

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

Факультети Фармацевтик химия
 кафедраси Бойта пайерлов йўналиши 1/2 гурухи

Тасдиқлайман
 Кафедра муdiri В.Н. Абдушариев
 2004 йил « 14 » июль

БИТИРУВ МАЛАКАВИЙ ИШИ БЎЙИЧА ТОПШИРИК

Талаба Колматов Бобур Мусурман ўғли
 (фамилияси, исми, шарифи)

1. Битирув ишининг мавзуси Семаетат суюқ эстракти таркибидан флавоноидларни ўрганиш.

№ й. « 14 » июльда кафедра мажлисида маъқулланган.

2. Битирув иши топшириш муддати 21.05.14

3. Битирув ишни бажаришга доир бошлангич маълумотлар Илмий адабиётлар, фармакопелар, интернет сайтлари, анциклопедия, оммабоп журналлар, илмий мақолалар.

4. Ҳисоблаш-тушунтириш ёзувларининг таркиби (ишлаб чиқиладиган масалалар рўйхати) Суюқ эстракт таркибидан флавоноидларни аниқлаш ва физик химий таҳлил усулларини ўрганиш. НДСХ усулини ишлаб чиқиш. Маҳаллий ҳон тухта тўви ўсимликлар қавида маълумот йиғиш. Англич тилда, бундай тилда ва икки ўйим газанда ўсимликларини аниқлаш ва илмий таркибини адабиётлардан ўрганиш.

5. Чизма ишлар рўйхати (чизмалар номини кўрсатилади) Англич тилда ва икки ўйим газанда ўсимликларини расмлари. Спирт ширкорини газ суюқлик хроматограмиаси. Флавоноидларни НДСХ қосматограмиаси. Флавоноидларни СР ва НДСХ расмлари.

6. Битирув иши бўйича маслаҳатчи(лар):

№	Бўлим мавзуси	Маслаҳатчи ўқитувчи ф.и.ш.	Имзо, сана	
			топширик берилди	топширик бажарилди
1	Гемостат суюқ ажраткич ни амалиёт ва сон курсаткичларини амал- гай.	Дош; Шодмонова Ш.	15.01.14.	Шош
2	Флобакоидларни ингиби ва шиддорий тахлил усулларини ийлаб чиқиш.	кал. ўн Юсуфходжаева А.А.	23.03.14	Юсуф

7. Битирув ишини бажариш режаси

№	Битирув иши босқичларининг номи	Бажариш муддати (сана)	Текшируадан ўтганлик белгиси
1	мавзу юзасидан адабиёт маълумотларни тузатиш.	25.09.14	9.09.13
2	Флобакоидларни ингиби- торларнинг тахлил усул- ларини ийлаб чиқиш.	15.01.14	24.04.14
3	Флобакоидларни шид- дорий тахлил усул- ларини ийлаб чиқиш.	25.01.14	29.05.14

Битирув иши раҳбари

Юсуфходжаева Нодира Абдулқалимовна (имзо)

(фамилияси, исми, шарифи)

Топшириқни бажаришга олдим

Уломинов Бобур Муҳаммад ўғли (имзо)

(фамилияси, исми, шарифи)

Топшириқ берилган сана 2014 йил

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава I. Обзор литературы.....	
1. Местные и культивируемые растения с кровоостанавливающим действием.....	5
2. Химический состав и применение трав горца перечного, горца птичьего и листьев крапивы.....	8
3. Методы качественного и количественного анализа флавоноидов.....	15
4. Современное состояние стандартизации флавоноидов в составе фитопрепаратов.....	22
Выводы.....	
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
1. Получения жидкого экстракта «Гемостат».....	26
2. Определение цифровых показателей качества жидкого экстракта «ГЕМОСТАТ»	26
3. Разработка методов идентификации жидкого экстракта «ГЕМОСТАТ»	31
4. Разработка количественного определения суммы флавоноидов в жидком экстракте «ГЕМОСТАТ» методом СФ	32
5. Разработка количественного определения флавоноидов методом ВЭЖХ в жидком экстракте «ГЕМОСТАТ»	35
Выводы.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	44

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Одной из важнейших задач при создании эффективных, доступных, импортозамещающих лекарственных препаратов на основе растительного сырья является разработка методов контроля качества и их стандартизация.

Стандартизация лекарственных средств растительного происхождения немного затруднена в связи с содержанием в них большого количества сложных по структуре биологически активных соединений. Для решения этого вопроса необходимо проведение комплекса фитохимических исследований по выявлению веществ, доминирующих не только в количественном отношении, но и определяющих терапевтический эффект препаратов и исходного сырья.

Разработка современных инструментальных методов оценки качества по действующим веществам жидких многокомпонентных растительных лекарственных форм и их стандартизация даст возможность оценить и повысить качество выпускаемой продукции, контролировать технологические процессы производства и обосновать сроки годности.

В нашей Республике огромное внимание уделяется изучению местных растений для получения лекарственных препаратов. В Постановлении Президента Республики Узбекистан «О программе модернизации, технического и технологического перевооружения предприятий фармацевтической отрасли на период до 2011 года» от 19.11.2007г. одной из важнейших задач считается внедрение в производство новых для Республики лекарственных препаратов из собственного сырья всех видов. При этом основной упор делается на те виды продукции, внедрение которых в производство не потребует больших затрат времени и средств и уже в ближайшем будущем позволит полностью снять потребность в их импорте.

Особая ценность исследования биологически активных веществ местного вида горцев перечного и птичьего в том, что пути биосинтеза

растений зависят от почвенно-климатических условий произрастания, и можно ожидать появление новых ранее необнаруженных веществ.

В связи с этим, выявление основного действующего вещества или группы соединений в лекарственном растительном сырье и его лекарственной форме, разработка на их основе научно-обоснованных методов контроля качества является неотъемлемой частью стандартизации лекарственных средств.

Целью настоящей работы является изучения флавоноидов в жидком экстракте «Гемостат» состоящего из местного сырья горцев птичьего, перечного и листьев крапивы двудомной.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать жидкий экстракт на основе горцев перечного птичьего и крапивы двудомной;
- установить показатели подлинности жидкого экстракта;
- разработать методику количественного определения флавоноидов методом спектрофотометрии в жидком экстракте «Гемостат»;
- разработать методику количественного определения флавоноидов методом ВЭЖХ в жидком экстракте «Гемостат»;
- обосновать нормативные показатели качества экстракта;

1. Местные и культивируемые лекарственные растения с кровоостанавливающим действием

Растения используются в медицинских целях в течение многих столетий. В древних текстах Аюрведа, Гиппократов, Теофраста, Галена, Абу Али ибн Сины обобщен огромный опыт использования лекарственных растений и препаратов, созданных на их основе, для лечения разных заболеваний. Из числа официальных лекарственных средств на долю лекарств, получаемых из растений, приходится около 40%. Лекарственные растения, как правило, не обладают токсичностью, поэтому они охотно употребляются с лечебной целью, так как не вызывают побочных действий [1,2,3].

По литературным данным [4], биохимическое воздействие многих растений способствует улучшению самочувствия человека, усиливает сопротивляемость к неблагоприятным условиям среды, влияет на работу сердца, мозга и на нервную систему, а также на деятельность других органов.

В связи с тем, что диссертационная работа посвящена разработке методов контроля качества лекарственных форм с кровоостанавливающим действием, полученных из местного растительного сырья, целесообразно было привести в обзоре литературы данные о местных и культивируемых растениях с гемостатическим действием, произрастающих на территории Узбекистана, которые представлены ниже [1,3].

Х.Х.Халматовым и др. авторами проведено фитохимическое изучение ряда местных лекарственных растений, содержащих флавоноиды и витамин К₁.

Была изучена недотрога мелкоцветная (*Impatiens parviflora* DC.) сем бальзаминовые (Balsaminaceae). В траве растения найдены флавоновые гликозиды (0,43%), алкалоиды (0,016%), витамин С и следы каротина. Трава недотроги используется как кровоостанавливающее средство [1,4,5].

Подорожник ланцетолистный (*Plantago lanceolata* L.) сем. подорожниковые (*Plantaginaceae*). В листьях обнаружены гликозид аукубин, дубильные вещества, витамины С, К, каротин. Его листья применяются как отхаркивающее и кровоостанавливающее средство [3].

Лагохилус опьяняющий (*Lagohilus inebrians* Vge) сем. яснотковые (*Lamiaceae*). В химическом составе содержит спирт лагохилин, эфирное масло, дубильные и смолистые вещества, большое количество экстрактивных веществ, кальций, магний, 20 различных микроэлементов, каротин, витамины С, К, органические кислоты. Препараты лагохилуса опьяняющего применяются при травматических, поносовых, лёгочных, геморроидальных кровотечениях [4].

Императа цилиндрическая (*Imperata cylindrica*) сем. злаковые (*Gramineae*). Содержит витамин К, крахмал, сахар (до 13%) с преобладанием сахарозы и глюкозы, каротин. Корневища содержат также яблочную, лимонную, щавелевую и винную кислоты. Отвар из корневища используют при кровотечениях, в частности, маточных, а также как мочегонное и отхаркивающее средство.

Кукуруза (*Zea mays* L.) сем. злаковые (*Gramineae*). Содержит витамин К₁, жирное и эфирное масла, смолистые вещества (1,2%), сапонины, аскорбиновую и пантотеновую кислоты, инозит, витамины группы В и др. компоненты. Из рылец выделено антигеморрагическое вещество – витамин К₃. Растение также применяется как кровоостанавливающее средство [1,4].

Журавельник цикутовый (*Erodium cicutarium* L.) сем. гераниевые (*Geraniaceae*). Трава содержит горечи, смолы, дубильные вещества, ацетилхолин, каротин, сахара (4,9%), витамин С, витамин К (0,64%).

В настоящее время отвар травы рекомендуется при внутренних и маточных кровотечениях [1].

Тысячелистник Биберштейна (*Achillea Biebersteini* Afan) сем. астровые (*Asteraceae*). Трава содержит эфирное масло, сумму алкалоидов, сумму гликозидов (0,068%), дубильные вещества, витамин С и К. Отвар из

травы используется в народной медицине при внутренних и наружных кровотечениях, кровоточащих ранах.

Многие растения рода *Scutellaria* L (сем. *Lamiaceae*) используются в народной и научной медицине. Их высокая активность обусловлена наличием флавоноидов. Род *Scutellaria* представлен около 360 видами, из них в Узбекистане произрастают 32. М.П.Юлдашевым изучены флавоноиды шлемника глазкового (*Scutellaria ocelata* Juz) и шлемника котовниковидного (*Scutellaria nepetoides* M.Pop). Методом колоночной хроматографии выделены семь индивидуальных флавоноидов, идентифицированных с ороксилином А, вогонином, апигенином, 3,7,4-тригидроксифлавоном, цинарозидом, байкалином и вогонозидом. Из корней шлемника котовниковидного (*Scutellaria nepetoides*) выделены: апигенин -7-О-в—D-глюкуронид, норвогонозид и skutellarin, а также новый флавоноид непетозид, А-норвогонин -7-О-в—D-галактуронид [6,7,8].

Яснотка белая (глухая крапива) *Lamium album* L. сем. яснотковые (*Lamiaceae*). Венчиков яснотки содержат до 10% дубильных веществ, сапонины, аскорбиновую кислоту, 0,012-0,005% алкалоидов, флавоноиды (изокверцитрин, кверцетин, кемпферол, астрагалин, кверцетрин и др.), хлорогеновую и галловую кислоты, холин, гистамин, тирамин и другие вещества [1,3]. В народной медицине отвар, настойка, настой и порошок венчиков яснотки белой используются как отхаркивающее, кровоостанавливающее и вяжущее средство. Отвар листьев используется как кровоостанавливающее при кровавом поносе.

Как видно из литературных данных, приведённых выше, растения с кровоостанавливающим действием содержат в своём составе чаще всего витамин K_1 и флавоноиды. Поэтому в литературном обзоре диссертационной работы нами были приведены данные по витамину K_1 и флавоноидам, а также существующие методы их качественного и количественного анализа, которые представлены в следующей главе.

2. Химический состав и применение трав горца перечного и горца птичьего

Одним из широко распространённых лекарственных растений с кровоостанавливающим действием являются растения семейства гречишных.

Виды горца – горец почечуйный, горец змеиный, горец красивый, горец перечный, горец птичий- это одно- и многолетние травянистые растения семейства гречишных (*Polygonaceae*).

Горец перечный (водяной перец) – *Polygonum hydropiper L.*

Горец перечный – однолетнее травянистое растение. Его лекарственным сырьём являются трава, которое содержит 2-2,5% флавоноидов, до 3,4% смол, 0,14% суммы гликозидов, горькие вещества, 3,5-8,23% дубильных веществ, эфирное масло, 0,5% органических кислот (муравьиная, уксусная, валериановая, галловая, яблочная и полигоновая кислоты), гликозид полигопиперин, витамины К₁ (0,76 мг%), С (до 200 мг%), Е, D, каротин (до 42,35 мг%), ситостерин, 7,4% сахара, микроэлементы. В зависимости от места и условий произрастания лекарственные растения отличаются по химическому составу.

По литературным данным, в траве горца перечного, произрастающего на территории России, найдены два флавоногликозида. Гликозиды были извлечены этилацетатом и разделены хроматографированием на бумаге со смесью бутанол - ледяная уксусная кислоты- вода (4:1:5). Один из них идентифицирован как кверцетин-3 рамнозид, а второй – гиперозид [9].

Учёными Валентин и Вагнер при исследовании горца перечного выделены: рамногликозид - рутин, агликон кверцетин, 0,005% камфорного масла и 3,8% дубильных веществ, относящихся к ряду катехина и танина [10].

Авторами Хёрхаммер Ханзель из воздушно-сухого растения *Polygonum hydropiper L.*, экстрагируя эфиром и метанолом, выделен эфир рамнацина, который идентифицирован хроматографическим и

спектрохроматографическим методами [11].

Водяной перец – старинное популярное народное средство. Еще Ибн Сино применял его для рассасывания твердых опухолей, застарелых кровоподтеков, прикладывая к ним толченую свежую траву. В народной медицине траву используют как кровоостанавливающее (при внутренних, маточных и геморроидальных кровотечениях), как болеутоляющее, ранозаживляющее средство, а также при малярии, поносе и других заболеваниях.

Водяной перец является официальным лекарственным сырьем научной медицины. Его препараты (жидкий экстракт, настой, трава в составе чаев-сборов) назначают в качестве кровоостанавливающего средства при маточных кровотечениях, а также при геморрое [1,3,4].

Горец птичий (спорыш, птичья гречиха) – *Polygonum aviculare* L.

Горец птичий – однолетнее травянистое растение. Содержит дубильные вещества, флавоноиды, эфирное масло, 4,7-4,9 мг% каротина, 57-450 мг% витамина С, витамин К₁, 2,65% сахаров, кремневую кислоту, в том числе и её растворимую форму, сапонины, кумарины, слизи, антрахиноновые гликозиды и другие вещества.

Авторами были изучены флавоноиды горца птичьего, при этом были обнаружены такие флавоноиды, как кверцетин, авикулярин и ранее неизвестный 5,7,3',4'-тетраокси-3-(0- \square -L-рамнопиранозил) флавоон (кверцитрин). Колоночной хроматографией на силикагеле с использованием в качестве растворителей бензол, смесь бензола и хлороформа и хлороформ выделен умбелиферон и скополетин [12,13].

А.И.Яковлев, П.И.Чурилов проводили исследования по выделению и химическому изучению водорастворимых полисахаридов из травы горца птичьего. Они экстрагировали траву горячей водой и растворами электролитов при различных температурах. Для определения качественного углеводного состава полисахариды подвергали гидролизу одно нормальной серной кислотой. Бумажная хроматография выполнена на бумаге FN-11 в

системах: бутанол-1-пиридин-вода (6:4:3) и этилацетат-муравьиная кислота-уксусная кислота-вода (18:1:4:3). Проведенные химические исследования показывают, что полисахаридный комплекс содержит галактуроновую кислоту и арабинозу в качестве основных компонентов [14,15].

Настой из травы в медицине применяется при болезнях печени, почек, мочевого пузыря и в качестве маточного кровоостанавливающего средства.

Галеновые препараты спорыша уменьшают проницаемость стенок сосудов, снижают давление и углубляют дыхание. Ванну из травы рекомендуют при лишаях и сыпях у детей, а свежую траву прикладывают к опухолям, ранам и язвам как ранозаживляющее средство.

Крапива двудомная «*Urtica dioica* L.»

Семейство крапивные — URTICACEAE.

Крапива - многолетнее травянистое жгучее растение с длинным ползучим корневищем. Стебель крапивы прямостоячий, высотой до 120 см, с супротивно сидячими яйцевидно-лопастными черешковыми листьями длиной 8—17 см. Цветки крапивы мелкие, зеленые, собраны в колосовидные повисающие соцветия. Плод — яйцевидный или эллиптический, желтовато-серого цвета, орешек 1,2—1,5 мм длины. Стебель и листья крапивы покрыты жгучими волосками, которые при соприкосновении с кожей человека и животного вонзаются в нее и выделяют жидкость (муравьиную кислоту), вызывающую сильное раздражение. Цветет крапива с июня до сентября.



Распространение: крапива двудомная растет повсеместно в Европейской части России, на Кавказе и в Западной Сибири, встречается в Восточной Сибири, на Дальнем Востоке и в Средней Азии.

Крапива растет в сорных местах, на пустырях, около жилья, в кустарниках, в оврагах.

Химический состав крапивы двудомной: содержит витамины, дубильные, флавоновые, алкалоидоподобные вещества, фитонциды, холин, муравьиную кислоту и микроэлементы — хром, железо, марганец, алюминий, ванадий и др. Большое содержание витаминов (аскорбиновой, пантотеновой кислот, каротина и витамина К), а также гликозида уртицина и дубильных веществ обуславливает многогранность фармакотерапевтического действия.

Применение крапивы двудомной: В медицине листья крапивы применяются в качестве кожнораздражающего, витаминосодержащего и кровоостанавливающего средства при легочных, геморроидальных и маточных кровотечениях.

Как кровоостанавливающее средство крапиву употребляют в виде настоя (15—20 г на стакан воды, принимать по столовой ложке 3—4 раза в день) или экстракта (по 30—40 капель на прием).

Установлено, что настой крапивы действует подобно спорынье, увеличивая сокращение матки.

Крапива входит в состав препарата аллохола, рекомендуемого при острых и хронических заболеваниях печени и желчных путей, при хронических запорах и желчнокаменной болезни.

В Румынии употребляют мазь, содержащую 10—20%-ный экстракт листьев крапивы, при некоторых устойчивых к антибиотикам болезнях, вызываемых золотистым гемолитическим стафилококком.

В народной медицине траву крапивы используют внутрь при подагре и ревматизме, болезнях почек и мочевого пузыря (почечные колики и песок в мочевом пузыре), при водянке, болезнях печени и желчного пузыря, против туберкулеза легких, при геморрое, нарушении обмена веществ, дизентерии и наружно — против крапивной лихорадки и как средство, укрепляющее волосы. В старинных травниках крапива упоминается как противораковое средство. Благодаря присутствию фитонцидов крапива оказывает бактерицидное действие. Отвар корней и корневищ крапивы рекомендуют пить как кровоочистительное средство при угрях, кожных сыпях, фурункулах, глистных инвазиях. Водный настой цветков крапивы — как отхаркивающее при кашле, бронхитах.

Крепкий настой из листьев крапивы идет для промывания ран, при язвах и ожогах, обмывания и протирания при угрях, лишаях, перхоти, выпадении волос. Сок свежих листьев крапивы закапывают в нос при кровотечениях.

Вениками из предварительно ошпаренной крапивы парятся в банях при болях в пояснице и суставном ревматизме. Порошком из сухих листьев крапивы присыпают гнойники и язвы.

Способы приготовления и использования

1. Свежий сок листьев пьют по 1 чайной ложке 3 раза в день при кровохарканье, носовых, геморроидальных и маточных кровотечениях.

2. Настой из цветков и листьев (50—60 г на 1 л кипятка) назначают внутрь при малярии, недостаточном выделении мочи, хронических кожных болезнях, высыпаниях на коже, фурункулезе, кожном зуде по 1 стакану 3 раза в день.

3. При дизентерии настой из листьев крапивы жгучей и ежевики (по 1 чайной ложке на 1,5 стакана кипятка, заваривают в течение 2 ч в духовке) принимают внутрь в течение всего дня (дневная доза).

Многие виды крапивы были изучены учеными некоторых стран.

Химические компоненты *Urtica dioica*, произрастающей в Грузии были изучены авторами Н.Ш. Кавтарадзе, М.Д. Алания и Дж.Н. Анели. Они изучили надземную и подземную часть крапивы двудомной собранной во время массового цветения. В водно-спиртовом экстракте, приготовленном из воздушно-сухого сырья обеих частей, обнаружили стерины, сапонины, аминокислоты, кумарины, азотсодержащие соединения и вещества фенольной природы, а в хлороформном экстракте — стерины и тритерпеновые вещества. Из надземной части растения выделили 6 вещества, а из подземной — 7. Результаты физико-химических методов исследования и данные сравнения с достоверными образцами позволили отождествить их кофейной кислотой (1), рутином (2), кверцетином (3), гиперинном (4), изокверцетрином (5), вещество 6 относится к группе лигнанов а вещество 7 по ИК-спектру идентичен в-ситостерину.

Крапива двудомная (*Urtica dioica* L.) и крапива жгучая (*Urtica urens* L.) применяются в гомеопатии с конца XIX века — при ожогах, крапивнице, мочекаменной болезни итд. Трава и корни крапивы содержат флавоноиды (гликозиды кверцетина, кемпферола и рамнетина), кислоты (кофеил-яблочную, гидроксibenзойную, элаговую, хлорогеновую, яблочную, янтарную, фумаровую и др.), танины, амины (холин, ацетилхолин, бетаин, лецитин, серотонин, гистамин и глюкопротеины), (В-ситостерол, каротиноиды, глюкохиноны, ферменты, пектин (агглютинин), полисахариды, скополетин, витамины группы В, С, К и микроэлементы [2-8].

Авторами К. В. Губин и М. А. Ханина было изучено надземная часть *Urtica cannabina* L.

Методами бумажной и тонкослойной хроматографии определен компонентный состав биологически активных веществ надземной части *Urtica cannabina* L.

Спектрофотометрическим, титриметрическим, гравиметрическим методами определено количественное содержание биологически активных веществ.

По результатам общего фитохимического исследования было установлено, что *U. cannabina* содержит флавоноиды, кумарины, фенолкарбоновые кислоты, полисахариды, дубильные вещества, аскорбиновую кислоту, филлохинон, каротиноиды, хлорофилл. При определении компонентного состава флавоноидов установили 16 веществ, из которых идентифицировали рутин, кверцетин, гиперозид, кверцетина-рамнозид, кумаринов - 5 веществ, из которых идентифицированы эскулин, эскулетин, умбеллиферон, скополетин, герниарин, фенолкарбоновых кислот-7 веществ, из которых идентифицированы феруловая, хлорогеновая, кофейная, транс-коричная, галловая кислоты. При определении их количественного содержания по органам растения и местам сбора установили содержание флавоноидов в пределах от 1,77 до 0,45%, фенолкарбоновых кислот - 1,38-0,47%, кумаринов - 0,89-0,28%, хлорофилла - 0,76-0,15%, каротиноидов 0,57-0,13%. Установлены технологические параметры для получения извлечения из сырья *U. cannabina* наибольшим содержанием БАВ. Доказали, что в качестве сырья *U. Cannabina* необходимо использовать всю надземную часть растения.

В авторских работах Е.С. Лапинская и Я.Ф. Копытько были изучены состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной (*Urtica dioica*.) и крапивы жгучей (*Urtica urens* L.)

Методом ГЖХ-МС исследованы липофильные фракции из настоек гомеопатических матричных (НГМ) *Urtica dioica* L. (I) и *Urtica urens* L.(II), полученных из свежесобранного и высушенного сырья. В составе гексановых

извлечений из НГМ (I) найдено 43 вещества, 27 из которых идентифицированы, из НГМ (II)-28, из них определено 21. В извлечении из НГМ (I) найдены жирные кислоты, содержащиеся в основном в виде этиловых эфиров, терпеноиды (апиол, эвгенол), сквален и другие вещества. Основными жирным кислотами являются пальмитиновая, линоленовая, нонадекановая. В НГМ (I), полученной из высушенного сырья, обнаружены линолевой и бензофурандикарбоновой кислоты этиловые эфиры, не найденные в (II).

В НГМ (I) из свежесобранного сырья больше содержится этиловых эфиров олеиновой, 9-оксононановой, 4-гидрокси-3-метокси- бензойной кислот, 3-этил-4-метил-(1H)-пиррол-2,5-диона, 5,6,7,7a-тетрагидро-2(4H)-бензофуранона и эвгенола. В НГМ (II) в значительных количествах обнаружены пальмитиновая, линолевая и линоленовая кислоты, 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол, причем этиловые эфиры гептадеценовой, арахиновой, 8,11-эйкозодиеновой, генэйкозановой, бегеновой кислот идентифицированы, только в НГМ, полученной из высушенного сырья. Липофильная фракция НГМ корней *Urtica dioica* содержит большие количества линолевой, линоленовой, нонадекановой кислот и их изомеров, а также пальмитиновой, миристиновой, 9-оксононановой и пентадекановой кислот. Количественно идентифицированных компонентов содержится больше в НГМ из свежего сырья, за исключением сквалена, концентрация которого в настойке из высушенного сырья возрастает более чем в 4 раза.

3. Методы качественного и количественного анализа флавоноидов

Существуют различные способы выделения флавоноидов из растительного сырья. Они зависят от характера растительного материала и типа флавоноида. Лучше всего экстракции подвергается воздушно – сухое сырьё. Если же обрабатывается свежесобранное сырьё, то его помещают в кипящий растворитель, чтобы прекратить действие ферментов, которые

могут вызвать гидролиз гликозидов. Флавоноиды растворяются в полярных органических растворителях таких, как этанол, ацетон, этилацетат, метанол и вода. Поэтому флавоноиды экстрагируют из растительного сырья вышеуказанными растворителями или их смесями [31,33,39].

В литературе описано использование адсорбентов: силикагеля, магнезола, целлюлозы, окиси алюминия, полиамида, сефадексов для разделения и очистки самых различных комбинаций флавоноидов. Наиболее часто употребляют силикагель, целлюлозу и полиамид. Спиртовые и водные экстракты обычно содержат, наряду с суммой флавоноидов, большое количество углеводов, фенолов, дубильных веществ и других соединений, которые затрудняют разделение и выделение флавоноидов и их гликозидов. Для этого первичный экстракт подвергают предварительной очистке с целью удаления балластных веществ и разделения экстрактивных веществ на близкие по полярности соединения. Сгущённые спиртовые экстракты разбавляют водой, выпавший осадок отделяют фильтрованием, фильтрат последовательно обрабатывают органическими растворителями в порядке увеличения полярности: петролейным эфиром [29,31] (гексаном, экстракционным бензином), хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом. Большое количество флавоноидов переходит в этилацетатную фракцию. Далее эти фракции разделяются колоночной хроматографией. Следует указать, что выделение флавоноидов и их гликозидов из растительного сырья представляет сложную проблему из-за их плохой растворимости и присутствия в сырье близких по свойствам соединений, наличия в большинстве флавоноидоносных растениях значительного количества сопутствующих веществ.

По литературным данным, существуют способы выделения суммы флавоноидов методом колоночной хроматографии [40,41,42].

В ряде растений сумму флавоноидов получают, экстрагируя растительное сырьё этанолом. Например, из корней шлемника незапятнанного выделены несколько флавоноидов: хризин, вагонин,

астигенин, изоскутеллареин и скутелларин. Водно-спиртовой экстракт последовательно обрабатывают хлороформом, этилацетатом и бутанолом, флавоноиды разделяют методом колоночной хроматографии [8].

В листьях *Astragalus galegiformis* обнаружены также флавоноиды, как астрагалин, флагалозид А, В, С, Д, кемпферол. Экстракт сгущают до водного остатка, очищают хлороформом и исчерпывающе экстрагируют этилацетатом [43]. Причём, в зависимости от содержащихся балластных веществ очистку проводят в 2 стадии. Этот метод является много-стадийным, трудоёмким; при относительно невысоком выходе целевого продукта, наблюдается высокий расход дорогих и дефицитных растворителей.

Известная в настоящее время технология получения суммы флавоноидов с Р- витаминной активностью позволяет выделить из бутонов софоры японской рутин [44,45].

По литературным данным видно, что существуют различные способы выделения флавоноидов и общего метода для всех групп не имеется. При этом выбор метода зависит от различных факторов, которые были приведены выше, и для каждого растительного сырья условия экстракции и очистки выбираются индивидуально. С целью обнаружения флавоноидов из хроматографических методов широко используется хроматография на бумаге (БХ), в тонком слое сорбента (ТСХ) и газожидкостная хроматография (ГЖХ), а в последнее время - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [47,48,49,51].

Большинство флавоноидов на хроматограммах из-за малой концентрации бесцветны или слабо окрашены, поэтому их просматривают в УФ-свете и опрыскивают различными хромогенными реактивами. Используя эти реактивы, можно ориентировочно установить структуру ядер флавоноидов, определить положение гидроксильных групп у C_3 , C_5 , C_7 , C_8 и наличие диоксигруппировки в боковом фенильном радикале [29].

Для качественного анализа флавоноидов чаще всего применяются

следующие пробирочные реакции:

- проба Синода ($Mg+HCl$), позволяющая по продуктам реакции восстановления флавоноидов магнием в соляной кислоте, имеющим различную растворимость в воде и амиловом спирте, отличить агликоны от гликозидов.

- реакция Гиббса (появляется голубая окраска с реактивом при отсутствии свободного гидроксила) [29]

- проба Хёрхаммера (жёлтая окраска указывает на наличие свободного гидроксила у C_3);

- госсипетоновая реакция (красно – коричневая окраска указывает на пара-хиноидный тип строения, наличие свободного гидроксила у C_5 и C_8);

- реакция со стронция хлоридом в аммиаке (возникающие жёлтое, коричневое, зелёное, чёрное окрашивания указывают на наличие ортодифенольной группировки);

- проба с баритовой водой (зелёное окрашивание-5,6,7-триоксигруппировка). Число гидроксильных групп в молекуле подтверждается путём ацетилирования или бензоилированием. Ацетилирование проводится несколькими способами: в пиридине с избытком уксусного ангидрида, с уксусным ангидридом (перхлоратом магния или концентрированной серной кислотой в качестве катализатора) [29,52].

При идентификации флавоноидов, чтобы узнать состав, положение, величину окисных циклов и конфигурацию сахарных остатков используют методы определения разности молекулярных вращений, расщепление стереоспецифическими ферментами, исчерпывающее метилирование ступенчатого гидролиза, периодатное окисление. Метилирование проводят обработкой диметилсульфатом в среде ацетона, йодистым этилом по методу Хакомори.

Одним из основных этапов определения флавоноидов в лекарственных растениях и лекарственных формах является их количественный анализ.

Известно большое число методов количественного определения флавоноидов в сырье и готовой продукции. Существующие методы количественного определения флавоноидов можно разделить на несколько групп. В частности, весовые, флюорометрические, фотозелектрометрические [54,55,56] полярографические, спектрофотометрические и хроматоспектрофото-метрические. Приводится краткое описание и сравнительная оценка существующих методов определения флавоноидов в сырье, субстанции и их лекарственных формах.

Рассмотрены химические методы анализа, одним из которых является титриметрический метод. Данный метод является традиционным в определении флавоноидов. Так, кислотно-основное титрование в неводных средах (диметилформамид) было применено для количественного определения рутина, где в качестве титранта был использован 0,05н. раствор гидрокситетроэтил аммония в смеси бензол-метанол (4:1).

Существует весовой метод определения суммы флавоноидов. Этот метод основан на выделении флавоноидных компонентов из препарата этанолом, очищенным этилацетатом и натрия гидрокарбонатом, растворением в бутаноле и последующим выпариванием растворителя.

Весовой метод, разработанный для количественного определения содержания рутина в субстанции и его лекарственной форме (в таблетках), основан на гидролизе рутина с последующим образованием агликона кверцетина. Метод очень длителен и недостаточно точен, так как примеси других флавоноидов также подвергаются гидролизу; кверцетин, содержащийся в препарате, и образующийся при гидролизе агликон, вносят погрешность. Данный метод применён только для индивидуальных веществ.

Известен полярографический метод, который основан на способности флавоноидов восстанавливаться на ртутно - капельном электроде. Потенциалы ионизации полученных флавоноидов [58] очень мало отличаются друг от друга, поэтому обычно определяют их общее

содержание. Чтобы определить флавоноиды полярографическим методом необходима предварительная очистка их от сопутствующих веществ. Чувствительность метода невелика (2-4мг в 10мл раствора). Для идентификации иногда используют производные рутина. Метод трудно воспроизводим из-за образования таутомерных форм флавоноидов в процессе полярографии.

Метод комплексонометрического титрования основан на осаждении флавоноидов уксуснокислым свинцом в среде метанола. В качестве примера можно привести метод определения кверцетина и гиперозида [59] в субстанции и таблетированных лекарственных формах. Точность определения $\pm 1\%$. Метод применим только для флавоноидов, способных образовывать комплексы со свинцом.

При потенциометрическом методе флавоноиды определяют путём титрования растворами натрия гидроксида в неводных растворителях, в частности гидрокситетразила и тетрабутиламмония с использованием катодополяризационного платинового электрода. Относительная ошибка метода определения составляет $\pm 2\%$. Данный метод мало избирателен, необходим тщательный подбор индикаторного электрода и титранта. Метод зависит от оптимальных условий потенциометрического титрования, а также от кислотно-основных свойств флавоноидов.

Флуорометрический метод основан на способности флавоноидов к комплексообразованию с катионами металлов и борной кислотой. Этот метод чувствителен и требует тщательности при проведении анализа. Данным методом можно идентифицировать все классы флавоноидов.

Известен также способ определения кверцетина в рутине, основанный на реакции с нитритом цинка в среде изоамилового спирта и последующим измерением флуоресценции раствора [60].

Спектрофотометрический метод наиболее часто применяется для анализа флавоноидов. Этот метод основан на интенсивном поглощении в УФ-области спектра с наличием максимумов поглощения, относящихся к

первым (320-380нм) и вторым (240-270 нм) полосам поглощения [56]. Было установлено, что для получения воспроизводимых результатов подходит полоса, в которой менее выражены сольватохромные эффекты. Часто используется метод прямой спектрофотометрии по какому - либо одному флавоноиду или стандартному образцу, чтобы дать характеристику сырью или препарату. Например, известен СФ-метод определения флавоноидов в настойке календулы, где в качестве стандартного образца используют кверцетин. Ошибка метода составляет \square 4,5%.

Количественное определение рутина прямым СФ методом проводят при длине волны 362,5 нм в растворе абсолютного этанола. Этот метод используют как для очищенных препаратов, так и для смесей [61].

В основу спектрофотометрических методов анализа положены также реакции восстановления флавоноидов магнием в кислой среде, комплексообразования с хлоридом алюминия, ионизации с добавкой гидроксида натрия, что приводит к образованию определённых продуктов, т.е. смещению максимума спектра поглощения в видимую область.

При реакциях комплексообразования с солями металлов наблюдается батахромный сдвиг 1-й полосы поглощения флавоноидов на 30-70 нм. В литературе описаны условия комплексообразования с солями металлов Cu, Sn, Pb, Sb, Mg, Zn.

В настоящее время используется метод ВЭЖХ для определения флавоноидов. В качестве элюента использована система растворителей ацетонитрил - вода в объемном соотношении 40:60. Скорость элюирования - 0,5мл/мин [49].

При изучения флавоноидного состава методом ВЭЖХ донника лекарственного выделены и идентифицированы флавоноиды: лютеолин, арбутин, гиперозид, рутин, скополетин, кверцетин [50].

Методом ВЭЖХ на приборе "Gilson" с последующей компьютерной обработкой результатов исследования в чае «Байкальском-7» идентифицированы кверцетин, лютеолин, гесперидин, рутин, гиперозид,

дигидрокверцетин, феруловая кислота, кемферол в качестве неподвижной фазы использованы металлические колонки «Platinum EPS C-18» 100A размером 4,6x250 мм, подвижная фаза - метанол- вода - фосфорная кислота (конц.) в соотношении 40:60:0,5 [51,62].

Для определения качественного и количественного состава полифенольных соединений хмеля использован метод ВЭЖХ. В качестве неподвижной фазы использованы: 150:4,6 мм Zorbax, Eclipse-XDB C-8 (USA), а подвижная фаза - ацетонитрил-метанол -1% водный раствор муравьиной кислоты (35:32:33). Халконы детектируются по УФ-поглощению при длине волны 370 нм, флавононы- при длине волны 290 нм. Флавонолы представлены кверцетином и кемпферолом и их сумма составляет 0,16% [63].

4. Современное состояние стандартизации флавоноидов в составе фитопрепаратов

Отечественной промышленностью на сегодняшний день выпускается много препаратов из растительного сырья в виде настоек и жидких экстрактов. Из настоек, производства ООО «Галеника», нами были изучены «Настойка пустырника», «Настойка боярышника» и «Настойка календулы». При изучении фитопрепаратов основное внимание уделяли условиям экстрагирования, установлению подлинности препаратов, количественному определению БАВ в препаратах.

«Настойка пустырника»

Условия экстрагирования. Настойку пустырника получают из травы пустырника (200 г) экстрагированием 70% этиловым спиртом (до 1 л). Нормативный документ на лекарственное средство – ФС 42 Уз-0045-2011.

Подлинность. Подлинность препарата устанавливается химическими реакциями на иридоиды (ванилин + серная кислота) и флавоноиды (стрептоцид + серная кислота + нитрит натрия).

Количественное определение БАВ устанавливается по флавоноидам. Использован классический метод спектрофотометрии по реакции с раствором алюминия хлорида, в сравнении с рабочим стандартным образцом рутина в аналогичных условиях. Определение ведут на аналитической длине волны – 416 нм. Содержание флавоноидов в настойке должно быть не менее 0,03%, в пересчете на рутин.

«Настойка боярышника»

Условия экстрагирования. Настойку получают из плодов боярышника (100 г) экстрагированием 70% этиловым спиртом (до 1 л). Нормативный документ на лекарственное средство – ФС 42 Уз-0261-2013.

Подлинность. Подлинность лекарственного средства устанавливается по антоцианам, флавоноидам и сахарам.

Наличие антоцианов устанавливают по реакции с хлористоводородной кислотой, в результате которой образуется красное окрашивание. Наличие флавоноидов определяют химической реакцией с магнием и хлористоводородной кислотой, в результате которой наблюдается коричнево-красное окрашивание. Присутствие сахаров устанавливают при помощи реактива Фелинга.

Количественное определение проводится двумя методами.

Метод 1 – определение содержания флавоноидов в пересчете на гиперозид.

Испытание проводят спектрофотометрическим методом по реакции с алюминием хлоридом, в сравнении с раствором стандартного образца при 409 нм. Содержание флавоноидов в настойке должно быть не менее 0,002%, в пересчете на гиперозид.

Метод 2 – определение содержания флавоноидов в пересчете на кверцетин.

Испытание проводят спектрофотометрическим методом в таких же условиях как и предыдущий метод, только при 430 нм, специфической для кверцетина длине волны. В отличие от первого метода, для испытания не применяется стандартный образец, а используется его удельный

показатель поглощения 1% раствора. Содержание флавоноидов в настойке должно быть не менее 0,002%, в пересчете на кверцетин.

«Настойка зверобоя»

Условия экстрагирования. Настойку получают по ФС 42 Уз-0279-2013 из травы зверобоя (200 г) экстрагированием 40% этиловым спиртом (до 1 л).

Подлинность. Подлинность настойки устанавливают по флавоноидам и дубильным веществам.

Наличие флавоноидов устанавливают цветной реакцией с раствором алюминия хлорида, в результате которой образуется зелено-желтое окрашивание.

Наличие дубильных веществ устанавливают по реакции с раствором хлорида железа, в результате которой образуется зелено окрашивание.

Количественное определение флавоноидов проводится спектрофотометрическим методом. Испытание проводится аналогично определению флавоноидов в настойке пустырника, только используется более концентрированный раствор алюминия хлорида – 10%. Длина волны спектрофотометра 415 нм. Параллельно проводится измерение оптической плотности раствора стандартного образца рутин. Содержание флавоноидов в настойке должно быть не менее 0,07%, в пересчете на рутин.

«Настойка календуль»

Условия экстрагирования. Настойку получают по ФС 42 Уз-0153-2013 из цветков ноготков (100 г) экстрагированием 70% этиловым спиртом (до 1 л).

Подлинность. Подлинность препарата устанавливают по флавонам и флавоноидам.

Реакция установления наличия флавонов проводится при помощи реакции с металлическим магнием в присутствии хлористоводородной кислоты, в результате чего наблюдается появление красного окрашивания. Наличие

флавоноидов устанавливается по реакции с серной кислотой, в результате которой наблюдается появление красно-фиолетового окрашивания.

Количественное определение проводится хроматоспектрофотометрическим методом по флавоноидам. Настойку предварительно хроматографируют на силикагеле в системе н-бутанол-уксусная кислота – вода в соотношении 4:1:5. На этой же пластинке параллельно хроматографируют раствор стандартного образца рутина для точного установления R_f рутина в образце препарата. После хроматографирования отмечают зоны соответствующие рутину, вырезают и элюируют 40% этиловым спиртом. У очищенного фильтрованием элюата измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 360 нм. Содержание дигликозида изорамнетина должно быть не менее 0,05%.

II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Получение жидкого экстракта «Гемостат»

Для получения жидкого экстракта горца перечного использовали метод ВНИИФ (1-метод). Измельченного сырья трав горца перечного, птичьего и листьев крапивы в сухом виде загружали в равных количествах в три перколятора. Свежий экстрагент (70% ный спирт) подавали только в первый перколятор в три приема. Вначале заливали сырье в первом перколяторе «до зеркала» и настаивали 24 часа. По истечению срока вытяжку из первого перколятора переносили во второй, а в первый вновь подавали свежий экстрагент «до зеркала». Сырье в обоих перколяторах настаивали 24 часа, после чего вытяжку из второго перколятора переносили на сырье в третий перколятор, во второй переносили вытяжку из первого перколятора, а в первый снова (в третий раз) подавали свежий экстрагент. Загруженные перколяторы оставляли для настаивания на 24 часа. На следующий день из третьего перколятора сливали всю вытяжку, являющуюся готовым продуктом. Из второго перколятора всю вытяжку переносили в третий перколятор. Из первого перколятора вытяжки сливали, сырье выгружали и отжимали. Оба перколятора оставляли на сутки. Затем из третьего перколятора сливали вторую порцию готового продукта. Из второго перколятора полностью сливали вытяжку, сырье выгружали и отжимали. Все извлечения из второго перколятора передавали в третий перколятор и настаивали 24 часа. По истечению этого времени получали третью порцию готового продукта, к которому присоединяли отжим из последнего перколятора. Полученный жидкий экстракт (1 литр в соотношении 1:1) фильтровали через бумажный фильтр [91,92].

2. Определение цифровых показателей качества жидкого экстракта «ГЕМОСТАТ»

В настоящее время по требованиям ГФ XI издания качество жидких экстрактов оценивается по внешнему виду, содержанию спирта (или по плотности), тяжёлых металлов, сухого остатка и микробиологической чистоты [93,94,95,96].

Определение вышеуказанных показателей жидкого экстракта «Гемостат» проводили по методам, приведенным в ГФ XI, результаты которых представлены в таблице 1.

Таблица 1

Качественные и количественные показатели жидкого экстракта «Гемостат»

Исследуемый образец	Внешний вид	Плотность, г/см ³	Сухой остаток не менее, %	Тяжёлые металлы, не более %	Подлинность на флавоноиды	Количество спирта
Жидкий экстракт «Гемостат»	Жидкость зелено-бурого цвета с ароматным запахом, горьковато-вяжущего вкуса	0,9038	14,30	0,001	ТСХ, реакция с FeCl ₃ , тёмно-зелёное окрашивание	69,2

Описание. Жидкость зелено-бурого цвета с ароматным запахом, горьковато-вяжущего вкуса. Допускается образования лёгкой мути при хранении. Допускается образование легкой мути при хранении. Должно соответствовать требованиям ГФ XI вып.2, с.148.

Подлинность. К 5 мл препарата прибавляют несколько капель 5% спиртового раствора железа окисного хлорида, появляется темно-голубое или темно-зеленое окрашивание (флавоноиды).

Тяжелые металлы. К 1 мл препарата прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, осторожно сжигают и прокаливают. Полученный остаток обрабатывают при нагревании 5 мл насыщенного

раствора аммония ацетата. Фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл воды и доводят объем фильтрата до 200 мл. 10 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы (не более 0,01% в препарате (ГФ XI, вып. 1, с. 165).

Плотность. От 0,9091 до 0,9097 г/см³ (ГФ XI, вып. 1, с. 24, метод 1).

Сухой остаток. 5 мл препарата помещают во взвешенный бюкс, выпаривают на водяной бане и сушат 3 ч (при 102,5±2,5°C), затем охлаждают в эксикаторе 30 мин и взвешивают. Содержание сухого остатка должно быть не менее 14,30 % (ГФ XI, вып. 1, с. 161).

Определение спирта. Для определения спирта использован метод газожидкостной хроматографии. Определение содержания этилового спирта в полученном экстракте определяли ГЖХ методикой на газовом хроматографе Agilent Technologies «GC 6850 Network GC System».

Хроматографирование осуществляли в следующих найденных условиях: DB-624 Capillary 30,0m x 250µm x 1,40µm nominal; температура печи от 40°C - 120°C, продолжительность анализа-8,0 мин, инъекция 1µl, split ratio 50:1, температура инжектора - 120°C; температура детектора- 260°C; подвижная фаза- 0,8 мл/мин гелий (He); детектор-пламенный ионизационный (FID); скорость воздуха и водорода 450 мл/мин и 40,0 мл/мин, соответственно.

Приготовление испытуемого раствора: 10 мл испытуемого экстракта помещают с помощью пипетки в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером 0,45мкм.

Приготовление 70% раствора стандартного образца (PCO) этанола. Для этого 66,5 г (точная навеска) 99% этилового спирта помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем до метки очищенной дистиллированной водой и перемешивают раствор №1. 10 мл раствор №1 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Идентификацию этилового спирта на хроматограммах исследуемого образца осуществляли путем сравнения времен удерживания РСО. Поочередно хроматографировали по 1,0 мкл испытуемого раствора и раствора РСО этанола, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов.

Достоверность результатов анализа проверяли путем определения пригодности хроматографической системы по: -разрешению (R) пиков спирта этилового (не менее 2,0); -коэффициенту асимметрии (T) пика спирта этилового (не превышает 2,0); -относительному стандартному отклонению (RSD) (не превышает 2,0%). Идентификацию этилового спирта на хроматограммах исследуемых образцов осуществляли путем сравнения времен удерживания стандартного образца. Результаты исследований представлены на рис.1- 2.

Рис. 2. Хроматограмма экстракта «Гемостат»

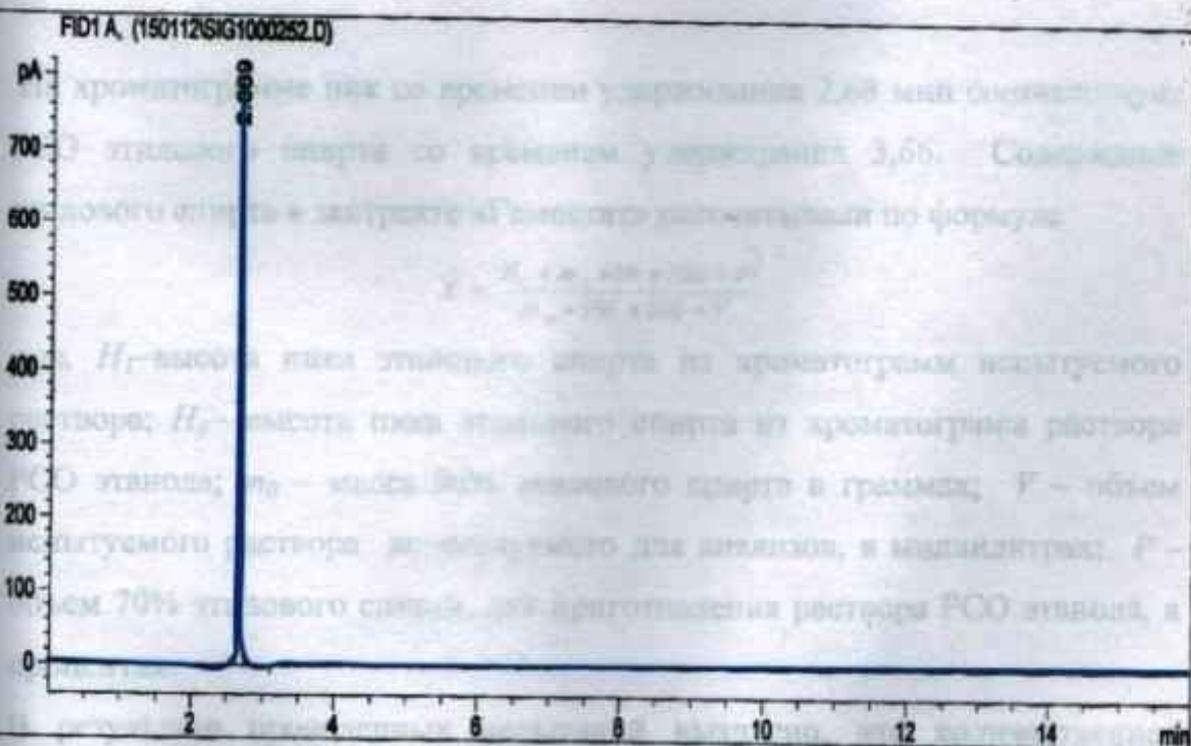


Рис. 1. Хроматограмма стандартного образца этилового спирта

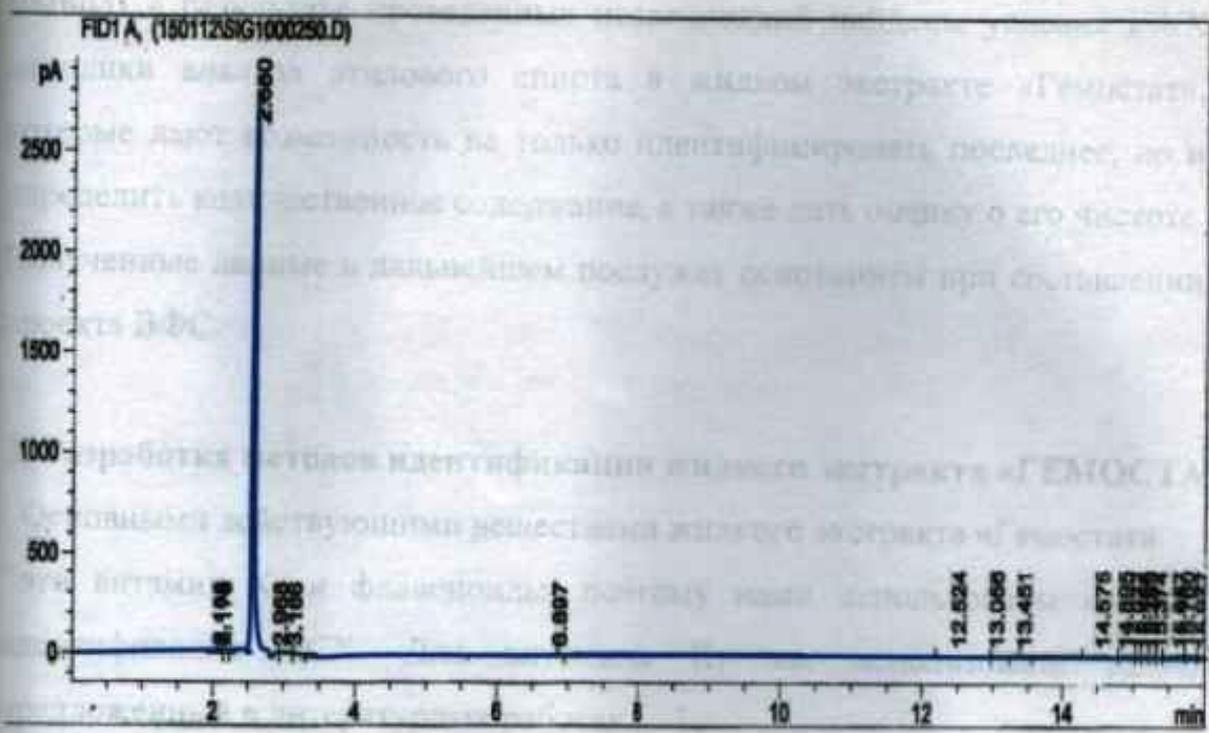


Рис. 2. Хроматограмма экстракта «Гемостат»

На хроматограмме пик со временем удерживания 2,68 мин соответствует РСО этилового спирта со временем удерживания 3,66. Содержание этилового спирта в экстракте «Гемостат» рассчитывали по формуле

$$X = \frac{H_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot P}{H_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}$$

где, H_1 – высота пика этилового спирта из хроматограмм испытуемого раствора; H_0 – высота пика этилового спирта из хроматограмм раствора РСО этанола; m_0 – масса 96% этилового спирта в граммах; V – объем испытуемого раствора используемого для анализов, в миллилитрах; P – объем 70% этилового спирта, для приготовления раствора РСО этанола, в процентах.

В результате проведенных испытаний выявлено, что количественное содержание этилового спирта в экстракте «Гемостат» составило не менее 69,2%.

Вывод: в результате проведенных исследований найдены условия ГЖХ методики анализа этилового спирта в жидком экстракте «Гемостат», которые дают возможность не только идентифицировать последнее, но и определить количественное содержание, а также дать оценку о его чистоте. Полученные данные в дальнейшем послужат основанием при составлении проекта ВФС.

3. Разработка методов идентификации жидкого экстракта «ГЕМОСТАТ»

Основными действующими веществами жидкого экстракта «Гемостат» это витамин K_1 и флавоноиды, поэтому нами использованы методы идентификации ТСХ. Для витамина K_1 мы использовали метод предложенный в литературных работах [].

0,2 мл препарата наносят на пластинку «Силуфол» (10x15 см). Пластинку с нанесенной пробой высушивают на воздухе в течение 5 мин., помещают в камеру со смесью растворителей эфир-бензол (2:8) и хроматографируют восходящим способом. Все процессы выполняются в темноте. При проявлении пластинку УФ- свете, должно появиться белое пятно, (R_f около 0,43) (витамин K_1).

Чтобы определить флавоноиды в жидком экстракте «Гемостат» в качестве «свидетелей» были использованы спиртовые растворы кверцетина и рутина которые, были идентифицированы из растительного сырья.

5 мл жидкого экстракта улитучивали на водяной бане затем три раза промывали толуолом, остаток растворяли 96 % спиртом.

Для этого на пластинку «Силуфол УФ-254» (15x15 см) наносили 0,02 мл жидкого экстракта «Гемостат» и растворы «свидетелей». Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе, помещали в камеру со смесью растворителей которые приведены в таблице и хроматографировали восходящим способом.

№	Вещества	Система		
		Толуол : (96%) этиловый спирт 3:2	Бутанол : уксусная к-та : вода 4 : 1 : 5	Эфир : толуол 2 : 8
1	Рутин	0,44	0,43	0,16
2	Кверцетин	0,70	-	-
3	Жидкий экстракт	0,43	0,41	0,15

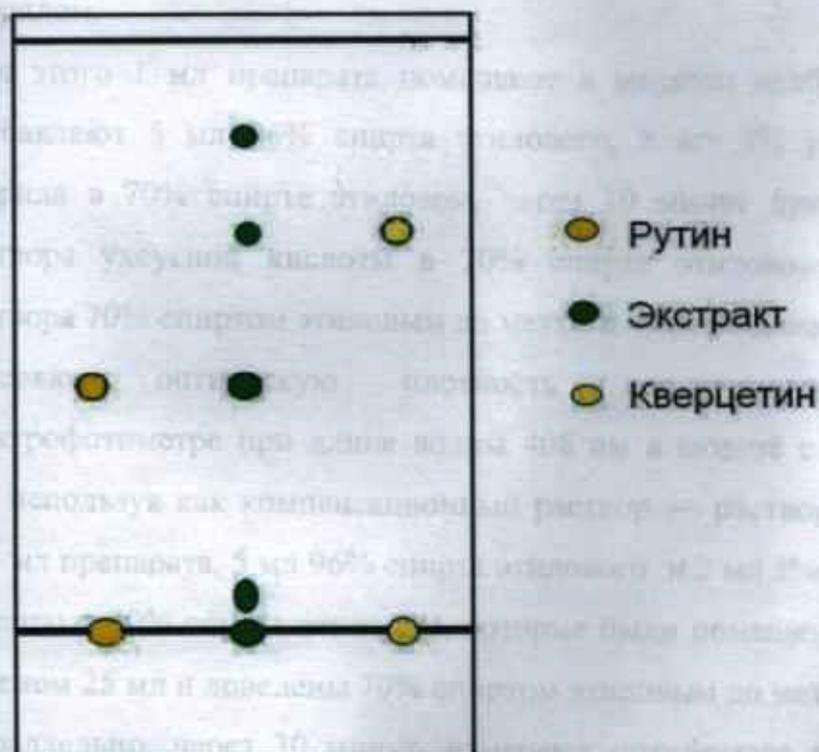


Рис.3 Хроматограмма жидкого экстракта и флавоноидных свидетелей

Таким образом, в результате проведенных исследований из жидкого экстракта обнаружены витамин К₁ и флавоноиды: рутин, кверцетин а самая оптимальная система для флавоноидов это толуол : этиловый спирт (96%) 3:2.

4. Разработка количественного определения суммы флавоноидов в жидком экстракте «ГЕМОСТАТ» методом СФ

Одним из важных этапов при стандартизации лекарственных препаратов является определение количественного содержания действующих веществ, в данном случае флавоноидов.

Целью данной работы явилось разработка методики количественного определения суммы флавоноидов спектрофотометрического метода анализа, основанная на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом.

Для этого 1 мл препарата помещают в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляют 5 мл 96% спирта этилового, 5 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, через 10 минут прибавляют 2 мл 5% раствора уксусной кислоты в 70% спирте этиловом, доводят объем раствора 70% спиртом этиловым до метки и перемешивают. Через 30 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кюветё с толщиной слоя 10 мм, используя как компенсационный раствор — раствор, который состоит из 1 мл препарата, 5 мл 96% спирта этилового и 2 мл 5% раствора уксусной кислоты в 70% спирте этиловом, которые были помещены в мерную колбу объемом 25 мл и доведены 70% спиртом этиловым до метки.

Параллельно, через 30 минут, измеряют оптическую плотность, которая содержит 1 мл раствора сравнения (раствор стандартного образца рутина), приготовленного аналогично испытуемому раствору, используя как компенсационный раствор — раствор, который состоит из 1 мл раствора сравнения и 2 мл 5% раствора уксусной кислоты в 70% спирте этиловом, которые помещены в мерную колбу объемом 25 мл и доведены 70% спиртом этиловым до метки.

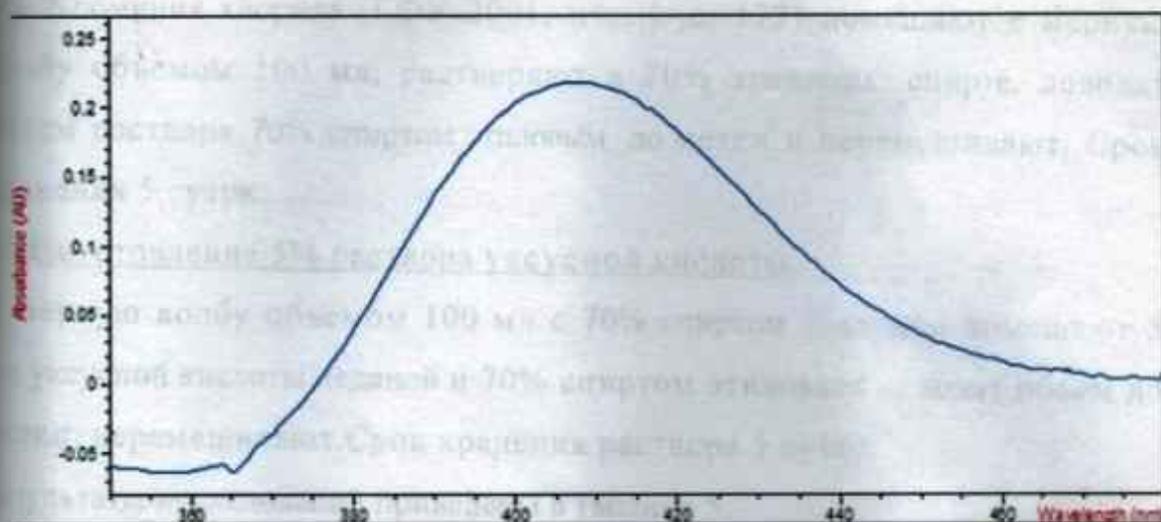


Рис.4. Спектр жидкого экстракта Гемостат

Содержание суммы флавоноидов (X) в препарате при перерасчете на рутин в миллиграммах в 1мл рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times m_0 \times 1 \times 25 \times 25}{A_0 \times 100 \times 25 \times 1 \times 1} = \frac{A \times m_0 \times 1}{A_0 \times 4} \times 100\%$$

Где: А – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность раствора сравнения;

m_0 – масса навески РСО рутина, в мг

1 Примечание.

1.Приготовление раствора сравнения. Около 0.025г (точная навеска) рутина, высушенная при температуре 135°C до постоянного веса, помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 80 мл 96% спирта этилового Р при нагревании на водяной бане, после охлаждения доводят объем раствора тем же спиртом этиловым 96% до метки перемешивая.

Срок хранения раствора 1 месяц при хранении в хорошо укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

2.Приготовление 5% раствора алюминия хлорида.

5 г алюминия хлорида (ГФУ 2001, изд. I ,с. 172) помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 70% этиловом спирте, доводят объем раствора 70% спиртом этиловым до метки и перемешивают. Срок хранения 5 суток.

3. Приготовление 5% раствора уксусной кислоты.

В мерную колбу объемом 100 мл с 70% спиртом этиловым помещают 5 мл уксусной кислоты ледяной и 70% спиртом этиловым доводят объем до метки, перемешивают. Срок хранения раствора 5 суток.

Результаты исследований приведены в таблице 5.

Таблица 5

Метрологические характеристики результатов метода количественного определения суммы флавоноидов жидкого экстракта «Гемостат» (n=5; P=95%; t(p,f)=2,78)

$X_i, \%$	$\bar{X}, \%$	f	S^2	S	S_x	$\bar{\varepsilon}, \%$
$X_1=0,69$	0,71	4	0,00020	0,0141	0,00632	2,47
$X_2=0,70$						
$X_3=0,72$						
$X_4=0,72$						
$X_5=0,72$						

Как видно из результатов исследований, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в жидком экстракте составило 0,71 %.

5. Разработка ВЭЖХ методики для количественного определения суммы флавоноидов

Цель настоящей работы заключалась в разработке методики качественного и количественного определения рутина и кверцетина в новом препарате.

В процессе разработки методики ВЭЖХ нами были изучены условия проведения анализа, основным из которых является выбор подвижной фазы. Для подбора подвижной фазы указанной ЛФ испытывали следующие смеси растворителей в различных соотношениях: метанол-уксусная кислота-вода (30:0,1:69,9; 40:0,1:59,9; 50:0,1:49,9; 60:0,1:39,9); ацетонитрил – ортофосфорная кислота – вода (30:1:69; 40:1:59; 50:1:49; 39:1:60; 59:1:49; 69:1:30); метанол – ортофосфорная кислота с рН 2 (20:80); метанол – ортофосфорная кислота до рН 3,1 – вода (68:32). Для полного хроматографического разделения рутина и кверцетина, т.е. по симметричности, времени удерживанию и площади полученных пиков наиболее оптимальной системой явилась 0,3% раствор ортофосфорной кислоты с метанолом. Поэтому в дальнейшем для идентификации и количественного определения исследуемых соединений в качестве подвижной фазы использовали данную систему.

Как показали предварительные эксперименты, наибольшей селективностью по отношению к разделяемым компонентам, в частности, рутина и кверцетину обладала подвижная фаза метанол- ортофосфорная кислота с рН 2,0 при элюировании в градиентном режиме с изменением концентрации от 20 до 80% (таблица 6).

Таблица 6

Градиентный режим		
t, min	A(%) ортофосфатная кислота	B (%) метанол
0	80	20
3	80	20
15	35	65
22	35	65
25	80	20

В выборе оптимальных условий ВЭЖХ немаловажное значение имеет также и тип сорбента. Для разделения флавоноидов были использованы колонки различных размеров заполненные разными типами сорбентов. Наибольшая эффективность (более 2000 теоретических тарелок) была

достигнута при использовании колонок размерами 3×150, 3,0×100, 3,5×100 и 4,6×150 мм заполненных, сорбентом Zorbax Eclipse C-8 и C-18 с величиной частиц 3 и 5 мкм (Agilent Technologies).

Поэтому в дальнейшем для исследования в качестве стандарта были использованы спирто-водные растворы рутина и кверцетина, наиболее доступные РСО с известными спектрами оптического поглощения. Спектры оптического поглощения кверцетина ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2 \cdot H_2O$) и рутина ($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 2 \cdot H_2O$) с максимумами поглощения в области длин волн 220-270 и 350-390 нм снимали на спектрофотометре фирмы Agilent Technologies (США) марки 8453, результаты представлены на рис. 1 и 2.

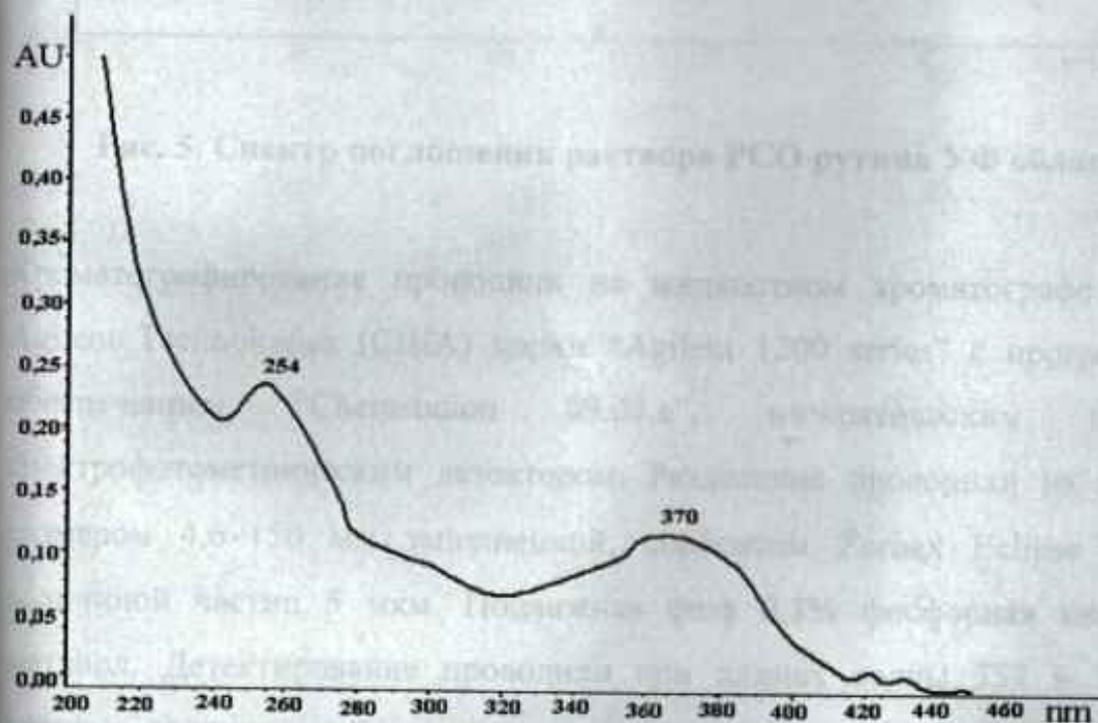


Рис. 4. Спектр поглощения раствора РСО кверцетина

Проверку пригодности хроматографической системы, где получаются воспроизводимые результаты, проводили по числу теоретических тарелок, степени разделения пиков и относительному стандартному отклонению.

Приготовление раствора РСО рутина. 0,0055 г рутина (ГФ X) растворяют в метаноле в пикнометре вместимостью 10 мл и доводят объем до метки этим же растворителем.

Приготовление раствора РСО кверцетина. 0,0054 г кверцетина (ФС 42Уз-0031-96) растворяют в метаноле в пикнометре вместимостью 10 мл и доводят объем до метки тем же растворителем.

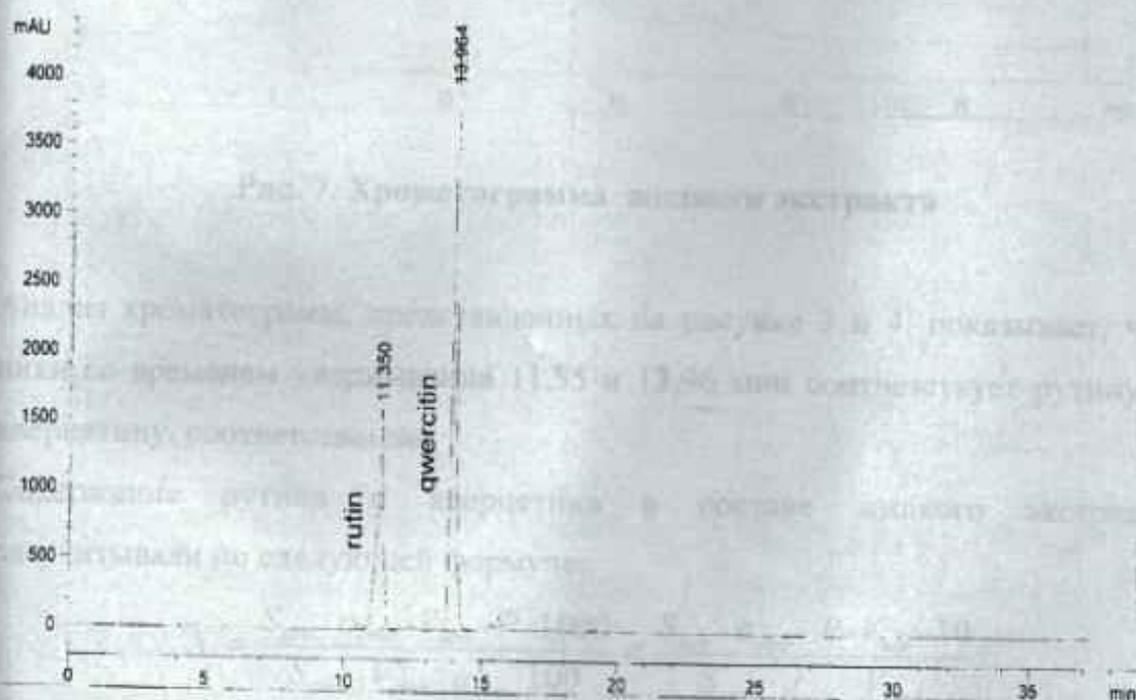


Рис. 6. Хроматограмма стандартного образца кверцетина и рутина

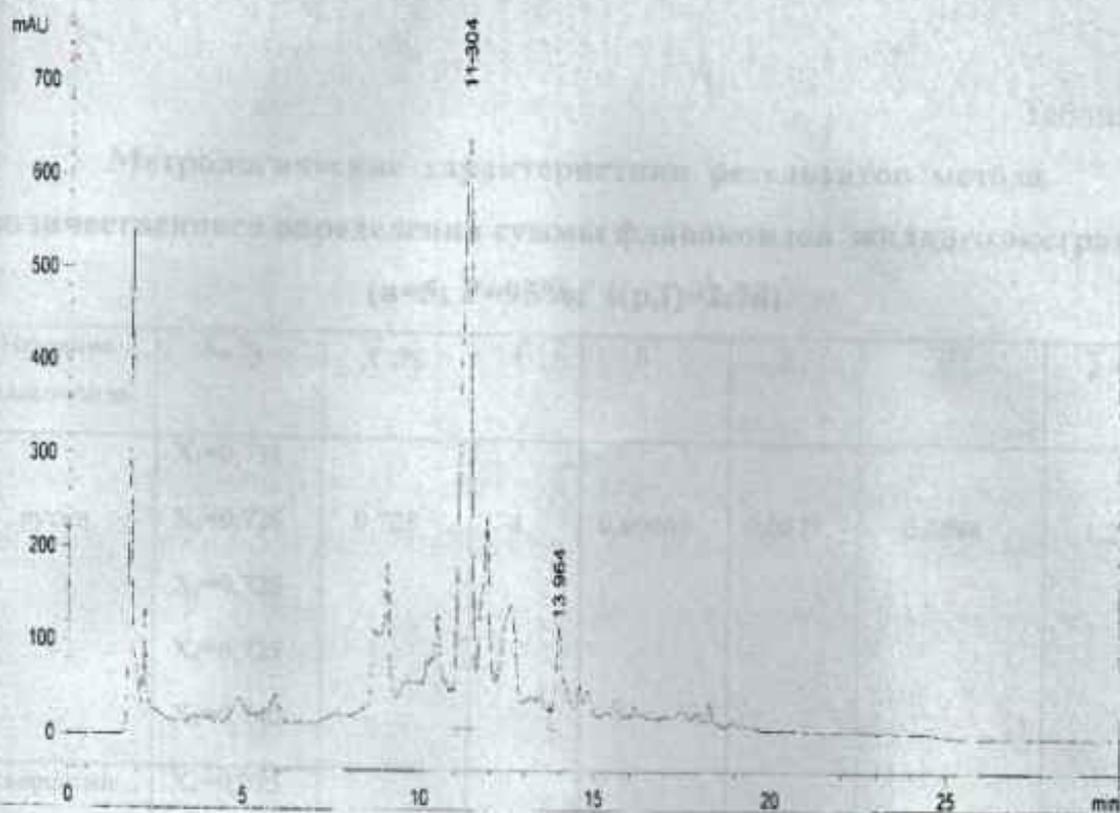


Рис. 7. Хроматограмма жидкого экстракта

Анализ хроматограмм, представленных на рисунке 3 и 4, показывает, что пики со временем удерживания 11,35 и 13,96 мин соответствует рутину и кверцетину, соответственно.

Содержание рутина и кверцетина в составе жидкого экстракта рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_{исп} \cdot a_{std} \cdot V_{исп} \cdot P \cdot 1000}{S_{std} \cdot V_{std} \cdot a_{исп} \cdot 100} = \frac{S_{исп} \cdot a_{std} \cdot P \cdot V_{исп} \cdot 10}{S_{std} \cdot a_{исп} \cdot V_{std}}$$

где:

S_{std} – площадь основных пиков на хроматограмме растворов РСО рутина и кверцетина, mAU;

$S_{исп}$ – площадь пика рутина и кверцетина на хроматограмме испытуемого образца, mAU;

a_{std} – навеска РСО рутина и кверцетина, г;

P – содержание рутина и кверцетина в стандартном образце, %.

Метрологические характеристики результатов метода
количественного определения суммы флавоноидов жидкого экстракта
($n=5$; $P=95\%$; $t(p,f)=2,78$)

Название флавоноида	$X_i, \%$	$\bar{X}, \%$	f	S^2	S	\bar{X}	$\bar{\varepsilon}, \%$
рутин	$X_1=0,731$	0,728	4	0,00005	0,0075	0,0094	1,29
	$X_2=0,726$						
	$X_3=0,720$						
	$X_4=0,725$						
	$X_5=0,740$						
кверцетин	$X_1=0,035$	0,0346	4	0,0000003	0,00054	0,00068	1,96
	$X_2=0,034$						
	$X_3=0,034$						
	$X_4=0,035$						
	$X_5=0,035$						

Таким образом, на основании проведенных исследований разработана сквозная методика качественного и количественного определения рутина и кверцетина в исследуемом образце с использованием метода ВЭЖХ. Результаты, которых приведены ниже.

Содержание рутина в жидком экстракте составило 0,72 % а кверцетин 0,035 %, соответственно. Результаты изучения метрологической характеристики [6] разработанной методики показали, что относительная ошибка среднего результата составила $\pm 1,29 \%$ и $\pm 1,96 \%$, что соответствует требованиям, предъявляемым инструментальным методам анализа.

Выводы

Таким образом, для стандартизации жидкого экстракта «Гемостат» нами были проведены исследования по определению флавоноидов.

Для идентификации флавоноидов и витамина К₁ жидкого экстракта «Гемостат» была подобрана система растворителей ТСХ, которые были включены в проект ВФС по показателю «Подлинность».

Разработаны методики спектрофотометрической и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Средняя относительная ошибка спектрофотометрического метода составило $\pm 2,47\%$, а ВЭЖХ метода $\pm 1,29\%$. Разработанные методики будут включены в проект ВФС

ПФБ на жидкий экстракт «Гемостат».

4. Разработана методика количественного определения флавоноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Содержание рутина в жидком экстракте составило $9,12\%$ в стандарте и $0,035\%$ в исследуемом. Результаты количественных характеристики разработанной методики показали, что относительная ошибка среднего результата составила $\pm 1,29\%$ и $\pm 2,47\%$.

5. Разработанные методики количественного анализа флавоноидов могут быть включены в проект ВФС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые разработан новый жидкий экстракт «Гемостат»
2. Проведена стандартизация жидкого экстракта «Гемостат» по фармакопейным показателям: «Описание», «Подлинность» (по витамину К₁ и флавоноидам), «Сухой остаток», «Плотность», «Тяжелые металлы», количество спирта определено методом ГЖХ.
3. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в жидком экстракте «Гемостат» с использованием УФ-спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин составило 0,71 %, средняя ошибка метода $\pm 2,47\%$. Разработанная методика включена в проект ВФС на жидкий экстракт «Гемостат».
4. Разработана методика количественного определения флавоноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание рутина в жидком экстракте составило 0,72 % а кверцетин 0,035%, соответственно. Результаты изучения метрологической характеристики разработанной методики показали, что относительная ошибка среднего результата составила $\pm 1,29\%$ и $\pm 1,96\%$.
5. Разработанные методики количественного анализа флавоноидов дают возможность целесообразно использовать в проекте ВФС.

10. Горелов А.И. (авторship). Информационно-методический сборник «Лекарственные травы», стр.1-100 стр. (2007).

11. Smit J.W, Vlietinck A., Principles of Liquid chromatography, The first edition, Van Nostrand Reinhold, 1978, 222 Pages, Price, 1978.

12. Borek SL, Smit JW, Density based and Adsorption-44 Yonatan K, J. Nat. 1998, Vol.123, 785-788.

13. Borek SL, Smit JW, Density based and Adsorption-44 Yonatan K, J. Nat. 1998, Vol.123, 785-788.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халматов Х.Х., Ахмедов У.А. Фармакогнозия. Ташкент: Ибн Сина, 1995.-390с.
2. Халматов Х.Х. Лекарственные растения Центральной Азии.- Ташкент: во. Ибн Сина, 1998.-295 с.
3. Турова А.Д., Сапожникова Э.Н. Лекарственные растения СССР и их применение.- М: Медицина, 1982.- С. 277.
4. Попов А.П. Траволечебник: Лечение лекарственными растениями.- СПб., 1997. -560с.
5. Юлдашев М.П. Флавоноиды корней *Scutellaria comosa* // Химия природ. соедин.- Ташкент.1996.-№6.-С.610.
6. Юлдашев М.П. Строение двух новых флавоноидов из *Scutellaria ramosissima* // Химия природ. соедин.- Ташкент.1994.-№3.-С.355.
7. Юлдашев М.П., Каримов А. Флавоноиды корней *Scutellaria immaculate* // Химия природ. соедин.- Ташкент 2005.-№1.-С.26-27.
8. Горец перечный (водяной перец). Информационно-поисковый сайт «Лекарственные травы» email: homeart@mail 2007.
9. Хворост П.П., Комисаренко Н.Ф. Флавоноиды *Polygonum aviculare* // Химия природ. соедин. – Ташкент, 1980.-№6.-С.840.
10. Горец птичий (спорыш). Информационно-поисковый сайт «Лекарственные травы», email: homeart@mail 2007.
11. Suttie J.W. Vitamin K. Handbook of Lipid research: The fat –soluble vitamins (N.F. DeLuca, ed): Plenum Press, 1998.
12. Booth SL., Suttie JW. Dietary intake and Adequacy of Vitamin K.// J Nutr. 1998.-Vol.128. №5-P.785-788.
13. Shunsaku Ohta, Yasunari Hinata, Masayuki Yamashita. One –Step Synthesis of 1,2,3,4- Tetrahydrobenzo (g) quinazoline-5,10 –dione Derivatives from Vitamin K₁ //J. Chem. Pharm. Bull. 1994.- Vol.42.- № 9- P.1730-1735.

14. Березов Т.Г., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Химия, 1990.- С-142.
15. British pharmacopoeia. Phytomenadione.- 1997. -Р. 1040.
16. European pharmacopoeia 1997.-Р. 1332-1334.
17. Струкова М.П. Хроматографический метод контроля производства витамина К₁ // Хим. фарм. журн.- Москва, 1975. №8.- С-50.
18. Фенольные соединения различных видов *Polygonum* / Николаева Г.Г., Лаврентьева М.В., Николаева И.Г. // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2009.-№5.-С.616.
19. Н.Ш. Кавтарадзе. Фенольные соединения *URTICA URENS*, произрастающей в Грузии // Хим. природ. соедин., 2003.- №3.- С. 249.
20. Губин К.В., Ханина М.А. Изучение химического состава надземной части *URTICA CANNABINA L.* Флоры Сибири // Химия раст. сырья. 2009 № 3. С. 89-92.
21. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Фитоменадион. – Ташкент, 1998.- Т.2.- С. 97.
22. Клышев Л.К. Флавоноиды растений.-Алма-Ата: Наука,1978.-С.22.
23. Биологическая активность растительных источников флавоноидов/ Мокин Ю.Н., Арлыт А.В., Зенченко Л.А., Ивашев М.Н. // Фармация.- Москва, 2006.- № 3.-С. 36-37.
24. Выделение и анализ природных биологически активных веществ; под. ред. Е.Е. Сироткиной. -Томск: Изд-во Томского ун-та, 1987.-184 с
25. Муминова Б.А., Батиров Э.Х., Юлдашев М.П. Гликозиды кемпферола из *Allium sera* и *Raphanus sativus* // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2006.-№1.-С.89
26. Бутаяров А.В, Батиров Э.Х. Флавоноиды *Caragana alaica* // Химия природ. соедин.-Ташкент, 1999.-№6.-С.734.
27. Кулеш Н.И., Веселова В.М. Полифенолы из стеблей *Vitis amurensis* // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2006.-№2.-С.194-195.

28. Хамидулина Е.А., Пурэвдаш М.П., Ушаков И.В. Фенольные соединения из скорлупы *Pinus sibirica* // Химия природ. соедин.-Ташкент, 2005.-№1.-С.81-82.
29. Дроздова И.А., Бубенчикова Р.А. Аминокислоты фиалки полевой и донника рослого // Фармация. Москва, 2004. -№2.-С. 11-12.
30. Бубенчикова Р.А., Дроздова И.А. Флавоноиды фиалки трёхцветной // Фармация. Москва, 2003. -№5.-С. 14-15.
31. Муминова Б. А., Юлдашев М.П. Флавоноиды *Sophora griffithi* и *Goebella rachsarpa* // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2006. -№1. - С.88.
32. Юлдашев М.П. Флавоноиды надземной части *Vicia subvillosa* // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2007.-№1.-С.30-31.
33. Мовсумов И.С., Гараев Э.А., Исаев М.И. Флавоноиды цветков *Cephalaria gigantea*. // Химия природ.соедин.- Ташкент, 2006.-№6.- С.552-554.
34. Маликов В.М., Юлдашев М.П. Фенольные соединения растения рода *Scutellaria*. Распространения, строения и свойства // Химия природ. соедин. -Ташкент, 2002.-№4.-С.299.
35. Алания М.Д., Кавтарадзе Ш.Н. Флавоноидные гликозиды листьев *Astragalus galegiformis*. // Химия природ.соедин. -Ташкент, 2006.-№6.- С.555-558.
36. Тулаганов А.А., Гаибназарова Д.Т. Выделение и идентификация флавоноидов плодов софоры японской. // Хим.-фарм. журн.-Москва, 2001.- №8.-С.28-30.
37. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х. -М.: Мир, 1981.Т.2.-С. 523.
38. Краснов Е.А., Ралдугин В.А., Шилова И.В. Фенольные соединения *Filipendula ulmaria* // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2006.-№2.-С.122-124.

39. Мовсумов И.С., Гараев Э.А. Флавоноиды *Limonium Meyeri* // Химия природ. соедин.- Ташкент, 2005.-№3.- С.281.
40. Болтенков Е.В., Рыбан В.Г., Зарембо Е.В. Флавоны каллусной ткани *Iris ensata* // Химия природ. соедин. -Ташкент, 2005.-№5.-С. 440-442.
41. Бубенчикова В.Н., Дроздова И.П. Изучение состава фенольных соединений донника лекарственного методом ВЭЖХ // Хим. фарм.журн.- Москва, 2004.-№4-С.24-25.
42. Чикаренко Е.И. Разработка и стандартизация средств, рекомендуемых для профилактики заболеваний желудочно –кишечного тракта: Автореф.. дис... канд.фарм. наук.-Тюмень, 2006.-22с.
43. Шинкаренко А.И. Методы исследования природных флавоноидов.- Пятигорск, 1997.-175 с.
44. Ярцева И.Б., Куркин В.А. Количественное определение суммы флавоноидов в траве одуванчика лекарственного // Фармация.- Москва, 1996.-№4.-С.24-27
45. Мечикова Г.Я., Степанова Т.А., Загузова Е.В. Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях земляники // Хим.-фарм. журн.- Москва, 2007.-№2.-С.38-41.
46. Матющенко Н.В., Степанова Т.А. Количественное определение суммы флавоноидов в новом фитопрепарате "Элима"// Хим.-фарм. журн.- Москва, 2003.-№5.-С.42-44.
47. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в траве шлемника байкальского / А.В. Кузык, А.В. Середя, Порова и др.// Фармакон.-Москва, 1998.-№2.-С.18-20.
48. Сур С.В., Гриценко Э.Н. Проблемы и перспективы разработки и внедрения современных лекарственных средств растительного происхождения // Фарматека.- Москва, 2001.-№9.-С.10-14.

49. Абдуллабекова В.Н., Тулаганов А.А. Разработка метода количественного анализа цветков календулы лекарственной // Хим.-фарм. журн. - Москва, 2001.-№ 10.-С. 25.
50. Абдуллабекова В.Н., Камилов Х.М. Количественное определение кверцетина. // Киме ва фармация.-Ташкент, 1998.-№ 3.-С.7-9.
51. Особенности применения стандартного образца рутина в анализе растительного сырья витаминных фитопрепаратов / Л.П Смирнова., С. Николаева и др. // Хим.-фарм. журн.- Москва, 2000.-№ 1.-С. 29-31.
52. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Староверов В.М. ВЭЖХ в исследовании флавоноидов. Определение рутина //Хим.-фарм. журн.- Москва, 2004.-№ 9. -С. 23-25
53. Алексеева М.А., Эллер К.И., Арзамасцев А.П. Определение полифенольных компонентов хмеля с помощью обращено- фазовой ВЭЖХ // Хим.-фарм. журн. - Москва, 2004.-№12.-С.39-41.
54. Sacchettini J.C., Poulter C.D.// Science. 1997. -Vol. 277. -P. 1788-1789.
55. Ткаченко К.Г., Казаринова Н.В. Санационные свойства эфирных масел некоторых видов растений // Мед.техника.-Москва, -1995. -№ 1-2. -С. 50.
56. Государственная фармакопея СССР.-XI изд.-М.: Медицина, 1987.- Вып. 1.- С.33.
57. Государственная фармакопея СССР.-XI изд.-М.: Медицина, 1990.- Вып. 2. 392 с.
58. Кортиков В.Н., Кортиков В.А. Полный справочник лекарственных растений.- М.: Феникс 2002.- 800 с.
59. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России.- М., 2005. - С. 565.
60. Балуда В.П., Балуда М.В., Деяков И.И. Физиология системы гемостаза. -Москва, 1995.
61. Изменения 2 от 29.09.2005., к ст..ГФ XI изд.-М.: Медицина, 1990.- Вып. 2. С.193.

62. ФС 42Уз-0228-2004. Трава горца птичьего.
63. ФС 42Уз-0348-2004. Трава горца перечного.
64. Амосов А.С., Литвененко В.И. Фенольные соединения родов (*Glycyrrhiza* L) и (*Meristotropis* Fisch.et Mey) (обзор) // Хим.-фарм. журн. –Москва, 2007.-№ 7.-С. 30-52.
65. Xiao Z.P., Wu H.K., Wu T. Кемпфероловые и кверцетиновые флавоноиды *Rosa rugosa* // Химия природ. соедин.-Ташкент, 2006.-№6.-С.600-601
66. Еремена А.В., Решетняк В.Ю., Везиришвили М.О. Определение полифенольного состава сухого экстракта гребней винограда методом ВЭЖХ // Хим.-фарм. журн.-Москва, 2004.-№ 3.-С. 26-28.
67. Зайнутдинов. Х.С. Анализ микроэлементного состава травы *Helichrysum teracandicum* M. Pol // Киме ва фармация. Ташкент, 1998.-№ 3.-С. 5-6.
68. Государственный Реестр Узбекистана. Изд.Х.-Т.: Patent-Press, 2006.- 478 с.
69. Миралимов М.М. Фармацевтик технология асослари. Ташкент: Ибн Сино, 2001.- 342с.
70. Технология получения суммарного флавоноидного препарата из *Thermopsis Alterniflore*, его лекарственной формы и оценка их гиполипидемической активности. / Г.Б. Сатимов, А.У. Маматханов и др. // Хим.-фарм. журн. –Москва, 2003.-№ 4.С. 42-45.
71. Прибыткова Т.Ф., Шарикова Л.А. Стандартизация жидкого экстракта элеутерококка // Фармация.- Москва, 2006. -№ 1.-С. 15-18.
72. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек, экстрактов и эликсиров в ведущих странах Европы и Америки / Зенкевич И.Г., Багирова В.Л., Сокольская ТА., Нечаева Е.Б. // Фармация.- Москва, 2002.-№ 1.-С. 43-45.
73. Тяжёлые металлы и стандартизация настоек / Т.В. Плетёнова, Н.И. Потапова и др. // Фармация.- Москва, 2004. -№ 4.-С. 9-10.

74. Редченкова В.Н., Хишова О.М. Анализ требований некоторых фармакопей предъявляемых к экстрактам // Хим.-фарм. журн.-Москва, 2006.-№ 1.-С. 37-40.
75. Куркин В.Н., Стеняева В.В. Стандартизация листьев берёзы // Фармация.- Москва, 2006. -№ 4.-С. 10-12.
76. Исаева Н.В., Самылина И.А. Биологические активные вещества плодов настойки барбариса // Фармация. –Москва, 2006. -№ 1.-С. 22-23.
77. Петриченко В.М., Галишевская Е.Е. Определение суммы флавоноидов в траве марьянкина лугового // Фармация.- Москва, 2004.- № 1.-С. 24-26.
78. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков *Calendula officinilis* // Химия природ.соедин.- Ташкент, 2007.-№ 2.-С. 179-180.
79. Индикаторные компоненты водных извлечений травы зверобоя / А.М. Власов, К.И. Эллер и др. // Фармация.- Москва. 2005. -№ 3.-С. 15-18.
80. Гордиенко В.С. Гепатопротекторный механизм действия флавоноидов // Фармация. –Москва, 1990. -№ 3. С. 75-78.
81. Пахамов В.П. Хроматография в химико-фармацевтических исследованиях // Хим.-фарм. журн.-Москва, 2003.-№ 8.-С. 55-56.
82. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фарм. журн.-Москва, 2004.- № 4.-С. 40-55.
83. United States Pharmacopoeia. Validation of compendia methods.- 2003.
84. Валидность методики определения компонентов препарата «Саливертин»/ А.М. Савватив, В.Л. и др. // Фармация. –Москва, 2005. - № 3.-С. 11-14.
85. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов // Фармация.- Москва, 2006. -№ 4.-С. 8-13.

86. Определение витаминов А, Д, Е в поливитаминных препаратах с помощью ВЭЖХ / Э.И. Козлов, И.А. Солунина и др. // Хим.-фарм. журн.-Москва, 2003.-№ 10.-С. 50-54.
87. Исмагилов Р.Р., Костылев Д.А. Календула.- Уфа, 2000.-102с.
88. Хазиев Р.Ш., Тынчерова А.А. Экстрагируемость флавоноидов травы зверобоя в настои // Фармация.- Москва, 2006.-№ 6.-С. 32-35.
89. Abdullabekova V.N., Bekchanov Kh.N. Use the HPLC Method in Analysis of Flavanoids in Leonurus Tincture // 7-th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds: Abstracts. –Tashkent, Uzbekistan, 2007.-P. 354.
90. Юнусходжаева Н.А., Абдуллабекова В.Н., Тулаганов А.А. Качественное изучение моносахаридов настойки *Polygonum aviculare* и жидкого экстракта *Polygonum hidropiper* методом бумажной хроматографии // Матер.науч.-практ.конф. «Актуальные проблемы образования, науки и производства в фармации». – Ташкент, 2005.-С. 138.
91. Юнусходжаева Н.А., Абдуллабекова В.Н. Анализ макро- и микроэлементного состава надземных частей трав горца птичьего и горца перечного, произрастающих в Узбекистане // XIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тез. докл.-М., 2006.-С.800-801.
92. Юнусходжаева Н.А., Бекчанов Х.Н. Абдуллабекова В.Н. Разработка ВЭЖХ методики определения витамина К₁ в травах горца птичьего и перечного // Фармацевтический журнал. -Ташкент, 2006.-№ 4.-С. 37-40.
93. Юнусходжаева Н.А., Абдуллабекова В.Н. Флавоноиды настойки горца птичьего // Матер.науч.- практ. конф. «Интеграция образования, науки и производства в фармации», посвященной 70-летию Ташкентского фармацевтического института.-Ташкент, 2007.-С. 205-206.

94. Юнусходжаева Н.А., Выпова Н.Л., Абдуллабекова В.Н. К механизму гемостатического действия настойки горца птичьего // Матер.науч. практ. конф. «Интеграция образования, науки и производства в фармации», посвященной 70-летию Ташкентского фармацевтического института.-Ташкент, 2007.-С. 276-277.
95. Юнусходжаева Н.А., Выпова Н.Л., Абдуллабекова В.Н. Гемостатическое действие жидкого экстракта горца перечного // Матер. науч. практ. конф. «Интеграция образования, науки и производства в фармации», посвященной 70-летию Ташкентского фармацевтического института.-Ташкент, 2007.-С. 290-291.
96. Yunuskhodjaeva N.A., Abdullabekova V.N., Eshbakova K.A. Licviridine and cynnarozide from Polygonum aviculare L // 7-th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds: Abstracts. –Tashkent, Uzbekistan, 2007.-P. 353.
97. Terpenoids of the liquid extract of polygonum hydropiper /Yunuskhodjaeva N.A., Abdullabekova V.N., Muhamatkhanova R.F., Shamyayov I.D. // 7 th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds: Abstracts. –Tashkent, Uzbekistan, 2007. - P. 355.
98. А.Н. Кузьменко. Стандартизация растительного сбора методом газо-жидкостной хроматографии // Вестн. Моск. Ун-та.Сер 2. Химия 2009. Том 50. № 4.С. 278-281.
99. Юнусходжаева Н.А., Сайдалиева Ф.А., Казанцева Д.С. Гемостатические свойства сбора из лекарственных растений горца птичьего, горца перечного и крапивы. //Инфекция, иммунитет и фармакология 2012.- №4.- С.76-79.
100. Акашкина, А.П. Разработка и стандартизация фитопрепаратов / А.П. Акашкина, Г.И. Российская, М.Н. Лякина // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы II Междунар. съезда-СПб., - 1998. - С. 9-13.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На правах рукописи

ХОЛИКОВ БОБУР МУСУРМОН УГЛИ

**ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА
«ГЕМОСТАТ»**

Научный руководитель:

к.фарм.н., ст. пр. Н.А.Юнусходжаева

Рецензент: к.фарм.н., ст. пр. Зулфикориева Д.