

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ПЛОДАХ БОЯРЫШНИКА И ПРЕПАРАТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ

© Е. П. Шефер, Н. П. Антонова, Н. Е. Семенова, Т. А. Голомазова,
С. Д. Кахраманова, С. С. Прохвятилова, С. А. Кучугурин

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127051, г. Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
E-mail: shefer@expmed.ru

Поступила в Редакцию 21 мая 2024 г.

После доработки 26 июня 2024 г.

Принята к публикации 2 августа 2024 г.

РЕЗЮМЕ

Введение. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах и настойке боярышника в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации проводится методом спектрофотометрии. Используемая методика имеет существенные недостатки, такие как низкая селективность, невозможность разделять компоненты действующих веществ и недостаточная точность. Эти недостатки могут быть устранены при определении с привлечением иных инструментальных методов. Ранее нами была предложена методика количественного определения действующих веществ в цветках боярышника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Аналогичная методика может быть разработана и для определения суммы флавоноидов в плодах и настойке боярышника, так как химический состав цветков и плодов боярышника схож. **Цель.** Разработка ВЭЖХ-методики определения суммы флавоноидов в лекарственных средствах «Боярышника плоды» и «Боярышника настойка»; определение подходов к гармонизации методов количественного определения действующих веществ плодов боярышника с требованиями ведущих фармакопей. **Материалы и методы.** Объектами исследования служили образцы плодов и настоек боярышника отечественных производителей. Исследование проводили следующими методами: ВЭЖХ на хроматографе Infinity II 1260 DAD, спектрофотометрией на спектрофотометре Agilent 8453E, кислотно-основным титрованием. В процессе пробоподготовки использовали прибор для непрерывной экстракции. Влажность плодов определяли в термошкафу. В качестве стандартного образца использовали кверцетин дигидрат квалификации EP CRS. **Результаты.** Комплексный анализ подходов ведущих фармакопей к стандартизации плодов боярышника по показателю «Количественное определение» показал перспективность разработки селективной методики определения флавоноидов методом ВЭЖХ, а также целесообразность нормирования процианидинов в пересчете на цианидина хлорид. Введение методики определения органических кислот в плодах боярышника в фармакопейные требования, по аналогии с требованиями Фармакопеи КНР, признано излишним, поскольку содержание этой группы веществ в плодах официнальных видов значительно ниже, чем в плодах боярышника, описанных в Фармакопее КНР. **Выводы.** Предложена и валидирована ВЭЖХ-методика определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в плодах и настойке боярышника, рекомендовано включение определения содержания процианидинов в пересчете на цианидина хлорид в фармакопейную статью «Боярышника плоды».

Ключевые слова: боярышника плоды; *Crataegi fructus*; ВЭЖХ; высокоэффективная жидкостная хроматография; флавоноиды; кверцетин; гиперозид; процианидины; спектрофотометрия; количественное определение; кислотно-основное титрование; стандартизация; гармонизация; фармакопея

Для цитирования: Шефер Е.П., Антонова Н.П., Семенова Н.Е., Голомазова Т.А., Кахраманова С.Д., Прохватилова С.С., Кучугурин С.А. Методы количественного определения действующих веществ в плодах боярышника и препаратах на его основе // Журнал прикладной химии. 2024. Т. 97. № 3. С. 198–208. <https://doi.org/10.31857/S0044461824030034>.

DOI: 10.31857/S0044461824030034; EDN: NPVTZE

METHODS TO QUANTIFY ACTIVE SUBSTANCES IN HAWTHORN BERRIES AND HAWTHORN BERRY MEDICINAL PRODUCTS

© Elena P. Shefer, Natalia P. Antonova, Natalia E. Semenova, Tatyana A. Golomazova, Sabina D. Kakhramanova, Svetlana S. Prokhvatilova, Sergey A. Kuchugurin

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation
shefer@expmed.ru

Received 21 May 2024

Revised 26 June 2024

Accepted 2 August 2024

ABSTRACT

Introduction. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation requires that the total flavonoid content in hawthorn berries and hawthorn tincture should be determined using spectrophotometry. The current analytical procedure has significant limitations, including low selectivity, poor accuracy, and inability to determine the components of active substances individually. These limitations can be eliminated by using other instrumental methods. In a previous paper, the authors proposed an analytical procedure for the quantitative determination of active substances in hawthorn flowers by high-performance liquid chromatography (HPLC). With the similar chemical compositions of hawthorn flowers and berries, a similar analytical procedure can be developed to determine the total flavonoid content in hawthorn berries and hawthorn tincture. **Aim.** This study aimed to develop an HPLC procedure to determine the total flavonoid content in hawthorn berries and hawthorn tincture; additionally, the authors aimed to suggest approaches to harmonising the methods for the quantitative determination of active substances in hawthorn berries with the methods outlined in the leading pharmacopoeias. **Materials and methods.** The study focused on the Hawthorn Berries and Hawthorn Tincture herbal medicines from Russian manufacturers. The authors used HPLC on an Infinity II 1260 DAD chromatograph, spectrophotometry on an Agilent 8453E spectrophotometer, and acid–base titration. The sample preparation procedure involved using a continuous extraction apparatus. The loss on drying was determined using a drying chamber. Quercetin dihydrate CRS (European Pharmacopoeia) was used as a reference standard. **Results.** A comprehensive review of the approaches of the leading pharmacopoeias to the standardisation of assays for hawthorn berries showed the potential for developing a selective analytical procedure for flavonoid quantification by HPLC. The review demonstrated that it was feasible to standardise procyanidins, expressed as cyanidin chloride. The authors considered it unnecessary to introduce an analytical procedure to determine the organic acids in hawthorn berries, similar to that required by the Pharmacopoeia of the People's Republic of China, in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation since the berries of Russian officinal species have much lower organic acid levels than the berries of the hawthorn species described in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China. **Conclusions.** The authors suggested and validated an HPLC procedure to determine the total flavonoid content, expressed as hyperoside, in hawthorn berries and hawthorn tincture and recommended that the pharmacopoeia monograph on hawthorn berries should include the quantitative determination of procyanidins, expressed as cyanidin chloride.

Keywords: hawthorn berries; *Crataegi fructus*; HPLC; high-performance liquid chromatography; flavonoids; quercetin; hyperoside; procyanidins; spectrophotometry; assay; acid–base titration; standardisation; harmonisation; pharmacopoeia

For citation: Shefer E. P., Antonova N. P., Semenova N. E., Golomazova T. A., Kahramanova S. D., Prokhvatilova S. S., Kuchugurin S. A. Methods to quantify active substances in hawthorn berries and hawthorn berry medicinal products // Russ. J. Appl. Chem. 2024. V. 97. N 3. P. 198–208. <https://doi.org/10.31857/S0044461824030034>.

Введение

Препараты боярышника относятся к группе кардиотонических средств растительного происхождения и применяются в составе комплексной терапии легких форм функциональных нарушений деятельности сердечно-сосудистой системы.¹ В качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) заготавливают цветки и плоды боярышника. Однако сбор цветков осложняется коротким сроком их цветения, 10–12 дней, при этом рекомендовано собирать цветки в начале цветения. Плоды же пригодны к заготовке со второй половины августа до октября, после их полного созревания.² Таким образом, использование плодов боярышника как ЛРС является более перспективным с экономической точки зрения, о чем свидетельствует преобладание лекарственных препаратов из плодов боярышника среди препаратов на основе боярышника. Так, количество регистрационных удостоверений, выданных на ЛРС и лекарственные растительные препараты (ЛРП) на основе плодов боярышника, значительно превышает количество регистрационных удостоверений на ЛРС и ЛРП на основе цветков боярышника (30 против 2).³ В табл. 1 представлена обобщенная информация о комбинированных препаратах с седативным и кардиотоническим действием, в состав которых входят плоды боярышника. Наиболее востребованными являются ЛРП «Боярышника плоды» в цельном и измельченном виде и «Боярышника настойка».

Боярышника плоды (*Crataegi fructus*) собирают в фазу полного созревания и высушивают. Заготовка сырья разрешена от дикорастущих или культивируемых кустарников 12 видов боярышника (сем. розоцветных — *Rosaceae*).⁴ Плоды содержат флавоноиды (основные — гиперозид, кверцетин и витексин), процианидины различной степени полимеризации, органические кислоты (лимонная, урсоловая, катехиновая, кофейная, хлорогеновая, яблочная), тритерпеновые и флавоновые гликозиды, кароти-

ноиды, пектины, сахара, витамины; в семенах обнаружены жирные масла и бета-ситостерин [1–3]. Стандартизация плодов боярышника проводится по процианидинам и гиперозиду, представляющему собой гликозид кверцетина [4–8].

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации стандартизация ЛРС боярышника плоды⁵ и боярышника настойка⁶ проводится методом дифференциальной спектрофотометрии по сумме флавоноидов в пересчете на гиперозид. Нормы содержания действующих веществ составляют «не менее 0.04%» и «не менее 0.003%» соответственно. Методика основана на определении комплекса полифенольных соединений в спиртовых экстрактах боярышника с алюминия хлоридом по удельному показателю поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом. К недостаткам данной методики можно отнести низкую селективность, невозможность отдельно определять компоненты основных действующих веществ и низкую точность, так как не предусмотрено использование стандартного образца в аналогичных условиях испытания.

Существуют примеры более селективного определения флавоноидов боярышника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Так в Фармакопею США⁷ включена монография на смесь цветков с листьями, которые стандартизуют по содержанию С-гликозилированных флавонов в пересчете на витексин и О-гликозилированных флавонов в пересчете на гиперозид, определенных методом ВЭЖХ. Ранее нами была предложена ВЭЖХ-методика количественного определения действующих веществ в препарате «Боярышника цветки» [9]. Близкий химический состав цветков и плодов боярышника позволяет считать перспективным разработку аналогичной методики определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид для плодов и настойки боярышника.

Монографии на плоды боярышника включены в Европейскую фармакопею и Государственную фарма-

¹ https://www.vidal.ru/drugs/crataegi_fructus__18061
<https://grls.rosminzdrav.ru>

² Атлас лекарственных растений России / Под ред. Н. И. Сидельникова. М.; 2021.

³ <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁴ ФС.2.5.0061 Боярышника плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

⁵ Там же.

⁶ ФС.3.4.0001.18 Боярышника плодов настойка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

⁷ Hawthorn leaf with flower. Monograph. United States Pharmacopeia. 41th Ed.

Таблица 1
Лекарственные препараты на основе боярышника плодов

Лекарственная форма	Состав препарата	Фармакотерапевтическая группа
Плоды цельные/измельченные	Боярышника плоды	Кардиотоническое средство растительного происхождения
Настойка	Боярышника плоды	Средства для лечения заболеваний сердца; другие препараты для лечения заболеваний сердца
Капли для приема внутрь	Боярышника плодов настойка + Валерианы лекарственной корневищ с корнями настойка + Натрия бромид + [Рацементол]	Седативное средство растительного происхождения
Эликсир	Аронии черноплодной плоды + Березы почки + Боярышника плоды + Боярышника цветки + Сосны кедровой сибирской семена + [Мед]	Общетонизирующие средства и адаптогены
Настойка	Боярышника плоды + Донника трава + Кориандра плоды + Мелиссы лекарственной трава + Овса посевного зерно + Пустырника трава + Хмеля соплодия	Седативное средство растительного происхождения
Раствор для приема внутрь	Боярышника плодов экстракт + Крапивы двудомной листьев экстракт + Ландыша травы настойка	Кардиотоническое средство растительного происхождения
Экстракт для приема внутрь	Боярышника плоды + Мелиссы лекарственной трава + Пустырника трава + Шиповника плоды + Эхинацеи пурпурной трава	Седативное средство растительного происхождения

копею Республики Беларусь¹ (ГФ РБ), где в цельных плодах определяют содержание процианидинов в пересчете на цианидина хлорид спектрофотометрическим методом с нормой «не менее 0.06%». В ГФ РБ дополнительно предусмотрено спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид по методике, аналогичной методике ГФ РФ.

В Фармакопее КНР описаны плоды боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida* Vge), отличающегося от европейских видов боярышника. Данный вид произрастает на территории России в Приморье и Приамурье, за ее пределами — в Китае и Корее. Согласно фитохимическим исследованиям в плодах боярышника перистонадрезанного обнаружены терпеноиды, фенилпропаноиды, лигнаны, флавоноиды, тритерпеновые кислоты [10]. В монографию Фармакопее КНР² включено определение органических кислот в пересчете на лимонную кислоту ти-

риметрическим методом с нормой «не менее 5.0%» и экстрактивных веществ, растворимых в спирте, которых должно быть не менее 21.0%. Для нас представляло интерес оценить содержание органических кислот в плодах боярышника, заготавливаемых в Российской Федерации, по методике Фармакопее КНР с целью возможного использования ее для стандартизации.

Цель работы — разработка селективной ВЭЖХ-методики определения суммы флавоноидов в лекарственных средствах «Боярышника плоды» и «Боярышника настойка»; определение подходов к гармонизации методов количественного определения действующих веществ плодов боярышника с требованиями ведущих фармакопей.

Задачи исследования:

— провести количественную оценку суммы флавоноидов и процианидинов в плодах боярышника методом спектрофотометрии, органических кислот методом кислотно-основного титрования с использованием зарубежных и отечественных фармакопейных методик;

— разработать селективную методику определения суммы флавоноидов в плодах и настойке боярышника методом ВЭЖХ.

¹ Monograph 07/2016:1220 Hawthorn berries (*Crataegi fructus*). European Pharmacopoeia. Strasbourg; 2016.

Государственная фармакопея Республики Беларусь. Изд. 2. Молодечно; 2016.

² Monograph *Crataegi fructus*. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. V. 1a. Beijing; 2020.

Материалы и методы

Объекты исследования. Образцы препаратов «Боярышника плоды, плоды цельные» (образец 1, образец 2, образец 3) и «Боярышника настойка» (образец 4, образец 5) нескольких отечественных производителей.

Методы исследования. Исследование осуществляли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием на жидкостном хроматографе Infinity II 1260 DAD (Agilent); спектрофотометрией с регистрацией УФ-спектров на спектрофотометре Agilent 8453E и методом кислотно-основного титрования с индикатором. В процессе пробоподготовки для метода ВЭЖХ использовали прибор для непрерывной экстракции (прибор Сокслета), предназначенный для экстракции веществ из твердых образцов с помощью летучих растворителей. Влажность образцов препарата боярышника плодов определяли в термощкафу суховоздушном ED53 (Binder GmbH).

В качестве стандартного образца при определении методом ВЭЖХ использовали кверцетина дигидрат (EP CRS, каталожный № Y0001009 содержание действующего вещества 81.7%). Готовили метанольный раствор с концентрацией 0.5 мг·мл⁻¹.

Статистическую оценку экспериментальных данных и валидацию разработанной ВЭЖХ-методики проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» и ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV изд. соответственно.

Обсуждение результатов

Оценка объектов испытания по утвержденным фармакопейным методикам для дальнейшего заключения о целесообразности включения методик в фармакопейную статью на плоды боярышника при актуализации ГФ РФ. Методом спектрофотометрии определяли две группы веществ в плодах боярышника: процианидины в пересчете на цианидина хлорид и сумму флавоноидов в пересчете на гиперозид. Образцы препарата предварительно измельчали до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, и определяли влажность гравиметрическим методом.

Определение флавоноидов проводили после трехкратной экстракции образца препарата этиловым спиртом 96% при нагревании на кипящей водяной бане и реакции комплексообразования флавоноидов

с алюминия хлоридом по методике ГФ РФ.¹ Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора в видимой области спектра при длине волны 410 нм (рис. 1). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье составило 0.04% (образец 1) и 0.08% (образец 2).

Процианидины извлекали спиртом этиловым 70%, подвергали кислотному гидролизу и трижды экстрагировали полученные растворы бутанолом. Измеряли оптическую плотность объединенных органических фракций при длине волны 555 нм (рис. 1). Содержание процианидинов рассчитывали с использованием удельного показателя поглощения цианидина хлорида, равного 1200, в соответствии с методикой Европейской фармакопеи.² Результат для образцов 1 и 2 составил 0.07 и 0.12% соответственно.

Органические кислоты в пересчете на лимонную кислоту в боярышника плодах определяли, соблюдая условия и режим экстракции, приведенные в Фармакопее КНР.³ Около 1 г (точная навеска) образца препарата настаивали в 100 мл воды при комнатной температуре 4 ч при периодическом перемешивании. Затем фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили водой до метки. К 25 мл полученного раствора прибавляли 50 мл воды и титровали 0.1 М раствором натрия гидроксида с индикатором фенолфталеин до малиново-красного окрашивания. Методика, приведенная в Фармакопее КНР, требовала доработки, поскольку из-за низкого содержания органических кислот в плодах боярышника фармакопейных видов (около 1.4%) объем титранта составил менее 1.0 мл. Увеличение навески образца приводило к усилению окраски испытуемого раствора и не позволяло адекватно оценить конечную точку титрования. Наиболее оптимальными оказались условия определения органических кислот, указанные в методике, описанной в ФС.2.5.0093 «Рябины обыкновенной плоды» ГФ РФ XV изд. Содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту составило 1.21% (образец 1) и 1.42% (образец 2). В табл. 2 приведены результаты количественного определения действующих веществ в плодах боярышника по фармакопейным методикам.

¹ ФС.2.5.0061 Боярышника плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

² Monograph 07/2016:1220 Hawthorn berries (*Crataegi fructus*). European Pharmacopoeia. Strasbourg; 2016.

³ Monograph *Crataegi fructus*. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. V. 1a. Beijing; 2020.

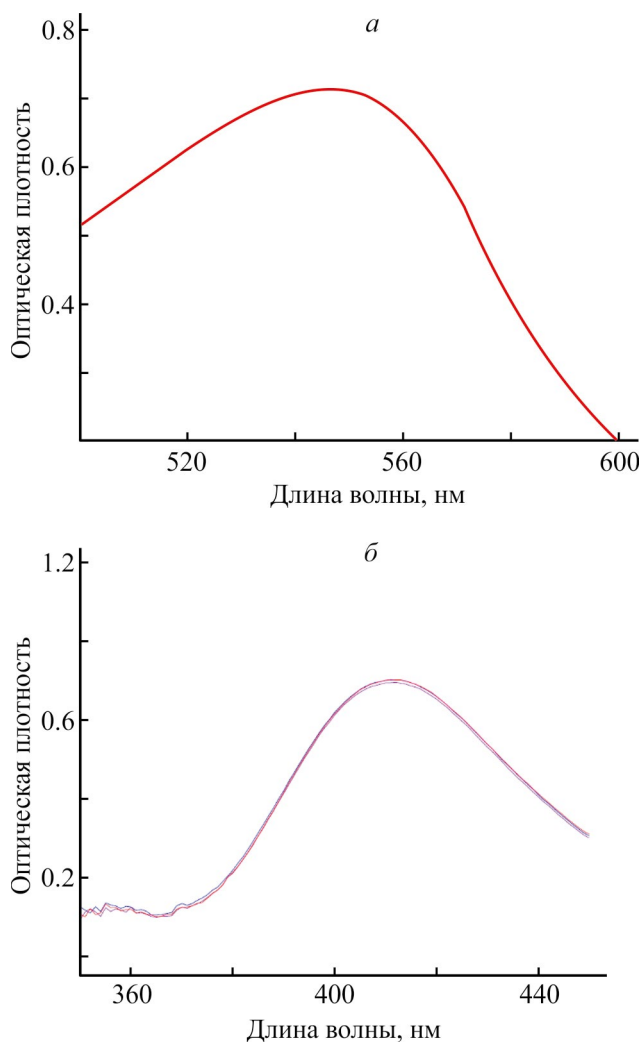


Рис. 1. Спектры испытуемого раствора лекарственного препарата «Боярышника плоды» при определении содержания: *а* — процианидинов в пересчете на цианидина хлорид, *б* — суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид.

На основании проведенной работы был сделан вывод о целесообразности гармонизации фармакопейных требований ГФ РФ с требованиями Европейской фармакопеи и ГФ РБ (методики идентичны) и стандартизации плодов боярышника по содержанию процианидинов. Содержание органических кислот в плодах официальных видов боярышника низкое, и воспроизводимые результаты при определении этой группы веществ получить не удалось. Поэтому определение органических кислот в плодах боярышника считаем избыточным.

Разработка методики определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в плодах боярышника методом ВЭЖХ. Основные этапы пробоподготовки включали экстракцию флавоноидов из

испытуемого образца в аппарате Сокслета, концентрирование пробы и проведение кислотного гидролиза.

Аналитическую пробу, около 10 г (точная навеска) препарата, предварительно измельченную до частиц размером 2 мм, помещали в патрон из фильтровальной бумаги, размещали его в экстракторе аппарата Сокслета с рабочим объемом 500 мл. В колбу-приемник прибавляли 250 мл метанола и экстрагировали в течение 5 ч. Экстракт охлаждали и упаривали под вакуумом до объема 15 мл. Упаренный экстракт количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили метанолом до метки. 20.0 мл полученного раствора переносили в колбу с обратным холодильником, добавляли 2 мл 25% раствора кислоты хлористоводородной и нагревали на водяной бане при температуре 85°C в течение 60 мин. Содержимое колбы охлаждали, переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили метанолом до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр 0.45 мкм CHROMAFIL Xtra PET-45/25.

Хроматографирование проводили на обращеннофазовой колонке Gemini C18, размер колонки 250 × 4.6 мм, размер частиц 5 мкм. Детектирование осуществляли с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 370 нм. Скорость потока составляла 1.5 мл·мин⁻¹, температура колонки 25°C, объем вводимой пробы — 10 мкл, подвижная фаза — смесь метанол:вода:фосфорная кислота концентрированная в соотношении 100:100:1 (об.).

Использовали метод внешнего стандарта. Время удерживания кверцетина в описанных условиях составляло около 10 мин. Расчет проводили по кверцетину (агликон флавоноидов), образовавшемуся после гидролиза. В качестве стандартного раствора использовали 0.005%-ный раствор кверцетина в метаноле. Типичные хроматограммы испытуемого раствора и стандартного образца кверцетина представлены на рис. 2.

В формуле расчета (1) учитывали коэффициент для пересчета кверцетина на гиперозид, равный отношению молекулярных масс гиперозида и кверцетина (1.536).

$$X = \frac{S_1 \cdot a \cdot 25 \cdot 50 \cdot P \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1.536}{S_0 \cdot 100 \cdot m \cdot 20 \cdot 100 \cdot (100 - w)}, \quad (1)$$

где X — содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в препарате, %; S_0 — площадь пика кверцетина на хроматограмме раствора стандартного образца; S_1 — площадь пика кверцетина на хроматограмме испытуемого раствора; a — навеска

Таблица 2

Результаты количественного определения действующих веществ в лекарственном препарате «Боярышника плоды»

Наименование образца	Сумма флавоноидов в пересчете на гиперозид,* %	Содержание процианидинов в пересчете на цианидина хлорид,** %	Органические кислоты в пересчете на яблочную кислоту,*** %
Образец 1, влажность = 10.6%	0.04 (RSD = 2.85%)	0.07 (RSD = 1.14%)	1.16 (RSD = 0.58%)
Образец 2, влажность = 6.5%	0.08 (RSD = 0.64%)	0.12 (RSD = 0.37%)	1.43 (RSD = 1.47%)
Норма содержания	Не менее 0.06	Не менее 0.06	Не менее 5.0

Примечание. RSD — относительное стандартное отклонение.

* Определено методом спектрофотометрии по методике ФС.2.5.0061 Боярышника плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2023.

** Определено методом спектрофотометрии по методике Monograph 07/2016:1220 Hawthorn berries (*Crataegi fructus*). European Pharmacopoeia. 11th Ed. 2016.

*** Определено методом титриметрии по методике Monograph *Crataegi fructus*. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. V. 1a. 2020.

стандартного образца кверцетина, г; m — навеска препарата, г; w — влажность препарата, %; P — содержание действующего вещества в стандартном образце кверцетина, %.

Оценка пригодности хроматографической системы по хроматограмме стандартного образца удовлетворяла требованиям ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография» ГФ РФ XV изд. (значение асимметрии пика кверцетина — 1.02; эффективность колонки по пику кверцетина — 7652 теоретических тарелок; относительное стандартное отклонение площади пика кверцетина для 6 определений — 0.59%).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид составило 0.024%, относительное стандартное отклонение (RSD) = 1.80% (образец 1), 0.043%, RSD = 0.21% (образец 2) и 0.021%, RSD = 1.92% (образец 3).

Разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид была также адаптирована для ЛП «Боярышника настойка». Пробоподготовка заключалась в проведении кислотного гидролиза, концентрировании пробы и хроматографирования полученного испытуемого раствора в условиях, описанных для боя-

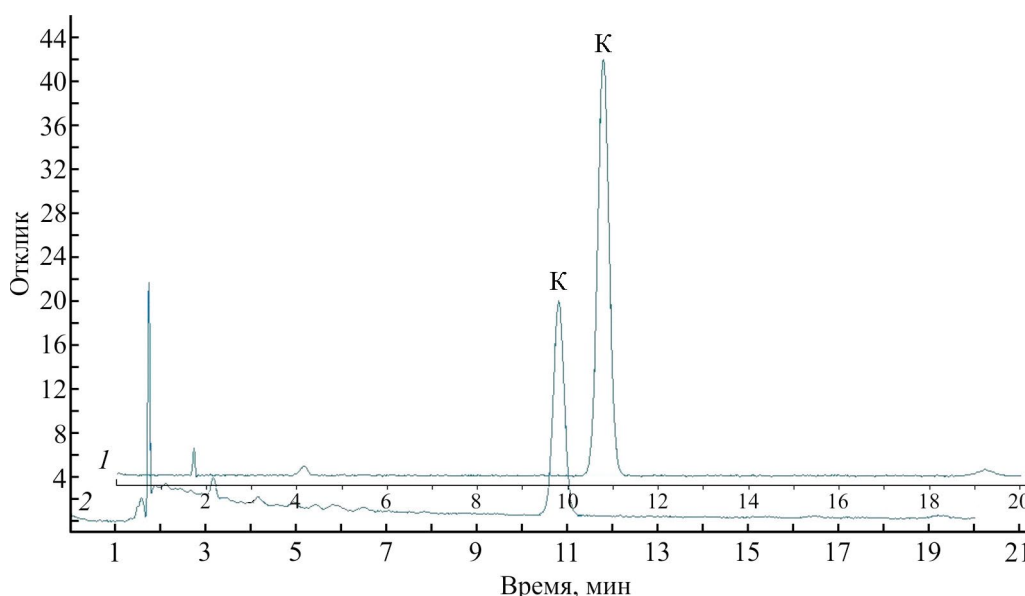


Рис. 2. Хроматограммы стандартного образца кверцетина (I) и испытуемого раствора лекарственного препарата «Боярышника плоды» (2); K — пик, соответствующий кверцетину.

Таблица 3

Данные статистической оценки методики определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в лекарственном препарате «Боярышника настойка»

Наименование образца	Объем выборки n	Среднее значение выборки $\bar{X}$, мг·мл ⁻¹	Стандартное отклонение S	Критерий Стьюдента	Полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата $\Delta\bar{X}$
Образец 4	10	0.02458	0.00064	2.26	0.00045
Образец 5	10	0.01768	0.0006	2.26	0.00004

рышника плодов. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в настойке боярышника составило 0.0025%, $RSD = 3.9\%$ (образец 4) и 0.0020%, $RSD = 0.5\%$ (образец 5) (табл. 3).

В рамках валидационных исследований была проведена оценка специфичности, линейности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности ВЭЖХ-методики определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в ЛС «Боярышника плоды». (табл. 4).

Оценку линейности проводили по стандартному раствору кверцетина. Полученные данные статистически обрабатывали и строили график зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики от 30 до 200%. Зависимость содержания действующих веществ в испытуемом образце (мг·мл⁻¹) от площади пика кверцетина описывалась линейным уравнением. Квадрат

Таблица 4

Результаты валидации аналитической методики количественного определения суммы флавоноидов в лекарственном средстве «Боярышника плоды» в пересчете на гиперозид

Характеристика	Требования	Результат		
Специфичность	Методика позволяет определить конкретное вещество	Время удерживания основного вещества испытуемого раствора соответствует времени удерживания кверцетина на хроматограмме стандартного раствора. На УФ-спектре испытуемого раствора присутствует характерный максимум поглощения (370 нм), совпадающий с максимумом поглощения УФ-спектра стандартного раствора кверцетина		
Линейность	Данные экспериментальных измерений аналитических сигналов 7 проб с различным содержанием определяемых веществ обработаны методом наименьших квадратов с использованием линейной модели: $y = bx + a$ Коэффициент корреляции: $ r \geq 0.99$	Концентрация кверцетина		Площадь пика, у. е.
		мг·мл ⁻¹	%	
		0.0125	30	208.493
		0.0208	50	343.431
		0.0333	80	544.492
		0.0417	100	677.972
		0.0500	120	823.855
		0.0625	150	1012.828
		0.0833	200	1350.893
Аналитическая область	Методика применима в интервале 30–200% от минимального допустимого значения	Уравнение прямой: $y = 16135x + 7.9127$ Коэффициент корреляции: $r^2 = 0.9999$ $ r > 0.99$		
		Соответствует на основании данных по изучению линейности		

Таблица 4 (продолжение)

Характеристика	Требования	Результат		
Прецизионность Повторяемость	% RSD результатов 6 определений количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид должно быть ≤3.0%	Результаты 6 определений количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид:		
		№ определения		Значение
		1		0.0241
		2		0.0238
		3		0.0232
		4		0.0237
		5		0.0240
		6		0.0238
		Среднее значение = 0.0237 S = 0.0003; RSD = 1.32% Доверительный интервал (P = 95%. α = 0.05) ± 0.0003		
		Внутрилабораторная прецизионность	Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения $F = S_1^2/S_2^2$ $F \leq F_{\text{табл}}$	№
1	0.0201%			0.0201%
2	0.0199%			0.0207%
3	0.0200%			0.0208%
S	0.0001			0.00038
S²	0.000000010			0.000000014
$F = 0.000000014/0.000000010 = 14.4$ $F_{\text{табл}}(0.05; 2; 2) = 19.00$ $F < F_{\text{табл}}$ $F = 0.000000014/0.000000010 = 14.4$ $F_{\text{crit}}(0.05; 2; 2) = 19.00$ $F \leq F_{\text{crit}}$				

Примечание. RSD — относительное стандартное отклонение; F , $F_{\text{табл}}$ — критерий Фишера полученный и табличный соответственно; S_1 , S_2 — стандартное отклонение; $P = 95\%$ — доверительная вероятность, $\alpha = 0.05$ — уровень значимости.

коэффициента корреляции (r^2) составил 0.9999 (критерий линейности ≥ 0.99), что подтверждает линейность в рассматриваемом диапазоне.

Прецизионность оценивали для 6 определений для испытуемых растворов со 100% содержанием определяемого вещества с помощью валидированных программ статистической обработки экспериментальных данных Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения.

В ходе проведения валидации методики получены результаты, соответствующие критериям приемлемости. Разработанная методика количественного

определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в боярышника плодах позволяет получать достоверные, воспроизводимые результаты.

Выводы

Проведен комплексный анализ подходов ведущих фармакопей к количественному определению действующих веществ плодов боярышника. Показана целесообразность включения в ФС «Боярышника плоды» определения содержания процианидинов в пересчете на цианидина хлорид по методике Европейской фармакопеи и Фармакопеи Республики Беларусь. Определение органических кислот в пло-

дах боярышника является избыточным, поскольку содержание их в произрастающих в России видах низкое.

Разработана и валидирована селективная методика количественной оценки суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в плодах и настойке боярышника методом ВЭЖХ, получены данные содержания суммы флавоноидов после гидролиза в плодах — «не менее 0.02%» и в настойке «не менее 0.002%». Разработанная методика может быть рекомендована для включения в раздел «Количественное определение» фармакопейных статей «Боярышника плоды» и «Боярышника настойка» Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Информация о вкладе авторов

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е. П. Шефер — написание текста рукописи, анализ и обобщение данных литературы; Н. П. Антонова — концепция и дизайн работы, критический пересмотр его содержания; Н. Е. Семенова — проведение экспериментальных исследований методом ВЭЖХ; Т. А. Голомазова — проведение валидационного исследования и обработка его результатов; С. Д. Кахраманова — проведение экспериментальных исследований методом титриметрии; С. С. Прохвятилова — консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, критический пересмотр содержания текста рукописи; С. А. Кучугурин — проведение экспериментальных исследований методом спектрофотометрии.

Информация об авторах

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

Антонова Наталья Петровна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

Семенова Наталья Евгеньевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6787-0647>

Голомазова Татьяна Александровна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>

Кахраманова Сабина Джейхуневна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8160-7829>

Прохвятилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

Кучугурин Сергей Александрович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9439-9611>

Список литературы

- [1] Морозова Т. В., Куркина А. В., Правдивцева О. Е., Дубищев А. В., Куркин В. А., Зайцева Е. Н. Фармакогностическое и фармакологическое исследование сырья боярышника // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2015. Т. 17. № 5–3. С. 959–963. <https://www.elibrary.ru/wfcbgх>
- [2] Гусалова М. И., Хмелевская А. В., Черчесова С. К. Изучение химического состава плодов боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.) и шиповника коричневого (*Rosa cinnamomica* L.) // Изв. Горск. гос. аграр. ун-та. 2019. Т. 56 (2). С. 111–115. <https://www.elibrary.ru/amivvj>
- [3] Cosmulescu S. N., Trandafir I., Scricciu F., Stoenescu A. M. Content in organic acids of *Mespilus* spp. and *Crataegus* spp. genotypes // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2020. V. 48 (1). P. 171–176. <https://doi.org/10.15835/nbha48111746>
- [4] Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Laakso I., Hiltunen R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1112. N 1–2. P. 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.080>
- [5] Хишова О. М., Бузук Г. Н. Количественное определение процианидинов плодов боярышника // Хим.-фарм. журн. 2006. Т. 40. № 2. С. 20–21. <https://www.elibrary.ru/taligp>
[Khishova O. M., Buzuk G. N. Quantitative determination of procyanidins in hawthorn fruits // Pharm. Chem. J. 2006. V. 40. N 2. P. 79–81. <https://doi.org/10.1007/s11094-006-0063-1>]
- [6] Yang B., Liu P. Composition and health effects of phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus* spp.) of different origins // J. Sci. Food Agric. 2012. V. 92 (8). P. 1578–1590. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5671>
- [7] Orhan I. E. Phytochemical and pharmacological activity profile of *Crataegus oxyacantha* L. (Hawthorn) —

- a cardiotonic herb // *Curr. Med. Chem.* 2018. V. 25. N 37. P. 4854–4865.
<https://doi.org/10.2174/0929867323666160919095519>
- [8] Морозова Т. В., Куркин В. А., Правдивцева О. Е. Актуальные проблемы химической стандартизации сырья лекарственных растений рода боярышник (*Crataegus* L.) // *Фармация и фармакология*. 2018. V. 6 (2). P. 104–120.
<https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-2-104-120>
- [9] Антонова Н. П., Шефер Е. П., Семенова Н. Е., Калинин А. М., Прохватилова С. С., Моргунов И. М. Применение метода ВЭЖХ для экспертизы и стандартизации лекарственного растительного сырья «Боярышника цветки» // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019. Т. 9. № 3. С. 177–183.
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-177-183>
- [10] Буданцев А. Л., Беленовская Л. М., Битюкова Н. В. Компонентный состав и биологическая активность *Crataegus pinnatifida* (Rosaceae) (обзор) // *Химия раст. сырья*. 2020. Т. 4. С. 31–58.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2020046612>
-