

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)
04.03.01 «Химия»
(код и наименование направления подготовки, специальности)
«Медицинская и фармацевтическая химия»
(направленность (профиль)/ специализация)

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему: «Сравнительный анализ биологически активных соединений
растений, обладающих отхаркивающим действием»

Студент	Э.А. Стукалова	
	_____	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Руководитель	Т.М. Гребенкина	
	_____	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Консультанты	Е. Ю. Аношина	
	_____	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)

Допустить к защите

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко
(ученая степень, звание, И.О. Фамилия) (личная подпись)

« _____ » _____ 2018 г.

Тольятти 2018

АННОТАЦИЯ

Данная выпускная квалификационная работа изложена на 57 страницах, содержит 7 таблиц и 27 рисунков. Состоит из введения, 3 глав, выводов, списка литературы, включающего 56 источников, в том числе 13 иностранных.

Главной целью выпускной работы является сравнительный анализ биологически активных веществ в растениях, обладающих отхаркивающим эффектом.

Объектами исследования в данной работе являются лекарственные растения: *Plantago major*, *Thymus*, *Tussilago farfara*, *Inula*, *Althaea*.

В литературном обзоре рассматривается описание биологически активных веществ и краткие характеристики лекарственных растений. Кроме того, проанализированы химические и физико-химические методы анализа лекарственных средств, обладающих отхаркивающим эффектом.

В обсуждении результатов анализируются полученные экспериментальные данные, сравниваются значения биологически активных веществ в исследуемых образцах.

В экспериментальной части приводятся подробные методики исследования образцов, расчетные формулы и описание оборудования, на котором проводилось исследование.

Результаты исследования показали сходства качественного и различия количественного содержания полисахаридов, пектиновых веществ, флавоноидов и витамина С при сравнительном анализе БАВ пяти видов лекарственного растительного сырья.

ABSTRACT

The title of the graduation work is «Comparative biochemical analysis of plants with an expectorant effect». In this work, medical plants such as *Plantago major*, *Thymus*, *Tussilago farfara*, *Inula*, *Althaea officinalis* are studied.

The aim of the work is to compare the objects of the research on the content of biologically active compounds. We study the scientific literature and pharmacopoeia articles. Then we determine the content of polysaccharides, pectin substances, ascorbic acid and flavonoids in herbs of medical plants that have an expectorant property.

The thesis includes introduction, three chapters, conclusion, and list of 56 references, including 13 foreign sources. The text of the work contains 27 figures, 7 tables, and 8 formulas.

In the first chapter, the description of biologically active substances and brief characteristics of medicinal plants are considered. In addition, chemical and physical-chemical methods of analysis are studied.

In the second chapter, we compare medical plants with each other and report the results of experiments of medicinal products that have expectorant effect on the obtained experimental data; also, we compare the values of biologically active compounds in the samples.

The third chapter describes the measurement methods.

The results of the study show similarities in the qualitative and differences in the quantitative content of polysaccharides, pectin substances, flavonoids and vitamin C in medical plants.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.1 Современные представления о лекарственных растениях и их биологически активных соединениях.....	10
1.1.1 Основные понятия.....	10
1.1.2 Классификация биологически активных соединений лекарственных растений.....	11
1.1.3 Лекарственное значение и физиологическая роль биологически активных соединений первичного и вторичного метаболизма.....	12
1.2 Фармакологическая значимость представителей лекарственных растений, обладающих отхаркивающим свойством.....	16
1.3 Методы исследования лекарственных растений.....	19
1.3.1 Хроматографические методы.....	19
1.3.1.1 Бумажная хроматография.....	19
1.3.1.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	20
1.3.2 Титриметрические методы.....	23
1.3.2.1 Кислотно – основное титрование.....	23
1.3.2.2 Окислительно – восстановительное титрование.....	25
1.3.2.3 Потенциометрическое титрование.....	26
1.3.4 Спектрофотометрический метод.....	29
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	31
2.1 Определение потери в массе при высушивании.....	31
2.2 Количественное определение полисахаридов в лекарственном сырье.....	31
2.3 Гидролиз полисахаридов и качественный анализ моносахаридов....	32
2.4 Определение пектиновых веществ.....	33
2.4.1 Качественная реакция на наличие галактуроновой кислоты.....	33
2.4.2 Количественное определение пектиновых веществ в	

лекарственных растениях.....	34
2.5 Определение содержания витамина С йодометрическим титрованием.....	35
2.6 Определение суммы флавоноидов.....	36
2.6.1 Качественные реакции на флавоноиды.....	36
2.6.1 Спектрофотометрический метод определения суммы флавоноидов.....	37
2.6.2 Определение суммы флавоноидов методом ВЭЖХ.....	38
2.6.3 Определение суммы флавоноидов методом потенциометрического титрования.....	39
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	43
3.1 Реагенты, оборудование и объекты исследования.....	43
3.2 Методики выполнения анализа.....	43
3.2.1 Определение потери в массе при высушивании сырья.....	43
3.2.2 Количественное определение полисахаридов в лекарственном сырье.....	44
3.2.3 Гидролиз полисахаридов и качественный анализ моносахаридов методом бумажной хроматографии.....	45
3.2.4 Определение пектиновых веществ.....	45
3.2.4.1 Качественная реакция на галактуроновую кислоту.....	45
3.2.4.2 Количественное определение пектиновых веществ в лекарственных растениях.....	46
3.2.5 Определение содержания витамина С йодометрическим титрованием.....	46
3.2.6 Определение суммы флавоноидов.....	47
3.2.6.1 Качественная реакция на флавоноиды.....	47
3.2.6.2 Спектрофотометрический метод определения суммы флавоноидов.....	48

3.2.6.3	Определение суммы флавоноидов методом ВЭЖХ.....	49
3.2.6.4	Определение суммы флавоноидов методом потенциометрического титрования.....	50
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	51
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	52

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФС	Фармакопейные статьи
ГФ	Государственная фармакопея
ПС	Полисахариды
ПВ	Пектиновые вещества
БАВ	Биологически активные вещества
ОВР	Окислительно-восстановительные реакции
АК	Аскорбиновая кислота
ЛРС	Лекарственное растительное сырьё
УФ	Ультрафиолетовый

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность выпускной квалификационной работы. По данным Всемирной организации здравоохранения, болезни органов дыхания в мире составляют 40% от общей заболеваемости, поэтому лёгочные заболевания относят к социально-значимым [1].

Одним из направлений обеспечения национальной безопасности в сфере здравоохранения и здоровья, реализуемым Указом Президента РФ от 12.05.2009 № 537 (ред. от 01.07.2014) "О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года" является совершенствование стандартов контроля качества, эффективности и безопасности лекарственных средств и лекарственного растительного сырья.

Нормы контроля качества лекарств и сырья обозначены в Фармакопейных статьях (ФС) Государственной фармакопеи (ГФ) – государственном документе. Для препаратов и лекарственных растений в ФС можно узнать: требования, предъявляемые к лекарственным растениям и их упаковке, биологические свойства, список числовых показателей и способы испытания.

В последнее время в терапевтической практике фитопрепараты зарекомендовали себя как более безопасные и малотоксичные по сравнению с химически синтезированными лекарственными средствами, а также как доступные и эффективные средства [2]. Кроме того, официальные лекарственные растения и препараты, приготовленные из них, относятся к безрецептурным. Поэтому повышение требований к их стандартизации – это залог эффективности и безопасности лечения.

Прием лекарственных растений нормализует обменные процессы, нарушенные в результате заболевания, усиливает выведение из организма токсических метаболитов, а также способствует восстановлению защитных функций организма [3].

Известно, что эффективность растительных лекарственных средств связана с наличием в сырье биологически активных веществ (БАВ), представляющих собой продукты первичного и вторичного метаболизма растения: полисахариды (ПС), фенольные соединения, витамины, алкалоиды и др.

Цель и задачи исследования выпускной квалификационной работы.

Цель работы: сравнительное исследование биологически активных веществ, выделенных из лекарственных растений, обладающих отхаркивающим свойством.

Задачи:

1. Изучить литературные данные, описывающие лекарственные растения, обладающие отхаркивающим свойством, выбрать объекты исследования.
2. Определить группы БАВ, при наличии которых в лекарственных растениях проявляется противокашлевый эффект.
3. Сравнить выбранные лекарственные растения по содержанию БАВ, применив химические и инструментальные методы исследования.
4. Проанализировать полученные результаты.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Современные представления о лекарственных растениях и их биологически активных соединениях

1.1.1 Основные понятия

Еще древние врачеватели знали, что растения оказывают различное воздействие на животный организм. Замечая их действие, накапливая практический опыт, их использовали для приготовления очистительных составов, ядов, лечения заболеваний, заживления ран у людей и животных.

Сейчас лекарственные растения используют в народной и научной медицине. Не все растения, обладающие биологической активностью, получают юридическое право на официальное применение из-за недостаточной химической изученности.

В научной медицине применяют лекарственные растения, разрешенные к применению с целью лечения – *официальные* (от лат. officina – аптека), а значимые из них включают в Государственные фармакопеи (ГФ). В этом случае такие растения называют *фармакопейными* [4]. Фармакопейная статья (ФС) – это документ, утвержденный уполномоченным федеральным органом исполнительной власти и содержащий перечень показателей качества и методов контроля качества лекарственного средства. Понятие «качество лекарственного средства» означает соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи [5]. Раздел «Числовые показатели» в ФС включает специфические показатели для цельного или измельченного растения, которые являются стандартом для всех видов лекарственного растительного сырья и определяют его качество. Фармакопейными могут быть как сами растения, так и их отдельные части, которые употребляют в высушенном или свежем виде, а также используют для получения лекарственных веществ [6].

Классифицируют официальные растения по морфологическим признакам и по биологическим свойствам.

В основе морфологической классификации фармакопейных растений лежит наименование органа или части официального растения, которые используются в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС). В соответствии с этой классификацией ЛРС подразделяют на группы: cortex (кора), flos (цветок), folium (лист), fructus (плод), gemma (почка), herba (трава), radix (корень), rhizōma (корневище), semen (семена).

По лечебному воздействию на животный организм фармакопейные растения разделяют на отхаркивающие, кровеостанавливающие, сердечно - сосудистые, успокаивающие, потогонные и др [6].

1.1.2. Классификация биологически активных соединений лекарственных растений

Фармакологические свойства лекарственных растений обусловлены наличием в них определенных химических соединений. С медицинской точки зрения их принято делить на три группы: 1) *действующие*, или фармакологически активные соединения, обладающие лечебными свойствами; 2) *сопутствующие* – соединения, облегчающие всасывание действующих веществ либо изменяющие их свойства, а иногда и оказывающие вредное действие; 3) *балластные* – соединения, не имеющие медицинского действия, но свойства которых приходится учитывать при переработке сырья [7].

Накопление в организме растения БАВ, являющихся основой лекарственных средств, тесно связано с основными обменными процессами, протекающими в организме. Процессы, сходные для всех живых организмов (образование и расщепление, белков, нуклеиновых кислот и пептидов, а также углеводов, карбоновых кислот и т.д.), называют *первичным метаболизмом*. Процессы, свойственные лишь определённым группам

организмов (защита от вредителей, участие в размножении, придание окраски и запаха цветам и плодам, обеспечения взаимодействия растений между собой и с другими организмами в экосистеме), называют *вторичным метаболизмом* [4]. К первым относят ферменты, липиды, белки, витамины, углеводы, ко вторым – алкалоиды, гликозиды, смолы, фенольные соединения, эфирные масла, дубильные вещества.

1.1.3. Лекарственное значение и физиологическая роль биологически активных соединений первичного и вторичного метаболизма

Витамины – это вещества, обладающие исключительно высокой биологической активностью, требуются животному организму в небольших количествах. Они участвуют в обмене веществ в качестве биокатализаторов [8]. В животном организме синтез витаминов отсутствует, за исключением витамина D.

Одним из широко известных витаминов, является аскорбиновая кислота (АК). Биологически активен только один из её изомеров — L-аскорбиновая кислота [9] – антицинготный витамин (витамин С) – сильный восстановитель, широко распространенный в природе. Его недостаток в пище человека в течение 1-3 месяцев способствует развитию гиповитаминоза С, а через 3-6 месяцев – авитаминоза С (цинге) [10].

Синтезируется аскорбиновая кислота растениями из различных гексоз (глюкозы, галактозы) схема приведена на рисунке 1 [8]. Синтетически витамин С получают из глюкозы.

Полисахариды (ПС) – это сложные углеводы (рисунок 2), которые благодаря способности образовывать коллоидные растворы, облегчают откашливание [11,12].

Полисахариды во всех организмах выполняют функции запасных (гликоген, крахмал), защитных (слизи), опорных (хитин, целлюлоза,) веществ [13].

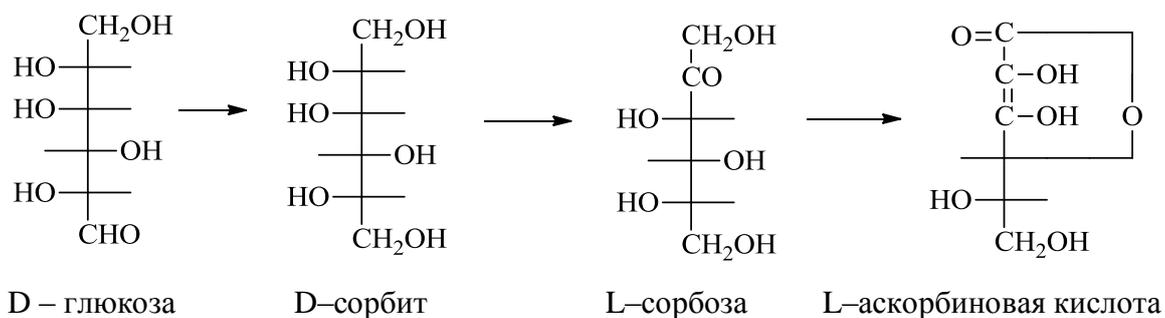


Рисунок 1 – Схема синтеза аскорбиновой кислоты

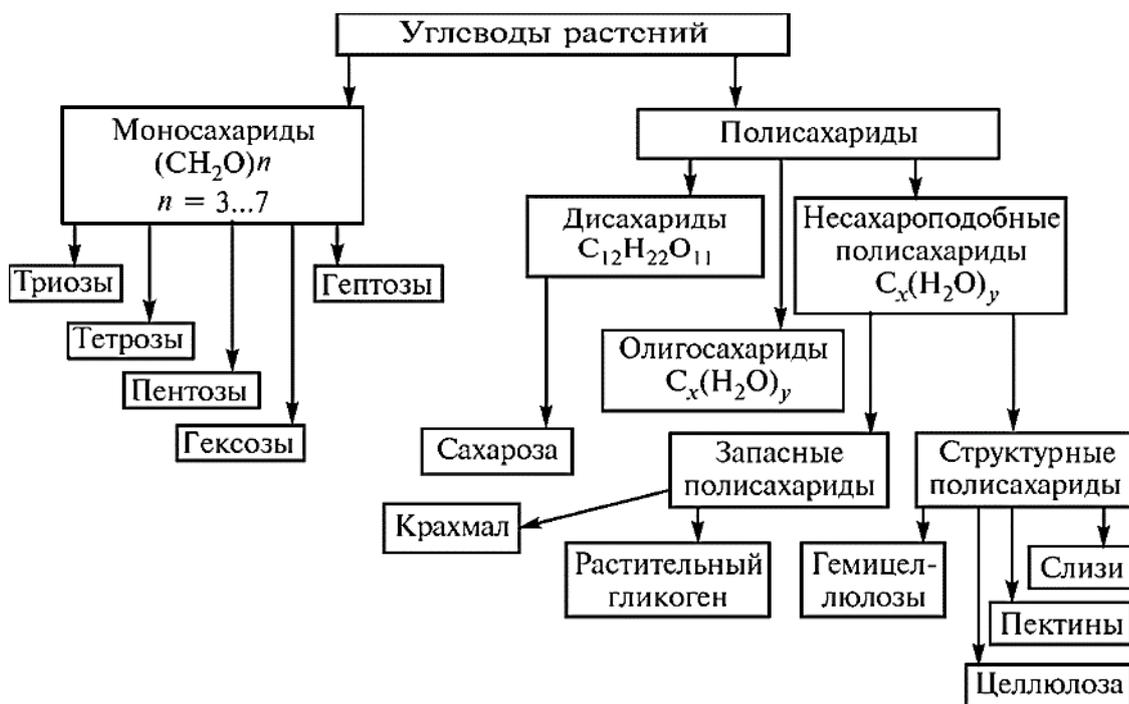


Рисунок 2 – Классификация углеводов растений

При гидролизе полисахариды образуют моносахариды или олигосахариды, схема гидролиза целлюлозы представлена на рисунке 3.

Пектиновые вещества – это несхароподобные структурные полисахариды. Они способны улучшать лечебный эффект основных действующих веществ при изготовлении лекарственных форм (в эмульсиях – эмульгатор, в пилюлях – связывающий компонент) [14].

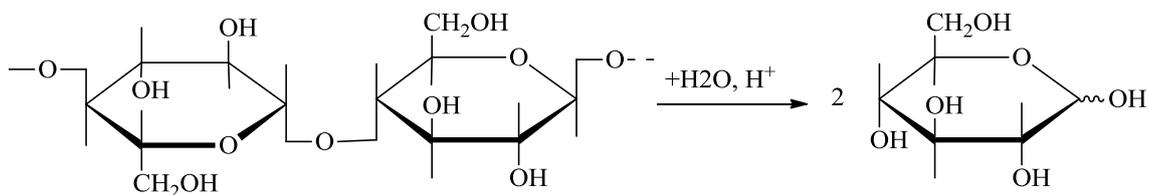


Рисунок 3 – Схема гидролиза полисахарида (целлюлозы)

Пектины относят к гетерополисахаридам, главным компонентом которых является D-галактурановая кислота [15,16]. Галактурановая кислота (гексурановая кислота) образуется в организмах окислением первичного гидроксила галактозы до карбоксильной группы, схема получения представлена на рисунке 4.

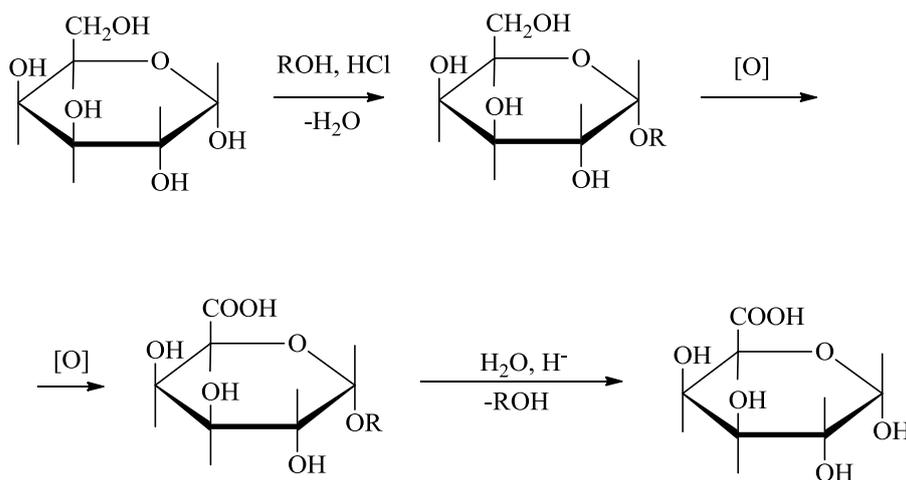


Рисунок 4 – Схема получения галактурановой кислоты из галактозы

Флавоноиды – продукты вторичного метаболизма растений, используются в медицине в качестве антиоксидантов, регулирующих свободнорадикальные процессы [17-19]. Они содержатся почти всех высших растениях, но встречаются так же в грибах и водорослях. Ими богаты семена, цитрусовые, оливковое масло и др [20-21].

Некоторые растения и специи, содержащие флавоноиды, использовались в течение тысяч лет в традиционной восточной медицине. Они представляют собой низкомолекулярные соединения, состоящие из

трехкольцевой структуры с различными заместителями. Флавоноиды являются производными хромона (рисунок 5) [22-24].

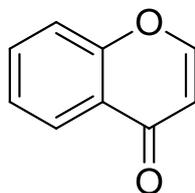


Рисунок 5 – Структурная формула хромона

Примерами флавоноидов, значимых для человека являются рутин и кверцетин [22]. В организме человека кверцетин, как и рутин, не вырабатываются [23, 24].

Рутин (витамин Р) – органическое соединение из группы флавоноидов, обладающее витаминной активностью (рисунок 6) [21, 24].

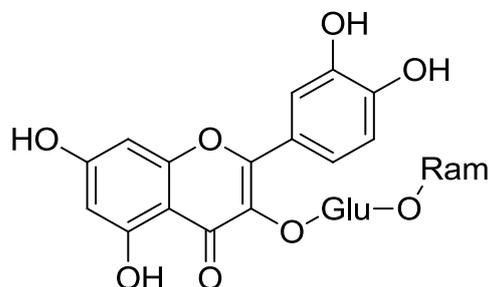


Рисунок 6 – Структурная формула рутина

Кверцетин является агликоном рутина (рисунок 7) [21, 24].

К основным функциям кверцетина и рутина относятся: иммуностимулирующее, спазмолитическое, противоязвенное, противоотечное, антиоксидантное, антигистаминное, противовоспалительное действие [23,24].

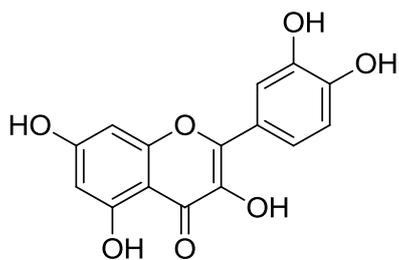


Рисунок 7– Структурная формула кверцетина

1.1.2 Фармакологическая значимость представителей лекарственных растений, обладающих отхаркивающим свойством

Применение лекарственных растений при болезнях органов дыхания имеет многовековую историю и наибольшее распространение. Широкие возможности взаимозаменяемости лекарственных растений позволяют использовать их в течение длительного времени без угрозы привыкания больного [25].

Нельзя забывать о нежелательных побочных эффектах синтетических препаратов. С этих позиций лекарственные растения явно предпочтительнее.

Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, обладающие отхаркивающим действием, содержат разные БАВ. Из них можно выделить группу растений, которая обуславливает фармакологический эффект за счет преимущественного содержания полисахаридов (слизей) – это листья мать-и-мачехи и подорожника большого, трава чабреца, корни и корневища девясила, корни алтея [26].

Подорожник большой (лат. *Plantago major*) – многолетнее травянистое растение, семейства подорожниковых, долгое время он считался сорняком, в настоящее время подорожник большой является лекарственным растением. Произрастает в России практически везде, кроме Крайнего Севера [27]. Листья подорожника большого содержат: полисахариды, слизи, флавоноиды, терпеноиды, и некоторые органические кислоты, которые оказывают отхаркивающее, противовоспалительное, анальгетическое, антиоксидантное,

слабо антибиотическое, иммуномодулирующее и противоязвенное действие [28]. Используют листья подорожника большого для приготовления лекарственных средств, чаще всего сиропов. Известны лекарственные средства, обладающие отхаркивающим эффектом на основе подорожника: «Экстракт подорожника биолит», «Бабушкин сироп», «КМ-тусофит», «Сиропыч», «Стоптуссин Фито», «Гербион с подорожником», «Эвкабал», «Доктор Тайс с подорожником.

Мать-и-мачеха (лат. *Tussilago*) — многолетнее травянистое растение, семейства астровых, цветет ранней весной до появления листьев [29]. Растет на лугах, холмах, пустырях, в садах, парках. По берегам рек иногда образует сплошные заросли [6]. Листья мать-и-мачеха содержат такие БАВ как полисахариды, слизи, флавоноиды, терпеноиды, органические кислоты, эфирные масла и аскорбиновую кислоту. В современной медицине настой из листьев мать-и-мачехи используют в качестве отхаркивающего, дезинфицирующего и противовоспалительного средства почти при всех заболеваниях верхних путей дыхательной системы. Настой листьев мать-и-мачехи применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта как средство, обладающие вяжущими свойствами. Так же траву мать-и-мачехи используют при лечении воспалительных заболеваний почек, мочевого пузыря, простудных заболеваний [29-31]. Лекарственным средством, обладающим отхаркивающим эффектом, которое имеет в своем составе траву мать-и-мачехи, является «Бабушкин сироп».

Чабрец (лат. *Thymus*) – род полукустарничков относится к семейству яснотковых, произрастает в умеренном поясе Евразии и северной Африки. Чабрец содержит множество БАВ: полисахариды, флавоноиды, дубильные вещества, терпеноиды, эфирные масла. Достаточно широко чабрец используют и в медицине. Отвары и порошок используют в качестве отхаркивающего средства в виде отвара или мази на меду тимьян успокаивает боль, чабрец способствует пищеварению [13, 32].

Лекарственными средствами на основе травы чабреца являются: «Бабушкин сироп», «Коделак бронхо», «Бронхikum С», «Пертусин», «Туссамаг», «Стоптуссин фито», «Эквкбал», «Доктор Тайтс», «Бронхосепт», «Бронхипрет ТП».

Девясил (лат. *Inula*) – род многолетних трав, семейства астровых, произрастающих в Евразии и Африке. Некоторые виды девясила декоративны [13]. Корневища и корни содержат полисахариды, следы алкалоидов, эфирное масло (до 4,3 %), сапонины смолы, инулин (до 44 %). Девясил обладает отхаркивающим, противовоспалительным, желчегонным и слабым мочегонным действием [26]. Лекарственными средствами, обладающими отхаркивающим эффектом на основе девясила являются: «Бабушкин сироп», «Доктор мом сироп».

Алтей лекарственный (лат. *Althaea officinalis*) – это многолетнее травянистое растение, семейства мальвовых, произрастающее в Европе, Азии, Северной Америке и на севере Африки. Основная зона культивации: Украина и Краснодарский край (Россия). Растение предпочитает влажную почву с близким расположением грунтовых вод. Поэтому часто растет в поймах рек и на заболоченной местности. Корни алтея содержат пектин (10–11%), сахара, слизи (до 35%), крахмал (до 37%), жирные масла (до 1,7%). Корни алтея обладают отхаркивающим, противовоспалительным, обволакивающим действием, облегчают спонтанную регенерацию тканей, уменьшают воспалительные процессы [33,34]. Из корней алтея получают различные лекарственные средства, обладающие отхаркивающим эффектом: «Алтей сироп», «Мукалтин», «Сироп алтейка», «Микстура от кашля сухая».

Перечисленные лекарственные растения используются в официальной медицине в виде водных экстрактов и в качестве сырья для изготовления лекарственных средств. Поэтому требования к контролю качества лекарственного сырья определены ГФ. С описанием официальных растений, временем сбора и числовыми показателями можно ознакомиться в 11 издании сборника ГФ СССР. Числовым показателем листьев подорожника

большого являются ПС, которых в сырье должно быть не менее 12%. Для листьев мать-и-мачехи, травы чабреца, корней и корневищ девясила и корней алтея числовых показателей БАВ в ФС не указано.

1.3 Методы исследования лекарственных растений

1.3.1 Хроматографические методы

Разделение сложных смесей хроматографическим методом основано на различной сорбируемости компонентов смеси (адсорбционная хроматография). Разделение основано на дифференциальном распределении между подвижной и неподвижной фазами [35-36].

1.3.1.1 Бумажная хроматография

В распределительной хроматографии на бумаге (бумажной хроматографии) применяют специфический носитель, таким носителем является специальная хроматографическая бумага.

Важной характеристикой в бумажной хроматографии, является хроматографическая подвижность (R_f), которую можно рассчитать по уравнению:

$$R_f = \frac{x_1}{L} \quad (1)$$

где x_1 – расстояние от стартовой линии до центра пятна; L – расстояние, пройденное за это же время растворителем.

Для начала наносится хроматографируемая проба на стартовую линию бумажной и подвергается действию растворителя (рисунок 8). После

поднятия растворителя проявляют бумагу при помощи специальных реактивов.

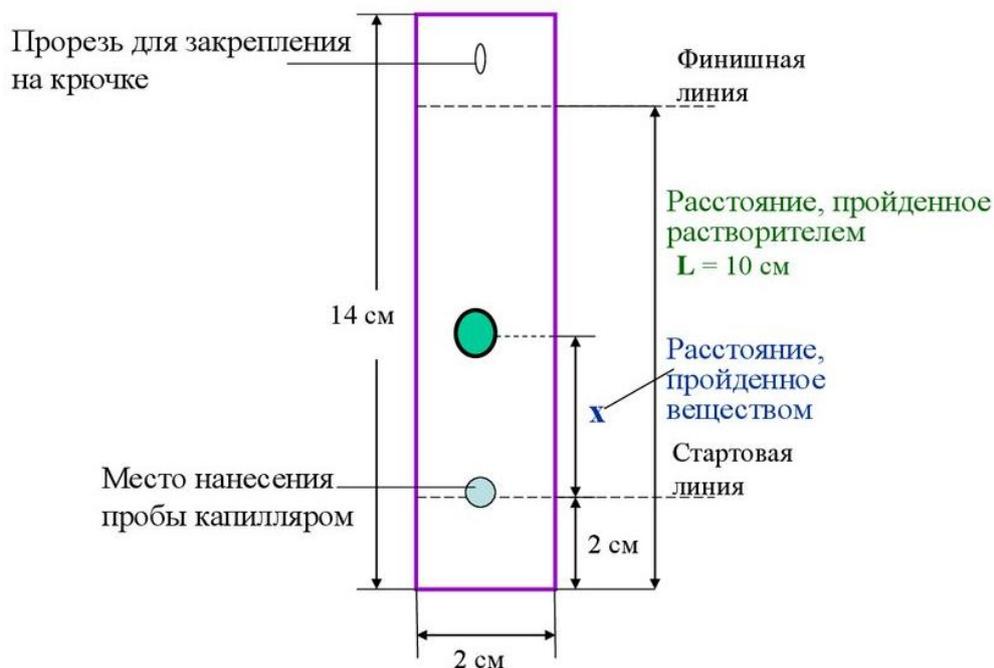


Рисунок 8 – Бумажная хроматография

Хроматографическая подвижность не зависит от концентрации вещества и присутствия других компонентов, она зависит только от природы вещества, от параметров бумаги и от свойств растворителя. При одинаковых условиях опыта и при однородном составе смеси эти коэффициенты остаются постоянными и могут быть использованы для идентификации компонентов смеси.

В выбранных растворителях компоненты пробы должны иметь разную растворимость, иначе разделение не произойдет [37].

1.3.1.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Современная жидкостная хроматография, также называемая высокоэффективной жидкостной хроматография (ВЭЖХ), была введена как

аналитическое разделение в начале 1970-х годов, и стала широко используемой хроматографической техникой. ВЭЖХ дополняет газовую хроматографию тем, что обеспечивает быстрый анализ термически лабильных, энергонезависимых соединений, который был бы трудным или невозможным для газовой хроматографии. Главной особенностью ВЭЖХ является разделение при высоком давлении. Некоторыми типичными примерами применения ВЭЖХ являются: разделение и количественное определение отдельных компонентов в сложных смесях, анализ чистых соединений из примесей и отделение чистых соединений.

Хроматография - это способ разделения смесей веществ с использованием двух фаз, одна из которых является не подвижной, а другая подвижной, движущейся в определенном направлении. Методы хроматографии разделены в соответствии с физическими состояниями двух участвующих фаз [38]. Схема устройства ВЭЖХ представлена на рисунке 9.

Существует несколько механизмов разделения веществ: адсорбционный, распределительный, ионообменный, эксклюзионный. Распределительный механизм лежит в основе жидкость-жидкостной хроматографии. К ней относятся методы обращено – фазовой и нормально – фазовой ВЭЖХ. В обращено – фазовой ВЭЖХ не подвижной фазой является не полярное вещество, а в качестве элюента используют полярный растворитель. В нормально – фазовой ВЭЖХ не подвижная фаза является более полярной, чем подвижная (элюент) [35]. Хроматография в самых различных формах является незаменимой технологией разделения, очистки или анализа одного, или нескольких компонентов из смеси [39].

Виды детекторов для ВЭЖХ: УФ, рефрактометрический, фотодиодно-матричный, флуориметрический, электрохимический, масс-селективный [40].

УФ-детекторы используются с высокоэффективной жидкостной хроматографией для обнаружения и идентификации аналитов (обнаруживаемый или количественно определяемый компонент) в образце. Ультрафиолетовый детектор ВЭЖХ использует свет для анализа образцов.

Измеряя поглощение света образца на разных длинах волн, его можно с легкостью идентифицировать. Эти детекторы могут использоваться любой лабораторией с использованием ВЭЖХ, включая геномные, биологические и биохимические лаборатории, для анализа нуклеиновых кислот, белков и для проведения токсических и терапевтических испытаний на наркотики. Два типа ВЭЖХ УФ-детекторов - это одиночные и переменные детекторы длины волны. Детекторы с одной длиной волны измеряют поглощение образцов одной длины волны, а датчики с переменной длиной волны измеряют поглощение нескольких длин волн и поэтому более чувствительны.

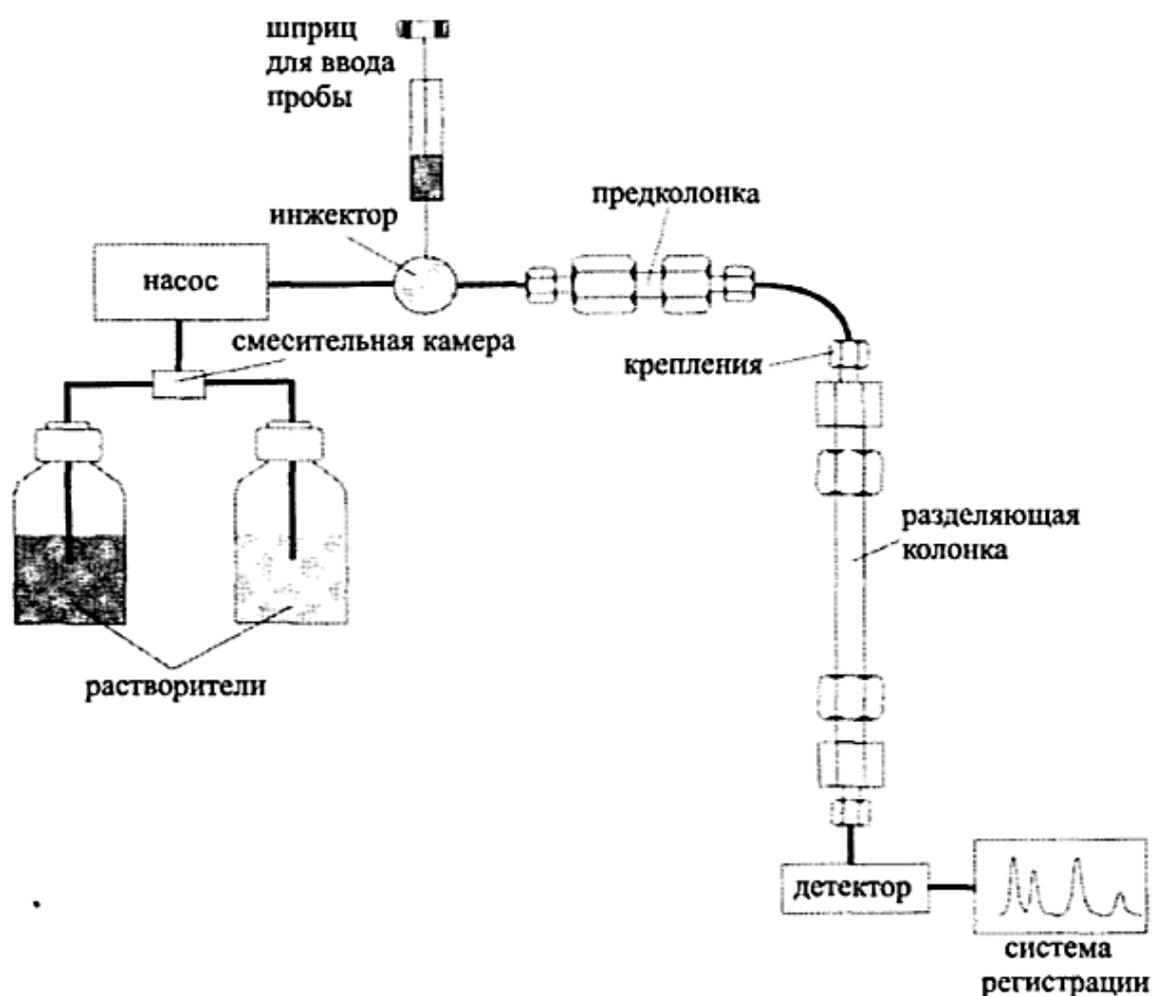


Рисунок 9 – Схема устройства ВЭЖХ

Рефрактометрические детекторы в ВЭЖХ используются с жидкостными хроматографами высокого давления при обнаружении веществ с ограниченным или отсутствующим поглощением УФ-излучения. Эти химическими компонентами являются спирты, сахара, жирные кислоты, полимеры и углеводы. Рефрактометрические детекторы считаются универсальными детекторами. Ограничением этих детекторов является отсутствие чувствительности; они также, как и УФ детекторы зависят от температуры и не подходят для градиентного элюирования. Некоторые функции, которые необходимо учитывать в рефрактометрическом детекторе, это контроль температуры, улучшенную базовую стабильность, низкий уровень шума, совместимость программного обеспечения и автоматические последовательности. Рефрактометрические детекторы могут быть простым и эффективным способом обнаружения аналитов, которые не поглощают УФ-излучение.

Из-за универсальности ВЭЖХ используют в различных промышленности и научных отраслях таких как судебная, фармацевтическая, экологическая и химическая. Некоторыми типичными примерами применения ВЭЖХ являются: разделение и количественное определение отдельных компонентов в сложных смесях, анализ чистых соединений из примесей и отделение чистых соединений для синтетической и/или идентификации цели. Ее можно использовать для анализа твердых веществ или жидкостей [41].

1.3.1 Титриметрические методы

Титриметрический анализ основан на точном измерении количества реактива, израсходованного на реакцию с определяемым веществом [42].

1.3.2.1 Кислотно-основное титрование

Кислотно-основное титрование представляет собой определение концентрации кислоты (основания) путем точной нейтрализации кислоты (основания). Для этого к анализируемому раствору кислот (основания) добавляют раствор реагента, называемого титрантом – основания (кислоты) известной концентрации до тех пор, пока определяемое вещество и титрант не окажутся в эквивалентных друг другу количествах. Этот момент, называемый точкой эквивалентности, можно зафиксировать по изменению окраски индикатора (таблица 1). Это позволяет количественно анализировать концентрацию неизвестного раствора кислоты (основания) [43]. В кислотно-основном титровании используется реакция нейтрализации, которая возникает между кислотами и основаниями

В качестве рабочих растворов используют растворы сильных оснований или растворы сильных кислот, концентрация которых от 0,05 до 1,0 моль/л.

Таблица 1 – Индикаторы для кислотно-основного титрования

Индикатор	Интервал перехода рН	pK_{Hind}	Изменение окраски
Метилловый фиолетовый	0...1,8	–	Желтая–фиолетовая
Тимоловый синий	1,2...2,8	1,65	Красная–желтая
Метилловый оранжевый	3,1...4,4	3,36	Красная–желтая
Метилловый красный	4,4...6,2	5,00	Красная–желтая
Феноловый красный	6,4...8,2	8,00	Желтая–красная
Тимоловый синий	8,0...9,6	9,20	Желтая–синяя
Фенолфталеин	8,2...9,8	9,53	Бесцветная–красная
Тимолфталеин	9,3...10,5	9,6	Бесцветная – синяя

Точную концентрацию титрованных растворов кислот и щелочей часто устанавливают при помощи фиксаналов (вещества с точной концентрацией в запаянных ампулах) [42].

1.3.2.2 Окислительно-восстановительное титрование

Окислительно-восстановительное титрование основано на протекании окислительно-восстановительных реакций, описанных с помощью зависимости равновесного потенциала системы от количества, добавленного титранта.

Восстановленная форма одного вещества, отдавая электроны, переходит в окисленную форму того же вещества. Окисленная форма второго вещества, участвующего в ОВР, принимая электроны, переходит в восстановленную форму того же вещества [42].

Индикацию в окислительно-восстановительном титровании осуществляют с использованием веществ способных существовать в окисленной и восстановленной форме (таблица 2).

Таблица 2 – Индикаторы окислительно-восстановительного титрования

Индикатор	Переход окраски	E (В, при pH=7)
Ферроин	красная - голубая	1,06
Дифениламин	бесцветная - синяя	0,76
Метиленовый голубой	голубая - бесцветная	0,01
Индигосульфоновая кислота	синяя - желтая	-0,11

Например, изменение окраски дифениламина происходит за счет отщепления электронов с образованием восстановленной формы (рисунок 10).

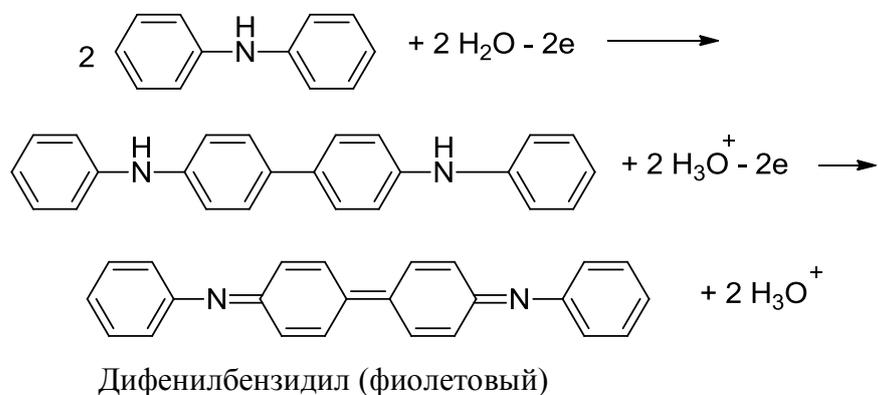


Рисунок 10 – Схема перехода окраски окислительно-восстановительного индикатора

1.3.2.3 Потенциометрическое титрование

Этот вид потенциометрического анализа широко используется в лабораторной практике. Он заключается в том, что точку эквивалентности при титровании определяют по резкому изменению разности потенциалов парой электродов, погруженных в анализируемый раствор.

Потенциал индикаторного электрода зависит от концентрации тех ионов, которые определяют потенциал. Если при титровании в результате реакции осаждения, нейтрализации, окисления – восстановления концентрация этих ионов уменьшается, соответствующим образом изменится и потенциал. Наибольшее изменение потенциала произойдет в момент полного связывания ионов, определяющих потенциал, т.е. в точке эквивалентности. Таким образом, электрохимический потенциал служит индикатором в процессе титрования.

Реакции, используемые при потенциометрическом титровании, должны быть практически необратимыми, протекать с большой скоростью и только в определенном направлении, а в точке эквивалентности должно происходить заметное изменение потенциала индикаторного электрода (скачок потенциала) (рисунок 11).

Приемы потенциометрического титрования: в анализируемый раствор погружают электродную пару и после добавления в каждой порции титранта измеряют электродный потенциал. При этом необходимо интенсивное перемешивание, по скольку в концентрации ионов в слое жидкости, прилегающим к электродам и концентрации ионов во всем растворе должны быть одинаковыми. При титровании состав раствора меняется, и в соответствии с новым составом раствора устанавливается новый равновесный электродный потенциал. Это происходит быстро, но не мгновенно, и после добавления каждой порции рабочего раствора нужно выдержать его в течении некоторого времени, перемешивая, после чего начать измерения электродного потенциала.



Рисунок 11 – Установка для измерения электродного потенциала

Результаты титрования вносят в таблицу и затем строят кривую титрования (рисунок 12). На оси абсцисс откладывают объём добавленного рабочего раствора, на оси ординат электродный потенциал (в милливольтгах). В точке эквивалентности плавный характер кривой изменяется. В зависимости от значения скачка потенциала на кривой появляется изгиб, или ступень. Отрезок оси абсцисс от нуля до точки, обозначающая скачок потенциала, соответствует объёму рабочего раствора, который израсходован на титровании до точки эквивалентности. Для обычных технических анализов точность этого графического приема вполне достаточна.

В начале титрования даже при добавлении большой порции рабочего раствора потенциал меняется незначительно. По мере приближении к точке эквивалентности каждая порция рабочего раствора вызывает все большее изменение потенциала. Максимальное изменение (скачок) потенциала происходит из точки эквивалентности.

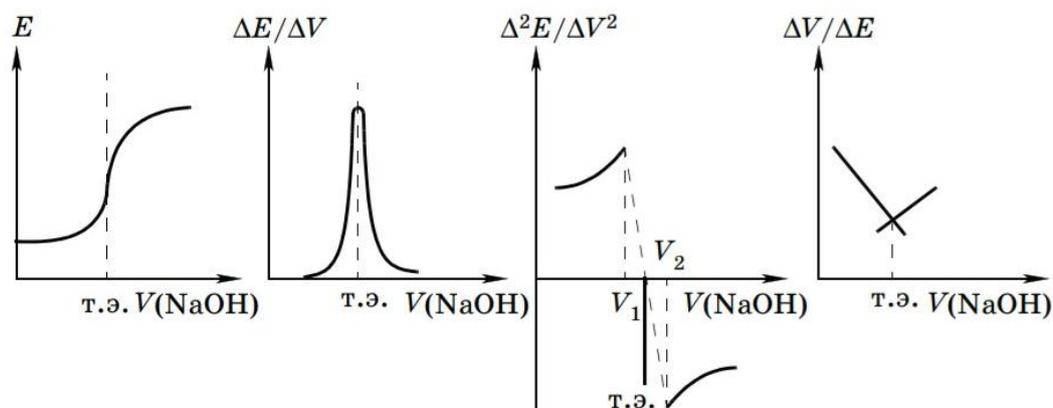


Рисунок 12 – Кривые потенциметрического титрования

Кривая потенциметрического титрования необходима для точного определения точки эквивалентности и для определения объема титранта в этой точке. Во многих химических анализах, где в точке эквивалентности потенциал резко меняется, расход рабочего раствора можно определить, не

прибегая к построению графика. Расчет ведут по обычной формуле объёмного анализа:

$$N_x = \frac{V \cdot N}{V_x} \quad (2)$$

где N_x – концентрация анализируемого раствора, моль-экв/л; V_x – объем анализируемого раствора, мл; N – концентрация рабочего раствора, моль-экв/л; V –объем рабочего раствора, израсходованный на титрование до точки эквивалентности.

Потенциометрическое титрование в общем случае требует большей затраты времени, чем титрование с индикатором. Поэтому потенциометрический метод применяют только в тех случаях, когда невозможно выполнить анализ обычными приемами объёмного анализа [44].

1.3.4 Спектрофотометрический метод

Каждое химическое соединение поглощает, передает или отражает свет (электромагнитное излучение) в определенном диапазоне длин волн. Спектрофотометрия - это измерение того, насколько химическое вещество поглощает, передает или отражает свет. Спектрофотометрия широко используется для количественного анализа в различных областях (например, химия, физика, биология, биохимия, материаловедение и химическая инженерия, клинические применения, промышленные применения и т. д.). Любое направление, использующее химические вещества или материалы, может использовать этот метод. Например, в биохимии он используется для определения ферментативно-катализируемых реакций. В клинических лабораториях он используется для исследования крови или тканей для клинического диагноза. Существует также несколько вариантов

спектрофотометрии, таких как атомно-адсорбционная спектрофотометрия и атомно-эмиссионная спектрофотометрия.

Спектрофотометр - это инструмент, который измеряет количество фотонов (интенсивность света), поглощаемых после прохождения через раствор образца. С помощью спектрофотометра мы можем определить количество известного химического вещества (концентрацию) [45].

В основе спектрофотометрического метода лежит закон Бугера - Ламберта – Бера [39]:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (3)$$

где A – оптическая плотность; ε – коэффициент светопоглощения; l - толщина светопоглощающего слоя; C – концентрация окрашенного вещества.

Основными параметрами, которые следует учитывать при выборе оптимальных условий фотометрических определений, является длина волны, оптическая плотность, толщина светопоглощающего слоя и концентрация окрашенного вещества [39].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Определение потери в массе при высушивании

Потеря в массе при высушивании происходит за счет удаления гигроскопической влаги, которую определяют в лекарственном растительном сырье при их высушивании до постоянной массы способом, описанным в фармакопейной статье [6]. Результаты определения представили в таблице 3.

Таблица 3 – Потеря в массе при высушивании

Содержание гигроскопической влаги в растительном сырье, %				
Листья подорожника большого	Трава чабреца	Листья мать- и-мачехи	Корни и корневища девясила	Корни алтея
5.20 \pm 0.04	4.48 \pm 0.03	4.39 \pm 0.03	3.68 \pm 0.02	5.94 \pm 0.04

После удаления гигроскопической влаги из образцов лекарственных растений установили, что в листьях подорожника большого и корнях алтея лекарственного содержание влаги больше, чем в остальных лекарственных растениях. Достоверно на 1.5 % меньше влаги содержится в корнях и корневищах девясила.

3.2 Количественное содержание полисахаридов в лекарственных растениях

Содержание ПС в листьях подорожника большого, согласно ФС, должно быть не менее 12%, для остальных объектов исследования данные не описаны. Из объектов исследования выделяли ПС и сравнивали между собой по содержанию [6]. Результаты представили на рисунке 13.

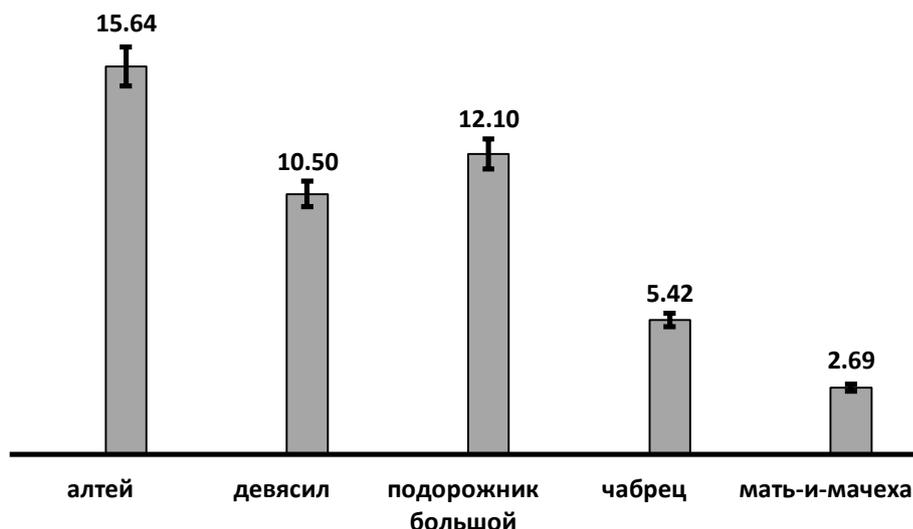


Рисунок 13 – Содержание полисахаридов

В результате анализа установили, что концентрация ПС в корнях алтея составляла 15.64 %, что на 3 % больше, чем в листьях подорожника большого. В траве чабреца и листьях мать-и-мачехи этот показатель был меньше в 3 и 5 раз соответственно. В корнях и корневищах девясила содержание ПС на 5 % меньше, у алтея.

2.3 Гидролиз полисахаридов и качественный анализ моносахаридов

При гидролизе полисахаридов идет разрушение гликозидной связи, тем самым полисахарид гидролизуется до моносахаридов.

Для установления наличия глюкозы и фруктозы в гидролизатах ПС исследуемых объектов, применяли метод бумажной хроматографии [46-47]. Параллельно на линию старта наносили образцы глюкозы и фруктозы. В результате получали хроматограммы, объединенная схема которых представлена на рисунке 14.

После проведения качественного анализа моносахаридного состава пяти лекарственных растений мы можем сделать вывод, что в листьях подорожника большого содержится фруктоза и глюкоза, в листьях мать-и-

мачехи, в траве чабреца и в корнях алтея содержится только глюкоза, а в корнях и корневищах девясила только фруктоза. Результаты подтверждаются литературными данными [48-52].

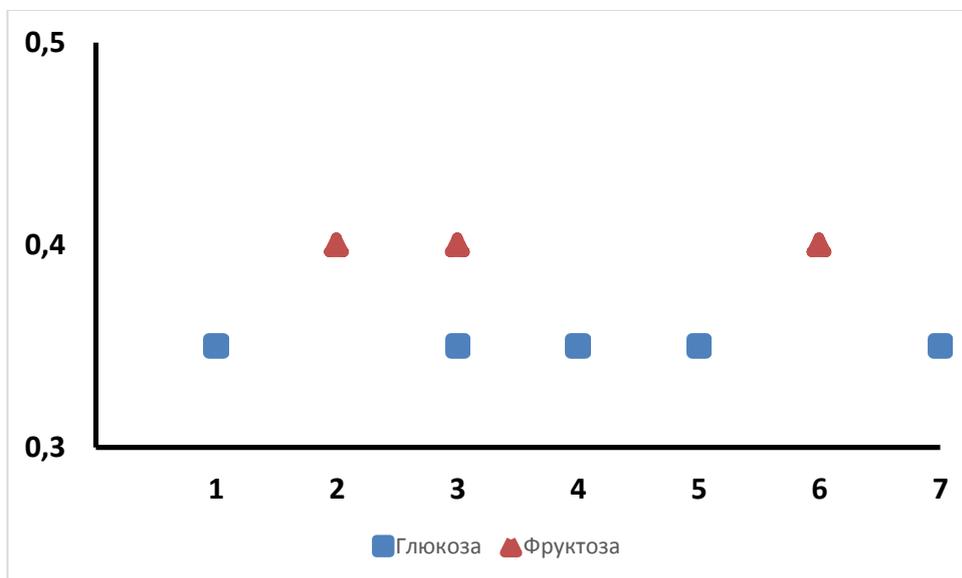


Рисунок 14 – Объединенная схема хроматограмм

По оси абсцисс: 1 – глюкоза, 2 – фруктоза, 3 – листья подорожника большого, 4 – листья мать-и-мачехи, 5 – трава чабреца, 6 – корни и корневища девясила, 7 – корни алтея.

По оси ординат: значение Rf.

2.4 Определение пектиновых веществ

2.4.1 Качественная реакция на наличие галактурановой кислоты

После проведения качественной реакции наблюдали красно-фиолетовое окрашивание во всех исследуемых лекарственных растениях, что свидетельствовало о наличии галактурановой кислоты в растворе (рисунок 15) [6].

Галактуроновая кислота содержится во всех пектиновых веществах и является их главным компонентом.

Проведением качественного анализа мы доказали содержание гетерополисахаридов. Гетерополисахариды – полисахариды, состоящие из нескольких моносахаридных остатков.

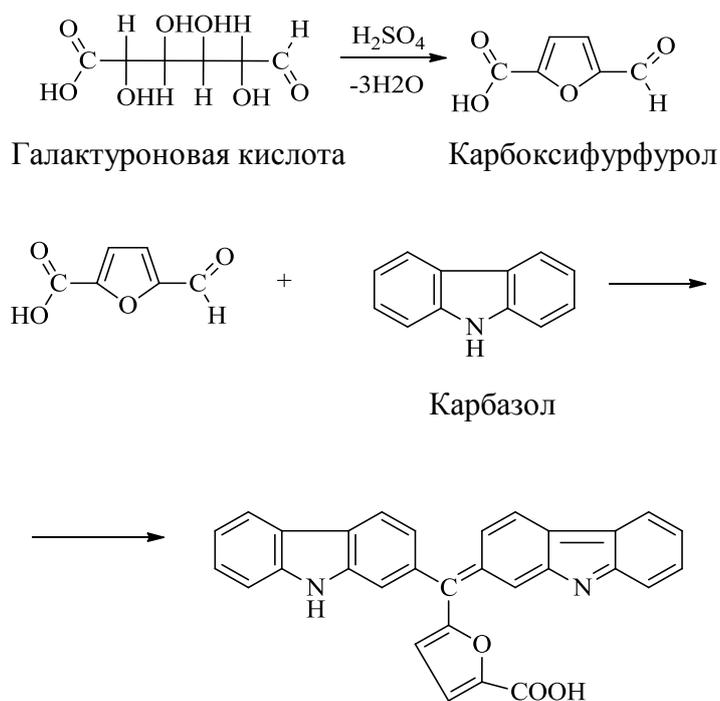


Рисунок 15 – Схема качественной реакции на галактуроновую кислоту

2.4.2 Количественное определение пектиновых веществ в лекарственных растениях

Пектиновые вещества экстрагировали из сухого шрота [6]. После проведения сравнительного анализа мы выяснили, что в листьях мать-и-мачехи содержание пектиновых веществ преобладает по сравнению с другими объектами исследования: в 2 раза больше, чем в корнях и корневищах девясила, в 1.5 раза больше чем в траве чабреца и корнях алтея (рисунок 16).

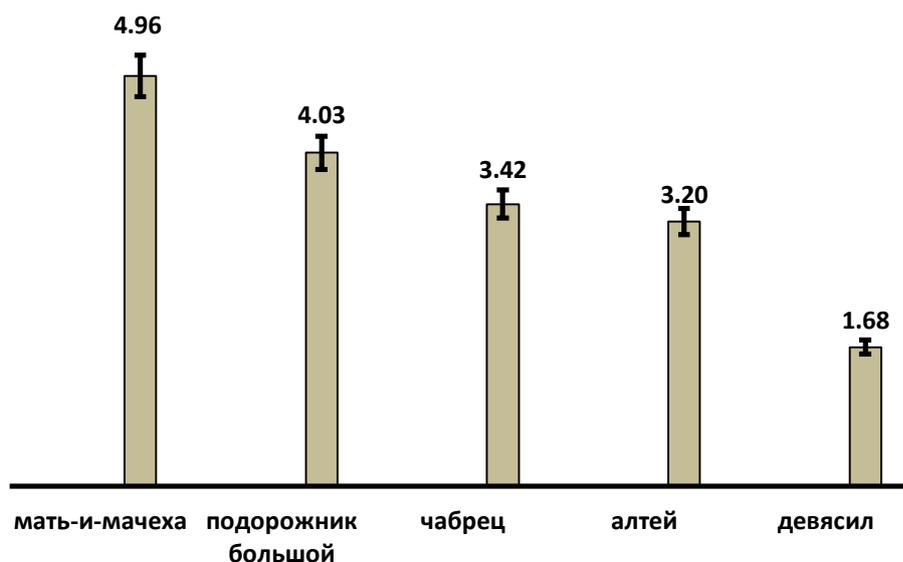


Рисунок 16 – Содержание пектиновых веществ в лекарственных растениях

Примечание: по оси абсцисс – название лекарственных растений, по оси ординат – концентрация ПВ, %.

2.5 Определение содержания витамина С йодометрическим титрованием

Исследование содержания витаминов было проведено на примере АК – водорастворимого витамина С, не вырабатываемого животным организмом [6]. Определение витамина С в лекарственных растениях проводили методом окислительно - восстановительного титрования. Результаты исследования показаны в таблице 4.

Наибольшее количество витамина С обнаружено в листьях подорожника большого.

В результате установлено, что в траве чабреца аскорбиновой кислоты содержится почти в 2 раза меньше, чем в других исследуемых образцах.

Таблица 4 – Содержание аскорбиновой кислоты в лекарственных растениях

Название растительного сырья	Содержание аскорбиновой кислоты, мг в 1 г сырья
Листья подорожника большого	0.870 ± 0.010
Трава чабреца	0.490 ± 0.040
Листья мать-и-мачехи	0.840 ± 0.020
Корни и корневища девясила	0.085 ± 0.020
Корни алтея	0.085 ± 0.030

2.6 Определение суммы флавоноидов

Флавоноиды играют антиоксидантную роль в растительном организме и очень широко распространены в высших растениях. Многие флавоноиды – пигменты, придающие разнообразную окраску растительным тканям.

2.6.1 Качественные реакции на флавоноиды

Взаимодействие с щелочами.

При взаимодействии извлечений с NaOH наблюдали желтую окраску у всех образцов, которая при нагревании изменялась до кирпичной или оранжевой, свидетельствующая наличие флавонов, флавонолов, флавононов, флаванололов [53].

Цианидовая проба.

Характерной качественной реакцией является цианидовая проба, проводимая при помощи концентрированной соляной кислоты и металлического магния [54]. Действие водорода приводит к восстановлению карбонильной группы и образованию насыщенного пиранового цикла,

который под действием концентрированной соляной кислоты превращается в оксониевое соединение, имеющее красную окраску, которую мы наблюдали в ходе реакций (рисунок 17). Эти наблюдения подтверждают присутствие флавоноидов в исследуемых объектах.

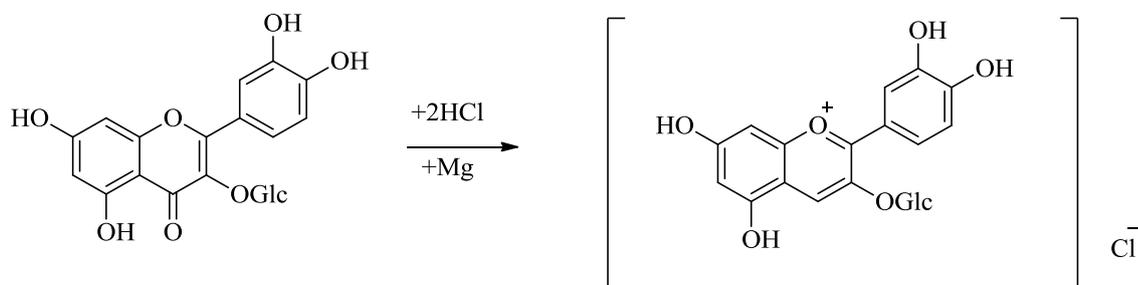


Рисунок 17 – Качественная реакция на флавоноиды

2.6.1 Спектрофотометрический метод определения суммы флавоноидов

Определение суммы флавоноидов проводили СФ методом, описанным в ГФ [6,55]. В корнях очень маленькое содержание флавоноидов, поэтому для более точного определения сумму флавоноидов в корнях определяли другими методами: ВЭЖХ и потенциометрическим титрованием.

После проведения сравнительного анализа мы можем сделать вывод, что содержание суммы флавоноидов в лекарственных растениях больше в листьях мать-и-мачехи, а меньше в листьях подорожника большого. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5– Содержание суммы флавоноидов

Содержание растительного сырья, %		
Листья подорожника большого	Трава чабрец	Листья мать-и- мачеха
0.460±0.001	0.591±0.001	0.601±0.001

2.6.2 Определение суммы флавоноидов методом ВЭЖХ

Для определения содержания суммы флавоноидов в исследуемых объектах, строили градуировочную зависимость площади пика рутина от его концентрации [56]. Для этого готовили стандартные растворы рутина и хроматографировали (рисунок 18). Затем хроматографировали исследуемые объекты и по градуировочному графику определяли концентрацию суммы флавоноидов (Таблица 6).

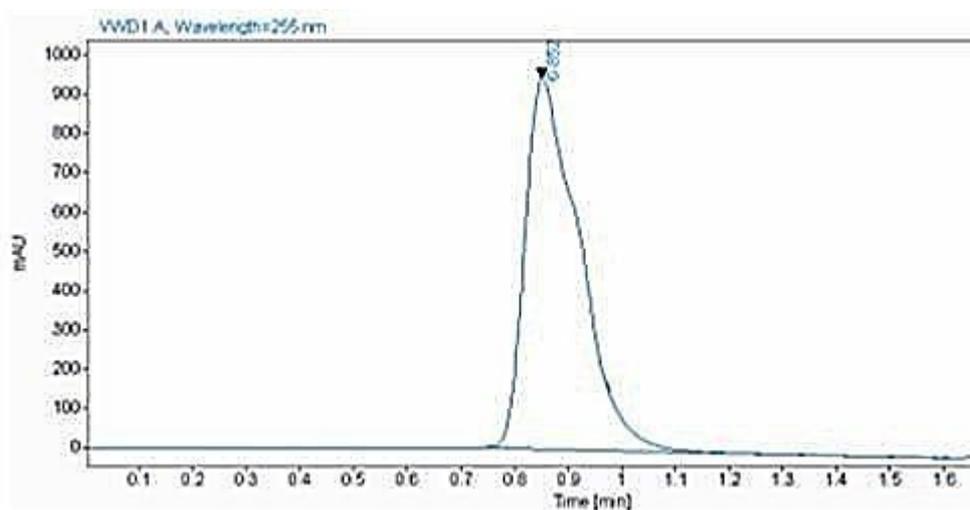


Рисунок 18 – Типичная хроматограмма рутина (концентрация 0,16 мг/мл)

Таблица 6 – Концентрация суммы флавоноидов

Название растительного сырья	Концентрация, мг/мл
Листья подорожника большого	0.317±0.006
Трава чабреца	0.620±0.008
Листья мать-и-мачехи	0.784±0.009
Корни и корневища девясила	0.056±0.002
Корни алтея	0.008±0.001

В результате анализа установили, что концентрация суммы флавоноидов уменьшается в ряду: листья мать-и-мачехи > трава чабреца > листья подорожника большого > корни и корневища девясила > корни алтея.

2.3.6.3 Определение суммы флавоноидов методом потенциометрического титрования

По результатам потенциометрического титрования построили кривые (рисунок 19-23) [53].

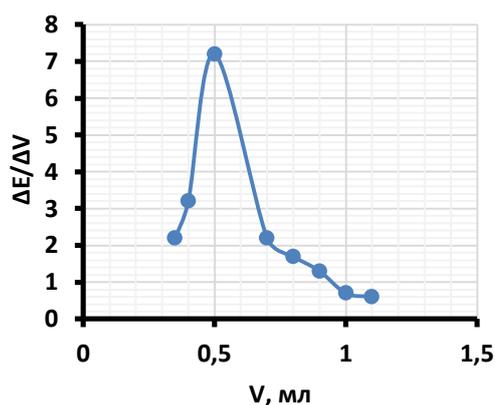


Рисунок 19 – Кривая титрования листьев подорожника большого

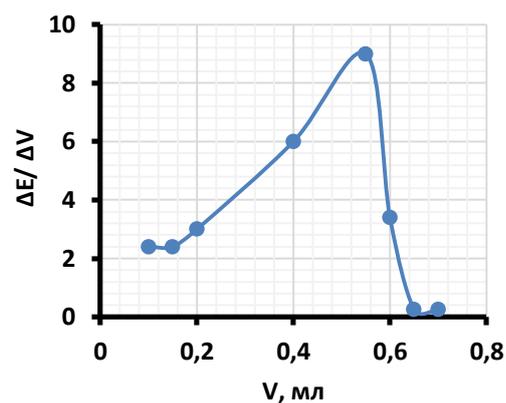


Рисунок 20 – Кривая титрования чабреца

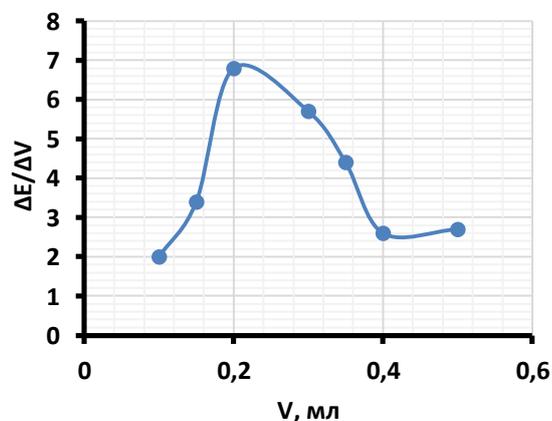
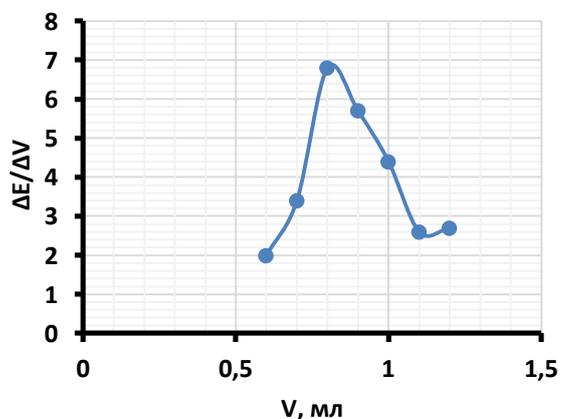


Рисунок 21 – Кривая титрования
листьев мать-и-мачехи

Рисунок 22 – Кривая титрования
корней и корневищ девясила

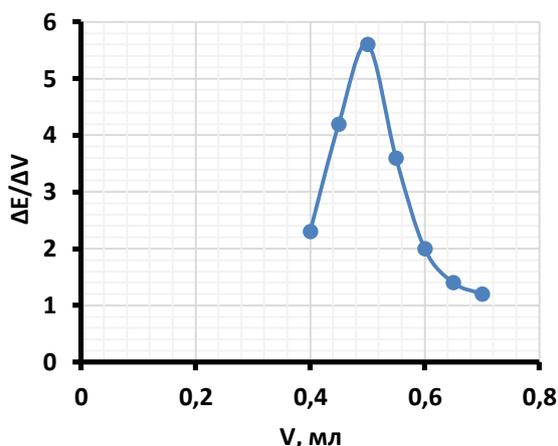


Рисунок 23 – Кривая титрования корней алтея

Вычислили нормальную концентрацию образцов и представили в таблице 7.

Таблица 7 – Концентрация флавоноидов в экстракте

Название растительного сырья	Концентрация, моль-экв/л
Листья подорожника большого	0.00125±0.00002
Трава чабреца	0.00138±0.00002
Листья мать-и-мачехи	0.00200±0.00002
Корни и корневища девясила	0.00113±0.00002
Корни алтея	0.00088±0.00001

В таблице показано, что содержание суммы флавоноидов больше всего накапливается в листьях мать-и-мачехи, что достоверно в 2 раза больше, чем в остальных исследуемых лекарственных растениях.

Суммируя полученные результаты по концентрации выбранных нами групп биологически активных соединений, содержащихся в пяти видах

лекарственного растительного сырья, обладающего отхаркивающим свойством: листьев подорожника большого и мать-и-мачехи, травы чабреца, корней девясила и алтея лекарственного, установили, что выбранные БАВ присутствуют во всех видах сырья с различной степенью депонирования (рисунок 24).

Известно, что из пяти исследованных видов растительного сырья только для листьев подорожника большого существует числовой показатель по определению полисахаридов в ФС 20: «Folia Plantaginis majoris. Листья подорожника большого».

Анализ полисахаридов показал, что их концентрация в корнях алтея выше на 3 %, чем в листьях подорожника большого. А учитывая, что лекарственных средств, изготавливаемых из корней алтея больше, чем из листьев подорожника большого (рисунок 25) можно предложить разработку практических рекомендаций по определению числового показателя «количественное определение полисахаридов» для ФС 64 «Radices althaeae. Корни алтея» с целью повышения требований к качеству лекарственного растительного сырья.

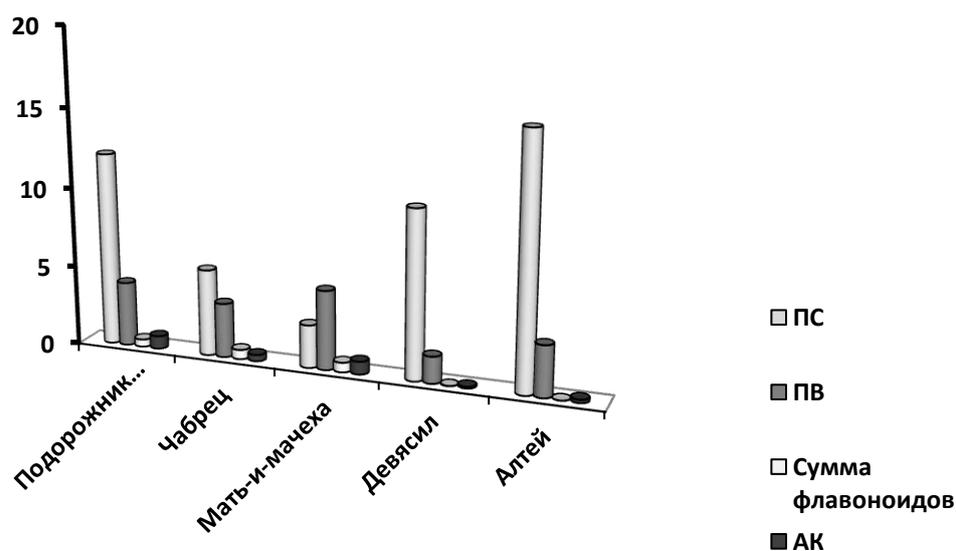
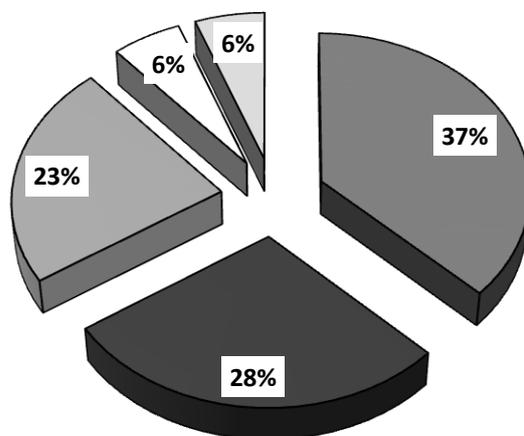


Рисунок 24 – Содержание БАВ (%) в исследуемых объектах



■ Чабрец ■ Аллея ■ Подорожник большой ■ Девясил ■ Мать-и-мачеха

Рисунок 25 – Число наименований лекарственных средств на основе лекарственных растений

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Реагенты, оборудование и объекты исследования

Оборудование:

1. Жидкостной хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы Agilent Technologies 1220;
2. Хроматографический шприц Agilent 1220;
3. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6x100мм), произведена в Agilent;
4. Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
5. Аналитические весы;
6. Сушильный шкаф;
7. Спектрофотометр Unicо 2800;
8. Магнитные мешалки.

Реагенты: серная кислота, щавелевая кислота, соляная кислота, уксусная кислота, метанол, этанол, ацетонитрил, карбазол, рутин, оксалат аммония, крахмал, гидроксид натрия, йодид калия, хлорид алюминия (III), йодат калия, карбазол, резорцин ортофосфорная кислота.

Объекты исследования: лекарственное растительное сырье: листья мать-и-мачехи, листья подорожника большого, трава чабреца, корни и корневища девясила, корни алтея.

3.2 Методики выполнения анализа

3.2.1 Определение потери в массе при высушивании сырья

Точную навеску 10.0 г вещества помещали в предварительно высушенный и взвешенный бюкс, сушили до постоянной массы при температуре 75°C [6]. Рассчитывали потерю в массе при высушивании сырья:

$$\omega = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m} \quad (4)$$

где m – масса высушенного бюкса, г; m_1 – масса бюкса с сырой навеской, г; m_2 – масса бюкса с сухой навеской, г.

3.2.2 Количественное определение полисахаридов в лекарственных растениях (осадок 1)

Точную навеску 10.0 г вещества троекратно экстрагировали водой. Водные извлечения объединяли и декантировали в мерную колбу 500 мл через 5 слоев марли. Объем полученного экстракта доводили до метки.

Отбирали 25 мл раствора и прибавляли 95% этиловый спирт в соотношении (1:3). Раствор перемешивая, подогревали на водяной бане при 30°C в течение 5 мин. Полученный осадок отфильтровывали под вакуумом на предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный фильтр. Осадок промывали раствором спирта в воде в соотношении (3:1). Фильтр с осадком высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 50°C [6]. Рассчитывали содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое вещество в процентах:

$$\omega = \frac{m_2 - m_1 \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - \omega)} \quad (5)$$

где m - масса сырья, г; m_1 - масса высушенного фильтра, г; m_2 – масса высушенного фильтра с осадком, г; ω – потеря в массе при высушивании сырья, %.

3.2.3 Гидролиз полисахаридов и качественный анализ моносахаридов методом бумажной хроматографии

Для установления моносахаридного состава водорастворимых полисахаридов проводили их гидролиз 2N серной кислотой при температуре 100 °С в течение 10 часов при постоянном перемешивании.

Для разделения моносахаридов наносили по 5 мкл приготовленных растворов на два хроматографических листа. Хроматографирование проводили в системе растворителей н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) параллельно с образцами фруктозы и глюкозы. После хроматографирования листы, высушивали при комнатной температуре и опрыскивали из пульверизатора. Один лист 1% спиртовым раствором резорцина с 0,2N раствором соляной кислоты, затем нагревали до 90 °С, а второй лист обрабатывали аммиачным раствором нитрата серебра и нагревали до 105 °С.

При этом на хроматограммах исследуемых лекарственных растений были выявлены зоны, по окраске и хроматографической подвижности, соответствующие зонам образцов глюкозы и фруктозы [46,47].

3.2.4 Определение пектиновых веществ

3.2.4.1 Качественная реакция на наличие галактуроновой кислоты

50 мл раствора едкого натра (0.1 моль/л) помещали в коническую колбу и добавляли полученный осадок 1. К 1 мл экстракта прибавили 0.25 мл раствора карбазола (0.5%) и 5 мл концентрированной серной кислоты. Смесь нагревали на водяной бане в течение 10 минут. При этом наблюдали красно-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о содержании галактуроновой кислоты в исследуемых лекарственных растениях [6].

3.2.4.2 Количественное определение пектиновых веществ в лекарственных растениях

Сухой шрот, полученный после экстракции полисахаридов трехкратно экстрагировали 0.5% раствором щавелевой кислоты и оксалата аммония (1:1) в течение 2 часов. Полученный экстракт осаждали пятикратным объемом 95% этилового спирта. Осадок отфильтровывали под вакуумом на предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный фильтр, затем высушивали до постоянной массы при температуре 50 °С [6]. Содержание (в процентах) пектиновых веществ рассчитывали по формуле:

$$\omega = \frac{m_2 - m_1 \cdot 100}{m} \quad (6)$$

где m - масса сырья, с учетом потери в массе при высушивании, г; m_1 - масса высушенного фильтра, г; m_2 – масса высушенного фильтра с осадком, г.

3.2.5 Определение содержания витамина С йодометрическим титрованием

Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на окислении ее йодом; при этом образуется окисленная форма (рисунок 26), или дегидроформа.

Навеску растительного сырья массой 1.00 г переносили в мерную колбу на 100 мл и добавляли 20 мл 1%-ного раствора соляной кислоты. Раствор доводили до метки 2%-ным раствором ортофосфорной кислоты, настаивали 10 мин и фильтровали. В 20 мл фильтрата добавляли несколько кристалликов KI и 2 капли 1%-ного раствора крахмала. Смесь оттитровывали раствором KIO_3 до устойчивого синего окрашивания. В контрольном титровании вместо 20 мл фильтрата брали 20 мл воды [6].

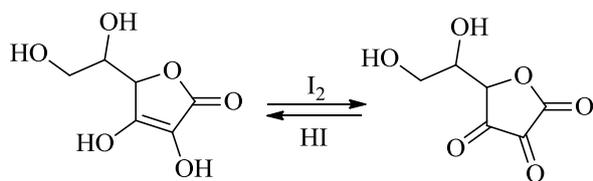


Рисунок 26 – Схема реакции окисления аскорбиновой кислоты йодом

Расчет содержания аскорбиновой кислоты вели по следующей формуле:

$$X = \frac{V_3 - V_2 \cdot V_1 \cdot 0,088 \cdot 100}{m \cdot V_2} \quad (7)$$

где 0,088 – 1 см³ 0,001 моль/дм³ КЮ₃ соответствует 0,088 см³ аскорбиновой кислоты; V₃ – объем раствора КЮ₃, затраченного на титрование экстракта, см³; V₄ – объем раствора КЮ₃, затраченного на контрольное титрование, см³; V₁ – общий объем экстракта, см³; V₂ – объем экстракта, взятого на титрование, см³; m – масса навески, г.

3.2.6 Определение суммы флавоноидов

1.0 г измельченного сырья, помещали в колбу с шлифом вместимостью 250 мл, затем прибавили 100 мл 70% раствора метанола. Колбу присоединили к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 45 минут, периодически перемешивая. Колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры. Извлечения отфильтровывали при помощи фильтровальной бумаги [53].

3.2.6.1 Качественные реакции на флавоноиды

Отношение флавоноидов к щелочам

2 мл извлечения, которые получили при экстрагировании сырья метиловым спиртом, помещали в пробирку и приливали к ним 1 мл 1% раствора едкого натра [53]. Наблюдали желтое окрашивание, характерное наличию в растворе флавонов, флавонолов, флавононов, флаванолов.

Цианидовая проба

2 мл извлечения, полученные при экстрагировании сырья метиловым спиртом, помещали в пробирку, добавляли несколько мг металлического магния и несколько капель концентрированной соляной кислоты. Наблюдали красное окрашивание, которое доказало нам наличие флавоноидов в растворе [54].

3.2.6.2 Спектрофотометрический метод определения суммы флавоноидов

2 мл извлечения флавоноидов (полученное ранее) помещали в мерную колбу объемом 25 мл, прибавляли 5 мл 5% раствора $AlCl_3$ в 70% метаноле и 1 мл 3% раствора уксусной кислоты. Объем раствора доводили до метки 70% метанолом и оставляли на 30 минут. Раствор сравнения: 2 мл извлечения, 1 мл 3% раствора уксусной кислоты, доведенный 70% метанолом до метки. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Unico 2800 при длине волны 410 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина, приготовленного аналогично испытуемому [55]. Содержание суммы флавоноидов в процентах в пересчете на рутин вычисляли по формуле:

$$x = \frac{A}{A_{\text{рут}}} \cdot \frac{m_{\text{рут}} \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m_{\text{нав}} \cdot 2 \cdot 100 \cdot (100 - w)} \quad (8)$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\text{рут}}$ – оптическая плотность рутина; $m_{\text{рут}}$ – масса рутина; $m_{\text{нав}}$ – масса навески исследуемого образца; w – потеря в массе при высушивании сырья.

3.2.6.3 Определение суммы флавоноидов методом ВЭЖХ

ВЭЖХ анализ суммы флавоноидов, лекарственных растений, осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220, оборудованном УФ-спектрофотометрическим детектором с использованием колонки ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6× 100 мм). Образцы исследовали при оптимальных условиях: длина волны составила 255 нм, объем вводимой пробы составил 50 мкл, скорость потока 1 мл/мин. Обработывали данные в программе LC 1220 OpenLAB online. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил с водой в соотношении (8:2) подкисленный ортофосфорной кислотой.

Для приготовления испытуемых растворов лекарственное сырье измельчали. Точную навеску взвешивали на аналитических весах и переносили в колбу со шлифом, далее прибавляли 100 мл 70 % метанола. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили на водяной бане 45 мин. Полученный раствор отфильтровали при помощи фильтровальной бумаги. После чего производили хроматографирование с целью обнаружения в них суммы флавоноидов [56].

Сумму флавоноидов в лекарственных растениях находили методом абсолютной градуировки. Для их определения прокальвали серию рутин различной концентрации, и по полученным данным строили градуировочный график (рисунок 27). Затем, по методу наименьших квадратов находили уравнение для расчета содержания суммы флавоноидов в определяемых лекарственных растениях.

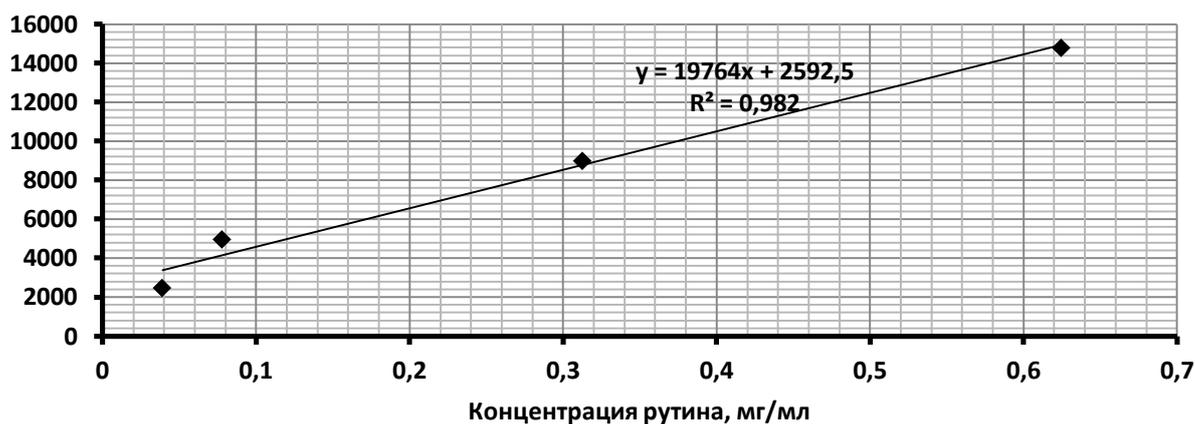


Рисунок 27 – Градуировочная прямая рутина

3.2.6.4 Определение суммы флавоноидов методом потенциометрического титрования

Потенциометрическое титрование основано на определении точки эквивалентности по результатам потенциометрических измерений. В точке эквивалентности происходит скачок потенциала индикаторного электрода. В качестве титранта использовали NaOH.

Приготовили 0.05N раствор NaOH и стандартизировали его 0.1N раствором HCl. В конические колбы налили по 20 мл экстракта. Добавляли по 1 мл титранта и измеряли потенциал при помощи pH-метра. Строили графики зависимости $\Delta E/\Delta V-V$ для нахождения объема в точки эквивалентности, при помощи программы Microsoft Excel. Затем рассчитывали концентрацию по закону эквивалентов [53].

Статистика: для исследований отбирали по три представительных пробы для каждого вида анализа.

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel 2010.

Значения всех величин рассчитывали как средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность отличий оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента ($P < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлены сходства качественного и различия количественного содержания полисахаридов, пектиновых веществ, флавоноидов и витамина С при сравнительном анализе БАВ пяти видов лекарственного растительного сырья: листьев подорожника большого и мать-и-мачехи, травы чабреца, корней девясила и алтея лекарственного. Обнаружено, что содержание полисахаридов в корнях алтея на 3 % больше, чем в листьях подорожника большого. Аккумуляция пектиновых веществ в листьях мать-и-мачехи в 1.5-2 раза больше, чем в остальных исследуемых растениях. Концентрация суммы флавоноидов максимальна в травах чабреца и мать-и-мачехи и превышает в 2 раза содержание этого БАВ в листьях подорожника большого. Трава чабреца содержит витамин С в 1.7 раза меньше, чем остальное исследуемое лекарственное растительное сырье.

2. Полученные результаты являются основой для разработки практических рекомендаций по определению числового показателя «количественное определение полисахаридов» для фармакопейной статьи 64 «*Radices althaeae*. Корни алтея» с целью повышения требований к качеству лекарственного растительного сырья, обладающего отхаркивающим свойством.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корнеева А. День лёгочного здоровья в России // Мед-инфо. – 2012.
2. Кирилук А. А., Петрище Т. Л. Особенности влияния биологически активных веществ лекарственных растений на фармакологическую активность лекарственных средств // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2017. №2. С. 1-12.
3. Бубенчиков, Р.А. Фитохимическое и фармакологическое изучение растений рода фиалка: Автореф. дис.канд.мед. наук. – Купавна, 2002. – 24 с.
4. Яковлева Г.П. Лекарственное сырье животного и растительного происхождения. Фармакогнозия. / Г.П. Яковлева – Спб.: Спецлит, 2006. – 845с.
5. Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств " от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ // Собрание законодательства Российской Федерации. 2014 г. Ст. 429-ФЗ с изм. и допол. в ред. от 28.12.2017 г.
6. Государственная фармакопея СССР. - 11- изд. - М.: Медицина, 1987. - Вып. 1. -277 с.
7. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002.
8. Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеёнок / Витамины. - Минск: Асар, 2002. 112 с.
9. Определение аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах методами капиллярного зонного электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии / Е.В. Зыкова, Н.Г. Сандецкая, В.Е. Веровский., О.В. Островский // Химико-фармацевтический журнал. – 2010.- Т.44, №8. – С. 39-41.
10. Громова О.А., Торшин И.Ю., Захарова И.Н., Спиричев В.Б., Лиманова О.А., Боровик Т.Э., Яцык Г.В. «О дозировании витамина d у детей и подростков». Вопросы современной педиатрии. 2015, - С. 38-47.

11. Беликов В. Г., Якимова Ю. В. Изучение полисахаридного состава отходов зерна проса *Panicum milliaceum* L // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2008. №1. – С. 116-119.
12. Olennikov D.N., Agafonova S.V., Rokhin A.V., Borovskii G.V., Penzina T.A. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. Vol. 48. Pp. 65–70.
13. Советский энциклопедический словарь / Научно-редакционный совет: А. М. Прохоров, М. С. Гиляров, Е. М. Жуков и др. – М.: «Советская Энциклопедия», 1980. – 1600 с.
14. Лавренова Г.Ю., Чернов И.П. Сравнительная оценка влияния некоторых растительных полисахаридов на воспалительный процесс и регенерацию хронической язвы // *Фармакология и токсикология.* – 1983. – № 4. – С. 85–89.
15. Органическая химия: учебник для вузов: В 2 кн. Кн 2: Специальный курс / Н. А. Тюкавкина, С. Э. Зурабян, В. Л. Белобородов и др.; под ред. Н. А. Тюкавкиной. – М.: Дрофа, 2008. – 592с.
16. Органическая химия: учебник / Н. А. Тюкавкина [и др.]; под ред. Н. А. Тюкавкиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 640с
17. Лобанова А. А., Будаева В. В., Сакович Г. В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // *Химия растительного сырья.* 2004. №1. – С. 47-52.
18. Птицын А. В. Технология выделения флавоноидов винограда *Vitis vinifera* сорта "Изабелла" для косметики и изучение их свойств: автореф. дис. канд. хим. наук: 03 00 23 . - М., 2007. - 130 с.
19. Яковлева А. И., Семенова В. В., Биологически активные вещества пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. произрастающей в Центральной Якутии // *Химия растительного сырья.* 2010. №3. – С. 147-152.
20. Яковлева, Г.П. Лекарственное сырье животного и растительного происхождения. Фармакогнозия. / Г.П. Яковлева – Спб.: Спецлит, 2006. – 845с.

21. Middleton E/, Kandaswami C., Theoharides T. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer // The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. - 2000. - №4. - P. 673-674.
22. Химия растительного сырья №4. – 2007. – С. 73-77.
23. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
24. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б.Н. Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер. – М.: Наука, 2002.
25. D S Alviano, C S Alviano Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2009. – Vol. 10, №1. – P.106–121
26. Ложкин Ю. Г., Андреева Д. М, Давыдова В. Н. Отхаркивающие средства растительного происхождения // Фармация. - 2013. - №2. - С. 52-56.
27. Muhammad Z. Genetic and environmental effects on polyphenols in *Plantago major* // Swedish University of Agricultural Sciences. – 2010.
28. Jamilah J., Sharifa A.A., Sharifah N.R.S.A GC-MS Analysis of Various Extracts from Leaf of *Plantago major* Used as Traditional Medicine // World Applied Sciences. - 2012. - №17. - P. 67-70.
29. Мать-и-мачеха / Т. В. Егорова // Ломбард — Мезитол. — М.: Советская энциклопедия, 1974. — (Большая советская энциклопедия: [в 30 т.] / гл. ред. А. М. Прохоров; 1969—1978, т. 15
30. Ботанико-фармакогностический словарь / К. Ф. Блинова, Н. А. Борисова, Г. Б. Гортинский и др., под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. - М: Высш. шк., 1990. - 272 с.
31. Кароматов И. Д., Ибатов Х. Б., Амонов М. К. Лекарственное растение мать-и-мачеха // Биология и интегративная медицина. - 2017. - №5. - С. 216-222.

32. Morales R. et al. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus* // *Thyme: The Genus Thymus* / Elisabeth Stahl-Biskup und Francisco Sáez. — CRC Press, 2002. — P. 1-43.
33. Мазнев Н. И. Золотая книга лекарственных растений / Н. И. Мазнев. — 15-е изд., доп. — М.: ООО «ИД РИПОЛ Классик», ООО Издательство «ДОМ. XXI век», 2008. — 621 с.
34. Чухно Т. Большая энциклопедия лекарственных растений / Т. Чухно. — М.: Эксмо, 2007. — 1024 с.
35. Отто М. Современные методы аналитической химии. - 2 изд. - М.: Техносфера, 2006. - 416 с.
36. Murry J. Organic chemistry: with biological applications. - 2nd ed. - Belmont: CA: Brooks/Cole, 2011. - 395 p.
37. Аналитическая химия. В 2 кн. Кн 2: Физико-химические методы анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец. / В. П. Васильев. — 6-е изд., стереотип. — М.: Дрофа, 2007. — 383с.
38. Ing Q., Enantiomeric Separation of Triazole Fungicides with 3-Im and 5-Im Particle Chiral Columns by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography / Q. Ing, D. Shouhui, Z. Chuangmu, Y. Shuming, C. Tingting, B. Mei // *Chirality*. — 2011. — №23. — PP. 479-486.
39. Buddhadeb M., Bulbul C., Deb N. Principles of Chromatography. - New York: Copyrigh, 2016. — С. 1-10.
40. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учеб. пособие / М.И. Лебедева. Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2005. 216 с.
41. James M. Encyclopedia of Applied Spectroscopy. - Weinheim: Copyright, 2009. — 48с.
42. Васильев В.П. Аналитическая химия. - 2 изд. - М.: Дрофа, 2002. - 368 с.
43. The Chemical Age – Chemical Dictionary – Chemical Terms. Hesperides. 2007. P. 14.

44. Гурвич Я. А. Химический анализ: Учебник для средних ПТУ. – М.: Высш. шк., 1985. – 295с.
45. Atkins, Peter and Julio de Paula. Physical Chemistry for the Life Sciences. New York: Oxford University Press, 2006.
46. Sinner M., Puls J. J. The chromatographic behavior of polysaccharides // *Chromatography*. 1998. V. 156. P. 194-204.
47. Ананьина Н. А., Андреева О. А., Оганесян Э.Т. Полисахариды клубней георгины простой // *Химия растительного сырья*. - 2008. - №2. - С. 135-136.
48. Соснина С. А. Сравнительное фармакогностическое изучение, стандартизация сырья и фитопрепаратов видов рода *Plantago L.*: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.02. - Пермь, 2009. - 25 с.
49. Олейников Д.Н., Samuelsen А.В., Танхаева Л.М. Подорожник большой (*Plantago májor*). Химический состав и применение. // *Химия растительного сырья*. – 2007, №2. – С. 37–50.
50. Голубева И.С., Сорокина А.А. Изучение углеводов сырья алтей лекарственного: В сб. научных трудов конгресса «Традиционная медицина» – 2007 – С. 50–51.
51. Корж А.П., Гурьев А.М., Белоусов М.В. и др. Моносахаридный состав полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи // *Бюлл. сибирской медицины*. – 2011. т. 10, № 5. – С. 62–65.
52. Азарова А. В. Фармакогностическое изучение девясила иволистного: автореф. дис. канд. фарм. наук: 14.04.02. - Курск, 2014. - 118 с.
53. Каухова И. Е., Особенности экстрагирования биологически активных веществ двухфазной системой экстрагентов при комплексной переработке лекарственного растительного сырья / И. Е. Каухова // *Растительные ресурсы*. – 2006. – Т.42. – Вып. 1. – С. 82-91.
54. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е. А. Краснов, Т. П. Березовская, Н. В. Алексеюк, Н. И. Белоусова, Л. А.

Демиденко, В. В. Дудко, С. Е. Дмитрук, Г. И. Калинкина, Г. А. Романова, -
Томск: Томского университета, 1987. - 184 с.

55. Бубенчиков Р. А. Спектрофотометрический метод определения содержания суммы флавоноидов в надземной части *viola odoratal* // Научные ведомости. - 2011. - №9. - С. 192-194.

56. Марчишин С. М., Козачок С. С., Баев А.А. Определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот в траве *Tropaneolum majus L.* методом ВЭЖХ // Медицинские фармацевтические науки. - 2014. - №1.