

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего
профессионального образования

«Казанский государственный медицинский университет»

На правах рукописи

ПЕТРОВА ДИЛЯРА НАИЛЬЕВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА РЯДА
ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук

Научный руководитель:
канд. биол. наук, доцент
Хазиев Р.Ш.

Казань – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	13
ГЛАВА 1 Обзор литературы.....	13
1.1. Состав флавоноидов и их количественное содержание в <i>Hypericum perforatum</i> L. и <i>H. maculatum</i> Crantz	13
1.2. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве зверобоя.....	18
1.3. Состав флавоноидов и их количественное содержание в листьях <i>Betula pendula</i> Roth. и <i>B. pubescens</i> Ehrh.	20
1.4. Методы количественного определения суммы флавоноидов в листьях березы.....	24
1.5. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве <i>Polygonum aviculare</i> L.....	26
1.6. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве горца птичьего.....	29
1.7. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве <i>Origanum vulgare</i> L.....	30
1.8. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве душицы.....	33
1.9. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве <i>Thymus serpyllum</i> L.	35
1.10. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве тимьяна ползучего.....	36
1.11. Состав флавоноидов и их количественное содержание в цветках <i>Calendula officinalis</i> L.	37
1.12. Методы количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы.....	39

1.13. Состав флавоноидов и их количественное содержание в цветках <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	42
1.14. Методы количественного определения суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного.....	43
1.15. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве <i>Viola tricolor</i> L.	46
1.16. Методы количественной стандартизации травы фиалки.....	48
1.17. Состав флавоноидов и их количественное содержание в <i>Amaranthus cruentus</i> L.	49
Выводы к главе 1.....	49
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1. Объекты исследований.....	52
2.2. Методы исследований.....	53
2.2.1. Методы фитохимического анализа	53
2.2.2. Методы биохимического анализа.....	60
ГЛАВА 3 ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ОБРАЗЦАХ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	61
3.1. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого.....	61
3.2. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в листьях березы повислой.....	68
3.3. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве горца птичьего.....	74
3.4. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве душицы.....	78
3.5. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве тимьяна ползучего.....	84

3.6. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в цветках ноготков.....	89
3.7. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в цветках бессмертника песчаного.....	94
Выводы к главе 3.....	98
ГЛАВА 4. ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ НА ОСНОВЕ ПРИНЯТОЙ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ.....	99
4.1. Формулировка модели.....	99
4.2. Кинетика однократной экстракции.....	103
4.3. Калибровка модели на основе проведенных экспериментов.....	104
Выводы к главе 4.....	110
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ФИАЛКИ.....	112
5.1. Разработка метода количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки	112
Выводы к главе 5.....	118
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СПОСОБОВ ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ АМАРАНТА БАГРЯНОГО И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.....	119
6.1. Разработка метода количественного определения флавоноидов в листьях амаранта багряного.....	119
6.2. Разработка способа препаративного выделения суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного.....	122
6.3. Изучение биологической активности суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного.....	125

Выводы к главе 6.....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	135

Список сокращений:

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВФС – временная фармакопейная статья

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ XI – Государственная фармакопея СССР XI издания

ЛРС – лекарственное растительное сырье

НД – нормативная документация

УФ – ультрафиолетовый

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ВВЕДЕНИЕ

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. 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, В.Н. Бубенчиковой и др. Результаты этих

исследований нашли отражение в проектах фармакопейных статей на флавоноидсодержащие виды сырья для включения в Российскую фармакопею XII издания. Вместе с тем исследований по разработке экспрессных методов определения флавоноидов в растительном сырье почти нет.

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 5 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 послужили результаты отечественных и зарубежных исследований по количественному определению суммы флавоноидов. Был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; выбраны объекты исследования и подобран комплекс современных методов исследования, которые проводились с помощью различных методов: тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, 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.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ: «Исследования в области совершенствования контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего биологически активные вещества различной природы, с учетом перехода их в используемые лекарственные формы» (№ Государственной регистрации 01201174259).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных. В работе применено

построение математических моделей, объясняющих полученные экспериментальные данные, использованы методы математического эмпирического планирования, результаты которых обработаны методами дисперсионного и регрессионного анализов. Статистическую обработку экспериментальных данных ($P=95\%$) проводили с помощью программ «Excel 7.0» и «Statistica 6.0».

Материалы работы доложены и обсуждены на пятой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения» (Санкт-Петербург, 2010), научно-методической конференции «Гаммермановские чтения –2011» (Санкт-Петербург, 2011), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения академика Л.Н.Андреева «Ботанические сады в современном мире: теоретические и прикладные исследования» (Москва, 2011), 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).

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

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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состав флавоноидов и их количественное содержание в *Hypericum perforatum* L. и *H. maculatum* Crantz.

В медицинской практике Российской Федерации применяется два вида рода зверобой (*Hypericum* L.) – зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) и зверобой пятнистый (четырёхгранный) (*Hypericum maculatum* Crantz., (синоним *Hypericum quadrangulum* L.) семейства *Hypericaceae* (*Guttiferae*). В настоящее время трава обоих видов зверобоя используется совершенно равноценно для приготовления настоев, производства настойки зверобоя, входит в виде экстрактов в состав комплексных отечественных препаратов «Простанорм» и «Сибектан», а также является составной частью ряда бальзамов и эликсиров («Панта-Форте», «Эвалар», «Виватон», «Алтайский», «Демидовский»). Кроме того, на российском рынке присутствует ряд препаратов на основе травы зверобоя продырявленного зарубежных производителей – «Деприм», «Негрустин», «ГелариумГиперикум», а также комплексные препараты, содержащие извлечения из зверобоя «Ново-Пассит», «Кызылмай». Надо сказать, что до выхода в свет Государственной Фармакопеи СССР XI издания, узаконившей равноценное использование обоих видов зверобоя, зверобой пятнистый рассматривался как примесь к зверобою продырявленному и заготовкам не подлежал. В Европейской фармакопее официален только один вид зверобоя – зверобой продырявленный. На территории Республики Татарстан распространены и могут заготавливаться оба вида. *H. perforatum* произрастает в светлых лиственных и смешанных лесах, среди кустарников, на луговых степях, лугах, каменистых склонах. *H. maculatum* в большей степени мезофит, и произрастает по опушкам хвойных и смешанных лесов. Отсюда и его меньшие размеры по сравнению с *H. perforatum*.

Химический состав рода *Hypericum* L. сложен и разнообразен по типу

структур биологически активных соединений. Ведущую роль в терапевтических свойствах видов этого рода играют: флавоноиды, конденсированные производные антрацена (гиперицин и др.), пренилированные производные флороглюцина (гиперфорин и др.), дубильные вещества конденсированного ряда (димерные и тримерные проантоцианидины).

В отечественной медицине именно группа флавоноидов считается наиболее важной с точки зрения проявляемых травой зверобоя терапевтических эффектов и по ее содержанию оценивается качество сырья.

О содержании флавоноидов в *H. perforatum* впервые сообщается в 1915 г., а в 1918 г. О'Нейлом обнаружен кверцетин. Первым гликозидом, выделенным в кристаллическом виде, был гиперозид [26, 122]. Подробное исследование флавоноидов в *H. perforatum*, произраставшем на территории Советского Союза, впервые было проведено в 1971 г. [46].

В работе [111] было показано, что основными флавоноидами *H. perforatum* являются рутин, гиперозид и изокверцитрин. Другими авторами [118] присутствие этих же флавоноидов, а также кверцитрина было доказано с помощью метода ВЭЖХ.

Кроме уже отмечавшихся рутина, гиперозида и изокверцитрина, были идентифицированы и другие гликозиды кверцетина – астильбин, гуаявоверин, кверцетин-3-О-(2''-ацетил)- β -D-галактозид), а также изоориентин (6- β -глюкозиллютеолин) [123]. В работах [104, 105] было сообщено о выделении из *H. perforatum* двух бис-флавоноидов – I3,II8 – бисапигенина и аментофлавона (I3',II8 – бисапигенина).

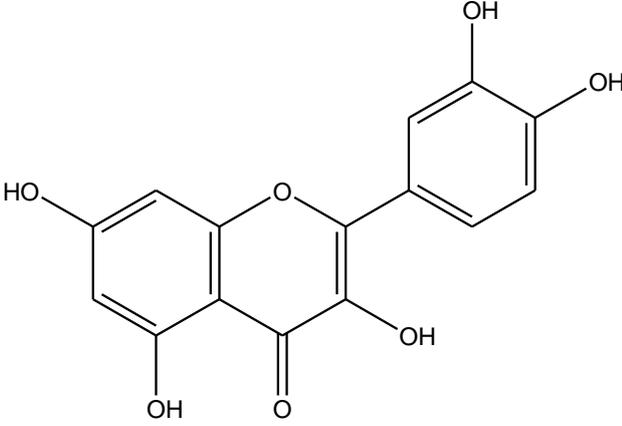
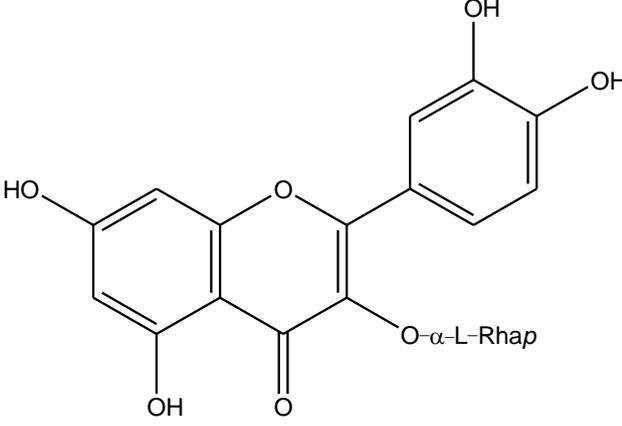
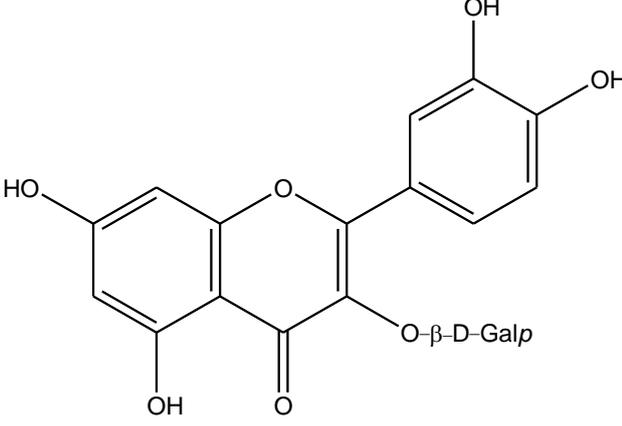
Детальное исследование флавоноидного состава *H. perforatum* и *H. maculatum*, произрастающих в России, было проведено в серии работ В.А. Куркина и О.Е. Правдивцевой [20, 30, 31, 32, 33, 36, 61].

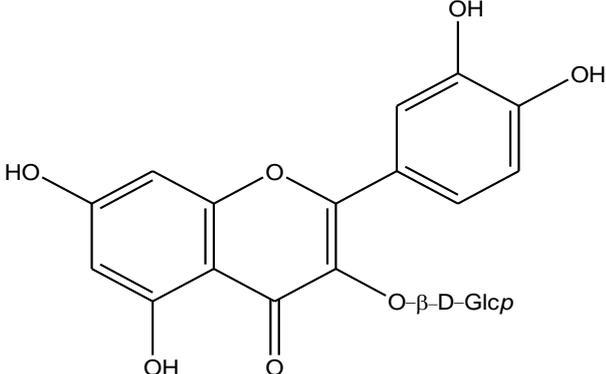
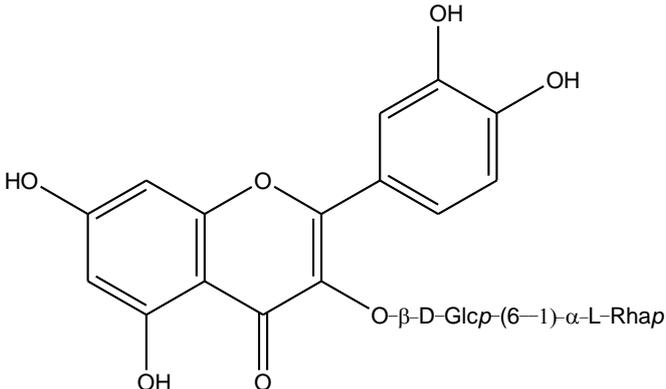
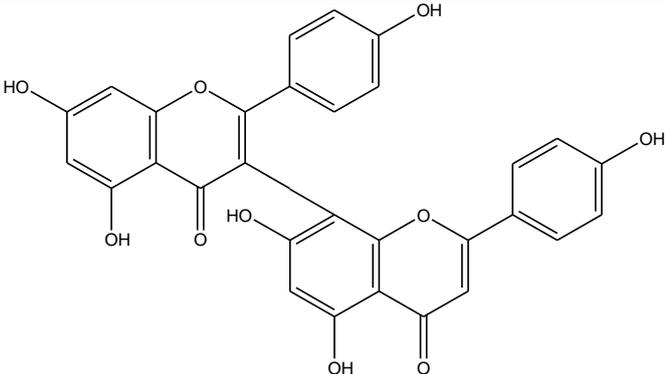
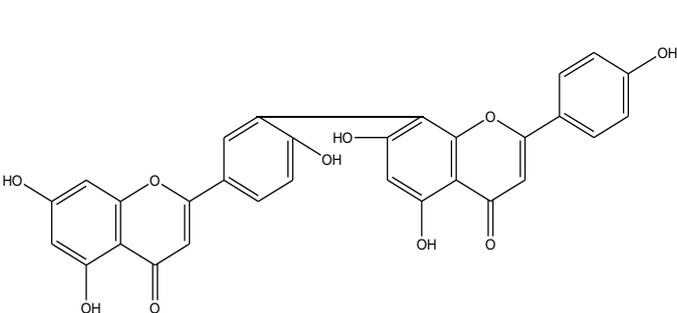
Авторами были выделены и идентифицированы из травы зверобоя продырявленного – рутин, гиперозид, кверцетин, 3,8¹¹ – бисапигенин и 6,8¹¹ – дикверцетин.

В таблице 1 приведены структурные формулы основных флавоноидов зверобоя продырявленного.

Таблица 1

Структурные формулы основных флавоноидов *H. perforatum*

№	Название соединения	Структурная формула
1	Кверцетин	
2	Кверцитрин (3- α -L-рамнозидкверцетина)	
3	Гиперозид (3- β -D-галактозидкверцетина)	

4	Изокверцитрин (3-β-D-глюкозидкверцетина)	
5	Рутин (3-β-рутинозидкверцетина)	
6	I3,II8 – бисапигенин	
7	Аментофлавон (I3',II8 – бисапигенин)	

Этими же авторами исследовалась локализация флавоноидов по органам *H. perforatum* и динамика их накопления по фазам вегетации [61] (Табл. 2 и 3).

Таблица 2

Содержание флавоноидов в различных частях сырья *H. perforatum* [61]

Части сырья	Цветки	Плоды	Стебли	Листья
Содержание флавоноидов, %	6,93±0,10	2,61±0,04	1,33±0,02	5,90±0,09

Таблица 3

Содержание флавоноидов в траве *H. perforatum* в различные фазы вегетации, % [61]

Начало вегетации	Начало бутонизации	Начало цветения	Середина цветения	Плодоношение	Конец плодоношения
3,32±0,04	4,00±0,06	5,69±0,09	5,35±0,08	3,53±0,05	3,45±0,05

Р.Р. Файзуллиной в *H. perforatum*, произрастающем в Башкортостане были идентифицированы рутин, гиперозид, кверцетин, лютеолин [79].

Состав флавоноидов *H. maculatum* изучен менее детально. Г.Г. Запесочной с соавторами сообщалось об обнаружении в траве *H. maculatum* кверцитрина, гиперозида и кверцетина [17].

В работах Л.Н. Зиминной с соавторами флавоноидный состав двух видов зверобоя – продырявленного и пятнистого, исследовался методом ВЭЖХ. Было показано, что в траве зверобоя пятнистого присутствуют гиперозид, рутин и кверцетин и в отличие от зверобоя пятнистого отсутствует I3,II8 – бисапигенин, причем гиперозид был доминирующим флавоноидом этого вида [18, 19].

Н.А. Гриненко [13] проводилось сравнительное изучение состава флавоноидов и производных антрахинона в *H. perforatum* и *H. maculatum*. Суммарное содержание флавоноидов в траве зверобоя продырявленного здесь оказалось выше (2,7%) нежели в зверобое пятнистом

(2,1%). Содержание кверцетина и гиперозида было выше в *H. maculatum*, но здесь полностью отсутствовал рутин (табл. 4).

Таблица 4

Количественное содержание флавоноидов и производных антрахинона в надземной части *H. perforatum* и *H. maculatum*, % [13]

Вид	Флавоноиды			Производные антрахинона
	кверцетин	гиперозид	рутин	
<i>H. perforatum</i>	0,105±0,005	1,280±0,027	0,860±0,046	0,40
<i>H. maculatum</i>	0,185±0,011	1,900±0,168	—	0,39

Содержание полифенолов (мг/г в эквивалентах рутина) у обоих видов, произрастающих в Эстонии, было примерно на одном уровне, достигая максимума в фазе начала цветения и снижаясь к фазе образования плодов [59].

Методом ВЭЖХ были исследованы *H. perforatum* и *H. maculatum*, произрастающие в Литве. В цветках и листьях обоих видов доминирующим флавоноидом был гиперозид, рутин в цветках практически отсутствовал, в листьях его содержание было примерно в 3 раза меньше чем гиперозида. Кверцитрин и кверцетин в обоих видах являлись минорными флавоноидами [136].

В работе [61] было показано, что в траве *H. maculatum*, заготовленной в начале цветения в Поволжье содержание флавоноидов оказалось существенно ниже ($3,16 \pm 0,05\%$), чем в траве *H. perforatum* ($5,69 \pm 0,09\%$).

1.2. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве зверобоя

Трава зверобоя входит в отечественную фармакопею последнего издания [76] и в Европейскую фармакопею [113]. ГФ XI стандартизует траву зверобоя по содержанию суммы флавоноидов, тогда как Европейская

фармакопея – по содержанию антраценпроизводных («totalhypericins»). Надо отметить, что в России официальны оба вида зверобоя – и продырявленный и пятнистый. Европейская фармакопея регламентирует качество сырья только зверобоя продырявленного. Методика ГФ XI предполагает дробную трехкратную экстракцию сырья 50% спиртом по 30 минут каждая. В последующем к аликвоте полученных экстрактов добавляется раствор хлорида алюминия и полученный раствор фотометрируется при длине волны 412 нм. Для расчетов суммарного содержания флавоноидов в траве зверобоя используется оптическая плотность комплекса ГСО рутина с раствором хлорида алюминия, которая определяется параллельно в данной методике. К сожалению, в тексте фармакопейной статьи на траву зверобоя в ГФ XI допущены грубые опечатки, фактически делающие методику невыполнимой. В вышедших в последние годы нормативных документах [82] воспроизведена фармакопейная методика, но уже без опечаток, кроме того предлагается расчеты вести не только измеряя показатель поглощения рутина с хлоридом алюминия, но и используя удельный показатель поглощения этого комплекса равный 248. Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 1,5%. Необходимо отметить, что и отечественные препараты зверобоя, такие как настойка и сухой экстракт стандартизуются по сумме флавоноидов, определяемой этим же методом [80, 86, 87].

Критическому анализу была подвергнута фармакопейная методика определения флавоноидов в траве зверобоя в работах О.Е. Правдивцевой и В.А. Куркина [60, 61]. Авторы пришли к выводу, что оптимальным растворителем для экстракции является не 50%, а 70% этиловый спирт, другие положения методики возражений не встретили.

Предлагается включить в украинскую фармакопею метод стандартизации травы двух видов зверобоя – продырявленного и пятнистого по сумме флавоноидов, разработанный на основе унифицированной методики определения флавоноидов в растительном сырье, принятой в

Европейской фармакопее. Методика заключается в следующем: навеску сырья подвергают кислотному гидролизу в среде ацетона, образовавшиеся агликоны экстрагируют этилацетатом и измеряют оптическую плотность комплекса агликонов с хлоридом алюминия в среде этилацетат–метанол–уксусная кислота. Содержание флавоноидов рассчитывают, используя удельный показатель поглощения гиперозида, который в условиях определения равен 500 [28].

Возможности усовершенствования существующих методик определения суммарного содержания флавоноидов в траве зверобоя лежат на наш взгляд в области оптимизации довольно продолжительной процедуры экстракции флавоноидов (1,5 часа), когда можно отказаться от режима исчерпывающей экстракции определяемых веществ и ввести в расчетную формулу поправочный коэффициент на неполноту экстракции. С другой стороны, с учетом того, что состав флавоноидов в двух официальных в России видах зверобоя различен, требуется уточнение референтного флавоноида, удельный показатель поглощения которого в комплексе с хлоридом алюминия будет использоваться для расчетов.

1.3. Состав флавоноидов и их количественное содержание в листьях *Betula pendula* Roth. и *B. pubescens* Ehrh.

В Российской Федерации у березы используется два вида сырья – почки и листья, для заготовки которых разрешено применять два вида – березу повислую (бородавчатую) (*Betula pendula* Roth. (синоним *B. verrucosa* Ehrh.)) и березу пушистую (*B. pubescens* Ehrh.) семейства *Betulaceae*.

Оба вида представляют собой листопадные деревья высотой до 20 м с белой, легко отслаивающейся корой. У березы повислой ветви повисающие, листья яйцевидно-ромбические, треугольно-яйцевидные или овально-яйцевидные. Береза пушистая отличается от березы повислой более короткими, направленными вверх и в стороны ветвями и овально-

яйцевидными, более кожистыми листьями. Оба вида обычны для лесной и лесостепной зоны, однако береза пушистая заходит на север значительно дальше березы повислой.

Почки и листья используются для приготовления настоев (индивидуально или в составе сборов) обладающих диуретическими, желчегонными и бактерицидными свойствами. Листья березы также используются для получения сухого экстракта, который является составной частью гепатопротекторного препарата «Сибектан».

Первые сведения об обнаружении в березе флавоноидных соединений относятся к 1946 г., когда из листьев березы повислой был выделен в количестве 0,36% гиперозид. В работе [138] в листьях *B. pendula* были обнаружены кверцитрин, гиперозид, мирицетин-3-дигалактозид. В серии работ К. Dulelenbach–Tollke (Dallenbach-Tölke) с соавторами [109, 110, 112] в листьях *B. pendula* и *B. pubescens* методом ВЭЖХ были идентифицированы кверцитрин, рутин, гиперозид, авикулярин (кверцетин-3-арабинофуранозид), кверцетин-3-арабинопиранозид, кверцетин-3-глюкуронид, мирицетин-3-галактозид.

Состав флавоноидов в листьях *B. pendula* и *B. pubescens*, произрастающих в Финляндии был изучен в работах М. Keinanen с соавторами [127, 128, 129]. С помощью метода ВЭЖХ ими были идентифицированы кверцитрин, гиперозид, авикулярин (кверцетин-3-арабинофуранозид), кверцетин-3-арабинопиранозид, кверцетин-3-глюкуронид, два различных 3-гликозида мирицетина.

В работах V. Ossipov с соавторами [117, 119] в листьях *B. pendula* и *B. pubescens* методом ВЭЖХ–МС были идентифицированы мирицетин-3-глюкуронопиранозид, мирицетин-3-галактопиранозид, мирицетин-3-ацетилрамнопиранозид, кверцетин-3-глюкуронопиранозид, кверцетин-3-галактопиранозид (гиперозид), кверцетин-3-арабинофуранозид (авикулярин), кверцетин-3-рамнопиранозид (кверцитрин), кверцетин-3-

ацетилрамнопиранозид, кемпферол-3-глюкопиранозид, кемпферол-3-рамнопиранозид, нарингенин, а также несколько флавоноидов, структура которых точно не была установлена. На рисунке 1 приведена таблица из работы [117], по которой видно, что доминирующими флавоноидами в листьях *B. pendula* являются мирицетин-3-ацетилрамнопиранозид, а в листьях *B. pubescens* – кверцетин-3-глюкуронопиранозид

Content of phenolic compounds in the leaves of *B. pubescens* and *B. pendula*

Number of peak ^a	Phenolic compound	Content ^b (mg g ⁻¹ dry mass)	
		<i>B. pubescens</i>	<i>B. pendula</i>
1	1- <i>O</i> -Galloyl- β -D-(2- <i>O</i> -acetyl)-glucopyranose	1.11	+
2	Gallic acid	0.14	+
4	Flavanol	+	+
5	Flavanol	+	+
6	Neo-chlorogenic acid	0.44	0.54
8	<i>cis</i> -5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.17	0.33
9	<i>trans</i> -5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.31	0.67
11	(+)-Catechin	2.01	1.62
12	Flavanol	1.39	+
13	1-(4''-Hydroxyphenyl)-3'-oxopropyl- β -D-glucopyranose	0.80	8.50
16	Chlorogenic acid	20.42	1.28
19	<i>trans</i> -3- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.14	0.30
21	<i>cis</i> -3- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.09	0.18
22	Flavanol	+	+
23	Flavanol	+	+
24	Flavanol	+	+
25	Myricetin-3- <i>O</i> - β -D-glucuronopyranoside	1.16	1.45
26	Myricetin-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside	0.80	0.21
27	Flavanol	0.60	+
28	Myricetin-3- <i>O</i> - α -L-(acetyl)-rhamnopyranoside	1.65	8.66
29	Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-glucuronopyranoside	4.92	0.77
30	Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside	1.41	0.07
31	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranoside	1.88	1.95
32	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	+	0.33
33	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	1.56	0.19
34	Quercetin-glycoside	0.65	+
35	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	1.18	+
36	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-(4''- <i>O</i> -acetyl)-rhamnopyranoside	0.82	+
37	Kaempferol-glycoside	0.17	+
38	Kaempferol-glycoside	0.30	0
39	Kaempferol-glycoside	0.45	0
40	Naringenin	0.07	0
41	Flavanone	0.07	+
	Total content	44.70	27.05

Рисунок 1. Содержание фенольных компонентов в листьях *B. pubescens* и *B. pendula* [117].

Состав флавоноидов в листьях березы, произрастающей в Самарской области, был изучен В.В. Стеняевой. Были выделены и идентифицированы гиперозид, рутин, апигенин, 7,4'-димететиловый эфир скутеллареина [71].

Состав и количественное содержание флавоноидов в экстракте из листьев березы изучено в работе [2]. Методом ВЭЖХ-МС были определены

такие флавоноиды как мирицетин-3-глюкопиранозид (0,409), мирицетин-3-глюкуронопиранозид (0,273), мирицетин-3-галактопиранозид (0,307), мирицетин-3-арабинофуранозид (0,063), кверцетин-3-глюкопиранозид (изокверцитрин) (0,116), кверцетин-3-галактопиранозид (гиперозид) (1,889), кверцетин-3-глюкуронопиранозид (1,073), кверцетин-3-арабинопиранозид (0,440), кверцетин-3-арабинофуранозид (авикулярин) (0,186), кверцетин-3-рамнопиранозид (кверцитрин) (0,442), кемпферол-3-рамнопиранозид (0,146), 5,7-дигидрокси-3',4'-диметоксифлавоон (0,411). В скобках приведено каждого флавоноида в мг/100 мг экстракта. Из представленных данных видно, что доминирующим флавоноидом листьев березы является гиперозид.

Той же В.В. Стеняевой для определения наиболее оптимальных сроков заготовки данного лекарственного растительного сырья было проведено исследование динамики накопления флавоноидов в листьях березы (Рис. 2).

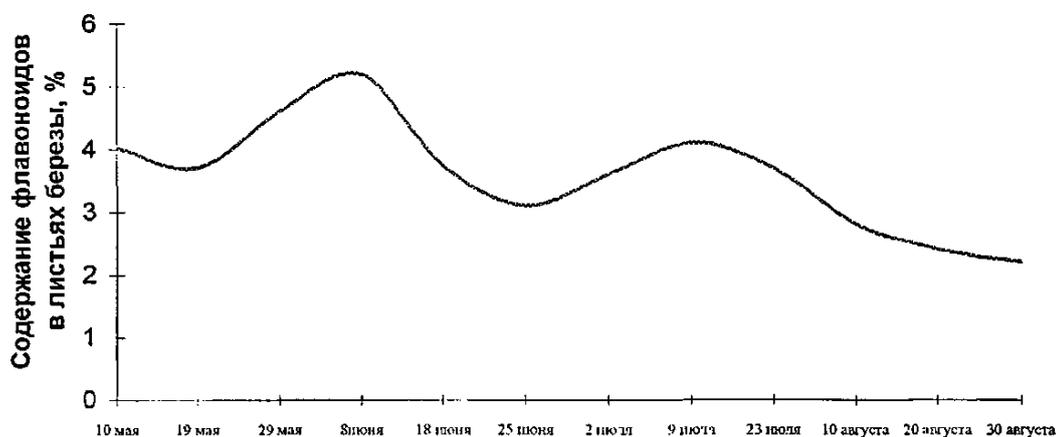


Рисунок 2. Динамика накопления флавоноидов в листьях березы [71].

В результате проведенных исследований было установлено, что основной максимум содержания суммы флавоноидов наблюдается в конце первой декады июня (5,14 %), затем отмечается тенденция к некоторому снижению содержания этих соединений (3,03 %) – конец июня. В начале июля содержание суммы флавоноидов снова начинает увеличиваться и достигает максимума к концу первой декады июля (4,06 %), причем до конца месяца оно остается довольно высоким.

В середине августа содержание суммы флавоноидов опускается ниже нормируемого предела и составляет 1,69 % [71].

Состав флавоноидов и динамика накопления их в листьях двух видов берез – *B. pendula* и *B. pubescens*, произрастающих в Татарстане было изучено Г.В. Дёминой с соавторами [14]. Было показано, что доминирующим флавоноидом в листьях обоих видах берез является гиперозид, рутин – не обнаружен. Динамика накопления соответствовала данным полученным в работе В.В. Стеняевой [71], максимальное накопление флавоноидов наблюдалось во второй половине мая, к середине июня содержание флавоноидов снижалось и вновь возрастало к середине июля, еще один подъем отмечался в середине сентября.

1.4. Методы количественного определения суммы флавоноидов в листьях березы

Листья березы повислой включены в Европейскую фармакопею. Количественное определение флавоноидов проводится по унифицированной методике, по которой таким же образом определяется содержание флавоноидов еще в нескольких видах сырья. Навеска сырья нагревается 30 минут в ацетоне, содержащем раствор гексаметилентетрамина и хлористоводородную кислоту для гидролиза гликозидов флавоноидов. После фильтрования раствора остаток в колбе дважды экстрагируют порциями ацетона при нагревании по 10 минут. Все ацетоновые извлечения собирают в мерной колбе на 100 мл и доводят объем раствора ацетоном до метки. 20 мл этого раствора переносят в делительную воронку, разбавляют 20 мл воды и извлекают агликоны флавоноидов этилацетатом 4 порциями (15+10+10+10 мл). Аликвоту этого раствора смешивают с раствором хлорида алюминия и уксусной кислоты в метаноле. Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора при 425 нм. Для расчетов используют удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с хлоридом

алюминия при 425 нм равный в условиях опыта 500. Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 1,5% [113].

В России листья березы как лекарственное сырье стандартизуются по ВФС и ФСП [9, 83, 85]. Во всех трех нормативных документах методика количественного определения флавоноидов одинакова и предполагает двухчасовую экстракцию флавоноидов кипящим 50% спиртом. К аликвоте экстракта добавляется раствор хлорида алюминия и через 40 минут измеряется оптическая плотность раствора при 412 нм. Параллельно измеряется оптическая плотность ГСО рутин с хлоридом алюминия. В методике ФСП ОАО «Красногорсклексредства» [83] допускается использовать для расчетов удельный показатель поглощения этого комплекса равный 248. Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 2,0%.

Был предложен метод определения флавоноидов в листьях березы, который отличается от фармакопейных тем, что в качестве референтного флавоноида предлагается использовать не рутин, а доминирующий флавоноид этого сырья – гиперозид [35].

Сухой экстракт листьев березы, входящий в состав препарата «Сибектан» стандартизуется по сумме фенольных соединений (фактически флавоноидов) в пересчете на рутин. В работе [64] предлагается стандартизовать сухой экстракт из листьев березы по сумме флавоноидов в пересчете на доминирующий флавоноид – гиперозид.

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что официальные методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях березы в пересчете на рутин предполагают достаточно длительную процедуру экстракции (2 часа), что делает возможным их оптимизацию за счет сокращения времени экстракции и разработку экспрессного варианта определения флавоноидов в этих видах сырья. Требуется дополнительное уточнение использования для расчетов в качестве референтного флавоноида

рутина, поскольку по литературным данным в листьях березы основным флавоноидом является гиперозид.

1.5. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве *Polygonum aviculare* L.

Горец птичий, или спорыш, *Polygonum aviculare* L. сем. *Polygonaceae* – однолетнее травянистое растение с ветвистым лежачим, приподнимающимся тонким стеблем 10-60 см длиной и небольшими округло-эллиптическими листьями. Цветки мелкие, по 3-5 в пазухах листьев. Плод – орешек. Распространен космополитно в северном полушарии. В России произрастает в европейской части, в Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке. Встречается повсеместно на лугах и пашнях вдоль дорог и по выгонам, на приречных песках и отмелях [1].

Сбор травы горца птичьего проводят в фазу цветения, рекомендуемые календарные сроки для средней полосы России – июль–сентябрь [62].

В настоящее время трава горца птичьего используется фактически только в форме настоя в качестве кровоостанавливающего и диуретического средства.

Действующими веществами травы горца птичьего считаются флавоноиды, по содержанию которых осуществляется оценка качества сырья. Изучение флавоноидного состава горца птичьего было начато в 1940 году. Первый флавоноловый гликозид авикулярин (3- α -L-арабинозидкверцетина) был выделен в 1940 году из надземной части горца птичьего, собранного в Японии [132]. Позднее F. Naverland [114] обнаружил в надземной части горца птичьего, произрастающего в Германии, кверцитрин (3-L-рамнозидкверцетина) и гиперозид (3-D-галактозидкверцетина), а J. Tronchet и B. Vuillemin [137] в надземной части этого вида, собранного во Франции – три гликозида кверцетина и 2 гликозида кемпферола.

В дальнейшем П.П. Хворост и Н.Ф. Комиссаренко подтвердили наличие авикулярина и кверцитрина в надземной части горца птичьего, собранного на

Украине, и, кроме того, выделили из нее кверцетин [100]. Л.Г. Паносян с соавторами изучая надземную часть горца птичьего, собранного в Армении, не обнаружили в ней этих гликозидов, но выделили из него гиперозид, 3-арабинозид кемпферола, 3-галактозид рамнетина, флавоноид лютеолин и С-гликозиды – витексин и изовитексин [8]. Гликозиды мирицетина в качестве основных компонентов были найдены в надземной части горца птичьего японскими исследователями [126].

М.И. Китаева и Л.В. Селенина [25] изучая надземную часть горца птичьего из окрестностей Санкт-Петербурга, установили, что флавоноидный комплекс этого вида состоит из 9-ти компонентов, из которых доказано наличие: кверцетина, гиперозида и 7-гликозида эпигенина. Корейские фитохимики выделили из надземной части горца птичьего югланин (3-арабинозид кемпферола), астрагалин (3-β-D-глюкозид кемпферола) и авикулярин [130].

Содержание флавоноидов в горце птичьем, произрастающем в Сибири, изучалось Г.И. Высочиной. Ею было выделено из надземной части этого вида 7 веществ флавоноидной природы, 2 из которых были идентифицированы как югланин и гиперозид, еще одно – предположительно как 3-О-дигалактозид мирицетина. Была дана также количественная оценка содержания флавоноидов в надземной части и листьях. Содержание суммы флавоноидов в листьях различных образцов варьировало от 0,47 до 4,40%, в надземной части – от 0,63 до 3,65%. Было установлено, что доминирующими являются 3 флавоноида – югланин, гиперозид и флавоноидный гликозид не установленного строения. Максимальное содержание югланина достигало 1,38%, гиперозида – 0,84% и третьего флавоноида – 0,62%. В изученных образцах сумма трех главных флавоноидных гликозидов составляла 33,0–88,0% от общего количества флавоноидов. В подавляющем большинстве образцов основным флавоноидом являлся югланин, однако в некоторых случаях преобладал гиперозид. Автор пришел к заключению о

существовании на территории Сибири двух хемоформ горца птичьего – с преобладанием югланина или гиперозида [11].

Сведения о количественном содержании флавоноидов в горце птичьим приводятся еще в двух работах: содержание флавоноидов в надземной части этого вида, собранного в Литве, составило 9,4% [57], а собранного в окрестностях Ленинграда – 0,88–1,45% [25]. Данные литовских авторов при сравнительном анализе представляются явно завышенными.

В другой работе Г.И. Высочиной была изучена динамика содержания и качественного состава флавоноидов травы горца птичьего, собранного в окрестностях г. Новосибирска в различные фазы вегетации. Было установлено, что в течение всего вегетационного периода югланин является главным флавоноловым гликозидом растений изученной популяции. В динамике суммы флавоноидов в надземной части растений отмечается два максимума: больший – в вегетативной фазе, и меньший – в фазе начала плодоношения. Содержание суммы флавоноидов в надземной части в фазу вегетации составило около 3,5%, а в листьях – 7,65%, причем на югланин приходится более половины – 4,0%. К концу вегетации происходит сначала резкое, а потом постепенное снижение суммы флавоноидов, остается минимальным в течение всего периода цветения и вновь возрастает в начале плодоношения. Для выбора оптимального срока заготовок сырья автором было проведено определение содержания флавоноидов в пересчете на сырьевую массу одного сухого растения в мг в те же фенофазы. В результате было установлено, что наибольшее содержание флавоноидов (78,4 мг) можно получить из одного растения в фазу начала плодоношения, которая и предлагается в качестве оптимальной для заготовок травы спорыша [10].

Данные о содержании флавоноидов в горце птичьим произрастающем в Татарстане, приводятся в работе [96]. Авторы установили, что содержание флавоноидов в траве горца птичьего максимально в фазу вегетации (июнь) – $1,04 \pm 0,07\%$, снижается в фазу цветения (июль) – $0,86 \pm 0,08\%$, и достигает

минимальных значений в фазу плодоношения (август) – $0,68 \pm 0,07\%$. В другой работе этих же авторов был изучен процесс перехода флавоноидов травы горца птичьего в водные извлечения [97].

1.6. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве горца птичьего

Трава горца птичьего включена в Государственную фармакопею СССР XI издания [75] и Европейскую фармакопею [113]. В обоих нормативных документах предусмотрена стандартизация сырья по содержанию суммы флавоноидов. Однако есть разница в методах количественного определения этих соединений в данном сырье. Отечественная фармакопея предусматривает трехкратную экстракцию флавоноидов горца птичьего (в форме гликозидов) 70% спиртом (каждая экстракция продолжительностью 30 минут) с последующим добавлением к аликвоте экстракта раствора хлорида алюминия и измерением через 20 минут оптической плотности раствора при 410 нм. Для расчетов используется удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с хлоридом алюминия при 410 нм равный 330. Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 0,5%.

В Европейской фармакопее используется унифицированная методика, принципиальное содержание которой изложено в разделе 1.4. данной диссертации. Сущность методики заключается в том, что навеску сырья подвергают кислотному гидролизу в среде ацетона, полученные агликоны экстрагируют этилацетатом и измеряют оптическую плотность комплекса агликонов с хлоридом алюминия в среде этилацетат–метанол–уксусная кислота. Содержание флавоноидов рассчитывают, используя удельный показатель поглощения гиперозида, который в условиях определения равен 500.

Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 0,3%.

Возможности усовершенствования существующей фармакопейной методики определения суммарного содержания флавоноидов в траве горца птичьего лежат на наш взгляд в области оптимизации довольно продолжительной процедуры экстракции флавоноидов (1,5 часа), когда можно отказаться от режима исчерпывающей экстракции определяемых веществ и ввести в расчетную формулу поправочный коэффициент на неполноту экстракции.

1.7. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве *Origanum vulgare* L.

Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L., семейство Яснотковых - *Lamiaceae*) — многолетнее травянистое растение, имеющее несколько опушенных стеблей высотой 30-60 см. Листья супротивные, черешковые, удлинённо-яйцевидные, цельнокрайние или мелкозубчатые, на верхушке заострённые, тёмно-зелёного цвета, снизу более светлые, длиной 1-4 см. Цветки мелкие розово-пурпурной окраски, многочисленные, собранные в щитковидную метёлку. Плод сухой, четырёх-орешек. Растение обладает приятным, ароматным запахом. Цветёт с июля до сентября, плодоносит в сентябре-октябре [66].

Душица распространена в Европе и Средиземноморье. В России растёт в средней зоне европейской части страны, на Кавказе, в южных районах Сибири. Основные заготовки проводятся в средней полосе России.

В настоящее время трава душицы используется фактически только в форме настоя в качестве противовоспалительного и отхаркивающего средства.

Основными носителями биологической активности душицы считаются эфирное масло и его преобладающие компоненты – терпены фенольной природы – тимол и карвакрол. Это нашло отражение и в нормативных документах на это сырье. Европейская фармакопея стандартизует траву

душицы по содержанию эфирного масла (не менее 2,5%), в котором суммарное содержание тимола и карвакрола должно быть не меньше 75%. Отечественная фармакопея также предусматривает стандартизацию травы душицы по содержанию эфирного масла (не менее 0,1%). Мы видим, что минимальный уровень эфирного масла для отечественной травы душицы в 25 раз ниже, чем для европейского сырья. К тому же на территории России массово произрастает один из 4-х хемотипов *O. vulgare*, в составе эфирного масла которого нет тимола и карвакрола. Подобное положение побудило исследователей к изучению других групп природных соединений душицы обыкновенной, и выбор здесь пал, прежде всего, на флавоноиды.

Зарубежными исследователями из душицы обыкновенной были выделены и идентифицированы кемпферол, лептозидин, 5-гидрокси-3,7,3',4'-тетраметоксифлавоон, лютеолин, апигенин, нарингенин-7-глюкозид, лютеолин-7-диглюкуроноид, лютеолин-7,3'-О-диглюкуроноид, лютеолин-7,4'-О-диглюкозид, лютеолин-7-О-рутинозид [121]. Российскими учеными из душицы обыкновенной выделены флавоноиды изороифолин (7-рутинозид апигенина), лютеолин-7-глюкозид [12]. В душице обыкновенной найдены антоциановые соединения – производные пеонидина, антоцианидина и мальвидина [67].

Детальное изучение флавоноидного состава *O. vulgare*, произрастающей в Восточной Сибири было проведено в серии работ В.М. Миревич с соавторами [48, 49, 50, 58]. Были обнаружены и идентифицированы такие флавоноиды как 5-оксифлавоон, космоин (апигенин-7-β-D-глюкопиранозид), лютеолин-7-β-D-глюкуронозид, лютеолин, хризин-7-β-D-глюкуронозид, а также неидентифицированный гликозид апигенина. Этим же автором были изучены закономерности накопления флавоноидов культивируемой и дикорастущей душицы обыкновенной из восточносибирского региона в сравнении с душицей из других регионов России. Было показано, что качественный состав флавоноидов

культивируемой и дикорастущей душицы одинаков. Все органы растения накапливают гликозиды лютеолин-7-β-0-глюкуронозид и космосиин. Листья, кроме указанных соединений, накапливают лютеолин, а стебли – хризин-7-β-0-глюкуронозид и 5-оксифлаван. При изучении динамики накопления флавоноидов в надземных органах душицы обыкновенной культивируемой и дикорастущей установлено, что наибольшее их количество накапливают листья и цветки. Меньше всего флавоноидов содержат стебли душицы обыкновенной. Закономерность распределения флавоноидов по органам душицы обыкновенной культивируемой и дикорастущей из Восточной Сибири и европейской части России оказалось одинаковой. Автором отмечается, что трава душицы обыкновенной культивируемой в условиях Восточной Сибири в период цветения по содержанию флавоноидов не уступает дикорастущим образцам из сибирского региона и европейской части России. Отмечается, что культивирование душицы обыкновенной приводит к увеличению количественного содержания флавоноидов по сравнению с душицей из естественных местообитаний этого региона.

Поскольку для душицы обыкновенной свойственна изменчивость качественного состава флавоноидов под влиянием климатогеографических факторов [106], В.М. Миревич исследовала особенности накопления в ней не только суммы флавоноидов, но также производных лютеолина и апигенина. Было установлено, что надземные органы душицы обыкновенной из различных географических мест сбора содержат флавоноиды, производные лютеолина и апигенина в количествах от 0,41 до 0,97%. При этом флавоноидов, производных лютеолина, в душице обыкновенной из средней полосы России, Западной и Восточной Сибири накапливается в 3 раза больше, чем флавоноидов, производных апигенина. Для южных районов (Ставропольский край, Азербайджан) характерно соотношение флавоноидов, производных лютеолина и апигенина как 58:42 (или 1,4:1). Таким образом, автором было установлено, что душица обыкновенная по содержанию

флавоноидов, производных лютеолина и апигенина имеет две хеморасы (с соотношением этих компонентов как 3:1 и 1,4:1 соответственно).

Увеличение содержания производных лютеолина в душице обыкновенной из средней полосы России и сибирского региона, по мнению автора, связано с приспособлением этого растения к более суровым климатическим условиям (низкие зимние температуры, короткий летний период). Далее автором была изучена динамика накопления флавоноидов по фазам вегетации в душице обыкновенной культивируемой в условиях Иркутской области. В период вегетации в надземной части растения отмечается высокое содержание флавоноидов, что объясняется значительным количеством листьев на еще слабо развитых стеблях, так как листья накапливают наибольшее количество этих соединений. В последующем происходит плавное снижение содержания флавоноидов вплоть до фазы плодоношения. Таким образом, проведенные автором исследования показали, что в химическом составе душицы обыкновенной сумма флавоноидов была представлена производными лютеолина и апигенина в соотношениях 3:1 [15, 49].

1.8. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве душицы

Хотя трава душицы включена и в Европейскую и отечественную фармакопею, этими нормативными документами она стандартизуется по содержанию эфирного масла [74, 113]. Вышедшая в 2006 году ФСП на траву душицы ОАО «Красногорсклексредства» предлагает стандартизовать траву душицы, не предназначенную для получения эфирного масла, по содержанию суммы флавоноидов. Методика предполагает полуторачасовую экстракцию флавоноидов 60% этиловым спиртом, добавление к аликвоте экстракта раствора хлорида алюминия и через 40 минут измерение оптической плотности раствора при 400 нм. Для расчетов используется

удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с хлоридом алюминия равный при 400 нм 549,41 [89].

Эта же методика предлагается для включения в XII издание Российской фармакопеи. На сайте Минздрава РФ опубликован проект соответствующей фармакопейной статьи на траву душицы [63].

Предлагается для включения в Государственную фармакопею Украины в монографию «Трава душицы» на основе унифицированного метода определения флавоноидов из Европейской фармакопеи, методика определения суммы флавоноидов в траве душицы. Методика заключается в следующем: навеску измельченного сырья обрабатывают при нагревании 60% спиртом, полученный экстракт после охлаждения и фильтрования количественно переносят в мерную колбу, аликвоту полученного раствора выпаривают, после выпаривания остаток обрабатывают смесью кислоты борная – кислота щавелевая в среде кислота муравьиная – кислота уксусная. Определяют оптическую плотность образующегося при этом окрашенного раствора при 409 нм. Для расчетов используют удельный показатель поглощения комплекса лютеолин-7-глюкозида (цинарозида) с борной и щавелевой кислотами равный 700 [29].

Был разработан метод определения флавоноидов в траве душицы на основе двукратной экстракции сырья 70% этиловым спиртом общей продолжительностью 60–70 минут и цветной реакцией с хлоридом алюминия в среде ацетатного буфера (рН=4). Оптическую плотность раствора измеряли при 396 ± 3 нм, используя в качестве стандартного раствора ГСО лютеолин-7-глюкозида (цинарозида). Среднее содержание флавоноидов в траве душицы, определенное авторами оставило $0,98 \pm 0,02\%$. Ошибка метода не превышала 2,04% [73].

Таким образом, можно констатировать, что официальная методика определения суммы флавоноидов в траве душицы по [89] (она же предлагается для включения в Государственную фармакопею XII издания)

предусматривает длительную (1,5 часовую) экстракцию сырья и тоже может быть подвергнута оптимизации за счет сокращения этой процедуры. Кроме этого, спорным является использование для расчетов удельного показателя поглощения агликона лютеолина, поскольку основная масса флавоноидов душицы имеет гликозидную природу. Вопрос использования оптимального референтного флавоноида при анализе травы душицы нуждается в дополнительном изучении.

1.9. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве *Thymus serpyllum* L.

Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L., семейство Губоцветных – *Lamiaceae*) – многолетний полукустарничек высотой до 15 см, образующий густые дерновники. Стебли при основании деревянистые, распластанные по почве, ветвистые, с приподнимающимися или прямостоячими ветвями, покрытыми отогнутыми вниз или отстоящими волосками. Листья супротивные, короткочерешковые, продолговато-овальные, точечно-железистые, сверху тёмно-зелёные, снизу зеленовато-зелёные. Пластинка от округлой или яйцевидной до линейно-продолговатой формы. Цветки мелкие, яркие, розовато-лиловые, собраны на концах ветвей в головчатые соцветия. Плоды – мелкие, овальные, гладкие, черно-бурые орешки. Растение душистое. Цветёт в июне – июле, плодоносит в августе – сентябре [5].

В нашей стране он распространён в лесной и лесостепной зонах европейской части страны, Западной Сибири, Забайкалье.

Трава чабреца используется как отхаркивающее средство в форме настоя и в форме жидкого экстракта в составе препарата «Пертуссин».

Основными носителями биологической активности тимьяна ползучего, как и у душицы считаются эфирное масло и его преобладающие компоненты – терпены фенольной природы – тимол и карвакрол. Отечественная

фармакопея XI впрочем, предусматривает стандартизацию травы чабреца только по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 30% спиртом.

Изучению флавоноидного состава тимьяна ползучего посвящено небольшое количество работ. Флавоноидный состав видов тимьяна (в том числе и тимьяна ползучего), произрастающих на территории Польши был изучен в работе [133]. В тимьяне ползучем были обнаружены следующие флавоноиды – апигенин, лютеолин, диосметин, скутеллареин, апигенин-7-О-β-D-глюкозид (космосиин), лютеолин-7-О-β-D-глюкозид (цинарозид), диосметин-7-О-β-D-глюкуронид, лютеолин-7-О-β-D-диглюкозид, скутеллареин-глюкозилглюкуронид. Апигенин, лютеолин и скутеллареин были идентифицированы в чабреце, произрастающем на Украине [44]. Апигенин-4'-О-β-D-п-кумароилглюкозид и скутеллареин-7-О-β-D-глюкозил (1-4)-α-L-рамнозид были описаны в индийских видах *T. serpyllum* [139, 140].

1.10. Методы количественного определения суммы флавоноидов в траве тимьяна ползучего

Как уже отмечалось, действующими нормативными документами трава чабреца стандартизуется только по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 30% спиртом [78]. На сайте Минздрава РФ размещен проект фармакопейной статьи на траву чабреца для включения в Государственную фармакопею РФ XII издания. Проект предлагает стандартизацию травы чабреца проводить по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид. Методика определения флавоноидов предусматривает часовую экстракцию сырья кипящим 70% этанолом и проведением цветной реакции с хлоридом алюминия в аликвоте экстракта. Оптическая плотность полученного раствора измеряется при длине волны 395 ± 2 нм. Расчет ведется с использованием удельного показателя поглощения цинарозида с алюминия хлоридом равным 345.

Содержание суммы флавоноидов в траве чабреца согласно проекту ФС нормируется на уровне не менее 0,9% [63].

В работе [54] предложена похожая методика определения флавоноидов, однако в качестве референтного соединения предлагается использовать рутин. Навеска сырья экстрагируется 50% спиртом в течение 50 минут. К аликвоте полученного экстракта добавляется раствор хлорида алюминия и через 20 минут измеряется оптическая плотность раствора при 415 нм. Для расчетов используется величина оптической плотности ГСО рутина с хлоридом алюминия измеренная при той же длине волны.

Из действующих нормативных документов на препараты чабреца можно отметить ФСП 42-2627-08 «Чабреца экстракт жидкий субстанция» ОАО «Фармстандарт–Томскхимфарм». В данной статье стандартизация препарата осуществляется по содержанию суммы флавоноидов после реакции с хлоридом алюминия. Измерения проводятся длине волны 395 нм с использованием для расчетов стандартного образца лютеолина [90].

Для оптимизации нами была выбрана методика определения суммы флавоноидов в траве чабреца из проекта фармакопейной статьи для включения в Государственную фармакопею РФ XII издания. Область оптимизации находится в сокращении времени экстракции флавоноидов, с другой стороны необходимо уточнить использование в качестве референтного флавоноида цинарозида и аналитической длины волны, при которой будут производиться измерения, поскольку в литературе описаны и другие варианты, нежели те которые используются в проекте фармакопейной статьи.

1.11. Состав флавоноидов и их количественное содержание в цветках *Calendula officinalis* L.

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L., семейство Астровых – *Asteraceae*) – однолетнее травянистое растение. Все растение железисто-опушенное с ветвистым прямостоячим стеблем высотой около 50-70см. Листья очередные, продолговато-обратнояцевидные. Золотисто–желтые оранжевые цветки, собранные в крупные корзинки; краевые –

ложноязычковые, в центре трубчатые. Плоды – семянки разной формы и величины развиваются из краевых язычковых цветков, срединные трубчатые – бесплодные. Цветет растение со второй половины лета до поздней осени. Дикорастущие формы не известны. Растение встречается только в культуре.

Цветки ноготков применяют как ранозаживляющее, противовоспалительное и ранозаживляющее средство. Используются в форме настоя, настойки и жидкого экстракта (в составе «Ротокана»).

Первыми сообщениями об обнаружении в *C. officinalis* L. флавоноидов стали работы Н. Freidrich в которых сообщалось о выделении из цветков двух флавоноидов изорамнетин-3-глюкозида и изорамнетин-3-рутинозида [115, 116]. Флавоноидный состав цветков календулы, выращенной на территории Советского Союза был впервые подробно изучен в работе украинских авторов, которые выделили и описали такие флавоноиды как изорамнетин, изорамнетина-3- β -глюкопиранозид, изорамнетина-3- β -D-глюкопиранозид, кверцетина-3- β -D-глюкопиранозид, а также два флавоноида до конца не установленного строения, агликоном которых был изорамнетин, а гликозидная часть была представлена глюкозой и рамнозой [3].

Природа доминирующих флавоноидов цветков календулы, культивируемой в России, была определена в работах О.В. Шаровой и В.А. Куркина, где было показано, что это изорамнетин-3-рутинозид (нарциссин) и кверцетина-3- β -D-глюкопиранозид (изокверцитрин) [37, 102].

Подробное исследование флавоноидного состава *C. officinalis* L., выращенной в азиатской части России, было представлено в работах Д.Н.Оленникова и Н.И. Кащенко [24, 125, 134]. Из цветков *C. officinalis* L. были выделены и описаны такие флавоноиды как – кверцетин, изорамнетин, кверцитрин, изокверцитрин, кверцетин-3-O-(2''-ацетил)- β -D-глюкопиранозид, кверцетин-3-O-(6''-ацетил)- β -D-глюкопиранозид, кверцетин-3-O-(2'',6''-диацетил)- β -D-глюкопиранозид, изорамнетин-3-O- β -D-глюкопиранозид, изорамнетин-3-O- α -L-рамнопиранозид, календофлазид, изорамнетин-

3-О-(6''-ацетил-)-β-D-глюкопиранозид, кверцетин-3-О-(2''-α-L-рамнопиранозил)-α-L-рамнопиранозид, рутин, нарциссин, календофлавозид, календофлавобиозид, мангаслин, тифанеозид. Два соединения – изорамнетин-3-О-(2''-ацетил-)-β-D-глюкопиранозид и изорамнетин-3-О-(2'',6''-диацетил-)-β-D-глюкопиранозид выделенные из цветков календулы являлись новыми природными веществами.

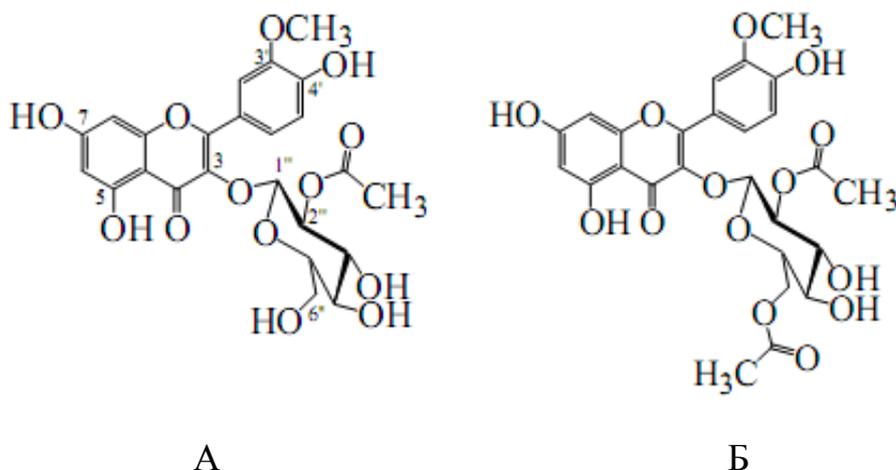


Рисунок 3. Новые природные флавоноиды изорамнетин-3-О-(2''-ацетил-)-β-D-глюкопиранозид (А) и изорамнетин-3-О-(2'',6''-диацетил-)-β-D-глюкопиранозид (Б) [24].

1.12. Методы количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы

Цветки календулы включены в отечественную и Европейскую фармакопеи. Количественное определение флавоноидов по Европейской фармакопее проводится по унифицированной методике, по которой таким же образом определяется содержание флавоноидов еще в нескольких видах сырья. Сущность этой методики изложена в разделе 1.4. данной диссертации. Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 1,5% [113].

По действующей ГФ XI стандартизация цветков календулы проводится по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом, но

вышедшие в последнее время ФСП предусматривают стандартизацию этого сырья по сумме флавоноидов. В частности в ФСП 42-8179-06 ОАО «Красногорсклексредства» на цветки ноготков методика количественного определения флавоноидов предполагает двухчасовую экстракцию флавоноидов кипящим 70% спиртом. К аликвоте экстракта добавляется раствор хлорида алюминия и через 40 минут измеряется оптическая плотность раствора при 408 нм. Для расчетов используется удельный показатель поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия равный 248. Содержание суммы флавоноидов нормируется в сырье на уровне не менее 1,0% [88].

Похожая методика предлагается и в проекте ФС для включения в ГФ РФ XII издания, опубликованном на сайте Минздрава РФ. В этой статье двухчасовой экстракции на водяной бане предшествует настаивание сырья с 70% спиртом при комнатной температуре в течение часа, т.е. общее время экстракции увеличивается до 3-х часов. Вместо использования удельного показателя поглощения здесь реализован вариант с применением ГСО образца рутина [31].

В.А. Куркин и О.В. Шарова предлагают общее время экстракции сократить до 1 часа и проводить определение оптической плотности растворов извлечения с хлоридом алюминия при 412 нм [34].

В работе [65] предлагается двухкратная экстракция 70% этанолом по 40 минут каждая и измерение оптической плотности проводить при 395 нм.

Н.И. Кащенко и Д.Н.Оленников подвергли критическому разбору все применяющиеся в настоящее время методы количественного определения флавоноидов в цветках календулы и предложили свою, свободную от недостатков присущих известным методам. Методика Европейской фармакопеи была подвергнута критике за сложность и многостадийность и неудачный, по мнению авторов, выбор референтного флавоноида для расчетов – гиперозида, агликоном которого является кверцетин, хотя

доминирующими флавоноидами цветков календулы являются производные изорамнетина. Отечественные методики, по мнению авторов, дают завышенные результаты, поскольку свой вклад в оптическую плотность при измеряемых длин волн вносят комплексы оксикоричных кислот (в частности, кофеоилхинных) с хлоридом алюминия. Авторами предлагается методика определения флавоноидов в цветках календулы, в которой после часовой экстракции сырья 60% спиртом в ультразвуковой ванне, предусмотрен этап твердофазной экстракции на полиамидном патроне, для отделения флавоноидов от оксикоричных кислот [23]. На наш взгляд, это достаточно серьезно усложняет методику. Проблему влияния на оптическую плотность комплекса хлорида алюминия с оксикоричными кислотами, можно решить проще, путем добавления в реакционную среду кислоты, которая разрушает достаточно неустойчивые комплексы хлорида алюминия с оксикоричными кислотами по орто-гидроксильным группам, не влияя на более прочные комплексы с флавоноидами с участием карбонильной группы в 4-м положении.

Все методики предусматривают достаточно длительную процедуру экстракции (от 1 до 3-х часов), которая на наш взгляд может быть сокращена с введением в расчетную формулу коэффициента поправки на неполноту экстракции флавоноидов. Доминирующим флавоноидом цветков календулы является производное изорамнетина – изорамнетин-3-рутинозид (нарциссин). Было показано, что по физико-химическим свойствам нарциссин очень близок к рутину и имеет близкий к нему удельный показатель поглощения [102]. Поскольку рутин является гораздо более доступным флавоноидом, чем нарциссин его использования в качестве ГСО (и использование для расчетов удельного показателя поглощения рутина) при анализе цветков календулы является вполне оправданным.

1.13. Состав флавоноидов и их количественное содержание в цветках *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

Бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench, семейство Астровых – *Asteraceae*) – многолетнее травянистое растение с беловато-войлочным опушением, высотой 20–40 см. Прикорневые листья продолговато-обратнояйцевидные, стеблевые – линейно-ланцетовидные, очередные, цельнокрайние, длиной 2–6 см. Цветки в шаровидных корзинках шириной 5–6 мм, собранные в густые щитковидные метелки; листочки обертки сухие, лимонно-желтые, реже оранжевые. Краевые цветки расположены в один ряд, нитевидно-трубчатые, обоеполые; вместо чашечки хохолок. Цветет с июля по август.

В нашей стране он распространён в лесной, лесостепной и степной зонах европейской части страны, в степных районах Западной Сибири.

Цветки бессмертника песчаного применяются как желчегонное средство при заболеваниях печени, желчного пузыря и желчевыводящих путей. Основные формы использования – настой и препарат «Фламин».

В соцветиях бессмертника содержится сумма флавоноидов, относящихся к различным группам: флавоны (апигенин, лютеолин), флавонолы (кемпферол, кверцетин и их гликозиды, 3,5-дигидрокси-6,7,8-триметоксифлавоноловые гликозиды), флаваноны (нарингенин и его гликозиды), халконы (изосалипурпозид) [45]. В работах А.В. Куркиной было показано, что доминирующими флавоноидами цветков бессмертника являются изосалипурпозид и салипурпозид [38, 40, 41, 42].

В работах [56, 99] было показано, что при получении вытяжек из цветков бессмертника песчаного происходит реакция халкон – флаваноновой изомеризации салипурпозид и изосалипурпозид, существующего в более устойчивой *E*-конфигурации. Изомеризация происходит как при длительном стоянии вытяжек, их подкислении, так и при нагревании. Процесс

циклизации одновременно сопровождается образованием *Z*-изомера изосалипурпозид.

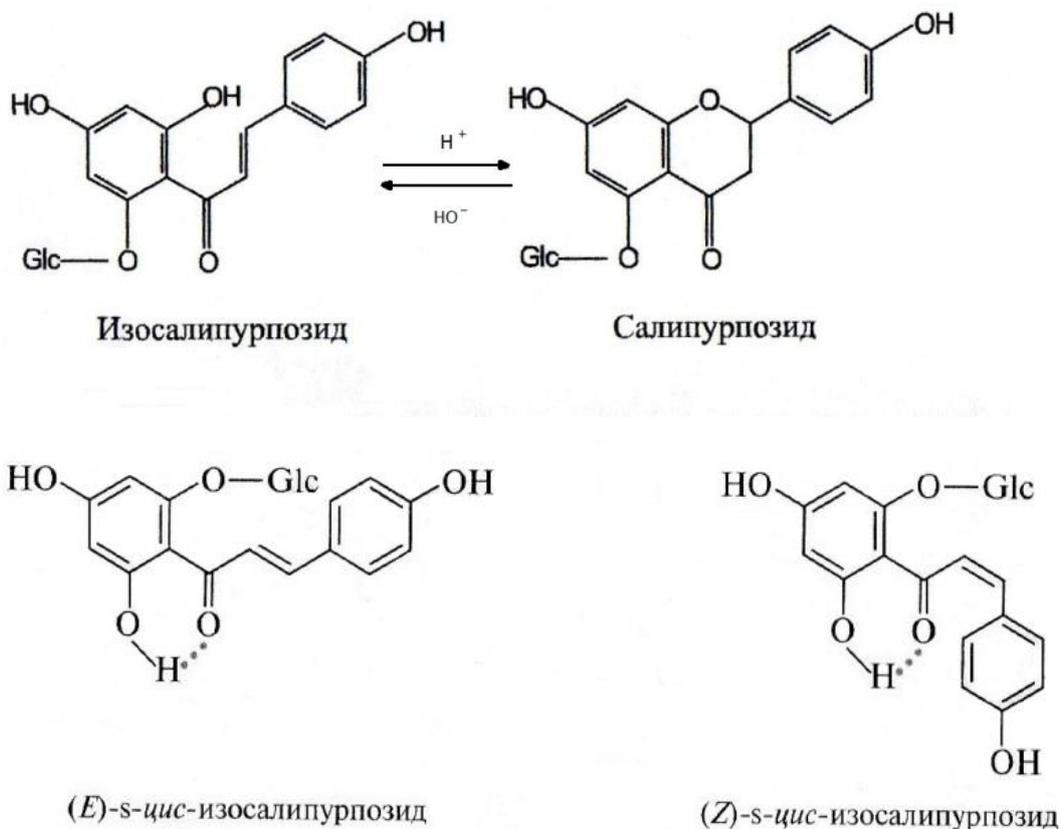


Рисунок 4. Халкон–флаваноновая изомеризация изосалипурпозид и образование его диастереоизомеров.

Накопление флавоноидов в надземной части *H. arenarium* из различных местобитаний Саратовской области было изучено в работе [21]. Основным местом локализации флавоноидов в бессмертнике являются соцветия, содержание которых составляет от 4,5 до 6,5% от массы соцветий.

1.14. Методы количественного определения суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного

Цветки бессмертника песчаного включены в ГФ XI. Стандартизацию цветков бессмертника по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид фармакопея проводит путем прямой спектрофотометрии водно-спиртового извлечения из сырья при длине волны 315 нм [101]. Такая

же методика используется и для стандартизации основного флавоноидного препарата цветков бессмертника – «Фламина» [52,81].

Фармакопейная методика количественного определения флавоноидов в цветках бессмертника песчаного была подвергнута критическому разбору в работе [70]. Серьезными недостатками методики, по мнению авторов, являются недоступность изосалипурпоза как ГСО (он производится на Украине), а также завышенные результаты, поскольку первичный экстракт не подвергается никакой очистке, а в измеряемом диапазоне (315 нм) поглощает большое количество сопутствующих веществ бессмертника. Авторы предложили методику дифференциальной спектрофотометрии, основанной на реакции флавоноидов с хлоридом алюминия. Измерения оптической плотности проводилось при 411 нм, параллельно измерялась оптическая плотность ГСО рутина с хлоридом алюминия. Предложенная авторами методика нашла свое отражение в ФСП на фламин производства ЗАО «ВИФИТЕХ». В этой статье предлагается вместо использования ГСО рутина, для расчетов применять удельный показатель рутина с хлоридом алюминия равный при 411 нм – 248 [84].

Новый виток активности исследований по стандартизации цветков бессмертника песчаного связан с работами А.В. Куркиной. Ею был разработан и предложен метод определения суммы флавоноидов в этом сырье, основанный на часовой экстракции цветков бессмертника 70% спиртом, проведением с аликвотой извлечения реакции с хлоридом алюминия и измерением оптической плотности раствора при 418 нм, параллельно измеряется оптическая плотность комплекса ГСО изосалипурпоза с хлоридом алюминия [39]. Это методика легла в основу метода количественного определения флавоноидов в проекте ФС на цветки бессмертника для включения в ГФ РФ XII издания, в ней помимо варианта с использованием ГСО изосалипурпоза, предлагается для

расчетов использовать удельный показатель поглощения этого флавоноида с хлоридом алюминия равный при 418 нм 500 [31].

Во всех публикациях, в которых предлагают использовать для определения флавоноидов в цветках бессмертника реакцию с хлоридом алюминия, не обсуждается одна важная деталь: если взглянуть на молекулу основного флавоноида цветков бессмертника изосалипурпозиды то он формально не может вступать в реакцию с хлоридом алюминия – гидроксильная группа в 3-м положении отсутствует, гидроксильная группа в 5-м положении заблокирована молекулой глюкозы, орто-гидроксильных группировок в кольце В нет.

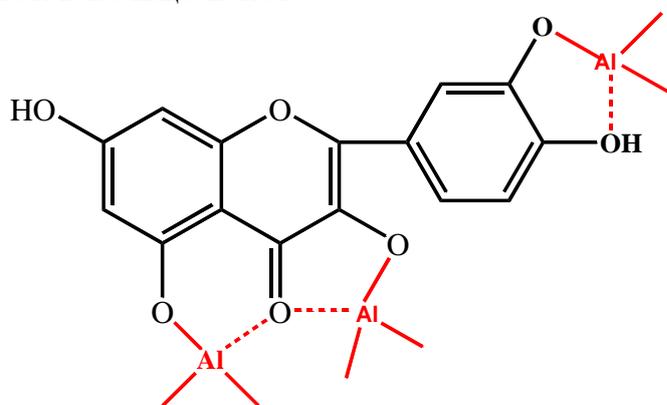


Рисунок 5. Возможные механизмы реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия.

Возможный механизм этой реакции показан нами на примере одного из диастереоизомеров изосалипурпозиды (Рис. 6).

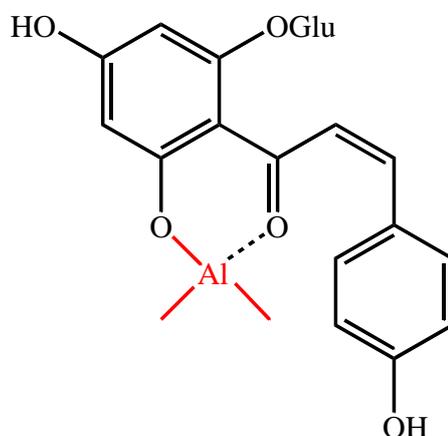


Рисунок 6. Возможный механизм реакции комплексообразования изосалипурпозиды с хлоридом алюминия.

Однако если реакция идет по такому механизму (а это единственно возможное объяснение того как изосалипурпозид может реагировать с хлоридом алюминия), то необходимо учитывать условия проведения реакции с хлоридом алюминия, поскольку как уже отмечалось для изосалипурпозиды характерна реакция халкон–флавононовой изомеризации.

В кислой среде равновесие смещается в сторону образования салипурпозиды (рис. 4), который уже никак не может реагировать с хлоридом алюминия.

В упоминавшихся выше источниках [70,84] реакция с хлоридом алюминия проводится как раз в кислой среде с добавлением разведенной хлористоводородной кислоты, а в методиках предлагаемых А.В. Куркиной – без добавления кислоты. Все эти особенности методик могут существенно сказываться на конечных результатах.

Параметром оптимизация метода определения флавоноидов в цветках бессмертника песчаного является сокращения времени экстракции и уточнение условий реакции комплексообразования смеси салипурпозиды и изосалипурпозиды с хлоридом алюминия.

1.15. Состав флавоноидов и их количественное содержание в траве *Viola tricolor* L.

Фиалка трехцветная (*Viola tricolor* L., семейство Фиалковых – *Violaceae*) – одно- или двулетние растения. Стебли простые или ветвистые, прямостоячие или приподнимающиеся, слегка ребристые, опушенные, высотой 10-45 см. листья короткоопушенные, яйцевидно – треугольные или удлиненно – яйцевидные, по краю зубчатые, с округлым или клиновидным основанием, черешки длиннее пластинки листа. Верхние листья удлиненно – ланцетовидные, тупозаостренные, по краю пильчатые, коротко – черешковые или почти сидячие. Пластинки листьев перистораздельные, со значительно более крупной конечной долькой. Цветки одиночные, не правильные на

длинных согнутых цветоножках. Венчик у фиалки трехцветной значительно длиннее чашечки, состоит из 5 неравных лепестков: 2 верхних яйцевидные, а 2 боковых – эллиптические, сине-фиолетовые, нижний более крупный, со шпорцем, округло-обратнотреугольный, при основании желтый, с 5-7 темными полосками, по краю фиолетовые. Цветет фиалка с мая по сентябрь.

Фиалка трехцветная встречается почти по всей Европейской части страны, в Западной Сибири, за исключением самых северных районов. Растет по лесным опушкам и полянам, вдоль дорог, в лесополосах и т. д. Больших зарослей не образует.

Трава фиалки используется в качестве отхаркивающего средства в форме настоя. Сухой экстракт применяется для производства нестерильных лекарственных форм.

Флавоноидные соединения фиалки трехцветной представлены кверцетином, лютеолином, лютелин-7-глюкозидом, рутином. Содержание рутина в листьях фиалки составляет до 0,15%, в стеблях – до 0,1%, в корнях – 0,05%, в семенах и цветках – следы. Наряду с О-гликозидами флавоноидов из травы фиалки трехцветной выделен целый ряд С-гликозидов-флавонов: витексин и изовитексин (сапонаретин) (8-С и соответственно, 6-С-глюкозилапигенин); ориентин и изоориентин (8-С и соответственно, 6-С-глюкозиллютеолин), виценин и виолантин (6,8-ди-С и соответственно, 6-С-рамнозил-8-С-глюкозилапигенин), скопарин, сапонарин [43].

Флавоноидный состав *V. tricolor*, произрастающей в России был детально изучен в работах Р.А. Бубенчикова [6, 7]. С использованием метода ВЭЖХ были идентифицированы кверцетин, рутин, гиперозид, гесперидин, апигенин, витексин, виценин.

Содержание суммы флавоноидов, по данным разных авторов, колеблется в траве фиалки трехцветной от 2,19 до 4,15% [4].

1.16. Методы количественной стандартизации травы фиалки

Трава фиалки заготавливается от двух видов фиалок – трехцветной (*Viola tricolor* L.) и полевой (*Viola arvensis* L.). Действующие нормативные документы на этот вид сырья предусматривают стандартизацию сырья только по сумме экстрактивных веществ, извлекаемых водой [77, 92, 93]. Европейская Фармакопея определяет качество травы фиалки по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на виолантин (не менее 1,5%), используя спектрофотометрию продуктов реакции флавоноидов с борной и щавелевой кислотами при 405 нм. Экстракция флавоноидов осуществляется 60% этиловым спиртом [113]. Отечественные ученые предлагают стандартизовать траву фиалки по сумме флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 1%), определяемых спектрофотометрией продуктов реакции флавоноидов с хлоридов алюминия при 410 нм. Экстракцию флавоноидов ведут 70% этиловым спиртом [7]. С другой стороны по содержанию суммы флавоноидов стандартизуется сухой экстракт травы фиалки [94].

Согласно современным требованиям, предъявляемым к стандартизации лекарственного растительного сырья, она должна определяться путями использования этого растительного сырья. В случае если данное сырье предназначено для приготовления водных извлечений, нормативная документация на него должна содержать показатель, характеризующий содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, а также показатель содержания определенного действующего вещества или группы биологически активных веществ, переходящих в водное извлечение [68].

Поскольку основной формой использования травы фиалки в настоящее время является водный настой, сухой экстракт фиалки о котором речь шла выше также получается экстракцией водой в соотношении сырье – растворитель 1:5, нам показалось оправданным стандартизовать это сырье по содержанию флавоноидов, переходящих в водные извлечения и разработать для этого соответствующий способ их количественного определения.

1.17. Состав флавоноидов и их количественное содержание в *Amaranthus cruentus* L.

Впервые о содержании флавоноидов в надземной части амаранта багряного было сообщено в работах Р.Ш. Хазиева [95, 98]. Доминирующим флавоноидом *A. cruentus* был рутин. Его содержание определенное методом ВЭЖХ составило в отдельных образцах листьев *A. cruentus* более 2%. В последующем информация о доминировании во флавоноидном составе амаранта багряного рутина была подтверждена в работах [124, 131, 135]. Был предложен и запатентован способ получения рутина из надземной части амаранта [55].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Состав флавоноидов *H. perforatum* и *H. maculatum* представлен преимущественно производными кверцетина – рутином, гиперозидом, кверцитрином, изокверцитрином и др. В ряде работ отмечается, что доминирующим флавоноидом обоих видов является гиперозид, причем в *H. maculatum* рутин может вообще отсутствовать. Вопрос о доминирующем флавоноиде в этих видах сырья, требует дополнительного изучения.

2. Состав флавоноидов *B. pendula* представлен преимущественно производными кверцетина – рутином, гиперозидом, кверцитрином, авикулярином и др. Сведения о доминирующем флавоноиде противоречивы. Российскими исследователями отмечается преобладание в листьях *B. pendula* гиперозида. Вопрос о доминирующем флавоноиде в этом сырье, требует дополнительного изучения.

3. Состав флавоноидов *P. aviculare* представлен производными кверцетина и кемпферола – авикулярином, югланином и др. В траве горца птичьего, произрастающего в Европейской части РФ преобладает авикулярин (3-арабинозид кверцетина), а в Сибири – югланин (3-арабинозид кемпферола). Поскольку эти два соединения имеют очень близкую структуру

и соответственно близкие значения удельного показателя поглощения комплексов с хлоридом алюминия, выбор референтного флавоноида для расчетов не имеет принципиального значения.

4. Состав флавоноидов *O. vulgare* представлен производными апигенина и лютеолина. Сведения о доминирующем флавоноиде противоречивы. Отмечается, что на территории Сибири существуют 2 хеморасы душицы, отличающиеся количественным соотношением производных апигенина и лютеолина. Вопрос о доминирующем флавоноиде в этом сырье, требует дополнительного изучения.

5. Состав флавоноидов *T. serpyllum* представлен производными апигенина и лютеолина. Сведения о доминирующем флавоноиде отсутствуют. Вопрос о доминирующем флавоноиде в этом сырье, требует дополнительного изучения.

6. Состав флавоноидов *C. officinalis* представлен производными изорамнетина и кверцетина. Доминирующими флавоноидами являются, по мнению ряда авторов, производные изорамнетина, в частности 3-рутинозид изорамнетина – нарциссин. Поскольку рутин и нарциссин имеют очень близкую структуру и соответственно близкие значения удельного показателя поглощения комплексов с хлоридом алюминия, оправдан выбор в качестве референтного флавоноида рутин – как более доступного соединения.

7. Состав флавоноидов *H. arenarium* представлен флавонами, флавонолами, флавононами и халконами. Доминирующими соединениями являются халкон изосалипурпозид и его изомер флаванон салипурпозид, которые при изменении условий среды могут переходить друг в друга, что необходимо учитывать при разработке методов определения флавоноидов в этом сырье.

8. Состав флавоноидов *V. tricolor* представлен флавонами и флавонолами. Особенности флавоноидного состава фиалки трехцветной является присутствие наряду с О-гликозидами, С-гликозидов. Вопрос о

доминирующем флавоноиде в этом сырье, требует дополнительного изучения.

9. Доминирующим флавоноидом *A. cruentus* по данным разных авторов является рутин.

10. Трава зверобоя, трава горца птичьего, трава душицы, листья березы, цветки календулы отечественными нормативными документами подвергаются количественной стандартизации по содержанию флавоноидов, определяемых спектрофотометрическим методом по продуктам реакции с хлоридом алюминия. Для травы чабреца и цветков бессмертника песчаного разработаны проекты ФС, предусматривающих аналогичную стандартизацию. Все указанные нормативные документы, предусматривают достаточно продолжительную процедуру экстракции растительного сырья (1–2 часа), которая может быть оптимизирована и сокращена.

11. Методики определения флавоноидов в траве зверобоя, траве душицы, траве чабреца и листьях березы могут быть усовершенствованы за счет уточнения референтного флавоноида, используемого для расчетов.

12. Для растительного сырья, используемого для приготовления водных извлечений, рациональной является стандартизация по содержанию флавоноидов, переходящих в водные растворы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований

В работе использовались:

– высушенные образцы травы зверобоя продырявленного (*Herba Hyperici perforati*) и пятнистого (*Herba Hyperici maculati*), заготовленные в июне - июле 2011 – 2013 годов в Республике Татарстан и Республике Марий-Эл;

– высушенные образцы листьев березы повислой (*Folia Betulae pendulae*), заготовленные в мае – июне 2011 – 2013 годов в Республике Татарстан и Республике Марий-Эл;

– высушенные образцы травы горца птичьего (*Herba Polygoni avicularis*), заготовленные в мае – июне 2012 – 2013 годов в Республике Татарстан;

– высушенные образцы травы душицы обыкновенной (*Herba Origani vulgaris*), заготовленные в июле 2012 - 2013 годов в Республике Татарстан и Республике Башкортостан;

– высушенные образцы травы тимьяна ползучего (*Herba Serpylli*), заготовленные в июле 2012 - 2013 годов в Республике Татарстан и Республике Башкортостан;

– высушенные образцы цветков календулы лекарственной (*Flores Calendulae officinalis*), выращенные и заготовленные в июне – июле 2011 - 2013 годов в ботаническом саду Казанского государственного медицинского университета в Высокогорском районе Республики Татарстан;

– высушенные образцы цветков бессмертника песчаного (*Flores Helichrysi arenarii*), выращенные и заготовленные в июле – августе 2012 – 2013 годов в ботаническом саду Казанского государственного медицинского университета в Высокогорском районе Республики Татарстан;

– высушенные образцы травы фиалки трехцветной (*Herba Viola tricoloris*), заготовленные в июне 2011 – 2013 годов в Республике Татарстан;

– высушенные образцы листьев амаранта багряного (*Folia Amaranthi cruenti*), выращенные и заготовленные в июне – сентябре 2012 – 2014 годов в ботаническом саду Казанского государственного медицинского университета в Высокогорском районе Республики Татарстан.

2.2. Методы исследований

2.2.1. Методы фитохимического анализа

В работе использованы методы: хроматографии в тонком слое сорбента, высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

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 70:30, скорость потока 1 мл/мин. Детекцию осуществляли при аналитической длине волны $\alpha_{\max} = 360$ нм.

В качестве стандартных образцов были использованы:

Гиперозид (quercetin-3-d-galactoside, hyperoside) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 97%;

Кверцетин (quercetin dihydrate) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 98%;

Рутин (quercetin-3-rutinoside trihydrate) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 95%;

Лютеолин (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 99%;

Лютеолин-7-глюкозид (luteolin-7-glucoside) – производства фирмы Merck, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 97%.

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

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

Оценку количественного содержания флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого проводили по [82]:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 50 % спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. Вату помещают в колбу для экстрагирования и прибавляют 30 мл 50 % спирта. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят 50 % спиртом до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, 1 мл алюминия хлорида в 95 % спирте и доводят объем раствора 95 % спиртом до

метки. Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95 % спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$x = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{248 \cdot m \cdot (100 - w)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 415 нм; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оценку количественного содержания флавоноидов в листьях березы проводили по [83]:

Аналитическую пробу березы листьев измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1мм. Около 1,00 г (точная навеска) измельченных листьев помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 50% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 часов. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят её содержимое спиртом этиловым 50% до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая 25 мл фильтрата (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95 % спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$x = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{248 \cdot m \cdot (100 - w)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 412 нм; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оценку количественного содержания флавоноидов в траве горца птичьего проводили по [75].

Оценку количественного содержания флавоноидов в траве душицы проводили по [89]:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстием размером 0.25 мм. Около 0.8 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50мл спирта этилового 60%, колбу взвешивают с погрешностью ± 0.01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1,5 часа. Затем колбу охлаждаем до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 60%. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 3 мл 2% спиртового раствора $AlCl_3$ и доводят раствор до метки 95% этанолом. Через 40 минут измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25мл прибавляют 1каплю концентрированной уксусной кислоты и доводят объём раствора 95% спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов (x) в процентах в пересчёте на лютеолин и абсолютное сухое сырьё вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{549,41 \cdot m \cdot (100 - w)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 549,41 – удельный показатель поглощения комплекса лютеолина с алюминия хлоридом при 400 нм; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оценку количественного содержания флавоноидов в траве чабреца проводили по [63]:

Аналитическую пробу сырья, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 70% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2,5 мл полученного извлечения (раствора А) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл раствора алюминия хлорида 5 % спирте этиловом 70 % и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора

3 %. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 30 мин (раствор Б).

Оптическую плотность испытуемого раствора Б измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны (395 ± 2) нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя раствор сравнения для испытуемого раствора.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{345 \cdot m \cdot 4 \cdot V \cdot (100 - w)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 345 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при 395 нм; V – количество извлечения в миллилитрах; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оценку количественного содержания флавоноидов в цветках календулы проводили по [88]:

Аналитическую пробу ноготков измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстия 2 мм. Около 0,8 г (точная навеска) измельченных цветков помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70%, колбу взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г., присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70 %.

Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбрасывая первые 25 мл фильтрата (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, прибавляют 6 мл 2 % спиртового раствора $AlCl_3$ и доводят раствор спиртом этиловым 95 % до метки (испытуемый раствор). Через 40 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре на

максимуме поглощения при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 0,1 мл кислоты уксусной концентрированной, и доведенный спиртом этиловым 95 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчёте на безводный рутин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100}{248 \cdot m \cdot (100 - w)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 408 нм; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оценку количественного содержания флавоноидов в цветках бессмертника песчаного проводили по [63]:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц с отверстиями диаметра 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) сырья помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 70% и взвешивают. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Затем содержимое колбы охлаждают, доводят массу колбы с содержимым до первоначальной, фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой.

1 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 2 мл алюминия хлорида раствора 2 %, доводят объём раствора спиртом 95 % (раствор А комплекса) и через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 418 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор А, полученный аналогичным образом, но без добавления хлорида алюминия.

Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчёте на изосипурпозид в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{500 \cdot m \cdot (100 - w)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 500 – удельный показатель поглощения комплекса изосалипурпозида с алюминия хлоридом при 418 нм; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Определение потери в массе сырья при высушивании проводили по [53].

2.2.2. Методы биохимического анализа

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 Кост С.А. и Стенко М.И. 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 [47].

ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ОБРАЗЦАХ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

3.1. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого

Как уже отмечалось в главе 1.2. возможности усовершенствования методики определения флавоноидов в траве зверобоя лежат в области оптимизации довольно продолжительной процедуры экстракции флавоноидов (1,5 часа), с отказом от режима их исчерпывающей экстракции и введением в расчетную формулу поправочного коэффициента на неполноту экстракции, а также выбора референтного флавоноида, удельный показатель поглощения которого будет использоваться для расчетов.

Содержание флавоноидов, определенное по [82], составило в траве зверобоя продырявленного $3,96 \pm 0,01$, а в траве зверобоя пятнистого $4,65 \pm 0,02\%$.

Поскольку в упоминавшейся выше работе [60] была подвергнута сомнению оптимальность концентрации спирта используемого для экстракции флавоноидов в фармакопейной методике, в первую очередь был исследован выбор спирта для экстракции флавоноидов. Результаты по выходу флавоноидов из травы *H. perforatum* и *H. maculatum* при разных концентрациях этилового спирта приведены в таблице 5.

Таблица 5

Содержание флавоноидов в траве *H. perforatum* и *H. maculatum* при использовании для экстракции этилового спирта различных концентраций, %

Трава	Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) (% от всей суммы в сырье)		
	50% этанол	70% этанол	95% этанол
<i>H. perforatum</i>	$\frac{3,96 \pm 0,11}{100}$	$\frac{3,89 \pm 0,02}{98}$	$\frac{3,78 \pm 0,03}{96}$
<i>H. maculatum</i>	$\frac{4,65 \pm 0,02}{100}$	$\frac{4,34 \pm 0,03}{93}$	$\frac{4,03 \pm 0,03}{87}$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 50% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной для сырья обоих видов зверобоя.

В методике ГФ XI и методике ФСП на траву зверобоя ОАО «Красногорсклексредства» [82], в качестве аналитической длины волны при измерениях комплексов флавоноидов с хлоридом алюминия использовалась длина волны 415 нм, в тоже время в работах О.Е. Правдивцевой и В.А. Куркина предлагается использовать длину волны 412 нм [60].

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов *H. perforatum* и *H. maculatum* с хлоридом алюминия нами были записаны электронные спектры самих извлечений, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия на фоне 95% спирта и на фоне самих извлечений (дифференциальный спектр), которые представлены на рисунках 7 и 8.

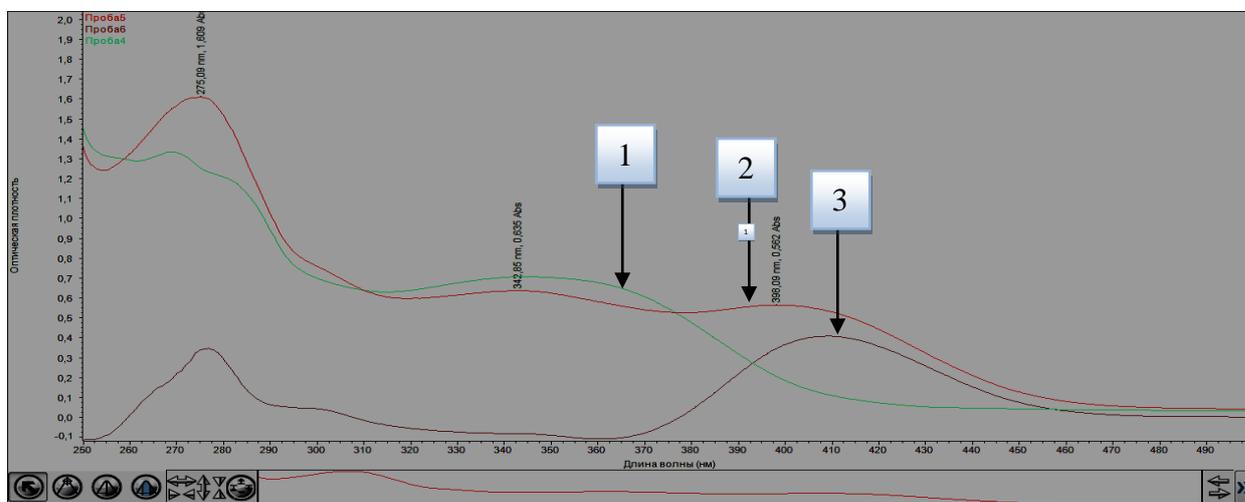


Рисунок 7. Электронный спектр спиртового извлечения из травы *H. perforatum*. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95% этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения)

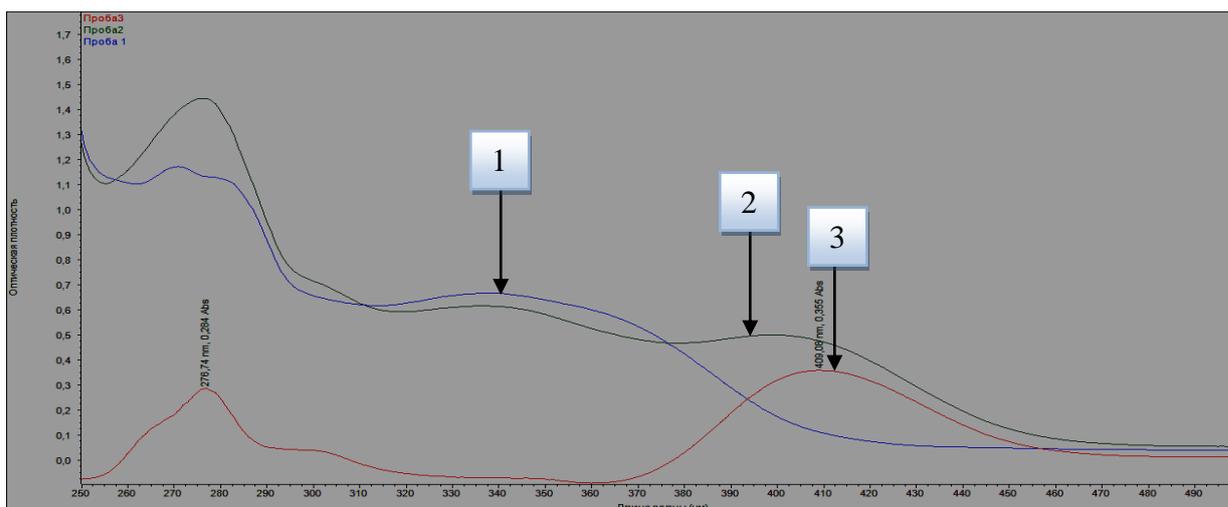


Рисунок 8. Электронный спектр спиртового извлечения из травы *N. maculatum*. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95% этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения)

Длинноволновый максимум дифференциального спектра в обоих случаях находился на отметке 410 нм и отличался и от максимума, используемого в фармакопейных методиках и от максимума, предлагаемого в качестве аналитического в работах О.Е. Правдивцевой и В.А. Куркина. С другой стороны, точка максимума зачастую варьирует в определенном диапазоне длин волн, что можно объяснить как вариабельностью качественного состава флавоноидов (и их количественным соотношением относительно друг друга) у сырья собранного в разных климатических и экологических условиях, так и условиями проведения самой реакции комплексообразования с хлоридом алюминия. К тому же анализ дифференциального спектра на рисунках 7 и 8 показывает, что пик поглощения в районе 410 нм имеет плосковыпуклый характер, и абсолютные значения оптических плотностей в диапазоне 410 ± 5 нм не существенно отличаются друг от друга. Поэтому мы решили в рамках подхода к

унификации методик определения флавоноидов в различных видах ЛРС в этой части не менять условия оптимизируемой методики и все измерения проводили при длине волны указанной в фармакопейной статье – 415 нм.

На следующем этапе исследований была изучена динамика выхода флавоноидов из сырья в зависимости от времени экстракции при оптимальной концентрации спирта. Во всех случаях использовалось соотношение сырья и растворителя 1:100.

Зависимость выхода флавоноидов от времени экстракции проверялась в экспериментах минимум в 4-х повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6

Выход флавоноидов из травы *H. perforatum* и *H. maculatum* в зависимости от времени экстракции 50% этанолом в соотношении 1:100, %

Время экстракции, мин	Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) (% от всей суммы в сырье)			
	5	10	15	30
Трава <i>H. perforatum</i>	$\frac{3,55 \pm 0,09}{89}$	$\frac{3,62 \pm 0,06}{91}$	$\frac{3,64 \pm 0,06}{92}$	$\frac{3,83 \pm 0,07}{97}$
Трава <i>H. maculatum</i>	$\frac{3,83 \pm 0,11}{82}$	$\frac{4,25 \pm 0,09}{91}$	$\frac{4,35 \pm 0,12}{94}$	$\frac{4,53 \pm 0,10}{97}$

Как видно из полученных результатов более 90% флавоноидов из обоих видов зверобоя экстрагируется за 10 минут. Это дало возможность предложить нам вариант экспресс–методики определения флавоноидов в траве обоих видов зверобоя, с использованием поправочного коэффициента на неполноту экстракции.

В предлагаемой нами экспресс–методике определения флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого время экстракции сокращено до 10 минут, а для расчета истинного содержания флавоноидов вводится поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов равный 1,09. Поправочный коэффициент рассчитывался как частное при делении

значения содержания флавоноидов при исчерпывающей экстракции (3,96% для *H. perforatum* и 4,65% для *H. maculatum*) на значения, полученные при 10-минутной экстракции (3,62% и 4,25% соответственно).

В действующих нормативных документах на траву зверобоя содержание суммы флавоноидов пересчитывается на рутин, который считается доминирующим флавоноидом в этом сырье. Вместе с тем в работе [19] было показано, что основным флавоноидом *H. maculatum* является гиперозид, а рутин в нем практически отсутствует. Использование в этом случае в качестве референтного флавоноида рутина, а не гиперозида приведет к серьезной ошибке в конечных результатах, поскольку рутин и гиперозид вследствие большой разницы в молекулярных весах имеют существенно различающиеся значения удельных показателей поглощения своих комплексов с хлоридом алюминия.

Для уточнения референтного флавоноида, по удельному показателю поглощения которого с хлоридом алюминия должны производиться расчеты содержания флавоноидов, мы провели исследование качественного и количественного состава флавоноидов в обоих видах зверобоя методом ВЭЖХ. Результаты, представленные на рисунках 9 и 10, показали, что в траве зверобоя пятнистого доминирующим флавоноидом является гиперозид, рутин присутствует только в следовых количествах.

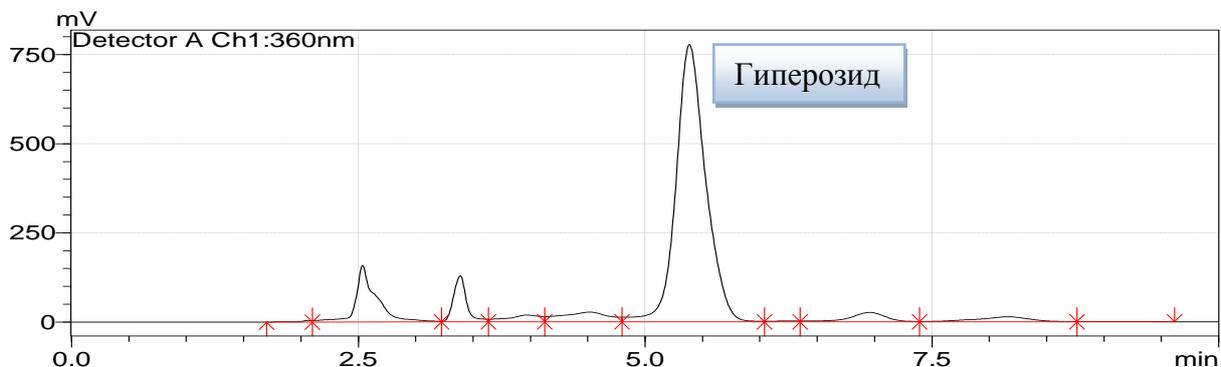


Рисунок 9. Хроматограмма извлечения из травы *H. maculatum* (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

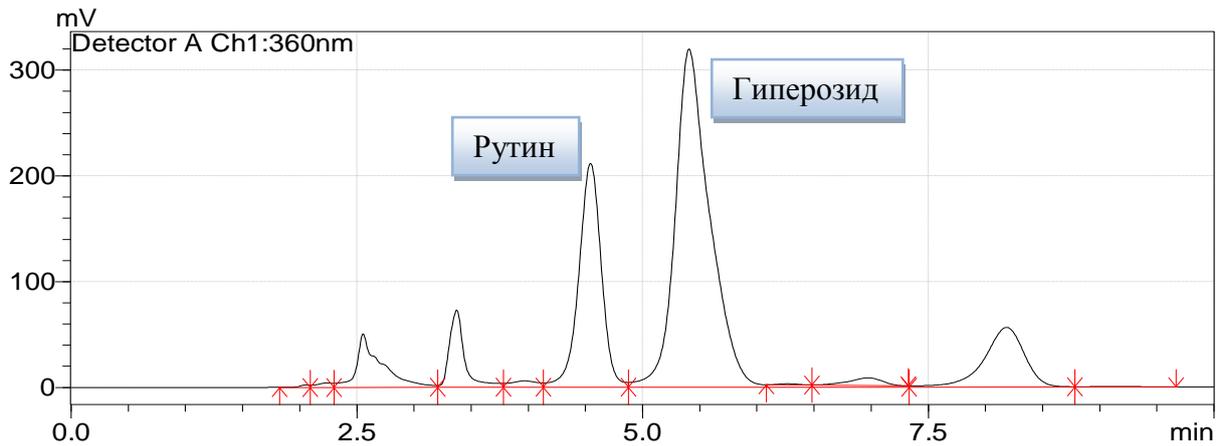


Рисунок 10. Хроматограмма извлечения из травы *H. perforatum* (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

В траве зверобоя продырявленного доминирующим флавоноидом также является гиперозид, однако рутин также присутствует в значимых количествах (их количественное соотношение описывается как 2,6:1).

Таким образом, для корректного расчета содержания флавоноидов в траве зверобоя пятнистого необходимо использовать удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с хлоридом алюминия при 415 нм равный 380. Для травы зверобоя продырявленного теоретически также должен использоваться этот показатель, поскольку гиперозид является доминирующим флавоноидом этого сырья, однако с учетом того, эти два флавоноида 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.

Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в траве зверобоя

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 50% спирта, колбу присоединяют к обратному

холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в траве зверобоя пятнистого в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,09}{380 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

а содержание суммы флавоноидов в пересчете на смесь гиперозида и рутина и абсолютно сухое сырье в траве зверобоя продырявленного в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,09}{343 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 380 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при 415 нм; 343 – расчетный удельный показатель поглощения комплекса смеси гиперозида и рутина с алюминия хлоридом при 415 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,09 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанных методик провели по 10 параллельных определений (табл. 7). Ошибка метода не превышает для травы зверобоя продырявленного 3,13%, а для травы зверобоя пятнистого 2,32%.

Таблица 7

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в траве зверобоя продырявленного и пятнистого

	F	\bar{X}	S ²	S	P	t (0,95; 9)	Δx	ϵ , %
<i>H. perforatum</i>	9	2,86	0,028871	0,1143	0,95	2,26	0,08	3,13
<i>H. maculatum</i>	9	3,03	0,009605	0,0980	0,95	2,26	0,07	2,32

Таким образом, истинные значения содержания флавоноидов в исследованных видах сырья находятся, скорее всего, для травы *H. maculatum* на уровне 3,03%, а для травы *H. perforatum* на уровне 2,86%, а не 4,65 и 3,96% как нами было определено по методике фармакопейной статьи [82].

3.2. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в листьях березы повислой.

Параметры оптимизации методики фармакопейной статьи [83] находятся, как уже отмечалось, в сокращении достаточно длительной процедуры экстракции флавоноидов (2 часа) с введением в расчетную формулу поправочного коэффициента на неполноту экстракции, а также уточнения референтного флавоноида, удельный показатель поглощения которого в комплексе с хлоридом алюминия будет использоваться для расчетов.

Поскольку при определении флавоноидов в листьях березы методика фармакопейной статьи предусматривает однократную экстракцию, нами была проверена полнота извлечения флавоноидов при таком режиме экстракции. Для этого выполнялась методики определения флавоноидов по

фармакопейной статье и вариант, когда проводилась трехкратная экстракция (40 мл + 30 мл + 30 мл) по 30 минут каждая спиртом той же концентрации. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8

Содержание флавоноидов в листьях березы повислой, %

Содержание флавоноидов в листьях березы повислой, %	
определенное при однократной экстракции в течение 2 часов	определенное при трехкратной экстракции по 30 минут каждая
2,33 ± 0,08	2,72 ± 0,09

Таким образом, можно констатировать, что однократная экстракция сырья для листьев не обеспечивает исчерпывающего извлечения флавоноидов, оставляя в сырье 14 % от их общего содержания. При дальнейших расчетах за истинное содержание флавоноидов в листьях березы принимались результаты, полученные при дробной трехкратной экстракции.

На следующем этапе исследований выяснялось, являются ли оптимальными используемые в фармакопейной методике концентрация этилового спирта как экстрагента и используемая для измерений оптической плотности растворов длина волны. Поскольку в методике фармакопейной статьи используется 50% этиловый спирт, то изучалась эта концентрация спирта, а также 70% и 95% концентрация спирта. Результаты по выходу флавоноидов из сырья при разных концентрациях этилового спирта приведены в таблице 9.

Таблица 9

Содержание флавоноидов в листьях березы повислой при использовании для экстракции этилового спирта различных концентраций, %

Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) (% от всей суммы в сырье)		
50% этанол	70% этанол	95% этанол
$\frac{2,72 \pm 0,08}{100}$	$\frac{2,29 \pm 0,07}{84}$	$\frac{2,10 \pm 0,07}{77}$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 50% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной.

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов березы с хлоридом алюминия нами были записаны электронные спектры самого извлечения, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия на фоне 95% спирта и на фоне самого извлечения (дифференциальный спектр), которые представлены на рисунке 11.

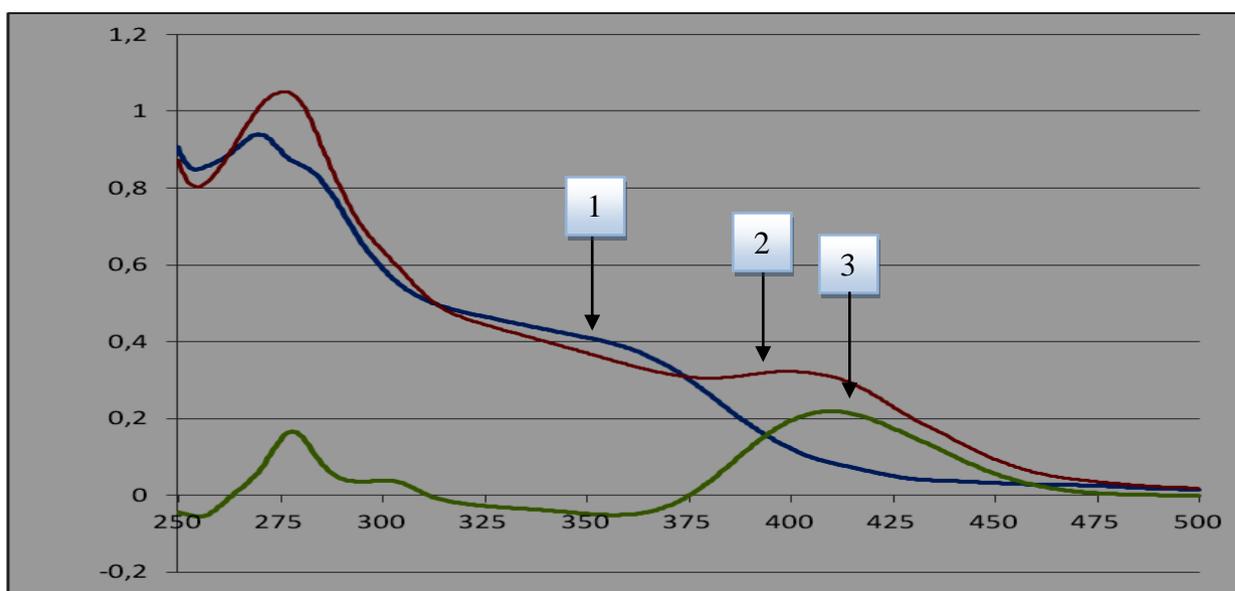


Рисунок 11. Электронный спектр спиртового извлечения из листьев березы. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии AlCl_3 на фоне 95% этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии AlCl_3 на фоне извлечения)

Длинноволновый максимум дифференциального спектра находился на отметке 410 нм и немного отличался от используемого в рассматриваемых методиках (412 нм). В силу изложенных выше причин мы решили не менять аналитическую длину волны, и все измерения проводили в последующем при 412 нм.

На следующем этапе исследований была изучена динамика выхода флавоноидов из сырья в зависимости от времени экстракции при оптимальной концентрации спирта. Во всех случаях использовалось соотношение сырья и растворителя 1:100.

Зависимость выхода флавоноидов от времени экстракции проверялась в экспериментах минимум в 4-х повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10

Выход флавоноидов из листьев березы повислой в зависимости от времени экстракции 50% этанолом в соотношении 1:100, %

	Время экстракции, мин			
	5	10	15	30
Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)	$2,12 \pm 0,05$ 79	$2,18 \pm 0,06$ 81	$2,32 \pm 0,05$ 86	$2,36 \pm 0,07$ 87

Как видно из полученных результатов основная масса этих соединений экстрагируется из сырья за относительно короткий промежуток времени, однако не достигает необходимого уровня в 90%, который мы приняли как минимальный для разработки экспресс-метода, с введением в расчетную формулу поправочного коэффициента на неполноту экстракции. Двукратная экстракция листьев березы 50% спиртом по 10 минут, позволила извлечь из сырья 91% всех флавоноидов. Это дало возможность предложить вариант экспресс-методики определения флавоноидов в листьях березы, с использованием поправочного коэффициента на неполноту экстракции.

Разработанная нами методика предполагает экспресс режим двукратной экстракции по 10 минут и для расчета истинного содержания флавоноидов в листьях березы вводится поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов, равный 1,09.

В методике фармакопейной статьи [83] для расчетов используется удельный показатель поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия равный 248. В работе [35] предлагается в качестве референтного флавоноида использовать не рутин, а доминирующий флавоноид этого сырья – гиперозид. Если доминирующим флавоноидом листьев березы является гиперозид, то использование в качестве референтного флавоноида рутина, приведет к серьезной ошибке в конечных результатах, поскольку рутин и гиперозид вследствие большой разницы в молекулярных весах имеют существенно различающиеся значения удельных показателей поглощения своих комплексов с хлоридом алюминия.

Для уточнения референтного флавоноида, по удельному показателю поглощения которого с хлоридом алюминия должны производиться расчеты содержания флавоноидов, мы провели исследование качественного и количественного состава флавоноидов в листьях березы повислой методом ВЭЖХ. Результаты, представленные на рисунке 12, показали, что доминирующим флавоноидом листьев березы является гиперозид, а рутин фактически отсутствует.

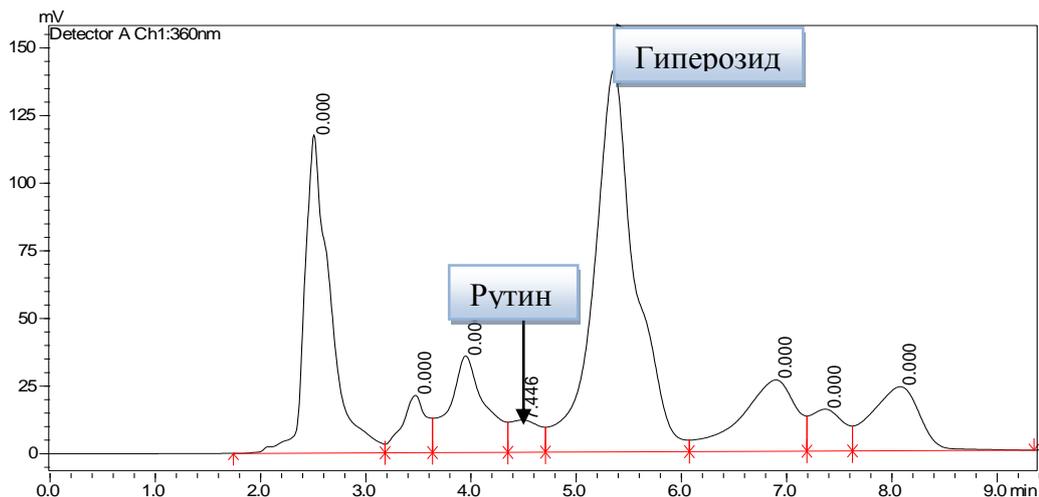


Рисунок 12. Хроматограмма извлечения из листьев *B. pendula* (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

*Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в листьях
березы повислой*

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 50% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл. Остаток сырья в колбе повторно экстрагируют 50 мл 50% спирта в течение 10 минут на водяной бане. После охлаждения раствор профильтровывают в тот же цилиндр (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,09}{380 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 380 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при 412 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах;

1,09 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 12). Ошибка метода не превышает 3,16%.

Таким образом, истинные значения содержания флавоноидов в исследованных листьях березы видах сырья находятся, скорее всего, на уровне 1,78%, а не 2,72% как нами было определено по методике фармакопейной статьи [83].

Таблица 12

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в листьях березы

F	\bar{X}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	ϵ , %
9	1,78	0,006151	0,0784	0,95	2,26	0,09	3,16

Использование для расчетов содержания флавоноидов в листьях березы удельного показателя поглощения комплекса гиперозида с хлоридом алюминия должно повлечь за собой изменение нормы содержания флавоноидов с нынешних «не менее 2%» в сторону более низких значений.

3.3. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве горца птичьего.

Параметром оптимизации фармакопейной методики [75] является сокращение времени экстракции флавоноидов (общее время экстракции 1,5 часа) с введением в расчетную формулу поправочного коэффициента на неполноту экстракции.

Содержание флавоноидов в траве горца птичьего, определенное фармакопейным методом составило $1,62 \pm 0,02\%$.

Основной параметр оптимизации фармакопейной методики определения флавоноидов в траве горца птичьего – сокращение времени экстракции, попутно проверялись такие параметры методики как концентрация спирта, используемого для экстракции флавоноидов и максимум поглощения комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия в условиях опыта.

Зависимость выхода флавоноидов от концентрации спирта и времени экстракции проверялась в экспериментах минимум в 4-х повторностях. Поскольку в фармакопейной методике для экстракции используется 70% этиловый спирт, проверялась эта концентрация и крайние концентрации, которые используются для экстрагирования флавоноидов – 40% и 95%. Полученные результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14.

Динамика извлечения флавоноидов из травы горца птичьего в зависимости от времени экстракции при разных концентрациях спирта (при соотношении сырье/экстрагент 1:100), %

	Концентрация спирта, (%)	Время экстракции, (мин)			
		5	10	15	30
Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)	40	$1,32 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,05$
		81	82	85	93
	70	$1,51 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,03$	$1,53 \pm 0,03$	$1,55 \pm 0,03$
		93	94	94	96
	95	$0,37 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,04$
		23	28	35	49

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 70% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной. Основная масса флавоноидов при этом извлекается растворителем уже в первые минуты экстракции и в последующем идет извлечение небольших остаточных количеств.

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов горца птичьего с хлоридом алюминия нами были записаны электронные спектры самого извлечения, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия на фоне 95% спирта и на фоне самого извлечения (дифференциальный спектр), которые представлены на рисунке 13.

Длинноволновый максимум дифференциального спектра находился на отметке 407 нм, что укладывается в допустимые интервалы отклонений (± 5 нм), поэтому все измерения проводились при длине волны указанной в фармакопейной методике – 410 нм.

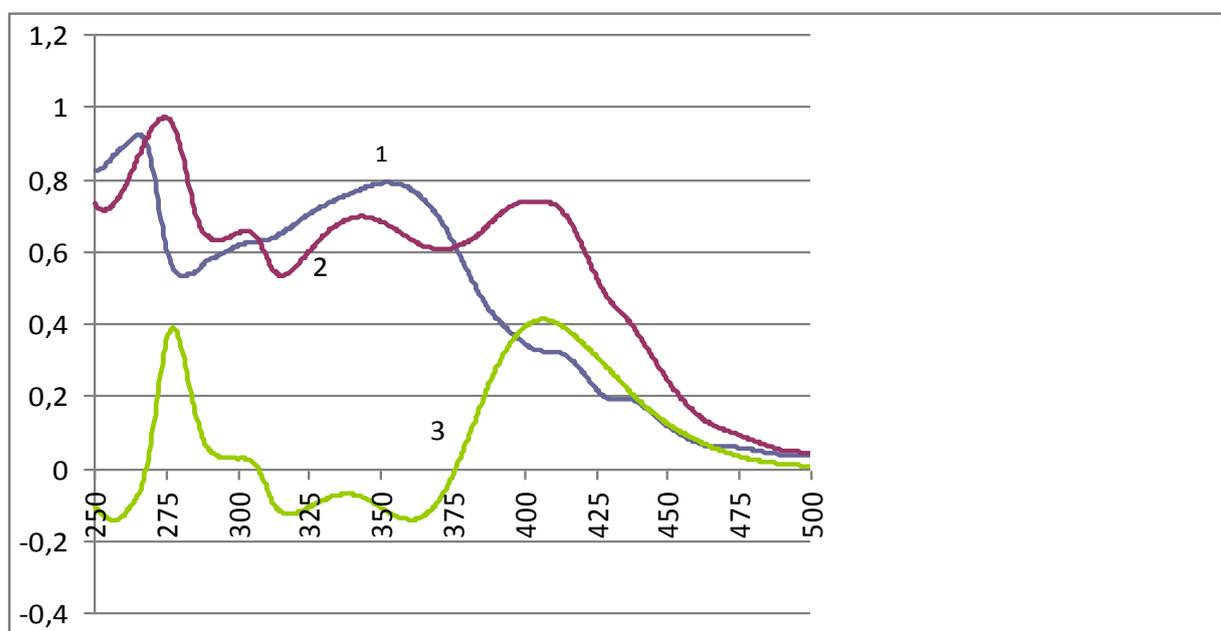


Рисунок 13. Электронный спектр спиртового извлечения из травы горца птичьего. По оси ординат – оптическая плотность; по оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95% этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения).

Все вышеизложенное дает возможность предложить экспресс-методику определения флавоноидов в траве горца птичьего, когда основная масса этих соединений экстрагируется из сырья за относительно короткий промежуток времени и вместо длительной исчерпывающей экстракции, оставшихся в

сырье флавоноидов, в расчетную формулу вводится поправочный коэффициент на неполноту экстракции. Таким образом, экспресс-метод определения флавоноидов в траве горца птичьего реализуется в варианте экстракции 70% этиловым спиртом в течение 5 минут.

*Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в траве
горца птичьего*

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,07}{330 \cdot m \cdot 4 \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 330 – удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при 410 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в

граммах; 1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 15). Ошибка метода не превышает 3,13%.

Таблица 15

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в траве горца птичьего

f	\bar{x}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	$\epsilon, \%$
9	1,62	0,005055	0,0711	0,95	2,26	0,05	3,13

3.4. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве душицы.

Параметры оптимизации методики фармакопейной статьи на траву душицы [89] находятся области в сокращении достаточно длительной процедуры экстракции флавоноидов (1,5 часа) с введением в расчетную формулу поправочного коэффициента на неполноту экстракции, а также уточнения референтного флавоноида, удельный показатель поглощения которого в комплексе с хлоридом алюминия будет использоваться для расчетов.

Поскольку при определении флавоноидов в траве душицы методика фармакопейной статьи предусматривает однократную экстракцию, нами была проверена полнота извлечения флавоноидов при таком режиме экстракции. Для этого выполнялась методики определения флавоноидов по фармакопейной статье и вариант, когда проводилась трехкратная экстракция (40 мл + 30 мл + 30 мл) по 30 минут каждая спиртом той же концентрации. Полученные результаты представлены в таблице 16.

Можно констатировать, что однократная экстракция сырья для травы душицы не обеспечивает исчерпывающего извлечения флавоноидов, оставляя в сырье 9 % от их общего содержания. При дальнейших расчетах за

истинное содержание флавоноидов в сырье душицы принимались результаты, полученные при дробной трехкратной экстракции.

Таблица 16.

Содержание флавоноидов в траве душицы, %

Содержание флавоноидов в траве душицы, %	
определенное при однократной экстракции и (1,5 часа)	определенное при трехкратной экстракции по 30 минут каждая
1,03 ± 0,03	1,13 ± 0,05

На следующем этапе исследований была изучена динамика выхода флавоноидов из сырья в зависимости от времени экстракции. Попутно проверялась, является ли оптимальной концентрация спирта, используемая в фармакопейной методике. Во всех случаях использовалось соотношение сырья и растворителя 1:100. Зависимость выхода флавоноидов от концентрации спирта и времени экстракции проверялась в экспериментах минимум в 4-х повторностях. Поскольку в фармакопейной методике для экстракции используется 60% этиловый спирт, проверялась эта концентрация и крайние концентрации, которые используются для экстрагирования флавоноидов – 40% и 95%. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17.

Динамика извлечения флавоноидов из душицы в зависимости от времени экстракции при разных концентрациях спирта (при соотношении сырье/экстрагент 1:100), %

	Концентрация спирта, (%)	Время экстракции, (мин)			
		5	10	15	30
Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)	40	<u>0,95±0,01</u>	<u>0,97±0,01</u>	<u>0,98±0,02</u>	<u>0,99±0,02</u>
		84	86	87	88
	60	<u>1,01±0,01</u>	<u>1,06±0,02</u>	<u>1,06±0,02</u>	<u>1,06±0,02</u>
		88	94	94	94
	95	<u>0,63±0,02</u>	<u>0,65±0,01</u>	<u>0,70±0,02</u>	<u>0,71±0,02</u>
		56	58	62	63

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 60% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной. Основная масса флавоноидов при этом извлекается растворителем уже на начальном этапе экстракции.

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов душицы с хлоридом алюминия нами были записаны электронные спектры самого извлечения, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия на фоне 95% спирта и на фоне самого извлечения (дифференциальный спектр), которые представлены на рисунке 14. Длинноволновый максимум дифференциального спектра находился на отметке 395 нм, что отличалось от аналитической длины волны (400 нм) при которой проводились измерения в фармакопейной методике. Но поскольку отклонения не превышали диапазона 5 нм, а сам дифференциальный спектр в области максимума поглощения имел плосковыпуклый характер и различия в значениях оптических плотностей в указанном диапазоне не имели существенного характера, было решено в целях унификации методик, измерения проводить при аналитической длине указанной в методике фармакопейной статьи – 400 нм.

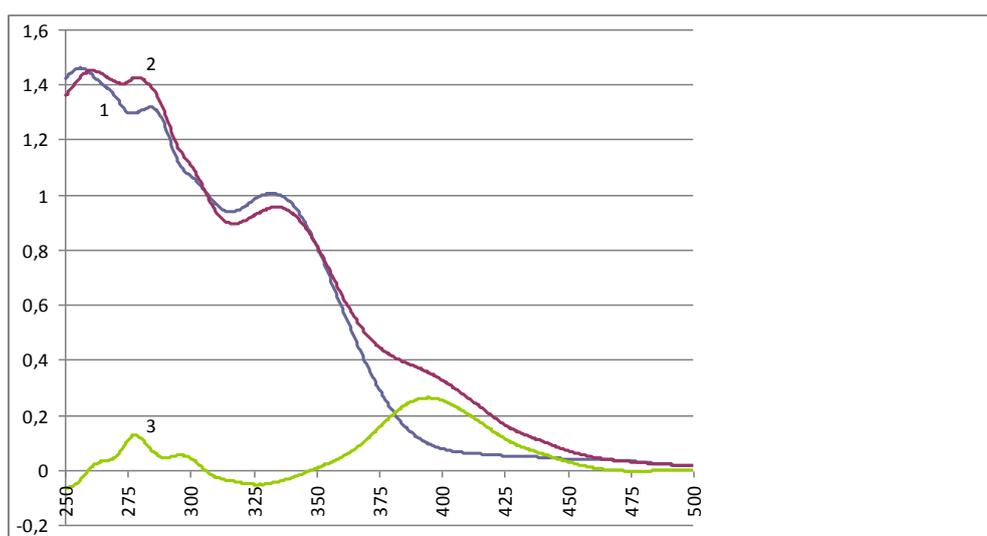


Рисунок 14. Электронный спектр спиртового извлечения из травы душицы. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина

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).

Все вышеизложенное дает возможность предложить экспресс-методику определения флавоноидов в траве душицы, когда более 90% этих соединений экстрагируется из сырья за 10 минут 60% спиртом и в расчетную формулу будет введен поправочный коэффициент на неполноту экстракции.

В методике фармакопейной статьи в качестве референтного флавоноида, в пересчете на который производится определение суммы флавоноидов травы душицы выбран лютеолин. Лютеолин является агликоном, в отличие от гликозидных форм флавоноидов, агликоны редко накапливаются в значительных количествах в растениях и еще реже являются доминирующими соединениями в сумме флавоноидов. Из-за значительной разницы в молекулярных весах агликонов и гликозидов флавоноидов у них существенно различаются значения удельных показателей поглощения, которые используются в расчетных формулах, что при соответствующем неверном выборе референтного соединения приведет к большой ошибке в конечных результатах. Для уточнения природы доминирующего флавоноида травы душицы нами было проведено исследование флавоноидного состава душицы обыкновенной методом ВЭЖХ. Достоверность идентификации пиков на хроматограммах подтверждали использованием в методике анализа соответствующих внутренних стандартных веществ – рутина, гиперозида, цинарозида и лютеолина.

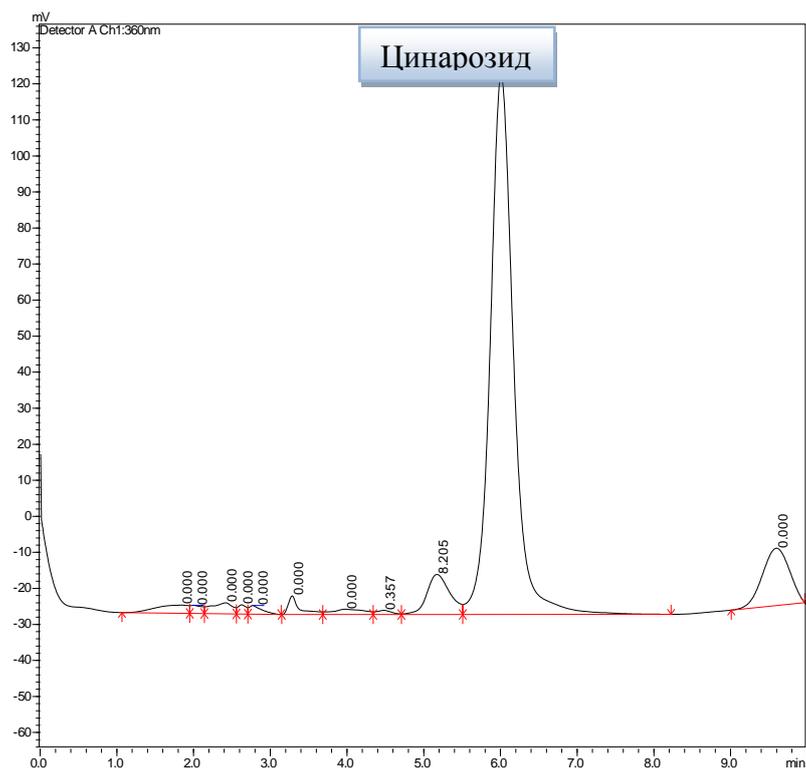


Рисунок 15. Хроматограмма извлечения из травы душицы (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

Результаты, представленные на рисунке 15, показали, что доминирующим флавоноидом в этом сырье является лютеолин-7-глюкозид (цинарозид), а сам лютеолин практически отсутствует.

Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в траве душицы

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 60% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,07}{345 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 345 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при 400 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 18), ошибка метода не превышает 2,48%.

Таблица 18.

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в траве душицы

f	\bar{X}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	$\varepsilon, \%$
9	1,80	0,000606	0,0246	0,95	2,26	0,10	2,48

Таким образом, истинные значения содержания флавоноидов в исследованных образцах травы душицы находятся, скорее всего, на уровне 1,80%, а не 1,13% как нами было определено по методике фармакопейной статьи [89].

3.5. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в траве тимьяна ползучего (чабреца).

Поскольку утвержденных нормативных документов на траву тимьяна ползучего в которых бы предусматривалась стандартизация сырья по содержанию флавоноидов в настоящее время нет, для оптимизации нами была выбрана методика из проекта фармакопейной статьи на траву тимьяна ползучего для включения в ГФ XII издания [63].

Поскольку данная методика предполагает однократную экстракцию флавоноидов травы чабреца в течение 60 минут, нами была проверена полнота извлечения флавоноидов при таком режиме экстракции. Для этого выполнялась методика определения флавоноидов по фармакопейной статье в течение 1 часа и вариант, когда проводилась трехкратная экстракция (40 мл + 30 мл + 30 мл) по 30 минут каждая спиртом той же концентрации. Полученные результаты представлены в таблице 20.

Таким образом, можно констатировать, что однократная экстракция сырья для травы чабреца не обеспечивает исчерпывающего извлечения флавоноидов, оставляя в сырье более 18 % от их общего содержания. При дальнейших расчетах за истинное содержание флавоноидов в сырье чабреца принимались результаты, полученные при дробной трехкратной экстракции.

Таблица 20.

Содержание флавоноидов в траве чабреца, %

Содержание флавоноидов в траве чабреца, %	
определенное при однократной экстракции в течение 1 часа	определенное при трехкратной экстракции по 30 минут каждая
1,38±0,04	1,69±0,06

На следующем этапе исследований была изучена динамика выхода флавоноидов из сырья в зависимости от времени экстракции. Попутно проверялась, является ли оптимальной концентрация спирта, используемая в фармакопейной методике. Во всех случаях использовалось соотношение

сырья и растворителя 1:100. Зависимость выхода флавоноидов от концентрации спирта и времени экстракции проверялась в экспериментах минимум в 4-х повторностях.

Таблица 21.

Динамика извлечения флавоноидов из травы чабреца в зависимости от времени экстракции при разных концентрациях спирта (при соотношении сырье/экстрагент 1:100), %

	Концентрация спирта, (%)	Время экстракции, (мин)			
		5	10	15	30
Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)	40	$\frac{1,28 \pm 0,02}{75}$	$\frac{1,30 \pm 0,02}{77}$	$\frac{1,31 \pm 0,03}{77}$	$\frac{1,37 \pm 0,03}{81}$
	60	$\frac{1,41 \pm 0,03}{83}$	$\frac{1,42 \pm 0,03}{84}$	$\frac{1,45 \pm 0,04}{85}$	$\frac{1,48 \pm 0,03}{87}$
	70	$\frac{1,45 \pm 0,05}{85}$	$\frac{1,46 \pm 0,04}{86}$	$\frac{1,48 \pm 0,04}{87}$	$\frac{1,61 \pm 0,05}{95}$
	95	$\frac{0,52 \pm 0,02}{31}$	$\frac{0,54 \pm 0,02}{32}$	$\frac{0,6 \pm 0,02}{35}$	$\frac{0,64 \pm 0,02}{38}$

Поскольку в фармакопейной методике для экстракции используется 70% этиловый спирт, проверялась эта концентрация и крайние концентрации, которые используются для экстрагирования флавоноидов – 40% и 95%. Кроме этого, с учетом близости флавоноидного состава травы чабреца и травы душицы, дополнительно проверялась 60% концентрация спирта, которая оказалась оптимальной для травы душицы. Полученные результаты представлены в таблице 21.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 70% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной.

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов травы чабреца с хлоридом алюминия нами были записаны электронные спектры самого извлечения, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом

алюминия на фоне 95% спирта и на фоне самого извлечения (дифференциальный спектр), представленные на рисунке 16.

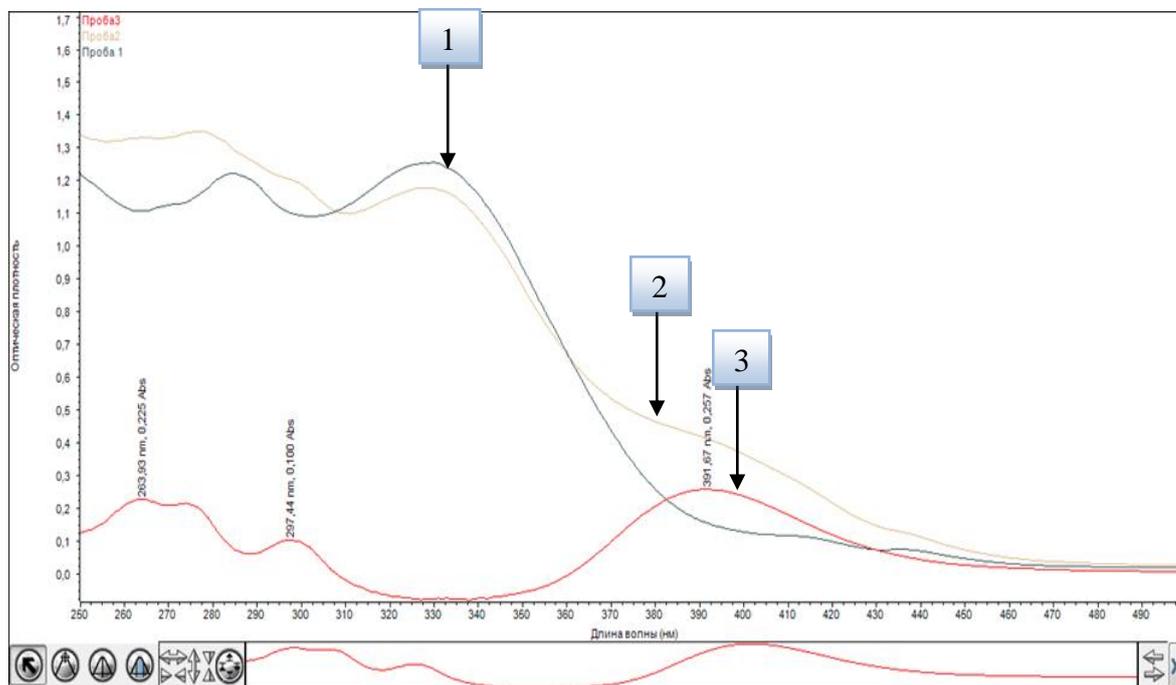


Рисунок 16. УФ-спектр спиртового извлечения из травы чабреца. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 (синий) – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 (розовый) – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95% этилового спирта; 3 (красный) – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения).

Длинноволновый максимум дифференциального спектра находился на отметке 392 нм, что укладывается в допустимые интервалы отклонений (± 5 нм), поэтому все измерения проводились при длине волны указанной в фармакопейной методике – 395 нм.

Как видно из полученных результатов достичь степени экстракции флавоноидов не менее 90% удается достичь лишь при 30 минутной экстракции 70% спиртом. При двукратной экстракции травы чабреца 70% спиртом по 10 минут, удалось извлечь из сырья также 95% всех флавоноидов. Это дало возможность предложить вариант экспресс-методики

определения флавоноидов в этом сырье, с использованием поправочного коэффициента на неполноту экстракции.

Разработанная нами методика предполагает экспресс режим двукратной экстракции по 10 минут и для расчета истинного содержания флавоноидов в траве чабреца вводится поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов, равный 1,06.

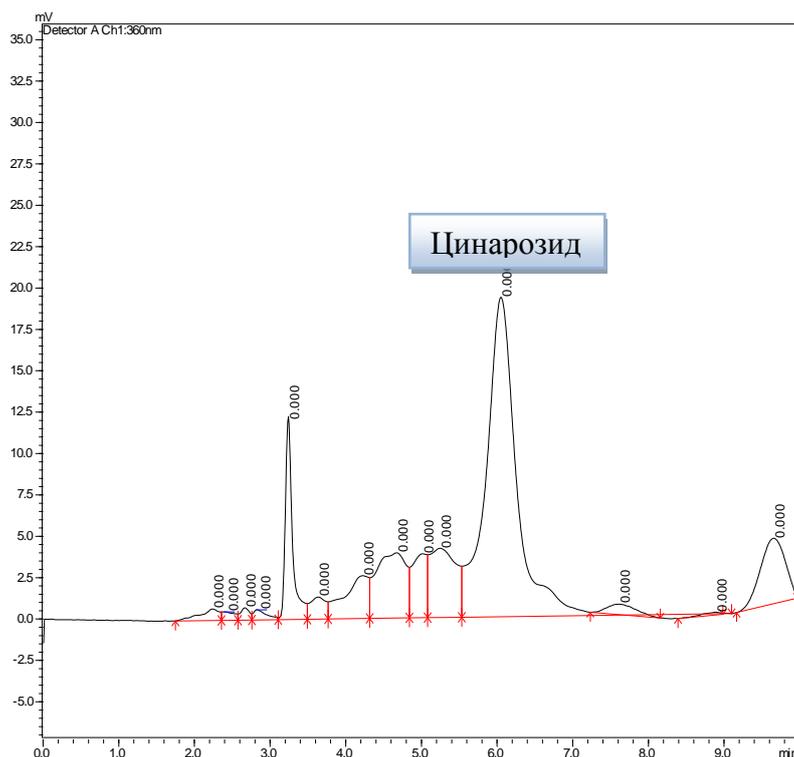


Рисунок 17. Хроматограмма извлечения из травы чабреца (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 80:20)

Как отмечалось выше, нет устоявшегося мнения о выборе референтного флавоноида для проведения расчетов содержания флавоноидов в траве чабреца и его препаратах.

Для уточнения референтного флавоноида, по удельному показателю поглощения которого с хлоридом алюминия должны производиться расчеты содержания флавоноидов, мы провели исследование качественного и количественного состава флавоноидов в траве чабреца методом ВЭЖХ.

Результаты, представленные на рисунке 17, показали, что доминирующим флавоноидом в этом сырье является лютеолин-7-глюкозид (цинарозид).

Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в траве чабреца.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл. Остаток сырья в колбе повторно экстрагируют 50 мл 70% спирта в течение 10 минут на водяной бане. После охлаждения раствор профильтровывают в тот же цилиндр (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 395 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю концентрированной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,06}{345 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 345 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при 395 нм; V – объем раствора A в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,06 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 22), ошибка метода не превышает 4,18%.

Таблица 22.

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в траве чабреца

f	\bar{X}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	$\epsilon, \%$
9	1,69	0.0097417	0,0987	0,95	2,26	0,07	4,18

3.6. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в цветках ноготков.

Для оптимизации мы использовали методику действующей фармакопейной статьи ОАО «Красногорсклексредства» [88].

Поскольку при определении флавоноидов в цветках календулы методика фармакопейной статьи предусматривает однократную экстракцию, нами была проверена полнота извлечения флавоноидов при таком режиме экстракции. Для этого выполнялась методика определения флавоноидов по фармакопейной статье и вариант, когда проводилась трехкратная экстракция (40 мл + 30 мл + 30 мл) по 30 минут каждая спиртом той же концентрации. Полученные результаты представлены в табл. 23.

Таблица 23

Содержание флавоноидов в цветках календулы, %

Содержание флавоноидов в цветках календулы, %	
определенное при однократной экстракции (2 часа)	определенное при трехкратной экстракции по 30 минут каждая
1,58 ± 0,14	1,73 ± 0,03

Можно констатировать, что однократная экстракция сырья не обеспечивает исчерпывающего извлечения флавоноидов, оставляет в сырье 9% от их общего содержания. При дальнейших расчетах за истинное содержание флавоноидов в цветках календулы принимались результаты, полученные при дробной трехкратной экстракции.

На следующем этапе для оптимизации экспериментальной работы нами была изучена динамика извлечения флавоноидов в зависимости от времени экстракции. Результаты приведены в табл. 24.

Полученные результаты показали, что при 5 минутной экстракции цветков календулы извлекается почти 90 % всех флавоноидов.

Таблица 24

Динамика извлечения флавоноидов цветков календулы 70% спиртом в зависимости от времени экстракции (при соотношении сырье/экстрагент 1:100)

	Время экстракции, мин			
	5	10	15	30
Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)	$\frac{1,52 \pm 0,06}{88}$	$\frac{1,62 \pm 0,04}{94}$	$\frac{1,66 \pm 0,06}{96}$	$\frac{1,68 \pm 0,04}{97}$

Это позволило нам все последующие эксперименты по изучению параметров экстракции проводить в режиме 5 минутной экстракции сырья.

Следующим этапом нашего исследования стала проверка концентрации спирта, которая обеспечивает максимальное извлечение флавоноидов из цветков календулы. Данные этого исследования представлены в табл. 25.

Таблица 25

Выход флавоноидов из цветков календулы при различных концентрациях спирта, %

Концентрация спирта, %	Время экстракции, мин	Выход флавоноидов (% от массы сухого сырья)
40	5	$1,25 \pm 0,05$
70	5	$1,52 \pm 0,06$
96	5	$0,38 \pm 0,03$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 70% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной.

В ходе разработки методики было также проверено влияние на экстракцию флавоноидов из сырья такого фактора, как соотношение сырье/экстрагент. Для этого нами были проведены ряд опытов с варьированием данного фактора. Результаты опытов приводятся в табл. 26.

Таблица 26

Выход флавоноидов из цветков календулы при различных соотношениях сырья/экстрагента (концентрация спирта – 70%, время экстракции – 5 минут)

Соотношение сырье/экстрагент	1:50	1:62,5	1:75	1:100
Выход флавоноидов (% от массы сухого сырья)	$1,42 \pm 0,08$	$1,46 \pm 0,05$	$1,46 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,06$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что соотношение сырья/экстрагента 1:100 является в изученном диапазоне оптимальным.

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов календулы с хлоридом алюминия нами были записаны электронные спектры

самого, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия на фоне 95 % спирта и на фоне самого извлечения (дифференциальный спектр), которые представлены на рис. 18.

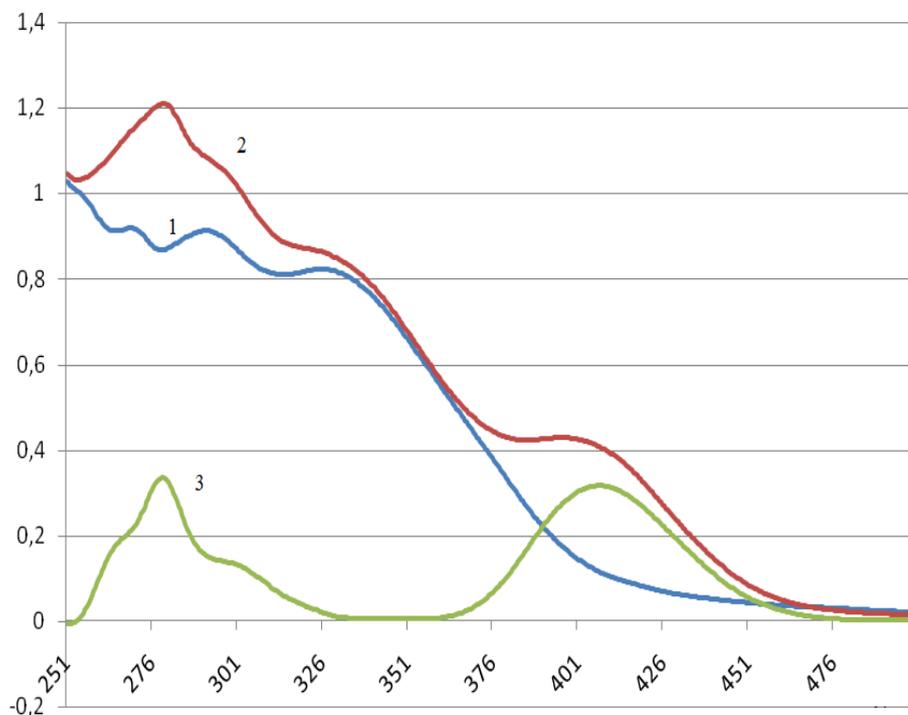


Рисунок 18. Электронный спектр спиртового извлечения из цветков календулы. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95 % этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95 % этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения).

Длинноволновый максимум дифференциального спектра находился на отметке 407 нм, что укладывается в допустимые интервалы отклонений (± 5 нм), поэтому все измерения проводились при длине волны указанной в методике фармакопейной статьи – 408 нм.

Обобщая полученные результаты можно сказать, что при 10 минутной экстракции цветков календулы 70% спиртом в соотношении к сырью 1:100 можно извлечь 94% всех флавоноидов, что позволяет нам предложить

вариант экспресс-методики с введением в расчетную формулу коэффициента на неполноту экстракции.

Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в цветках календулы

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 100 мл через бумажный фильтр (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 6 мл 2% спиртового раствора $AlCl_3$ и доводят раствор спиртом этиловым 95% до метки (испытуемый раствор). Через 40 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре на максимуме поглощения при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А и 0,1 мл кислоты уксусной концентрированной, и доведенный спиртом этиловым 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{D \times V \times 100 \times 25 \times 1,07}{248 \times m \times (100 - W) \times 2}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 408 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,07 –

поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 27), ошибка метода не превышает 3,7 %.

Таблица 27

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в цветках календулы

f	\bar{x}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	$\varepsilon, \%$
9	1,73	0,0079923	0,0894	0,95	2,26	0,06	3,70

3.7. Оптимизация метода количественного определения флавоноидов в цветках бессмертника песчаного.

Для оптимизации мы использовали методику количественного определения флавоноидов из проекта ФС на цветки бессмертника для включения в ГФ РФ XII издания [63]. Поскольку при определении флавоноидов в цветках бессмертника песчаного методика проекта фармакопейной статьи предусматривает однократную экстракцию, нами была проверена полнота извлечения флавоноидов при таком режиме экстракции. Для этого выполнялась методика определения флавоноидов по фармакопейной статье и вариант, когда проводилась трехкратная экстракция (40 мл + 30 мл + 30 мл) по 30 минут каждая спиртом той же концентрации. Полученные результаты представлены в таблице 28.

Таблица 28

Содержание флавоноидов в цветках бессмертника песчаного, %

Содержание флавоноидов в цветках бессмертника песчаного, %	
определенное при однократной экстракции в течение 1 часа	определенное при трехкратной экстракции по 30 минут каждая
1,11 ± 0,03	1,36 ± 0,08

Таким образом, можно констатировать, что однократная экстракция сырья не обеспечивает исчерпывающего извлечения флавоноидов, оставляя в сырье 18 % от их общего содержания. При дальнейших расчетах за истинное содержание флавоноидов в цветках бессмертника песчаного принимались результаты, полученные при дробной трехкратной экстракции.

На следующем этапе для оптимизации экспериментальной работы нами была изучена динамика извлечения флавоноидов в зависимости от времени экстракции. Результаты приведены в табл. 29.

Полученные результаты показали, что при 5 минутной экстракции цветков бессмертника песчаного извлекается 90 % всех флавоноидов.

Таблица 29

Динамика извлечения флавоноидов цветков бессмертника песчаного 70% спиртом в зависимости от времени экстракции (при соотношении сырье/экстрагент 1:100)

	Время экстракции, мин			
	5	10	15	30
Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) / (% от всей суммы в сырье)	$\frac{1,22 \pm 0,02}{90}$	$\frac{1,27 \pm 0,05}{93}$	$\frac{1,28 \pm 0,06}{94}$	$\frac{1,35 \pm 0,06}{99}$

Это позволило нам все последующие эксперименты по изучению параметров экстракции проводить в режиме 5 минутной экстракции сырья.

Следующим этапом нашего исследования стала проверка концентрации спирта, которая обеспечивает максимальное извлечение флавоноидов из цветков бессмертника песчаного. В методике ГФ XI [101] для экстракции флавоноидов используется 50% спирт, в работе [69] – 96% спирт, в методике, предлагаемой для включения в проект Государственной фармакопеи XII издания [63] – 70% спирт. Результаты, полученные в наших исследованиях, приведены в таблице 30.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 70% концентрация этилового спирта является в изученном диапазоне оптимальной.

Для проверки максимума поглощения продуктов реакции флавоноидов бессмертника с хлоридом алюминия нами были записаны электронные

Таблица 30

Выход флавоноидов из цветков бессмертника песчаного при различных концентрациях спирта, %

Концентрация спирта, %	Время экстракции, мин	Выход флавоноидов (% от массы сухого сырья)
50	5	1,00 ± 0,04
70	5	1,22 ± 0,02
95	5	0,81 ± 0,03

спектры самого извлечения, продуктов реакции флавоноидов с хлоридом алюминия на фоне 95% спирта и на фоне самого извлечения (дифференциальный спектр), которые представлены на рисунке 19.

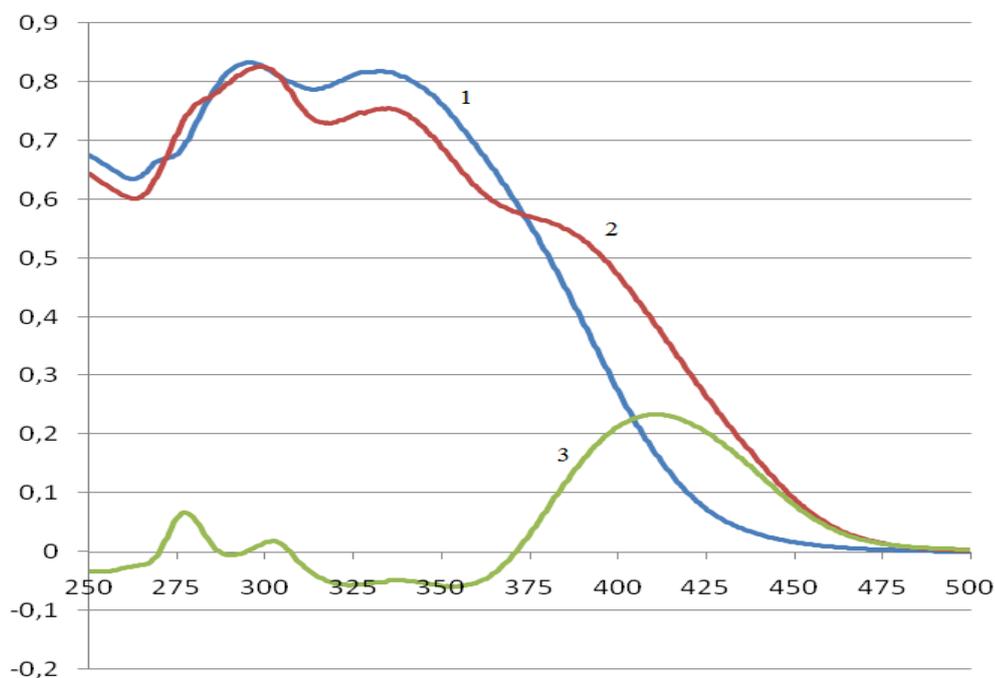


Рисунок 19. Электронный спектр спиртового извлечения из цветков бессмертника песчаного. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95% этилового

спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения).

Длинноволновый максимум дифференциального спектра находился на отметке 415 нм, что укладывается в допустимые интервалы отклонений (± 5 нм), поэтому все измерения проводились при длине волны 418 нм, использованной в проекте фармакопейной статьи.

Обобщая полученные результаты можно сказать, что при 10 минутной экстракции цветков бессмертника песчаного 70% спиртом в соотношении к сырью 1:100 можно извлечь 93% всех флавоноидов, что позволяет нам предложить вариант экспресс-методики с введением в расчетную формулу коэффициента на неполноту экстракции.

*Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в цветках
бессмертника песчаного*

Аналитическую пробу цветков измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта этилового. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, и извлечение фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 100 мл через бумажный фильтр (раствор А).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора $AlCl_3$ в 95% спирте этиловом. Объем раствора доводят тем же спиртом до метки и оставляют на 30 минут.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 418 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А и доведенный 95 % спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флаваноидов в процентах (X) в пересчёте на изосалипурпозид и абсолютное сухое сырьё вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times V \times 100 \times 25 \times 1,07}{500 \times m \times (100 - W) \times 2}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 500 – удельный показатель поглощения комплекса изосалипурпозид с алюминия хлоридом при 418 нм; V – объем раствора A в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 31), ошибка метода не превышает 2,74

Таблица 31

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в цветках бессмертника песчаного

f	\bar{X}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	$\varepsilon, \%$
9	1,36	0,0023329	0,0483	0,95	2,26	0,04	2,74

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

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. Ошибки определения находятся в пределах от 2,32 до 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.

ГЛАВА 4. ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ НА ОСНОВЕ ПРИНЯТОЙ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Результаты, полученные в разделах 1.3 – 1.7 показывают, что ключевым параметром позволяющим усовершенствовать методики количественного определения флавоноидов в ряде образцов ЛРС является процедура экстракции. Проведенные эксперименты показали схожесть результатов экстракции для разных видов флавоноидсодержащего сырья. Нами была предпринята попытка провести обобщение полученных результатов и получить теоретическое объяснение процессов, происходящих при экстракции флавоноидов в выбранных нами условиях.

4.1. Формулировка модели.

При анализе полного содержания целевых веществ в сырье существенное затруднение могут вызывать адсорбционные эффекты, когда для извлечения некоторой части интересующих соединений необходима пониженная концентрация раствора, омывающего сырье. А это приводит к необходимости проведения многократной экстракции. Однако в результате проведенных экспериментов по методике многократной (трехкратной) экстракции, можно сделать вывод о несущественности адсорбционных эффектов для изученных объектов. Таким образом, наблюдаемые результаты согласуются с основными представлениями о механизмах массопереноса, подробно изложенными в работе [69]. Предлагаемая математическая модель пренебрегает эффектами адсорбции и 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.

Во-вторых, 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 соответствие с экспериментальными данными, как описанными в цитируемой работе, так и полученные в результате проведенного исследования, по этим каналам экстрактивные вещества начинают диффундировать к поверхности частиц молотого сырья уже на первом этапе экстракции.

В работе [69] также учитывается, что 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 α .

Основная часть рассуждений посвящена формулировке (двух) уравнений, описывающих массоперенос во время второго периода экстракции. Первое уравнение является вторым законом Фика [106] 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 θ_{\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 γ – 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 ρ_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 θ_0 целевых веществ в сырье, отнесенную к единице массы сухого сырья, из

баланса массы целевых веществ получим выражение для θ_{\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 $E = ea$.

На основании изложенного, сформулированная модель (1)-(5) содержит считающиеся заданными параметры ρ_0 , e , a , характеризующие исследуемое сырье. Величины C_0 и θ_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 , θ_0 и D) предлагается [68] 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

$$Y(t) = C(t)V_s / m_0, \quad Y_0 = C_0 V_s / m_0,$$

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, в рассматриваемой работе [68] считается, что

$$V_s = V - V_0 E,$$

таким образом, $\gamma = (V - V_s) / V$.

4.2. Кинетика однократной экстракции.

Кинетику однократной экстракции удобно исследовать после перехода к безразмерным переменным [68]

$$Fo = \frac{tD}{a^2}, \quad y = \frac{Y}{\theta_0}, \quad y_0 = \frac{Y_0}{\theta_0}, \quad c = \frac{C}{C_{max}}. \quad (6)$$

Можно заключить, что весь процесс определяется лишь двумя параметрами: γ и y_0 . Типичный вид нормированной КВЦС y при различных значениях этих комплексов приведен на рис. 20.

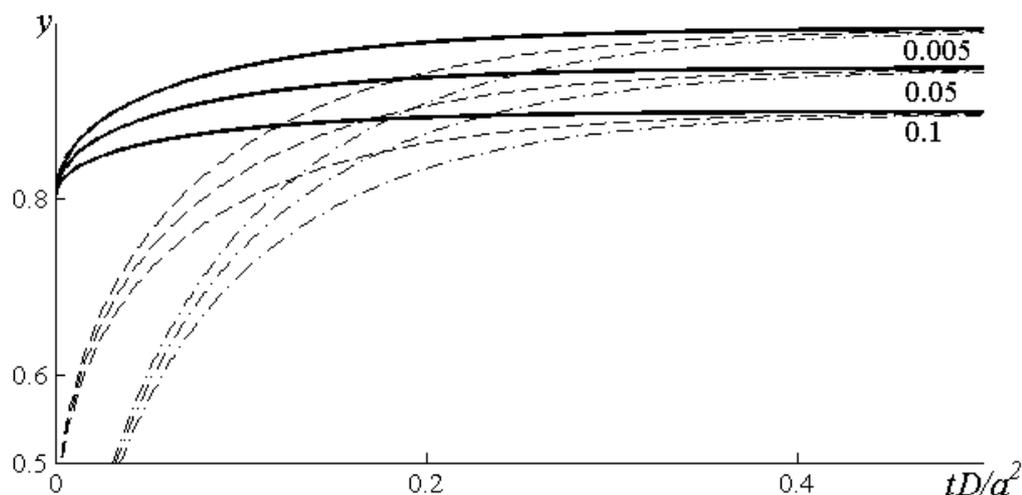


Рисунок 20. Нормированные КВЦС при различных значениях величин y_0 и γ . Сплошные линии – $y_0 = 0.8$, пунктирные линии – $y_0 = 0.4$, штрихпунктирные линии – $y_0 = 0$. Числа под кривыми – соответствующие значения γ . Каждому значению γ соответствует по три кривые с различными значениями y_0 и наоборот [69].

Из результатов расчетов (рис. 20) и экспериментальных наблюдений следует, что при правильном выборе растворителя значительная часть целевых веществ экстрагируется из сырья уже к началу второго этапа, а оставшаяся часть, составляющая лишь 10-15% от их общего содержания, вырабатывается в течение относительного длинного периода времени. Однако в рамках точности используемых экспериментальных техник и приборов проведение длительной экстракции, обеспечивающей полное

извлечение целевых веществ, может быть неоправданным с практической точки зрения. Разработанные экспресс-методики существенным образом эксплуатируют наблюдаемый (опытный) факт – большое значение концентрации C_0 .

Важное заключение, которое можно сделать на основании изложенной модели заключается в слабой зависимости времени полной экстракции целевых веществ от безразмерного параметра γ , характеризующего объем используемого растворителя. В связи с этим в работе [69] предлагается отказаться от чрезмерно больших объемов растворителя, обеспечивая лишь соизмеримость объема извлечения и исходного объема растворителя, $V_s \approx V$. Таким образом, адекватное расходование растворителя соответствует выполнению критерия

$$V_s / V \geq 0.95, \quad (7)$$

позволяющего контролировать погрешность, связанную с неполным извлечением растворителя после экстракции. Время полной экстракции существенным образом зависит только от отношения a^2 / D , и, следовательно, это время можно, например, уменьшать за счет более тонкого помола.

4.3. Калибровка модели на основе проведенных экспериментов.

Как упоминалось ранее, 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. В общем случае для адаптации модели также необходимо задать характеристики сырья: E , ρ_0 , V_0 , θ_0 , y_0 , D и a , методика определения которых подробно изложена в цитируемой работе. Определение плотности ρ_0 по этой методике показало, что она слабо зависит от рассматриваемого объекта, и было решено принять для каждого растения значение $\rho_0 = 0.65 \text{ г/см}^3$. Далее, выполнение критерия (7) позволяет считать, что $V_s \approx V$ и

$$Y(t) = C(t)V / m_0, \quad Y_0 = C_0V / m_0,$$

а максимальное значение КВЦС равно полному содержанию, $Y_{\max} = \theta_0$. На основании результатов ситового анализа навесок использованного сырья принято, что $a = 0.25$ мм.

На представленных ниже рисунках 21–27 приведены адаптационные модели для всех исследованных нами образцов сырья флавоноидов из травы *H. perforatum*(■) и *H. maculatum*(●).

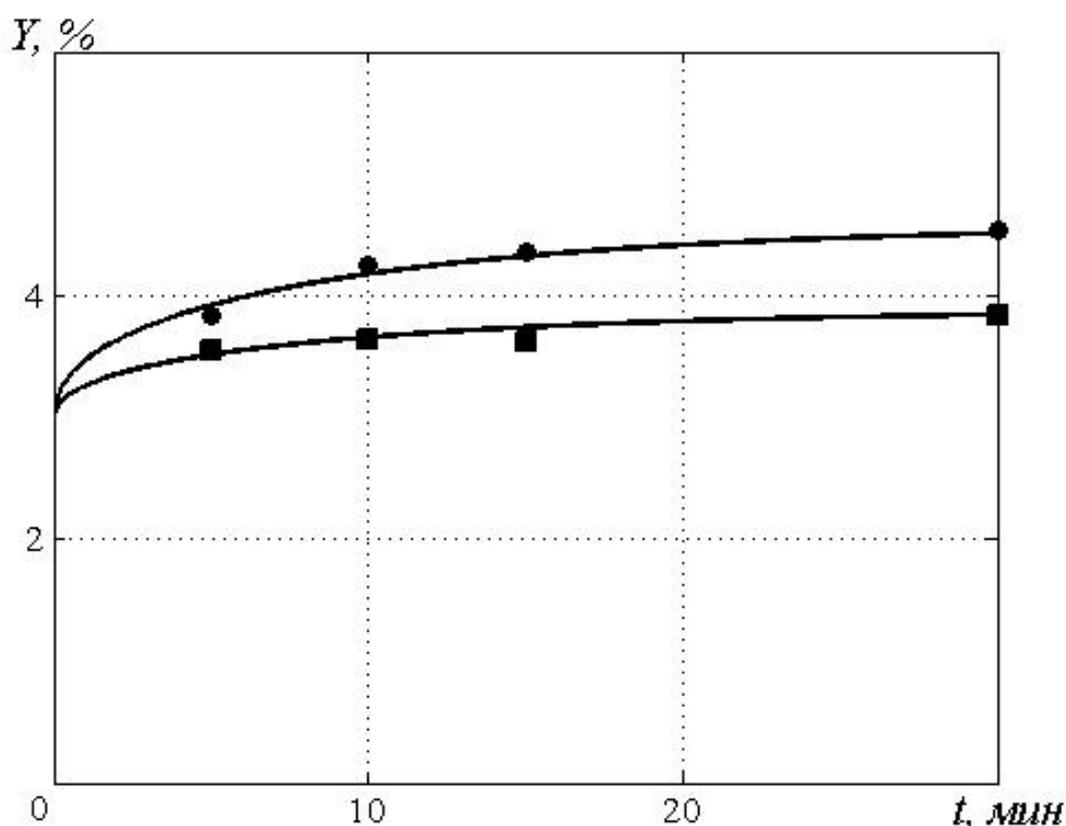


Рисунок 21. Экстракция флавоноидов из травы *H. perforatum*(■) и *H. maculatum*(●). Адаптация модели (сплошная линия) и результаты опытов (маркеры) при использовании 50% этанола в соотношении к сырью 1:100

По оси ординат – выход флавоноидов в % от массы сухого сырья;

По оси абсцисс – время экстракции, мин.

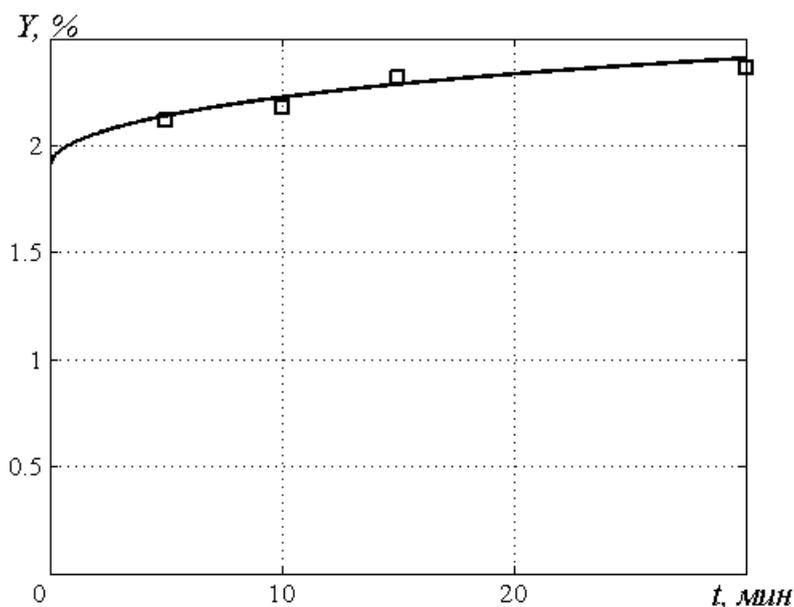


Рисунок 22. Экстракция флавоноидов из листьев березы. Адаптация модели (сплошная линия) и результаты опытов (маркеры) при использовании 50% этанола в соотношении к сырью 1:100

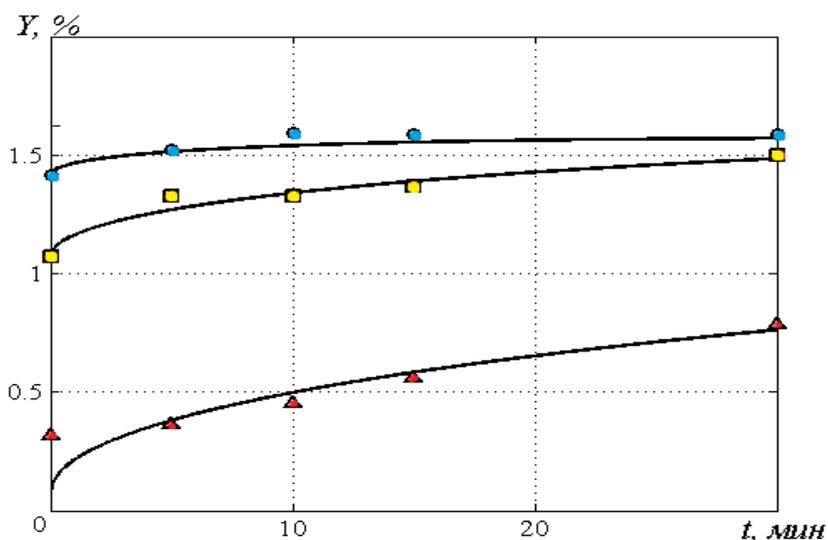


Рисунок 23. Экстракция флавоноидов из травы горца птичьего. Адаптация модели (сплошные линии) и результаты опытов (маркеры) при трех различных концентрациях спирта в растворителе (треугольники – 95%, круги – 70%, квадраты – 40%). Примечание: для проверки адекватности математической модели экспериментальным данным были дополнительно определены концентрации флавоноидов в извлечениях в момент закипания растворителя (при $t=0$) и использованы при построении модели.

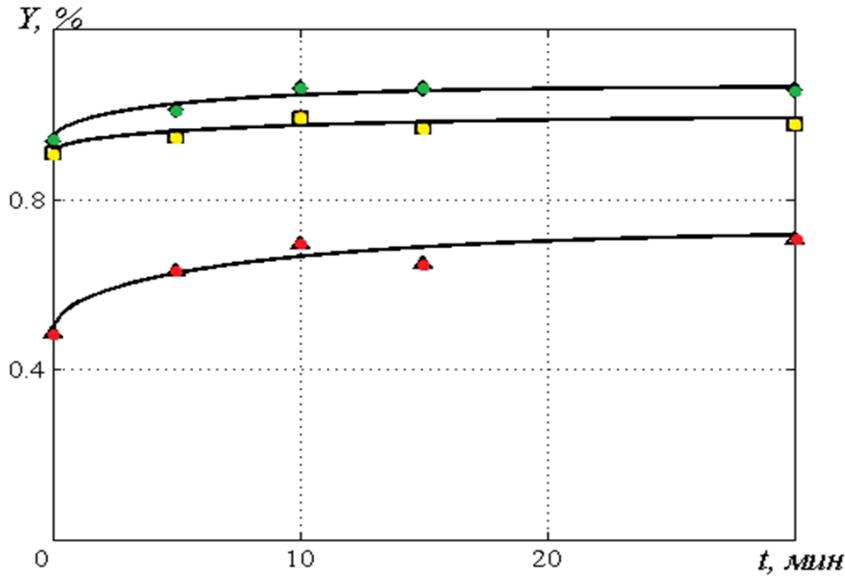


Рисунок 24. Экстракция флавоноидов из травы душицы. Адаптация модели (сплошные линии) и результаты опытов (маркеры) при трех различных концентрациях спирта в растворителе (треугольники – 95%, ромбы – 60%, квадраты – 40%). Примечание: для проверки адекватности математической модели экспериментальным данным были дополнительно определены концентрации флавоноидов в извлечениях в момент закипания растворителя (при $t=0$) и использованы при построении модели.

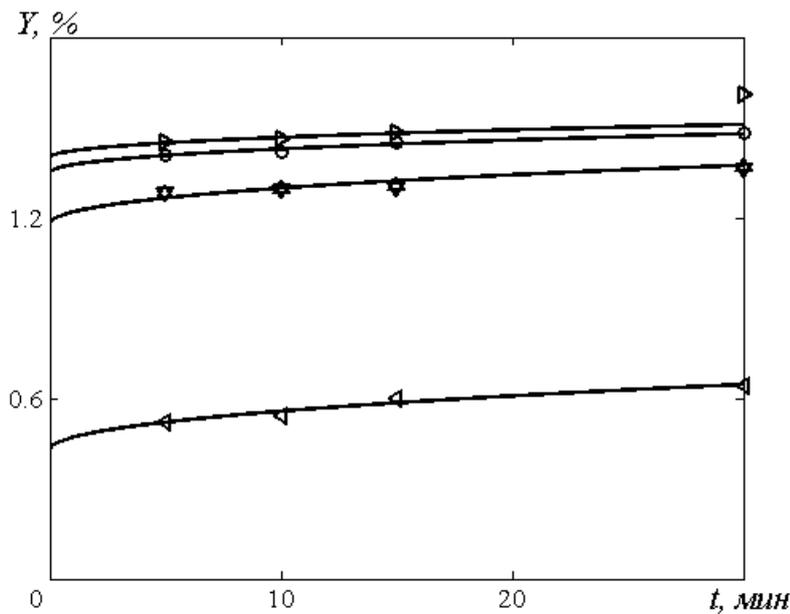


Рисунок 25. Экстракция флавоноидов из травы чабреца. Адаптация модели (сплошные линии) и результаты опытов (маркеры) при 4-х различных

концентрациях спирта в растворителе (треугольники (нижние) – 95%, звездочки – 40%, круги – 60%, треугольники (верхние) – 70%)

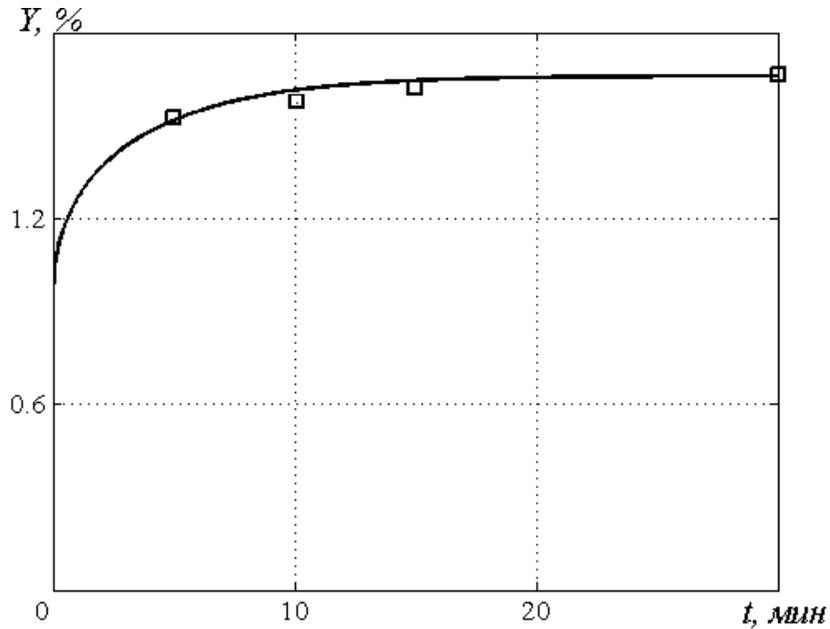


Рисунок 26. Экстракция флавоноидов из цветков календулы. Адаптация модели (сплошная линия) и результаты опытов (маркеры) при 70% концентрации спирта и соотношении сырья к растворителю 1:100.

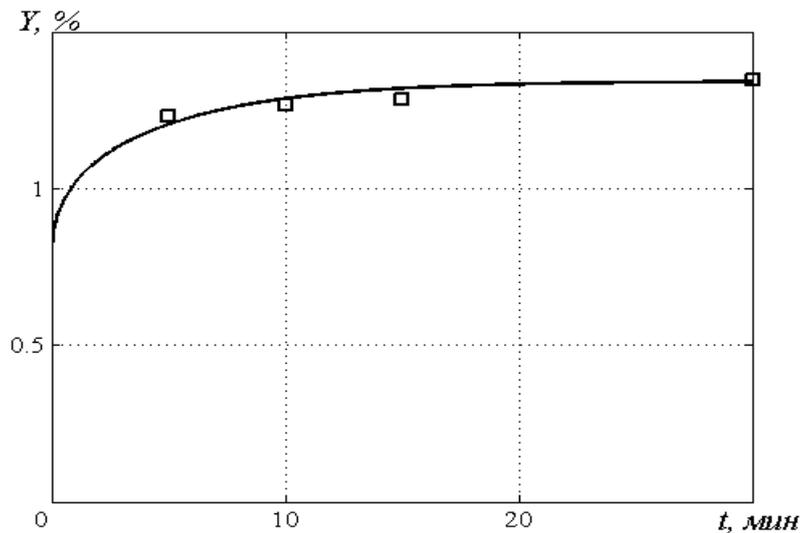


Рисунок 27. Экстракция флавоноидов из цветков бессмертника песчаного. Адаптация модели (сплошная линия) и результаты опытов (маркеры) при 70% концентрации спирта и соотношении сырья к растворителю 1:100.

Таким образом, единственным адаптационным параметром остается эффективный коэффициент диффузии D , значения которого, определенные в результате апробации модели для каждого объекта (трава зверобоя, листья березы, трава горца птичьего, трава душицы, трава чабреца, цветки календулы, цветки бессмертника) приведены в таблицах 32 и 33 и лежат в ожидаемых пределах [103].

Таблица 32.

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

ЛРС	Трава чабреца				
Концентрация спирта, %	40	50	60	70	95
Диффузия D , 10^{-11} м ² /с	3	2	1	1.1	2
ЛРС	Трава душицы				
Концентрация спирта, %	40	60	95		
Диффузия D , 10^{-11} м ² /с	1	1.5	1		
ЛРС	Трава горца птичьего				
Концентрация спирта, %	40	70	95		
Диффузия D , 10^{-12} м ² /с	4.5	11.2	1.05		

Таблица 33.

Параметры модели для травы зверобоя, листьев березы, цветков календулы и бессмертника

ЛРС	Диффузия D , 10^{-11} м ² /с
Трава зверобоя (<i>H. perforatum</i>)	1
Трава зверобоя (<i>H. maculatum</i>)	0.8
Листья березы	0.2
Цветки календулы	1
Цветки бессмертника песчаного	2

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 [120] и полидисперсность навески [16]. Во втором случае частицы мелкодисперсной фракции, обладая большой удельной поверхностью, экстрагируются мгновенно, 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 [108]. Поэтому исследование динамики выхода экстрактивных веществ в случае одно- и многократной экстракции имеет решающее значение при разработке различных методик количественного определения.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. 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.

2. Кривая выхода целевых соединений (КВЦС), позволяет прогнозировать и определять оптимальные режимы экстракции целевых соединений (флавоноидов) при разработке аналитических и препаративных методов выделения природных соединений из растительного сырья.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ФИАЛКИ.

5.1. Разработка метода количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки.

При разработке способа количественного определения водорастворимых флавоноидов нам казалось 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 настой, 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 по методу [7] 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 ГФ XI 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. 34). 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 34

План эксперимента и результаты испытаний водных извлечений из травы фиалки

Опыт	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4	X ₁ сред. %	X ₂ сред. %
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)

X₁ – количество извлеченных флавоноидов в % от массы сырья

X₂ – степень экстракции флавоноидов

Анализ спектров поглощения настоев из травы фиалки после добавления равного объема 2%-ного спиртового раствора алюминия хлорида показал, что максимальное поглощение наблюдалось при длине волны 405 нм (Рис. 28). Этот максимум поглощения отличался от аналитической длины волны (410 нм) использованной в работе [7], однако в силу уже излагавшихся выше причин, мы приняли решение проводить все измерения при 410 нм, с использованием удельного поглощения комплекса рутин с алюминия хлоридом равного 248.

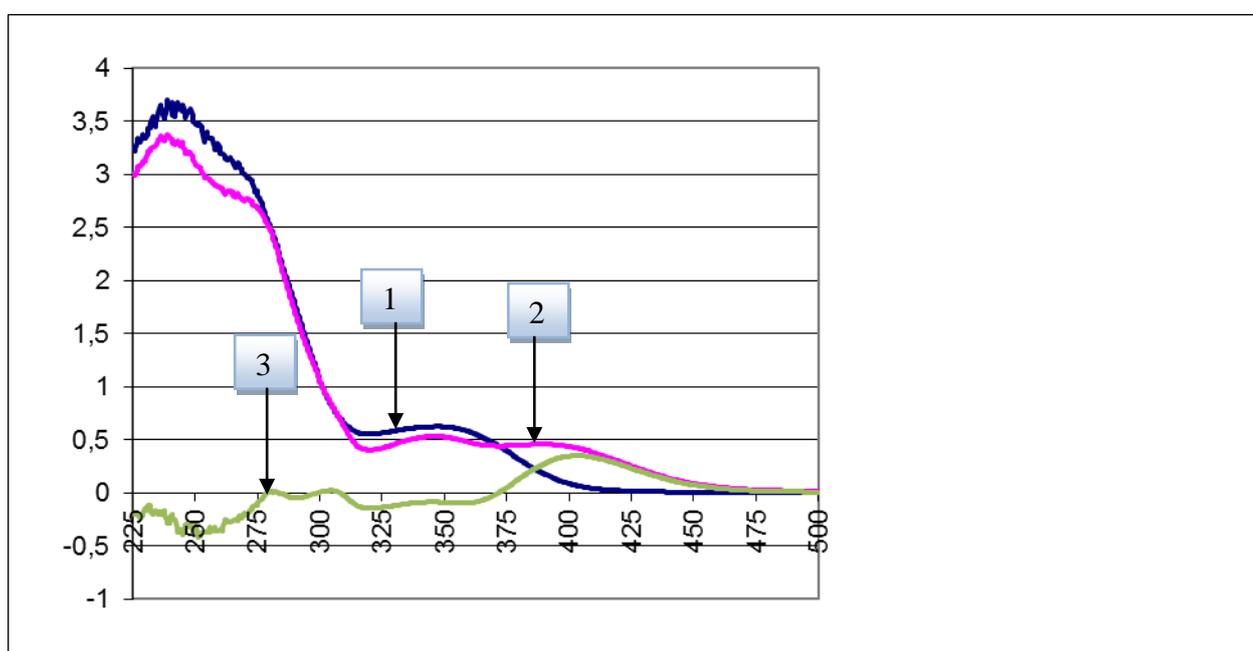


Рисунок 28. УФ-спектр водного извлечения из травы фиалки трехцветной. По оси ординат – оптическая плотность; По оси абсцисс – длина волны, нм; 1 – раствор извлечения на фоне 95% этилового спирта; 2 – раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне 95% этилового спирта; 3 – дифференциальная кривая поглощения (раствор извлечения в присутствии $AlCl_3$ на фоне извлечения).

В результате опытов с добавлением в водные извлечения из травы фиалки четырехкратного объема 2%-ного спиртового раствора алюминия хлорида было установлено, что устойчивое окрашивание раствора наступает через 40 минут и сохраняется в течение еще 1,5–2 часов, что достаточно для проведения анализа.

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 сырья (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 следующую методику количественного определения:

Методика количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом и прибавляют

100 мл воды очищенной. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на плитке при умеренном кипении в течение 5 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, перенося сырье на фильтр, сырье отжимают, объем извлечения доводят через тот же фильтр до 100 мл водой очищенной (раствор А).

Аликвоту 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл 2%-ного раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, доводят объем раствора до метки 95% этиловом спиртом и перемешивают. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: равную взятой ранее аликвоту водного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю кислоты уксусной разведенной, доводят объем раствора до метки 95% спиртом и перемешивают.

Содержание флавоноидов, извлекаемых водой (X) в процентах в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{248 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 410 нм; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Таблица 35.

Метрологические характеристики метода определения в траве фиалки флавоноидов, извлекаемых водой

f	\bar{x}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	ε , %
9	3,36	0,0267453	0,1635	0,95	2,26	0,11	3,3

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений, ошибка метода не превышает 3,3% (табл. 35).

В нескольких образцах травы фиалки, приобретенных в розничной аптечной сети, по разработанной методике провели определение флавоноидов, переходящих в водные извлечения (табл. 36).

Таблица 36.

Содержание флавоноидов, извлекаемых водой в различных образцах травы фиалки, приобретенных в аптечной сети.

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

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

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Единственным значимым фактором при экстракции флавоноидов в водные растворы является соотношения сырья и растворителя.
2. Разработан метод количественного определения водорастворимых флавоноидов в траве фиалки, ошибка метода не превышает 3,3%.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СПОСОБОВ ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ АМАРАНТА БАГРЯНОГО И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

6.1. Разработка метода количественного определения флавоноидов в листьях амаранта багряного

Разработку метода определения суммарного содержания флавоноидов в листьях *A. cruentus* мы по алгоритму, выработанному при разработке экспресс-методов определения флавоноидов, описанных в главах 3.1–3.7.

Аликвоту раствора, полученного при экстракции сырья, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте и доводят объем раствора 70% спиртом до метки. Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Для расчетов используют удельный показатель поглощения комплекса рутина с хлоридом алюминия при 410 нм равный 248.

Прежде всего, была выбрана оптимальная концентрация этилового спирта для экстракции флавоноидов. Экстракцию проводили на кипящей водяной бане трижды 40, 30 и 30 мл спирта по 30 минут каждая. Все эксперименты проводились минимум в 4-х повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 37.

Таблица 37

Содержание флавоноидов в листьях *A. cruentus* при использовании для экстракции этилового спирта различных концентраций, %

	Выход флавоноидов, (% от массы сухого сырья) (% от всей суммы в сырье)		
	50% этанол	70% этанол	95% этанол
Листья <i>A. cruentus</i>	$\frac{2,16 \pm 0,11}{90}$	$\frac{2,39 \pm 0,07}{100}$	$\frac{2,09 \pm 0,11}{87}$

Наибольший выход был при использовании 70% этилового спирта. Результат, полученный при таком режиме экстракции, был нами принят как 100% содержания флавоноидов в данном сырье.

На следующем этапе исследований была изучена динамика выхода флавоноидов из сырья в зависимости от времени экстракции при оптимальной концентрации спирта. Во всех случаях использовалось соотношение сырья и растворителя 1:100.

Полученные результаты представлены в таблице 38.

Таблица 38

Выход флавоноидов из листьев *A.cruentus* в зависимости от времени экстракции 70% этанолом в соотношении 1:100, %

	Выход флавоноидов, (<u>% от массы сухого сырья</u>) (% от всей суммы в сырье)			
	5	10	15	30
Время экстракции, мин				
Листья <i>A.cruentus</i>	<u>2.29 ± 0,03</u> 96	<u>2,30 ± 0,07</u> 96	<u>2,32 ± 0,08</u> 97	<u>2,35 ± 0,12</u> 98

Таким образом, по аналогии с методиками, описанными в разделах 3.1 – 3.7 мы можем предложить экспресс–метод определения флавоноидов в листьях *A.cruentus* с введением в расчетную формулу поправочного коэффициента на неполноту экстракции флавоноидов.

*Экспресс-метод количественного определения флавоноидов в листьях
амаранта багряного*

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной

температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте и доводят объем раствора 70% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора 70% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,04}{248 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 410 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,04 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели по 10 параллельных определений ошибка, метода не превышает 1,38% (табл. 39).

Таблица 39

Метрологические характеристики экспресс-метода определения флавоноидов в листьях амаранта багряного

f	\bar{X}	S^2	S	P	t (0,95; 9)	Δx	ε , %
9	2,39	0,002125	0,0461	0,95	2,26	0,03	1,38

Разработанным нами способом определения суммы флавоноидов мы отследили динамику накопления флавоноидов в листьях *A. cruentus*, выращиваемого в ботаническом саду КГМУ и установили, что их

максимальное накопление происходит в сентябре месяце в фазе плодоношения и образования семян.

6.2. Разработка способа препаративного выделения суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного

Ранее сообщалось о возможности использования сырья амаранта багряного для препаративного получения рутина [55]. Способ предполагал экстракцию сырья 70–95% спиртом, после отгонки спирта водный остаток очищался этилацетатом, далее рутин извлекался бутанолом и после отгонки бутанола выкристаллизовывался из водного раствора. Отталкиваясь от результатов, полученных в главе 5.1. когда в результате 5-минутной водной экстракции травы фиалки удалось извлечь более 94% всех содержащихся в сырье флавоноидов (основным из которых является рутин), мы предположили возможность препаративного выделения флавоноидов (рутина) из листьев амаранта багряного непродолжительной водной экстракцией.

Для этих целей нами была изучена динамика выхода флавоноидов из листьев амаранта багряного от времени экстракции, используя в качестве экстрагента – дистиллированную воду. Выход рассчитывался по показателю исчерпывающей экстракции 70% спиртом. Во всех случаях использовалось соотношение сырья и растворителя 1:100. Зависимость выхода флавоноидов от времени экстракции проверялась \pm в экспериментах минимум в 4-х повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 40.

Таблица 40

Выход флавоноидов из листьев *A.cruentus* в зависимости от времени экстракции водой в соотношении 1:100, %

	Выход флавоноидов, (<u>% от массы сухого сырья</u>) (% от всей суммы в сырье)			
	5	10	15	30
Время экстракции, мин				
Листья <i>A.cruentus</i>	$\frac{1,95 \pm 0,10}{82}$	$\frac{2,04 \pm 0,09}{85}$	$\frac{1,99 \pm 0,06}{83}$	$\frac{1,96 \pm 0,09}{82}$

Из полученных результатов, можно сделать вывод, что оптимальным временем в режиме однократной экстракции водой, является экстракция кипящей водой в течение 10 минут.

Этот режим был положен нами в основу препаративного способа получения флавоноидов из листьев *A.cruentus*, на основе водной экстракции. В отличие от способа, описанного в патенте [55], 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. После охлаждения до комнатной температуры к водному раствору добавляли 1 каплю толуола с целью предотвращения микробной контаминации и оставляли 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.

Качественное исследование полученной фракции методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» в системе этилацетат–уксусная кислота–вода (5:1:1) показало, что это смесь трех флавоноидов, предположительно рутина, гиперозида и кверцетина, поскольку зоны веществ с желто-зеленой флуоресценцией после опрыскивания

хроматограммы 2% спиртовым раствором хлорида алюминия, совпадали по значениям R_f с такими же зонами на участках указанных образцов свидетелей.

Для оценки количественного соотношения флавоноидов в полученной смеси мы провели исследование его состава методом ВЭЖХ.

Достоверность идентификации пиков на хроматограммах подтверждали использованием в методике анализа соответствующих внутренних стандартных веществ – рутина, гиперозида и кверцетина.

Подтверждено, 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.

Таким образом, можно констатировать, что предложенным нами способом на основе водной экстракции листьев амаранта багряного была получена сумма флавоноидов – фактически технический рутин, с небольшим содержанием гиперозида и кверцетина.

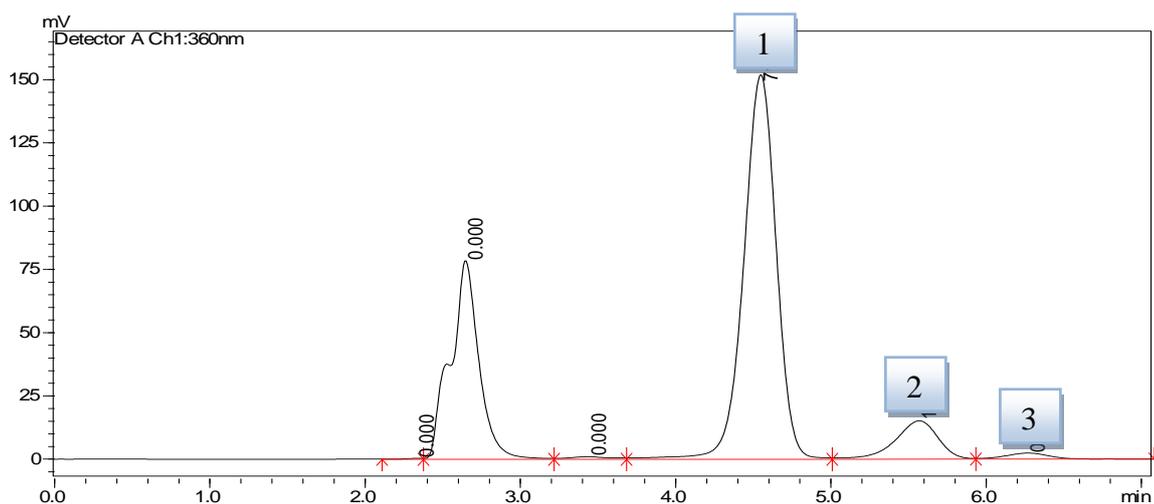


Рисунок 29 – Хроматограмма суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного (подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 70:30); 1 – рутин, 2 – гиперозид, 3 – кверцетин.

6.3. Изучение биологической активности суммы флавоноидов из листьев амаранта багряного

Амарант багряный (как и другие виды амаранта) является потенциальным лекарственным растением, с одной стороны как источник биологически активных флавоноидов (рутина), с другой стороны жирное масло, получаемое из семян содержит высокие концентрации сквалена, ациклического тритерпена, обладающего среди прочего противоопухолевой активностью. В настоящее время различные виды амарантов применяются, прежде всего, как кормовые и пищевые растения. В Татарстане предприятием ООО «Электрол-Б» производится кормовая добавки из травы амаранта багряного «Экстрафит» применяющаяся в животноводстве. «Экстрафит» получается на основе водных экстрактов из травы амаранта багряного. 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 документах 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.

Исследования были проведены в отделе токсикологии ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» под руководством Шиловой О.В. 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.

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.

Одним из наиболее значимых показателей, характеризующих рост и развитие животных, является живая масса. Она предопределяется наследственными особенностями и зависит, в первую очередь, от условий кормления и содержания.

Анализ полученных данных (табл. 41 и рис. 30) показывает, что включение в состав рациона кормления крыс подсолнечного масла, кормовой добавки «Экстрафит» и биологически активных веществ амаранта, способ-

Таблица 41

Живая масса подопытных белых крыс, г ($M \pm m$)

Сроки исследования, сутки	Группа					
	ПК	ПК+ Масло	ПК+Экстрафит	ПК+Флавоноиды	ПК+Остаток	ПК+Сквален
	контроль	1	2	3	4	5
До опыта	75,0±3,63	78,0±4,25	74,8±5,02	80,0±4,32	72,6±3,75	75,0±3,35
12	82,5±4,52	103,8±4,25	121,3±4,85	121,3±3,24	112,5±3,47	122,5±5,02
18	120,0±5,45	120,6±4,24	123,1±4,87	126,3±4,50	114,4±4,72	137,5±5,12
25	133,3±4,75	147,1±4,85	141,3±3,76	145,0±5,22	135,0±4,53	151,6±5,67
31	165,0±4,27	168,6±5,24	165,0±3,86	148,8±4,76	155,0±4,70	185,0±4,69

Примечание: $p=0,95$

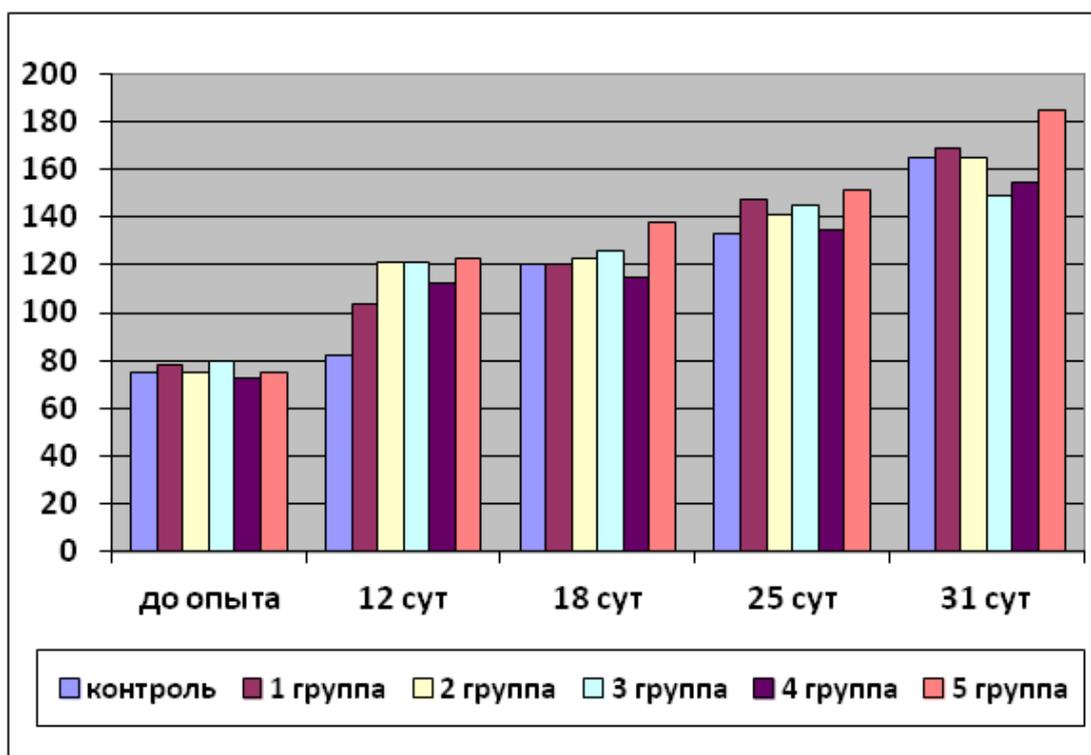


Рисунок 30 – Динамика живой массы подопытных белых крыс, г

стествовало повышению живой массы крыс. Так, на 12-е сутки опыта животные 1-ой опытной группы по живой массе превышали особей контрольной на 25,8 % ($p=0,95$). Живая масса крыс 2-ой и 3-ей опытных групп составила соответственно $121,3 \pm 4,85$ и $121,3 \pm 3,24$ г, т.е. была на 47,0 % ($p=0,95$) выше контроля. По массе тела крысы 4-ой опытной группы превосходили контроль на 30 г. Лабораторные животные 5-ой опытной группы по живой массе превышали контрольных на 48,5 % ($p=0,95$).

К 18 суткам исследования масса тела белых крыс опытных групп практически не отличалась от контрольной. Лишь в 5-ой опытной группе она превысила контроль на 15 % ($p=0,95$), а животные 4-ой опытной группы отстали в росте от контроля на 0,5 %.

На 25-е сутки животные 1-ой, 2-ой, 3-ей и 4-ой опытных групп по массе практически не отличались от контрольной и превышали контроль соответственно на 10,4; 6,0; 8,8 и 1,3 %. Живая масса 5-ой опытной группы превосходила таковое значение контроля на 13,7 % ($p=0,95$) и составила 151,6 г.

На 31-е сутки исследования животные 1-ой и 5-ой опытных групп по живой массе превысили сверстников контрольной группы соответственно на 2,2 и 12,2 %. Живая масса 2-ой опытной группы была практически на уровне контроля.

Для более тщательного изучения влияния биологически активных веществ на ростовые процессы крыс нами были рассчитаны абсолютная скорость роста и среднесуточные приросты живой массы, которые представлены в таблицах 42 и 43.

Таблица 42

Прирост живой массы подопытных белых крыс, г

Сроки исследования, сутки	Группа					
	ПК	ПК+ Масло	ПК+Экстрафит	ПК+Флавоноиды	ПК+Остаток	ПК+Сквален
	контроль	1	2	3	4	5
0-12	7,50±1,24	25,80±2,45	46,51±2,34	40,34±2,17	39,90±2,21	47,52±2,70
12-18	37,53±2,13	16,87±1,46	1,82±0,07	5,00±0,56	1,97±0,09	15,05±1,54
18-25	13,39±1,12	21,15±1,54	18,22±1,46	18,74±1,29	20,68±1,33	14,10±1,81
25-31	31,72±1,11	21,53±1,33	23,71±1,17	3,84±0,06	20,02±1,07	33,40±1,65

Примечание: p=0,95

Данные таблицы 42 показывают, что использование кормовой добавки «Экстрафит» и биологически активных веществ амаранта усиливает ростовые процессы. В период между 12 и 18 сутками исследования прирост живой массы у крыс всех опытных был несколько ниже, чем в контрольной группе. Между 18 и 25 сутками эксперимента интенсивность роста лабораторных животных опытных групп была выше, чем в контроле. Так, крысы, которым дополнительно в рацион вводили биологически активные вещества, за неделю исследования по абсолютному приросту живой массы превысили сверстников контрольной группы на 4,8–7,8 г (p=0,95). В промежуток между 25 и 31 сутками эксперимента прирост живой массы у

животных 1–4-ой опытных групп был ниже значений контроля. У крыс 5-ой опытной группы абсолютный прирост был на 5,3 % больше по сравнению с контролем, но разница недостоверна.

Таблица 43

Среднесуточный прирост живой массы белых крыс, г

Сроки исследования, сутки	Группа					
	ПК	ПК+ Масло	ПК+Экстракт	ПК+Флавоноиды	ПК+Остаток	ПК+Сквален
	контроль	1	2	3	4	5
0-12	0,60±0,07	2,20±0,08	3,92±0,06	3,41±0,07	3,33±0,06	4,00±0,08
12-18	6,31±0,11	2,85±0,14	0,31±0,12	0,80±0,08	0,32±0,06	2,50±0,10
18-25	1,92±0,07	3,03±0,14	2,64±0,12	2,76±0,10	2,91±0,09	2,06±0,11
25-31	5,34±0,15	3,57±0,21	4,01±0,32	0,63±0,25	3,30±0,21	5,64±0,28

Примечание: $p=0,95$

Анализ данных таблицы 43 показывает, что в первые 12 суток эксперимента среднесуточный 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 среднесуточный прирост живой массы крыс опытных групп несколько снизился по сравнению с контролем.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использование кормовой добавки «Экстракт» 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.

Защита организма и его способность обеспечивать иммунитет к возбудителю инфекции зависят от многих общих и специфических факторов.

В то же время иммунная система является наиболее чувствительной и уязвимой системой организма и одна из первых реагирует на внешние воздействия. Результаты проведенного исследования по изучению влияния препарата «Экстрафит» и биологически активных веществ, полученных из амаранта, на иммунологический статус организма представлены в таблице 44.

Приведенные в таблице 44 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. 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.

Таблица 44

Иммунологические показатели крови белых крыс, получавших биологически активные вещества

Показатель	Норма	ПК	ПК+ Масло	ПК+ Экстра- фит	ПК+ Флаво- ноиды	ПК+ Остаток	ПК+ Сквале н
		контр	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
Бактерицидн ая 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
Фагоцитарна я 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
Фагоцитарно е 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
Фагоцитарн ый индекс	3,75- 7,00	5,79± 0,12	5,87± 0,03	5,99± 0,055	5,83± 0,04	5,84± 0,03	5,92± 0,04
Лейкоциты, 10 ⁹ /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
Фагоцитарна я емкость, ×10 ³	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-лимфоци- ты, %	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-лимфоци- ты, %	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

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Разработан метод количественного определения флавоноидов в листьях амаранта багряного, ошибка метода не превышает 1,38%.

2. Разработан способ препаративного выделения суммы флавоноидов (технического рутина) на основе водной экстракции листьев амаранта багряного, с выходом 50% от теоретического.
3. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. М., ГУГК, 1980. – 340 с.
2. Биологически активные вещества сухого экстракта листьев березы: идентификация и количественное определение методом ВЭЖХ / А.А. Сосипатрова, В.И. Осипов, Н.Б. Демина, В.А. Быков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – №3. – С. 23–29.
3. Бирюк, В.А. Флавоноіди суцвіть нагідок / В.А. Бирюк, В.Т. Чернобай // Фармацевтичний журнал. – 1972. – №2. – С. 44–49
4. Блинова, О.А. Фиалки трехцветная и полевая: химический состав и применение (обзор) / О.А. Блинова, А.И. Иванов, С.Д. Марченко // Фармация. – 2005. – №3. – С. 41-43.
5. Бубенчиков, А.А. Морфологические диагностические признаки некоторых видов рода *Thymus* L. I. / А.А. Бубенчиков, Я.С. Трембаля // Фармация. – 1983. – Т. 32. – № 4. – С. 15-17.
6. Бубенчиков, Р.А. Фитохимическое и фармакологическое изучение растений рода фиалка: автореф. дис....канд. мед. наук: 15.00.02 / Р.А. Бубенчиков; Курский гос. медицинский ун–т. – Курск, 2002. – 26 с.
7. Бубенчиков, Р.А. Флавоноиды фиалки трехцветной / Р.А. Бубенчиков, И.Л. Дроздова // Фармация. – 2004. – №2. – С. 11–12
8. Влияние флавоноидов горца птичьего на агрегацию тромбоцитов / Паносян Л.Г. и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 1986. – №2. – С.190–194.
9. ВФС 42–2487–95 «Листья берёзы». Введ. 09.07.1996. – М., 1996. – 8 с.
10. Высочина, Г.И. Динамика содержания и компонентного состава флавоноидов *Polygonum aviculare* L. / Г.И. Высочина // Растительные ресурсы. – 1999. – т. 34. – вып. 3. – с. 67–74.

11. Высочина, Г.И. Содержание суммы и некоторых основных флавоноидов в надземной части *Polygonum aviculare* L., произрастающего в Сибири / Г.И. Высочина // Растительные ресурсы. – 1998. – вып.4. – С. 47–55.
12. Гелла, Э.В. Полифенолы некоторых представителей семейства губоцветных / Э.В. Гелла // Тезисы второго симпозиума по феиольным соединениям 12-17 октября 1970. – Алма-Ата, 1970. – С. 22–23.
13. Гриненко, Н.А. Состав флавоноидов и производных антрахинона в *Hypericum perforatum* L. и *H. maculatum* Grantz / Н.А. Гриненко // Растительные ресурсы. – 1989. – Т.25. – Вып. 3. – С. 387–392.
14. Демина Г.В. Особенности накопления и качественный состав флавоноидов в листьях и почках *Betula* L. / Г.В. Демина, Р.Ш. Хазиев, Р.В. Егорова // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2013. – Т. 155. – кн. 3. – С. 155–161.
15. Динамика накопления флавоноидов и дубильных веществ в траве душицы обыкновенной, культивируемой в Прибайкалье / В.М. Мирович, Г.М. Федосеева, Н.Н. Головных, Г.И. Бочарова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. научн. трудов. – Пятигорск, 2007. – Вып. 62. – С. 93–95.
16. Егоров, А.Г. Прямые и обратные задачи сверхкритической экстракции из полидисперсного зернистого слоя растительного материала / А.Г. Егоров, А.А. Саламатин, Р.Н. Максудов // Теорет. основы хим. технологии. – 2014. – Т. 48. – № 1. – С. 43–52.
17. Запесочная, Г.Г. Флавоноиды *Hypericum maculatum* и *H. inodorum* / Г.Г. Запесочная, Л.П. Купцова, Т.В. Кыштымова // Химия природных соединений. – 1967. – №4. – С. 279–280.
18. Зими́на, Л.Н. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятнистого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.Н. Зими́на, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Медицинский альманах.– 2012.– №2 (21). – С. 227–229.

19. Зими́на, Л.Н. Сравнительное исследование компонентного состава травы фармакопейных видов зверобоя методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.Н. Зими́на, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Химия растительного сырья. – 2013. – №1. – С. 205–208.
20. Исследование сырья и препаратов зверобоя / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, А.В. Дубищев, и др. // Фармация. – 2005. – Т. 53. – № 3. – С. 23–25.
21. Кашин, А.С. Количественное содержание флавоноидов в надземной части *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) в различных местообитаниях Саратовской области / А.С. Кашин, Н.В. Машурчак, В.В. Игнатов // Растительные ресурсы. – 2011. – т.47. – вып. 3. – С. 73–80
22. Кащенко, Н.И. Количественный анализ фенольных соединений календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) методом микроколоночной ВЭЖХ. / Н.И. Кащенко, Д.Н. Оленников // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 36. – № 12. – С. 66–174.
23. Кащенко, Н.И. Спектрофотометрический анализ фенольных соединений календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). Ревизионное исследование существующих методов / Н.И. Кащенко, Д.Н. Оленников // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т. 37. – № 1. – С. 146–155.
24. Кащенко, Н.И. Фитохимическое исследование и совершенствование методов стандартизации цветков и травы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): Автореф. дис... канд. фармац. наук / Н.И. Кащенко; Улан-Удэ, 2014. 22 с.
25. Китаева, М.И. Фитохимическое изучение горца птичьего/ М.И. Китаева, Л.В. Селенина // Тезисы докладов II Республиканской конференции по мед. ботанике. Киев, 1988, с. 255.
26. Китанов, Г.М. Современное состояние химического изучения видов рода *Nurpericum* / Г.М Китанов, К.Ф. Блинова // Химия природных соединений. – 1987. – №2. – С. 185–303.

27. Коновалова, О.А. Биологически активные вещества *Calendula officinalis* L./ О.А. Коновалова, К.С. Рыбалко // Растительные ресурсы. – 1990. – т.26. – вып.3. – с. 42–57.
28. Котова, Э.Э. Вопросы введения в ГФУ монографии «Зверобой» // Фармаком. – 2007. – №2. – с. 26–32.
29. Котова, Э.Э. Стандартизация травы душицы по количественному содержанию флавоноидов / Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Котов А.Г. // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2011. – вып. XXIV. – №3. – с. 38–42.
30. Куркин, В.А. Вопросы стандартизации сырья и препаратов зверобоя / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Фармация. – 2007. – Т. 55. – № 4. – С. 12–14.
31. Куркин, В.А. Зверобой: итоги и перспективы создания лекарственных средств. Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ»; / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева //ООО «Офорт», 2008. 127 с.
32. Куркин, В.А. Исследование зверобоя травы на содержание суммы флавоноидов и антраценпроизводных / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Пятигорск, 2007. Вып. 63. С. 605-609.
33. Куркин, В.А. Сравнительное исследование содержания суммы флавоноидов и антраценпроизводных в препаратах травы зверобоя / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – № 10. – С. 39–42.
34. Куркин, В.А. Разработка методик стандартизации цветков ноготков / В.А. Куркин, О.В. Шарова // Фармация. – 2007. – №8. – С. 11–13.
35. Куркин, В.А. Стандартизация листьев берёзы / В.А. Куркин, В.В. Стеняева // Фармация. – 2004. – №6. – С. 10–12.

36. Куркин, В.А. Флавоноиды надземной части *Hypericum perforatum* / В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // Химия природных соединений. – 2007. – № 5. – С. 512–513.
37. Куркин, В.А. Флавоноиды цветков *Calendula officinalis* / В.А. Куркин, О.В. Шарова // Химия природных соединений. – 2007. – №2. – с. 179–180.
38. Куркина, А.В. Исследование компонентного состава цветков *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. / А.В. Куркина // Химия растительного сырья. – 2011. – №2. – С. 113–116.
39. Куркина, А.В. Новые подходы к стандартизации сырья бессмертника песчаного – *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. / А.В. Куркина // Традиционная медицина. – 2010. – №1. – С. 45–49.
40. Куркина, А.В., Определение содержания изосалипурпоза в сырье и препаратах бессмертника песчаного/ А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Е.В. Авдеева // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46. – № 3. – С. 28–33.
41. Куркина, А.В. Содержание изосалипурпоза в цветках бессмертника песчаного / А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Е.В. Авдеева // Фармация. – 2011. – Т. 59. – № 1. – С. 12–14.
42. Куркина, А.В. Фитохимическое исследование сырья и препаратов бессмертника песчаного / А.В. Куркина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – Самара. – 2007. – Т. 2. – С. 177–182.
43. Литвиненко, В.И. Фиалка трехцветная и фиалка полевая / В.И. Литвиненко, Р.А. Бубенчиков, Н.В. Попова // Фармаком. – 2004. – №1. – с. 1–5.
44. Литвиненко, В.И. Хемотаксономическое изучение видов рода *Thymus* на Украине / В.И. Литвиненко, И.Г. Зоз // Растительные ресурсы. – 1969. – вып.4. – с. 481–495.

45. Литвиненко, В.И. Цміні: ботанічна характеристика, хімічний склад, застосування / В.И. Литвиненко, Н.В. Попова, О.О. Волькович // Фармаком. – 2001. – №1. – С. 9–15.
46. Максютин, Н.П. Полифенолы травы *Hypericum perforatum* и препарата новоиманина / Н.П. Максютин, Т.А. Ковет // Химия природных соединений. – 1971. – №3. – С. 363–367.
47. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики/ И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко и др. // Справочник. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
48. Миревич, В.М. Исследование фенольных соединений душицы обыкновенной / В.М. Миревич // Ресурсоведческое и фармакогностическое изучение лекарственной флоры СССР: сборник научных трудов ВНИИФ. – М., 1987. – Т.25. – С. 105-109.
49. Миревич, В.М.// Фармакогностическое исследование представителей родов *ORIGANUM* L. И *RHODODENDRON* L. флоры Восточной Сибири/ Дис... доктора фармацевт. наук. – Улан-Уде. – 2010, 419 с.
50. Миревич, В.М. Химический состав душицы обыкновенной, культивируемой в условиях Иркутской области / В.М. Миревич, Г.М. Федосеева, Н.Н. Головных // Естествознание и гуманизм: сб. науч. работ. – Томск, 2006. – Т. 3, № 3. – С. 37
51. Морохина, С.Л. Сравнительное изучение химического состава БАВ и анатомо-диагностических признаков травы душицы обыкновенной и душицы турецкой / С.Л. Морохина, Д.О. Боков // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т.32.– №11. – С. 69–74.
52. НД 42-9135-07 Фламин / ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина. 11 с.
53. Определение влажности лекарственного растительного сырья: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: 1987. – С. 285.

54. Определение флавоноидов в траве и лекарственных формах тимьяна ползучего / А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина, М.Н. Галько // Фармация. – 2013. – №5. – С. 14–17.
55. Пат. № 2041232 РФ, Способ получения рутина / А.И. Коновалов, Е.Н. Офицеров, Карасева А.Н., Хазиев Р.Ш., Карлин В.В.; заявл. 27.02.92; опубл. 9.08.1995
56. п-Диастереомеризация содержащегося во фламине изосалипурпозида/ Н.А. Тюкавкина, В.Е. Ручкин, И.А. Руленко и др.// Фармация. – 1989 – Т.38. – №2. – С. 28–30.
57. Пенкаускене, Э.Ф. Введение в культуру горца птичьего и биохимическая характеристика его сырья в Литовской ССР/ Э.Ф. Пенкаускене, Д.И. Баранаускайте // Новые культуры в народном хозяйстве и медицине. Киев, 1976, С.56.
58. Пешкова, В.А. Флавоноиды *Origanum vulgare* / В.А. Пешкова, В.М. Миревич // Химия природных соединений. – 1984. – № 4. – С. 522.
59. Пихлик, У. Фенология и динамика содержания полифенолов в *Hypericum perforatum* L. и *H. maculatum* Grantz в Эстонии / У.Пихлик // Растительные ресурсы. – 1993. – Т.29. – вып.1. – С. 77–82.
60. Правдивцева, О.Е. Исследование по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного / О.Е. Правдивцева, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2008. – №1. – С. 81–86.
61. Правдивцева, О.Е. Сравнительное исследование химического состава надземной части некоторых видов рода *Hypericum* L. / О.Е. Правдивцева, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2009. – № 1. – С. 79–82.
62. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций). – М.: Медицина, 1985. – 328 с.].
63. Проекты фармакопейных статей для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XII издания. Режим доступа:

<http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/> (дата обращения: 16.05.2014)

64. Раева, А.А. Изучение метаболома листьев березы с целью создания лекарственного препарата: Дис... канд. фармац. наук / А.А. Раева; М. – 2011. – 162 с.
65. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной различных сортов / К.И. Кобраков, Г.А. Целикова, Е.Л. Малинкина, Л.В.Кузнецова // Бутлеровские сообщения. – 2011. – Т. 28. – № 19. – С. 16-20.
66. Растительные ресурсы СССР. Вып. 6: Сем. *Hippuridaceae* – *Lobeliaceae*. – Л.: Наука. – 1991. – 254 с.
67. Римкене, С. Изучение полифенолов соцветий душицы обыкновенной / С. Римкене [и др.] // *Medicina Vilnius*. – 1981. – № XXI. – С. 79-82.
68. Руководство по стандартизации лекарственных средств / Под ред. Р.У. Хабриева, В.Л. Багировой, В.Б. Герасимова // М.: Медицина, 2006. – 352 с.
69. Саламатин, А.А. Кинетика экстракции биологически активных веществ из растительного сырья кипящим растворителем / А. А. Саламатин, Р. Ш. Хазиев, А. С. Макарова, С. А. Иванова // Теорет. основы хим. технологии. – 2015. – том 49. – № 2. – С. 1–8.
70. Смирнова, Л.П. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного/ Л.П. Смирнова, Л.Н. Первых // Химико–фармацевтический журнал. – 1998. – №6. – С. 35-38.
71. Стеняева, В.В. Сравнительное фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.): Автореф. дис... канд. фармац. наук / В.В. Стеняева; Самара. – 2005. – 24 с.
72. Соболева, Л.С. Зеленая аптека Татарии / Л.С. Соболева, И.Л. Крылова // Татарское кн. изд-во. Казань, 1990.– 156 с.

73. Современные подходы к изучению химического состава лекарственного растительного сырья представителей рода *Origanum* L. и разработка методов его стандартизации/ Д.О. Боков, С.Л. Морохина, Н.В. Пятигорская, Д.М. Попов // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.35. – №7. – с. 94–101.
74. Трава душицы: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырье. – М.: 1989. – С. 328.
75. Трава горца птичьего: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырье. – М.: 1989. – С. 330.
76. Трава зверобоя: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырье. – М.: 1989. – С. 323.
77. Трава фиалки: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырье. – М.: 1989. – С. 340.
78. Трава чабреца: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырье. – М.: 1989. – С. 338.
79. Файзуллина, Р.Р. Фитохимическое изучение зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) флоры Башкортостана и перспективы создания на его основе лекарственных средств: Автореф. дис... канд. фармац. наук / Р.Р. Файзуллина; Уфа, 2005. – 22 с.
80. ФС 42–1889–95 «Настойка Зверобоя». Введ. 01.05.1996. М., 1996. – 6 с.
81. ФС 42-1518-88 «Фламин». Введено 22.04.88. М., 5 с.
82. ФСП 42–7877–06 «Зверобоя трава» ОАО «Красногорсклексредства». – Введ. 18.09.2006. – М., 2006. – 14 с.
83. ФСП 42–8679–07 «Берёзы листья» ОАО «Красногорсклексредства». Введ. 18.06.2007. – М., 2007. – 14 с.

84. ФСП 0129083605 «Фламин» / ЗАО «ВИФИТЕХ». Введено 22.12.06. – М., 2006. – 6 с.
85. ФСП 42–0190–08 «Берёзы листья» ЗАО «Ст. – Медифарм». Введ. 21.01.2008. – М., 2008. – 11 с.
86. ФСП 42–0171174901 «Зверобоя экстракт сухой» ГУП «ПЭЗ ВИЛАР». Введ. 26.09.2001. – М., 2001.– 7 с.
87. ФСП 42–52293 «Настойка зверобоя» ФГУП «МПЗ». Введ. 02.09.2009. – М., 2009. – 8 с.
88. ФСП 42–8179–06 «Ноготков цветки» / ОАО «Красногорсклексредства». Введено 11.12.06. М., 2006. – 11 с.
89. ФСП 42–8012–06 «Душицы трава» ОАО «Красногорсклексредства» Введ. 16.10.2006.– М., 2006. – 23с.
90. ФСП 42–2627–08 «Чабреца экстракт жидкий субстанция» ОАО «Фармстандарт–Томскхимфарм» Введ.29.12.2008 .– М., 2008 –14 с.
91. ФСП 42–8179–06 «Ноготков цветки» / ОАО «Красногорсклексредства». Введено 11.12.06. – М., 2006. – 11 с.
92. ФСП 42–8253–06 «Фиалки трава» / ОАО «Красногорсклексредства». – Введ. 25.12.2006. – М., 2006. – 25 с.
93. ФСП 42–2630–06 «Фиалки трава» / ЗАО ФИРМА «ЗДОРОВЬЕ». – Введ. 11.12.2006. – М., 2006. – 9 с.
94. ФСП 42-9430-08 «Фиалки экстракт сухой» / ФГУП МА МЦ Управления Делами Президента РФ. – Введ. 29.09.2008. – М., 2008. – 6 с.
95. Хазиев, Р.Ш. Изучение биологически активных веществ растений рода *Amaranthus* L.: Автореф. дис... канд. биол. наук / Р.Ш. Хазиев; Казань, 1993, 21 с.
96. Хазиев, Р.Ш. Накопление флавоноидов в надземной части *Polygonum aviculare* (*Polygonaceae*) и особенности их экстрагирования при приготовлении водных настоев / Р.Ш. Хазиев, Д.Р. Карабань // Растительные ресурсы. – 2007. – вып. 3. – С. 102–107.

97. Хазиев, Р.Ш. Совершенствование технологии настоев из травы горца птичьего/ Р.Ш. Хазиев, А.Г. Фролов// Фармация, 2001, №4 с. 24-26.
98. Хазиев Р.Ш. Содержание рутина в *Amaranthus cruentus* L., выращиваемом в Татарстане / Р.Ш. Хазиев, А.В.Гарусов, Офицеров Е.Н. // Растительные ресурсы. – 1992. – вып.2. – С. 63–66.
99. Халкон – флавононова ізомеризація компонентів фламіну// В.Е. Ручкин, І.А.Руленко, В.І. Литвиненко и др.// Фармацевтичний журнал. – 1988. – №3. – С. 63–66.
100. Хворост, П.П. Флавоноиды *Polygonum aviculare* / П.П. Хворост, Н.Ф. Комиссаренко // Химия природных соединений. – 1980. – №6. – .825–826.
101. Цветки бессмертника песчаного: [фармакоп. ст.] // Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд.: в 2 вып. / МЗ СССР. – Вып. 2: Лекарственное растительное сырье. – М.: 1989. – С. 244.
102. Шарова, О.В. Флавоноиды цветков календулы лекарственной/ Шарова О.В., Куркин В.А. // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65–68.
103. Aguilera, J.M. Microstructural principles of food processing and engineering/ J.M. Aguilera, D.W. Stanley // Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.
104. Berghöfer, R. Biflavonoids in *Hypericum perforatum* /Part1. Isolation of I3,II8-biapigenin. R. Berghöfer, J. Hölzl // Planta Med. –1987. – №53. – P. 216–17.
105. Berghöfer, R. Isolation of I3',II8-biapigenin (amentoflavone) from *Hypericum perforatum* / R. Berghöfer, J. Hölzl // Planta Med.– 1989. –№55. – P.91.
106. Contributii la studiul fizico-chimical flavonoizilor din *Origanum vulgare* / V. Antonescu [et al.] // Farmacia. – 1982. – Vol. 30. – № 4. – P. 201–208.
107. Crank J. The mathematics of diffusion. Oxford: Clarendon Press, 1975.
108. Cissé M., Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling / M. Cissé, P. Bohuon, F. Sambe, C. Kane, M. Sakho, M. Dornier // J. of Food Eng. – 2012. – V. 109. – № 1. – P. 16–27.

109. Dallenbach-Tölke, K. HPLC-Analyse der Flavonoidglycoside aus *Betulae folium*/ K. Dallenbach-Tölke, S. Nyiredy, B. Meier, O. Sticher // *Planta Med.* – 1987. – №53. – P. 189–192.
110. Dallenbach-Tölke, K. Vergleich der Einzel- und Gesamtbestimmungsmethoden der Flavonoidglykoside von *Betulae folium*/ K. Dallenbach-Tölke, S. Nyiredy, O. Sticher // *Dtsch. Apoth. Ztg.* – 1987– №127. – P. 1167–1171.
111. Dorossiev, K. Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* // *Pharmazie.* – 1985. – №40. – P.585–586.
112. Dulelenbach-Tollke, K. Flavonoidglycosides from *Betula pubescens* and *Betula pendula* / K. Dulelenbach-Tollke, Sz. Nyiredy, G.A. Gross, O. Sticher// *J. Natur. Prod.* – 1986. –Vol. 49, №. 6. – P. 1155–1156.
113. *European Pharmacopoeia.* – 7th ed. – Sup. 7. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2010.
114. Haverland, F. *Polygonum aviculare* L. – Der vogelknoterich. Einebotanisch-chemisch-pharmazeutische Bearbeitung // *Die Pharmazie.* –1963.– H.1. –S.1–92.
115. Friedrich H. Über das Vorkommen von Isorhamnetinglykosiden in den Blüten von *Calendula officinalis* L. // *Arch. Pharmazie.* – 1962. – Bd 295. – H. I. – S.59–66.
116. Friedrich H. Über das Vorkommen von Isorhamnetinglykosiden in den Blüten von *Calendula officinalis* L. // *Arch. Pharmazie.* – 1962. – Bd 295. – H. 6.– S. 464–471.
117. High-performance liquid-chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula* / V. Ossipov, K. Nurmi, J. Loponen et al. // *J. of Chromatography A.*– 1996. –Vol. 721. – № 1. – P. 59–68.
118. Hoelzl, J. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) HPLC analysis of the main components and their variability in a population/J. Hoelzl, E. Ostrowski // *Dtsch. Apoth. Ztg.* – 1987. – №127. – P. 1227–1230.

119. HPLC isolation and identification of flavonoids from white birch *Betula pubescens* leaves / V. Ossipov, K. Nurmi, J. Lojonen et al. // Biochemical systematics and ecology. – 1995. – Vol. 23. – № 3. – P. 213–222.
120. Sovova, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂. I. Modelling of extraction curves // Chemical Engineering Science. 1994. – №49. – P. 409–414.
121. Husain, S. L. Distribution of flavonoids as chemotaxonomic in the genus *Origanum* L. and related genera in *Labiatae* / S. L. Husain, V.H. Heywood, K.R. Markham // Aromatic Plants. – 1982. – № 7. – P. 141–152.
122. Jerzmanowska, Z. // Wiadomosci Farm. 1937. – V.64. – P. 527 [Цит. по: Китанов Г.М, Блинова К.Ф. Современное состояние химического изучения видов рода *Hypericum* / Химия природных соединений. – 1987. – №2. – С. 185-303]
123. Jürgenliemk, G. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum* / G. Jürgenliemk, J. Nahrstedt // Planta Med. – 2002. – № 68. – P. 88–91.
124. Kalinova, J. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.) / J. Kalinova, E. Dadakova // Plant Foods Hum Nutr. – 2009. – № 64. – P.68–74.
125. Kashchenko, N.I. New rhamnoglucosides of quercetin and isorhamnetin from *Calendula officinalis* flowers / N.I. Kashchenko, D.N. Olennikov // “Chemistry of Natural Compounds”: Xth Int. Symp., Bukhara, November, 21-23. – 2013. – P. 366.
126. Kawasaki, M. Flavonoids in the leaves of twenty eight polygonaceous plants / M. Kawasaki, I. Kanomata, K. Yoshitama // Bot. Mag. Tokyo. – 1986. – Vol.99. – P. 63–74.
127. Keinanen, M. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics / M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto // J. Agric. Food Chem. – 1996. – Vol. 44. – № 9. – P. 2724–2727.
128. Keinanen, M. Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid

- chromatography / M. Keinanen // J. Agric. Food Chem. – 1993. – Vol. 41. – №11. – P. 1986–1990.
129. Keinanen, M. High-performance liquid-chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves / M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto // J. Chromatogr. – 1998. – Vol. 793. – № 2. – P. 370–377.
130. Kim, H.J. Et al novel lignan and flavonoids from *Polygonum aviculare* // J. Nat. Prod. –1994. –Vol. 57(5). – P. 581–586.
131. Martinková, J. Determination of the content of rutin and total polyphenols of spinach and amaranth/ J. Martinková, F. Hnilička, H. Hniličková, M. Orsák // Scientia agriculturae Bohemica. – 2009. – № 40. – P. 6–11.
132. Ohta T. Ueberin Glycosideder *Polygonum aviculare* L. var. *buxifolium* Ledeb. // J. Physiol. Chem. – 1940. –Bd. 263. – P. 221–223.
133. Olechnowicz-Stepien W. Study of the flavonoid fraction of some plants of the Labiatae family (*Herba serpylli* L., *Herba thymi* L., *Herba marjovanae* L., *Herba orzгани* L.) / W. Olechnowicz-Stepien, E. Lamer-Zarawska.// Herba Pol. – 1975. – № 21. – P. 347– 356.
134. Olennikov, D.N. New isorhamnetin glucosides and other phenolic compounds from *Calendula officinalis* / D.N. Olennikov, N.I. Kashchenko // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. –Vol. 49. – № 5. – P. 717–729.
135. Pasko, P. Analysis of selected acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC./ P. Pasko, M. Sajewich, S. Gorinstein, Z. Zachwieja //Acta Chromatographica. – 2008. – №20. – P. 661–672.
136. Raduöienė, J. Morphological and Chemical Evaluation on *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* in Lithuania / J. Raduöienė, E. Bagdonaitė, S. Kazlauskas // Proc.XXVI IHC ñ Future for Medicinal and Aromatic Plants Eds. L.E. Craker et al. Acta Hort.– 629 SHS. –2004. – P. 55–62.
137. Tronchet, J. Les flavonoides de *Polygonum aviculare* L. Effect du vieillissement et du traitement gibberelique/ J. Tronchet, B. Vuillemin // Ann. Scient. Univ. Besancon Bot. – 1964. – № 20. – P. 17–25.

138. Pawlowska, L. Flavonoids in the leaves of Polish species of the genus *Bétule* L. 1 Flavonoids of *B. pendula* Roth and *B. foncée* Kot. leaves. / L. Pawlowska // Acte Soc. Bot. Pol.– 1980. – № 49. – P. 281 – 296.
139. Washington, J.S. A new acylated apigenin 4'-O- β -D-glucoside from the stems of *Thymus serpyllum* L. / J.S. Washington, V.K. Saxena.// J. Inst. Chem. – 1983. – № 57. – P. 153– 155.
140. Washington, J.S. Scutellarein-7-O- β -glucopyranosyl(1-4)- α -L-rhamnopyranoside from the stems of *Thymus serpyllum* L. / J.S. Washington, V.K. Saxena.// J. Indian Chem. Soc. – 1986. – № 63. – P. 226 – 227.

ПРИЛОЖЕНИЯ

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 5

Цветки ноготков

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Числовые показатели. Ц е л ь - н о е с ы р ь е. Экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом, не менее 35%; влажность не более 14%; золы общей не более 11%; остатков цветоносов, в том числе отделенных от корзиной при анализе, не более 6%; корзинок с полностью осыпавшимися язычковыми и трубчатыми цветками (цветоложе с обертками) не более 20%; побуревших корзинок не более 3%; других частей растения (кусочков стеблей и листьев) не более 3%; органической примеси не более 0,5%;

Новая редакция

Числовые показатели. Ц е л ь - н о е с ы р ь е. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1%; влажность не более 14%; золы общей не более 11%; остатков цветоносов, в том числе отделенных от корзиной при анализе, не более 6%; корзинок с полностью осыпавшимися язычковыми и трубчатыми цветками (цветоложе с обертками) не более 20%; побуревших корзинок не более 3%; других частей растения (кусочков стеблей и листьев) не более 3%; органической примеси не более 0,5%;

минеральной примеси не более 0,5%.

П о р о ш о к .
Экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом, не менее 35%; влажность не более 14%; золы общей не более 11%; частиц не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 10%.

П о р о ш о к. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1%; влажность не более 14%; золы общей не более 11%; частиц не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 10%.

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей

холодной воды и фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 100 мл через бумажный фильтр (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 6 мл 2% спиртового раствора $AlCl_3$ и доводят раствор спиртом этиловым 95% до метки (испытуемый раствор). Через 40 минут измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре на максимуме поглощения при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А и 0,1 мл кислоты уксусной концентрированной, и доведенный спиртом этиловым 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

формуле:

$$X = \frac{D \times V \times 100 \times 25 \times 1,07}{248 \times m \times (100 - W) \times 2}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 408 нм; V – объем раствора A в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 9

Цветки бессмертника песчаного

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 50 % спирта и нагревают на водяной бане при температуре 60°C в течение 15 мин. Затем извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр, предварительно смоченный 50% спиртом в мерную колбу вместимостью 500 мл.

Новая редакция

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Колбу с содержимым искусственно охлаждают до комнатной температуры, и извлечение фильтруют в мерный цилиндр вместимостью 100 мл через бумажный фильтр

Экстракцию указанным выше способом повторяют еще 4 раза. Извлечения фильтруют в ту же мерную колбу и доводят их объем 50% спиртом до метки (раствор А).

5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 95 % спиртом до метки (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 315 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 95% спирт. Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца изосалипурпозиды.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид в абсолютно-сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 500 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 5 \cdot 250 \cdot 25 \cdot (100 - W)} =$$

(раствор А).

2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 418 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А и доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,07}{500 \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 500 – удельный показатель поглощения комплекса изосалипурпозиды с алюминия хлоридом при 418 нм; V – объем

$$\tilde{O} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 160 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; где D_0 – оптическая плотность раствора ГСО изосалипурпозид; испытуемого раствора; m – масса сырья, в граммах; m_0 – масса ГСО изосалипурпозид, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Допускается проводить определение с использованием калибровочного графика. В этом случае содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид и абсолютное сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{500 \cdot 50 \cdot C \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где C – количество суммы флавоноидов, найденное по калибровочному графику, в граммах на 1 мл.

Примечание. Приготовление раствора Государственного стандартного

раствора А в мерном цилиндре;

m – масса сырья в граммах;

1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

о о б р а з ц а (ГСО)

и з о с а л и п у р п о з и д а:
около 0,025 г (точная навеска)
ГСО изосалипурпозиды,
высушенного до постоянной
массы при температуре 100–105
°С, растворяют в мерной колбе
емкостью 250 мл в
небольшом количестве 95%
спирта и доводят объем
раствора тем же спиртом до
метки. В мерную колбу
емкостью 25 мл помещают
2 мл приготовленного раствора и
доводят объем 95% спиртом до
метки. Раствор используют
свежеприготовленным.

**Построение калибровочного
графика.** Около 0,025 г (точная
навеска) ГСО изосалипурпозиды,
высушенного до постоянной
массы при температуре 100–105
°С, помещают в мерную колбу
емкостью 250 мл,
растворяют в небольшом
количестве 95% спирта и
доводят объем 95% спиртом до
метки. Отбирают по 0,25; 0,50;
1,25; 2,50; 5,00; 6,25 мл раствора

в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 315 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют 95% спирт.

Для построения калибровочного графика по оси ординат откладывают оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию стандартного раствора изосалипурпозиды в граммах в 1 мл раствора.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 52

Трава зверобоя

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Новая редакция

Числовые показатели. Цельное сырье. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,5%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%; стеблей (в том числе отделенных при анализе) не более 50%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

Числовые показатели. Цельное сырье. Суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид не менее 1,5%; (для травы зверобоя пятнистого); суммы флавоноидов в пересчете на смесь гиперозида и рутина не менее 1,5% (для травы зверобоя продырявленного); влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%; стеблей (в том числе отделенных при анализе) не более 50%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

Измеленное сырье. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,5%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%; стеблей не более 50%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,310 мм, не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

П о р о ш о к. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1,5%; влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%; частиц, не

Измеленное сырье. Суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид не менее 1,5%; (для травы зверобоя пятнистого); суммы флавоноидов в пересчете на смесь гиперозида и рутина не менее 1,5% (для травы зверобоя продырявленного); влажность не более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%; стеблей не более 50%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,310 мм, не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

П о р о ш о к. Суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид не менее 1,5%; (для травы зверобоя пятнистого); суммы флавоноидов в пересчете на смесь гиперозида и рутина не менее 1,5% (для травы зверобоя продырявленного); влажность не

проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, не более 5%; минеральной примеси не более 1%; отклонения в массе $\pm 5\%$.

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 50 % спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через вату в мерную

более 13%; золы общей не более 8%; золы, нерастворимой в 10% хлористоводородной кислоты не более 1%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, не более 5%; минеральной примеси не более 1%; отклонения в массе $\pm 5\%$.

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 50% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный

колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. Вату помещают в колбу для экстрагирования и прибавляют 30 мл 50 % спирта. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят 50 % спиртом до метки и перемешивают (раствор А). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 96 % спиртом до метки.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл извлечения, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом до

фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье в траве зверобоя пятнистого в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,09}{380 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытываемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытываемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья, в граммах; m₀ – масса ГСО рутина, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах

Примечание *Приготовление раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина. Около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина,*

а содержание суммы флавоноидов в пересчете на смесь гиперозида и рутина и абсолютно сухое сырье в траве зверобоя продырявленного в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,09}{343 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытываемого раствора; 380 – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при 415 нм; 343 – расчетный удельный показатель поглощения комплекса смеси гиперозида и рутина с алюминия хлоридом при 415 нм; V – объем раствора A в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,09 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

предварительно высушенного при температуре 130-135 °С в 85 мл 95% спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 55

Трава душицы

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Числовые показатели. Цель -
ное сырье. Эфирного
масла не менее 0,1%; влажность
не более 13%; золы общей не
более 10%; золы
нерастворимой в 10% кислоте
хлористоводородной не более
5%; почерневших и
побуревших частей растения не
более 7%; кусочков стеблей и
боковых веточек, в том числе
отделенных при анализе, не
более 40%; органической
примеси не более 1%;
минеральной примеси не более
1%.

Измельченное сырье.
Эфирного масла не менее
0,08%; влажность не более

Новая редакция

Числовые показатели. Цель -
ное сырье. Эфирного масла
не менее 0,1%; суммы
флавоноидов в пересчете на
цинарозид не менее 1%;
влажность не более 13%; золы
общей не более 10%; золы
нерастворимой в 10% кислоте
хлористоводородной не более 5%;
почерневших и побуревших
частей растения не более 7%;
кусочков стеблей и боковых
веточек, в том числе отделенных
при анализе, не более 40%;
органической примеси не более
1%; минеральной примеси не
более 1%.

Измельченное сырье.
Эфирного масла не менее 0,08%;
суммы флавоноидов в пересчете

13%; золы общей не более 10%; золы нерастворимой в 10% кислоте хлористоводородной не более 5%; почерневших и растения не более 7%; кусочков стеблей и боковых веточек, не более 40%; содержание частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 10%; содержание частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

П о р о ш о к. Эфирного масла не менее 0,08%; влажность не более 13%; золы общей не более 10%; золы нерастворимой в 10% кислоте хлористоводородной не более 5%; почерневших и растения не более 7%; кусочков частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 10%; частиц,

на цинарозид не менее 1%; влажность не более 13%; золы общей не более 10%; золы нерастворимой в 10% кислоте хлористоводородной не более 5%; почерневших и побуревших частей растения не более 7%; кусочков стеблей и боковых веточек, не более 40%; содержание частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 10%; содержание частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

П о р о ш о к. Эфирного масла не менее 0,08%; суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 1%; влажность не более 13%; золы общей не более 10%; золы нерастворимой в 10% кислоте хлористоводородной не более 5%; почерневших и растения не более 7%; кусочков частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2

проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 10%; минеральной примеси не более 1%.

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Содержание эфирного масла определяют в 25 г измельченного сырья методом 2 (ГФ XI, вып. 1, с. 290). Время перегонки 2 ч.

мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 10%; минеральной примеси не более 1%.

Количественное определение.

1. Определение содержания эфирного масла.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Содержание эфирного масла определяют в 25 г измельченного сырья методом 2 (ГФ XI, вып. 1, с. 290). Время перегонки 2 ч.

2. Определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 60% спирта, колбу присоединяют к

обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,07}{345 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 345 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при 400 нм; V – объем раствора A в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 56

Трава горца птичьего (спорыша)

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 70 % спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию

Новая редакция

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл (раствор А).

повторяют еще 2 раза указанным выше способом. Объединенные извлечения повторно фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывают 70% спиртом и доводят объем фильтрата тем же спиртом до метки (раствор А).

4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 96 % спиртом до метки; через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95%

4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,07}{330 \cdot m \cdot 4 \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m

спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{330 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 330 – удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при 410 нм; m – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах

— масса сырья в граммах; 1,07 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 60

Трава чабреца

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Числовые показатели.

Экстрактивных веществ, извлекаемых 30% спиртом, не менее 18%; влажность не более 13%; золы общей не более 12%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 5%; кусочков стеблей толщиной более 0,5 мм, не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

Новая редакция

Числовые показатели.

Суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9%; влажность не более 13%; золы общей не более 12%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 5%; кусочков стеблей толщиной более 0,5 мм, не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью

250 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут с момента закипания растворителя. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр вместимостью 100 мл. Остаток сырья в колбе повторно экстрагируют 50 мл 70% спирта в течение 10 минут на водяной бане. После охлаждения раствор профильтровывают в тот же цилиндр (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки; через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 395 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения

используют следующий раствор: 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю концентрированной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% спиртом до метки.

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

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 25 \cdot 100 \cdot 1,06}{345 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 345 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия хлоридом при 395 нм; V – объем раствора А в мерном цилиндре; m – масса сырья в граммах; 1,06 – поправочный коэффициент на неполноту экстракции флавоноидов; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

ГФ XI, вып. 2, ст. 62

Трава фиалки

ИЗМЕНЕНИЕ № _____

Срок введения изменения с _____

Старая редакция

Числовые показатели. Цельное сырье. Экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 30%; влажность не более 14%; золы общей не более 13%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 3%; пожелтевших листьев и стеблей не более 7%; других частей растения (плодов, створок плодов, корней, в том числе отделенных при анализе) не более 3%; органической примеси не более 3%; минеральной примеси не более 1%.

Измельченное сырье.

Экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее

Новая редакция

Числовые показатели. Цельное сырье. Суммы флавоноидов, извлекаемых водой в пересчете на рутин не менее 1%; влажность не более 14%; золы общей не более 13%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 3%; пожелтевших листьев и стеблей не более 7%; других частей растения (плодов, створок плодов, корней, в том числе отделенных при анализе) не более 3%; органической примеси не более 3%; минеральной примеси не более 1%.

Измельченное сырье.

Суммы флавоноидов, извлекаемых водой в пересчете на

30%; влажность не более 14%; золы общей не более 13%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 3%; пожелтевших листьев и стеблей не более 7%; других частей растения (плодов, створок плодов, корней, в том числе отделенных при анализе) не более 3%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 10%; органической примеси не более 3%; минеральной примеси не более 1%.

рутин не менее 1%; влажность не более 14%; золы общей не более 13%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, не более 3%; пожелтевших листьев и стеблей не более 7%; других частей растения (плодов, створок плодов, корней, в том числе отделенных при анализе) не более 3%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 10%; органической примеси не более 3%; минеральной примеси не более 1%.

Количественное определение.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом и прибавляют 100 мл воды очищенной. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на

плитке при умеренном кипении в течение 5 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, перенося сырье на фильтр, сырье отжимают, объем извлечения доводят через тот же фильтр до 100 мл водой очищенной (раствор А).

Аликвоту 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 4 мл 2%-ного раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом и перемешивают. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: равную взятой ранее аликвоту водного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл,

прибавляют 1 каплю кислоты уксусной разведенной, доводят объем раствора до метки 95% спиртом и перемешивают.

Содержание флавоноидов, извлекаемых водой (X) в процентах в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{248 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески сырья, г; 248 – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при 410 нм; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.