

*На правах рукописи*

Петрова Диляра Наильевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА РЯДА  
ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Самара - 2015

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент  
Хазиев Рамиль Шамилович

**Официальные оппоненты:**

Куркина Анна Владимировна, доктор фармацевтических наук; государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, доцент кафедры

Юсупова Луиза Магдануровна, доктор химических наук, профессор; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», кафедра химии и технологии органических соединений азота, профессор кафедры

**Ведущая организация:**

государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль

Защита состоится 16 октября 2015 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К.Маркса, 165 Б)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан «    » июля 2015 года

Учёный секретарь диссертационного совета  
кандидат фармацевтических наук,  
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Флавоноидсодержащие растения составляют одну из наиболее обширных и популярных групп лекарственных растений как отечественной, так и мировой медицины. Тенденцией последних лет является переход к стандартизации по содержанию флавоноидов растений, действующими веществами которых ранее признавались биологически активные соединения иной природы ((Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркина А.В., 2012; Самылина И.А. и др., 2003; 2010). Выходящие в последние годы нормативные документы на лекарственное растительное сырье ведущих отечественных производителей постоянно увеличивают этот список (трава душицы, трава череды, цветки календулы, кукурузные рыльца, листья крапивы и др.).

Основным методом стандартизации ЛРС, содержащего флавоноиды в отечественной, да и в зарубежной практике стал в последнее время метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на цветной реакции флавоноидов с хлоридом алюминия. Если в одиннадцатом издании отечественной фармакопеи из 11 видов ЛРС, стандартизовавшихся по содержанию флавоноидов этим методом проводилось определение в 3 видах сырья, то во вновь вышедших ФСП на 10 фармакопейных видов сырья во всех случаях предлагается именно этот способ определения. В Европейской фармакопее из 18 флавоноидных растений, 8 стандартизуются этим методом. Однако в подходах российской НД и Европейской фармакопеи к определению флавоноидов в ЛРС имеются различия. В отечественной практике используется индивидуальный подход к каждому виду сырья, для которого подбирается режим экстракции флавоноидов, условия проведения реакции с хлоридом алюминия, определяется максимум поглощения продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия и основной флавоноид, на который будет пересчитываться содержание суммы флавоноидов. В Европейской фармакопее для большой группы сырья используется унифицированная методика, по которой навеску сырья подвергают кислотному гидролизу в среде ацетона, полученные агликоны экстрагируют этилацетатом и измеряют оптическую плотность комплекса агликонов с хлоридом алюминия. Для расчетов используют удельный показатель поглощения гиперозида или изокверцитрина равный 500. Отечественные методики отличаются большой вариабельностью в режимах экстракции флавоноидов (зачастую достаточно длительных – от 1 часа до 2-х и более), разнообразием в использовании референтного флавоноида (в качестве ГСО или применения для расчетов его удельного показателя поглощения), выбор которого не всегда оправдан, причем зачастую это приводит к конечным результатам, которые могут отличаться от истинного в разы.

В общепринятом и фактически ставшим классическим, методе определения флавоноидов в растительном сырье, обнаруживается резервы для совершенствования, конечной целью которых, должна стать унификация подходов к определению флавоноидов в различных видах сырья. Это возможно, прежде всего, в оптимизации процедуры экстракции, переходе от длительных режимом к экспрессным и доказательном выборе референтного флавоноида, удельный показатель поглощения которого будет использоваться для расчетов.

**Степень разработанности темы.** Совершенствование анализа флавоноидсодержащих растений является важным разделом современных

исследований лекарственного растительного сырья, что связано и с широким ассортиментом данной группы лекарственных растений и с их значением с терапевтической точки зрения. Этой проблемой занимаются большие научные школы, в частности ученые Самарского медицинского университета под руководством профессора В.А. Куркина (Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева, В.Б. Браславский, А.В. Куркина и др.), большое количество работ по этой проблематике выполнено под руководством профессоров И.А. Самылиной, А.А. Сорокиной, Т.Л. Киселевой, В.Н. Бубенчиковой и др. Результаты этих исследований нашли отражение в проектах фармакопейных статей на флавоноидсодержащие виды сырья для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания. Вместе с тем исследований по разработке экспрессных методов определения флавоноидов в растительном сырье почти нет.

### **Цели и задачи исследования.**

**Цель работы:** Совершенствование определения флавоноидов в различных видах растительного сырья методом дифференциальной спектрофотометрии.

Для достижения поставленной цели следовало решить следующие **задачи**:

1. Оптимизировать режим экстракции флавоноидов в рамках аналитической методики из следующих видов флавоноидсодержащего сырья:
  - 1) травы зверобоя продырявленного и пятнистого;
  - 2) травы горца птичьего;
  - 3) травы душицы;
  - 4) травы тимьяна ползучего (чабреца)
  - 5) листьев березы повислой;
  - 6) цветков календулы;
  - 7) цветков бессмертника песчаного.
2. Определить при помощи метода ВЭЖХ природу доминирующего флавоноида в следующих видах сырья:
  - 1) траве зверобоя продырявленного и пятнистого;
  - 2) траве душицы;
  - 3) траве тимьяна ползучего (чабреца);
  - 4) листьях березы повислой.
3. На основании экспериментальных данных предложить модель, описывающую закономерности экстракции флавоноидов из растительного материала.
4. Определить возможность водной экстракции флавоноидов в рамках аналитической методики для стандартизации сырья по содержанию флавоноидов, переходящих в водные извлечения на примере травы фиалки трехцветной.
5. Определить возможность водной экстракции флавоноидов для препаративного выделения из растительного материала на примере листьев амаранта багряного.
6. Оценить целесообразность стандартизации листьев амаранта багряного по содержанию суммы флавоноидов, при использовании их в качестве кормовой добавки в животноводстве.

**Научная новизна результатов исследования заключается** в получении данных о характере экстракции флавоноидов из растительного сырья кипящим растворителем.

На основании экспериментальных данных построена математическая модель, объясняющая закономерности быстрой экстракции флавоноидов из растительного материала отсутствием взаимодействия целевых веществ с внутренними структурами сырья (адсорбционные эффекты) и, во-вторых, образованием в результате измельчения сырья фракции так называемых “свободных” соединений, выходящих в раствор очень быстро. Была показана целесообразность отказа от продолжительной исчерпывающей экстракции флавоноидов в пользу экспрессных вариантов неполного извлечения флавоноидов с использованием в расчетных формулах соответствующих рассчитанных поправочных коэффициентов. Для пяти из исследованных видов сырья был определен доминирующий флавоноид и предложено использовать для расчетов значения его удельного показателя поглощения, взамен используемых в официальных нормативных документах, что существенно повышает достоверность анализа. Были исследованы технологические параметры, влияющие на процесс водной экстракции флавоноидов из растительного сырья, и показано, что единственным значимым фактором, влияющим на него, является соотношения сырья и растворителя, что в свою очередь позволило предложить экспресс-метод определения водорастворимых флавоноидов. Закономерности, выявленные при разработке аналитической методики определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки, позволили разработать новый способ получения флавоноидов (технического рутина) из листьев амаранта багряного на основе водной экстракции.

**Практическая значимость** полученных результатов состоит в разработке экспресс-методов количественного определения флавоноидов в 8 видах лекарственного растительного сырья, позволивших существенно сократить время анализа. Разработанные методики определения флавоноидов были апробированы в Казанском филиале государственного бюджетного учреждения «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» и на ОАО «Татхимфармпрепараты» и получили положительные оценки. Результаты исследований внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии фармацевтического факультета с курсами фармакогнозии и ботаники Казанского государственного медицинского университета. Подготовлены проекты изменений для внесения в действующие нормативные документы на соответствующие виды лекарственного растительного сырья.

Подготовлена заявка на патент на новый способ получения суммы флавоноидов (технического рутина) из листьев амаранта багряного.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой являлись отечественные и зарубежные исследования по количественному определению суммы флавоноидов в растительном сырье. Был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; выбраны объекты и методы исследования (ВЭЖХ, УФ-спектрометрия). Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Экспресс-методы количественного определения флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого, траве горца птичьего, траве душицы, траве чабреца, цветках календулы, цветках бессмертника песчаного, листьях березы, листьях амаранта багряного.

2. Математическая модель быстрой однократной экстракции флавоноидов из растительного сырья кипящим растворителем.

3. Экспресс-метод количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки.

4. Способ препаративного выделения суммы флавоноидов (технического рутина) из листьев амаранта багряного на основе кратковременной водной экстракции сырья.

5. Влияние флавоноидов, выделенных из амаранта багряного на рост и иммунологические показатели белых крыс, как фактора подтверждающего рациональность стандартизации этого сырья как кормовой добавки в животноводстве по содержанию данной группы соединений.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных, современных методах исследования и статистической обработке результатов. В работе применено построение математических моделей, использованы методы математического планирования эксперимента. Статистическую обработку данных ( $P=95\%$ ) проводили с помощью программ «Excel 7.0» и «Statistica 6.0».

Материалы работы доложены и обсуждены на научно–методической конференции «Гаммермановские чтения –2011» (Санкт-Петербург, 2011), на VI всероссийской научной конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул 2014), 88-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 200-летию Казанского государственного медицинского университета (Казань, 2014), научно-практической конференции «Бутлеровское наследие – 2015» (Казань, 2015).

**Публикации.** Основное содержание диссертации опубликовано в 9 научных работах, в том числе 4 статьи в журналах из перечня, рекомендуемого ВАК.

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором. Автором разработаны экспресс-методики анализа исследуемых видов лекарственного растительного сырья, предложена математическая модель быстрой однократной экстракции флавоноидов из растительного сырья кипящим растворителем, способ препаративного выделения суммы флавоноидов (технического рутина) из листьев амаранта багряного на основе кратковременной водной экстракции сырья. Исследования биологической активности суммы флавоноидов, выделенных из листьев амаранта багряного проведены в ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» Министерства сельского хозяйства РФ под руководством О.В. Шиловой.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 44 таблицы, 30 рисунков. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания объектов и методов исследования, 4-х глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований и их обсуждение, общих выводов и списка литературы, включающего 140 источников, из которых 38 – на иностранных языках.

Во *введении* обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечена новизна и практическая значимость полученных результатов, а также изложены положения, выносимые на защиту.

Глава 1 содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по современному состоянию исследований состава флавоноидов зверобоя продырявленного и пятнистого, горца птичьего, душицы обыкновенной, тимьяна ползучего, календулы лекарственной, бессмертника песчаного, березы повислой и пушистой, фиалки трехцветной, амаранта багряного и методам их количественного определения в сырье этих растений.

В главе 2 представлена характеристика объектов и методов исследования. Приведены методики физико-химического анализа лекарственного растительного сырья и биохимического исследования крови подопытных животных.

В главах 3-6 экспериментальной части приводятся результаты собственных исследований по разработке методов определения содержания флавоноидов в растительном сырье, их теоретическому обоснованию, способу получения очищенной суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного и исследованию их биологической активности.

Приложение содержит проекты изменений к действующим статьям Государственной Фармакопеи СССР XI издания.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили образцы сырья – трава зверобоя продырявленного (*Herba Hyperici perforati*) и пятнистого (*Herba Hyperici maculati*), трава горца птичьего (*Herba Polygoni avicularis*), трава душицы обыкновенной (*Herba Origanum vulgare*), трава тимьяна ползучего (*Herba Serpylli*), листья березы повислой (*Folia Betulae pendulae*), цветки календулы лекарственной (*Flores Calendulae officinalis*), цветки бессмертника песчаного (*Flores Helichrysi arenarii*), трава фиалки трехцветной (*Herba Viola tricoloris*), листья амаранта багряного (*Folia Amaranthi cruenti*) собранные в период 2011-2014 гг. Растения заготавливались на территории республик Татарстан, Башкортостан и Марий-Эл, а также были выращены в ботаническом саду Казанского ГМУ.

Для проведения ТСХ-анализа применяли силикагелевые пластины «Sorbfil ПТСХ-АФ-В» 15x15см и «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» 15x15см. Хроматографический анализ выполняли в системе растворителей этилацетат–уксусная кислота–вода (5:1:1). Детектирование проводили в видимом и УФ-свете (при длинах волн 254 и 365 нм), до и после опрыскивания хроматограмм 2% спиртовым раствором хлорида алюминия.

ВЭЖХ-анализ проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), колонка Supelco C18 (длина 25 см, внутренний диаметр 4,6 мм, зернение сорбента 10 мкм). Режим элюирования – изократический, в качестве подвижной фазы использовали смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20 или 70:30, скорость потока 1 мл/мин. Детекцию осуществляли при аналитической длине волны  $\alpha_{\max} = 360$  нм.

УФ-спектры записывались на спектрофотометрах LAMBDA-25 (Perkin Elmer, США) и Evolution 220 (Thermo Scientific, США)

Измерения оптических плотностей исследуемых растворов проводили на отечественных спектрофотометрах ПЭ-5300В (НПО «Экрос») и СФ-46.

Уровень Т-лимфоцитов в периферической крови определяли методом спонтанного розеткообразования с гетерогенными эритроцитами (Е-РОК), В-лимфоцитов – методом ЕАС-розеток по Фримелю.

Фагоцитарную активность нейтрофилов устанавливали по С.А. Кост и М.И. Стенко. Функциональную способность нейтрофилов определяли по показателям фагоцитоза: фагоцитарной активности – проценту активных (фагоцитирующих) нейтрофилов; фагоцитарному индексу – среднему числу микробных тел, приходящихся на один сосчитанный нейтрофил; фагоцитарному числу – среднему количеству микробов в одном активном нейтрофиле; фагоцитарной емкости, характеризующей общую фагоцитарную активность.

Лизоцимную активность сыворотки крови устанавливали нефелометрическим методом по В.Г. Дорофейчуку.

Определение бактерицидной активности сыворотки крови проводили методом фотонейфелометрии по О.В. Бухарину и В.Л. Созыкину

## **2. Оптимизация методов количественного определения флавоноидов в образцах лекарственного растительного сырья**

### ***2.1. Разработка экспресс-методик на основе оптимизации процедуры экстракции флавоноидов.***

Для оптимизации были выбраны методики количественного определения флавоноидов из действующих нормативных документов на различные виды лекарственного растительного сырья – Государственной фармакопеи XI издания (трава горца птичьего), фармакопейных статей предприятий (трава зверобоя, трава душицы, листья березы, цветки календулы) и проектов фармакопейных статей для Государственной фармакопеи XII издания (трава чабреца, цветки бессмертника песчаного). Общим для всех указанных методик является использование метода дифференциальной спектрофотометрии по продуктам реакции флавоноидов с хлоридом алюминия. Методики различаются между собой использованием для экстракции флавоноидов этилового спирта различной концентрации, режимами экстракции, аналитической длиной волны для определения оптической плотности растворов, выбором референтного флавоноида, в пересчете на который определяется суммарное содержание флавоноидов.

Прежде всего, было проверено являются ли оптимальными концентрации спирта, используемые для экстракции флавоноидов в указанных видах сырья и выбор аналитических длин волн, при измерении оптических плотностей анализируемых растворов.

Полученные результаты показали, что используемая в фармакопейных методиках концентрация спирта для всех исследованных видов сырья является оптимальной.

Измеренные максимумы поглощения продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия для всех видов сырья не совпали с длинами волн используемых для определения в указанных методиках.

Поскольку отклонения не превышали диапазона 2–5 нм, а сам дифференциальный спектр в области максимума поглощения имел плосковыпуклый характер и различия в значениях оптических плотностей в указанных диапазонах не имели существенного характера, было решено в целях унификации методик, измерения проводить при ана-

литических длинах волн, использованных в фармакопейных методиках. В качестве иллюстрации на рисунке 1 приведены электронные спектры одного из исследованных видов – *H. maculatum*.

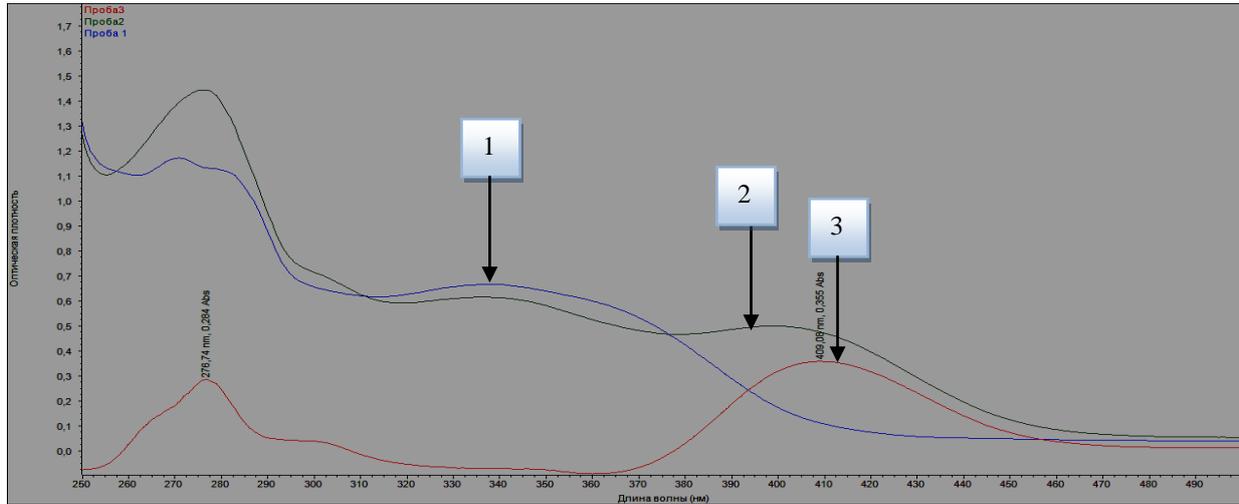


Рисунок 1. Электронные спектры спиртового извлечения из травы *H. maculatum*. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии  $AlCl_3$  на фоне 95% этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии  $AlCl_3$  на фоне извлечения)

На следующем этапе исследований была изучена динамика выхода флавоноидов от времени экстракции при оптимальных для каждого вида сырья концентрациях спирта. Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что выхода более 90%

Таблица 1

Выход флавоноидов из лекарственного растительного сырья в зависимости от времени экстракции спиртом в соотношении 1:100, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)

Лекарственное растительное сырье (ЛРС)	Концентрация спирта, (%)	Время экстракции, (мин)			
		5	10	15	30
Herba <i>Hyperici perforati</i>	50	$3,55 \pm 0,09$ 89	$3,62 \pm 0,06$ 91	$3,64 \pm 0,06$ 92	$3,83 \pm 0,07$ 97
Herba <i>Hyperici maculati</i>	50	$3,83 \pm 0,11$ 82	$4,25 \pm 0,09$ 91	$4,35 \pm 0,12$ 94	$4,53 \pm 0,10$ 97
Herba <i>Polygoni avicularis</i>	70	$1,51 \pm 0,04$ 93	$1,52 \pm 0,03$ 94	$1,53 \pm 0,03$ 94	$1,55 \pm 0,03$ 96
Herba <i>Origanii vulgaris</i>	60	$1,01 \pm 0,01$ 88	$1,06 \pm 0,02$ 94	$1,06 \pm 0,02$ 94	$1,06 \pm 0,02$ 94
Herba <i>Serpylli</i>	70	$1,45 \pm 0,05$ 85	$1,46 \pm 0,04$ 86	$1,48 \pm 0,04$ 87	$1,61 \pm 0,05$ 95
Folia <i>Betulae pendulae</i>	50	$2,12 \pm 0,05$ 79	$2,18 \pm 0,06$ 81	$2,32 \pm 0,05$ 86	$2,36 \pm 0,07$ 87
Flores <i>Calendulae officinalis</i>	70	$1,52 \pm 0,06$ 88	$1,62 \pm 0,04$ 94	$1,66 \pm 0,06$ 96	$1,68 \pm 0,04$ 97
Flores <i>Helichrysi arenarii</i>	70	$1,22 \pm 0,02$ 90	$1,27 \pm 0,05$ 93	$1,28 \pm 0,06$ 94	$1,35 \pm 0,06$ 99

от всей суммы флавоноидов, содержащихся в сырье для травы горца птичьего можно достичь уже за 5 минут кипячения сырья с растворителем, для травы обоих видов зверобоя, травы душицы, цветков календулы и цветков бессмертника песчаного – за 10 минут, для травы чабреца – за 30 минут. Для листьев березы в режиме однократной экстракции в изученном временном диапазоне выхода флавоноидов более 90% достичь не удастся. Порог в не менее чем 90% выхода флавоноидов был определен нами как условие для перехода к экспрессным вариантам определения без исчерпывающей экстракции сырья и введением в расчетные формулы поправочного коэффициента, учитывающего неполноту экстракции действующих веществ. Исходя из полученных экспериментальных данных были предложены экспресс-методы количественного определения флавоноидов при экстракции сырья 100 частями кипящего этилового спирта (50–70%) – для травы горца птичьего в течение 5 минут, для травы зверобоя, травы душицы, цветков календулы и бессмертника песчаного в течение 10 минут. Для листьев березы и травы чабреца после дополнительных исследований был найден вариант экспресс-методики в режиме двукратной экстракции по 10 минут, при котором удалось извлечь 91 и 94% флавоноидов соответственно. Рассчитанные поправочные коэффициенты для определения истинного содержания флавоноидов в исследованных видах сырья составили: для травы зверобоя и листьев березы – 1,09; для травы горца птичьего, травы душицы и чабреца, цветков календулы – 1,06; для цветков бессмертника песчаного – 1,07.

Для определения метрологических характеристик разработанных методик провели по 10 параллельных определений (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости методик, ошибки методов находятся в диапазоне  $\pm 2,32 - \pm 4,18\%$ .

Таблица 2

Метрологические характеристики экспресс-методов определения флавоноидов в 8 видах лекарственного растительного сырья

ЛРС	F	$\bar{X}$	$S^2$	S	P	t (0,95; 9)	$\Delta x$	$\varepsilon, \%$
Herba <i>H. perforati</i>	9	3,96	0,025059	0,1583	0,95	2,26	0,11	$\pm 3,13$
Herba <i>H. maculati</i>	9	4,65	0,022620	0,1504	0,95	2,26	0,11	$\pm 2,32$
Herba <i>P. avicularis</i>	9	1,62	0,005055	0,0711	0,95	2,26	0,05	3,13
Herba <i>O. vulgaris</i>	9	1,13	0,0015366	0,0392	0,95	2,26	0,03	2,48
Herba <i>Serpylli</i>	9	1,69	0,0097417	0,0987	0,95	2,26	0,07	4,18
Folia <i>B. pendulae</i>	9	2,72	0,0143760	0,1199	0,95	2,26	0,09	3,16
Flores <i>C. officinalis</i>	9	1,73	0,0079923	0,0894	0,95	2,26	0,06	3,70
Flores <i>H. arenarii</i>	9	1,36	0,0023329	0,0483	0,95	2,26	0,04	2,74

## 2.2. Определение референтных соединений для расчета суммарного содержания флавоноидов в образцах растительного сырья.

Методом дифференциальной спектрофотометрии в приведенных выше видах растительного сырья определяется суммарное содержание флавоноидов, однако это содержание рассчитывается в пересчете на один из флавоноидов, который называется референтным. Для того чтобы расчеты были корректными, в качестве референтного выбирается соединение, которое количественно преобладает в сумме соединений данной природы. Правильный выбор референтного соединения в случае суммарного

содержания флавоноидов приобретает особое значение, поскольку в растительном сырье флавоноиды представлены агликонами, монозидами, биозидами, которые существенно различаются молекулярными весами и соответственно удельными показателями поглощения, которые и используются в расчетных формулах. В фармакопейных методиках выбранных нами для оптимизации в качестве референтных используются рутин (биозид) – для травы обоих видов зверобоя, листьев березы и цветков календулы, монозиды – авикулярин (для травы горца птичьего), цинарозид (для травы чабреца) и изосалипурпозид (для цветков бессмертника песчаного) и агликон – лютеолин – для травы душицы. Анализ публикаций, посвященных флавоноидному составу указанных видов, показал, что в случае травы обоих видов зверобоя, листьев березы и травы душицы, выбор референтных флавоноидов использованный в официальных нормативных документах является, скорее всего, неудачным.

Определение природы доминирующих флавоноидов в этих видах сырья проводили методом ВЭЖХ, используя в качестве стандартов достоверные образцы рутина, гиперозида, цинарозида и лютеолина.

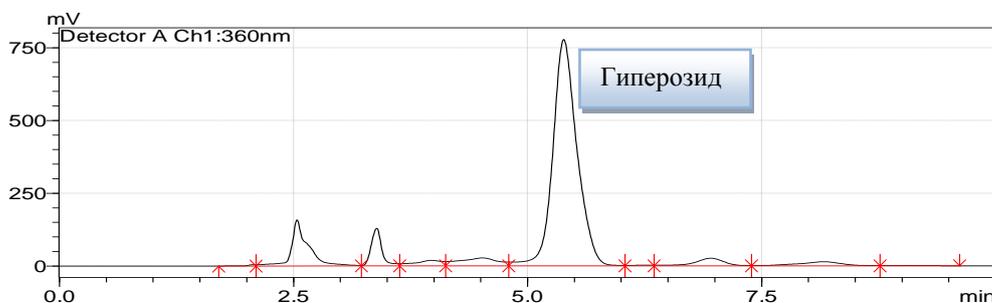


Рисунок 2. Хроматограмма извлечения из травы *N. maculatum* (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

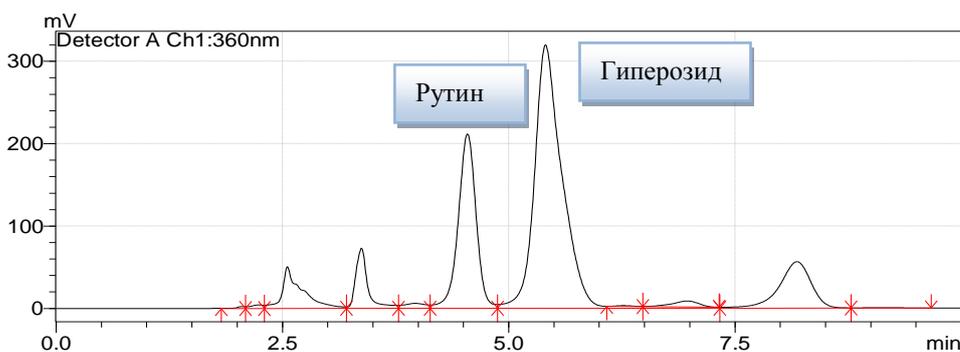


Рисунок 3. Хроматограмма извлечения из травы *N. perforatum* (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

Было показано (рис. 2–4), что доминирующим флавоноидом в траве обоих видов зверобоя и листьях березы является не рутин, а гиперозид (монозид). В траве душицы доминирующим флавоноидом оказался не лютеолин, а его 7-глюкозид – цинарозид (рис. 5А). Было также уточнено, что доминирующим флавоноидом травы чабреца также является цинарозид (рис. 5Б), в то время как стандартизация его препарата – жидкого экстракта проводится по содержанию флавоноидов в пересчете на лютеолин.

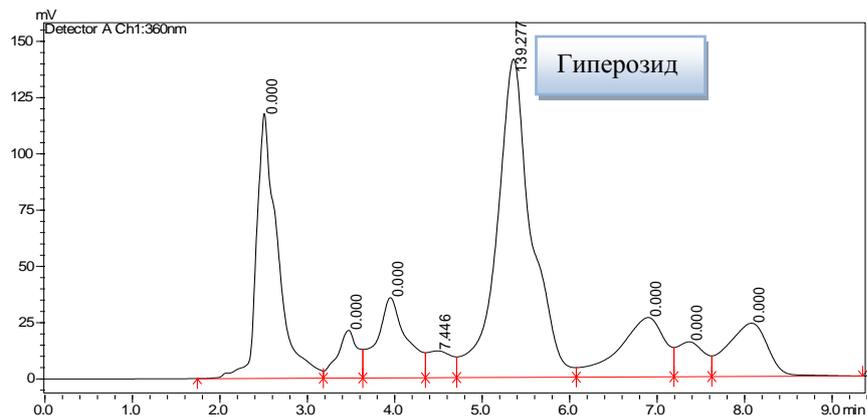


Рисунок 4. Хроматограмма извлечения из листьев *V. pendula* (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

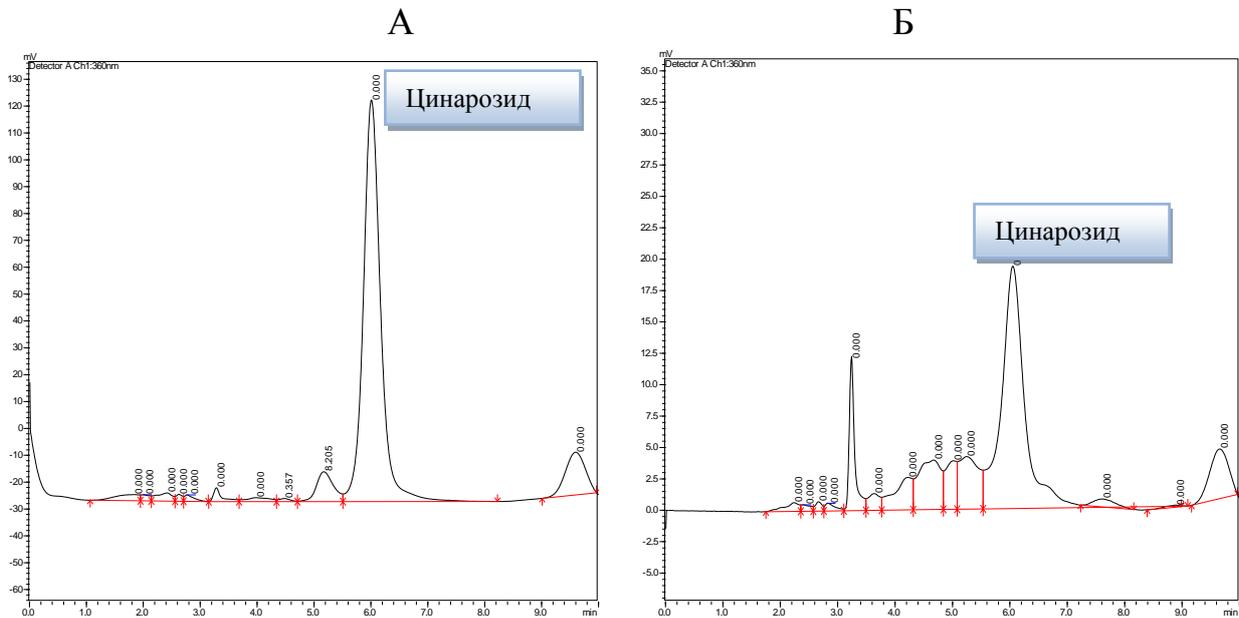


Рисунок 5. Хроматограмма извлечения из травы душицы (А) и травы чабреца (Б) (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

Таким образом, для корректного расчета содержания флавоноидов в траве зверобоя пятнистого, листьях березы необходимо использовать удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с хлоридом алюминия, а для травы душицы удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с хлоридом алюминия. Для травы зверобоя продырявленного теоретически также должен использоваться удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с хлоридом алюминия, поскольку гиперозид является доминирующим флавоноидом этого сырья, однако с учетом того, рутин и гиперозид находятся в траве *H. perforatum* в сопоставимых количествах и для проведения более корректных расчетов мы рассчитали условный удельный показатель поглощения суммы гиперозида и рутина с учетом их количественного соотношения в данном сырье, который оказался равен 343.

В таблице 3 показано, как изменятся уровни содержания флавоноидов в указанных видах сырья при использовании для расчетов уточненных удельных показателей поглощения комплексов флавоноидов хлоридом алюминия.

Таблица 3

Содержание флавоноидов в 4 видах растительного сырья, рассчитанное с использованием удельных показателей поглощения различных референтных соединений, %

Удельные показатели поглощения различных флавоноидов с $AlCl_3$	Herba <i>H. perforati</i>	Herba <i>H. maculati</i>	Folia <i>B. pendulae</i>	Herba <i>O. vulgaris</i>
$E_{1cm}^{1\%}$ рутина + $AlCl_3 = 248$	3,96	4,65	2,72	
$E_{1cm}^{1\%}$ гингерозида + $AlCl_3 = 380$		3,03	1,78	
Расчетный $E_{1cm}^{1\%}$ (гингерозид + рутин) + $AlCl_3 = 343$	2,86			
$E_{1cm}^{1\%}$ лютеолина + $AlCl_3 = 549,41$				1.13
$E_{1cm}^{1\%}$ цинарозида + $AlCl_3 = 345$				1,80

Результаты, приведенных в таблице 3 показывают, что фармакопейные методики определения флавоноидов в траве обоих видов зверобоя и листьях березы дают завышенные результаты, а в траве душицы – заниженные.

### 3. Обобщение результатов экстракции флавоноидов на основе принятой математической модели

Результаты, полученные при разработке экспресс-методик определения флавоноидов показывают, что ключевым параметром оптимизации является процедура экстракции. Схожесть результатов экстракции для разных видов сырья, обусловила попытку провести обобщение полученных результатов и получить теоретическое объяснение процессов, происходящих при экстракции флавоноидов в выбранных нами условиях.

#### 3.1. Формулировка модели

Предлагаемая математическая модель исходит из следующих положений о ходе экстракции.

Первый этап начинается с момента погружения сырья в растворитель (при комнатной температуре) и продолжается вплоть до достижения экстрагентом рабочей температуры (температуры кипения). Длительность этого периода экстракции обозначается в работе через  $t_0$  и, как отмечается, составляет около 3–5 минут. В момент закипания растворителя начинается второй, основной, этап экстракции, с этим же моментом связывается и начальный момент времени  $t$  экстракции.

Рассматриваемая модель предполагает образование на первом этапе экстракции так называемых транспортных каналов в сырье. Образуются они из изначально существующих в высушенном растительном материале пор (клеточные стенки, межклеточное пространство) в результате пропитки сырья растворителем. Объемная доля этих пор обозначена через  $e$ . Далее, после помещения колбы с сырьем и растворителем на водяную баню растворитель постепенно закипает и повышается его растворяющая способность. Все это приводит к высвобождению целевых веществ из клеток растительного сырья в рассматриваемые транспортные каналы. В соответствии с экспериментальными данными, по этим каналам экстрактивные вещества начинают диффундировать к поверхности частиц молотого сырья уже на первом этапе экстракции.

В результате пропитки навески растворителем происходит увеличение размера частиц, раскрытие самих пор, увеличение их объемной доли и формированию транспортных каналов в самом сырье. Коэффициент объемного расширения пор, вызванного пропиткой сырья, обозначен через  $\alpha$ .

Основная часть рассуждений посвящена формулировке (двух) уравнений, описывающих массоперенос во время второго периода экстракции. Первое уравнение является вторым законом Фика и описывает массоперенос в индивидуальной пористой частице радиуса  $a$  (изометрическое приближение формы частиц)

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial \theta}{\partial r} \right), \quad (1)$$

где  $r$  – радиальная координата в частице, отсчитываемая от ее центра,  $\theta(r,t)$  – текущая плотность целевых веществ (флавоноидов) в каналах сырья, а  $D$  – коэффициент эффективной диффузии целевых веществ в сырье, определяемый самим сырьем, применяемым растворителем и температурой процесса. Это уравнение должно быть дополнено начальным условием,

$$\theta(r,0) = \theta_{\max}, \quad (2)$$

определяющим распределение целевых веществ по частице к началу второго этапа экстракции. Здесь  $\theta_{\max}$  – средняя по объему транспортных каналов плотность экстрактивных веществ. А граничные условия выбираются из условия сферической симметрии частиц (при  $r = 0$ ) и высокой массоотдачи целевых веществ с поверхности сырья (при  $r = a$ )

$$\left. \frac{\partial \theta}{\partial r} \right|_{r=0} = 0, \quad \theta|_{r=a} = C(t), \quad (3)$$

где  $C(t)$  – средняя по объему раствора плотность экстрагированных веществ, определяемая вторым уравнением модели, которое при рассмотрении монодисперсного приближения навески сырья примет следующий вид

$$\frac{1-\gamma}{\gamma} \frac{dC}{dt} = - \frac{3D}{a} \left. \frac{\partial \theta}{\partial r} \right|_{r=a}. \quad (4)$$

Здесь  $\gamma$  – отношение объема растворителя, неотделимого от сырья после экстракции, к объему  $V$  используемого растворителя ( $V_0$  – объем сухого сырья, определяемый как отношение массы  $m_0$  навески к плотности сырья  $\rho_0$ ).

Принципиальным моментом в рассматриваемой модели является выделение некоторой части целевых веществ в отдельную компоненту, которая высвобождается в раствор в течение первого этапа экстракции. Таким образом, начальная (по отношению ко второму этапу) концентрация  $C_0$  веществ в растворе, определяющая начальное условие для уравнения (4), отлична от нуля. Определяя далее исходную массовую концентрацию  $\theta_0$  целевых веществ в сырье, отнесенную к единице массы сухого сырья, из баланса массы целевых веществ получим выражение для  $\theta_{\max}$  и максимальной плотности раствора  $C_{\max}$  через характеристики сырья

$$\theta_{\max} = \frac{1}{E} \left( \theta_0 \rho_0 - C_0 \frac{V_s}{V_0} \right), \quad C_{\max} = \frac{\theta_0 m_0}{V}, \quad (5)$$

где  $E = e\alpha$ .

На основании изложенного, сформулированная модель (1)-(5) содержит считающиеся заданными параметры  $\rho_0$ ,  $e$ ,  $\alpha$ , характеризующие исследуемое сырье. Величины  $C_0$  и  $\theta_0$  определяются из экспериментов по экстракции целевых веществ, а коэффициент диффузии  $D$ , зависящий от типа растворителя, температуры процесса и вида растительного сырья, является адаптационным параметром модели. Отметим, что значение плотности  $C_0$  в общем случае зависит от размера частиц, от типа и объема растворителя, от типа сырья и от температуры процесса. Но в тоже время этот параметр имеет ясный физический смысл.

Адаптацию модели (определение параметров  $C_0$ ,  $\theta_0$  и  $D$ ) предлагается проводить на основе измерения так называемой кривой  $Y(t)$  выхода целевых соединений (КВЦС) – зависимости от времени  $t$  отношения массы экстрагированного вещества к массе  $m_0$  навески. В принятых обозначениях

$$Y(t) = C(t)V_s / m_0, \quad Y_0 = C_0V_s / m_0,$$

где  $V_s$  – объем извлечения, который, вообще говоря, несколько меньше используемого объема  $V$  растворителя. Это связано с пропиткой сырья растворителем и его удержанием в макропорах навески в результате поверхностного натяжения и взаимодействия с частицами сырья. В первом приближении, учитывая лишь пропитку сырья, будем считать, что  $V_s = V - V_0E$ , таким образом,  $\gamma = (V - V_s) / V$ .

### 3.2. Калибровка модели на основе проведенных экспериментов.

Адаптация предложенной модели предполагает согласование теоретической зависимости  $Y(t)$  с экспериментальными КВЦС, полученными для конкретных значений объема  $V$  растворителя, массы  $m_0$  навески и других параметров процесса экстракции.

На рисунках 6 и 7 в качестве примера приведены адаптационные кривые экстракции флавоноидов для трех из исследованных видов растительного сырья – травы горца птичьего, травы душицы и травы чабреца.

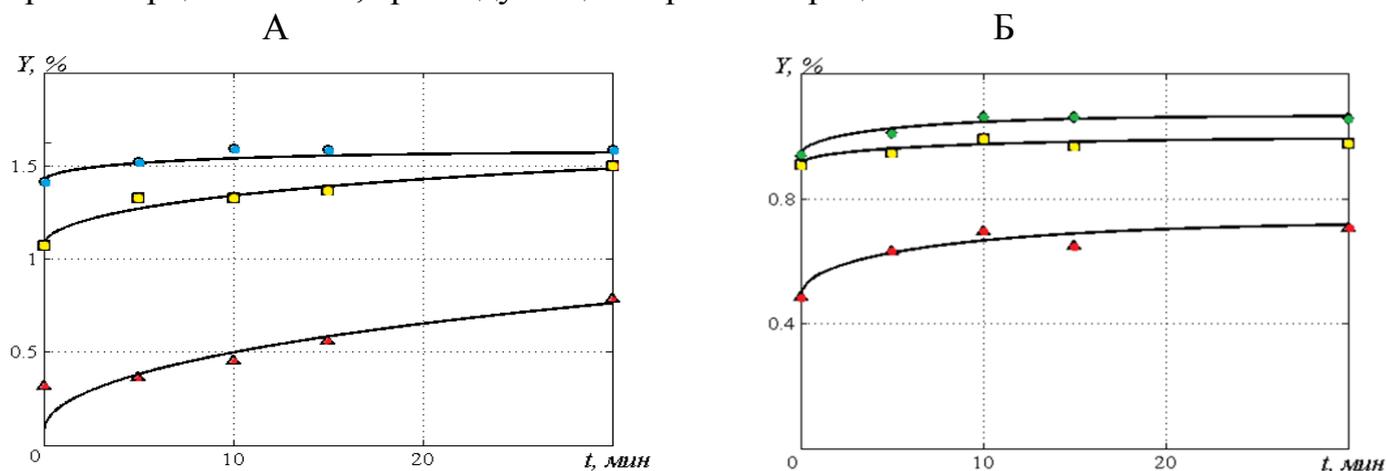


Рисунок 6. Адаптация модели (сплошные линии) и результаты опытов (маркеры) экстракции флавоноидов тремя различными концентрациями спирта: А – трава горца птичьего (треугольники – 95%, ромбы – 70%, квадраты – 40%); Б – трава душицы (треугольники – 95%, ромбы – 60%, квадраты – 40%).

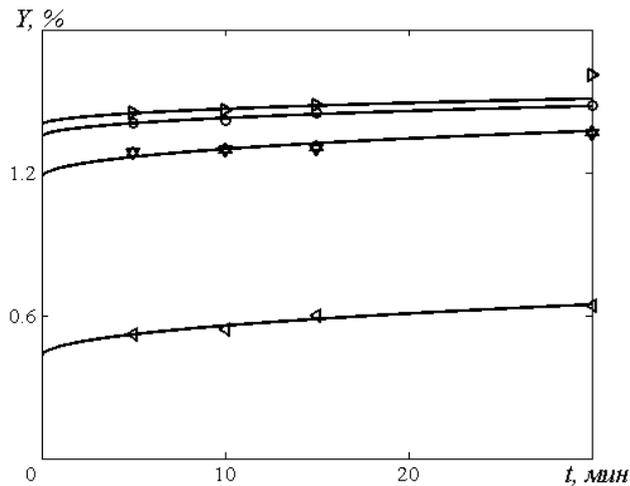


Рисунок 7. Адаптация модели (сплошные линии) и результаты опытов (маркеры) экстракции флавоноидов травы чабреца 4-мя различными концентрациями спирта (треугольники (нижние) – 95%, звездочки – 40%, круги – 60%, треугольники (верхние) – 70%)

Примечание: для проверки адекватности математической модели экспериментальным данным для травы горца птичьего и травы душицы (рис. 6) были дополнительно определены концентрации флавоноидов в извлечениях в момент закипания растворителя (при  $t=0$ ) и использованы при построении модели.

Значения эффективного коэффициента диффузии  $D$ , определенные в результате апробации модели для каждого объекта приведены в таблице 4 и лежат в ожидаемых пределах.

Таблица 4.

Параметры модели для травы чабреца, травы душицы, травы горца птичьего

ЛРС	Трава чабреца			
Концентрация спирта, %	40	60	70	95
Диффузия $D$ , $10^{-11}$ м <sup>2</sup> /с	3	1	1.1	2
ЛРС	Трава душицы			
Концентрация спирта, %	40	60	95	
Диффузия $D$ , $10^{-11}$ м <sup>2</sup> /с	1	1.5	1	
ЛРС	Трава горца птичьего			
Концентрация спирта, %	40	70	95	
Диффузия $D$ , $10^{-12}$ м <sup>2</sup> /с	4.5	11.2	1.05	

Полученное хорошее согласие теории с экспериментальными данными служит дополнительным подтверждением основных идей, положенных в основу исследования. Принципиальным моментом, позволяющим рассматривать варианты быстрых (однократных) методик экстракции, является, во-первых, отсутствие взаимодействия целевых веществ с внутренними структурами сырья (адсорбционные эффекты) и, во-вторых, образование в результате измельчения сырья фракции так называемых “свободных” соединений, которые выходят в раствор практически мгновенно и обеспечивают высокое значение параметра  $y_0$ . Механизмы образования фракции свободных экстрагируемых веществ нуждаются в дополнительном изучении, так как полученные в этом направлении результаты могут способствовать оптимизации экстракционных процессов не только в лабораторных условиях, но и в промышленных масштабах. В настоящее время в литературе известны две гипотезы,

объясняющие существование фракции свободных соединений: разрушение клеток поверхностного слоя частиц во время измельчения и полидисперсность навески. Во втором случае частицы мелкодисперсной фракции, обладая большой удельной поверхностью, экстрагируются за очень короткое время, а выработка частиц крупной фракции длится в течение всего времени экстракции.

В общем же случае, когда основные механизмы извлечения целевых соединений неизвестны, значительную информацию может предоставить КВЦС. Она, например, позволяет с уверенностью говорить не только о полноте извлечения, но и о возможной деградации компонент экстракта вследствие кипения растворителя при достаточно больших температурах. Поэтому исследование динамики выхода экстрактивных веществ в случае одно- и многократной экстракции имеет решающее значение при разработке различных методик количественного определения.

#### **4. Разработка метода количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки.**

При разработке способа количественного определения водорастворимых флавоноидов нам представлялось принципиально важным определить, не сколько всего содержится таких флавоноидов в растительном сырье (например, переходящих в водное извлечение при кипячении в течение 2-х часов), а сколько их оказывается в водном настое, приготовленном по обычной технологии (кратковременное кипячение на газовой или электрической плите, настаивание на водяной бане, заливание кипящей водой сырья в фильтр-пакете) в домашних условиях (по которой и готовится большая часть настоев из сырья, реализуемого в розничной аптечной сети). В таком случае сырье, будет стандартизоваться не общему содержанию флавоноидов, которое в любом случае невозможно исчерпывающе извлечь в настое, а по содержанию водорастворимых флавоноидов, гарантированно оказывающихся в водном извлечении, приготовленном в соответствии с инструкцией на упаковке. Фактически такой способ стандартизации сырья оказывается одновременно и способом стандартизации настоя, который будет из него приготовлен. Указанный способ дает дополнительно информацию о дозировке действующих веществ, в данном случае флавоноидов, в приготовленном настое и возможность изменять ее, увеличивая или уменьшая объем принимаемого настоя.

Содержание флавоноидов в сырье, определенное при экстракции его 70% спиртом составило  $3,56 \pm 0,04\%$ .

Задачу поиска оптимальных условий водной экстракции флавоноидов травы фиалки решали методом математического эмпирического планирования. В модель системы в качестве входных и управляемых параметров включили 4 фактора:

Фактор №1, соотношение сырье/вода (модуль экстракции). По технологии Государственной фармакопеи XI издания водные извлечения из травы фиалки следует готовить при соотношении сырье/вода 1:10. При использовании фильтр-пакетов соотношение составляет в среднем 1:100 (1-2 фильтр-пакета заливается 200 мл воды). Поэтому в качестве минимального уровня данного фактора был задан модуль экстракции 1:100, а в качестве максимального уровня – соотношение 1:10.

Фактор №2, режим нагревания. Кипячение на открытом огне газовой плиты (или электроплите) является возможным способом приготовления водного извлечения, наряду с такими приемами заливание кипятком с последующим термосным

настаиванием, приготовлением настоя на кипящей водяной бане (последний способ рекомендуется фармакопеей). В качестве минимального уровня было задано нагревание на кипящей водяной бане, а максимального уровня – нагревание на открытом огне или электроплите с обязательным кипячением для стерилизации.

Фактор №3, продолжительность нагревания. Продолжительность экстракции влияет как на выход действующих веществ, так и на их состав. Не имеет смысла нагревать извлечение меньше 5 минут, так как экстракция не пройдет количественно, и не будет достигнуто динамическое равновесие. Также нерационально нагревать настои более 45 минут, поскольку при этом увеличивается выход балластных веществ. Поэтому мы приняли в качестве минимального уровня фактора продолжительности нагревания 5 минут, а в качестве максимального уровня – 45 минут.

Фактор №4, степень измельченности сырья (размер частиц, способ измельчения). Фактор измельченности сырья варьировали, исходя из форм промышленного выпуска сырья, которое поступает в аптеки в фасованном виде в пачках (измельченное сырье, размер частиц не более 7 мм), и порошкованным в фильтр-пакетах (размер частиц не более 2 мм). Поэтому за минимальный уровень фактора степени измельченности сырья мы приняли размер частиц не более 7 мм, а за максимальный – размер частиц не более 2 мм.

Для изучения влияния нескольких факторов на экстрагируемость действующих веществ использовали метод ортогонального планирования эксперимента, то есть вместо традиционного последовательного перебора комбинаций уровней факторов использовали ортогональную матрицу, в которой комбинировали только верхние и нижние уровни исследуемых факторов (Табл. 5). Она и определяла последовательность опытов и содержание каждого опыта.

Для количественного определения содержания флавоноидов, переходящих в водные извлечения, использовали вариант дифференциального спектрофотометрического определения после реакции с алюминия хлоридом, который мы использовали и для определения общего содержания флавоноидов.

Таблица 5

План эксперимента и результаты испытаний водных извлечений из травы фиалки

Опыт	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	X <sub>1</sub> , %	X <sub>2</sub> , %
1	+	–	–	–	1,50±0,07	42,21±1,91
2	+	+	–	–	2,25±0,04	63,20±1,15
3	–	–	–	+	3,26±0,09	91,50±2,44
4	–	+	–	+	3,44± 0,11	96,56±3,06
5	+	–	+	–	1,91± 0,04	55,13±1,18
6	+	+	+	+	1,98± 0,05	55,48±1,28
7	–	–	+	–	3,52± 0,14	98,95±4,03
8	–	+	+	+	3,27± 0,12	91,78±3,57

Примечание:

«+» - верхний уровень фактора (максимальное его значение)

«–» - нижний уровень фактора (минимальное значение)

X<sub>1</sub> – количество извлеченных флавоноидов в % от массы сырья

X<sub>2</sub> – степень экстракции флавоноидов

Статистическую обработку полученных данных проводили по следующему алгоритму. Сначала с использованием метода многофакторного дисперсионного анализа определяли значимость влияния каждого из исследуемых факторов и с использованием метода регрессионного анализа или множественного регрессионного анализа составляли уравнение регрессии, описывающее зависимость выходных параметров от значимых факторов. Затем определяли доверительный интервал и стандартные ошибки коэффициентов регрессии. И после этого с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа определяли статистическую значимость коэффициентов в уравнениях регрессии, показывающую, насколько адекватно составленное математическое описание соответствует изучаемому процессу.

Было установлено, что на выход флавоноидов травы фиалки в водные извлечения статистически значимое влияние оказывает фактор соотношения сырья и воды. При изменении соотношения сырье/вода от 1:10 до 1:100 степень экстракции флавоноидов возрастает, но их концентрация в извлечениях снижается вследствие разбавления. Остальные технологические факторы не оказывают существенного влияния. Можно сделать вывод, что в рамках изученного факторного пространства условия исчерпывающей экстракции водой флавоноидов травы фиалки – это нагревание измельченного (размер частиц не более 2 мм) сырья с водой при соотношении 1:100 на плитке с обязательным кипячением в течение 5 мин. Таким образом, все вышеизложенное позволило нам предложить методику количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки, основанную на экстракции сырья кипящей водой в течение 5 минут, добавлении к аликвоте извлечения раствора хлорида алюминия и фотометрировании раствора при 410 нм. Содержание флавоноидов в сырье рассчитывали с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия равного 248.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 6), ошибка метода не превышает  $\pm 3,30\%$ .

Таблица 6.

Метрологические характеристики метода определения в траве фиалки флавоноидов, переходящих в водные извлечения

f	$\bar{X}$	$S^2$	S	P	t (0,95; 9)	$\Delta x$	$\varepsilon, \%$
9	3,36	0,0267453	0,1635	0,95	2,26	0,11	$\pm 3,30$

В нескольких образцах травы фиалки, приобретенных в розничной аптечной сети, по разработанной методике провели определение флавоноидов, переходящих в водные извлечения (табл. 7).

Таблица 7.

Содержание флавоноидов, переходящих в водные извлечения в различных образцах травы фиалки, приобретенных в аптечной сети.

№ образца	1	2	3	4	5	6
$\bar{x} \pm \Delta x$	1,64 $\pm$ 0,08	1,94 $\pm$ 0,10	1,75 $\pm$ 0,09	1,32 $\pm$ 0,09	2,63 $\pm$ 0,11	1,28 $\pm$ 0,07

Норма содержания водорастворимых флавоноидов в траве фиалки, предназначенной для приготовления настоев, предлагается – не менее 1%.

## **5. Разработка метода количественного определения и способа препаративного выделения флавоноидов амаранта багряного и изучение некоторых аспектов их биологической активности**

### **5.1. Разработка метода количественного определения флавоноидов в листьях амаранта багряного**

Разработку метода определения суммарного содержания флавоноидов в листьях *A. cruentus* проводили по алгоритму, выработанному при разработке экспресс-методов определения флавоноидов, описанных выше. В итоге был предложен экспресс-метод определения флавоноидов в листьях амаранта багряного при 5 минутной экстракции сырья 70% спиртом, добавлением к аликвоте экстракта раствора хлорида алюминия и измерением оптической плотности раствора при 410 нм. Расчет содержания флавоноидов производится с использованием  $E_{1cm}^{1\%} \text{рутина} + AlCl_3 = 248$  и коэффициента на неполноту экстракции флавоноидов 1,02.

Ошибка метода не превышала  $\pm 1,38\%$ .

### **5.2. Разработка способа препаративного выделения суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного**

Известен способ получения рутина из листьев амаранта багряного, по которому проводят экстракцию сырья 70–95% спиртом, после отгонки спирта водный остаток очищают этилацетатом, далее рутин извлекают бутанолом и после отгонки бутанола выкристаллизовывают из водного раствора.

Нами был разработан способ получения флавоноидов из листьев *A. cruentus*, на основе водной экстракции. В отличие от способа, основанного на спиртовой экстракции сырья, нами была опущена стадия очистки водного извлечения этилацетатом, поскольку при изначальной водной экстракции, экстракт будет свободен от ряда липофильных соединений, переходящих в спиртовое извлечение.

Для целей препаративного выделения было взято 100 г сырья, которые были суммарно проэкстрагированы 10 л воды в течение 10 минут при кипении растворителя. Полученный экстракт отфильтровывался и по частям обрабатывался в делительной воронке тремя порциями *n*-бутанола, общий объем которого равнялся объему обрабатываемого водного экстракта. Полученные бутанольные извлечения объединялись и концентрировались под вакуумом до сухого остатка. Сухой остаток растворялся при нагревании в минимальном объеме воды (100–200 мл) и отфильтровывался на воронке Бюхнера под вакуумом в горячем виде. Раствор охлаждался до комнатной температуры и оставлялся для кристаллизации флавоноидов.

В течение 3–5 дней из раствора выпадал аморфный осадок светло–желтого цвета, который отделяли, промывали холодной водой и высушивали. Общий выход составил 1,2 г.

Методом ВЭЖХ было установлено, что доминирующим флавоноидом в полученной смеси флавоноидов является рутин, составляя около 87 % от их общего содержания, гиперозид составляет примерно 13 % от общего содержания флавоноидов, кверцетин присутствует в следовых количествах.

Предложенным нами способом на основе водной экстракции листьев амаранта багряного была получена сумма флавоноидов – фактически технический рутин, с небольшим содержанием гиперозида и кверцетина.

### 5.3. Изучение биологической активности суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного

В настоящее время различные виды амарантов применяются, прежде всего, как кормовые и пищевые растения. В Татарстане предприятием ООО «Электрол–Б» производится кормовая добавка из травы амаранта багряного «Экстрафит» применяющаяся в животноводстве. Нами совместно с ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» были проведены биологические испытания «Экстрафита», суммы флавоноидов, выделенных нами из листьев амаранта багряного, также химически чистого сквалена для выяснения природы биологически активных веществ «Экстрафита» в целях последующей разработки нормативных документов на этот препарат, предусматривающих его стандартизацию по действующим веществам.

Изучалось влияние «Экстрафита», флавоноидов, сквалена, а также высушенного водного остатка из листьев амаранта багряного после выпадения из него суммы флавоноидов на интенсивность роста и иммунобиологические показатели крови белых крыс.

Для этого взяли 48 белых крыс 70-90-дневного возраста живой массой 70-80 г, которые по принципу аналогов были разделены на 6 групп по 8 голов в каждой. Условия содержания и кормления животных контрольной и опытных групп были одинаковые. Крысам контрольной группы скармливали полнорационный комбикорм. Животным первой опытной группы задавали полнорационный комбикорм (ПК) с добавлением подсолнечного масла. Крысам второй опытной группы комбикорм обогащали препаратом «Экстрафит» в дозе 2 %. Животные третьей опытной группы получали комбикорм, обогащенный флавоноидами, выделенными из листьев амаранта багряного из расчета 2 мг/кг живой массы.

Крысам четвертой опытной группы вводили в рацион препарат на основе остаточной фракции после осаждения флавоноидов в дозе 2 мг/кг веса животного. Пятой – масляный раствор сквалена в той же дозе.

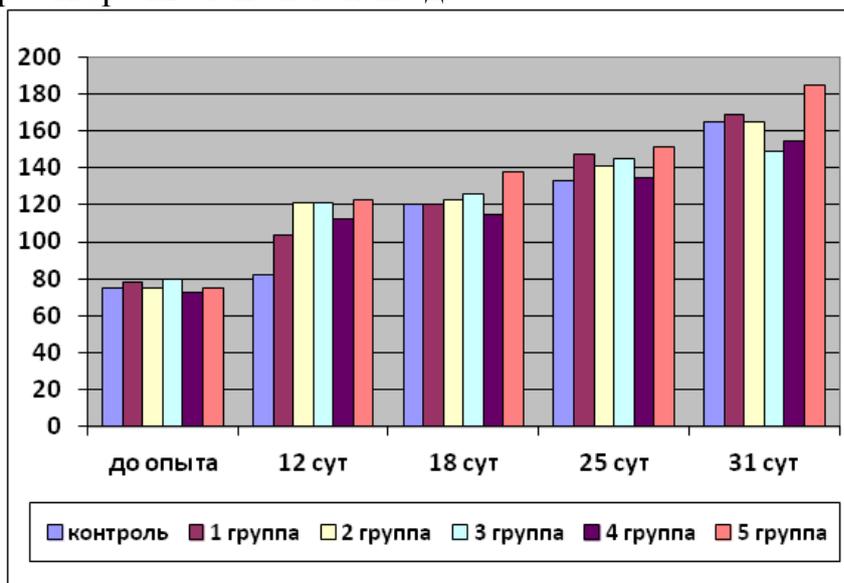


Рисунок 8. Динамика живой массы подопытных белых крыс, г

В ходе эксперимента изучали клиническое состояние белых крыс, потребление корма, изменения живой массы, проводили иммунологические исследования крови. Иммунный статус подопытных крыс оценивали по количественным и функциональным показателям.

Анализ данных приведенных на рисунке 8 показывает, что в первые 12 суток эксперимента прирост живой массы крыс опытных групп был выше таковых значений контроля. В следующую неделю опыта интенсивность роста крыс, получавших с рационом биологически активные вещества, снизилась по сравнению с контролем. Скорость роста особей опытных групп в срок 18–25 суток увеличилась по сравнению с предыдущим периодом и достоверно превосходила данный показатель сверстников контрольной группы. В конце опыта прирост живой массы крыс опытных групп несколько снизился по сравнению с контролем.

Можно констатировать, что использование кормовой добавки «Экстрафит» и биологически активных веществ амаранта (в том, числе флавоноидов) положительно влияет на интенсивность роста животных. Наибольшую разницу по абсолютному и среднесуточному приросту живой массы белых крыс между контрольной и опытными группами наблюдали в начале эксперимента.

Результаты проведенного исследования по изучению влияния препарата «Экстрафит», суммы флавоноидов, полученных из амаранта, суммарной фракции, оставшейся после осаждения флавоноидов и химически чистого сквалена, на иммунологический статус организма представлены в таблице 8.

Приведенные в таблице 8 данные свидетельствуют о том, что лизоцимная активность сыворотки крови у крыс 2-ой опытной группы была выше контроля на 41,6 %, 3-ей – на 27,6; 4-ой – на 12,9 и 5-ой – на 33,7 %. Бактерицидная активность сыворотки крови крыс, получавших дополнительно к рациону биологически активные вещества амаранта, превышала контрольное значение.

Таблица 8

Иммунологические показатели крови белых крыс, получавших «Экстрафит» и биологически активные вещества амаранта багряного

Показатель	Норма	ПК	ПК+масло	ПК+Экс-трафит	ПК+фла-воноиды	ПК+оста-ток	ПК+сква-лен
		контроль	1	2	3	4	5
Лизоцимная активность сыворотки крови, %	10,00-25,00	16,14±0,41	17,22±0,12	22,86±0,48	20,59±0,38	18,23±0,22	21,58±0,22
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	50,00-70,00	59,05±0,27	62,54±0,31	67,14±0,20	65,44±0,31	61,90±0,21	66,19±0,19
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	50,00-80,00	53,3± 0,67	55,00±0,61	59,00±0,86	53,25±0,80	55,13±0,68	59,63±0,95
Фагоцитарное число	3,00-5,00	3,08± 0,09	3,23± 0,03	3,54± 0,07	3,10± 0,04	3,22± 0,04	3,54± 0,07
Фагоцитарный индекс	3,75-7,00	5,79± 0,12	5,87± 0,03	5,99±0,06	5,83± 0,04	5,84± 0,03	5,92± 0,04
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,00-23,00	15,78±0,49	15,03±0,57	15,01±0,55	15,96±0,49	16,09±0,51	15,96±0,49
Фагоцитарная емкость, ×10 <sup>3</sup>	24,00-115,0	48,33±0,84	50,26±1,48	53,01±1,90	49,49±1,44	51,80±2,04	53,26±2,50
Т-лимфоциты, %	50,00-60,00	52,75±0,90	53,25±0,66	50,25±0,78	53,13±0,98	52,75±0,72	54,00±0,90
В-лимфоциты, %	25,00-30,00	26,50±0,83	27,38±0,92	28,00±0,57	25,13±0,47	27,88±0,65	28,25±0,56

Примечание:  $p=0,95$

Так, она во 2-ой группе была на 13,7 %, в 3-ей – на 10,8 и в 5-ой – на 12,1 % больше по сравнению с контролем. Фагоцитарная активность нейтрофилов крови животных, получавших дополнительно к рациону 2 % кормовой добавки «Экстрафит», превысила контроль на 10,5 %, а у крыс, которым скармливали масляный раствор сквалена, данный показатель был выше на 11,7 %. При скармливании кормовой добавки «Экстрафит» фагоцитарное число увеличивалось на 14,9 %, а фагоцитарная емкость – на 9,7 %. Достоверных отличий по значению фагоцитарного индекса, количеству Т- и В-лимфоцитов не установлено.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны экспресс-методы количественного определения флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого, траве горца птичьего, траве душицы, траве чабреца, листьях березы, цветках календулы и цветках бессмертника песчаного, основанные на отказе от длительной исчерпывающей экстракции действующих веществ и введением в расчетные формулы коэффициента на неполноту экстракции, позволившие значительно сократить общее время анализа. Ошибки определения находятся в пределах от  $\pm 2,32$  до  $\pm 4,18\%$ .
2. Доминирующим флавоноидом в траве зверобоя продырявленного и пятнистого и листьях березы является гиперозид, а в траве душицы и чабреца цинарозид. Использование для расчетов этих флавоноидов в качестве референтных в указанных видах сырья повысит объективность результатов количественного анализа.
3. Построенная на основании экспериментальных данных математическая модель, объясняет закономерности быстрой экстракции флавоноидов из растительного материала отсутствием взаимодействия целевых веществ с внутренними структурами сырья (адсорбционные эффекты) и, во-вторых, образованием в результате измельчения сырья фракции так называемых “свободных” соединений, выходящих в раствор за очень короткое время.
4. Разработан метод количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки, основанный на водной экстракции сырья и фотометрировании раствора после цветной реакции с хлоридом алюминия. Ошибка метода не превышает  $\pm 3,30\%$ , содержание флавоноидов в изученных образцах сырья варьирует в диапазоне от 1,28 до 2,63%.
5. Разработан метод количественного определения флавоноидов в листьях амаранта багряного, основанный на быстрой спиртовой экстракции сырья, фотометрировании аликвоты извлечения после цветной реакции с хлоридом алюминия и использовании в расчетах коэффициента на неполноту экстракции действующих веществ. Ошибка метода не превышает  $\pm 1,38\%$ , содержание флавоноидов в изученных образцах сырья варьирует в диапазоне от 1,21 до 2,39%.
6. Разработан способ препаративного выделения суммы флавоноидов (технического рутина) на основе водной экстракции листьев амаранта багряного, с выходом 50% от теоретического, оказывающей положительное влияние на рост и иммунологические показатели белых крыс.
7. Влияние флавоноидов, выделенных из амаранта багряного на рост и иммунологические показатели белых крыс подтверждают рациональность стандартизации этого сырья как кормовой добавки в животноводстве по содержанию данной группы соединений.
8. На основании полученных результатов предложены проекты изменений к статьям действующей Государственной фармакопеи XI издания – «Цветки ноготков», «Цветки бессмертника песчаного», «Трава зверобоя», «Трава душицы», «Трава горца птичьего», «Трава чабреца», «Трава фиалки» в разделы «Количественное определение».

**Практические рекомендации.** Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать методики анализа травы зверобоя продырявленного и пятнистого, травы горца птичьего, травы душицы, травы чабреца, травы фиалки, листьев березы, цветков календулы и цветков бессмертника песчаного и могут быть использованы в

учебном процессе по курсу «Фармакогнозия», а также в центрах сертификации и контроля качества ЛС и на фармацевтических предприятиях.

**Перспективы дальнейшей разработки** темы диссертационного исследования имеют важное научно-практическое значение для фармакогнозии в целях дальнейшего совершенствования методов анализа растений, содержащих флавоноиды в плане их унификации и экспрессности.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Хазиев, Р.Ш. Стандартизация травы фиалки по содержанию водорастворимых флавоноидов. / Р.Ш. Хазиев, Д.Н. Петрова, А.А. Тынчерова // **Традиционная медицина.** – 2012. – №5. – С. 312–315.
2. Влияние «Экстрафита» и полученных из него биологически активных веществ на рост и иммунологические показатели крыс / О.В. Семина, К.Х. Папуниди, И.И. Идиятов, Р.Ш. Хазиев, Д.Н. Петрова, Р.М. Низамединов // **Ветеринарный врач.** – 2015. – №1. – С. 53–58.
3. Хазиев, Р.Ш. Новые подходы к стандартизации травы душицы / Р.Ш. Хазиев, Д.Н. Петрова, А.Ю. Ситенков // **Бутлеровские сообщения.** –2015. – Т.41. – №3. – С.115–118.
4. Хазиев, Р.Ш. Новые подходы к стандартизации травы зверобоя. / Р.Ш. Хазиев, Д.Н. Петрова, М.Н. Габтрахманова, А.Ю. Ситенков // **Традиционная медицина.** – 2015. – №2. – С. 25–29.
5. Минвалеева, Д.Н. Амарант хвостатый как источник получения рутина / Д.Н. Минвалеева, Д.С. Петров // **Медицинский академический журнал.** – 2010. – т.10. – №5. – С. 169.
6. Минвалеева, Д.Н. Изучение амаранта хвостатого в качестве нового источника получения рутина / Д.Н. Минвалеева, Д.С. Петров, Л.А. Поцелуева, Р.Ш. Хазиев // Труды пятой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения» (Санкт-Петербург, 2010). СПб., 2010. – С. 366.
7. Минвалеева, Д.Н. Получение рутина и арбутина из новых растительных источников / Д.Н. Минвалеева, Д.С. Петров, Л.А. Поцелуева, Р.Ш. Хазиев // Научно-методическая конференция «Гаммермановские чтения – 2011» 1-3 февраля 2011 г. Сборник научных трудов. СПб., 2011. – С. 44–46.
8. Минвалеева, Д.Н. Изучение новых растительных источников получения рутина и арбутина / Д.Н. Минвалеева, Д.С. Петров, Л.А. Поцелуева, Р.Ш. Хазиев // **Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения академика Л.Н. Андреева «Ботанические сады в современной мире: теоретические и прикладные исследования»** Москва, 5–7 июля 2011 г.–М.–С. 459–460.
9. Хазиев, Р.Ш. Разработка экспресс-методов количественного определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье / Р.Ш. Хазиев, Д.Н. Петрова, С.А. Иванова, М.Н. Габтрахманова, Л.А. Зиганшина // **Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья VI Всероссийская конференция с международным участием.** Барнаул, 2014. – с. 161.







