

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

УДК: 575.23:.85:. 662

На правах рукописи

МУРАДХОДЖАЕВА ЗИЁДАХОН БАХТИЁР КИЗИ
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ИЗУЧЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ
ПЛОДОВ БОЯРЫШНИКА

Специальность 5А320501-Биотехнология (производство пищевых,
кормовых, химических продуктов и биопрепаратов для сельского
хозяйства)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание академической степени магистра

Научный руководитель:

к.б.н., доц Артикова Р.М.

ТАШКЕНТ 2017

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава I ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1 Краткая характеристика флавоноидов	7
1.2 Физико-химические свойства флавоноидов	12
1.3 Методы выделения и идентификации флавоноидов из растений	13
1.3.1. Флуориметрический метод	25
1.3.2. Потенциометрические методы	25
1.3.3. Полярографические методы	26
1.4 Биологическая активность флавоноидов	27
Глава II ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Объекты исследования	34
2.2. Плоды боярышника	34
2.3. Сушка растительного сырья	36
2.4. Метод определения влажности лекарственного растительного сырья	37
2.5. Выбор оптимальных условий выделения флавоноидов из исходных растительных объектов	39
2.6. Количественное определение суммы флавоноидов в полученных экстрактах	40
2.7. Методы отбора проб	41
2.8. Методика количественного определения суммы флавоноидов в растительном сырье спектрофотометрическим методом	42
2.9. Подготовка к анализу	44
2.10. Проведение спектрофотометрического анализ	45
2.11 Экстрагирование флавоноидов из растительного сырья	46

Глава III	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	47
3.1.	Определение влажности	47
3.2.	Выбор оптимальных условий экстракции флавоноидов из плодов боярышника	48
3.2.1	Исследования влияния соотношения сырья и экстрагента на эффективность извлечения флавоноидов	50
3.2.2.	Исследование влияния продолжительности экстракции на <i>эффективность извлечения флавоноидов</i>	50
3.2.3.	Изучение влияния измельченности плодов боярышника на экстракцию флавоноидов	54
3.3.	Качественный анализ флавоноидов плодов боярышника	55
3.4.	Количественное определение суммы флавоноидов в растительном сырье спектрофотометрическим методом при оптимальных условиях экстрагирования	57
IV	ВЫВОДЫ	60
V	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	62
VI	ПРИЛОЖЕНИЕ	69

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одним из важнейших процессов биотехнологии является процесс выделения и изучения продуктов биосинтеза. Общность представленной диссертационной работы с биотехнологией в том, что она посвящена именно этому процессу – выделению и изучению продуктов биосинтеза из биологических объектов – растений: флавоноидных соединений, которыми и объясняется широкий спектр их биологического действия. В связи с перспективами использования данного класса соединений, наблюдается значительный интерес к исследованию их биологических свойств. Доказано, что флавоноиды являются «ловушками» свободных радикалов и предотвращают перекисное окисление липидов. Также флавоноиды способны активировать природные механизмы клеточной защиты от окислительного стресса через экспрессию внутриклеточных ферментов.

Флавоноиды представляют собой многочисленный класс природных соединений, многообразие которых обуславливается, главным образом, строением агликона (степенью окисленности трехуглеродного фрагмента, положением бокового фенильного радикала, величиной гетероцикла и других признаках), а также составом гликозидного фрагмента.

Интерес к флавоноидам велик ввиду присущего им широкого спектра биологического действия и антиоксидантной активности. В современной науке огромное внимание уделяется поиску оптимальных путей использования флавоноидов в интересах укрепления здоровья людей, профилактики и лечения различных патологий, вызванных или сопровождающихся усилением свободнорадикальных процессов окисления.

В настоящее время для идентификации и количественного определения флавоноидов в лекарственных средствах широко используются физико-химические методы анализа, такие как спектрофотометрия, абсорбционная

спектроскопия. Однако все большее распространение получают комбинированные методы, включающие различные варианты хроматографического разделения исследуемых компонентов. Широкое распространение физико-химических и комбинированных методов анализа, в первую очередь, связано с тем, что эти методы обладают значительно большей чувствительностью и селективностью по сравнению с современными химическими и электрохимическими методами.

Целью диссертационной работы является выделение и изучение флавоноидов плодов боярышника.

Достижение поставленной цели предполагает решение следующих задач:

- 1) разработка методики количественного и качественного определения флавоноидов в плодах боярышника
- 2) выявить особенности (строение, физические и химические свойства) природных флавоноидов как объектов исследования;
- 3) проанализировать содержание рутина в лекарственном растительном сырье;
- 4) изучить теоретические вопросы анализа методами спектрофотометрии и хроматомасспектрометрии;
- 5) определить оптимальные условия экстрагирования флавоноидов плодов боярышника;
- 6) сделать выводы об эффективности использованных методов определения флавоноидов .

Объект и предмет исследования: Объектом исследования является плоды боярышника.

Методика и методы исследования: сравнительно-аналитический, экспериментальный.

Степень новизны итогов исследования с научной точки зрения:
заключается в развитии технологии получения флавоноидов из плодов боярышника.

Практическое значение и применения итогов исследования:
Практическая значимость полученных результатов заключается в разработке технологий производства флавоноидов с высокой антиоксидантной активностью.

Структура и состав работы: состоит из введения диссертации, 3 частей (литературный обзор, используемые источники и материалы, полученные результаты и их обсуждение), выводы, используемый список литературы и приложение. Общий объем диссертации 69 страниц, в нем содержится 14 рисунков и 4 таблиц и 1 схема. Список использованной литературы 67, из них 24 научные работы и достижения ближнего и дальнего зарубежья.

ГЛАВА I

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Краткая характеристика флавоноидов

Флавоноидами называется группа природных биологически активных веществ (БАВ) – производных бензо- γ -пирона (рисунок 1.1.1), в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из C_6 - C_3 - C_6 углеродных единиц. Это гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце [Яковлева, 2006].

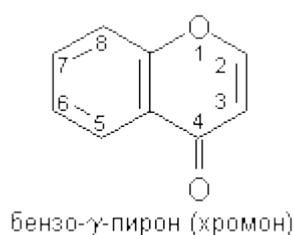


Рисунок 1.1.1 – Структура бензо- γ -пирона

При замещении в хромоне атома водорода в α -положении на фенильную группу образуется 2-фенил-(α)-бензо- γ -пирон или флаван (рисунок 1.1.2), который состоит из 2 ароматических остатков А и В и трехуглеродного звена (пропановый скелет)

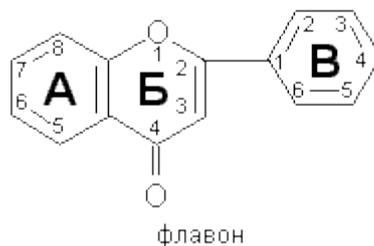


Рисунок 1.1.2 – Структура флавана

В зависимости от степени окисления и гидроксирования пропанового

скелета C₆-C₃-C₆ и положения фенильного радикала флавоноиды делятся на несколько групп (схема 1.1.1) [Муравьева и др. 2002].

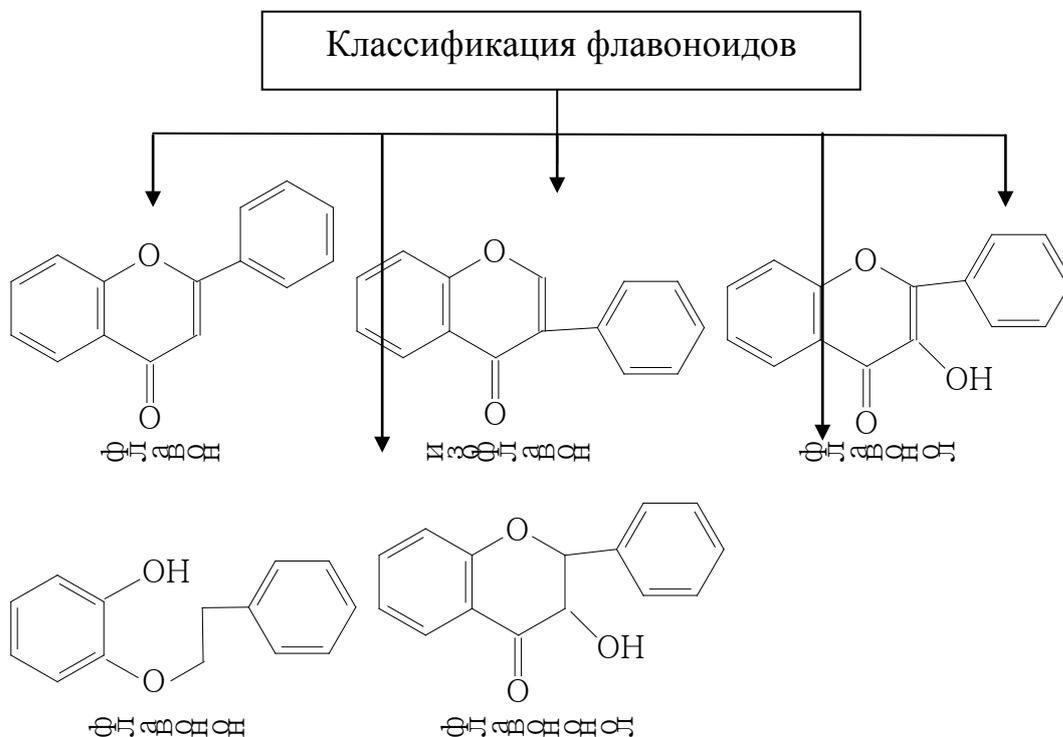


Схема 1.1.1 – Классификация флавоноидов

Флавоны – органические соединения гетероциклического ряда, фенильная группа находится во 2-м положении. Содержатся в цветках пижмы, ромашки.

Изофлавоны – фенильная группа находится в 3-м положении. Содержатся в корнях стального полевого.

Флавонолы – отличаются от флавонов наличием группы OH в 3-м положении, наиболее распространенными представителями являются кверцетин, кемпферол. У высших растений особенно часто встречается кверцетин, у однодольных преобладают производные кемпферола.

Флаваноны – гидрированное производное флавонола, в отличие от флавонола не имеют двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м

положениях. Известно свыше 30 представителей этой группы флавоноидов. Они обнаружены в семействах Rosaceae, Fabaceae и Asteraceae.

Флавононолы отличаются от флавонола отсутствием двойной связи между углеродами во 2-м и 3-м положениях. ОН-группа, как и у флавонола, находится в 3-м положении. Скелет флавонола составляет гликозид аромандендрин, содержащийся в листьях эвкалипта.

Флавоноиды, которые связаны с одной или более молекулой сахара называют гликозидами флавоноидов. Гликозиды – это сложные безазотистые органические соединения, при гидролизе распадающиеся на сахаристую часть – гликон и несакхаристую – агликон или генин. Большинство из флавоноидов находятся в клетках в виде гликозидов (О-гликозидов – основная группа и С-гликозидов (гликофлавоноиды)) или находятся в виде соединений с органическими кислотами [Головкин Б.Н. и др. 2002].

По физическим свойствам флавоноиды являются кристаллическими веществами с определенной температурой плавления, без запаха, имеющие жёлтый цвет (флавоны, флавонолы), бесцветные (изофлавоны, флаваноны). К группе флавоноидов относятся также антоцианы (природные красящие вещества растений), которые окрашиваются по-разному в зависимости от рН среды: в кислой среде они имеют красный цвет (соли катионов), в щелочной – синий (соли анионов).

Агликоны флавоноидов, как правило, растворимы в ацетоне, спиртах, органических растворителях и нерастворимы в воде. Гликозиды плохо растворимы в воде, за исключением гликозидов, имеющих в своей молекуле более трёх остатков сахара, не растворимы в органических растворителях (эфире и хлороформе).

Флавоноидные гликозиды обладают оптической активностью, для них характерна способность к кислотному и ферментативному гидролизу.

Скорость гидролиза и условия его проведения различны для различных групп флавоноидов.

По химическим свойствам О-гликозиды (цианогенные гликозиды, агликоновый компонент которых образован из α -циангидринов) при действии разбавленных минеральных кислот и ферментов легко гидролизуются до агликона и углеводного остатка. С-гликозиды с трудом расщепляются под действием концентрированных кислот (HCl или CH_3COOH) или их смесей при длительном нагревании.

Примерами флавоноидов, значимых для человека являются рутин и квертецин [Химия раст. сырья 2007].

Рутин – органическое соединение из группы флавоноидов, обладающее витаминной активностью. По химической структуре рутин представляет собой 5,7,3',4'-ОН-3-рамногликозид (рисунок 1.1.3) [Головкин Б.Н. и др. 2002 Беликов, В.Г. 2007].

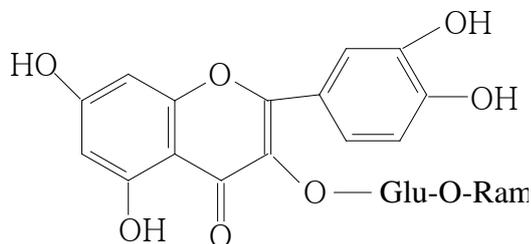


Рисунок 1.1.3 – Химическая структура рутина

Основные функции рутина: антиоксидантные, противовоспалительные, антиканцерогенные, антитромбические, противоязвенные, антиаллергические, противоотечные, спазмолитические, сахароснижающие, желчегонное действие; коррекция микроциркуляции крови и лимфы; укрепление стенок капилляров, защита от кровоизлияний; уменьшение венозного отека; сдерживание агрегации тромбоцитов; защита от токсинов; увеличение плотности костной ткани; ингибирование альдолазы,

трансминазы, С – реактивного белка; ингибирование перекисного окисления липидов; увеличение активности адреналина; снижение активности щитовидной железы.

В организме человека рутин не вырабатывается. К основным природным источникам рутина относятся: листья гречихи, листья чайного куста, черная смородина, шиповник, клюква, соки черники и рябины, можжевельник (ягоды), боярышник (бутоны), ромашка (цветы), календула [Головкин Б.Н. и др. 2002].

Кверцетин (рисунок 1.1.4) является агликоном рутина. По химической структуре кверцетин представляет собой 3,5,7,3'-Пентаоксифлавонон .

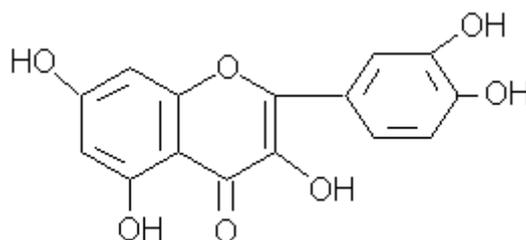


Рисунок 1.1.4 – Химическая структура кверцетина

К основным функциям кверцетина относятся: антиоксидантное, противоотечное, спазмолитическое, антигистаминное, противовоспалительное, диуретическое, противоязвенное, гипотензивное, иммуностимулирующее, противодиабетическое, гипогликемическое, противовирусное, ранозаживляющее, геропротекторное, анаболическое действия; снижение проницаемости стенок капилляров; повышение тонуса сосудов; блокада синтеза лейкотриенов и других воспалительных медиаторов; процессы ремоделирования костной ткани; эстрогено-подобное действие; нормализация выработки кортизона и инсулина; защита ЛНП-холестерина от окисления; улучшение реологии крови; угнетение синтеза тромбосана; поддержка миокарда; стабилизация клеточных мембран;

стимуляция ферментных систем; улучшение функций фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов; транспорт калия и натрия; адаптация к гипоксии; апоптоз раковых клеток.

В организме человека кверцетин, как и рутин, не вырабатывается. К основным источникам кверцетина природного происхождения относятся: брусника, черная смородина, малина, ежевика, клюква, черника, рябина, облепиха [Головкин Б.Н. др. 2002].

1.2. Физико-химические свойства флавоноидов

В чистом виде флавоноиды - кристаллические соединения, бесцветные (изофлавоны, катехины, лейкоантоцианидины, флаванолы, флаваноны), желтые (флавоны, флавонолы, халконы, ауруны), а также окрашенные в красный, синий или фиолетовый цвета (антоцианидины). Без запаха, горького вкуса, с определенной температурой плавления (гликозиды 100 - 180°C, агликоны до 300°C). [Головкин Б.Н. др. 2002]

В зависимости от рН среды: в кислой среде они имеют оттенки красного или розового цветов; в щелочной - синего.

Гликозиды, катехины и лейкоантоцианидины хорошо растворимы в воде, этаноле и метаноле различной концентрации, но нерастворимы в полярных органических растворителях.

Агликоны, за исключением катехинов и лейкоантоцианидинов растворяются в этиловом эфире, ацетоне, этилацетате, спиртах, практически не растворимы в воде. Агликоны и гликозиды флавоноидов лишены запаха. Некоторые из них обладают горьким вкусом. Флавоноидные гликозиды обладают оптической активностью, способны к кислотному и ферментативному гидролизу. Скорость гидролиза и условия его проведения различны для различных групп флавоноидов.

О - гликозиды при действии разбавленных минеральных кислот и

ферментов гидролизуются до агликона и углеводного остатка.

C - гликозиды с трудом расщепляются лишь при действии крепких кислот (конц. хлористоводородная или уксусная - смесь Килиани) при длительном нагревании.

Катехины и лейкоантоцианидины легко окисляются в присутствии кислорода воздуха, под действием света и щелочей, превращаясь в окрашенные соединения - продукты конденсации, вплоть до высокомолекулярных полимерных форм. При нагревании до температуры 200°C эти соединения возгоняются, а при более высокой температуре разрушаются.

1.3. Методы выделения и идентификации флавоноидов из растений

Для флавоноидов, как и для большинства природных соединений, не существует универсальных методов выделения. В зависимости от свойств веществ, особенностей растительного сырья и ряда других факторов прибегают к наиболее подходящему из известных методов выделения: избирательная экстракция, хроматография и др. [Беляков и др. 1996].

Для выделения флавоноидов проводят экстракцию растительного материала, как правило, одним из низших спиртов (метиловый [Flavonoids of the aerial part of *Centaurea pullata*, 2005; Optimal recovery..., 2005; Louaar, 2007; Flavonoids from *Chrysanthemum fuscatum*, 2007; Flavonol glycosides..., 2007], этиловый [Исследование химического состава..., 2003; Optimal recovery..., 2005; Flavonoids of *Serratula cichoracea*..., 2007; Kurkin, Sharova, 2007;] или ацетоном [Ванг, Чен, Инг, 2010]).

Спиртовое извлечение упаривают, к остатку добавляют горячую воду и после охлаждения удаляют неполярные соединения (хлорофилл, жирные и эфирные масла) из водной фракции хлороформом [Phenolic compounds from *Centaurea Africana*, 2006; Louaar, 2007; Flavonoids aglicones from *Centaurea sphaerocephala*, 2008], четыреххлористым

углеродом [Глинкевич, Софрович, 1983] или гексаном. Далее флавоноиды из водной фазы извлекают последовательно этиловым эфиром (агликоны), этилацетатом (в основном монозиды) и бутанолом (биозиды, триозиды) [Сиротский, 1987; Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis*, 2006; Louaar, 2007; Flavonoids aglicones from *Centaurea sphaerocephala*, 2008].

Описан метод выделения флавоноидов из корней девясила – *Inula L.*, путем водной ультразвуковой экстракции при комнатной температуре и нагревании до 40°C [Получение сухого экстракта, 1999].

Для сравнения проводили экстракцию методом настаивания (мацераций).

Экстракцию проводили настаиванием дважды при температуре 40°C, выход экстрактивных веществ составил 27,2% через 3 часа, для ультразвуковой экстракции – 41,2% через 40 мин. При комнатной температуре 13,5 % для ультразвуковой экстракции. Для удаления полисахаридов из водяной вытяжки после ультразвуковой экстракции использовали 80%-ный этанол. Флавоноиды при этом остаются в растворе [Получение сухого экстракта, 1999].

Для выделения гликозидов из водно–спиртового раствора проводилась экстракция этилацетатом, для агликонов – серным эфиром [Получение сухого экстракта, 1999].

Довольно часто, для упрощения разделения суммарного экстракта или отдельных фракций, их подвергают химическим превращениям, с целью получения более устойчивых и менее полярных веществ. К таким способам относятся: метилирование, ацетилирование, кислотный и щелочной гидролиз.

Фракции флавоноидных соединений разделяют на индивидуальные компоненты обычно хроматографическими методами, которые используют для исследования качественного состава флавоноидов и для их количественного определения.

Выделение индивидуальных флавоноидных соединений проводится по механизму распределительной или адсорбционной хроматографии. Для разделения флавоноидных соединений в качестве неподвижной фазы используют силикагель [Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis*, 2006; Шарова, Куркин, 2007; Louaag, 2007; Флавоноиды и терпеноиды..., 2008; Лобанова], полиамидный сорбент [Штейнбюк, Антоновский, Белозерова, 1985; Сиротский, 1987; Ботиров, Дренин, Макарова, 2006; Flavonoids aglicones from *Centaurea sphaerocephala*, 2008; Флавоноиды и терпеноиды..., 2008;] или целлюлозу [Глинкевич, Софрович, 1983; Получение сухого экстракта..., 1999]. Элюирование веществ проводят смесью хлороформа с метиловым спиртом с возрастающей концентрацией метилового спирта [Flavonoids of the aerial part of *Centaurea pullata*, 2005; Флавоноиды и терпеноиды..., 2008; *Serratula tintoria*, a source..., 2009] или спиртово-водными смесями с возрастающей концентрацией спирта [Flavonoids of the aerial part of *Centaurea pullata*, 2005], если сорбентом служит полиамид, и 5-30%-ной уксусной кислотой в случае целлюлозы [Глинкевич, Софрович, 1983; Флавоноиды и терпеноиды..., 1999].

Для выделения индивидуальных флавоноидов существуют специфические методы. При выделении рутина из бутонов софоры японской экстракцию проводят горячей водой. При охлаждении водных извлечений рутин выпадает в осадок, его отфильтровывают и очищают перекристаллизацией из спирта [Глинкевич, Софрович, 1983].

К. Н. Kim et al. предлагают метод выделения рутина (с чистотой 95 %) из надземной части гречихи. Метод включает экстракцию сырья 50 % раствором этанола при 80 °С в течение 1 часа. Выделение рутина из экстракта на колонке с обращено-фазовым сорбенте НР-20 (стиролдивинилбензол) при элюировании 20 – 30 % раствором этанола,

и перекристаллизацией из горячей воды при 4 °С в течение 12 часов; выход рутина составил 92 %.

В работе Э.Р. Каримовой и др. [Групповой состав фенольных соединений...,2011] описан способ получения рутина из лужги (шелухи) гречихи посевной. Извлечение рутина из лужги гречихи проводили обработкой сырья 70 %-ым этанолом в аппарате Сокслета при умеренном нагревании в течение 4 часов. Затем отработанную шелуху заливали 50 мл хлороформа и настаивали в течение суток. Объединяли этанольный и хлороформенные экстракты, растворитель упаривали.

Фракцию рутина извлекали из сгущенного экстракта, в два приема кипящей водой по 20 – 25 мл, горячий раствор фильтровали и кристаллизовали при 10-12 °С. Выпавшие кристаллы рутина перекристаллизовывали из метанола. Выход составил 1 % в пересчете на воздушно-сухое сырье [Групповой состав фенольных соединений..., 2011].

Для быстрого разделения и очистки флавоноидов от балластных веществ используется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для контроля за составом исходного экстракта, выходом индивидуальных соединений при колоночной хроматографии и идентификации состава смеси с использованием этанольных соединений применяется аналитическая ТСХ, проводимая на пластинках «Силуфол» в системе растворителей хлороформ-метанол (8:3) по объему [Юй, 2006; Гришина, Погодин]. М.М. Анисимова [2011] для определения подлинности травы гречихи посевной разработала методику тонкослойной хроматографии для разделения флавоноидов. Разделение флавоноидов проводили на пластинках «Силуфол УФ-254» в системе растворителей: хлороформ : метанол : вода (26:14:3) или на пластинках «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» в системе н-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:2). В результате на хроматограмме обнаруживается доминирующее пятно с величиной R_f около 0,4 (рутин), с R_f –0,8 (кверцетин) и с R_f –0,6 (изокверцитрин).

При качественном определении методом ТСХ состава фенольных соединений (в частности флавоноидов) серпухи венценосной – *Serratula coronata* наилучшее разделение было достигнуто при использовании в качестве подвижной фазы смеси растворителей хлороформ:метанол (1:1) [Ангаскиева, 2006].

Препаративную ТСХ применяют чаще всего для доочистки индивидуальных соединений или разделения фракций, содержащих небольшое количество соединений [Юй, 2006]. При анализе флавоноидных соединений методом ТСХ флавоноиды идентифицируют по характеру свечения на хроматограммах в УФ-свете и после проявления хромогенными растворами.

Для проявления флавоноидов на хроматограммах используют пары 25%-ного аммиака либо 2 – 5 % –ный спиртовой раствор хлорида алюминия. При этом происходит усиление окраски пятен в УФ свете или изменение окраски до желтой, в случае использования хлорида алюминия [Гришина, Погодин].

Катехины проявляют 1 %-ным раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте, при этом в видимом диапазоне наблюдается интенсивное красное окрашивание [Гришина, Погодин,].

Кроме ТСХ при анализе экстрактов, состоящих из смеси флавоноидов, используется бумажная хроматография (БХ), которая ранее являлась одним из самых применяемых методов в анализе флавоноидных соединений [Георгиевский, Комиссаренко, Дмитрук, 1990]. В БХ применяют растворители, обладающие высокой кислотностью. Это обусловлено тем, что флавоноидные соединения обладают свойствами слабых кислот и кислотность растворителя способствует уменьшению диссоциации флавоноидов. В БХ чаще всего для разделения флавоноидов используют систему бутанол – уксусная кислота – вода (БУВ). При разделении флавоноидов выделенных из видов *Myosotis arvensis*, *M.*

krylovii, *M. austrobaicalensis*, *M. decumbens*, *M. pseudovariabilis*, *M. baicalensis*, *M. palustris*, *M. asiatica* б *Astragalus membranaceus* [Коцупий, 2007] использовали систему бутанол–уксусная кислота–вода (БУВ) (40:12:28); видов *Serratula coronata* [Ангаскиева, 2006], *Astragalus onobrychis*, *Arctostaphylos uva–ursi*, *Vaccinium vitis–idaea*, *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium uliginosum* [Исследование качественного..., 2009] (4:1:2); вида – *Aschemilla vulgaris* (10:3:7).

В анализе флавоноидов широкое распространение получил метод газо–жидкостной хроматографии (ГЖХ) благодаря его высокой чувствительности и эффективности. Преимущество метода газо–жидкостной хроматографии заключается в возможности определения качественного состава и количественного содержания разделяемых компонентов, а также в автоматизации процесса контроля при разделении веществ методом колоночной хроматографии. Но использование данного метода ограничивается легколетучими и термостабильными компонентами. При анализе труднолетучих флавоноидов необходимо получать их летучие производные. В качестве летучих производных используют метиловые, этиловые или триметилсиллильные эфиры [Георгиевский, Комиссаренко, Дмитрук, 1990; Molnar–Perl, Fuzfai, 2005]. В методе ГЖХ наиболее распространено использование триметилсиллильных эфиров (ТМС). Это обусловлено простотой их получения и высоким выходом летучих производных флавоноидов [Георгиевский, Комиссаренко, Дмитрук, 1990; Nolvachai, Marriott, 2013].

В работе [Molnar–Perl, Fuzfai, 2005] предложен способ идентификации флавоноидных гликозидов 29 видов рода *Sempervivum* и 34 видов рода *Sedum* методом газо–жидкостной хроматографии с масс–спектрометрическим детектированием (ГЖХ/МС), после их гидролиза до агликонов и последующим силлилированием с бис–триметилсиллиацетамидом (БСА). Идентификация и количественное

определение флавоноидов видов рода *Populus* (*P. lasiocarpa*, *P. angustifolia*, *P. trichocarpa*, *P. euphratica*, *P. ciliate*) проведены методом ГЖХ/МС и ГЖХ/ПД в виде силлилированных эфиров с бистриметилсилил трифлуороацетамидом (БСТФА) [Molnar–Perl, Fuzfai, 2005].

Высокоэффективная жидкостная хроматография обладает неоспоримыми преимуществами среди современных методов анализа флавоноидов, т.к. не требует повышения летучести и термостабильности исследуемых компонентов.

Разделение флавоноидов проводится, как правило, на октадецилсилане (C₁₈) при элюировании смесями ацетонитрил – вода и метанол–вода с небольшим содержанием фосфорной, уксусной, муравьиной или трифторуксусной кислоты. Эти подвижные фазы удобны для разделения сложных смесей как флавоноидов,

так и их гликозидов в условиях изократического и градиентного элюирования и допускают использование УФ– или диодно–матричных детекторов. Разделение флавоноидов (рутина, витексина, ориентина) шелухи гречихи проводили на обращенной фазе C₁₈ при градиентном элюировании системой метанол – 5 % раствор HCOOH (содержание метанола изменялось от 5 до 90 об. %) . D.Dietrych –Szostak et al. [2005] выбрали для разделения флавоноидов из шелухи гречихи на колонке Eurospher – 100 систему 3 % раствор HCOOH – 40 % CH₃CN (концентрация ацетонитрила изменялась от 0 до 40 %). В работе М.М. Анисимовой описаны условия разделения рутина из экстракта травы гречихи посевной на сорбенте C₁₈ в изократическом режиме при элюировании смесью растворителей ацетонитрил–вода (30 : 70) об./об. с добавкой 1 % CH₃COOH. Количественное определение рутина проводили в экстрактах полученных из семян гречихи методом ОФ ВЭЖХ в изократическом режиме при элюировании смесью ацетонитрил – 2,5 % CH₃COOH (20 : 80. [Suppressive effects..., 2007] разделение флавоноидов (кверцетина, рутина и

кверцетрина) проводили из семян гречихи на колонке Eclipse–XPD–C18 при градиентном элюировании. Раствор (А): 10 мМ раствор H_3PO_4 и (В): метиловый спирт: 0 –10 мин, 80–65 % (А); 10 –40 мин, 65–30% (А); 40–50 мин, 30 % (А). Флавоноиды (апигенин, рутин, лютеолин, кверцетин) надземной части растения серпухи венценосной – *Serratula coronata* были разделены на неподвижной фазе C18 элюентом служила смесь ацетонитрил – 10 % CH_3COOH (градиент концентрации ацетонитрила от 70 до 30 об. %) [Ангаскиева, 2006].

Для установления структуры флавоноидных соединений используют различные спектральные методы: УФ– , ИК– , ЯМР– спектроскопия и масс–спектрометрия с использованием различных источников ионизации.

Метод УФ–спектрометрии основан на способности молекул поглощать электромагнитное излучение в области 200 – 400 нм. В УФ–спектре флавоноидов наблюдается характерные для них максимумы поглощения в областях 250 – 270 нм и 330 – 370 нм [Дренин, 2008]. Кроме того, методом УФ–спектрометрии можно определить положение гидроксильных групп в молекуле флавоноида. В этом случае применяют специальные ионизирующие и комплексообразующие реагенты (CH_3ONa , CH_3COONa , AlCl_3), которые приводят к батохромному сдвигу полос поглощения основного хромофора на определенную длину волны в зависимости от положения функциональных групп. Батохромное смещение в УФ–спектре флавоноидов максимумов поглощения с добавкой ацетата натрия длинноволновых (10 – 15 нм) и коротковолновых (4 – 15 нм) полос характеризует наличие свободной гидроксигруппы у С–7 (рисунок 1.3.1..).

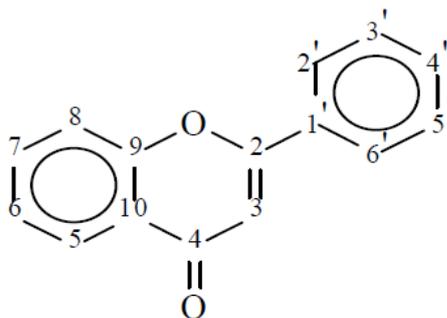


Рисунок 1.3.1.– Структура флавоноида

При смещении максимума поглощения первой полосы в системе борная кислота – ацетат натрия на 10 – 16 нм, указывает на ортодиоксигруппировку (С– 3' и С–4') в В–кольце. В этилате натрия батохромный сдвиг максимума поглощения первой полосы на 45 – 60 нм, обуславливает наличие свободной гидроксигруппы у С–4'. Батохромный сдвиг максимума поглощения первой полосы на 40– 60 нм в присутствии хлористого цирконила или хлорида алюминия показывает свободную С–5 гидроксигруппу. Исчезновение батохромного сдвига при добавлении лимонной кислоты к хлористому цирконилу свидетельствует об отсутствии гидроксигруппы в положении С–3.

При идентификации и установлении структуры флавоноидов используются и методы масс–спектрометрии, позволяющей определять молекулярную массу и возможный распад соединения при электронном ударе. Эти методы хорошо дополняют информацию, получаемую с помощью других физических методов. Например, Г.П.

Кононенко и др. [Изучение масс–спектрометрического.. 1980] изучали особенности распада при электронном ударе флавоноидных агликонов (сакурнетин (I), 5–гидрокси–7,4'– диметокси–флаванон (II), апигенин (III), акацетин (IV), 5 – гидрокси –7, 4'– диметоксифлаван(V), 3,5–диметокси–7,4'–диметоксифлаван (VI), 5,7–дигидрокси–3,4'–диметокси флаван (VII), кемпферид (VIII), изорамнетин (IX)) выделенных из почек березы повислой) – *Betula pendula* Ehrch.

C–3 кольца C. Известно, что в масс–спектре флавоноидов с двумя гидроксигруппами при C–3 или C–5 сигналы иона «d» имеют низкую интенсивность (18 – 20 %), а введение метоксигруппы в положение C–3 приводит к резкому возрастанию интенсивности пика рассматриваемого иона до 50 % [Ведерников, Рощин, 2011].

Использование инфракрасной спектроскопии при установлении строения флавоноидов является, в большинстве случаев, чисто эмпирическим. С помощью ИК – спектра можно получить предварительные данные о наличии в молекуле той или иной функциональной группы. Высокая полоса 3200 – 3500 см⁻¹ обусловлена фенольными гидроксильными группами, полоса 1660 см⁻¹ принадлежит карбонильной группе, ароматические C=C–связи дают полосы при 1610, 1580, 1510, 1460 см⁻¹. Важной для идентификации флавоноидов является так называемая область «отпечатков пальцев» 800 – 1200 см⁻¹. Совпадение полос указанных группами области «отпечатки пальцев» служит надежным признаком идентичности веществ [Дренин, 2008].

При проверке растительного сырья на присутствие флавоноидов используют качественные реакции. Общей реакцией на флавоноидные соединения является реакция восстановления атомарным водородом в кислой среде в присутствии магния по Шиноду (появление вишнево–красной окраски) или ее модификация с цинком [Федосеева, Минович, Горячкина, 2009].

Флавоноиды, благодаря наличию карбонильных и фенольных оксигрупп, способны образовывать комплексы с солями металлов, которые различаются по устойчивости в зависимости от природы металла, pH среды и других факторов. Наиболее специфической и универсальной пробой на флавоноиды является возникновение зеленой, коричневой,

черной или синей окраски комплексной соли в присутствии хлорида железа [Федосеева, Минович, Горячкина, 2009].

Флавоноиды с диоксифенольными группами дают осадки с раствором основного ацетата свинца, образуют окрашенные соединения с хлоридом сурьмы и (V). Многие флавоноиды дают окрашенные комплексы с хлоридом алюминия (III), с солями циркония и другими металлами [Федосеева, Минович, Горячкина, 2009].

Флавоноиды со свободной 7-оксигруппой легко образуют азокрасители с диазотированной сульфаниловой кислотой и другими производными ароматических аминов.

Для количественного определения суммарного содержания флавоноидов в растительном сырье наибольшее распространение получили физико-химические методы, прежде всего фотоколориметрия, спектрофотометрия, флуориметрия, потенциометрия и полярография.

Фотоколориметрический метод основан: – на цветных реакциях комплексообразования с солями различных металлов (циркония, галлия, кобальта) [Георгиевский, Комиссаренко, Дмитрук, 1990]; на реакции с лимонно-борным реактивом ;

- на реакции восстановления флавоноидов магнием в присутствии соляной кислоты в спиртовом растворе и последующем фотометрировании полученного раствора.

Спектрофотометрические методы основаны на измерении поглощения комплекса флавоноидов со спиртовым раствором хлорида алюминия в интервале длин волн от 408 до 435 нм [2009; Исследование качественного и количественного...,2009; Анисимова, Куркин, Ежков, 2010].

В работах Chatchawan Chotimarkorn et al. [2008] предложена модифицированная методика, основанная на поглощении комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия в присутствии нитрита натрия в

щелочной среде при длине волны 510 нм. В.А. Кудринская и др. [2010] предлагают определять флавоноиды по реакции азосочетания с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазонием (4-НФД). В щелочной среде 4-НФД вступает реакцию азосочетания с кверцетином, нарингенином, хризином, морином, рутином и нарингином с образованием окрашенных соединений с максимумом поглощения при длине волны 425 – 435 нм. Предел обнаружения методики составляет $(1,5-3,9) \times 10^{-7}$ М. Методика отработана для модельных смесей флавоноидов [Кудринская, 2010].

1.3.1. Флуориметрический метод

Предложена флуориметрическая методика определения кверцетина, основанная на регистрации интенсивности люминесценции комплекса кверцетина с алюминием, с пределом обнаружения $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л .А.А. Мальцевой и др. [Пат. 2475724 Российская Федерация...., 2013] предложили методику количественного определения содержания индивидуальных флавоноидов (рутина, кверцетина) в различных видах лекарственного сырья без их предварительного разделения. Методика основана на регистрации интенсивности флуоресценции комплекса флавоноида с хлоридами алюминия, при длинах волн испускания, которая индивидуальна для конкретного флавоноида.

1.3.2. Потенциметрические методы

Учитывая проявление флавоноидными соединениями слабо выраженных кислотных свойств (что обусловлено наличием в молекуле фенольных гидроксиллов), используют кислотно-основное титрование в неводных растворителях: диметилформамиде, диметилсульфоксиде, ацетоне [Коноплева, 2002]. О.В. Малахова и др. [2004] проводили потенциметрическое титрование соединения б-бромкверцетина в

изопропиловом спирте. Это вещество в амфипропном растворителе проявляет себя как двухосновная кислота.

Методика потенциометрического определения гидролизуемых флавоноидов [Сравнительное исследование Melissa..., 2009], в траве Melissa лекарственной – *Melissa officinalis* и шалфея лекарственного – *Salvia officinaleis* предусматривает титрование водных извлечений флавоноидов 0,02 н. раствором перманганата калия в диапазоне потенциалов от –50 мВ до + 250 мВ.

1.3.3. Полярографические методы

Основаны на способности молекул флавоноидов окисляться как в растворе, так и на поверхности электродов из материалов различной природы. Предложено вольтамперометрическое определение флавоноидов в фармпрепаратах, основанное на регистрации высоты волны окисления кверцетина на платиновом электроде на фоне 0,1М H₂SO₄ , либо на фоне 0,1М HCl.

Л.С. Анисимова и др. [Пат. 2215288 Российская Федерация..., 2003] предложили способ определения следовых количеств флавоноидов как в чистых растворах, так и растворах растительных экстрактов методом дифференциальной вольтамперометрии. Вольтамперометрическое определение проводили на стеклоуглеродном электроде по пикам восстановления при потенциалах от +0,41 до –0,63 В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода или по пикам окисления при потенциалах от –0,36 до +0,46 В на фоне 0,2 н Na₂HPO₄ или 0,2 н двухзамещенного лимоннокислого аммония, регистрацию пиков проводили при линейной скорости развертки потенциала 20 – 30 мВ/с в дифференциальном режиме съемки вольтамперограммы.

1.4. Биологическая активность флавоноидов

Флавоноиды - наиболее многочисленный класс природных фенольных соединений, которым характерно структурное многообразие, высокая и разносторонняя активность и малая токсичность.

Направление биологического действия флавоноидов связано с физико-химическими свойствами различных структур, в том числе с конформациями молекул, наличие которых обеспечивает, например, радиопротекторные и антиоксидантные свойства.

Флавоноиды содержатся в овощах, фруктах, цветах, семенах, стеблях и корнях растений, которые служат источником их поступления в организм животных и человека. В гликозилированной (гликозиды) и негликозилированной (агликоны) формах флавоноиды накапливаются преимущественно в эпидермальных клетках цветов, листьев, стволов (стеблей), корней, семян и плодов растений. При этом ввиду низкой растворимости в воде агликоны локализованы главным образом в жировых каплях и восковых слоях.

Установлено, [Ман Н.Н 2002] что флавоноиды обладают выраженными антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и противовирусными свойствами.

Большое значение придается противовоспалительному действию флавоноидов, с которым, вероятно, связаны их противоязвенное, ранозаживляющее, жаропонижающее и вяжущее действие.

Привлекают внимание и антимикробные свойства флавоноидов. Так, выявлено отрицательное влияние кверцетина на грамположительные бактерии, флавонов и халконов - на стафилококк. Антимикробными свойствами в отношении стафилококков, стрептококков и *Escherichia coli* обладают (-)- эпигаллокатехин > (±)-галлокатехин > очищенная и окисленная сумма катехинов.[Георгиевский В.П. и др. 1990])

Суммарные препараты и индивидуальные флавоноиды (кверцетин, кемпферол, изорамнетин) оказывают влияние на белковый обмен (стимуляция синтеза и торможение распада белков).

Необходимо упомянуть также эстрогенное действие изофлавонов, которые благодаря этому свойству могут воздействовать на воспроизводительную функцию организма. Суммарный флавоноидный препарат из трифоли гибридной, в которой доминируют кверцетин, изокверцитрин, популин и др., влияет на половой цикл, вес тела и внутренних органов. [Иванов Л.В. 1992]

Ранее других биологических свойств флавоноидов было обнаружено [Stéphane Quideau etc. 2011] их действие на стенки кровеносных капилляров. Способность к нормализации капиллярной системы организма доказана для флавонов и флавонолов, катехинов, лейкоантоцианидинов и флаванолов.

Многочисленные исследования показали, что Р-витаминной активностью обладает целая группа разных по структуре соединений, относящихся к классу флавоноидов. Более того, выяснилось, что помимо кверцетина, рутина и гесперетина капилляроукрепляющим действием обладали антоцианы, кумарины, фенолокислоты и представители других групп растительных фенольных соединений. [Корулькин Д.Ю. 2007]

О защитных свойствах флавоноидов свидетельствуют фактические данные: тепличные растения содержат меньше полифенолов, чем произрастающие в открытом грунте; листья, освещенные солнцем, богаче рутином, чем находящиеся в тени; избыток радиации и УФ-облучения, болезни стимулируют биосинтез полифенольных соединений, поэтому больные растения содержат больше флавоноидов по сравнению со здоровыми.

Резкие колебания в накоплении флавоноидов в период бутонизации—цветения и сравнительная стабильность флавонолового состава в

изменяющихся условиях среды могут свидетельствовать об адаптации обмена веществ к внешним условиям и роли флавоноидов в этих процессах. [Хушбактова З.А.1995]

Богатые резервы таят в себе флавоноидные препараты в борьбе за продление жизни человека, так как некоторые из них обладают противоатеросклеротическим действием и антиоксидантными свойствами, замедляющими процессы старения организма. Антисклеротическое действие флавоноидов, по-видимому, связано также с их желчегонным эффектом, так как известно, что желчегонные средства благоприятно влияют на липидный обмен, увеличивая выведение холестерина из организма. (Тюкавкина НА. и др. 1996).

При изучении желчегонного действия установлено, что суммарные экстракты растений превосходят по активности выделенные из них индивидуальные флавоноиды, которые, усиливая желчеотделение, улучшают детоксицирующую способность по отношению к таким веществам, как барбитураты и мышьяк. Детоксикации организма способствует также свойство флавоноидов оказывать мочегонное действие, например, некоторые флавоноиды, выделенные из растений семейства норичниковых, благоприятно влияют на пищеварение, повышая тонус кишечника и мочевыводящих путей. [Корулькин Д.Ю. 2007]

Поскольку известно, что общим звеном развития многочисленных патологий является активация перекисного окисления, чаще всего липидов, многие исследователи объясняют широкий спектр биологического действия флавоноидов их антиоксидантной активностью. [Рогинский В.А. 1988].

В настоящее время общепризнанны [Зенков Н.К. и др. 2003] следующие три молекулярных механизма антиоксидантного действия флавоноидов в биологических системах:

- реакции с биорадикалами (антирадикальное действие);

- связывание металлов с переменной валентностью (хелатирующее действие);
- ингибирование прооксидантных ферментов.

Взаимосвязь структуры и антиоксидантной активности 27 флавоноидов, продуцируемых растениями Центральной Азии, изучена [Shahat A.A., 2002.]на примере пяти изофлавонов, пяти флавонов, десяти флаванолов и семи флаванолов. Показано, что флавоноиды как полифенолы могут быть "ловушкой" свободных радикалов и тормозить перекисное окисление. Сравнение структурных особенностей изученных соединений показало, что строение основного ядра (изофлавонон - флавонон) не оказывает существенного влияния на антиоксидантную активность, а гликозилирование и метоксилирование даже несколько снижают эти свойства.

Флавоноиды как антиоксиданты играют важную роль в предупреждении нарушений структуры и функции печени при различной патологии, ускоряя регенерацию и восстанавливая функциональную активность гепатоцитов, особенно в комплексной терапии острого и хронического гепатита и цирроза печени. [Зенков Н.К. 2003]

Флавоноиды активны в отношении радикалов, возникающих в липидной и водной фазе, и ингибируют процессы перекисного окисления липидов как на стадии инициации, взаимодействуя с активными формами кислорода, так и на стадии продолжения цепи, выступая донорами атомов водорода для липидных радикалов.

Структурный анализ и экспериментальные данные свидетельствуют о прямой взаимосвязи между антиоксидантной эффективностью флавоноидов и количеством фенольных ОН-групп в их молекулах. Исследование разных по структуре флавоноидов показало, что соединения без ОН-заместителей или с одной гидроксильной группой в положении 5 флавонового ядра не проявляют сколько-нибудь значимой активности в

отношении перекисных радикалов; эффективность флавонов с одним ОН-заместителем в положениях 3, 6, 2', 3' или 4' составляет меньше 60 % эффективности тролокса. Флавонолы и флавоны, такие

как кемпферол, лютеолин, кверцетин, мирицетин, содержащие от двух до шести фенольных ОН-групп, в 2-4 раза превосходят тролокс по способности ингибировать перекисные радикалы, а изофлавоны дайдзеин (две ОН-группы) и генистеин (три ОН-группы) - соответственно в 1,6 и 2,4 раза.

Многочисленные экспериментальные исследования в водных системах (Зенков Н.К. и др. Фенольные биоантиоксиданты. Новосибирск, 2003.) позволили выявить наиболее важные для антирадикальной активности структурные элементы молекул флавоноидов:

- две ОН-группы в положениях 3' и 4';
- двойная связь между С₂ и С₃ атомами углерода, желательно совместно с карбонильной группой в положении 4;
- ОН-группы в положениях 3 и 5 совместно с карбонильной группой.

Многие флавоноиды действуют как хелаторы ионов металлов переменной валентности и способны, таким образом, ингибировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) на стадии разветвления цепей, когда ионы металлов индуцируют гомолиз органических перекисей. Флавоноиды (кверцетин, мирицетин, кемпферол, рутин и др.) могут не только связывать, но и восстанавливать или окислять ионы металлов переменной валентности и, таким образом, стимулировать или ингибировать свободнорадикальные процессы. [Корулькин Д.Ю. 2007].

Следует подчеркнуть, что металлокомплексы флавоноидов могут образовываться непосредственно в крови и в тканях, и в этом случае между двумя механизмами, обуславливающими антиоксидантное действие флавоноидов – антирадикальным и хелатирующим – будет иметь место положительная обратная связь. [Костюк В.А. 2004.]

В гетерофазных системах, таких как клетки или липопротеины, антиоксидантная эффективность флавоноидов во многом определяется их липофильностью и гидрофильностью.

Во многих исследованиях [Корулькин Д.Ю. 2007] *in vitro* у флавоноидов выявляется как антиоксидантный, так и прооксидантный эффект, особенно в присутствии ионов металлов переменной валентности. Присутствие ионов железа и меди усугубляет прооксидантные свойства флавоноидов.

Прооксидантные и антиоксидантные свойства флавоноидов во многом зависят от их растворимости, соотношения окислителей и восстановителей в среде, наличия металлов переменной валентности, pH среды и других факторов. Если в присутствии органических перекисей флавоноиды подавляют индуцированное Cu^{2+} окисление липопротеинов, то в отсутствие перекиси водорода они проявляют себя преимущественно как прооксиданты и усиливают окисление: при этом прооксидантная активность флавоноидов, так же как в случае ингибирования ОН-радикалов и перекисных радикалов, зависит от наличия ОН-заместителей и двойной связи $\text{C}_2\text{-C}_3$ между кольцами А и В. В живых организмах проблема осложняется тем, что, несмотря на несомненный факт наличия флавоноидов в рационе питания человека (в странах Европы в среднем около 23 мг в день), убедительных доказательств доминирующего антиоксидантного действия данных соединений в каких-либо процессах в организме *in vivo* нет. [Wu J.B., et oll 1997].

Кроме дыхательных процессов, флавоноиды участвуют во многих окислительно-восстановительных реакциях, поскольку орто-хиноны легко отнимают атомы водорода у других соединений, превращаясь в орто-фенолы, которые, в свою очередь, могут быть донорами водорода, выполняя антиокислительные функции по отношению к другим метаболитам.

Самым сильным ингибирующим действием обладают (в указанной последовательности): мирицетин > кверцетин > лютеолин > 3(5)-гликозиды мирицетина > 3,7-дирамнозид кемпферола. [Cos P., 2001.].

Спектр биологических эффектов флавоноидов достаточно широк и не ограничивается только их антиоксидантным действием. В исследованиях *in* и *ex vivo* флавоноиды демонстрировали противоопухолевую, антиишемическую, антиаллергическую и противовоспалительную активность, выступали в качестве радиопротекторов, ингибировали агрегацию тромбоцитов. Кроме того, флавоноиды подавляли активность самых разных ферментов, таких как липоксигеназа, циклооксигеназа, монооксигеназы, ксантинооксидаза, митохондриальные сукцинатдегидрогеназа и NADH-оксидаза, фосфолипаза A₂ и протеинкиназы, мембранная и цитозольная тирозинкиназы.

Большой интерес исследователей вызывают флавоноиды как перспективные противоопухолевые средства. В отличие от средств, обычно применяемых в терапии новообразований, флавоноиды, обладающие противоопухолевой активностью, нетоксичны и способны предотвращать метастазы при некоторых видах лимфосаркомы. Если расположить испытанные флавоноиды в ряд по убыванию противоопухолевой активности, то он будет выглядеть следующим образом: лейкоантоцианы (превосходят сарколизин) > халконы > флавонолы (причем агликоны действуют на солидные опухоли, а гликозиды - на асцитные) > катехины. [Tutelyan V.A. 2004.].

Сравнительному изучению на противоопухолевую активность были подвергнуты растительные флавоноиды и их синтетические производные. Установлено, что введение в структуру нитрогрупп и галогенов не только увеличивает противоопухолевую активность, но и сказывается на специфичности их действия на опухоли. [Колхир В.К. 2003].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были отобраны плоды кроваво-красного боярышника.

2.2. Плоды боярышника

Боярышник кроваво-красный (обыкновенный) (*Crataegus oxyacantha*) относится к семейству розоцветных.

Плоды боярышника яблокообразные, от шаровидной до эллипсоидальной формы, твердые, морщинистые, длиной 6-14 мм, шириной 5-11 мм, сверху с кольцевой оторочкой, образованной ссохшимися чашелистиками. Цвет плодов от желто-оранжевого и буровато-красного до темно-бурого или черного, иногда с беловатым налетом выкристаллизовавшегося сахара. Запах отсутствует. Вкус сладковатый.

Боярышник – это невысокое дерево или кустарник из семейства розоцветных. Его основное отличие – небольшие белые или розовые цветы с неприятным запахом, прочные длинные шипы на ветках и красные плоды, созревающие в августе – сентябре. Сегодня существует множество дикорастущих и культивированных сортов растения. Они отличаются не только цветом и размером плодов – от оранжевых до черных, но и своими лечебными свойствами. Чаще всего, в официальной и народной медицине, используется боярышник кроваво-красный, причем для лечения заготавливают все части кустарника – плоды, кору и цветы боярышника

В лечебных целях боярышник начали применять еще в Древнем Китае и Греции, настойками и вытяжками из ягод и цветов лечили дизентерию, заболевания сердечнососудистой системы, его принимали как желчегонное средство и при болезнях печени и желчевыделительных путей. В то время о

том, какие вещества содержит растение, могли только догадываться, но и в наши дни точный химический состав боярышника неизвестен.

По мнению ученых, основной лечебный эффект плодов боярышника обеспечивают растительные полифенолы или флавоноиды, которые уменьшают ломкость сосудов, нейтрализуют токсины и свободные радикалы в организме человека.

Плоды боярышника содержат следующие флавоноиды:

- ✓ *кверцитрин* – оказывает выраженное воздействие на сосудистую стенку, делает мелкие артериолы и капилляр более эластичными и прочными. Кроме того, кверцитрин помогает освободить организм от «неправильных» опухолевых клеток и обладает антиоксидантным действием;
- ✓ *кверцетин* – один из самых популярных и известных флавоноидов, он обладает выраженным кардиопротекторным действием, при его регулярном поступлении в кровь кверцетин стабилизирует капилляры, восстанавливая сосудистую стенку изнутри, в медицине это вещество используют для профилактики и лечения нарушений мозгового кровообращения, при заболеваниях сердца и сосудов, а также при заболеваниях мочевыделительной системы;
- ✓ *гиперозид* – этот флавоноид способствует максимальному поглощению кислорода и глюкозы из крови тканями и увеличивает поступление калия в клетки миокарда. В результате этого улучшается сердечно-сосудистая проводимость и питание клеток;
- ✓ *витексин* – это вещество расширяет сосуды и усиливает обменные процессы, происходящие в поперечнополосатой мускулатуре.

Кроме биофлавоноидов в плодах боярышника содержатся:

- ✓ урсоловая органическая кислота – одно из ценнейших соединений в боярышнике, так как это вещество редко встречается в природе, а наш организм испытывает в нем большую потребность. Урсоловая кислота ускоряет регенерацию клеток и оказывает ранозаживляющее и

противовоспалительное действие, обладает сосудорасширяющим, гепатопротекторным, кардиостимулирующим и противоопухолевым действием;

✓ олеаноловая органическая кислота – оказывает тонизирующее действие и усиливает кровоснабжение головного мозга, сердца и других органов;

✓ хлорогеновая органическая кислота – очищает сосуды от атеросклеротических бляшек, делает их стенки более эластичными и помогает нормализовать процессы, происходящие в почках, печени и кишечнике;

✓ кофейная органическая кислота – оказывает выраженное антибактериальное и противовоспалительное действие и усиливает выделение желчи и других пищеварительных соков;

✓ дубильные вещества — уничтожают болезнетворные бактерии, ускоряют заживление и оказывают противовоспалительное действие;

✓ провитамин А, витамины С, Е и К – эти витамины необходимы для нормального функционирования системы иммунитета, они участвуют во всех обменных процессах, ускоряют регенерацию клеток и обладают антиоксидантным действием; минералы – кальций, магний, калий, железо, медь, цинк.

2.3. Сушка растительного сырья

Лекарственное сырье сразу после сбора необходимо как можно быстрее сушить, так как в нем содержится большое количество влаги. Так, листья, трава и цветы содержат до 80 – 85%, сочные плоды до 96%, а корни и корневища до 46 – 65% влаги. При такой влажности растительное сырье под воздействием ферментов, имеющих в растениях, и температуры, возникающей в результате самосогревания уплотненного сырья, быстро подвергается порче. Для сушки растительное сырье сразу же после сбора рассыпают тонким слоем так, чтобы на один квадратный метр приходилось

не более 1 – 2 кг сырья. Чтобы оно сохло быстрее и не согревалось, его чаще переворачивают. Рассыпать растения необходимо на какой-нибудь чистой подстилке. Лучше всего лекарственное сырье сушить в хорошо проветриваемых помещениях].

Характер сушки зависит от вида сырья и содержания в нем действующих веществ. Сырье, имеющее в своем составе гликозиды (гореццвет, ландыш, полынь, наперстянка), необходимо сушить при температуре 50 – 60°C, при которой быстро прекращается деятельность ферментов, разрушающих гликозиды.

Все виды лекарственного сырья лучше сушить под открытым навесом, где имеется хорошая вентиляция и на сырье не падают прямые солнечные лучи, а также в закрытых помещениях с вентиляцией.

Самым «сберегающим» служит способ глубокого замораживания и высушивания в вакууме. Полученный таким способом растительный материал далее пригоден к длительному хранению. В тех случаях, когда основная цель исследования состоит в точной количественной оценке содержания флавоноидов, целесообразно применять быстрое замораживание растительного материала жидким азотом сразу после его сбора.

В промышленных масштабах процессу сушки сырья в производстве фитопрепаратов уделяется большое внимание. Технология этого процесса строго регламентирована .

2.4.Метод определения влажности лекарственного растительного сырья

Определение влажности растительного сырья производится согласно ГОСТ 24027.2-80 «Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных веществ, эфирного масла». Основан данный метод на определении потери в массе за счет

гигроскопической влаги и летучих веществ при высушивании сырья до абсолютно сухого состояния.

Оборудование, материалы и реактивы:

- шкаф сушильный лабораторный;
- весы лабораторные;
- весы аналитические;
- эксикатор;
- тигли;
- щипцы тигельные;
- вазелин технический;
- концентрированная серная кислота.

1) Подготовка к испытанию.

Берут две навески (аналитические пробы) сырья массой по 3-5 г (точная навеска), взвешенные с погрешностью не более 0.01 г. Каждую навеску помещают в предварительно взвешенный и пронумерованный тигель.

2) Проведение анализа.

В сушильный шкаф, нагретый до 100-105°C, быстро помещают подготовленные тигли с навесками. При этом температура в шкафу падает. Время, в течение которого сырье должно сушиться, отсчитывается с момента, когда температура в шкафу достигает 100-105°C. Высушивание проводят до постоянной массы.

Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 мин высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышает 0.01 г.

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле (2.1).

$$X = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m} \quad (2.1)$$

где, m – масса сырья до высушивания, г;

m_1 – масса сырья после высушивания, г.

Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0.5%.

2.5.Выбор оптимальных условий выделения флавоноидов из плодов боярышника

Выбор соотношения этанол – вода, сырье – экстрагент, времени, температуры и кратности экстракции проводился следующим образом:

✓ соотношение этанол : вода.

Навески по 5,00 г исходных растительных образцов экстрагировали 100 мл водного раствора этанола с массовой долей спирта 10, 20, 30, 40, 50, 60 минут при постоянном перемешивании на перемешивающем устройстве при температуре 40 °С .

✓ соотношение сырье : экстрагент.

Навески по 5,00 г растительных образцов экстрагировали 40 – 70 % этанола (таблица 8) в соотношении сырье : экстрагент: 1:10; 1:25; 1:50; 1:100 при постоянном перемешивании при температуре 70 °С в течение 4 ч;

✓ время экстракции.

Навески по 5,00 г образцов экстрагировали 150 – 250 мл 40 – 70 % этанола (таблица 8) при постоянном перемешивании и температуре 70 °С в течение: 30; 60; 90; 120; 240 минут;

✓ температура процесса.

Навески по 5,00 г растительных образцов экстрагировали 150 – 250 мл 40 – 70% этанола при различных температурных режимах : 20 °С; 40 °С; 55 °С; 65 °С; 100 °С; 130 °С;

✓ кратность экстракции.

Навески по 5,00 г растительных образцов помещали в колбы вместимостью 500 мл, приливали 150 – 250 мл 40 – 70 % этанола, и нагревали при 65 – 100 °С в течение 30 минут. Экстракцию повторяли дважды в тех же условиях 150 – 250 мл 40 – 70 % этанола в течение 30 минут при втором контакте фаз и 60 – 120 мин – при третьем (таблица 1).

Таблица 1

Условия экстракции флавоноидов из исходных растительных объектов

Название растительного объекта	Массовая доля этанола, ω (%)	Объем экстрагента, V (мл)	Время экстракции, t (мин)	Температура экстракции, T °С
Плоды бояршника	40	150	30 мин	100

2.6. Количественное определение суммы флавоноидов в полученных экстрактах

Экстракты, полученные при различных условиях, фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента), измеряли их объем. Аликвоты (5 мл) анализируемых экстрактов помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, добавляли по 2 мл 5 % спиртового раствора хлорида алюминия и доводили до метки 70 % этанолом. В качестве раствора сравнения использовали раствор анализируемого экстракта разведенного в 5 раз. Измеряли оптическую плотность через 30 мин при $\lambda = 405$ нм ($\epsilon = 609,8$) в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Для построения градуировочного графика, в мерные колбы емкостью 25 мл вносили по 2 мл 5 % спиртового раствора хлорида алюминия и следующие объемы стандартного раствора рутина с концентрацией 0,1 мг/мл: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 7,5 мл (объемы измеряли пипетками на 1 и 10

мл с погрешностью 0,01 и 0,1 мл). Содержимое колб доводили до метки 70 % этанолом. Оптическую плотность измеряли через 30 минут при $\lambda=405$ нм ($\epsilon=609,8$) в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм [Любанова, Будаева, Сакович, 2004; Бубенчикова, Кондратова, 2006; Ломбоева, Танхаева, Оленников, 2008; Выбор оптимальных условий..., 2008; Чирикова, Оленников, Танхаева, 2009; Исследование качественного и количественного..., 2009].

Градуировочный график зависимости оптической плотности (А) от содержания рутина в растворе (С) имеет вид прямой линии, проходящей через начало координат (приложение Б1).

Массовую долю флавоноидов в пересчете на рутин и сухое сырье в процентах (X, %) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1}{1000 \cdot V_2 \cdot m} \cdot \frac{100}{100 - W} \cdot 100, \quad (3)$$

C – содержание рутина в анализируемой аликвоте экстракта, определенное по градуировочному графику, мг/25 мл;

V₁ – объем экстракта, измеренный после экстракции, мл;

V₂ – объем аликвоты, мл;

m – масса навески растительного сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

2.7. Методы отбора проб

Метод отбора проб плодов боярышника кроваво-красного производится согласно ГОСТ 24027.0-80 «Правила приемки и методы отбора проб».

1) Подготовка к отбору проб.

Попавшие в выборку единицы продукции вскрывают и, путем внешнего осмотра, определяют:

- однородность сырья по способу подготовки (цельное, измельченное, прессованное и т.д.), цвету, запаху и засоренности;
- наличие плесени, гнили, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании; засоренность ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет грызунов и птиц и т.д.).

2) Измельчение.

Сырье измельчают в фарфоровой ступке до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм.

3) Отбор аналитических проб для определения влажности и содержания флавоноидов.

Аналитические пробы определяют методом квартования. Для этого сырье помещают на гладкую, чистую, ровную поверхность, перемешивают, разравнивают, по возможности тонким, равномерным по толщине слоем в виде квадрата, и по диагонали делят на четыре треугольника. Два противоположных треугольника удаляют, а два оставшихся соединяют, осторожно перемешивают, разравнивают в виде квадрата, вновь делят по диагонали и удаляют следующие два треугольника. Так повторяют до тех пор, пока в двух противоположных треугольниках не останется количество сырья, соответствующее массе аналитической пробы (5 г).

Аналитические пробы должны быть отобраны с погрешностью не более 0.01г[22].

2.8. Методика количественного определения суммы флавоноидов в растительном сырье спектрофотометрическим методом

При оценке качества растительного сырья и фитопрепаратов, содержащих флавоноиды, наибольшее распространение получил

спектрофотометрический метод анализа, основанный на использовании реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом. Фотометрический метод определения без предварительного разделения компонентов основан на аддитивности значений оптической плотности всех компонентов смеси при одной длине волны. Метод достаточно прост в исполнении, является высокочувствительным и относительно недорогим, что делает его предпочтительным для использования в контрольно-аналитических лабораториях. Использование такого метода позволяет определить сумму флавоноидов в присутствии других полифенольных соединений, не образующих комплекса с алюминием хлорида в среде 30-96% спирта.

В качестве стандарта используется тот флавоноид (рутин, кверцетин, гесперетин и т.д.), максимум поглощения комплекса которого наиболее соответствует максимуму поглощения комплекса с хлоридом алюминия исследуемого образца.

В диссертационной работе в качестве стандарта использовался ГСО рутина и ГСО кверцетина, так как максимумы поглощения комплексов с хлоридом алюминия рутина/кверцетина и экстракта боярышника, наблюдаются при наиболее близких значениях длин волн.

Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре СФ 46 в интервале длин волн 408-616 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Оборудование, материалы и реактивы:

- мерная колба объемом 100 см^3 – 1 шт.;
- мерные колбы объемом 25 см^3 – 6 шт.;
- пипетки объемом 1 см^3 – 3 шт.;
- пипетки объемом 5 см^3 – 1 шт.;
- мерный цилиндр объемом 100 см^3 ;
- часы;
- кюветы на 10 мм;

- спектрофотометр ПЭ-5300В;
- экстракт боярышника;
- алюминия хлорид 5%;
- спирт этиловый 70%;
- спирт этиловый 95%.

2.9. Подготовка к анализу

1) Приготовление 5%-го раствора алюминия хлорида

5 г алюминия хлорида х.ч. или ч.д.а. (ГОСТ 3759-75) растворяют в 50 мл 95% спирта в мерной колбе на 100 мл, доводят объём раствора этим же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 месяца.

Для анализа было приготовлено 250 мл 5% раствора алюминия хлорида в 40% спирте.

2) Приготовление 40%-го этилового спирта

Для приготовления 1 л 40% этилового спирта смешивают 380 г этилового спирта 95% и 620 г воды. В объемных единицах 95% этилового спирта – 855 см³, воды – 325 см³. После приготовления раствора проверяют его плотность или объемную долю спирта ареометром (ГОСТ 3639-79).

3) Приготовление экстрактов

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0.5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта этилового. Колбу взвешивают с погрешностью ± 0.01 г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают в термостате при температуре 60°C в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу вновь взвешивают и доводят до первоначальной массы 40% спиртом этиловым. Содержимое колбы фильтруют через воронку диаметром 7 см с вложенным ватным тампоном, отбрасывая первые 20 мл фильтрата.

2.10. Проведение спектрофотометрического анализа

В мерную колбу вместимостью 25 мл, предварительно взвешенную, переносят с помощью пипетки аликвоту анализируемого экстракта, равную 1 мл, и вновь взвешивают. В колбу с помощью пипетки добавляют 4 мл 5% раствора хлорида алюминия. Для приготовления раствора сравнения во вторую колбу вместимостью 25 мл с помощью пипетки переносят аликвоту (1 мл) анализируемого экстракта, после чего объем обеих колб доводят до метки 70% спиртом и оставляют на 30 мин. В случае помутнения растворов их фильтруют через бумажные фильтры в чистые стаканы.

Оптическую плотность измеряют в интервале 408-616 нм на длине волны максимума поглощения в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм, в рабочую кювету помещают раствор с добавленным хлоридом алюминия, в кювету сравнения – раствор сравнения. Если максимум поглощения расположен в области 408-420 нм, в качестве стандарта используют ГСО рутин. Если максимум поглощения расположен в области 421-435 нм, в качестве стандарта используют ГСО кверцетин[24].

Массовую долю суммы Р-активных флавоноидов в исследуемых экстрактах в пересчете на рутин в мг/ 100г (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{c \cdot F_p \cdot 10^5}{M}$$

где, c – количество рутина в анализируемой аликвоте экстракта, соответствующее измеренной оптической плотности по калибровочному графику, г/25 см³;

F_p – фактор разбавления;

10^5 – коэффициент пересчета в мг/100г;

M – масса экстракта, г.

2.11. Экстрагирование флавоноидов из растительного сырья

Следующим этапом при изучении состава и получения лекарственных средств заключается в извлечении (экстрагировании) флавоноидов, к которому также предъявляются требования соблюдения сохранности нативного состава веществ.

Для флавоноидных гликозидов подходящими экстрагентами являются спиртосодержащие смеси: метанол – вода (70:30) и чаще этанол – вода с разным соотношением компонентов. Спиртосодержащие экстрагенты выполняют еще и важную роль ингибирования ферментных систем растений и тем самым способствуют сохранению нативности состава.

Для агликонов, как для менее полярных соединений, можно применить и такие экстрагенты, как этилацетат и диэтиловый эфир.

Для количественного анализа процедуру извлечения повторяют дважды или трижды (до максимального «истощения» экстрагируемого материала). Если растительный материал (листья, трава и т. п.) обогащен хлорофиллом, то для освобождения от него проводят преэкстракцию неполярным растворителем (хлороформом, диэтиловым эфиром). Или же обрабатывают этими растворителями уже полученные экстракты, как правило, после практически полного удаления из них спирта.

Для флавоноидов, как и для других веществ, не существует способа выделения, универсального для всех растительных материалов. В каждом конкретном случае прибегают к наиболее подходящему методу или сочетанию методов, с учётом в основном свойств веществ и особенностей растительного сырья. Наиболее часто используются избирательная экстракция, осаждение с помощью солей тяжёлых металлов и хроматографические методы .

III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Определение влажности

Для определения влажности проводили два параллельных определения на содержание влаги в растительном сырье по методике, указанной в п. 2.2. Для этого берут по две точные навески (около 5 г) каждой пробы. Отбор проб производился согласно ГОСТ 24027.0-80 «Правила приемки и метода отбора проб». В сушильном шкафу при температуре 100-105⁰С навески были доведены до постоянной массы. После проведения испытаний и расчетов, указанных в п. 2.2. получены следующие результаты, приведенные в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Содержание влаги в пробах лекарственного растительного сырья

№ пробы	Масса пробы до высушивания	Масса пробы после высушивания	Содержание влаги, %	Среднее значение содержания влаги, %
Навеска 1				
Навеска 2	5.0137	4.5976	8.30	8.40
	5.0073	4.5817	8.50	

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что во навескв плодов боярышника влаги соответствует ГФ 11.

3.2. Выбор оптимальных условий экстракции флавоноидов из плодов боярышника

Для практического применения того или иного сырья при получении биологически активных соединений необходимо оценить их содержание в исследуемых объектах.

Для объективной оценки большую роль играет выбор способа экстракции, который должен отвечать следующим критериям:

- выделение максимально возможного количества целевых соединений;
- экономическая целесообразность;
- минимальное содержание балластных веществ;
- использование для целей выделения соединений и растворителей, не представляющих серьезной опасности окружающей среде;
- возможность осуществления контроля за процессом.

Для экстракции флавоноидов и других биологически активных соединений из растительного сырья обычно качестве экстрагента используют водные растворы, низших спиртов: этанола или метанола [Исследование химического состава...., 2003; Optimal recovery..., 2005; Flavonoids of the aerial part of *Centaurea pullata*...., 2005; Flavonoids of *Serratula cichoracea*...., 2007; Kurkin, Sharova, 2007; Louaar, 2007; Flavonoids from *Chrysanthemum fuscatum*, 2007; Flavonol glycosides..., 2007; Flavonoids aglicones from *Centaurea sphaerocephala*, 2008; Анисимова, Куркин, Ежков, 2010; Флавоноиды листьев.....,2012].

В ходе разработки методики экспериментально, с после следующей статистической обработкой результатов, было изучено влияние различных условий экстрагирования сырья на выход флавоноидов: концентрация экстрагента, соотношение сырья и экстрагента, время экстракции, кратность экстракции акции [Бубенчикова, Кондратова, 2006; Шарова, Куркин, 2007; Евдокимова, 2007; Мещерякова, Пупыкина, Закиева, 2008; Исследование

фенольных...., 2009; Чириков, Оленников, Танхаева, 2009; Анисимова, Куркин, Ежков, 2010].

Оптимальным экстрагентом с точки зрения быстроты и полноты извлечения определяемой нами вещества являются водно-спиртовые смеси. Были получены извлечения с использованием водно-спиртовых смесей следующих концентраций: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 95%.

Наиболее полное выделение целевых веществ из исходного сырья достигается при экстракции 40% и 70 %-ым раствором этанола. Флавоноиды из плодов бояршника извлекаются практически в равных количествах, как 40 % так и 70 %-ым раствором этанола. По-видимому, использование в качестве экстрагента 40%-ного раствора этанола, экономически более выгодно.

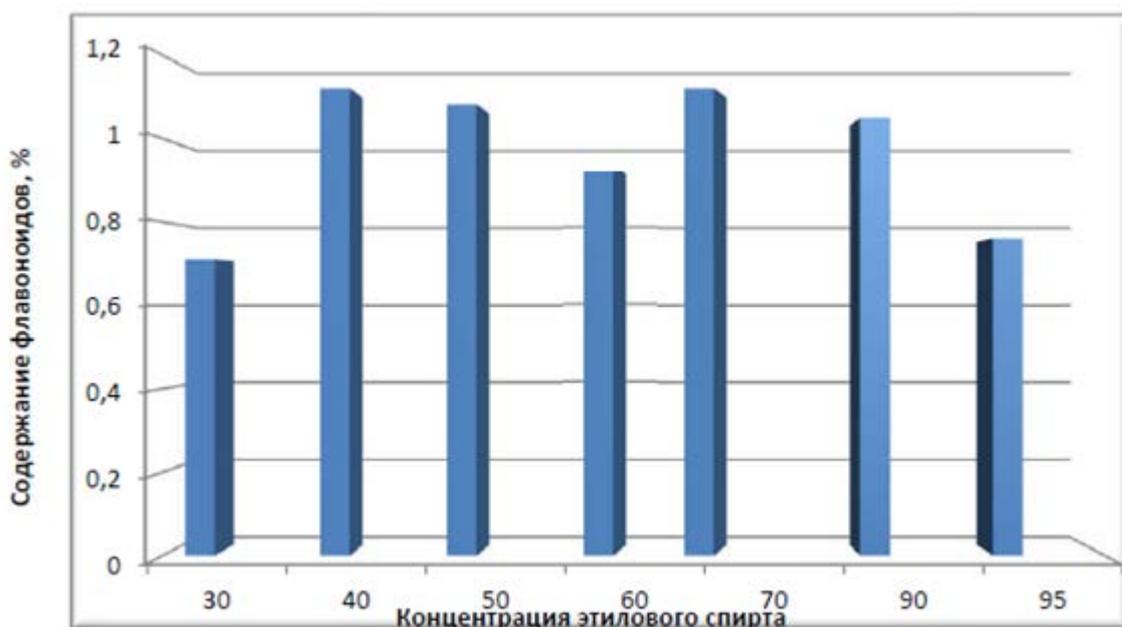


Рисунок 3.2.1. -Содержание флавоноидов в извлечениях в зависимости от концентрации этилового спирта, %.

Максимальное извлечение флавоноидов из сырья достигается двукратной экстракцией на кипящей водяной бане с обратным

холодильником в течение 30 мин (дальнейшее увеличение времени экстракции не приводило к увеличению выхода флавоноидов).

3.2.1. Исследования влияния соотношения сырья и экстрагента на эффективность извлечения флавоноидов

При определении соотношения сырья и экстрагента были использованы различные соотношения 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100. Получились следующие результаты в соответствии с рисунком 3.2.1.1.

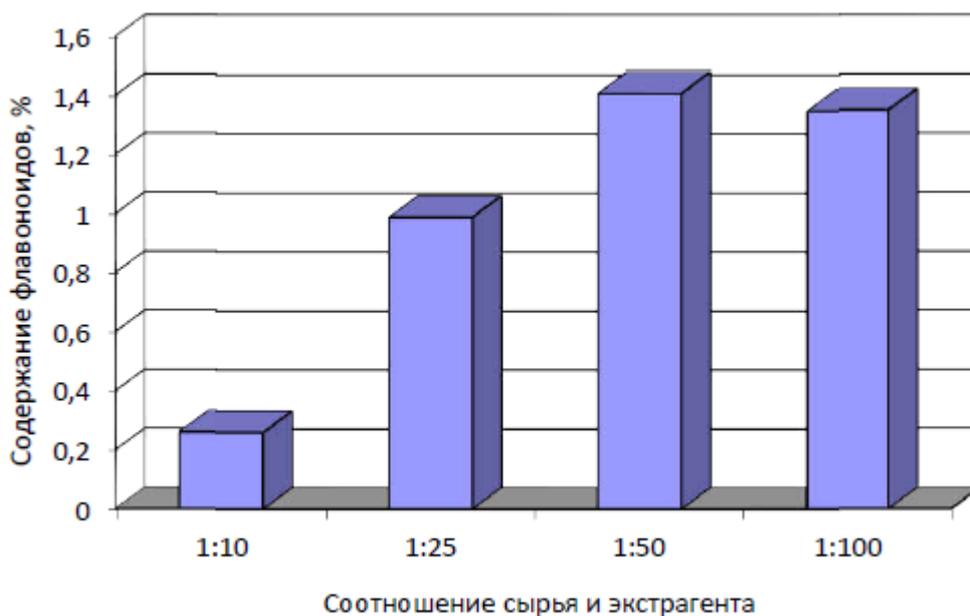


Рисунок 3.2.1.1. -Содержание флавоноидов в зависимости от соотношения сырья и экстрагента.

Как видно из рисунка максимальное извлечение флавоноидов из сырья достигается при соотношении сырье:экстрагент 1:50.

3.2.2. Исследование влияния продолжительности экстракции на эффективность извлечения флавоноидов

Экстракция лекарственного растительного сырья представляет собой процесс перехода веществ из сырья в раствор по закону диффузии. При этом

количество извлекаемых веществ прямо пропорционально времени экстракции. Проводить извлечение до полного выравнивания концентраций нецелесообразно, поэтому необходимо определить время, за которое определяемые вещества максимально извлекаются из сырья и кратность экстракции (рисунки 3.2.2.1.).

С целью определения технологически обоснованной продолжительности процесса экстракцию проводили при комнатной температуре в течение 10, 20, 30, 40 и 50 минут. В полученных извлечениях определяли содержание фенольных веществ.

Оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 30 минут. Полученные результаты представлены на рисунке 3.2.1.1.

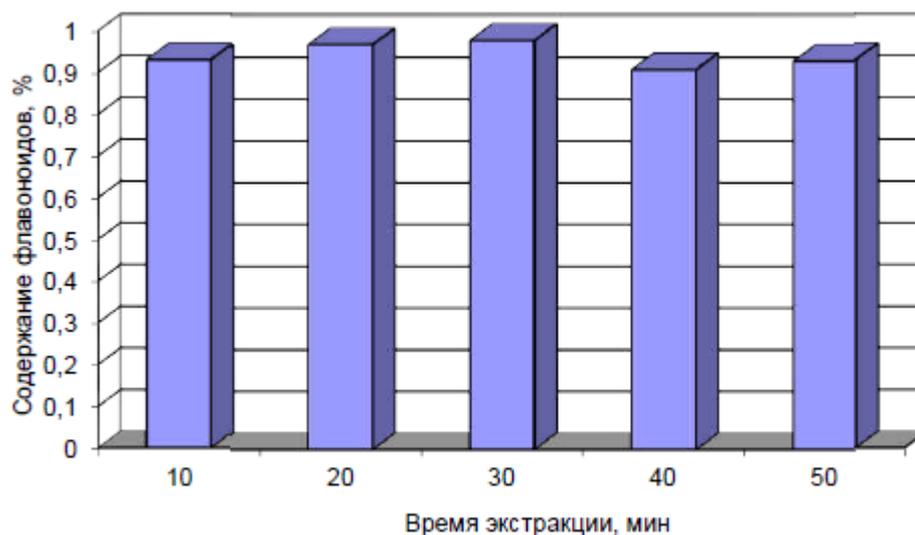


Рисунок 3.2.2.1. -Содержание флавоноидов в зависимости от времени экстракции.

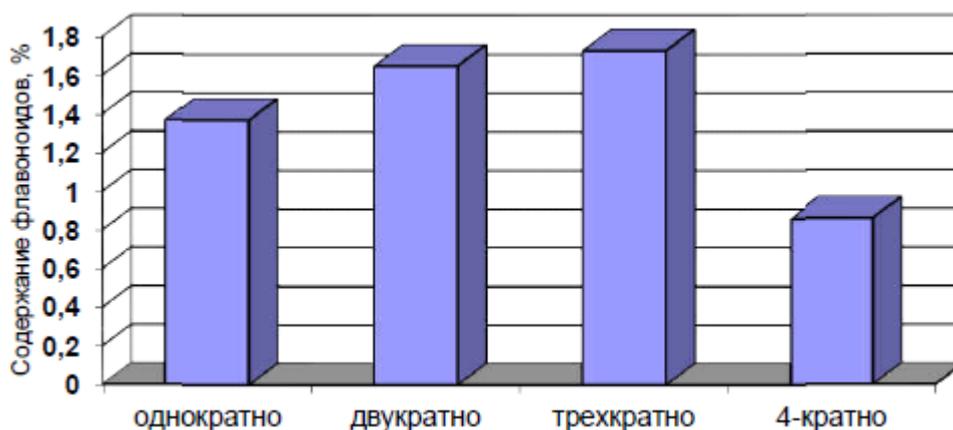


Рисунок 3.2.2.2.-Содержание флавоноидов в зависимости от кратности экстракции.

Были установлены также параметры комплексообразования концентрация и количество спиртового раствора алюминия хлорида, время образования и устойчивость комплекса (рисунки 3.2.2.3, 3.2.2. 4.).



Рисунок 3.2.2.3.-Содержание флавоноидов в зависимости от концентрации комплексобразователя.

Согласно полученным данным, оптимальной является концентрация комплексобразователя спиртового раствора алюминия хлорида – 5%.



Рисунок 3.2.2.4. -Содержание флавоноидов в зависимости от количества добавляемого комплексообразователя - раствора алюминия хлорида.

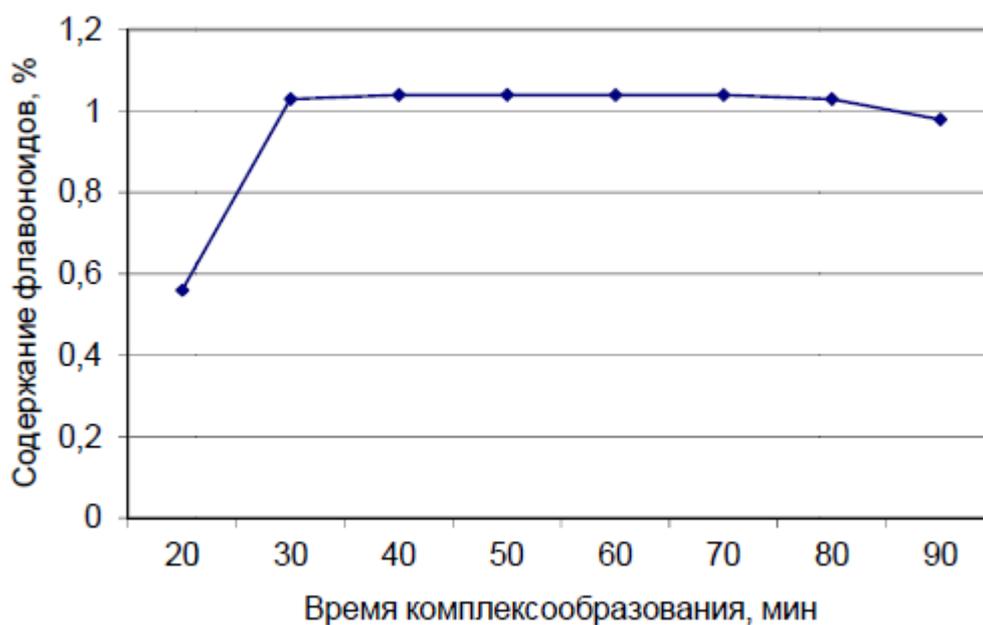


Рисунок 3.2.2.5. -Содержание флавоноидов в зависимости от времени образования комплекса.

На основании данных рисунков 3.2.2.3., 3.2.2.4. и 3.2.2.5. можно сделать вывод, что оптимальным является добавление 2 мл комплексообразователя–5% спиртового раствора Cl_3 , время образования комплекса составляет 30 мин и

его стабильность сохраняется -1,5 часа. Объем аликвоты определялся, исходя из полученных значений оптической плотности. Оптимальным является использование 4 мл полученного извлечения (раствора А).

3.2.3. Изучение влияния измельченности плодов боярышника на экстракции флавоноидов

Далее было исследовано влияние измельченности сырья на содержание флавоноидов.

Для установления полноты экстракции флавоноидов из плодов боярышника изучали влияние степени измельченности сырья. При выборе степени измельченности плодов боярышника использовали частицы сырья, проходящие через сито с диаметром отверстий 0,2; 0,5; 1; и 2 мм (рис. 3.2.3.1). Показано, что максимальное извлечение флавоноидов из плодов боярышника достигается при измельчении сырья до размера частиц 0,5 мм.

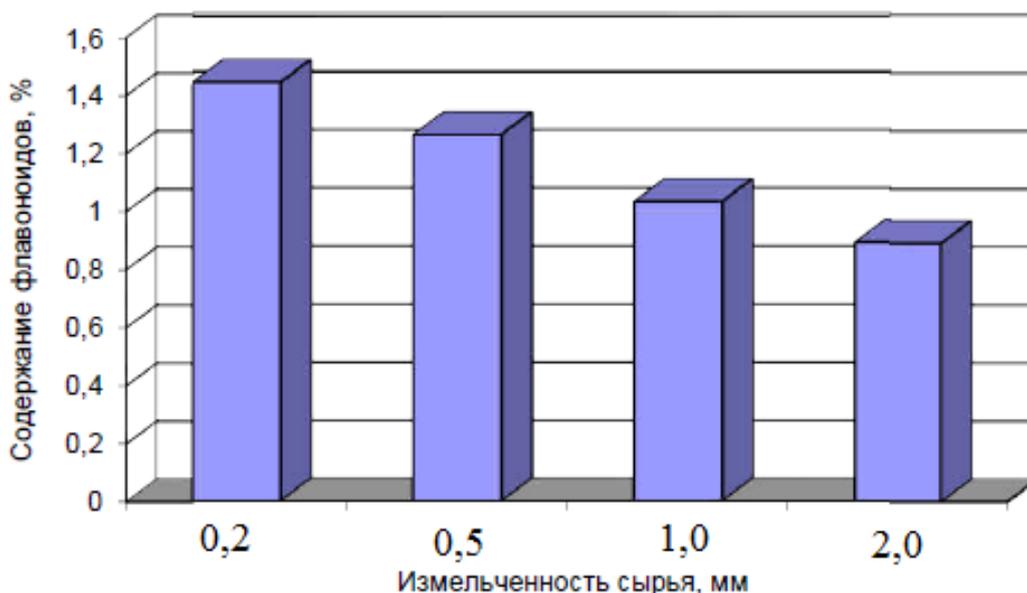


Рисунок 3.2.3.1-Содержание флавоноидов в плодах боярышника зависимости от измельченности сырья.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что наибольший выход флавоноидов достигается при использовании в качестве

экстрагента 40% этилового спирта, при соотношении сырья и экстрагента 1:50. В отношении кратности экстракции – мы получили близкие по значениям результаты двукратной и трехкратной экстракции (1,65 и 1,73 соотв соответственно), но отдали предпочтение двукратной экстракции по причине отсутствия в номенклатуре мерной посуды на 150 мл. Время достижения равновесной концентрации при экстрагировании флавоноидов из сырья составляет 30 мин нут. Экстракция происходит достоверно полнее при измельчении сырья до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Оптимальная концентрация комплексообразователя -5%. Количество 5% спиртового раствора алюминия миния хлорида, обеспечивающее полноту образования комплекса, составляет 2 мл. Реакция комплексообразования развивается в течение 30 минут и следующие п полтора часа комплекс сохраняет стабильность.

3.3. Качественный анализ флавоноидов плодов боярышника

Качественный состав флавоноидов мы исследовали, используя спиртовое (70% этанол) извлечение из плодов боярышника. Присутствие флавоноидов определяли по качественным реакциям [Бандюкова, 1965; Максютин, 1968]:

- цианидиновая реакция или проба Shinoda - флавонолы, флавононы и флавоны (агликоны и гликозиды) дают красное или оранжево-красное окрашивание .

- с 1 % водным раствором хлорида железа (III) флавоноиды образуют буро-зеленое окрашивание;

- с 10 % водным раствором натрия гидроксида в присутствии флавоноидов появляется желтое окрашивание [Кочкаров, 1997];

- с раствором ацетата свинца основного орто-гидроксильную группировка флавоноидов образуют желтый осадок.

Положительные результаты выше перечисленных реакций свидетельствуют о наличии флавоноидов в образцах плодов боярышника.

Обнаружение флавоноидов мы проводили также методом тонкослойной хроматографии [Бандюкова, 1973;] в системе растворителей:

- 1) вода - уксусная кислота - бутанол (2:1:4),
- 2) аммиак - метанол - хлороформ (0,5:2:8),
- 3) 30% уксусная кислота.

Для проявления флавоноидов использовали специальные хромогенные реактивы: аммиак, спиртовой раствор щелочи, раствор хлористого алюминия и др. До и после обработки реактивами хроматограммы рассматривали в УФ-свете. В результате также было установлено, что исследуемый образец сырья плодов боярышника содержит флавоноиды.

Таблица 3.3.

Качественный хроматографический анализ флавоноидов плодов боярышника

Система	Окраска пятна при обработке						Идентификация
	Rf	УФ-св	+NH ₃	+AlCl ₃	NaO	FeCl ₃	
					Н		
1	2	3	4	5	6	7	8
БУВ (4:1:2)	0,3	зелен.- желт.	ярко желт.	Желт.	Ярко- желт.	бурая	Кверцетин
БУВ (4:1:2)	0,78	желт.	ярко желт	Желт.	Ярко- желт	бурая	Гиперозид

Эффективность экстракции оценивали по количеству выделенных флавоноидов. Содержание флавоноидов в экстрактах определяли методом дифференциальной спектрофотометрии [Андреева, Калинкина, 2000; Лобанова, Будаева, Сакович, 2000; Ангаскиева, 2006; Бубенчикова, Кондратова, 2006; Зиэп Т.Т. Нго, Жохова, 2007; Евдокимова, 2007; Ломбоева, Танхаева, Оленников, 2008; Мещерякова, Пупыкина, Закиева, 2008; Чириков, Оленников, Танхаева, 2009; Анисимова, Куркин, Ежков, 2011; Куркина, 2011].

Определение основано на способности флавоноидов образовывать окрашенный комплекс, со спиртовым раствором хлорида алюминия, который дает основной максимум поглощения для плодов бояршника $\lambda_{\text{max}}=405$ нм, а для стандартных образцов ГСО рутина – 405 нм, кверцетина и лютеолина – 430 нм. Спектры поглощения исследуемых экстрактов имеют близкие максимумы поглощения к спектру комплекса рутина с алюминием, поэтому этот флавоноид выбран нами качестве стандартного образца. Использование веществ. качестве раствора сравнения испытуемого экстракта без комплексообразователя позволяет исключить влияние окрашенных и других сопутствующих веществ.

3.4. Количественное определение суммы флавоноидов в растительном сырье спектрофотометрическим методом при оптимальных условиях экстрагирования

В ходе исследования было выявлено, что наиболее полное извлечение определяемых веществ достигалось с использованием 40%-го спирта этилового, временем экстрагирования 30 мин. и при температуре проведения эксперимента 70°C. При определении количественного содержания флавоноидов лекарственного растительного сырья в пересчете на рутин,

были получены данные, представленные в таблице 3.3. Эксперимент проводился согласно методике, представленной в п. 2.2.3.

Таблица 3.3 – Содержание флавоноидов в пересчете на рутин в растительном сырье

Наименование экстракта	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, мг/мл
Экстракт плодов боярышника	0.0020

Использование в качестве контроля испытуемого раствора без реактива позволяет исключить влияние окрашенных и других сопутствующих веществ на результаты определения .

Для установления устойчивой окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после приготовления в течение 1 часа. Согласно литературным данным, для получения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента 2 % спиртового раствора алюминия хлорида в соотношении экстракт- комплексообразователь 1:1. В ходе исследований установили, что максимальная оптическая плотность достигается через 30 минут после добавления реактива.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБТС – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоная кислота)

АОА – антиоксидантная активность

БАВ – биологически активные вещества

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

БАВ – биологически активные вещества

ДДМ – диско-диффузионный метод

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РВ – редуцирующие вещества

СВ – сухие вещества

ФВ – фенольные вещества

ВЫВОДЫ

Флавоноиды исключительно многогранны. В равной мере они интересны как объекты изучения в ботанике, фармакогнозии, фитохимии и особенно в фармации и медицине.

В магистерской диссертационной работе флавоноиды главным образом изучены с точки зрения химических позиций. А именно рассмотрены особенности строения и физико-химические свойства биофлавоноидов, представлены современные методы идентификации, выделения и разделения флавоноидов.

1. При приготовлении экстракта из плодов боярышника наиболее значительно на химические свойства и антиоксидантные показатели влияют стадии сушки сырья, кроме того сушка позволяет увеличить сроки сырья, а также повысить содержание фенольных веществ и флавоноидов;
2. Оптимальным экстрагентом флавоноидов являются водно-спиртовые смеси. Были получены извлечения с использованием водно-спиртовых смесей следующих концентраций: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 95%. Наиболее полное выделение целевых веществ из исходного сырья достигается при экстракции 40% и 70 %-ым раствором этанола. Флавоноиды из плодов боярышника извлекаются практически в равных количествах, как 40 % так и 70 %-ым раствором этанола. Использование в качестве экстрагента 40%-ного раствора этанола, экономически более выгодно.
3. Максимальное извлечение флавоноидов из сырья достигается трехкратной экстракцией в течение 30 мин (дальнейшее увеличение времени экстракции не приводило к увеличению выхода флавоноидов).
4. При определении соотношения сырья и экстрагента были использованы различные соотношения 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100. Максимальное извлечение флавоноидов из сырья достигается при соотношении сырье:экстрагент 1:50

5. Определена технологическая обоснованная продолжительность процесса экстракции, проведенной при комнатной температуре в течение 10, 20, 30, 40 и 50 минут. При определении содержания флавоноидов установлена оптимальное время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 30 минут.
6. Определена технологически обоснованная температура экстракции для плодов боярышника составляет 70°C. Дальнейшее повышение температуры не способствует увеличению полноты экстракции и, согласно литературным данным, вызывает разрушение биологически активных веществ (полифенолов). Поэтому повышение температуры в данном случае нецелесообразно;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ангаскиева, А.С. Фармакологическое исследование серпухи венценосной культивируемой в Сибири: автореф. дисс ...канд. фарм.наук: 15.00.02/ Ангаскиева Аюна Сыреновна. – Томск, 2006. – 19с.
1. Анисимова, М.М. Качественный и количественный анализ флавоноидов травы гречихи посевной /М.М. Анисимова, В.А. Куркин, В.Н. Ежков//Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – Т. 12, № 1(8). – С.
2. Бандюкова, В.А, А.Л. Шинкаренко. Качественный анализ флавоноидов в растительном материале при помощи хроматографии на бумаге: метод. Рекомендации ,. - Пятигорск, 1972. - 21 с.
3. Бандюкова, В.А. Применение цветных реакций для обнаружения флавоноидов путем хроматографии на бумаге / В.А. Бандюкова // Раст. ресурсы. - 1965. - Т.1. - Вып.4. - С. 591-596
4. Беликов, В.Г. Фармацевтическая химия: учебник для высш. шк. / В.Г.Беликов – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 624 с.
5. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер. – М.: Наука, 2002
6. Ботиров, Э.Х., А.В. Дренин, А.В. Макарова Химическое исследование флавоноидов лекарственных и пищевых растений//Химия растительного сырья. – 2006. – № 1. – С. 45 – 48.
7. Ванг Инг. Состояние процесса производства и разработка стратегий в отношении продуктов из гречихи в Китае/ Ванг Инг, Чен Дзя, Фенг Ибаили//Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2010. – № 4(25). – С. 9 – 14.
8. Ведерников, Д.Н. Экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth. (Betulaceae).

9. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений/ В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук.–Новосибирск:Наука, 1990.– 333с.
10. Глинкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений: изд 2-ое, перераб. и дополн./ Н.И. Глинкевич, Л.Н. Софрович. – М.: Высшая школа, 1983. – 176с.
11. Гришина, Е.И. Фармакогнозия: электронное учебное пособие/ Е.И. Гришина, И.С. Погодин, Е.А. 2008.–1067с.
12. Групповой состав фенольных соединений, извлекаемых из плодовых оболочек гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench)/ Э.Р. Каримова, Э.Т. Ямансарова, О.С. Куковинец, М.И. Абдуллин// Вестник Башкирского университета : Серия Химия. – 2011. – Т.16, № 4. – С. 1167 – 1169.
13. Дренин, А.А. Флавоноиды и изофлавоноиды трех видов растений родов *Trifolium* L. и *Vicia* L.: автореф. дисс ...канд. хим. наук/ Дренин Алексей Анатольевич. –Сургут, 2008. – 24с.
14. Зенков Н.К. и др. Фенольные биоантиоксиданты. Новосибирск: Изд-во СО РАМН, 2003. 328 с
15. Иванов Л.В. // Хим.-фармацевт. журн. 1992. №2. С. 20-23
16. Изучение масс – спектрометрического поведения природных флавоноидных гликонов, продуктов их исчерпывающего метилирования и тридейтерометилирования/ Г.П. Кононенко, С.А. Поправко, Б.В. Розынов, В.Г. Заикин, Н.С. Вульфсон// Биоорганическая химия.–1980.– Т. 6, № 2. – С. 267 – 280. Ведерников и В.И. Роцин [2011]
17. Исследование качественного и количественного состава густого экстракта первоцвета лекарственного /Г.М. Латыпова, З.Р. Романова, В.Н. Бубенчикова, Г.В. Аюпова// Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 113 – 116.

18. Исследование химического состава серпухи венценосной культивируемой в Сибири/ А.С. Ангаскиева, В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина, Е.Н. Сальникова, Е.А.Бородышена, Т.Г. Харина//Химия растительного сырья. – 2003. – № 4. – С. 47– 50
19. Каримов, А. Флавоноиды *Scutellaria haematoclora* Juz. и *S. ocellata* Juz./А. Каримов, М.П. Юлдашев, Э.Х. Ботиров//Химия растительного сырья. – 2012. – №3. – С. 101 – 105.
20. Колхир В.К. // Тез. докл. Междунар. конгр. "Фитофарм- 2003". Пушкин, 2003. С. 540-544
21. Коноплева, М.М. Фармакогнозия: природные биологически активные вещества/ М.М. Коноплева. – Витебск: ВГМУ, 2002. – 210с.
22. Корулькин Д.Ю. Природные флавоноиды. Новосибирск, 2007
23. Костюк В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Мн.: БГУ, 2004. 179 с
24. Коцупий, О.В. Изменчивость состава и содержания флавоноидов *Astragalus membranaceus* (Fischer) Bunge из Восточной Сибири / О.В. Коцупий// Сибирский ботанический вестник [электронный журнал]. – 2007. – Т. 1, Вып. 2. –С. 69 – 78.
25. Кочкаров, В.И. Фармакогностическое изучение некоторых представителей семейства Яснотковые: дис. ... канд. фармац. наук / - Курск, 1997.
26. Кудринская, В.А., С.Г. Дмитриенко, Ю.А. Зотов Спектрофотометрическое определение флавоноидов пореакции азосочетания с тетрафторборатом 4–нитрофенилдиазония // Вестник Московского университета.– 2010. – Т. 51, № 4. – С. 296 – 301
27. Максютин, Н.П. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений / Н.П. Максютин, В.И. Литвиненко // Фенольные соединения и их физиологические функции. - М., 1968. - С. 7-26.
28. Малахова, О.В. Метод неводного титрования в определении биологически активных флавоноидов/ О.В. Малахова, Э.Р. Ишкенов,

- М.К. Наурызбаев//Тезисы докладов VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2004». – Новосибирск, 2004. – Т. 2 – С. 193.
- 29.Мальцевой и др. [Пат. 2475724 Российская Федерация...., 2013]
- 30.Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002
- 31.Получение сухого экстракта из корней девясила высокого и изучение его химического состава /С.А. Матасова, Н.А. Митина, Г.Л. Рыжова, Д.О. Жуганов, К.А. Дычко // Химия растительного сырья. – 1999. – № 2. – С. 119 – 123.
- 32.Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. М.: Медицина, 1988. 247 с.
- 33.Сиротский, Е.Е. Выделение и анализ природных биологически активных веществ/ Е.Е. Сиротский. – Томск: 1987. – 184 с.
- 34.Состав сесквитерпеновых диолов, триолов, флавоноидов/ Д.Н. Ведерников, В.И. Роцин// Химия растительного сырья. – 2011. – № 1. – С. 111–118.Дренин, 2008.
- 35.Сравнительное исследование Melissa лекарственной и шалфея лекарственнойна содержание полифенолов/ Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Н.И. Понамарева, С.В.Рябинин// Вестник ВГУ. – 2009. – № 2. – С. 49 – 53.
- 36.Тюкавкина НА. и др. // Вопр. питания. 1996. №2. С. 33-38
- 37.Федосеева, Г.М. В.М. Мирович, Е.Г. Горячкина Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды: методическое пособие для фармакогнозии/ – Иркутск: 2009. – 67с.
- 38.Флавоноиды и терпеноиды цветков лаванды колосовой/ Мохаммед Ламрини,В.А. Куркин, П.Г. Мизина, М.В. Беляева, Ю.И. Арутюнов, Л.А. Онучак //Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 65 – 68.
- 39.Химия растительного сырья №4. – 2007. – 73-77 с.
- 40.Хушбактова З.А. // Химия природ. соединений. 1995. С. 350-356

41. Шарова, О.В. Флавоноиды цветков календулы лекарственной// Химия растительного сырья. – 2007. – № 1. – С.
42. Шинкаренко, А.Л. Использование цианидиновой реакции в анализе флавоноидов / А.Л. Шинкаренко, А.В. Симонян, Э.Т. Оганесян // Съезд фармацевтов УССР (2: 1972, Киев): Тез. докл.... - Киев, 1972, - С. 795-796.
43. Шинкаренко, А.Л. Методы исследования природных флавоноидов / А.Л. Шинкаренко, В.А. Бандюкова, А.Л. Казаков. – Пятигорск, 1977.
44. Юй, У. Фенольные соединения кроны дерева сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.): дис...канд. хим. наук: 05.21.03/ У Юй.–Спб.: 2006.– 149с.
45. Яковлева, Г.П. Лекарственное сырье животного и растительного происхождения. Фармакогнозия./ Г.П. Яковлева – Спб.: Спецлит, 2006. – 845с.
46. Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis* / A. Nacer, A. Bernard, J. Boustie, R. Touzani, Z. Kabouche// Chemistry of Natural Compounds. – 2006. – Vol. 42, № 2. –P. 230.
47. Cos P., Mizuno T., Becker G. // *Planta Med.* 2001. V. 67. P. 515-519
48. Dietrych – Szostak, D. Flavonoids in Hulls of Different Varieties of buckwheat and their antioxidant activity/ D. Dietrych –Szostak// Proceedings of the 9th International Symposium on buckwheat. – Prague, 2004. – P. 621 – 625.
49. Flavonoids from *Chrysanthemum fuscatum*/S. Ameddah, H. Dendougui, A. Menad, R. Mekkiou, Z. Meraihi, S. Benayache, F. Benayache//Chemistry of Natural Compounds. – 2007. –Vol. 43, № 2. – P. 210 – 211.
50. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity / L. Aliouche, H. Zater, D. Zama, A. Bentamene, R. Seghiri, R. Mekkiou, S. Benayache, F.

- Benayache // Chemistry of Nature Compounds. – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 618 – 619. Kurkin, Sharova, 2007.
51. Flavonoids of the aerial part of *Centaurea pullata* / K. Medjroubi, S. Mezhoud, F. Benayache, E. Seguin, F. Tillequin // Chemistry of Natural Compounds. – 2005. – Vol. 41, № 2. – P. 226 – 227.
52. Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities / S. Akkal, F. Benayache, K. Medjroubi, F. Tillequin // Chemistry of Natural Compounds. – 2007. – Vol. 43, № 3. – P. 319 – 320.
53. Flavonol glucoside in total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* / H. Jianlin, L. Ke, J. Xue – hua // West China Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2008. – Issues 3.- P. 298 – 300.
54. Jian – lin, H. Identification and content determination of β -sitosterol- β -D-
55. Kurkin, V.A. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers / V.A. Kurkin, O.V. Sharova // Chemistry of Natural Compounds. – 2007. – Vol. 43, № 2. – P. 216 – 217.
56. Louaar, S. Flavonoids of *Retama sphaerocarpa* leaves and their antimicrobial activities / S. Louaar // Chemistry of Natural Compounds. – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 616.
57. Man H.H., Kroonig G.F. // Phytochemistry. 2002. N 6. P. 487-491
58. Molnar-Perl, Chromatographic capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids / I. Molnar-Perl, Zs. Fuzfai // Journal of Chromatography A. – 2005. – Vol. 1073. – P. 201 – 227.
59. Nolvachai, Y. GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends / Y. Nolvachai, P.J. Marriott // Journal of Separation Science. – 2013. – Vol. 36, Issue 1. – P. 20–36.
60. Optimal recovery of high – purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction,

- fractionation and recrystallization / Kyoung Heon Kim, Ki Won Lee, Dong Young Kim, Hyang Hwan 2005
61. Phenolic compounds from *Centaurea Africana*/R. Seghiri, R. Mekkiou, O. Boumata, S. Benayache, J. Bermijo, F. Benayache// *Chemistry of Natural Compounds*. – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 610 – 611.
62. *Serratula tintoria*, a source of natural dye: Flavonoid pattern and histolocalization / P. Guinot, A. Gargadenec, P. La Fisca, A. Fruchier, C. Andary, L. Mondolot//*Industrial Crops and Products*. – 2009. – Vol. 29. – P. 320 – 325.
63. Shahat A.A., Reezah B.S., Bottar R. T // *Phytochemistry*. 2002. № 6. P. 539-542
64. Stéphane Quideau etc. // *Plant Polyphenols: Chemical, Biological Activities, and Synthesis; Angewandte Chemie Int. Ed.*, 50, 586-621; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011
65. Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice
66. Tutelyan V.A. // *Abstr. Intern. Congr. "Phytopharm-2004"*. Mikke1i. Finland, 2004. P.595-602
67. Wu J.B., Cheng Y.D., Su L.L., Kim S.T. // *Phytochemistry*. 1997. V. 45(8). P. 1727-1728

