Ф. , Литвиненко В.И. // Украинский биофармацевтический журнал, № 6(17) 2011 (с. 4-11)

59. 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.
60. Практикум по фармакогнозии: учеб. пособие для студ. вузов / В.Н. Ковалев [и др.]. - Харьков: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2004. - 512 с.
61. Рождественский Д. А. Клиническая фармакология лекарственных средств на основе эфирных масел // Медицинские новости. 2015. №10 (253).
62. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
63. Самородов, А.В. Поиск новых азотсодержащих гетероциклических соединений, влияющих на систему гемостаза // Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Башкирский государственный медицинский университет. – Уфа, 2012.
64. Саркисян В.А. Витаминные и антиоксидантные свойства токоферолов: характеристика молекулярных механизмов действия / Саркисян В.А., Коденцова В.М., Бессонов В.В., Кочеткова А.А. // Вопросы питания. 2018. №3.
65. Способ количественного определения сапонинов в побегах боярышника пенсильванского. Павлова А.А. Кудашкина Н.В. Хасанова С.Р. / Приоритетная справка на патент.
66. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Сирота Т.В. / Патент №2144674 (Россия). Дата публикации: 20.01.2000.
67. Титов В. Н. Пальмитиновая, олеиновая кислоты и их роль в патогенезе атеросклероза / Титов В. Н., Дыгай А. М., Котловский М. Ю., Курдюк Е. В., Якименко А. В., Якимович И. Ю., Аксютин Н. В., Котловский Ю. В. // Бюллетень сибирской медицины. 2014. №5.
68. Тринеева О.В. Идентификация органических кислот методом ТСХ в извлечениях из растительных объектов / Тринеева О.В., Сафонова И.И.,

- Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013 Т. 13 Вып. 6
69. Ураков А.Л. Особенности экспрессии Р-селектина и агрегации тромбоцитов под действием лекарственных препаратов / Ураков А.Л., Самородов А.В., Камилов Ф.Х. [и др.] // Фармация. – 2017. – Т.66, №3. – С.43–46.
70. Ураков А.Л. Полирегионарная агрегатометрия крови пациентов с острым тромбозом, как потенциальная модель доклинических исследований новых корректоров системы гемостаза *ex vivo* / Ураков А.Л., Самородов А.В., Камилов Ф.Х., Халиуллин Ф.А. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т.16, №1(61). – С.65–71.
71. Уфимов Р.А. Заметки о роде *Crataegus* L. (Rosaceae). Новости систематики высших растений. 2013. Т. 44. С. 113-125.
72. Уфимов, Р.А. Род боярышник (*Crataegus* L., Rosaceae) во флоре Восточной Европы и Кавказа: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.02.01 / Уфимов Роман Александрович. - Санкт-Петербург, 2013. - 20 с.
73. Фаттахова Г.А. Сапонины как биологически активные вещества растительного происхождения / Фаттахова Г.А., Канарский А.В. // Вестник Казанского технологического университета. 2014. №3.
74. Федотова В. В. Растительные стеролы и станолаы, снижающие уровень холестерина липопротеинов низкой плотности // Человек и его здоровье. 2022. №2.
75. Хасанова, С.Р. Изучение качественного состава липофильной фракции листьев боярышника кроваво-красного / С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Традиционная медицина. - 2015. - Т.41, № 2. - С.53-55.
76. Хасанова, С.Р. Изучение компонентного состава липофильной фракции побегов боярышника мягковатого, интродуцированного в условиях Республики Башкортостана / С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, В.А. Гусакова // Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений: материалы

- Международной научно-практической конференции. - Симферополь, 2019. - С. 293-296.
77. Хасанова С.Р. Особенности химического состава некоторых неофицинальных видов *Crataegus* L. (Rosaceae) / Хасанова С.Р., Самылина И.А., Кудашкина Н.В., Павлова А.А., Шубина Т.В. // Фармация. 2024. Т. 73, № 3, С. 15 – 23 DOI: 10.29296/25419218-2024-03-03
78. Хишова О.М., Количественное определение процианидинов плодов боярышника / Хишова О.М., Бузук Г.Н. // Химико-фармацевтический журнал. - 2006. – Т.40, № 2. – С. 20-21.
79. Хортецкая Т. В. Определение содержания гидроксикоричных кислот в листьях подорожников большого (*Plantago major* L.) и среднего (*Plantago media* L.) / Хортецкая Т. В., Смойловская Г. П., Мазулин А. В., Мазулин Г. В. // Химия растительного сырья. 2014. №2.
80. Чуклин Р.Е. Влияние кофейной кислоты на сердечный ритм / Р.Е. Чуклин, М.Н. Ивашев // Клиническая фармакология и терапия. –2010. – № 6. – С. 71–72.
81. Чуклин Р.Е. Клиническая фармакология кофейной кислоты / Чуклин Р.Е., Масликова Г.В. // INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL EDUCATION №12, 2016 (с. 437)
82. Чуклин, Р. Е. Влияние кофейной кислоты на системную гемодинамику / Р. Е. Чуклин, М. Н. Ивашев // Клиническая фармакология и терапия. – 2009. – № 6. – С. 307–308.
83. Чуклин, Р.Е. Биологическая активность кофейной и феруловой кислот / Р.Е. Чуклин, М.А. Оганова, М.Н. Ивашев // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). – 2009. – Т.11. № 1. С. 141а.
84. Шубина Т. В. Исследование содержания сапонинов в различных видах рода *Crataegus* L. / Шубина Т. В., Павлова А. А., Хисматуллина А. А., Гусакова В. А., Хасанова С. Р., Кудашкина Н. В // Сборник материалов юбилейной

- Международной научной конференции, ФГБНУ ВИЛАР, Москва – 2021. DOI:10.52101/9785870191003_2021_499 (С.499 -501)
85. Щербаков А.М. / Апигенин ингибирует рост клеток рака молочной железы: роль *egr* и *her2/neu* / Щербаков А.М., Андреева О.Е. // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). 2015. №3 (26). С. 149 – 155.
86. Эль Мабруки Хахим Разработка методики количественного определения сапонинов в траве грыжника голого *herniaria glabra* L / Эль Мабруки Хахим, Каухова И. Е., Сорокин В. В., Минина С. А. // *Актуальные проблемы медицины*. 2014. №24 (195).
87. Яковишин Л.А. Молекулярные комплексы холестерина с олеаноловой кислотой и эсцином / Яковишин Л.А., Гришковец В.И. // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018. №1.
88. Ясинская И. М. Кверцетин - новый необратимый ингибитор цитохрома P450 аромат азы // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия*. 2001. №2.
89. Abbasi E. M. Effects of vitexin on scopolamine-induced memory impairment in rats / E. Abbasi, M. Nassiri-Asl, M. Sheikhi, and M. Shafiee // *Chin. J. Physiol.*, vol. 56, no. 3, pp. 184–189, 2013
90. Abbasi E. Neuroprotective Effects of Vitexin, a Flavonoid, on PentylentetrazoleInduced Seizure in Rats / E. Abbasi, M. Nassiri-Asl, M. Shafeei, and M. Sheikhi // *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 80, no. 2, pp. 274–278, 2012
91. Alam, M.S. Antibacterial and In vivo cytotoxic activities of the leaves of *Leucas aspera* / M.S. Alam, S. Saha, Du. Lee // *J. Korean Soc Appl Biol Chem* 57, 551–554 (2014). DOI:[10.1007/s13765-014-4202-1](https://doi.org/10.1007/s13765-014-4202-1)
92. Arnab Roy Chowdhury Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I / Arnab Roy Chowdhury, Shalini Sharma, Suparna Mandal, Anindya Goswami, Sibabrata Mukhopadhyay, Hemanta K Majumder // *Biochem J*. 2002 Sep 1;366(Pt 2):653-61. DOI: 10.1042/BJ20020098.

93. Azafrin. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.drugfuture.com/chemdata/Azafrin.html> (дата обращения 16.04.2022).
94. Baskaran G. HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Basella alba* leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia / Baskaran G., Salvamani S., Ahmed S.A., Shaharuddin N.A., Pattiram P.D., Shukor M.Y. // *Drug Design, Development and Therapy* 2015 - № 2015 P. 509-517 DOI:[10.2147/DDDT.S75056](https://doi.org/10.2147/DDDT.S75056)
95. Bhat IUH Quercetin: A Bioactive Compound Imparting Cardiovascular and Neuroprotective Benefits: Scope for Exploring Fresh Produce, Their Wastes, and By-Products / Bhat IUH, Bhat R. // *Biology*. 2021;10(7):586. DOI: 10.3390/biology10070586
96. Block, Timothy A. Reestablishment of *Crataegus* species associated with Tennessee Gas Pipeline LLC's northeast upgrade project loop 323 in High Point State Park. / Block, Timothy A. and Cynthia Skema // *Research Works (Botany)* 20. 2016. [Электронный ресурс]. - URL: https://repository.upenn.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1019&context=morrisarborium_botanyworks (дата обращения 12.02.2022).
97. *British Pharmacopoeia 2009* / *British Pharmacopoeia Commission*. - London: Crown Copyright, 2009. - 10952 p.
98. Chen Y. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in-vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect / Y. Chen, J. Liu, X. Yang [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 259–264.
99. Cis – 13 – eicosenoic acid. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.careomnia.com/cis-13-eicosenoic-acid-20-1-c-what> (дата обращения 16.04.2022).
100. *Damião P de Sousa Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities* / *Damião P de Sousa, Renan Oliveira S Damasceno, Riccardo Amorati, Hatem A Elshabrawy, Ricardo D de Castro, Daniel P Bezerra, Vitória Regina V Nunes,*

- Rebeca C Gomes, Tamires C Lima // *Biomolecules*. 2023 Jul 18;13(7):1144. doi: 10.3390/biom13071144
101. European Pharmacopeia 6.0 / European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. – Strasbourg: 2007. - 1129 с.
102. European Pharmacopoeia Online 9.0 [Электронный ресурс]. - URL: <http://online6.edqm.eu/ep900/> - (дата обращения 26.02.2023).
103. Fan H. Hyperoside Reduces Rotenoneinduced Neuronal Injury by Suppressing Autophagy. / Fan H., Li Y., Sun M., Xiao W., Song L., Wang Q., Zhang B., Yu J., Jin X., Ma. C, Chai. Z. // *Neurochem Res*. 2021; 46(12): 3149–3158.
104. Fu-Cai Ren 13,27-Cycloursane, ursane and oleanane triterpenoids from the leaves of *Lucuma nervosa* / Fu-Cai Ren, Guan-Yan Li, Nuosu Nama, Zhen-Hua Liu, Liu Yang, Jun Zhou, Jiang-Miao Hu // *Fitoterapia* May 2019 DOI:10.1016/j.fitote.2019.104178
105. Fulda S. Betulinic Acid for cancer treatment and prevention // *Int. J. Mol. Sci*. 2008. N9. Pp. 1096–1107. DOI: 10.3390/ijms9061096.
106. Gröber U. Micronutrients: Metabolic Tuning — Prevention — Therapy. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2009;24(2-4):331. DOI: 10.1515/dmdi.2009.24.2-4.331
107. Hiroshi Ueda Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens* / Hiroshi Ueda, Chikako Yamazaki, Masatoshi Yamazaki // *Biol Pharm Bull*. 2002 Sep;25(9):1197-202. DOI:10.1248/bpb.25.1197.
108. Jill S. Dodds *Crataegus pennsylvanica* Rare Plant Profile / New Jersey Department of Environmental Protection Office of Natural Lands Management New Jersey Natural Heritage Program. P 14, 2022, Trenton, NJ.
109. Juríková T. Polyphenols and their Mechanism of Action in Allergic Immune Response / Juríková T, Mlček J, Sochor J, et al. // *Glob J Allergy*. 2015;1(2):37-39. DOI: 10.17352/2455-8141.000008.
110. Ken Fern Temperate Plants Database [Электронный ресурс]. - URL: <https://temperate.theferns.info/plant/Crataegus+pennsylvanica> (дата обращения 12.02.2022).

111. Liu H. Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats / Liu H, Guo X, Hu Y, et al. // *Gene*. 2014;545(1):149-155. DOI: 10.1016/j.gene.2014.04.043
112. Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives // *J. Ethnopharmacol.* – 2005. – Vol. 100, № 1–2. – P. 92–94.
113. Lo E. Y. Y. Evidence for genetic association between East Asian and western North American *Crataegus* L. (Rosaceae) and rapid divergence of the eastern North American lineages based on multiple DNA sequences / Lo E. Y. Y., Stefanović S., Christensen K. I., Dickinson T. A. // *Molec. Phylog. Evol.* 2009. Vol. 51. P. 157–168. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.01.018.
114. Lo E. Y. Y. Molecular reappraisal of relationships between *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Pyreae) / Lo E. Y. Y., Stefanović S., Dickinson T. A. // *Syst. Bot.* 2007. Vol. 32, № 3. P. 596–616. DOI:10.1600/036364407782250562.
115. Lu C. C. Vitexin protects against cardiac hypertrophy via inhibiting calcineurin and CaMKII signaling pathways / C. C. Lu, Y. Q. Xu, J. C. Wu, P. Z. Hang, Y. Wang, C. Wang, J. W. Wu, J. C. Qi, Y. Zhang, and Z. M. Du // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 386, no. 8, pp. 747–755, 2013
116. M. Azalia Lozano Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene / M. Azalia Lozano, Shela Gorinstein, Eduardo Espitia, Gloria Dávila, Alma Leticia Martínez // *International Journal of Agronomy*, vol. 2018, Article ID 1829160, 13 pages, 2018. DOI:[10.1155/2018/1829160](https://doi.org/10.1155/2018/1829160)
117. Madhusudhan K. N. Isolation, purification and characterization of antibacterial bioactive compounds from *Bougainvillea spectabilis* Leaf / Madhusudhan K. N., Vinayarani G., Moorthy S. M., Satish L., Thirupathaiyah Y., Maheshwari C., Prakash H. S., Teotia R. S. and Sivaprasad V. // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2019; 8(3) P. 2668 – 2673
118. Majumder Natural anti-inflammatory terpenoids in *Camellia japonica* leaf and probable biosynthesis pathways of the metabolome / Majumder, Soumya; Ghosh, Arindam; Bhattacharya, Malay // *Bulletin of the National Research Centre*. 2020. 44 (1): 141. DOI:10.1186/s42269-020-00397-7

119. Margareth B. C. Gallo Biological activities of Lupeol / Margareth B. C. Gallo; Miranda J. Sarachine // International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences № 3 (Special Issue), 2009, p. 46 – 66
120. Marques MR Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers / Marques MR, Stüker C, Kichik N, Tarragó T, Giralt E, Morel AF, Dalcol // Fitoterapia. 2010. 81 (6): 552–6. DOI:10.1016/j.fitote.2010.01.018
121. Mitchell, Stephen C. Trimethylamine—The extracorporeal envoy/ Mitchell, Stephen C. and Robert L. Smith. // Chemical Senses 41(4): 275–279. 2016.
122. Mlcek J. Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response / Mlcek J, Jurikova T, Skrovankova S, et al. // Molecules. 2016;21(5):623. DOI: 10.3390/molecules21050623
123. Muhammad Shahzad Aslam Pharmacological potential of vitexin / Muhammad Shahzad Aslam, Muhammad Syarhabil Ahmad, Awang Soh Mamat // Indian Research Journal of Pharmacy and Science 2(2) 2015 (p. 114-122)
124. Murakami A. Multi targeted cancer prevention by quercetin / Murakami A, Ashida H, Terao J. // Cancer Letters. 2008;269(2):315-325. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.046
125. N. Radhakrishnan Genesis, Pathophysiology and Management of Venous and Lymphatic Disorders / Academic Press: 2022, 518 p.
126. Nigam N Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin / Nigam N, Prasad S, Shukla Y // Food and Chemical Toxicology. 2007. 45 (11): 2331–5. DOI:10.1016/j.fct.2007.06.002
127. Nighat Sultana Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product // J Enzyme Inhib Med Chem. 2011 Oct; 26(5):616-42.
128. NJNHP (New Jersey Natural Heritage Program). 2022. Biotics 5 Database. NatureServe, Arlington, VA. Accessed February 1, 2022.
129. Papi A. Vitexin-2-Oxyloside, raphasatin and (-)-epigallocatechin3-gallate synergistically affect cell growth and apoptosis of colon cancer cells / A. Papi, F.

- Farabegoli, R. Iori, M. Orlandi, G. R. De Nicola, M. Bagatta, D. Angelino, L. Gennari, and P. Ninfali // *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1521–1530, 2013.
130. Pavlova Aliya A. Qualitative detection of flavonoids in shoots of *Crataegus Pennsylvanica* Ashe / Pavlova Aliya A., Khasanova Svetlana R., Kudashkina Natalia V., Rustemovich Tagir N., Fazlyakhmetova Camilla S. // 24th International Congress PHYTOPHARM 2023 p. 73
131. *Pennsylvania Hawthorn*. [Электронный ресурс]. - URL: https://www.cirrusimage.com/tree_hawthornpennsylvania/ (дата обращения 12.02.2022).
132. PFAF (Plants for A Future). 2022. *Crataegus pennsylvanica*. [Электронный ресурс]. - URL: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Crataegus+pennsylvanica> - (дата обращения 12.02.2022).
133. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. P.: Peoples Medical Publishing House, 2005. - Vol. 1. – 974 p.
134. Phipps, James B. Page updated November 6, 2020. *Crataegus pennsylvanica* Ashe. In: *Flora of North America* Editorial Committee, eds. 1993+. *Flora of North America North of Mexico*. New York and Oxford. [Электронный ресурс]. - URL: http://floranorthamerica.org/Crataegus_pennsylvanica (дата обращения 12.02.2022).
135. Ram Krishna Rao Preliminary phytochemical and GC ms analysis of different extracts of *psophocarpus tetragonolobus* leaves / Ram Krishna Rao, N. Vijaya Lakshmi, Lakshmi Sundaram R. Mudiganti // *INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* 2018, 05 (03) P. 1649-1656 DOI:[10.5281/zenodo.1208629](https://doi.org/10.5281/zenodo.1208629)
136. Romero Estrada A. Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. *BMC* / A. Romero Estrada, A. Maldonado-Magaña, J. González-Christen [et al.] // *Complement Altern Med.* – 2016. – №16. – P. 422. DOI:[10.1186/s12906-016-1397-1](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1397-1)

137. Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases Second Edition Academic Press: 2019, 604 p. DOI:10.1016/C2017-0-00605-5
138. Ronald Ross Watson, Victor R Preedy Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements / Academic Press: 2019, 358 p.
139. Seol, G.H. Eucalyptol and Its Role in Chronic Diseases / Seol, G.H., Kim K.Y. // Adv Exp Med Biol. – 2016. – №929. – P.389–398. DOI: 10.1007/978-3-319-41342-6_18.
140. Shuang Zhang Toosendanin, a late-stage autophagy inhibitor, sensitizes triple-negative breast cancer to irinotecan chemotherapy / Shuang Zhang, Yu Dong, Xiuping Chen, Chris Soon Heng TAN, Min Li, Kai Miao, Jia-Hong Lu // Chinese Medicine 17(1), Article number: 55 (2022) DOI:10.1186/s13020-022-00605-8
141. Shuyu Yang Cardioprotective role of azafrin in against myocardial injury in rats via activation of the Nrf2-ARE pathway / Shuyu Yang, Guixin Chou, Qinglin Li // Phytomedicine. 2018 Aug 1;47:12-22. DOI:10.1016/j.phymed.2018.04.042. Epub 2018 Apr 18.
142. Simão da Silva Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice / Simão da Silva, Kathryn A.B.; Paszcuk, Ana F.; Passos, Giselle F.; Silva, Eduardo S.; Bento, Allisson Freire; Meotti, Flavia C.; Calixto, João B. // Pain. 2011. 152 (8): 1872–1887. DOI:10.1016/j.pain.2011.04.005
143. Sitesh C. Bachar Medicinal Natural Products: A Disease-Focused Approach / Sitesh C. Bachar, Ritesh Bachar, Khoshnur Jannat, Rownak Jahan, Mohammed Rahmatullah. // Academic Press: Volume 55, 2020, Pages 207-249
144. Toosendani. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.chembk.com/en/chem/Toosendani> (дата обращения 16.04.2022).
145. Toosendsnin [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/sml3465> (дата обращения 16.04.2022).

146. Tundis Rosa Recent Insights into the Emerging Role of Triterpenoids in Cancer Therapy / Rosa Tundis, Monica Rosa Loizzo, in *Studies in Natural Products Chemistry*, 2014
147. United States Pharmacopeia 32 ed. [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.uspbper.com/> - (дата обращения 25.02.2023).
148. United States Pharmacopoeia (USP 32 - NF 27). / V.: The United States Pharmacopoeial Convention, 2009 . - 815 p.
149. Weakley, A. S. Flora of the southern and mid-Atlantic states, working draft of May 2015 / University of North Carolina Herbarium, North Carolina Botanical Garden, Chapel Hill, NC – 2015
150. Weber Julia Chemical synthesis of culmorin metabolites and their biologic role in culmorin and acetyl-culmorin treated wheat cells / Julia Weber, Marta Vaclavikova, Gerlinde Wiesenberger, Maximilian Haider, Christian Hametner, Johannes Fröhlich, Franz Berthiller, Gerhard Adam, Hannes Mikula, Philipp Fruhmann // *Organic and Biomolecular Chemistry* 2017 DOI: 10.1039/c7ob02460f
151. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants / World Health Organization. - Geneva, 2004. - Vol. 2. – 297 p.
152. Woelflingseder L. The Fusarium metabolite culmorin suppresses the in vitro glucuronidation of deoxynivalenol / L. Woelflingseder, B. Warth, I. Vierheilig [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2019. – №93. – P. 1729 – 1743. DOI:[10.1007/s00204-019-02459-w](https://doi.org/10.1007/s00204-019-02459-w)
153. Xiaofang Wang Hyperoside Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling via the AKT Signaling Pathway / Xiaofang Wang, Yuan Liu, Lili Xiao, Ling Li, Xiaoyan Zhao, Lulu Yang, Ning Chen, Lu Gao, Jinying Zhang // *Cellular Physiology and Biochemistry* (2018) 51 (2): 827–841. DOI:10.1159/000495368
154. Xu D Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application / Xu D, Hu M-J, Wang Y-Q, et al. // *Molecules*. 2019; 24(6):1123. DOI: 10.3390/molecules24061123

155. Yong Lin Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy / Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wang, Han-Ming Shen // *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Nov; 8(7):634-46. doi: 10.2174/156800908786241050.
156. Young-Hee Jin Toosendanin From *Melia Fructus* Suppresses Influenza A Virus Infection by Altering Nuclear Localization of Viral Polymerase PA Protein / Young-Hee Jin, Sunoh Kwon, Jang-Gi Choi, Won-Kyung Cho, Bonggi Lee, Jin Yeul Ma // *Sec. Experimental Pharmacology and Drug Discovery Volume 10 - 2019* | DOI:10.3389/fphar.2019.01025
157. Zhou J. Hyperoside Protects HK-2 Cells Against High Glucose-Induced Apoptosis and Inflammation via the miR-499a-5p/NRIP1 Pathway / Zhou J., Zhang S., Sun X., Lou Y., Yu J. // *Pathol Oncol Res*. 2021; 27: 629829.
158. Zuyi Weng Luteolin Inhibits Human Keratinocyte Activation and Decreases NF- κ B Induction That Is Increased in Psoriatic Skin / Zuyi Weng, Arti B. Patel, Magdalini Vasiadi, Anastasia Therianou, Theoharis C. Theoharides // February 28, 2014 DOI:[10.1371/journal.pone.0090739](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090739)

Приложения

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Боярышника пенсильванского побегов

ФС 42-----

Crataegi pennsylvaniceae Cormus

Вводится впервые

Срок введения установлен

« ___ » _____ 20__ года

Срок действия до

« ___ » _____ 20__ года

Собранные в фазу цветения и высушенные побеги дикорастущих и культивируемых кустарников или небольших деревьев боярышника пенсильванского – *Crataegus pennsylvanica* Ashe, сем. розоцветных – *Rosaceae*.

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
<i>Внешние признаки</i>	Визуальный (с помощью микроскопа и лупы), органолептический, ГФ XV	Соответствует ФС
<i>Микроскопия</i>	ГФ XV	Соответствует ФС
<i>Качественные реакции</i>	ТСХ	Соответствует ФС
<i>Числовые показатели:</i> Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид Содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту	Дифференциальная спектрофотометрия Спектрофотометрия Микродиагностический	не менее 2,0% не менее 1,0%

ДЗП Влажность	ОФС.1.5.3.0007.15, ГФ- XV	не менее 70% не более 10%
Зола общей Зола, нерастворимой в НСI	ГФ- XV ОФС.1.5.3.0005.15, ГФ- XV	не более 10,0% не более 3,5%
Другие части растений Сырье, изменившее окраску	ОФС.1.5.3.0004.15, ГФ- XV ОФС.1.5.3.0004.15, ГФ-XV	не более 10%
Органическая примесь	ОФС.1.5.3.0004.15, ГФ- XV	не более 1,0%
Минеральная примесь	ОФС.1.5.3.0004.15, ГФ- XV	не более 0,5%
Измельченность измельченного сырья: частиц, не проходящих сквозь сито d=5 мм		не более 10%
частиц, проходящих сквозь сито d=0,5 мм	ОФС.1.5.3.0004.15, ГФ- XV	не более 4%
Измельченность порошка сырья: частиц, не проходящих сквозь сито d=2 мм		не более 10%
частиц, проходящих сквозь сито d=0,18 мм		не более 4%
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.18 ГФ XV	Соответствует категории 4А
Упаковка	ОФС 1.1.0025.18. ГФ-XV	Цельное сырье упаковывается по 15 кг в мешки бумажные многослойные; в мешки полипропиленовые из пропилена окрашенного; по 20 кг в мешки тканевые продуктовые. Фасованное сырье упаковывается по 50,0 г в бумажный пакет и картонную коробку. Фильтр-пакеты упаковываются в специальную бумагу по 2,0 г и по 20 фильтр- пакетов в картонную

		упаковку.
Маркировка	ОФС 1.1.0025.18. ГФ-XV	Соответствует ФС
Транспортирование	ОФС 1.1.0025.18. ГФ-XV	Соответствует ФС
Хранение	ОФС.1.1.0011.15 ГФ ГФ-XV	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C
Срок годности		3 года
Фармакологическая группа		Антиангинальное средство растительного происхождения

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Побеги представляют собой смесь зеленых стеблей, листьев и соцветий. Листья имеют простую, цельную, яйцевидную форму листовой пластинки, без прилистников, черешок 2,5 – 3 см, край листа мелкозубчатый, верхушка острая, основание широко – клиновидное, жилкование перисто-красное, расположение очередное, у основания черешков имеются крупные колочки длиной 6-10 см. Длина побегов равна 10-15 см. Соцветие у *S. pennsylvanica* шитки с 7-10 цветками, покрыты войлочным опушением. Цветки обоеполые, 20-25 мм в диаметр, тычинок 10-12, завязь нижняя с 3–5 стилодиями, лепестков венчика 5, белые. Чашелистиков 5, они яйцевидной формы с острой верхушкой и зубчатым краем. Стебли цилиндрические, темно-зеленого цвета с серо-войлочным опушением. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопа (16×) кусочки листьев, цветков различной формы и размера, обломки черешков, проходящие сквозь сито размером 5 мм, цвет кусочков листьев зеленый с верхней стороны и светло-зеленый - с нижней. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Порошок. Представляет собой кусочки листьев, цветков и черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопа (16×) видны кусочки листьев

зеленого или серовато-зеленого цвета, кусочки венчика цветков белого цвета и фрагменты черешка зеленого цвета. Цвет зеленый или серовато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабо-горьковатый.

Микроскопия. *Цельное сырье.* Эпидермис верхней стороны листа имеет слегка извилистую форму клеток и ярко выраженную складчатость кутикулы (рисунок 1); нижний эпидермис с более извилистыми клетками, устьичный аппарат аномоцитного типа, окруженный 4-5 околоустьичными клетками (рисунок 2), устьица встречаются на обеих сторонах листовой пластинки (преимущественно на нижней стороне). Волоски простые, одноклеточные, толстостенные, у основания образуют розетку из 5 клеток (рисунок 3, 4). По жилкам листовой пластинки располагается большое количество друз оксалата кальция и имеется кристаллоносная обкладка (рисунок 5). На кончике листа имеется железка с бурым содержимым (рисунок 6). Клетки черешка продолговато-удлиненные, с четковидными утолщениями. Устьица на черешке крупные, устьичный аппарат аномоцитного типа. Волоски простые, одноклеточные, толстостенные (рисунок 7, 8). На поперечном срезе черешка листа наблюдали один слой клеток эпидермиса, несколько слоев уголкового колленхимы, паренхиму коры, центральный цилиндр с открытым коллатеральным серповидно-изогнутым пучком, который имеет склеренхимную обкладку (рисунок 9). Клетки эпидермиса венчика продолговато-удлиненные, прямостенные, со складчатостью кутикулы, так же встречаются сосочковидные клетки. Устьица крупные, с аномоцитным типом устьичного аппарата, окруженного 3-5 околоустьичными клетками. Некоторые клетки содержат коричневое содержимое (рисунок 10). Клетки эпидермиса чашелистика продолговатые, многоугольные, со складчатостью кутикулы с таким же устьичным аппаратом, как на венчике (рисунок 11). Присутствуют крупные друзы оксалата кальция. Волоски одноклеточные, простые, толстостенные, с бурым содержимым в местах прикрепления (рисунок 12).

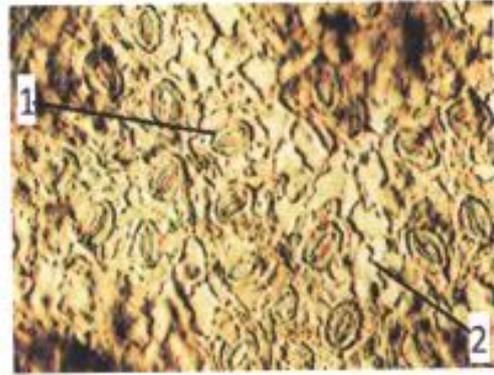
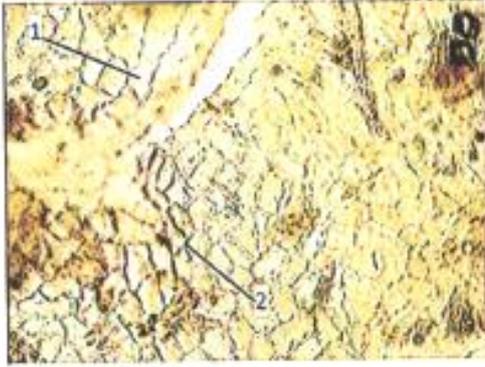


Рисунок 1 - Верхний эпидермис листа (1- складчатость кутикулы, 2 - устьица, 2 - извилистые стенки клеток)
 Рисунок 2 - Нижний эпидермис листа (1 - устьица, 2 - четковидные утолщения клеточной стенки)

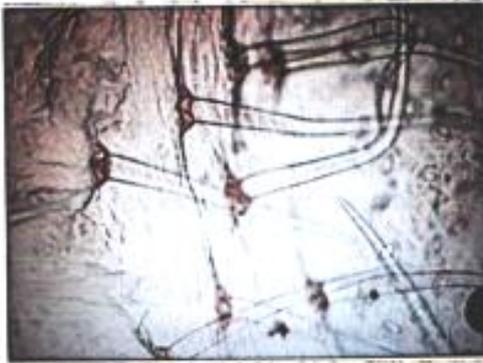


Рисунок 3 - Простые одноклеточные волоски листа

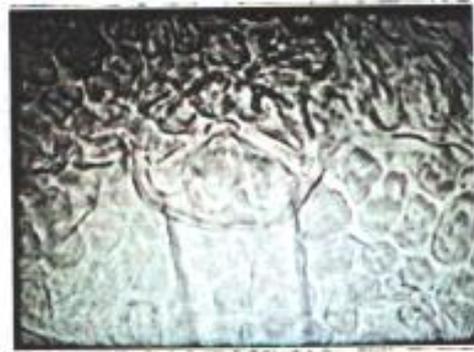


Рисунок 4 - Основание волоска с розеткой из 5 клеток



Рисунок 5 - Друзы оксалата кальция



Рисунок 6 - Желёзка с бурым содержимым

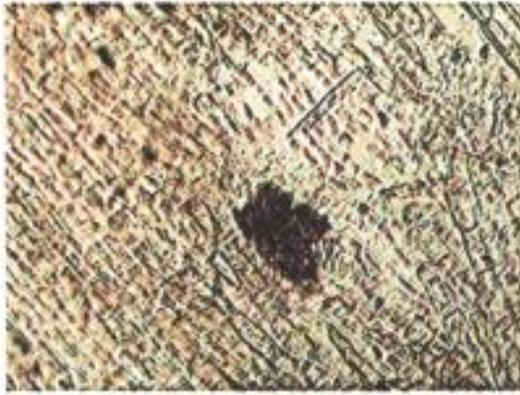


Рисунок 7 – Простые одноклеточные волоски на чашелистике

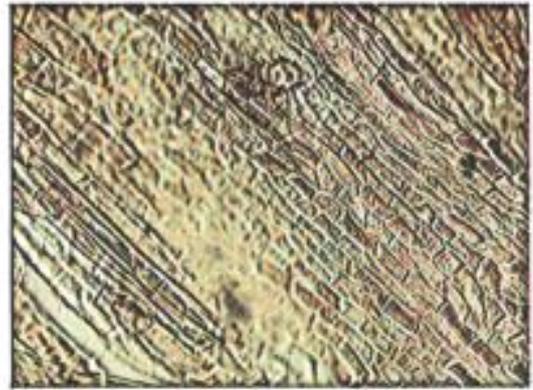


Рисунок 8 – Аномальный тип устьичного аппарата чашелистиков

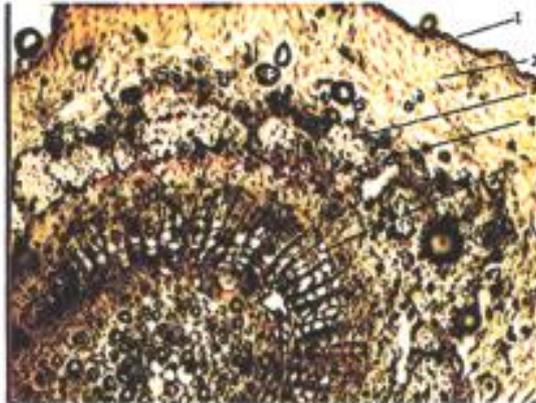


Рисунок 9 - Поперечный срез черешка (1- эпидермис, 2 - уголковая колленхима, 3 - паренхима коры, 4 - склеренхимная обкладка, 5 - серповидно-изогнутый коллатеральный проводящий пучок)

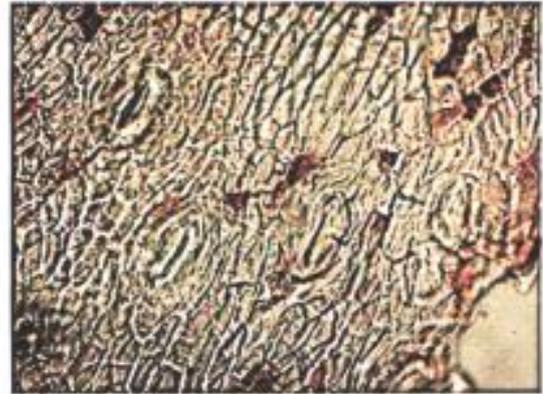


Рисунок 10 – Клетки эпидермиса венчика

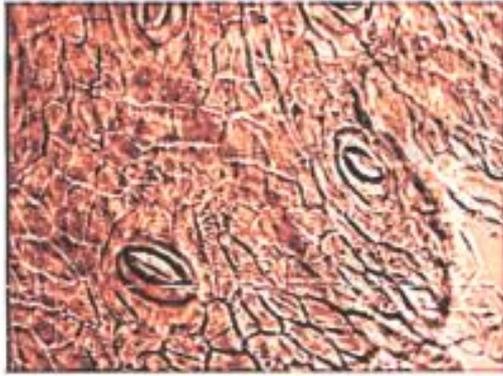


Рисунок 11 – Клетки эпидермиса чашелистика

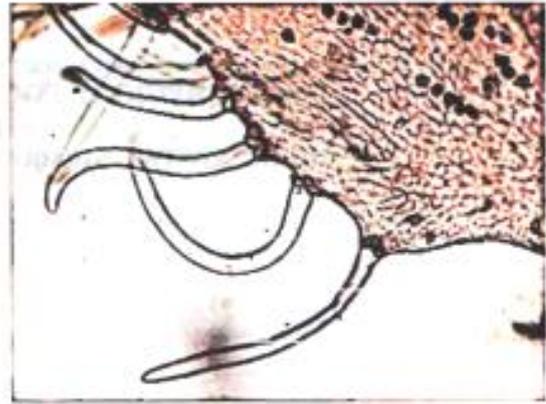


Рисунок 12 – Одноклеточные волоски

Измельченное сырье, порошок. Представляет собой фрагменты эпидермиса верхней и нижней стороны листа, венчика и чашелистика цветков, фрагменты жилок листа, сопровождающихся простыми толстостенными одноклеточными волосками, фрагменты края листовой пластинки с простыми одноклеточными волосками по краю, фрагменты верхушки сегментов листа с железкой, фрагменты эпидермиса с розеткой из 5-7 клеток в основании волоска. Практически на всех фрагментах присутствуют друзы оксалата кальция, чаще всего вдоль жилок листа. Тип устьичного аппарата – аномоцитный. (рисунки 1-12).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография флавоноидов. Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 10 мл 80% этилового спирта и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 20 мкл испытуемого раствора и 5 мкл

0,05% растворов СО рутина, СО гиперозида и СО хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную системой растворителей: этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80-90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления следов растворителя и опрыскивают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, полученную хроматограмму просматривают в УФ-свете. На хроматограмме испытуемого раствора при длине волны 365 нм должны обнаруживаться 3 основные зоны адсорбции на уровне СО рутина желтого цвета, на уровне СО гиперозида желтого цвета и на уровне СО хлорогеновой кислоты светлоголубого цвета. Допускается обнаружение дополнительных зон.

Тонкослойная хроматография сапонинов. Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 10 мл 80% этилового спирта и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10×10 см наносят 20 мкл испытуемого раствора и 5 мкл 0,05% растворов СО урсоловой кислоты, СО олеаноловой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную системой растворителей: хлороформ – метанол – вода (26:14:3), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80-90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления следов растворителя и обрабатывают 20% серной кислотой и нагревают в сушильном шкафу при 105 °С.

Наблюдают появление розовых пятен при дневном свете, далее просматривают полученную хроматограмму в УФ-свете при 365 нм, наблюдают 2 основные зоны, которые должны быть на уровне зон стандартных образцов олеаноловой и урсоловой кислот. Допускается обнаружение дополнительных зон.

Примечание:

1. Подготовка пластинок. Пластины вырезают размером 10×10 см, наносят линию старта на расстоянии 1 см от края и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100-105°C в течение 1 часа.

2. Приготовление системы растворителей для хроматографирования. Для проведения ТСХ-анализа рекомендуется система растворителей: этилацетат – бутанол – муравьиная кислота – вода (30:10:5:5). Система используется свежеприготовленная. Насыщение камеры для хроматографирования системой растворителей не менее 1 часа.

3. Приготовление раствора-проявителя.

Приготовление 3% спиртового раствора алюминия хлорида: 5,4 г алюминия хлорида 6-водного вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 80 мл 95 % этилового спирта, растворяют при нагревании и доводят этиловым спиртом до метки.

Приготовление 20% серной кислоты: 13 мл концентрированной серной кислоты разбавляют водой в мерной колбе до 100 мл.

4. Приготовление растворов сравнения.

Раствор СО рутина: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца рутина, предварительно высушенного при температуре 130-140°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.

Раствор СО гиперозида: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца гиперозида, предварительно высушенного при температуре 100-105°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.

Раствор СО хлорогеновой кислоты: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца хлорогеновой кислоты, предварительно высушенного при температуре 100-105°C в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят этиловым спиртом до метки и перемешивают.

Раствор СО урсоловой кислоты: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца урсоловой кислоты, предварительно высушенного при температуре 100-105°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.

Раствор СО олеаноловой кислоты: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца олеаноловой кислоты, предварительно высушенного при температуре 100-105°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.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 10%.

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

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – 3,5%.

Измельченность сырья. *Измельченное сырье* - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм не более 10%, частиц, проходящих сквозь сито $d=0,5$ мм не более 4%.

Порошок - измельченных частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм - не более 10%; измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,18 мм - не более 4%.

Посторонние примеси.

Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее). Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 10 %.

Органическая примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок - не более 1,0%.

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок - не более 0,5%.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье* – содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид не менее 2,0 %.

Приготовление раствора алюминия хлорида 3%.

5,4 г алюминия хлорида 6- водного (ГОСТ 3759-75) растворяют в спирте этиловом 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этим же растворителем до метки. Срок годности раствора 1 месяц при хранении в хорошо укупоренной таре.

Аналитическую пробу сырья 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 250 мл, прибавляют 50 мл 80 % этилового спирта,

присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Полученное извлечение осторожно фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу на 100 мл, избегая попадания частиц сырья в воронку. К оставшемуся в колбе сырью прибавляют 50 мл 80 % этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 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 100 мл (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, 2 мл 3% спиртового раствора хлорида алюминия, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят раствор до метки этиловым спиртом 95% (раствор В). Через 45 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты, доведенный этиловым спиртом 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{E \cdot m \cdot V \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

E – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 380;

m – навеска сырья, в граммах;

V – объем исследуемого раствора, взятого для анализа, мл;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Цельное сырье, измельченное сырье – содержание сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту не менее 1,0 %.

Приготовление раствора СО урсоловой кислоты.

0,05 г (точная навеска) стандартного образца урсоловой кислоты, предварительно высушенного при температуре 100-105°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.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. В колбу объемом 50 мл вносят 0,1 г сырья, добавляют 10 мл смеси 70% этилового спирта с ацетоном в соотношении 1:3. Выдерживают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Экстракт фильтруют в колбу на 150 мл и добавляют к нему 100 мл подкисленного раствора воды (Ph=1). Полученный раствор фильтруют и к осадку добавляют 25 мл смеси аммиачный буфер : вода (1:1). 25 мл полученного раствора перемешают в мерную колбу на 50 и доводят до метки смесью аммиачный буфер : вода (1:1). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 214 нм с использованием кюветы 10 мм. В качестве раствора сравнения используется смесь аммиачного буфера с водой в соотношении 1:1.

Для расчёта концентрации с использованием стандартного вещества измеряют оптическую плотность спирто-ацетонового раствора СО урсоловой кислоты в смеси аммиачный буфер : вода (1:1). Содержание суммы сапонинов (X) в пересчете на урсоловую кислоту и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times m_0 \times 50 \times 100}{A_0 \times m \times V_0 \times (100 - W)} \quad (5), \text{ где}$$

A - оптическая плотность анализируемого раствора;

A₀ - оптическая плотность СО урсоловой кислоты в смеси 70% этиловый спирт : ацетон (1:3);

m - навеска сырья в граммах;

m₀ - навеска СО урсоловой кислоты в граммах;

V_0 – объем раствора СО урсоловой кислоты в миллилитрах;

W - потеря в массе сырья при высушивании, %.

Определение диагностически значимых признаков. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – содержание диагностически значимых признаков (ДЗП) не менее 70 %.

Аналитическую пробу сбора измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. 1-2 г готового порошка помещают в пробирку, закрывают пробкой и перемешивают содержимое путем многократного переворачивания до получения равномерной смеси. На предметное стекло, размеченное на квадраты (16 квадратов при величине покровного стекла 24x24мм) наносят каплю 5 % раствора натрия гидроксида. Кончик препаравальной иглы обмакивают в каплю раствора натрия гидроксида и погружают в порошок сбора (на глубину 1,5 – 2 мм). Количество порошка на кончике иглы смывают в капле на предметном стекле, накрывают покровным стеклом и прогревают для просветления над пламенем горелки. После охлаждения высасывают фильтровальной бумагой раствор натрия гидроксида, добавляя с другой стороны стекла пипеткой 33% раствор глицерина. Готовый препарат помещают под микроскоп и подсчитывают при увеличении 15×1,5×10 (или при другом удобном увеличении) количество диагностически значимых признаков (ДЗП) и незначимых признаков (НЗП). Диагностически значимыми признаками побегов боярышника пенсильванского являются: обрывки верхнего эпидермиса со слабонзвилистыми стенками, четковидными утолщениями и со складчатой кутикулой, извилистые клетки нижнего эпидермиса с погруженными устьицами и аномоцитным типом устьичного аппарата, с простыми одноклеточными волосками и обрывками эпидермиса с основанием волоска с розеткой клеток, многоклеточные железки с бурым содержимым, друзы оксалата кальция и кристаллоносная обкладка.

$$X = \frac{ДЗП \cdot 100}{ДЗП + НЗП}, \text{ где}$$

ДЗП – количество в микропрепарате диагностически значимых признаков;

НЗП – количество в микропрепарате незначимых признаков.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

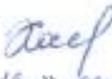
Срок годности. 3 года

Фармакологическая группа. Антиангинальное средство растительного происхождения

Зав. кафедрой фармакогнозии
и ботаники ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
профессор, д. фарм. н.


Н.В. Кудашкина
« 19 » сентября 2023 г.

Профессор кафедры фармакогнозии
и ботаники ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
д. фарм. н.


С.Р. Хасанова
« 19 » сентября 2023 г.

Ассистент кафедры фармакогнозии
и ботаники ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,


А.А. Павлова
« 19 » сентября 2023 г.

«УТВЕРЖДАЮ»



И.о. проректора по научной и
международной деятельности,
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

М.Ф. Кабирова

« 30 » 01 2024 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Павловой Алии Аликовны на тему: «Фармакогностическое исследование боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe» по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармакогнозии и ботаники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе д.фарм.н., профессора Кудашкиной Н.В., д.фарм.н., профессора Пупыкиной К.А., к.фарм.н., доцента Галиахметовой Э.Х. подтверждает использование результатов, полученных Павловой Алией Аликовной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Фармакогностическое исследование боярышника пенсильванского *Crataegus pennsylvanica* Ashe», в курсе обучения студентов фармацевтического, медико-профилактического факультетов на кафедре фармакогнозии и ботаники.

Д.фарм.н., профессор

Кудашкина Н.В.

Д.фарм.н., профессор

Пупыкина К.А.

К.фарм.н., доцент

Галиахметова Э.Х.

**Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение**



**«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)**

Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП - 3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

27.12.2023	W23077232	2023135345
<i>Дата поступления (дата регистрации)</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

<p>ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ <small>(дата регистрации) оригиналом документов заявки</small></p>	<p>(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №</p>	<p>ВХОДЯЩИЙ №</p>
<p><small>(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу</small></p>		
<p><input type="checkbox"/> (86) <small>(числовой код заявки международной заявки и дата международной заявки, дата окончания национальных исключительных прав)</small></p> <p><input type="checkbox"/> (87) <small>(номер и дата международной публикации международной заявки)</small></p> <p><input type="checkbox"/> (96) <small>(номер европейской заявки и дата ее подачи)</small></p> <p><input type="checkbox"/> (97) <small>(номер и дата публикации европейской заявки)</small></p>	<p>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ <small>(почтовый адрес, факс и электронная почта заявителя)</small> 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3, Кабинова Милуша Фаузиевна (450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3, Kabirova Milusha Fauziyevna)</p> <p>Телефон: 83472729872 Факс: Адрес электронной почты: if@fips.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ <small>(указывается при подаче заявки на секретное изобретение)</small></p>	
<p>З А Я В Л Е Н И Е о выдаче патента на изобретение</p>	<p>В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация</p>	
<p>(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ САПОННОВ В ПОБЕГАХ БОЯРЫШНИКА ПЕНСИЛЬВАНСКОГО</p>		
<p>(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (физическое или юридическое лицо) (последнее – при наличии) <small>(физическое лицо или коллективное юридическое лицо (общество, учреждение, ассоциация, фонд, фирма, партнерство или другое юридическое лицо, включая органы в коммунальном хозяйстве))</small> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» Министерства здравоохранения Российской Федерации <small>(Federalnoe gosudarstvennoe budzhetnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya «BASHKIRSKIIH GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKIIH UNIVERSITET» Ministerstva zdorovookhraneniya Rossiiskoi Federatsii)</small> 450008, Российская Федерация, 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3 (450008, Rossiyskaya Federatsiya, 450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3)</p>		<p>ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ</p> <p>ОГРН 1 02 02 02 56113 6 КПП 02 74 01 001 ИНН 02 74 02 308 8</p> <p>СНИЛС ДОКУМЕНТ (код, серия, номер)</p> <p>КОД СТРАНЫ (если не установлен) RU</p>
<p><input type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование)</p> <p><input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту <input type="checkbox"/> созданию о предоставлении субсидии <input type="checkbox"/> гранту <input type="checkbox"/> государственному заданию <input type="checkbox"/> инициативному заданию заказчик работ (указать наименование)</p>		

Общее количество документов в листах	29	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)		Автоматизированная система
Количество платёжных документов	1	
<p>Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fips.ru/registers-web</p>		