

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

ZHUSUPOVA A.I., ZHUSUPOVA G.E., LITVINENKO Y.A.

METHODOLOGY OF PROCESSING MEDICAL PLANT RAW MATERIALS

Study guide

Almaty
Kazakh national university
2019

Recommended for publication
Academic Council of the Faculty of Chemistry and Chemical Technology
A-Farabi Kazakh national university

Reviewers

Doctor of Chemical Sciences, Professor Dzhiembaev B.Zh.
Doctor of Biological Sciences, Professor Shalahmetova TM

Zhusupova G.E., Litvinenko Yu.A., Zhusupova A.I.

Methodology for the processing of medicinal plants: A training manual. - Almaty: Kazakh University, 2019. - 150 p.

The training manual "Methodology for processing medicinal plant materials" deals with the preparation and processing of medicinal plant materials with the establishment of parameters of its authenticity and quality indicators in accordance with the regulatory requirements of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, harmonized with the European Pharmacopoeia. The technological schemes for the isolation of substances and tinctures from pharmacopoeial medicinal plant raw materials are presented, as well as the issues of their standardization with the definition and identification of active substances in them and the preparation of technological schemes in terms of their laboratory developments and pilot production.

Recommended for students engaged in research of medicinal plant materials with the aim of its introduction into medicine

Bibliography name 26. Fig. 59. 16 Tables.

Zhusupova A.I., Zhusupova G.E., Litvinenko Y.A.
A-Farabi Kazakh national university, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	Page
Definitions	5
Notation and abbreviations	6
Introduction	7
1 Harvesting and processing of medicinal plant materials	10
2 Indicators of the quality of medicinal plant raw materials in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan	15
2.1 Definition	16
2.2 Identification	16
2.2.1 Macro and Microscopy	16
2.2.2 Classification, structure, properties and detection of some groups of biologically active substances of medicinal plant materials.	25
2.2.2.1 Amino Acids	25
2.2.2.2 Vitamins	38
2.2.2.3 Carboxylic acids	50
2.2.2.4 Polyphenols	52
2.2.2.5 Carbohydrates	66
2.3 Tests	84
2.3.1 Impurities	84
2.3.2 Loss on drying	84
2.3.3 Ash content	85
2.3.3.1 Total ash	85
2.3.3.2 Ash, insoluble in 10% hydrochloric acid	85
2.3.3.3 Sulfate Ash	86
2.3.4 Heavy metals	87
2.3.5 Radionuclides	88
2.3.6 Aflotoxins	88
2.3.7 Pesticides	89
2.3.8 Microbiological Purity	95
2.4 Quantitative determination of some groups of biologically active substances of medicinal plant materials	97
2.4.1 Quantitative determination of amino acids	102
2.4.2 Quantitative determination of vitamins	102
2.4.3 Quantitative determination of carboxylic acids	103
2.4.4 Quantitative determination of polyphenols	105
2.4.5 Quantitative determination of carbohydrates	110
3 Processing technology of medicinal plant materials. Technology processing roots Kermeina Gmelin. Development of regulatory documentation..	113
3.1 The degree of grinding of processed medicinal plant materials.	113
3.2 Development and optimization of the technology of extracting the substance Gmelin from the roots of Kermega Kermek as a dry extract and its standardization. Development	114

of regulatory documentation.	
3.3 Development and creation of a new effective medicinal product in the form of tincture from the roots of Kerme Gmelin and its standardization. Development of regulatory documentation..	122
4 Integrated processing of pine bark to obtain a range of popular products (proanthocyanidins, pectins and anthocyanidin chloride)	130
5. Examples of industrial processing of various types of wild medicinal plant materials	132
5.1 Technological features of obtaining drugs of ascorbic acid	132
5.2 Production technology of sea buckthorn oil	133
5.3 Production technology tincture valerian	134
5.4 Technology for processing flowers of immortelle sandy, containing flavone glycosides	135 136
5.5 Technological features of the production of anthrasenine	137
5.6 Technology of processing vegetable raw materials containing tannins	138
5.7 Technological features of kelling production	139
5.8 Technological features of the production of rutin from buds of the Japanese Saphora	141
6 Conclusion	143
7. Literature	145
8. Applications	

DEFINITIONS

The textbook uses the following terms with the appropriate definitions:

1. Amino acids, vitamins, carboxylic acids, microelements, di-, oligomeric, polymeric proanthocyanidins, sterols, phenolic acids, flavonoids, carbohydrates ически biologically active substances of medicinal plants, providing their therapeutic value and specific pharmacological properties.

2. Biological screening (bioscreening) - testing of drugs for biological activity in vitro.

3. Validation of the production process - assessment of the production process in order to document that the process will ensure the release of the finished product with a high degree of reliability in accordance with the established regulations and / or requirements of regulatory documents.

4. Auxiliary materials or excipients - substances and materials used in the production process of the finished product, but not intended for separate use as a medicine.

5. Finished products products that have passed all stages of the technological process, including packaging and labeling.

6. Kermek Gmelin is a species of the plant genus Kermek of the family Leech.

7. Acid, enzymatic, thiol, alkaline hydrolysis, alkaline cleavage - methods of chemical analysis.

8. Control of the production process a set of types of control (stepwise control, environmental control, monitoring of equipment cleanliness, etc.) carried out to monitor the technological process during production, adjust if necessary technological parameters and ensure compliance of the finished product quality with the requirements of regulatory documents.

9. Dosage form - form of finished medicinal products.

10. Residual pesticides - substances that include residual amounts of pesticides and any derivatives of pesticides (products of conversions, reactions, metabolites, impurities).

11. Sample for the determination of residual pesticides and heavy metals - a certain amount of the sample, selected by the method of quartering from the combined sample.

12. Substance - complex of biologically active substances, released in the form of liquid, thick or dry extracts from plant materials during its extraction with organic solvents and their mixtures with water.

13. Technological scheme of production - a scheme reflecting the sequence and interrelatedness of the stages of the technological process of production of a medicinal product.

14. UV, IR, mass, ^1H NMR, ^{13}C NMR - spectral analysis methods used to identify organic substances, i.e. to establish their fine structure.

15. Phytopreparations - pharmaceutical preparations of plant origin.

SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

- AND - analytical regulatory document
BAS - biologically active substances
BUV - n-butyl alcohol-acetic acid-water
BH - paper chromatography
WAND - Interim Analytical Regulatory Document
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
GLC - gas-liquid chromatography
GC - gas chromatography
GF RK - State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan
DMSO - dimethyl sulfoxide
EФ - European Pharmacopoeia
IR spectrum - infrared spectrum
Coupling constants - the constant spin-spin interaction
LP - drug
LRS - medicinal plant materials
LS - drug
NTSELS MZ RK - National Center for Expertise of Medicinal Products, Medical Devices and Medical Equipment of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan
FLOOR - lipid peroxidation
TP - technological process
TLC - thin layer chromatography
UV spectrum - ultraviolet spectrum
CMS - chromatography-mass spectrometry
¹H NMR - proton magnetic resonance spectrum
¹³C NMR - nuclear magnetic resonance spectrum on ¹³C nuclei
[α] D - the value of the specific rotation
CCl₄ - methane tetrachloride (carbon tetrachloride)
GMP - Good Manufacturing Practice
GLP - Good Laboratory Practice
HMBC - Double Magnetic Resonance Spectrum
H₂O₂ - hydrogen peroxide
MS Spectrum - Mass Spectrum
R_f - coefficient of the rate of movement of substances relative to each other during their chromatography

INTRODUCTION

According to the World Health Organization, to ensure the strategic security of each state, the level of drugs produced in it must be at least 20%, i.e. The revival of the country's own pharmaceutical industry is regarded as the main criterion for its national security.

More than 7,000 medicinal products are registered in the State Register of the Republic of Kazakhstan. The share of domestic drugs is 10%; accordingly, the pharmaceutical industry of the Republic of Kazakhstan is currently in an extremely difficult situation, since 90% of the medicines present on the pharmaceutical market of Kazakhstan come from the countries of near and far abroad. The creation of the pharmaceutical industry, the increase in profitability and competitiveness of existing industries, as well as the earliest possible increase in the share of domestic medicines to 40-50% by 2014 were designated as top priorities for the country's economic development in the Government of the Republic of Kazakhstan No. 302 of April 14, 2010. The strategic plan of the Ministry of Investment and Development of the Republic of Kazakhstan for 2014-2018 (Annex to Order No. 256 of the Minister for Investment and Development of the Republic of Kazakhstan dated December 9, 2014) confirms that these tasks are relevant to the present. Providing the domestic market with domestic drugs by 2018 should reach 55%. The pharmaceutical industry of Kazakhstan is represented mainly by generics (drugs that have lost their patent protection) on the basis of imported substances and traditional low-priced drugs targeted at the domestic market and the market of the CIS countries. The dominant position of generic drugs in the Kazakhstan market is due to the lack of conditions for the creation of innovative products. The pharmaceutical industry remains with a high level of imports, and the technological level of manufacturing enterprises in the pharmaceutical industry of Kazakhstan does not meet modern production standards. One of the pressing problems hampering the development of the pharmaceutical market is also the high need for specialized specialists, which is caused by an insufficient level of professional training and a shortage of qualified personnel. It should be noted about the lack of a GMP (Good Manufacturing Practice) certificate in a number of pharmaceutical enterprises in Kazakhstan, underdevelopment of scientific research, new developments and drugs. Meanwhile, success in research plays a crucial role in the competitiveness of the pharmaceutical industry. To implement the technical modernization of pharmaceutical enterprises, it is necessary to pay great attention to the development of conceptual provisions of the investment policy, taking into account the accumulated theoretical and practical domestic and foreign experience. According to experts, the cost of developing and promoting one innovative drug in the world is \$ 1 billion. In Kazakhstan, these costs are currently about 1,000 times lower. Not all domestic pharmaceutical manufacturers can invest heavily in long-term and expensive projects to create original products.

Thus, the state program on drug policy of the country provides for the introduction of highly effective, safe and affordable medicines through the most complete use of domestic raw materials.

For the implementation of this global state problem, it is necessary to use, first and foremost, medicinal plant materials, as is done in all the leading countries of the world. The share of pharmaceutical preparations of plant origin in the total volume of their medicines is currently more

than 50%. Plants have been used for medicinal purposes for centuries. Despite the significant progress in modern organic chemistry, which ensures the production of high-quality synthetic biologically active substances that are used in pharmacy, the popularity of herbal medicines throughout the world is not only declining, but steadily increasing. Due to their similarity with the physiological systems of the body, the compatibility of herbal medicines is able to purposefully induce and mobilize its protective resources, which in practice implements the principle "to heal the body, not a disease". The possibilities of chemical synthesis are far from being exhausted, but, along with useful properties, medical practice has clearly revealed the negative characteristics of this type of drugs. They derive from their unifying belonging to the category of foreign compounds for a living organism, which is the most complete biosystem. As a result, toxicity is an ineradicable sign of xenobiotic drugs. But the main danger lies in the fact that these alien compounds, replacing the body's own defense systems, inhibit the latter, thereby lowering its internal potential and the chances of autonomous existence. Therefore, their selectivity in relation to the tissue (organ) - the target is not comparable with the medicinal effect of a physiologically compatible agent, which include herbal medicines.

The advantage of herbal medicines is the softness and complexity of their therapeutic action, low toxicity, the practical absence of side effects, the cumulative effect, less addiction, and the rare induction of allergic reactions, which is especially important in the case of diseases requiring long-term treatment. For some long-term diseases, herbal remedies may be the only possible ones for use [1, 2]. The World Health Organization pays special attention to the standardization of medicinal plant materials. Recommendations on general methods for the control of medicinal plant materials, as well as individual monographs on selected species of medicinal plants, including 58 objects [3-5], have been published.

To solve the set tasks, it is necessary to select the most promising plant species taking into account their biological activity, resource endowment on the territory of Kazakhstan, procurement conditions, degree of complexity of technological processes for obtaining phytopreparations based on them, as well as the economic and environmental feasibility of their introduction into medicine. The object of research for industrial processing can be as well-known medicinal plants included in the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, harmonized with the European Pharmacopoeia, as well as other plants using the accumulated information on them in academic and folk medicine, the principle of botanical kinship, the study of "forgotten plants" [6-13].

In the study of wild medicinal plants, attention is paid to the factors influencing the accumulation in them of biologically active substances responsible for their physiological activity. For example, the roots need to be harvested in autumn or early spring, while the aerial parts have not yet begun to grow. In addition, it is necessary to provide rational methods for collecting, drying and storing raw materials, taking into account its loss during storage [1, 14-15]. Despite the continued interest in the study of plant material botanists, pharmacognos, phytochemists, phytoanalytics, the problems of unifying and improving regulatory documentation on the quality

control of medicinal plant materials remain relevant, especially in terms of good manufacturing practices [16].

For the study of medicinal plants as sources of pharmacologically active substances for the purpose of application in medicine, first of all, establish their authenticity, quality indicators and carry out identification for the presence in them of active biologically active substances using qualitative reactions with diagnostic and complexing agents, methods of titration, chromatography (BH, TLC, GC, GLC, HPLC) and spectroscopy (^1H NMR, ^{13}C NMR, UV spectra). Biologically active substances of medicinal plant materials related to its active substances, can affect the metabolic transformations in the body, change its state and function. In accordance with this, they are used for prophylaxis, diagnosis and treatment.

To date, only about 15% of the higher plants growing on Earth have been investigated for the presence of biologically active substances. Of course, carrying out expensive screening studies for the remaining 85% of species is not rational. In this case, it is important to examine all available information about plants already accumulated in traditional medicine, various Pharmacopoeias of the world, articles, reports and the development of information and analytical methods for its assessment. It is this approach that will allow to eliminate duplication of research on the study of plants and to achieve substantial savings in the costs, time and efforts of specialists in various fields to conduct their detailed phytochemical and preclinical studies [1-19].

1 PREPARATION AND HANDLING MEDICAL PLANT RAW MATERIALS

Medicinal plant raw materials used for industrial processing are usually formed on the basis of wild and cultivated medicinal plants, as well as imported medicinal plant raw materials (imported species include plants that do not grow in our country, for example, ginseng, eleutherococcus, lemongrass, etc.). The demand for foreign exports of wild medicinal plant materials from Kazakhstan is increasing every year, and therefore, it is necessary to take concrete measures so that its procurement is environmentally and economically viable and does not significantly affect the reserves of the unique domestic medicinal source in nature.

The State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan [14] is the unified state legislative base for quality control of both medicinal plant materials and medicinal products obtained on its basis. On the basis of the relevant monographs of the State Pharmaceutical Fund of the Republic of Kazakhstan, they carry out entrance control of the medicinal plant material harvested or received from suppliers.

The first step in ensuring the quality of herbal medicines, on which their safety and efficacy directly depend, is the proper practice of collecting medicinal plants, which also plays a significant role in protecting their natural resources, ensuring their rational use, and complies with the requirements of Good Agricultural Practice (GACP) [5].

This practice is particularly important in the modern conditions of economic integration and increasing requirements for the quality of medicines in accordance with domestic and international standards [14, 15].

The purity of medicinal plant materials is determined by the accuracy and timeliness of its collection, drying, the absence of mold, pests, heavy metals, radionuclides, aflotoxins and pesticides at normalized humidity, ash and microbiological purity. Essential are the nature of biologically active substances and their content in medicinal plant materials emitted from it in the form of extractive substances or used in powdered form, i.e. in the native state, for example, in powders and capsules. Without the definition of these data, LSR cannot be recognized as high-quality and suitable for use in industrial purposes for its industrial processing. To establish the terms of collection of medicinal plant materials, it is necessary to conduct systematic studies to study the dynamics of accumulation of active or active substances in the studied plants, depending on the period of their growing season. On the basis of the research conducted, the collection of plants (as a whole or their individual parts) is carried out at a time when they contain the maximum number of active substances, which determine their biological effect and, consequently, their therapeutic effect as a whole. In some cases, when determining the time for procurement of medicinal plant materials containing volatile biologically active compounds, take into account the daily dynamics of the accumulation of active substances (early morning or afternoon) in them, taking into account their chemical structure and, accordingly, physico-chemical properties.

The time of harvesting medicinal plants depends on the geographical zone and climatic conditions of their growth, as well as on economic and environmental factors. It is necessary to

understand that the growing environment is largely responsible for the qualitative and quantitative component composition of plants and the predominance in them of certain groups of biologically active compounds responsible for their adaptation to specific environmental conditions. In the Republic of Kazakhstan, due to the progressive spread of saline lands and the deteriorating environmental situation, every year more and more lands are subject to desertification. The regions of the Aral Sea, the northeastern Pre-Caspian Sea and the Balkhash region are subject to desertification processes especially dynamically; To date, land degradation covers over 60% of the territory of the Republic. On these soils, such plants as lichens, salos, desert plants adapt. For example, salomers or halophytes include plants of the Kermek genus, camel's thorn of Kirghiz, horse-cutter and others, and they attract attention and cause great interest as plants growing under extreme conditions and since ancient times widely used in folk medicine. The resistance of halophytes to high concentrations of salts in soils is closely related to the ability of these plants to accumulate various compounds and, in the first place, compounds of polyphenolic nature under salt exposure. It is the polyphenols of plants that exhibit the highest antioxidant properties and are generally recognized highly effective natural antioxidants, have a positive value, since they are one of the factors adaptive variability of plants and their adaptability to extreme environmental conditions. Apparently, phenolic compounds stabilize cell membranes within physiological concentrations, and their high protective activity increases the resistance of membranes to damage. The flavonol glycosides inactivate the enzymes of primary nitrogen assimilation and can be used as substrates for polyphenol oxidase and peroxidase. Polyphenolic compounds in a certain concentration are able to stabilize the membranes of plant cells, thereby protecting the main cellular components from damaging factors and from toxic active substances [20, 21].

Medicinal plant materials are used both in fresh form and in the form of powders from dried and shredded plants or by extracting active substances from them, subjecting them to simple processing using various methods while preserving the structure of the natural complex of these compounds. About half of the types of medicinal plant materials, currently permitted by the state registry of medicines for medical use, are used to prepare infusions and decoctions.

The aboveground part (leaves, herbs) of plants is collected only in dry weather, in the middle of the day (when the plant has dried from dew). Most often, the harvesting of raw materials is carried out during the flowering period, when, as a rule, it is possible to obtain the largest mass of a plant with a high content of active substances. The above-ground part of the perennial plants is collected carefully so as not to damage the underground part (the location of the resumption of plant growth). Thick, woody stems should not be collected, as they contain a small amount of biologically active substances. The leaves are harvested fully developed, green, in the period from the beginning of budding until the end of flowering.

The underground part (roots, rhizomes, tubers) of plants can also be collected in wet weather, because after a short drying they are thoroughly cleaned, cut into small pieces, dried and repeatedly shifted to completely remove impurities and then crushed. Most often, the collection is carried out in the fall (at this time a large mass of the underground part accumulates and the outflow of substances from the fading above-ground part occurs in it). Sometimes the harvesting of roots and rhizomes is carried out in early spring, especially wild plants, since only in this period can

plants be found in their aerial parts, which die off in autumn. Rhizomes of marsh plants collected after the decline of water.

Flowers (and inflorescences) are harvested at the beginning of flowering plants (for example, chamomile, linden, arnica) before shedding, during the period of preservation of flower color with a maximum content of active substances.

Fruits (berries, seeds) are harvested in the period of reaching their maturity in the early morning or in the evening in dry weather.

The bark is harvested in spring, during the sap flow, when it is easy to separate from the wood. For medical purposes, use the bark of young trees.

Buds are harvested in early spring during the period of education.

In connection with the above clarifications, when obtaining permission to use plants (or their parts) as medicinal objects, along with normative documents, it is necessary to submit scientifically-based data on the timing of their preparation taking into account the content of active or active substances in them that determine their therapeutic effect.

Primary processing of raw materials is to eliminate the disadvantages of the collection, that is, the removal of defective parts, impurities, etc.

The leaves are sorted in order to remove defective leaves, as well as impurities. First of all, unnecessary parts of a flower or inflorescence that have fallen leaves are removed from the flowers. If the lindens have cut the tops, then pluck the inflorescences (along with the leafy bract). Due to the exceptional "fragility" of the chamomile basket, only the most careful sorting is allowed (selection of baskets of similar species).

Herb plants collected for the sake of seeds and dried fruits are sifted in order to remove other plants that have been accidentally caught, after which they are knitted into snops.

Juicy fruits are cleaned from stalks, parts of inflorescence, unripe berries, leaf impurities and pieces of branches.

Roots and rhizomes are carefully separated from aboveground parts. Rhizomes with adventitious roots are quickly washed from the ground in water, or, to avoid loss of their BAS, they are carefully shaken off and rubbed. For drying, they are cut into pieces, turned over several times, while constantly removing the earth or dust released during the drying of the raw material, visually achieving its purity. Rod incised roots and shoots are treated similarly, without keeping them in water, so that water-soluble substances from them are not removed.

Drying of medicinal plant materials ensures the quality of the raw materials, since it preserves the biologically active substances contained in the raw materials. The optimal mode of drying is given in the instructions for the preparation and drying of specific types of medicinal raw materials.

The general rules of drying include the observance of temperature regimes of drying. Harvested vegetable raw materials are dried at a specific temperature to preserve the active ingredients in it. For example, raw materials containing essential oils are dried at a temperature of 25-30 ° C; raw materials containing glycosides are also dried at a temperature of 25-30 ° C, which allows you to quickly inactivate the enzymes that destroy glycosides; raw materials containing alkaloids, dried at temperatures up to 60 ° C; raw materials containing ascorbic acid are dried at a temperature of 80-90 ° C.

In all methods of drying, the medicinal raw materials are laid out in a thin layer (except for essential oil, which is placed in a well-ventilated area protected from direct rays of light and rain to prevent evaporation of essential oil. When drying, the raw materials are regularly turned over, trying not to increase the degree of its grinding at the same time. Drying is considered complete when the roots, rhizomes, bark and stems do not bend when bent, but break; leaves and flowers are ground into powder, juicy fruits do not stick together into lumps, and they do not crumble when pressed.

Technological parameters of medicinal plant materials:

The specific gravity of medicinal plant raw materials is the ratio of the mass of absolutely crushed raw materials to the volume of plant raw materials. 5.0 g of raw material (precise weight) is placed in a volumetric flask with a capacity of 100 ml, filled with purified water to 2/3 volume, kept in a boiling water bath for 1.5-2 hours, stirring occasionally to remove air, then the flask cooled to 20 ° C and adjusted to volume with purified water. Weigh the flask and determine its mass with raw materials and water. Pre-determine the weight of the flask with water. The specific mass is calculated by the formula:

$$d_y = \frac{Pd}{P+G-F}, \text{ где}$$

P is the mass of absolutely dry raw materials, g;

G is the mass of the flask with water, g;

F is the mass of the flask with water and raw materials, g;

d is the density of water, g / cm³ (d = 0.9982 g / cm³).

Bulk mass is defined as the ratio of unbroken raw materials at a certain moisture content to its full volume, which includes pores, cracks and capillaries filled with air. In a measuring cylinder 100 ml pour 50 ml of purified water. 10.0 g of uncrushed raw material is placed in a measuring cylinder with purified water and determine the volume that the raw material takes.

Bulk mass calculated by the formula:

$$d_o = \frac{P_o}{V_o}, \text{ где}$$

P_o is the mass of raw material not crushed at a certain humidity, g;

V_o is the volume occupied by raw materials (difference of volumes), cm³.

Bulk weight (d_H) is defined as the ratio of the mass of the crushed raw materials at natural moisture content to the total volume occupied by the raw materials, which includes the pores of the particles and the voids between them. The crushed raw material is placed in the measuring cylinder, shaken lightly to level the raw material, and the total volume it occupies is determined. After that, the raw material is weighed. Bulk weight calculated by the formula:

$$d_H = \frac{P_H}{V_H}, \text{ где}$$

P_H is the mass of unground raw materials at a certain humidity, g;

V_H is the volume occupied by the raw material, cm³.

Porosity (PS) characterizes the amount of voids inside the particles of the raw material and is defined as the ratio of the difference between the specific mass (density) and the volume mass to the specific mass. The porosity of the raw material is calculated by the formula:

$$P_s = \frac{d_y - d_o}{d_y}, \text{ где}$$

d_v is the specific gravity of the raw material, g / cm³;

d_0 is the bulk density of the raw material, g / cm³.

Porosity (RV) characterizes the size of the voids between the particles of plant material and is defined as the ratio of the difference between the bulk and bulk masses to the bulk mass:

$$P_v = \frac{d_o - d_H}{d_o} , \text{ где}$$

d_v is the specific gravity of the raw material, g / cm³;

d_0 is the bulk density of the raw material, g / cm³.

Questions for self-control:

1. The reasons for the difference of the action of synthetic drugs from drugs of plant origin, the advantage of the latter on a living organism.
2. Review of the current state of the pharmaceutical industry of the Republic of Kazakhstan and its development prospects.
3. Structure and content of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan.
4. Differences between the wild, cultivated and imported medicinal plants.
5. Methodological substantiation for the establishment of dates for the collection of various parts of medicinal plant materials, their processing, drying and storage.
6. Technological parameters of medicinal plant materials.

2 INDICATORS OF QUALITY OF MEDICAL PLANT RAW MATERIALS ACCORDING TO THE REQUIREMENTS STATE PHARMACOPEA OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Medicinal plant raw materials may be allowed for industrial processing in order to obtain on its basis powders (teas), medicines and medicines only if they fulfill and comply with a number of conditions for it:

- should be biologically safe and have a large and positive experience of its use in traditional medicine for the treatment of diseases of various origins;

- be allowed for use in medicine, i.e. pharmacopoeial facility or on it should be developed and drawn up regulatory documents registered with the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan. Regulatory documents should be valid and should ensure its standardization;

- stocks of medicinal plant materials must be industrial in the territory of the Republic of Kazakhstan;

- procurement of raw materials should be environmentally and economically feasible.

In addition, the yield of the extracted complex of biologically active substances in the form of a substance (liquid, thick and dry extracts) taken from the processing of medicinal plant materials should be sufficient, and the conditions for the extraction of the substance should not affect its biological safety and pharmacological efficacy. It is known that the composition of biologically active substances in plants is influenced by both various environmental factors and the processes of their processing, storage, etc. [18].

The quality indicators of medicinal plant materials are determined in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, harmonized with the European Pharmacopoeia and, therefore, in accordance with international standards [14-15]. When establishing the quality indicators of medicinal plant materials, the following are distinguished:

- 1 Definition

- 2 Identification

- 3 Purity tests, including the determination of a number of parameters:

- 3.1 Impurities

- 3.2 Mass loss on drying

- 3.3 Ash content (total ash, insoluble in 10% hydrochloric acid, sulphated ash)

- 3.4 Heavy metals

- 3.5 Radionuclides

- 3.6 Pesticides

- 3.7 Aflotoxins

- 3.8 Microbiological Purity

- 4 Determination of the amount of active substances

- 5 Pharmacological action

- 6 Storage conditions (packaging, temperature and relative humidity at the storage location) of medicinal plant materials and expiration dates.

In accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia for the medicinal plant materials determine the presence of pesticides and aflotoksinov [15].

It should be noted that the determination of pesticides is carried out for cultured medicinal plants, for wild plants, this indicator is not defined. Aflotoksiny same determine for plants that grow in tropical conditions, therefore, this indicator is not determined for plants growing in Kazakhstan.

The following are indicators of the quality of medicinal plant materials. Aphlotoxins and pesticides recommended by international standards for determination in medicinal plant materials will also be considered.

2.1 Definition

In this indicator “Definition”, the visual condition of the dried and processed medicinal plant raw materials is indicated first: whether it is whole, crushed, cut or powdered. After that, the international name and the value of the quantitative content of the active substances in it are given for the LSR. If the active substances and their content in the test object are not known, then indicate the amount of extractive substances released from it.

2.2 Identification

Identification of medicinal plant materials provides for its macroscopic and microscopic analyzes, as well as the identification of the main groups of biologically active substances that make up its composition.

2.2.1 Macro and Microscopy

Appendix A (Figures A-1 - A-3) shows various types of medicinal plants. Macroscopic analysis of plants provides a description of external signs to establish their authenticity.

When macroscopic analysis of the aboveground parts of plants pay attention to the structural features of the stem, namely the nature of branching (simple or branched), straight, curved or ascending, the cross-sectional shape, surface color, dimensions (diameter at the base, length), the location of the leaves, type of inflorescence, features of morphology and anatomy of leaves, flowers, fruits. For flowers, the type of inflorescence is established, the structure of the perianth and corolla, the number and shape of the petals or teeth, their color, the number and shape of the sepals, the number and structure of the stamens, pistils, the structure of the ovary are determined.

Macroscopy of the underground part of plants (roots, rhizomes) provides a description of the characteristics of the roots and rhizomes on the example of whole raw materials, their length and thickness, the description of the main and side roots, the adherence of the bark to the wood, their color and smell, etc.

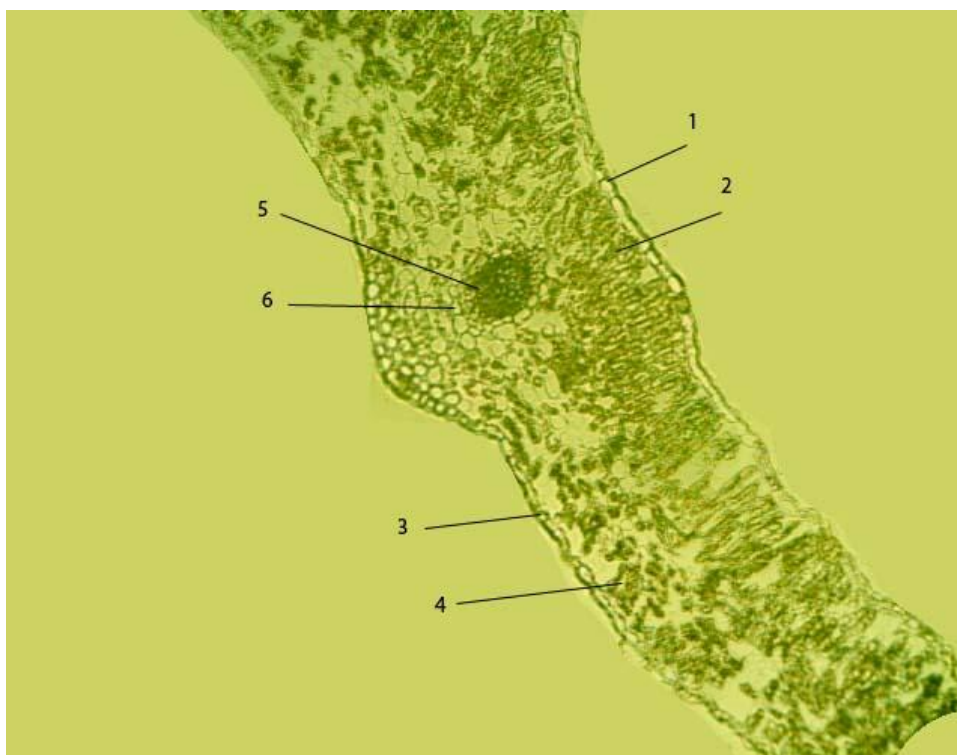
Macroscopic and microscopic descriptions of the above-ground parts and roots are given on the example of plants of the Kermek Gmelin type, which are authorized by the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan for use in medicine in order to obtain drugs on their basis in the form of a substance and various drugs. Monographs on the aboveground part and plant roots of the Kermek Gmelin species are introduced in the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, i.e. these plant objects are pharmacopoeial, Appendix A [14].

Grass macroscopy. *Kermek Gmelin* is a wild-growing perennial herb 30-80 cm tall. Stem - straight, shortened in the upper part, with usually paired branches with a broad corymboid apical panicle. The rosettes are numerous, green or bluish-green, reddening at the breaks, from oblong-obovate to broad elliptically. Peduncles - one or several, apical or axillary. Flowers in small, 1-3-4-flower spikes-semi-leaves, forming almost corymbose or pyramidal inflorescences. Spikelets 4-5-6 mm long, calyx 4-4.5 mm long, at the base and up to half along the veins, sometimes along the two internal veins thickly and rather long down. Whitish or pale purple limb, 5 less often 10 notched. Petals blue-violet, rarely white. Seeds oblong-ovate, 2 mm long, 0.6 mm wide, dark purple brown.

Macroscopy of roots and rhizomes. Whole raw materials: pieces of roots and rhizomes up to 5 cm long and up to 3 cm thick, densely woody, knotty, curved, with a thin bark, tight to wood. Undigested parts of the roots are rounded, finely, smoothly, longitudinally wrinkled, brown, fibrous with different shades (grayish, brownish, reddish, etc.) on the outside. On the fracture and in longitudinal section, the crust is somewhat lagging behind, of a dark color, the wood part is light with a creamy, sometimes pinkish shade. On the surface of the main root are scattered along the axis of the organ chain of small wart-like formations (3-6-7 in each chain). On the sides of the main taproot there are remnants of thick lateral roots, they are also fibrous in longitudinal cracks. The smell is weak, specific. The taste is bitter, astringent.

Microscopic analysis is the main method for determining the authenticity of shredded medicinal plant materials: shredded, crushed, powdered, shredded and pressed into briquettes and granules. This type of analysis of medicinal plant materials is based on the knowledge of the anatomical structure of plants and consists in finding the characteristic diagnostic features that distinguish the object being studied from parts of another plant.

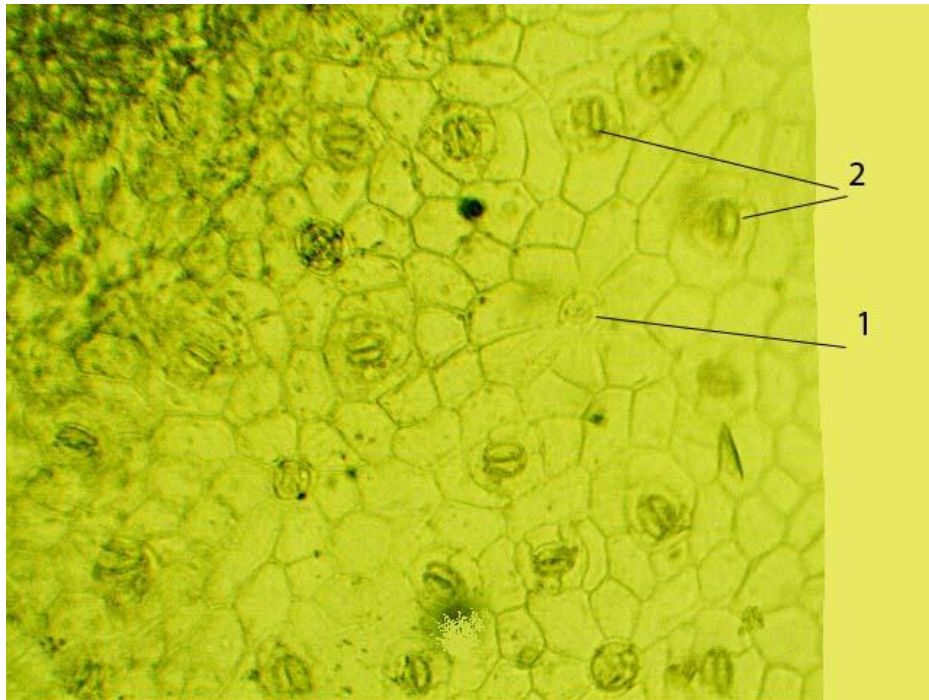
Microscopy grass. Consider the microscopy of grass on the example of grass *Kerme Gmelin*. Lamina outside is covered with epidermis. The cells of the epidermis are tightly closed, without intercellular spaces. Cells of the upper and lower epidermis are covered with a fine-tuberos cuticle. The leaf is dorsiventral, with a 2-row tightly closed, well-developed palisade fabric, located on the upper, adaxial side. Spongy tissue is friable, consists of cells of various shapes, elongated across the width of the sheet and lying in a plane parallel to the surface of the sheet (Figure 1). The study by optical microscopy using optical microscopes with high magnification is carried out in order to establish the botanical affiliation of the plant from which the object is obtained, and usually all the anatomical features of the plants are clearly identified. Cvet when viewed - artificial, reflected. Increase - from 18 to 40 times.



1– upper epidermis, 2 - columnar mesophyll, 3 - lower epidermis,
 4 - spongy mesophyll, 5 - conductive bundle, 6 - parenchymal lining of the bundle
 Fig. 1. Anatomical structure of the leaf (x 180)

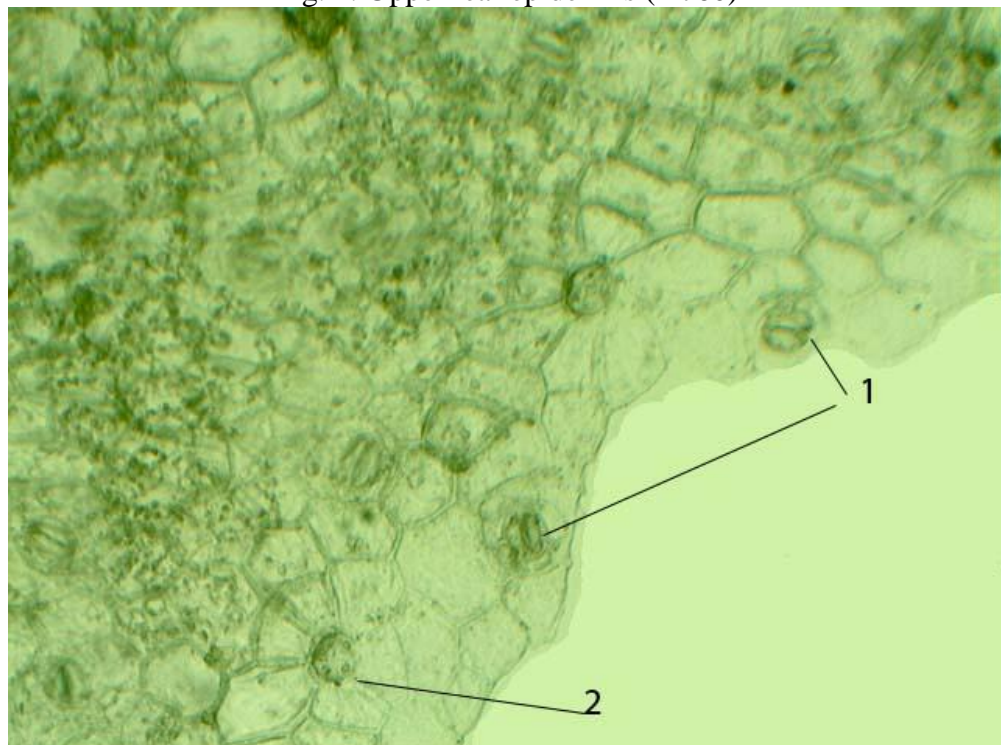
Vascular-fibrous bundles permeate the leaf mesophyll. Type of conductive beam collateral. Subepidermal angled collenchyma 3-row above the vein, 4-row below it. The epidermis on both sides has almost the same structure and consists of small cells, polygonal in outline. The mouth is numerous on both sides, they are surrounded by 2-3, less often 4 cells of the epidermis. The hairs in a significant amount over the entire surface of the leaf are single-celled, slightly curved with a pointed tip and a coarse-warty surface. Often the hairs fall off and then a small round cushion is left at the site of hair attachment, surrounded by a rosette of epidermis cells (Figures 2, 3). All veins of a leaflet have a parenchymal lining.

The stalk is covered with an epidermis consisting of tabular cells, the outer walls of the epidermis have a small tubercle cuticle (Figures 4, 5). Deeper is the layer of the parenchyma of the primary cortex, sharply delimited from the central cylinder by groups of sclerenchyma cells. Two layers are developed in the primary crust. The first layer of the stem consists of an assimilation tissue containing chlorophyll, the cells are more elongated and are located perpendicular to the epidermis. The first layer of the stem consists of an assimilation tissue containing chlorophyll, the cells are more elongated and are located perpendicular to the epidermis.



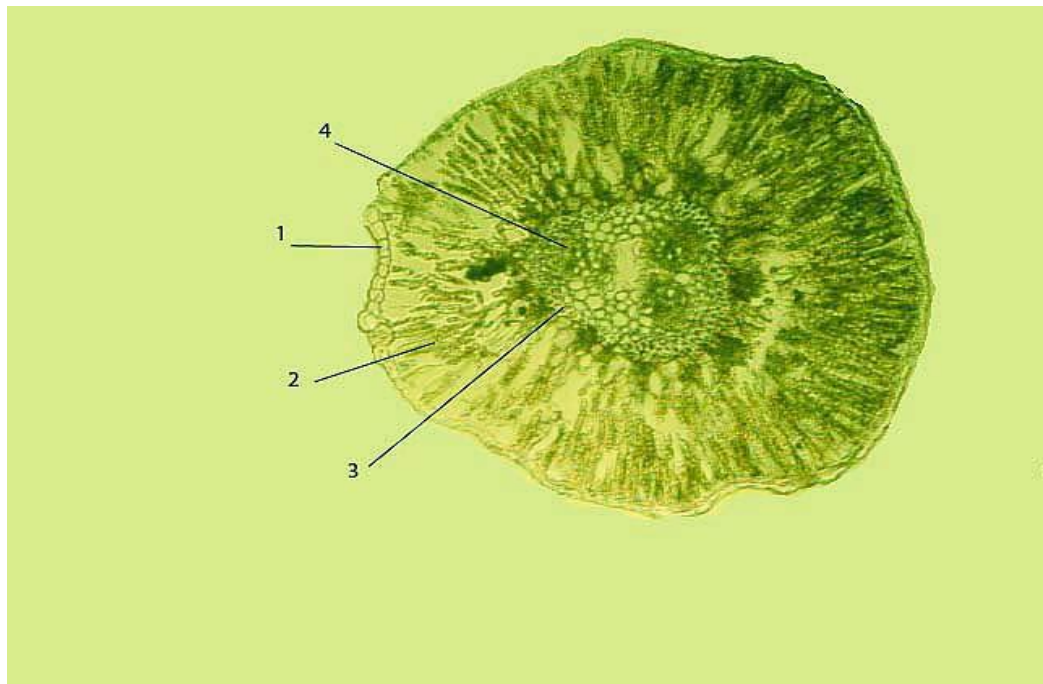
1 - stomatal apparatus, 2 - trichome bases

Fig. 2. Upper leaf epidermis (x 760)



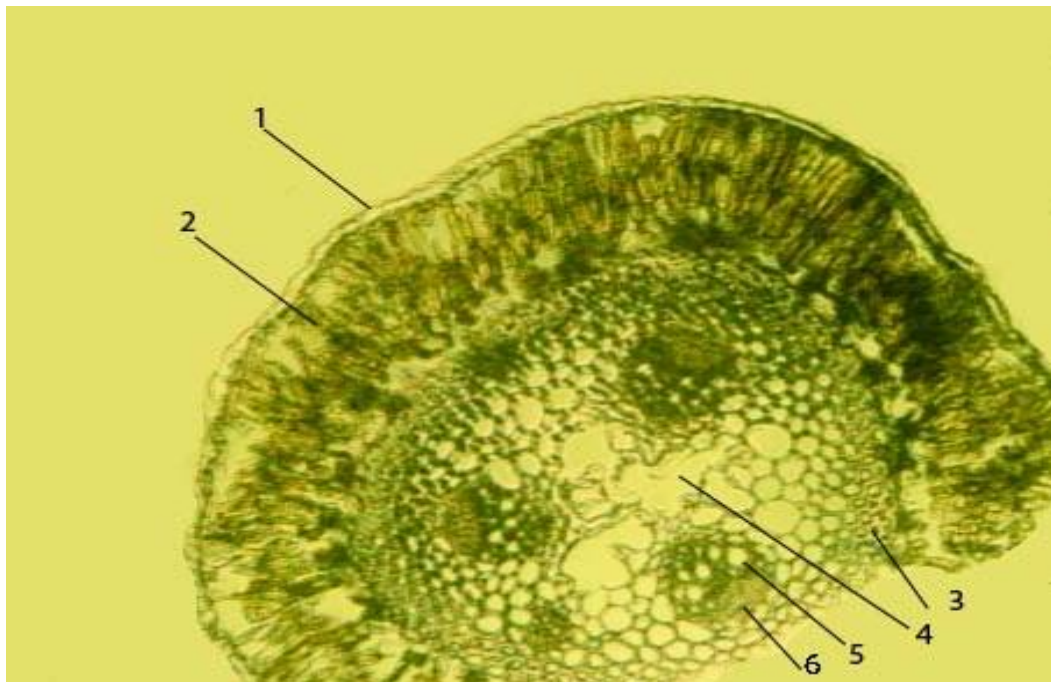
1 - stomata, 2 - trichome bases

Fig. 3. Lower leaf epidermis (x 760)



1 – epidermis, 2 – primary cortex,
3 – sclerenchyme, 4 – conducting beam, parenchyma

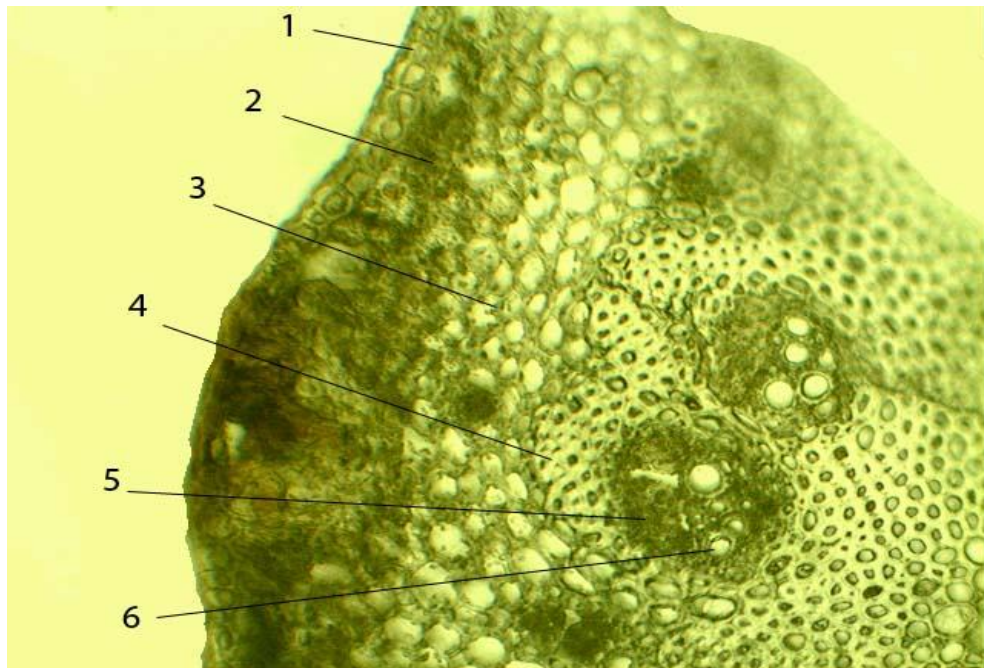
Fig. 4. Anatomical structure of the young stem (x 180)



1 – epidermis, 2 — primary cortex, 3 — sclerenhima,
4 - core parenchyma, 5 - xylem, 6 - phloem

Fig. 5. Anatomical structure of the stem of the generative phase (x 180)

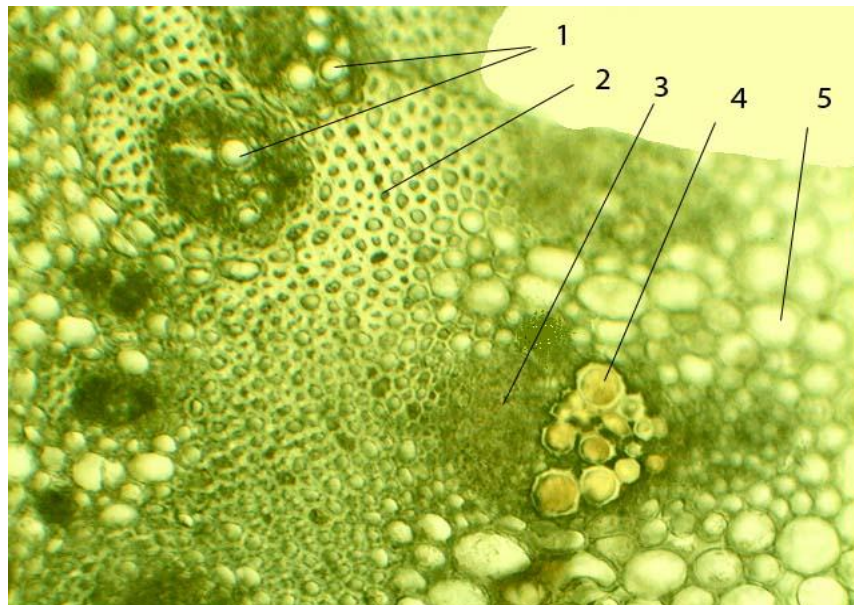
They are an important diagnostic feature (Figure 6). Chlorophyll-bearing parenchyma is more developed in young plants. The second layer contains parenchymal cells.



1 - epidermis, 2 - assimilation tissue, 3 - parenchymal cells of the primary cortex, 4 - sclerenchyma, 5 - phloem, 6 - xylem

Fig. 6. Anatomical structure of the stem of the postgenerative phase (x 180)

various forms. Sclerenchyma cells are thick-walled, rounded in cross section with a dotted cavity. In the zone of sclerenchymal cells, some adjacent cells of the cortex contain single crystals - drusen. In the central cylinder, the conductive fabric is arranged in bunches. The cambium functions in bundles (Figure 7).



1 - xylem, 2 - sclerenchyma, 3 - phloem, 4 - extractives in xylem vessels, 5 - core parenchyma

Fig. 7. Anatomy of the core portion of the stem (x 180)

Thick-walled vessels are arranged in groups. Around each bundle is a group of pericyclic fibers. The parenchyma of the heart is scattered. The core in cross section is round, consists of large thin-walled cells. In the cells of the parenchyma are found containers with biological active substances (Figure 8).



1-cell content, 2-sclerenchyma, 3-phloem

Fig. 8. The internal structure of the stem (x 760)

Thus, as can be seen from Figures 1-8, the main anatomical and morphological features of the aerial part (grass) of the Kermek Gmelin plants are as follows:

- particles of the lower and upper leaf epidermis;
- unicellular trichomes, slightly curved, with a pointed tip and a rough-warty surface.
- the presence in the parenchyma of the stem of containers with biological active substances.

The assimilation tissue in the stem is preserved even in plants of the postgenerative phase, and their presence is a stable diagnostic feature of plants of the Kermek Gmelin species.

Microscopy of the roots, rhizomes, bulbs, tubers and corms. Underground organs determine the shape, features of the outer surface and fracture, size, color from the surface and on the fresh fracture, smell and taste. On the fracture or transverse section of large roots, rhizomes and tubers are examined with the naked eye, under a magnifying glass (x 10) or a microscope, the location of the conductive elements. Roots can have primary and secondary structure. When the primary structure is in the center, the primary xylem vessels are visible; in the secondary structure, there is wood in the center. Distinctive features of the rhizomes from the root: the remnants of withered leaves in the form of brown scales or in the form of scars. The

bulbs consist of a shortened and expanded stem (bottom), on which fleshy leaves (scales) are located. Outside the bulbs are covered with dry scaly leaves. The tuber is a metamorphosed shoot with a strongly thickened stem, the leaves are reduced, and buds (eyes) are located in their sinuses. The corms have only external, dry, scaly leaves. When the primary structure of the root in cross section is visible: the covering tissue is the rhizoderm (exoderm), the cells of which often form root hairs. Under the epithelial tissues is the primary cortex, endoderm, central cylinder. In the secondary structure of the root but in a transverse section one can see: the covering fabric - periderm, bark, wood. The periderm consists of a more or less thick layer of cork, phellogen and feploderm. The cortex consists of cells of the parenchyma, conductive elements of phloem, often there are mechanical elements: bast fibers, stony cells. Some types of raw materials in the cortex are located secretory containers, channels, lachi. The cambium line is more or less clear. Wood most often has a radiant structure. In the wood there are vessels, tracheids. parenchyma, in some species of wood fibers (libriform). On the cross-section, the rhizome has a stem-type structure. The rhizome differs from the roots by the presence in the center of the parenchymal core (in some species it is destroyed - the rhizome is hollow). Rhizomes can have a beam and non-knuckle structure. At the roots of monocotyledonous plants, conductive beams are scattered randomly in the primary cortex and central cylinder. In dicotyledonous plants with a beam structure, the conductive beams are arranged in a certain order in a circle. For the rhizomes characterized by the presence of endoderm, located on the border between the primary cortex and the central cylinder. The conductive bundles of rhizomes are collateral, bicollateral, concentric; in monocotyledons, they are closed, in dicots, they are open. In tubers and corms, the predominant tissue is the storage parenchyma, in which conductive bundles are located. The most important diagnostic features for underground organs are the location and nature of the conductive and mechanical elements, the presence of a variety of containers, channels, cages, calcium oxalate crystals, storage nutrients (starch, mucus, inulin, fatty oils), etc.

On the cross-section of the main root of plants of the *Kermek Gmelin* species, one can see a radial structure (non-dull). The crustal and woody parts are clearly visible, the latter being somewhat larger. The bark outside is covered with a multi-row cork layer of brown color, under which a continuous ring of mechanical tissue (sclereids) is tangentially positioned. Next is the red-brown layer of phellogen - large cells with tangentially thickened walls. In the parenchyma of the bark and wood, numerous groups of sclereids are visible, in the cow part they are thicker and larger, scattered around the ring in groups of 3-7 cells, their color is yellow in the preparation; in the woody part, the sclereids are thinner and smaller, form tightly folded yarns along the radius of groups of vessels in the form of a mechanical lining around them. Between the bark and wood, a 2-3-row cambial layer is slightly noticeable. The core rays are clearly visible, continuing approximately to the middle of the cortex. The core takes a relatively small place, in some parts of the root is almost absent. In the core there are groups of sclereids, they look the same as in the cow parenchyma.

Thus, macro- and microscopic analyzes of plant materials provide an opportunity to establish the authenticity of the objects under study.

Figure 9 shows the distribution map of plants of the genus *Kermek* on the territory of the Republic of Kazakhstan, *Kermek Gmelin* has industrial reserves [6-12, 22].

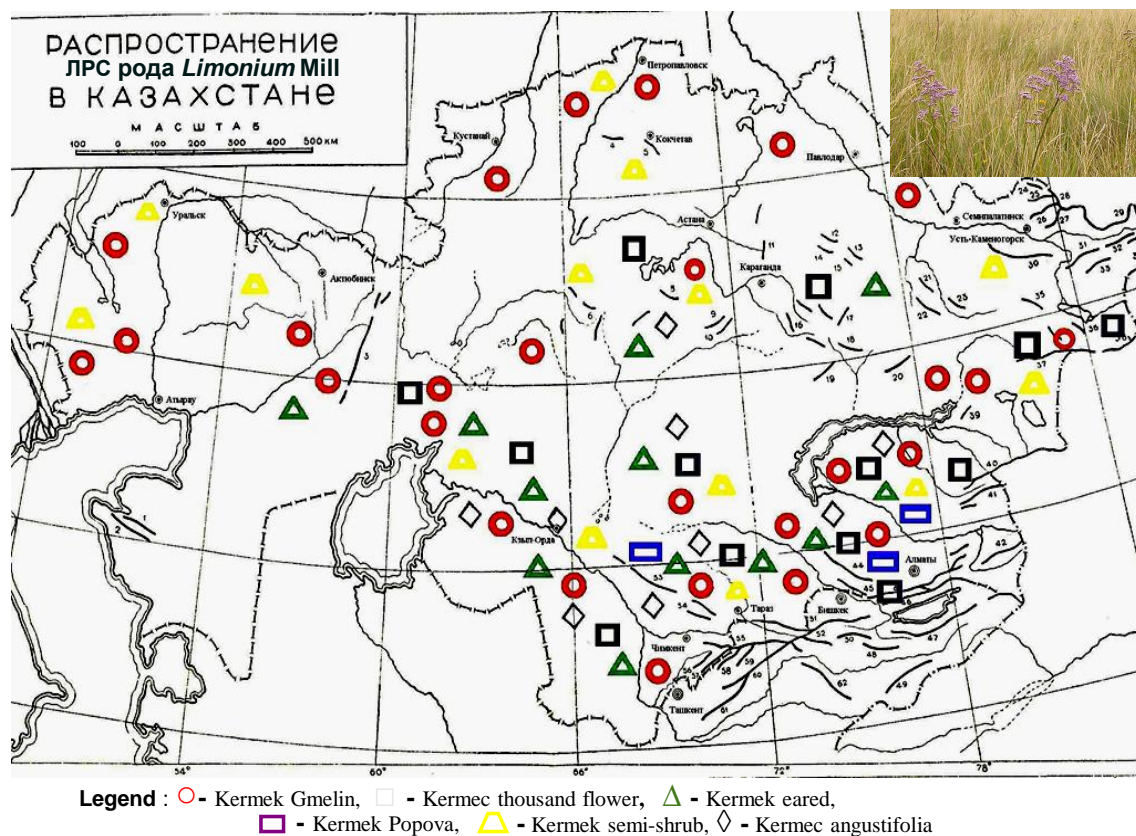


Fig. 9. Map of distribution of some species of plants of the genus *Kermek* in the Republic of Kazakhstan

Questions for self-control:

1. What is included in the concept of quality indicators of medicinal plant materials?
2. Why exactly the above indicators determine the quality of medicinal plant materials?
3. What does the indicator “Definition of medicinal plant raw materials” include?
4. What are the positions based indicator "Identification of medicinal plant materials"?
5. Describe the essence of microscopy and its conditions for the aboveground part of medicinal plants. State the method of its implementation.
6. Describe the essence of microscopy and its conditions for the underground part of medicinal plants.
7. The essence and value of determining each indicator of the quality of medicinal plant materials, the need for their establishment, methods of conducting.

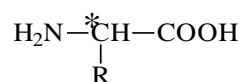
2.2.2 Classification, structure, properties and detection of certain groups of biologically active substances of medicinal plant materials

The therapeutic value of a medicinal plant object is determined by its synergistically active biologically active substances. That is why, when identifying medicinal plant materials, biologically active substances that are part of it are determined, which is possible with knowledge of the classification and nomenclature of the BAS studied, the characteristics of their chemical structure and their physicochemical and biological properties.

2.2.2.1 Amino Acids

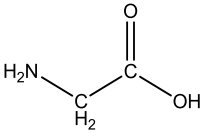
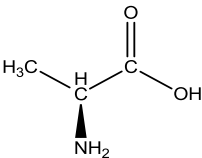
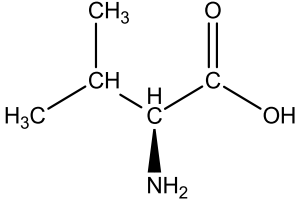
Amino acids are the most important class of natural nitrogen-containing compounds. They belong to bifunctional organic compounds containing in their composition two functional groups - amine (NH₂) and carboxyl (COOH). There are α-, β- and γ-amino acids, depending on the location of the amine and carboxyl groups relative to each other. In α-amino acids, the amine and carboxyl groups are with one carbon atom, in β-amino acids - they are separated by one carbon atom, in γ-amino acids between these functional groups contain two carbon atoms.

Constantly found in all proteins, 20 amino acids, called proteinogenic, are the most important α-amino acids. In the body, they are the primary metabolites, encoded by the genetic code and incorporated into proteins during translation. The general formula of α-amino acids:



In the formula presented, the carbon atom depicted as C * denotes an asymmetric or chiral carbon atom that differs from other carbon atoms in that it is bonded to four different atoms or groups of atoms, i.e. contains four different substituents. The classification of natural α-amino acids is presented in table 1.

Table 1 - Classification of Amino Acids

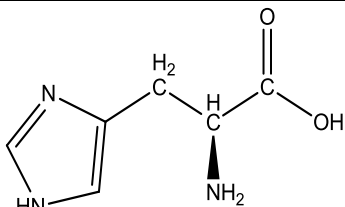
Amino acid structure	The full and abbreviated name of the amino acid	pK _a α-CO ₂ H	pK _a α-NH ₃ ⁺	pI*
1	2	3	4	5
	Glycine (Gly)	2.3	9.8	6.1
	Alanin (Ala)	2.3	9.9	6.1
	Valin (Val)	2.3	9.7	6.0

--	--	--	--	--

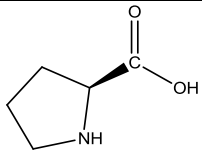
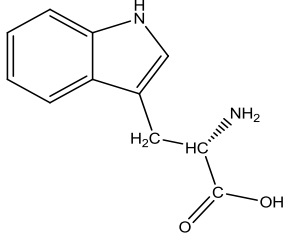
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
	Leucine (Leu)	2.3	9.7	6.0
	Isoleucine (Ileu)	2.3	9.7	6.0
	Cysteine (Cys)	1.9	10.7	5.2
	Methionine (Met)	2.1	9.3	5.7
	Serine (ser)	2.2	9.2	5.7
	Threonine (Thr)	2.1	9.1	5.6
	Aspartic Acid (Asp)	2.0	9.9	3.0

Продолжение таблицы 1				
1	2	3	4	5
	Glutamic acid (Glu)	2.1	9.5	3.1
	Asparagine (Asn)	2.1	8.7	5.4
	Glutamine (Gln)	2.2	9.1	5.7
	Lysine (Lys)	2.2	9.1	9.8
	Arginine (Arg)	1.8	9.0	10.8
	Phenylalanine (Phe)	2.2	9.3	5.7
	Tyrosine (Tyr)	2.2	9.2	5.7

	Histidine (His)	1.8	9.3	7.6
---	-----------------	-----	-----	-----

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
	Proline (Pro)	2.0	10.6	6.3
	Tryptophan (Trp)	2.5	9.4	5.9

* – изоэлектрическая точка

As can be seen from the data presented in Table 1, all the natural α -amino acids indicated in it differ in the structure of the radical R (side chains), which causes their various physicochemical properties. α -amino acids, depending on the structure and polarity of the side chains, can be divided into three groups, and in these three groups the amino acids contained in them can overlap:

- 1) fatty, aromatic, and heterocyclic amino acids;
- 2) neutral, basic and acid amino acids;
- 3) non-polar amino acids (hydrophobic) and polar (hydrophilic).

Let us consider in more detail each of the above groups of amino acids, presented in table 1.

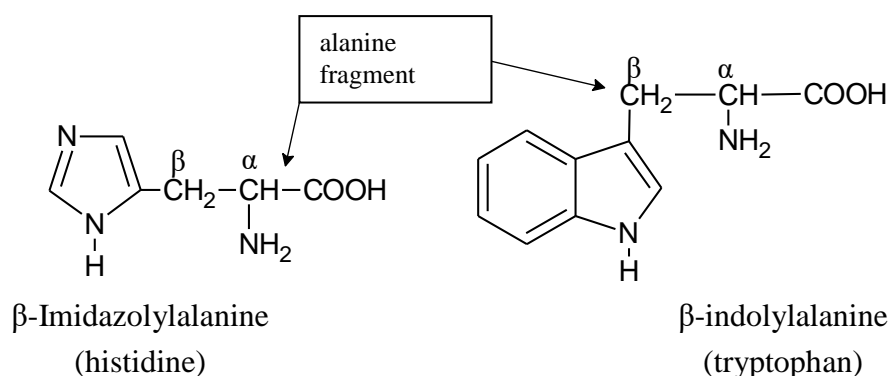
- 1) α -Amino acids of fatty, aromatic and heterocyclic series.

1.1 For fatty amino acids, the nature of the radical R in the side chain may be different alkyls (in the aliphatic amino acids) or contain additional functional groups, heteroatoms (N, O, S), cyclic groups. For example, for an amino acid with a trivial name, the alanine radical will be a methyl group, for an amino acid, valine is an isopropyl radical, in an amino acid, the leucine radical R is represented by isobutyl, and in isoleucine, secondary butyl, respectively. The last three radicals are branched. These amino acids have a pronounced low polarity. The thiol group is present in sulfur-containing amino acids - methionine and cysteine, and cysteine exists only in the undissociated state; in hydroxyl-containing amino acids - in serine and threonine contains a hydroxyl group; carboxyl group - in aspartic and glutamic acid; amino group in arginine and lysine; amide group in asparagine and glutamine.

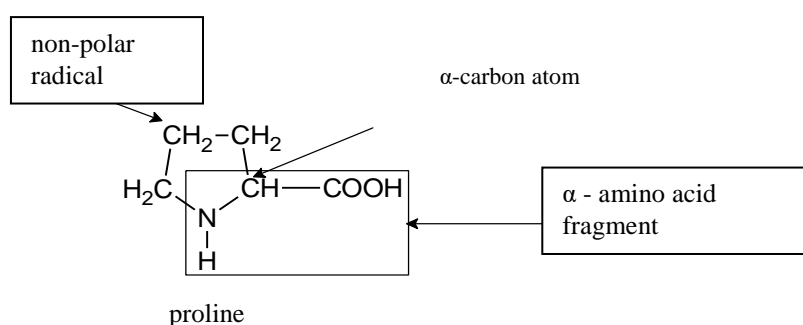
1.2 The aromatic α -amino acids include phenylalanine (the radical R is represented by benzyl) and tyrosine (the radical R is equal to the parahydroxybenzyl radical).

1.3. The heterocyclic α -amino acids include histidine and tryptophan, as well as proline. The α -amino acids of the aromatic and heterocyclic series (with the exception of proline) can be

considered as β -substituted alanine derivatives. The methylene group in these α -amino acids makes possible the rotation of flat cyclic systems and contributes to their spatial distribution.



В пролине α -аминокислотный фрагмент включен в пирролидиновый цикл.

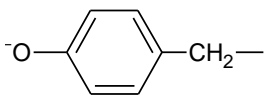
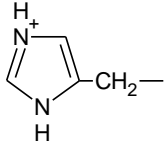


2) α -Amino acids are neutral, basic and acidic. α -Amino acids are divided into neutral, basic and acidic (table 1). In the basic amino acids in the side chain contains an additional amino group. These include arginine and lysine. In the presence of an additional carboxyl group in the amino acid side chain, acidic amino acids are formed, which include aspartic and glutamine amino acids. All other amino acids are neutral amino acids.

3) Hydrophobic and hydrophilic α -amino acids. α -Amino acids are divided into two groups: 1) non-polar or hydrophobic α -amino acids; 2) polar or hydrophilic α -amino acids. The first group includes α -amino acids, which have aliphatic or aromatic radicals in the side chain. These include alanine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine (table 1). The second group includes α -amino acids, in which the radical is represented by polar groups, among which there are ionogenic groups and non-ionic groups. For example, the amino acids tyrosine and serine in the side radical contain a hydroxyl group (table 1). However, it is necessary to pay attention to the fact that the nature of these hydroxyl groups is different. In the case of tyrosine, the hydroxyl group is associated with the aromatic core and is called phenolic, and in serine, the hydroxyl group is alcohol. Phenolic hydroxyl group has a significantly higher acidity compared with the alcohol hydroxyl group. The high mobility of the phenol hydroxyl proton is due to the positive mesomeric effect (+ M) resulting from the conjugation or interaction between the lonely pair of electrons of its oxygen atom and the p-electrons of the double bonds of the benzene ring. Therefore, in tyrosine, the side radical will be a polar ionic group in contrast to serine, in which it will be a polar non-ionic group. The polar non-ionic groups include alcoholic hydroxyl groups (α -amino acids serine and threonine) and amide groups (α -amino acids asparagine and glutamine).

Under certain conditions, ionic groups of α -amino acids carry positive (lysine, arginine, histidine) or negative (aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, cysteine) charges (Table 2).

Table 2 - α -Amino Acids with Polar Ionogenic Groups

Name α -amino acid	Negative charge	Name α -amino acid	Positive charge
Aspartic acid	${}^-\text{OOC}-\text{CH}_2-$	Arginine	$\text{H}_2\text{N}^+=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-$
Glutamic acid	${}^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	Lysine	$\text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_4-$
Tyrosine		Histidine	
Cysteine	${}^-\text{S}-\text{CH}_2-$		

Based on the biological values in the body, α -amino acids are divided into essential and replaceable (Table 1). Essential amino acids cannot be synthesized by the human body from other compounds present in it; therefore, they must be supplied to it with food. In plants, all 20 α -amino acids are synthesized. Essential amino acids include valine, leucine, isoleucine, lysine, methionine, threonine, tryptophan, and phenylalanine. The physiological role of essential amino acids is many-sided and very important.

Thus, 2-amino-3-methylbutanoic acid or valine is used in the body to restore damaged tissues, to carry out metabolic processes in muscles under heavy loads, and to maintain normal nitrogen metabolism in the body; has a stimulating effect.

2-amino-4-methylpentanoic acid or leucine along with valine and isoleucine protects muscle tissue, helping to restore them.

2-amino-3-methylpentanoic acid or isoleucine is necessary for the formation of hemoglobin, restores muscle tissue, supports the normal exchange of nitrogen in the body, stabilizes blood sugar levels and stimulates the process of energy production.

2,6-diaminohexanoic acid or lysine, which decreases the level of neutral lipids in the blood serum and has an antiviral effect, especially for viruses that cause herpes and acute respiratory infections, is synergistic with vitamin C and biflavonoids (vitamins of group P). These indicated vitamins are effective and known natural antioxidants.

2-amino-4-methylthiobutanoic acid or methionine in the body turns into cysteine (with the obligatory presence of vitamin B6), which is a precursor of glutathione (a substance that has a protective effect on the cells of the liver and brain from damage by alcohol, certain drugs and toxic substances). Thus, the synthesis of cysteine and taurine depends on the amount of methionine in the body. In turn, this amino acid provides detoxification processes, primarily on the binding of heavy metals, endogenous and exogenous toxins, has a pronounced antioxidant effect, as it is a good source of sulfur, inactivating free radicals, helps the metabolism of fats, preventing their deposition in the liver and on the walls arteries.

2-amino-3-hydroxybutanoic acid or threonine supports lipotropic function in the liver together with methionine and aspartame, plays an important role in the formation of collagen and elastin, in improving immunity, participating in the production of antibodies.

2-amino-3-indolylpropanoic acid or tryptophan is involved in the synthesis of albumin and globulins, increases the secretion of growth hormone, reduces the amount of fats that form cholesterol in the blood, has hypotensive properties, expanding blood vessels. It is also necessary for the production of vitamin B3 (niacin) and the major neurotransmitter serotonin, transmitting nerve impulses in the body.

2-amino-3-phenylpropanoic acid or phenylalanine, like all the above-mentioned essential amino acids, is also physiologically multifunctional. It takes an active part in the synthesis of proteins, increases mental alertness and memory, helps to improve the secretory function of the pancreas and liver. Tyrosine is biosynthesized from phenylalanine.

The intermediate position between the essential and non-essential amino acids is occupied by arginine, tyrosine and histidine, which are formed in the body, but in insufficient quantities and therefore must also be partly supplied with food. All other amino acids (glycine, alanine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, proline, cysteine, serine) are replaceable amino acids synthesized in the body. The physiological role of semi-replaceable and replaceable acids is also very important.

2-aminopropanoic acid or alanine normalizes carbohydrate metabolism and is part of acetyl coenzyme A.

2-amino-5-carbodiaminoimidopentanoic acid or arginine, by stimulating the immune system, slows the growth of tumors, including cancerous ones, and increases the activity of the thymus gland, which produces T-lymphocytes. It is used for fatty dystrophy and cirrhosis of the liver, as it contributes to detoxification processes and maintaining optimal nitrogen balance in the body, stimulates the production of growth hormone and increases sexual activity in men due to the restoration of erectile function and stimulation of spermatogenesis.

2-aminobutanedioic acid or aspartic acid has an immunomodulatory effect, increases physical endurance, normalizes the balance of excitation and inhibition in the central nervous system, plays an important role in the metabolism of nitrogenous substances.

2-amino-3-imidazolyl propanoic acid or histidine stimulates the formation of hemoglobin and blood formation in general, enhances the secretion of hydrochloric acid and pepsin in the stomach.

2-aminoethanoic acid or glycine is a central neurotransmitter, improves metabolic processes in brain tissues, weakens craving for alcohol, has a positive effect on muscular dystrophies, reduces irritability, normalizes sleep, and has a sedative effect.

2-aminopentanoic acid or glutamic acid and its amide glutamine have a unique effect on nitrogen metabolism by organizing the synthesis of various proteins through the transfer of nitrogen or by linking excess nitrogen, including ammonia, causing disruption of various organs, primarily the brain and liver. It is a stimulating neurotransmitter in the central nervous system, as well as an important component of muscle tissue that affects growth hormone.

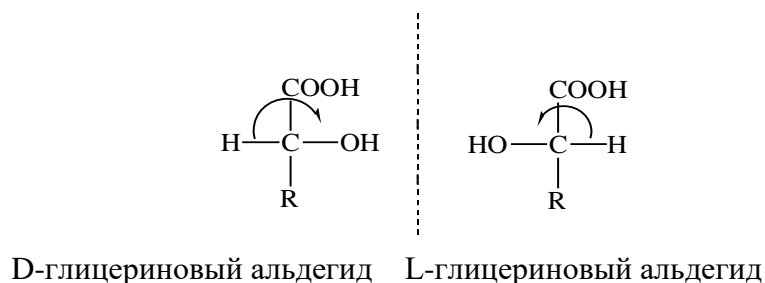
2-amino-3- (4-p-hydroxy) -phenylpropanoic acid or tyrosine is used in the body to synthesize neurotransmitters (nerve impulse transmitters) that help improve mental perception,

enhance the production of thyroid hormones and have antidepressant properties. Symptoms of tyrosine deficiency are also low blood pressure, low body temperature and anxious leg syndrome.

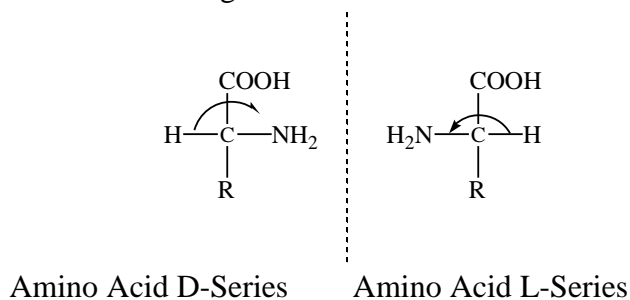
2-carboxy-dihydropyrrole or proline is involved in the synthesis of collagen, restores the structure of the connective tissue (including the musculoskeletal system, heart, parenchymal organs).

2-amino-3-thiol-propanoic acid or cysteine is a sulfur-containing amino acid that plays an important role in the formation of skin tissue, improves its elasticity, is part of the basic protein of the skin, nails, hair and some digestive enzymes, helps neutralize some toxic substances in the body and protects it from the damaging effects of radiation, being one of the highly effective antioxidants. Cysteine performs an important function of stabilizing the spatial structure of the protein due to the formation of disulfide bridges. Thus, it should be noted that all α -amino acids are important biologically active substances.

All α -amino acids, as shown above, contain asymmetric or chiral carbon atoms, therefore they are optically active or optically active compounds. They form optical isomers, the number of which is determined by the formula: 2^n , where the degree n is equal to the number of asymmetric carbons in the compound. The exception to all natural α -amino acids is glycine, in the structure of which there is no asymmetric or chiral carbon atom. Isoleucine, threonine, oxylysin each contain two chiral carbon atoms and, therefore, theoretically, four optical isomers can exist for them. Since it is known that all natural α -amino acids in absolute configuration belong to the L-series, in this case, for the above amino acids, the number of isomers is reduced to two isomers, respectively. Amino acid serine is a standard in establishing the absolute configuration of amino acids like glycerol aldehyde, which is adopted by the standard (configuration standard) in establishing the configuration in a series of carbohydrates:



The α -amino acid configurations of the L- and D-series are shown below.



The bifunctionality of α -amino acids, namely the presence of the acid carboxyl group COOH, capable of producing a proton during dissociation, and the main amino group NH₂, capable of attaching this proton, leads to their interaction in solutions. The acid-base interaction of these groups in solutions gives a salt-like structure called a zwitterion (from the German zwitter is a

hybrid) or a bipolar ion, or an intramolecular salt (Figure 10). That is why amino acids are high-melting solids, often well soluble in water, but not soluble in hydrophobic solvents, for example in ether or in benzene.

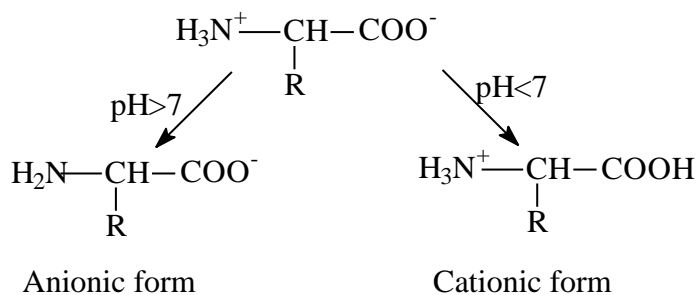
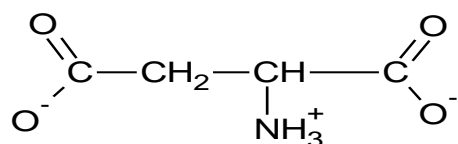


Fig. 10. Image of α -amino acids in acidic and basic media

As can be seen from Figure 10, in the basic medium, the α -amino acid is an anion, and in an acidic medium, it is a cation. In solution, an equilibrium is observed between the anionic and cationic forms of α -amino acids.

Since the nature of the radical R (its electron-donor or electron-withdrawing effect) affects the relative strength of the acidic and basic functions, the pH at which the amino acid solution contains an equal number of cations and anions varies from compound to compound.

The pH value at which the amino acid is neutral, i.e. contains an equal amount of positive and negative charges, is called its isoelectric point, denoted as pI and it is a characteristic value for each amino acid (Table 1). Compare the isoelectric points of different amino acids, for example, glycine and aspartic acid. The isoelectric point of glycine is 6.1, but at this pH value of 6.1, a large proportion of aspartic acid molecules containing a second carboxyl group in the side chain will be in the form of anions (aspartate anion):



To reach the isoelectric point for this α -amino acid, some of these anions need to be protonated, which is possible only with a decrease in pH to 3.0. Therefore, the isoelectric point of aspartic acid will be 3.0.

The basis of the separation of α -amino acids among themselves is the electrophoresis method, based on the fact that at any given pH different α -amino acids have slightly different total charges and therefore, if an electric field is applied, they will move to one of the electrodes at different speeds.

Due to the amphoteric nature of amino acids, they are able to neutralize small amounts of other acids or bases without significant changes in the pH of the solution, i.e. act as buffers. The latter term is adopted for solutions in which a constant pH is maintained. α -amino acids have amphoteric properties due to the presence of the basic (NH_2) and acid (COOH) groups in them. Because of this, they give salts with both acids and bases (Figure 11). The acid-base properties of α -

amino acids make possible their separation and identification by ion exchange chromatography using an amino acid analyzer.

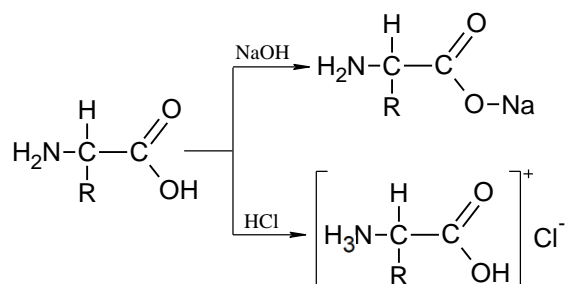
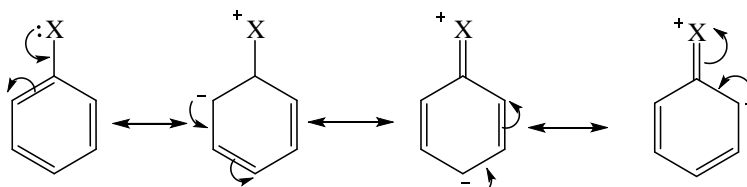


Fig. 11. Reaction of α -amino acids with bases and acids

The identification of α -amino acids can be carried out by comparing the UV spectra and chromatographic mobility of their dinitrophenyl derivatives (DNP-derivatives). Chromatographic mobility of substances is denoted by the symbol R_f and it means the speed of movement of substances relative to each other during their chromatography. α -Amino acids form with 2,4-dinitrofluorobenzene DNP-derivatives, painted in yellow. DNP derivatives of α -amino acids are extracted from the reaction mixture with organic solvents and are identified by spectrophotometric or chromatographic methods by comparing their R_f values of taps or standard samples. The R_f and UV spectra of the DNP derivatives of all 20 α -amino acids are known. The fluorine atom located in the aromatic nucleus is not very mobile, since its mobility due to the negative induction effect (-I-effect) is prevented by conjugation or interaction (+M effect) between the lonely pairs of chlorine electrons and the π -electrons of the aromatic nucleus. As a result, an increase in the strength of the C – F bond (carbon – fluorine) occurs, which makes it difficult to break.



Resonance formulas that contribute to the structure of fluorobenzene

However, the mobility of fluorine in the aromatic nucleus can be increased by introducing into ortho- and para-positions with respect to it strong electron-withdrawing groups (for example, NO_2), which deplete electron density from benzene to themselves and thereby loosen the C – F bond (carbon -fluoro), which is observed in the case of 2,4-dinitrofluorobenzene and makes possible the nucleophilic substitution of fluorine in it according to the scheme shown in Figure 12.

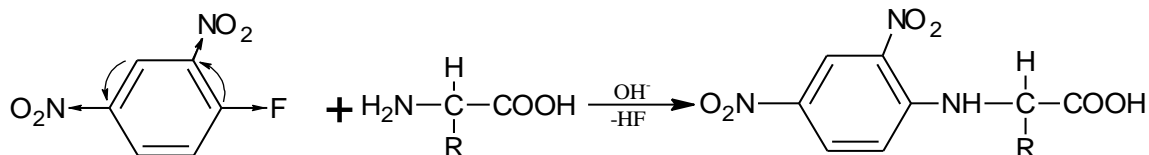


Fig. 12. Synthesis of DNP α -amino acid derivatives

α -amino acids are characterized by thermal decarboxylation due to the fact that the α -position of the carboxyl group contains an electron-withdrawing amino group, which exhibits a negative induction effect (-I-effect) due to the greater electronegativity. In the laboratory, the

decarboxylation of α -amino acids is carried out by heating them in the presence of a CO_2 absorber, for example $\text{Ba}(\text{OH})_2$. With the participation of decarboxylase enzymes and pyridoxal phosphate coenzyme in biological systems, α -amino acid decarboxylation reactions occur, which leads to the formation of biogenic amines. For example, decarboxylation of serine by the action of the enzyme decarboxylase and pyridoxal phosphate coenzyme results in the amino alcohol, colamine (2-amino-1-ethanol). There is also an inductive effect of the OH group in serine, which additionally facilitates decarboxylation (Figure 13).

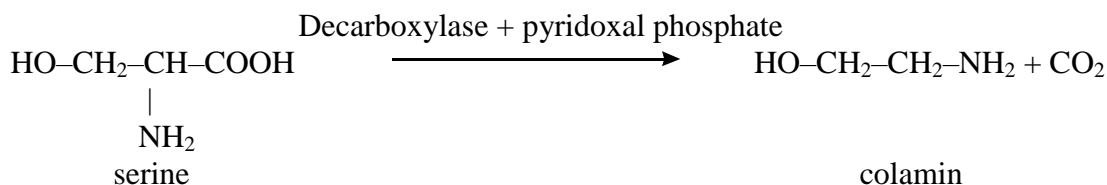


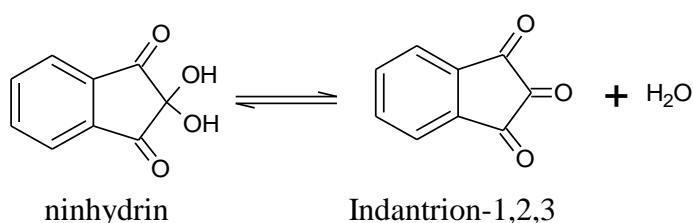
Fig. 13. Decarboxylation of serine

A number of derivatives are synthesized from colamine in the body, including choline and acetylcholine. Colamine and choline are biogenic amines that make up phospholipids. Histidine decarboxylation catalyzed by histidine decarboxylase results in a biogenic amine called histamine, which is one of the endogenous factors (mediators) involved in the regulation of vital body functions and playing an important role in the pathogenesis of a number of disease states. Catecholamines in the form of dopamine, norepinephrine and adrenaline are biogenic amines and they are formed in the body from the essential amino acid phenylalanine.

β -alanine (β -aminopropionic acid) is part of pantothenic acid, which is a vitamin of group B (vitamin B5). This chemical acts directly on the vascular centers of the peripheral bloodstream. This drug prevents the rapid entry of histamine into the bloodstream, but in essence it is not an antihistamine blocker, since it does not have a direct blocking effect on the corresponding receptors.

γ -Aminobutyric acid, which is formed by the decarboxylation of glutamic acid, is known as the drug "Aminalon" (natural tranquilizer), is a neurotransmitter. It restores metabolic processes in the brain, promotes the utilization of glucose by the brain and the removal of toxic metabolic products from it. Increases the productivity of thinking, improves memory, a positive effect on the restoration of movements and speech after a violation of cerebral circulation, has a slight psychostimulating effect.

For the detection of α -amino acids in LSR or their authenticity tests, their general color reaction with ninhydrin is used, which is carried out at a temperature of 100-110 ° C (Figure 14). Ninhydrin, losing a water molecule when heated, turns into an indantrione-1,2,3. 2 moles of indantrione-1,2,3 interact with the α -amino acid to obtain a colored interaction product due to the formation of a system of conjugated bonds in it.



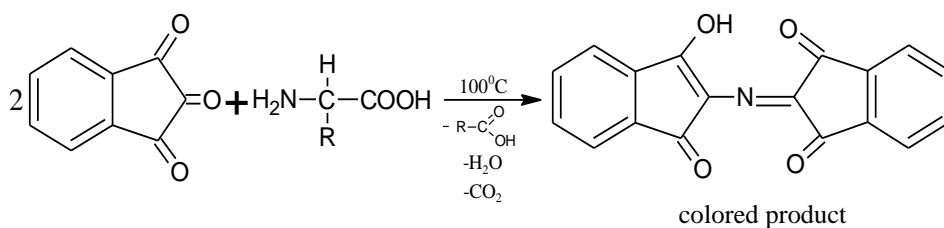
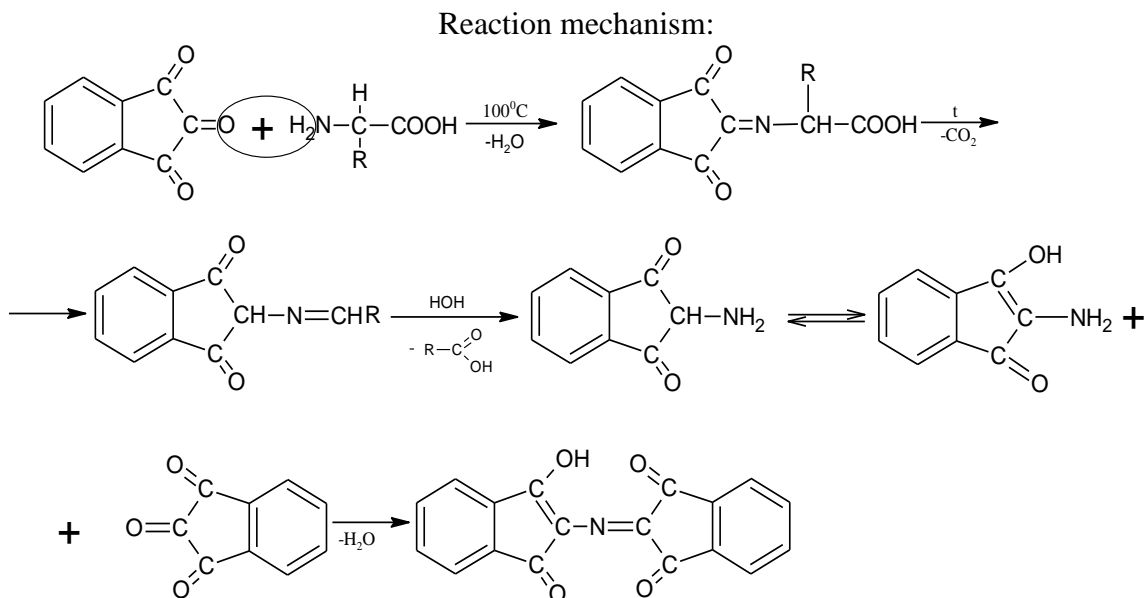


Fig. 14. Reaction of α -amino acids with ninhydrin



Qualitative detection of amino acids of all types of raw materials (aerial part and roots) is carried out in aqueous extracts by paper chromatography (BC) (one-dimensional, two-dimensional) and ninhydrin reaction. To this end, 15 g of each sample is placed in a flask, filled with 100 ml of distilled water and heated under reflux in a boiling water bath for 1 hour. The extract is filtered, and the remaining residue is extracted 2 more times under the same conditions. For one-dimensional chromatography, the combined extracts are concentrated to half the volume and applied on the starting line of chromatographic paper of the FN3 or FN 16 brand in parallel with reliable samples of amino acids (they are called standard or authentic samples, or taps). Then the chromatogram is placed in a chromatographic chamber with a mobile phase, which is a solvent system: butanol - acetic acid - water in a ratio of 40: 12.5: 29. For saturation, the chromatographic chamber is filled in advance with the mobile phase to the volume required for chromatography so that its level does not touch the deposited spots, otherwise they will simply dissolve in it. Chromatograph the ascending method until the solvent reaches the surface of the paper to a level called the solvent front (at the same time from the edge of the paper remains from 1.5 to 2 cm). Then, the chromatogram is removed from the chamber, dried under a load, treated with ninhydrin solution and heated in an oven at a temperature of 105-110 ° C for several minutes. Amino acids appear as colored spots, determine the R_f values of each amino acid and compare them with R_f reference samples, i.e. with known amino acids. R_f is a dimensionless quantity, shows the speed of movement of substances relative to each other when they are chromatographed in various solvent systems and is determined by the ratio of the path traveled by substances from the starting line to the middle of their spot to the path traveled by the solvent. Accordingly, the value of R_f is always less than one.

Thus, according to the convergence of the Rf values, qualitative detection of the amino acids contained in the studied medicinal plant object is carried out.

When conducting two-dimensional chromatography of extracts, you can get a peptide map of amino acids. In this case, first, chromatography is carried out in one direction (I solvent system), then in the second (perpendicular) direction in the second solvent system - II. The best separation of various amino acids with the greatest difference in Rf values is achieved when using the following solvent systems in two-dimensional chromatography: I - heptane-dichloroethane-acetic acid (20:30:30) and II - butanol-acetic acid-water (80:20: 20).

Questions for self-control:

1. The difference between α -, β - and γ -amino acids. Classification of α -amino acids and their biological significance for a living organism. What plants are sources of α -amino acids? The physiological significance of the formation of biogenic amines from α -amino acids.
2. Why are α -amino acids the substances of primary metabolism in a living organism? α -amino acid chirality.
3. Explain the acid-base interaction in α -amino acids, their behavior in acidic and basic media, and give the concept of their isoelectric point.
4. How to identify the α -amino acids by their reaction with 2,4-dinitrofluorobenzene?
5. Describe the essence of the detection of α -amino acids by the BH method.

2.2.2.2 Витамины

Витамины представляют собой группу органических соединений, обладающих очень высокой биологической активностью и незаменимых для организма человека и животных, поскольку они являются действующими частями ряда коферментов, без которых невозможно протекание ряда ферментативных реакций и, следовательно, соответствующих метаболических процессов живого организма. Витамины делятся на водорастворимые и жирорастворимые (таблица 3).

Как видно из данных, представленных в таблице 3, витамины имеют огромное значение для метаболизма веществ и жизнедеятельности организма, так как из-за их отсутствия или недостатка в организме развивается ряд заболеваний. Причинами болезней, возникающих из-за недостатка витаминов, могут быть пища, бедная витаминами, или консервированные продукты. Витамины, подобно незаменимым аминокислотам, не могут синтезироваться животными и человеком и должны содержаться в качественной и полноценной пище. В отличие от аминокислот ежедневная в них потребность составляет величину порядка миллиграммов, а не граммов.

Таблица 3 – Представители водо- и жирорастворимых витаминов

Обозначение	Название	Источник питания	Последствия недостатка витамина
Витамины группы В	В ₁	Тиамин	Ростки пшеницы, яйца, печень, горох, фасоль, орехи, арахис
	В ₂	Рибофлавин	Зеленые овощи, молоко, печень, дрожжи
	В ₃	Никотинамид	Овощи, неочищенный рис, печень, дрожжи, молоко
	В ₅	Пантотеновая кислота	Горох, пивные дрожжи, маточное молоко пчел
	В ₆	Пиридоксин	Злаки, печень, дрожжи
	В ₇ или Н	Биотин	Дрожжи, молоко, яичный желток, печень
	В ₉	Фолиевая кислота	Зеленые овощи, печень, дрожжи
В ₁₂	Цианкобаламин	Мясо, молоко, яйца	Злокачественное малокровие
А	Ретинол	Морковь, тыква, печень, рыбий жир	Постепенная потеря зрения, особенно в темноте
Д	Кальциферол	Обычные продукты, жир	Рахит у детей
Е	Токоферол	Соевые бобы, ростки пшеницы, зеленые овощи	Бесплодие

К	Витамин К	Зеленые листья	Медленное свертывание крови
С	Аскорбиновая кислота	Цитрусовые, черная смородина, шиповник, многие овощи	Цинга
Р	Полифенолы, флавоноиды	Ягоды, овощи, плоды	Воспалительные процессы

Витамины локализуются в зеленых частях растений, цветках, плодах и в семенах, не синтезируются в организме человека. При промышленной переработке лекарственного растительного сырья, содержащего витамины, получают поливитаминные средства (плоды черной смородины, плоды рябины обыкновенной, плоды шиповника, листья крапивы); кровоостанавливающие средства (цветки и листья зайцегуба, листья крапивы, кора калины, трава пастушьей сумки, трава тысячелистника); ранозаживляющие и противовоспалительные средства (масло облепихи и масло шиповника, трава череды, трава сушеницы топяной); противовоспалительное и антисептическое средство (цветки календулы); противовоспалительное и противоаллергическое средство (трава череды); желчегонные средства (кукурузные столбики с рыльцами, плоды шиповника), мочегонные средства (плоды и листья земляники, трава череды).

Водорастворимые витамины. К витаминам группы В относятся следующие: В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₇, В₉, В₁₂. Необходимо отметить, что витамины группы В сгруппированы вместе по чисто историческим причинам, поскольку они встречаются вместе с водорастворимой фракцией, выделяемой из молока.

Относительно эффективными источниками тиамин (витамин В₁) можно считать рябину обыкновенную, лимонник, барбарис и шиповник (от 0,05 до 0,01 мг/100 г).

Витамин В₁ или тиамин представляет собой два гетероциклических цикла – пиримидина и тиазола, соединенных между собой в молекуле метиленовой группой. Тиамин поэтому относят к пиримидинотиазоловым или пиримидилметилтиазолиевым витаминам. Из многочисленных вариантов синтеза тиамин представляет интерес метод, состоящий из трех этапов: синтеза пиримидиновой части молекулы, синтеза тиазолового цикла и связывания их между собой. Последний этап схемы взаимодействия двух гетероциклов представлен на рисунке 15.

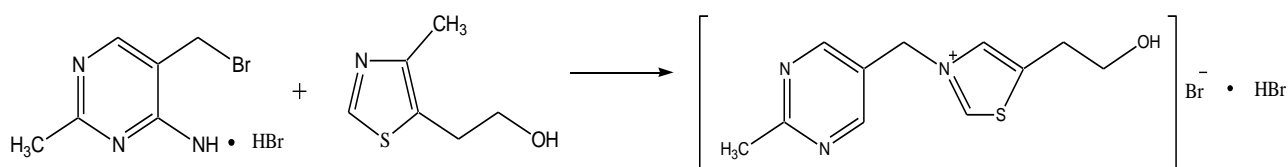
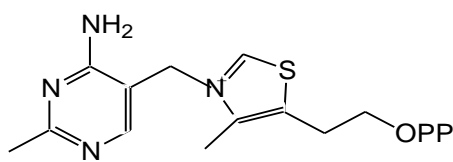


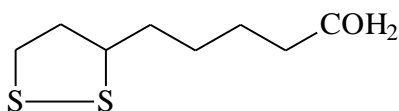
Рис. 15. Схема синтеза тиамин бромид

Тиамин в виде фосфата наряду с липоидной кислотой участвует в организме в декарбоксилировании α -кетокислот, например, пировиноградной кислоты (СН₃СОСООН) в цикле Кребса, что необходимо для образования ацетилкофермента А, который имеет первостепенное значение в биохимическом окислении жиров и углеводов и в биосинтезе многих природных продуктов. Суточная потребность в тиамине составляет от 1,5 до 3 мг,

недостаток тиамина приводит к неспособности клетки генерировать энергию в достаточных количествах.



Тиаминпирофосфат (В₁)

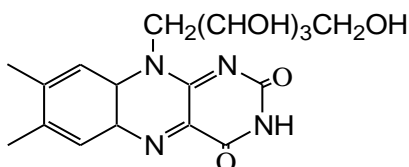


Липоидная кислота

Самыми ранними симптомами дефицита тиамина являются потеря аппетита, тошнота, депрессия, периферическая невропатия и общая слабость. Хроническая недостаточность тиамина ведет к таким более тяжелым неврологическим симптомам, как потеря координации глаз и помутнение сознания.

Максимум витамина В₂ отмечен в ягодах ежевики (до 2,3 мг/100 г), клюквы (до 0,31 мг/100 г), плодах шиповника (0,33-0,88 мг/100 г), черники (до 1,8 мг/ 100 г) и облепихи (0,2-0,6 мг/100 г).

Рибофлавин (витамин В₂) представляет собой эфир рибофлавина и АДФ, входит в состав коферментов флавиномононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), являясь их активным началом, т.е. осуществляет их биологическую роль.



Рибофлавин (витамин В₂)

Эти флавиновые коферменты участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, при этом два атома водорода обратимо присоединяются к рибофлавиновой части (витамин В₂) молекулы. Эти реакции происходят, например, в цепи дыхания. ФАД, подобно окисленному НАД⁺, присоединяет два электрона. Однако ФАД в отличие от НАД⁺ присоединяет оба теряемых субстратом атома водорода с получением восстановленной формы в виде ФАДН₂ (рисунок 16).

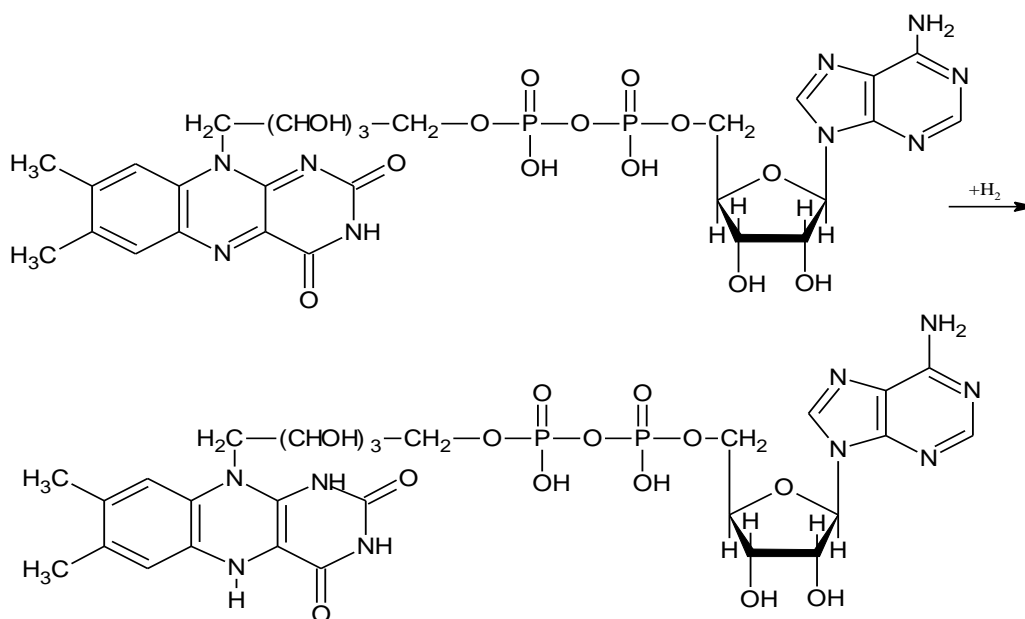
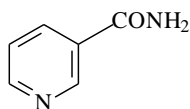


Рис. 16. Пример биохимического восстановления ФАД до ФАД*H₂

Никотиновую кислоту и ее амид (никотинамид) называют *витамин В₃* и их относят также к *витаминам группы РР*. По содержанию данного витамина лидерами являются ягоды черники (до 2 мг/100 г), плоды облепихи (0,2-0,6 мг/100 г) и шиповника (0,6 мг/100 г).



Никотинамид

Суточная потребность в витамине В₃ составляет от 15 до 30 мг. Недостаточное потребление данного витамина (как и триптофана) ведет к глосситу, дерматиту, потере веса, диарее, депрессии и деменции. Такие симптомы, как депрессия, дерматит и диарея объединяют под заболеванием, которое называется пеллагра. Никотиновая кислота при назначении фармакологических доз (2-4 г/день) понижает уровень холестерина в крови, это используется для лечения гиперхолестеролемии. Также никотиновая кислота ускоряет расход гликогена, что ведет к возрастанию уровня глюкозы в крови, поэтому терапия никотиновой кислотой не рекомендуется диабетикам и больным подагрой.

Никотинамид является действующей частью окислительно-восстановительных коферментов НАД⁺ и НАДФ⁺, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях организма. Восстановление окисленного НАД⁺ до НАДН+H⁺ происходит за счет восстановления никотинамидного кольца в положениях 1,4 с потерей ароматичности пиридинового цикла, т.е. происходит переход от термодинамически более устойчивого окисленного никотинамидадениндинуклеотида в виде НАД⁺ к менее устойчивой его восстановленной формы в виде НАДН+H⁺, но с более высокой потенциальной энергией. Восстановление окисленного НАД⁺ до НАДН+H⁺ представлено на (рисунке 17).

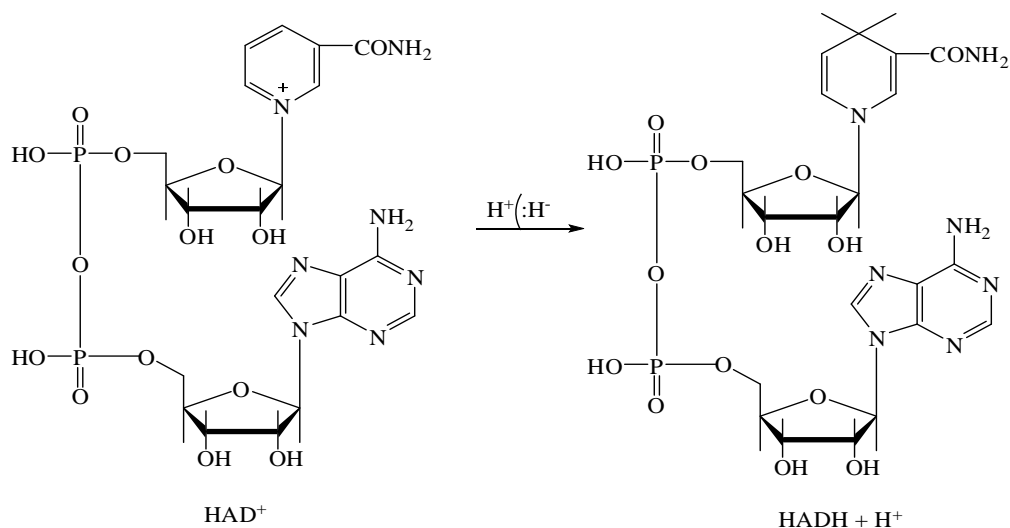


Рис. 17. Переход окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида NAD^+ в восстановленную форму $\text{NADH} + \text{H}^+$

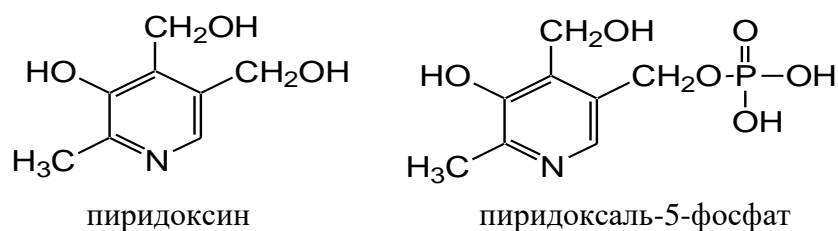
Пантотеновая кислота (витамин B₅). Иногда к витаминам группы В относят и пантотеновую кислоту, хотя она и не является существенной частью пищи, поскольку синтезируется в организме кишечными бактериями. Пантотеновая кислота наиболее присуща зелени и корневой части растений. Так, например, в траве укропа витамина B₅ накапливается около 0,25 мг/100 г. В плодах, например в яблоках, его содержание составляет около 0,03 мг/100 г; в грецких орехах – на уровне 0,9 мг/100 г.



Пантотеновая кислота

Пантотеновая кислота является структурным компонентом ключевого вещества метаболизма – кофермента А, который участвует в протекании всех видов обмена – белкового, липидного, углеводного, в синтезе гемоглобина, гормонов коры надпочечников, нейромедиатора ацетилхолина и в процессах детоксикации организма путем перенесения ацильных остатков. Потребность в данном витамине составляет 10-15 мг в сутки. Недостаточность пантотеновой кислоты наблюдается очень редко, т.к. она широко распространена в пищевых продуктах.

Пиридоксин (витамин B₆). *Пиридоксаль, пиридоксамин и пиридоксин,* различающиеся функциональной группой в четвёртом положении, в общем известны как витамин B₆. Все три компонента превращаются в биологически активную форму витамина B₆ – пиридоксальфосфат. Это превращение катализируется пиридоксалькиназой. Пиридоксальфосфат как кофактор используется в реакциях трансминирования аминокислот, а также в гликогенолизе как кофактор гликогенфосфорилазы. Участвует в обмене белка, аминокислот и серы, необходим для процессов кроветворения, нервной деятельности, состояния эпителиальной и костной ткани. Суточная потребность в витамине B₆ составляет 2-3 мг.



Недостаточность витамина В₆ бывает редко и обычно ассоциируется с недостаточностью других витаминов из группы В, проявляясь в нарушении обмена аминокислот, в частности, триптофана. Недостаточность в этом витамине может возникнуть при применении изониазида, используемого для лечения туберкулеза, и пенициллинамина (используется для лечения ревматоидного артрита).

Витамин Н или В₇, или *биотин* представляет собой органическую кислоту, которая в организме человека функционирует как кофермент в многочисленных реакциях карбоксилирования, т.е. во введении диоксида углерода в органические молекулы, например в превращении ацетилкофермента А в малонилкофермент А, участвует в углеводно-жировом обмене, является синергистом витаминов В₂, В₆, А, РР. В организмах высших животных он участвует в удалении аммиака, образующегося при дезаминировании аминокислот. Диоксид углерода, переносимый биотином (рисунок 18), соединяется с аммиаком и в несколько стадий превращается в мочевины, которая выделяется из организма.

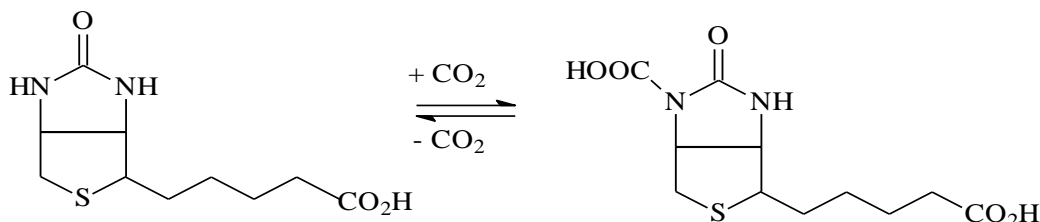
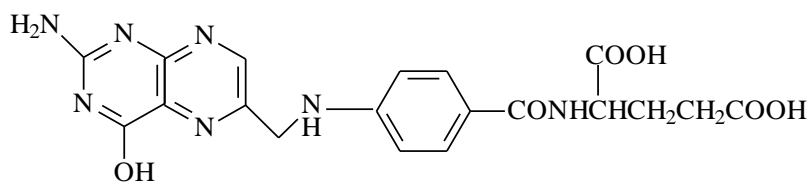


Рис. 18. Обратимое присоединение диоксида углерода к биотину

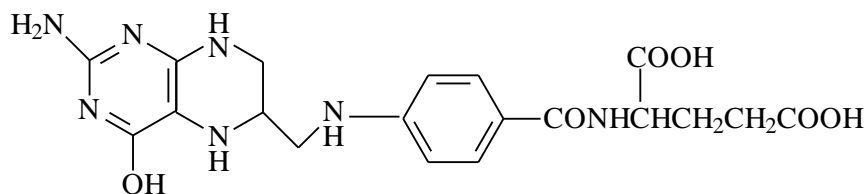
Фолиевая кислота или витамин В₉ (или В_с) присутствует в сырье преимущественно в связанном состоянии, высвобождаясь под действием ферментов. Фолиевая кислота состоит из трех частей: птеридинового кольца, *para*-аминобензойной и глутаминовой кислот. Этот витамин играет важную роль в метаболизме нуклеиновых кислот и белков при переносе одноуглеродных остатков (-СН₃, -СН₂ОН или -СНО) к другим молекулам, например, при биосинтезе пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, необходим для процессов кроветворения, деления клеток, роста и развития всех органов и тканей.



Фолиевая кислота

Недостаточность фолиевой кислоты из-за широкого распространения в продуктах встречается редко и связана, в первую очередь, с нарушением синтеза ДНК. Потребность в фолиевой кислоте составляет 0,18-0,2 мг в сутки.

В клетках этот витамин превращается в тетрагидрофолиевую кислоту:



Главными причинами недостаточности является нарушения абсорбции, метаболизма витамина или его повышенной потребности, например, во время беременности. При недостатке фолиевой кислоты начинается нарушение образования форменных элементов крови, возникает злокачественная анемия, снижается сопротивляемость заболеваниям. Наиболее богаты этим витамином плоды облепихи (0,79 мг/100 г), рябины обыкновенной (от 0,20 до 0,55 мг/100 г) и боярышника (до 0,4 мг/100 г). Причем, в солнечное лето фолиевой кислоты накапливается в два-три раза больше, чем в прохладное и дождливое время года.

Цианкобаламин или витамин В₁₂ в организме превращается в кофермент В₁₂. Это группа соединений корринового ряда весьма сложной структуры, участвует в биохимических процессах в коферментных формах, состоит из тетрапиррольного кольца и иона кобальта в центре. За установление его структуры методом дифракции рентгеновских лучей Дороти Крауфут Ходжкин была удостоена Нобелевской премии по химии (1964 г.). Лабораторный синтез витамина В₁₂, осуществленный Р. Вудвардом и А. Эшенмозером, представляет собой одно из достижений органического синтеза. Витамин В₁₂ синтезируется исключительно микроорганизмами (актиномицинами) и сине-зелеными водорослями. В организме человека за это производство ответственна микрофлора кишечника. Пищевым его источником является рыба, печень, мясо, молочные продукты (таблица 3). Витамин может освобождаться от белка, и тогда он становится активным. Этот процесс осуществляется в желудке под действием желудочного сока или трипсина при потреблении мяса. Витамин В₁₂ необходим для кроветворения и нормального развития нервных волокон, потребность в нем составляет 1,5-5,0 мкг в сутки. При дефиците витамина В₁₂ развивается пернициозная анемия, являющаяся результатом того, что страдает синтез пуриновых и пиримидиновых оснований, а следовательно, и синтез ДНК.

Аскорбиновая кислота или витамин С – хороший восстанавливающий агент, она легко превращается в дегидроксиаскорбиновую кислоту. Реакция является обратимой и переход от дегидроксиаскорбиновой кислоты к аскорбиновой осуществляется при действии мягких восстанавливающих агентов (рисунок 19).

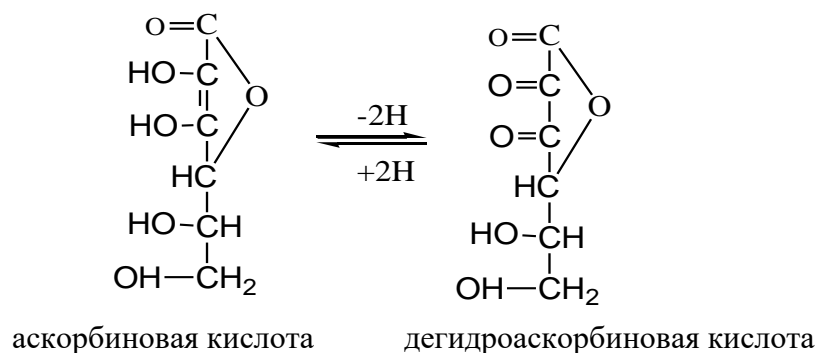


Рис. 19. Аскорбиновая кислота как восстанавливающий агент

Биохимическая роль витамина С, несомненно, связана с его восстановительными свойствами. Легкость гидролиза γ -лактонового цикла аскорбиновой кислоты приводит к тому, что в вареных овощах его содержание меньше, чем в сырых. Аскорбиновая кислота накапливается в достаточных количествах во многих растительных объектах, например в траве зверобоя (более 100 мг/100 г), укропа (до 330 мг/100 г), горца птичьего (до 700 мг/100 г); хвое (80-300 мг/100 г), листьях чёрной смородины (300-470 мг/100 г), брусники (до 200 мг/100 г), крапивы (до 600 мг/100 г) и душицы (до 500 мг/100 г); околоплодниках грецких орехов (около 200 мг/100 г). Прекрасным источником витамина С являются почки и молодые листья берёзы – до 2,8 %.

К витамину группы Р относят обширную группу природных соединений, принадлежащих к окисленным и восстановленным формам флавоноидов (рисунок 20).

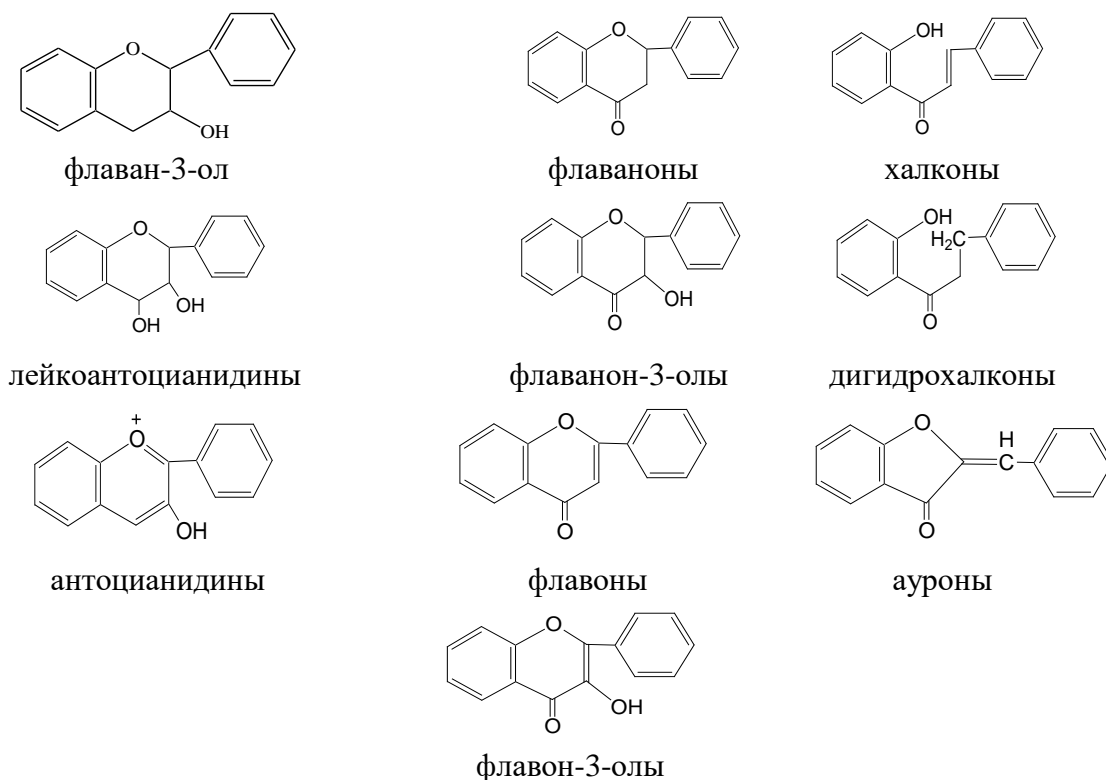


Рис. 20. Классификация флавоноидов

В настоящее время известно более 6000 природных флавоноидов различной структуры. Флавоноиды содержатся в растениях в виде гликозидов и в свободном состоянии (агликоны), в структуре которых в качестве заместителей могут быть алкильные, ацильные или другие функциональные группы. В чистом виде они представляют собой кристаллические или аморфные вещества, бесцветные или окрашенные, растворимые в воде и спиртах. В клетках растений фенольные соединения накапливаются главным образом в вакуолях эпидермических тканей цветков, фруктов, листьев, стеблей и корней. Флавоноиды чрезвычайно обширная и разнообразная группа органических соединений, весьма неоднородная по химическому строению. Они представляют производные 2,3-дигидро бенз- γ -пирана (флаван-3-олы или катехины, флаван-3,4-диолы или лейкоантоцианидины, антоцианидины) и бенз- γ -пирона (флаваноны или дигидрофлавоны, флаванон-3-олы или дигидрофлаванон-3-олы, флавоны, флаванон-3-олы, халконы, дигидрохалконы, ауруны), которые отличаются между собой по степени окисленности гетероциклического кольца С.

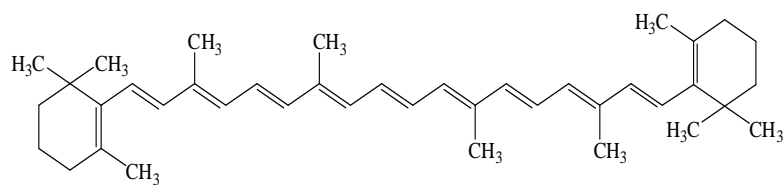
Многообразие флавоноидов обусловлено не только структурными изменениями гетероциклического кольца С, но и наличием различных радикалов в ароматической части молекул – кольцах А и В, степенью гликозидирования, местом присоединения углеводных остатков, их природой и количеством, величиной окисных циклов сахаров, конфигурацией гликозидных связей, характером сочленения гликозидной части с агликоном, а также степенью полимеризации мономерных единиц.

Жирорастворимые витамины, как и водорастворимые витамины, имеют огромное значение для нормального обмена веществ и жизнедеятельности организма. С другой стороны, неумеренный прием этих витаминов может привести к их накоплению в жире организма иногда до токсичных концентраций. Данные об источнике питания и последствий недостатка приема жирорастворимых витаминов приведены в таблице 1.

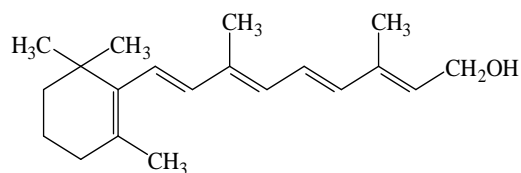
Витамин А представлен тремя биологически активными формами: ретинолом, ретиналем (ретинальдегид) и ретиноевой кислотой. *В растениях витамин А не встречается, но многие виды растительного сырья содержат каротины, которые являются предшественников этого витамина.* Высоким содержанием каротиноидов характеризуются плоды шиповника (от 2,6 до 4,2 мг/100 г), боярышника (от 2 до 14 мг/100 г), облепихи и рябины обыкновенной (до 18-20 мг/100 г), средним – ягоды чёрной смородины и черники (до 0,7-1,6 мг/100 г) и некоторые другие виды плодов и ягод. Хорошим источником каротиноидов являются также зелёные части растений – трава горца птичьего (содержание до 39 мг/100 г), листья шалфея (до 18 мг/100 г) и крапивы (до 50 мг/100 г), цветки и соцветия многих растений. Значительное содержание каротиноидов отмечается в цветках календулы – до 3 %. Каротины – одна из основных групп каротиноидов, которые по своей природе являются тетратерпенами $C_{40}H_{64}$. Каротин в растениях может быть в форме трех изомеров: α -, β - и γ -каротинов, но среди них основным, т.е. наиболее широко распространенным является β -изомер и на его долю в зависимости от вида растительного сырья приходится от 10 % до 80 % от суммы всех каротиноидов. Из α - и γ -каротинов образуется только по одной молекуле витамина А, так как в отличие от β -каротина они содержат одно β -иононовое кольцо. В организме происходит гидролитическое расщепление молекулы β -каротина на две симметричные половины, в результате чего образуются две молекулы витамина А. Это

превращение происходит в печени и в стенках кишечника под влиянием гипотетического фермента каротиказы. При попадании β -каротинов в просвет кишечника происходит его расщепление каротиндиоксигеназой и образование ретиналя. Ретиналь потом восстанавливается до ретинола с помощью ретинальдегидредуктазы. Ретинол этерифицируется пальмитиновой кислотой и вступает в кровь в составе хиломикронов. Остатки хиломикронов потребляются печенью, где и происходит накопление витамина А. Транспорт витамина А из печени к другим органам и тканям осуществляется в связанной форме ретинола с апоретинол-связывающим белком. Отсутствие витаминов группы А вызывает нарушение роста организма, понижение стойкости к заболеваниям и куриную слепоту. Ретиналь представляет собой альдегидную форму витамин А, является компонентом светочувствительного вещества родопсина, которое обнаружено в сетчатке глаза и является ответственным за поглощение света в зрительном процессе.

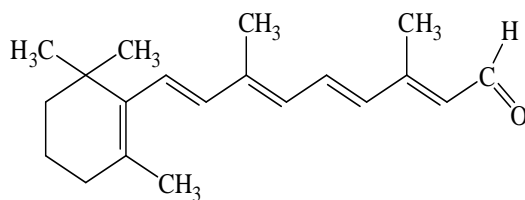
β -каротин, ретинол, ретиналь являются сопряженными системами с открытой цепью, чем и объясняется их более высокая термодинамическая устойчивость по сравнению с полиенами с изолированными двойными связями. Сопряжение – это перераспределение электронной плотности в системе π -связей, приводящее к стабилизации молекулы. В результате делокализации π -электронов выделяется энергия, поэтому сопряженная система всегда имеет более низкое содержание энергии (более низкий энергетический уровень), чем система с изолированными кратными связями, другими словами, более термодинамически устойчива. Из нижеуказанных трёх соединений самой термодинамически устойчивой будет полиеновая цепочка β -каротина, сопряженная цепь которого является самой длинной, содержащей 11 сопряженных двойных связей, и, следовательно, является самой устойчивой. Далее следует ретиналь (6 сопряженных двойных связей) и затем ретинол – витамин А, содержащий 5 сопряженных двойных связей. Ретиноевая кислота стимулирует экспрессию генов многих рецепторов к факторам роста, т.е. повышает чувствительность клеток к ростовым стимулам.



β -каротин



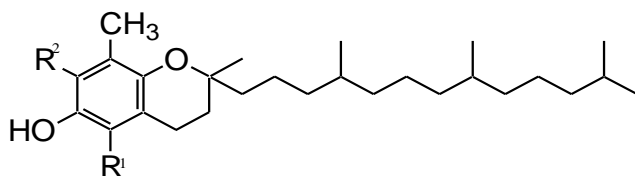
Ретинол



Ретиналь

Благодаря этому она регулирует нормальный рост и дифференцировку клеток эмбриона и молодого организма; регулирует деление и дифференцировку быстро делящихся тканей (хряща, костной ткани, сперматогенного эпителия, плаценты, эпителия кожи, слизистых, иммунной системы).

Витамин E (токоферол). Витамин E представляет собой смесь α -, β - и γ - токоферолов



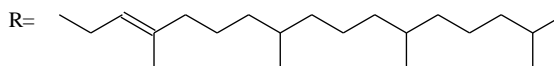
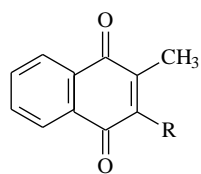
$R^1 = R^2 = \text{CH}_3$ (α -токоферол)

$R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \text{H}$ (β -токоферол)

$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{CH}_3$ (γ -токоферол)

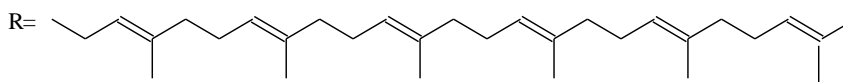
Токоферолы синтезируются только растениями. Богаты ими облепиха (до 18 мг/100 г), шиповник, боярышник, рябина обыкновенная. В значительных количествах токоферолы накапливаются в липофильной составляющей листьев (бадан – около 0,5 мг/100 г), корней и корневищ (девясил – до 32 мг/100 г). Главными симптомами недостаточности витамина E является увеличение хрупкости эритроцитов, мышечная слабость и бесплодие. Витамин E, встраиваясь в фосфолипидный бислой мембран, выполняет антиоксидантную функцию, иными словами препятствует развитию перекисного окисления липидов в организме, укрепляет стенки кровеносных сосудов, предотвращает образование тромбов и способствует их рассасыванию, укрепляет миокард. Это – мощный антиоксидант, связывающий свободные радикалы и молекулярный кислород, тем самым предотвращающий от окисления жирные кислоты мембран, снижает физическое и эмоциональное напряжение. α -Токоферол может связывать два пероксидных свободных радикала и потом, взаимодействуя с глюкуроновой кислотой, выводится из организма в составе желчи. Суточная потребность в витамине E составляет 10-20 мг.

Витамин K существует в двух видах – витамин K_1 (филлохинон) и K_2 (менахинон), отличающиеся по размеру изопреновой боковой цепи, которая не играет роли в физиологической активности витамина, так как в качестве его синтетического заменителя используется 2-метил-1,4-нафтохинон. Витамин K найден в различных объектах (им богаты зелёные листья крапивы (до 0,2 %), хвоя, трава горца, плоды рябины и шиповника, ягоды черники и чёрной смородины и многие другие виды растительного сырья, а также арахисовое масло и печень) и он играет жизненно важную роль в поддержании нормального уровня протеинов, необходимых для свертывания крови и обмена веществ в костной ткани. Витамин K относится к хинонам, имеющим большое значение в биоорганической химии, так как они широко распространены в природе как продукты растительного и животного метаболизма.



R=H (2-метил-1,4-нафтохинон)

Витамин K₁



Витамин K₂

Витамин К может всасываться в кишечнике только в присутствии желчных солей, суточная его потребность составляет 60-80 мкг. Так как витамин К синтезируется частично микрофлорой кишечника, то все лекарства, действующие на микрофлору, могут привести к его недостаточности. Основным симптомом проявления недостаточности витамина К является геморрагический синдром.

Вопросы для самоконтроля:

1. Назовите лекарственные растения, являющиеся источниками витаминов?
2. Почему для организма витамины являются жизненно необходимыми веществами?
3. Как связаны между собой понятия витамин и кофермент? Приведите соответствующие примеры, подтверждающие эти понятия.
4. Различие между водорастворимыми и жирорастворимыми витаминами?
5. Классификация водорастворимых витаминов и их биологическое значение для живого организма.
6. Классификация жирорастворимых витаминов и их физиологическая роль для живого организма.

2.2.2.3 Карбоновые кислоты

Карбоновые или органические кислоты (таблица 4) относятся к обязательным компонентам химического состава растительного сырья, они являются продуктами превращения углеводов и им самим принадлежит исключительно важная роль в обмене веществ – они участвуют в синтезе аминокислот, алкалоидов и многих других соединений. Вкус и отчасти ароматические свойства растительного сырья определяется наличием в их летучей фракции ряда карбоновых кислот, а именно муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной, валериановой и каприловой кислот и их эфиров, обладающих резким и острым запахом. Именно эти кислоты определяют специфические оттенки аромата лекарственно-технического сырья, преимущественно растений-эфироносков. Так, *муравьиная кислота* входит в состав органических кислот калины, толокнянки, яблок, ягод малины, стеблей и листьев крапивы, травы тысячелистника и многих других видов сырья.

Таблица 4 – Физические свойства некоторых насыщенных карбоновых кислот жирного ряда

Кислота	Структура	Растворимость	T пл.,	T кип., °C	K _A (H ₂ O)
---------	-----------	---------------	--------	------------	-----------------------------------

		г/100 г H ₂ O	°C		при 25°C
Муравьиная	HCO ₂ H	∞	8,4	100,7	1,77*10 ⁻⁴
Уксусная	CH ₃ CO ₂ H	∞	16,6	118,1	1,75*10 ⁻⁵
Пропионовая	CH ₃ CH ₂ CO ₂ H	∞	-22	141,1	1,3*10 ⁻⁵
Масляная	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	∞	-8	163,5	1,5*10 ⁻⁵
Изомасляная	(CH ₃) ₂ CHCO ₂ H	20 ²⁰	-47	154,5	1,4*10 ⁻⁵
Валериановая	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	3,3 ¹⁶	-34,5	187	1,6*10 ⁻⁵
Пальмитиновая	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO ₂ H	Нераствор.	64	390	
Стеариновая	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO ₂ H	0,034 ²⁵	69,4	360 (разл.)	

Наиболее распространённой является *уксусная кислота*, участвующая в виде ацетилкофермента А в обмене веществ всех без исключения растений. *Пропионовая кислота* из всего многообразия растительного сырья найдена только в цветочных корзинках тысячелистника. *Масляная кислота* входит также в состав цветков ромашки аптечной и корневищ и корней валерианы. *Валериановая* и *изовалериановая кислоты* найдены в листьях мяты и лавра благородного, травы иссопа, полыни и тысячелистника, лесной земляники, плодов калины, какао и персиков, корневищ и корней валерианы и дягиля. Наряду с кислотой уксусной широко распространены в растительном сырье лимонная, щавелевая, яблочная и янтарная кислоты, относящиеся к первичным продуктам фотосинтеза и принимающие участие в метаболических процессах растительной клетки. В таблице 4 приведены также физические свойства высших жирных кислот жирного ряда на примере *пальмитиновой* и *стеариновой кислот*. Длинноцепочечный радикал наиболее встречаемых высших жирных кислот в виде пальмитиновой и стеариновой кислот имеют зигзагообразную конформацию (рисунок 21).

В растительных объектах преимущественно содержатся ненасыщенные высшие карбоновые кислоты (полиеновые кислоты) жирного ряда. Важнейшие ненасыщенные высшие жирные кислоты приведены в таблице 5.

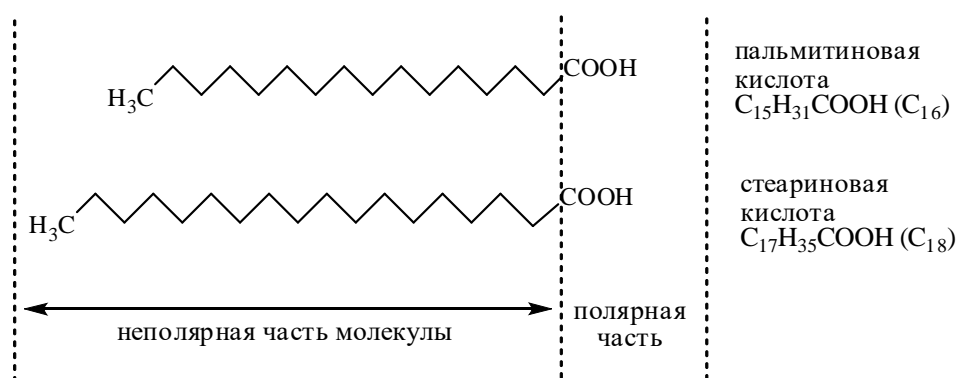


Рис. 21. Структура пальмитиновой и стеариновой кислот

Таблица 5 – Природные высшие ненасыщенные жирные кислоты

Название кислоты и ее общая формула	Структурная формула	Расположение двойной	Температура плавления

		связи	ния
Олеиновая C ₁₇ H ₃₃ COOH		Δ ⁹	+16°
Линолевая C ₁₇ H ₃₁ COOH		Δ ^{9,12}	-5°С
Линоленовая C ₁₇ H ₂₉ COOH		Δ ^{9,12,15}	-11°С
Арахидоновая C ₁₉ H ₃₁ COOH		Δ ^{5,8,11,14}	-49,5°
Δ (дельта) – обозначение наличия двойной связи, а цифрой справа вверху – ее начало			

Как видно из данных таблицы 5, двойные связи в этих кислотах не сопряжены, поскольку они разделены метиленовыми (–CH₂–) звеньями, поэтому их иногда называют «метиленразделенные кислоты». Ненасыщенные высшие кислоты всегда – цис-изомеры, так называемые ол-цис-изомеры (*от англ. all – все*). Температура плавления кислот понижается с увеличением числа атомов углерода в углеводородной цепи, а также при переходе от насыщенных кислот к ненасыщенным. В ненасыщенных кислотах содержатся цис-двойные связи, которые создают «петли» в углеводородных цепях и тем самым нарушают упаковку молекул. Чем выше степень ненасыщенности в природных кислотах жирного ряда, тем ниже их точки плавления.

Вопросы для самоконтроля:

1. Биологическая роль муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной, и валериановой кислот в растениях. Их распространение.
2. В чем заключается различие между насыщенными и ненасыщенными высшими карбоновыми кислотами жирного ряда? Приведите примеры.
3. Дайте обоснование показателям: йодное число, число омыления, пероксидное число, суть каждого из перечисленных показателей.

2.2.2.4 Полифенолы

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространённых и многочисленных классов природных соединений, которые классифицируются согласно схеме, изображенной на рисунке 22. При наличии в ароматическом кольце более двух фенольных гидроксильных групп их относят к полифенолам. Полифенолы обладают гипотензивным, противовоспалительным, противоопухолевым, противовоспалительным, ранозаживляющим, антиоксидантным, спазмолитическим действиями, что позволяет их широко использовать для создания новых лекарственных препаратов.

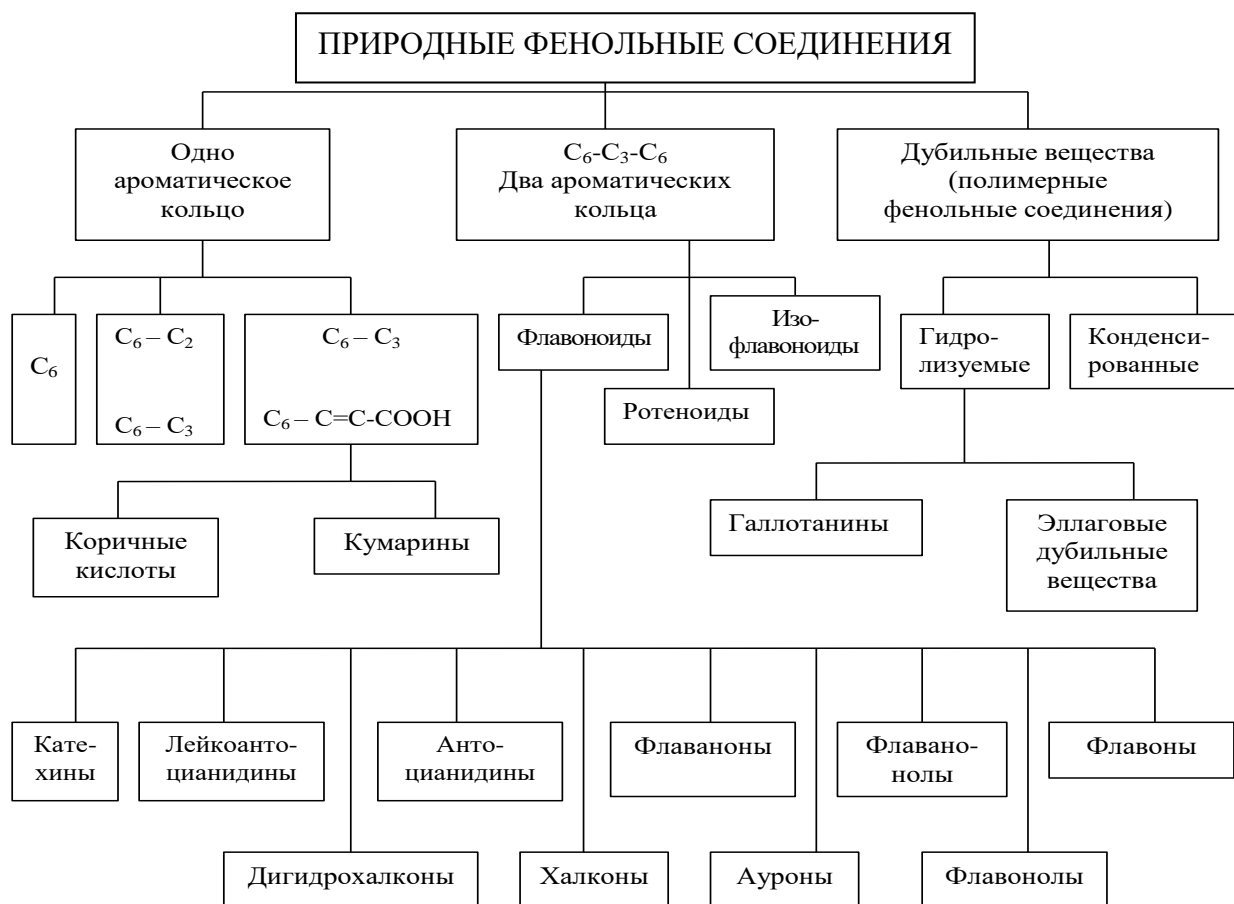
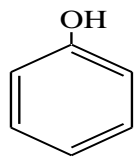


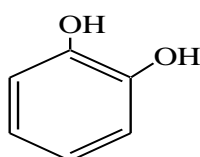
Рис. 22. Классификация природных фенольных соединений

Одно ароматическое кольцо содержат фенолы и фенолокислоты.

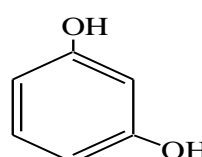
Фенолы делятся на одноатомные, двухатомные и трехатомные по количеству содержащихся в них фенольных гидроксильных групп. Фенол – C_6H_5OH (моногидроксипроизводное), двухатомные фенолы общей формулы $C_6H_4(OH)_2$ включают в себя три изомерных соединения – пирокатехин (две фенольные гидроксильные группы в *орто*-положении), резорцин (*мета*-положение) и гидрохинон (*пара*-положение).



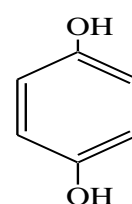
фенол



пирокатехин

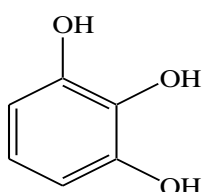


резорцин

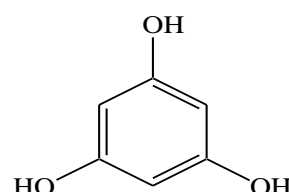


гидрохинон

Из трехатомных фенолов распространены в растениях пирогаллол и флороглюцин.

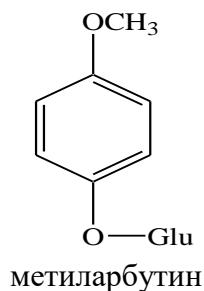
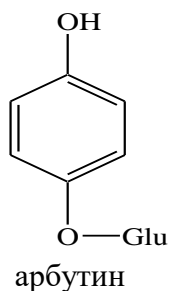


пирогаллол



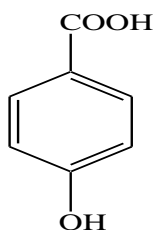
флороглюцин

Фенол можно получить из каменноугольной смолы, остальные простые фенолы сравнительно редко встречаются в растениях, чаще встречаются глюкозиды гидрохинона в виде арбутина (β -D-глюкозид гидрохинона) и метиларбутина (β -D-глюкозид метилгидрохинона), они присутствуют в толокнянке, бруснике, чернике. Они оказывают мочегонное и антисептическое действие.

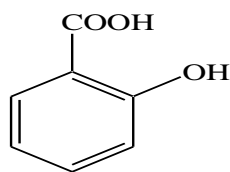


Фенолокислоты. В отличие от простых фенолов в разных органах растений широко встречаются оксибензойные и оксикоричные кислоты. Среди оксибензойных кислот наиболее известны *n*-гидроксибензойная, протокатеховая и ванилиновая кислоты, а среди оксикоричных кислот – *n*-кумаровая, кофейная и феруловая кислоты. Пожалуй, нет вида высших растений, в котором в той или иной комбинации не присутствовали вышеуказанные кислоты [21].

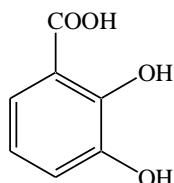
Ниже приведены структуры ряда природных оксибензойных и оксикоричных кислот:



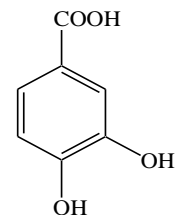
p-гидроксибензойная кислота



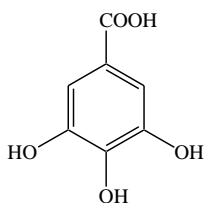
o-гидроксибензойная кислота
(салициловая кислота)



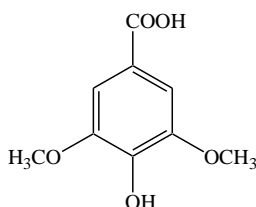
o-пирокатеховая кислота



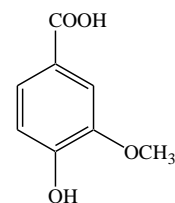
протокатеховая кислота



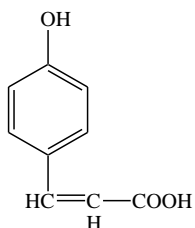
галловая кислота



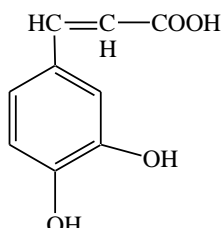
сиреневая кислота



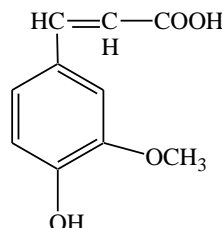
ванилиновая кислота



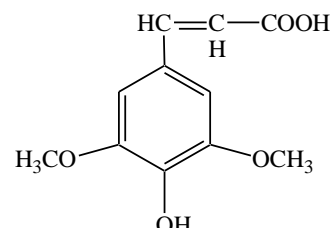
p-кумаровая кислота



кофейная
кислота



феруловая
кислота



синаповая кислота

Два ароматических кольца в молекуле содержат флавоноиды.

Флавоноиды относятся к наиболее многочисленной и повсеместно распространенной группе фенольных соединений. В медицине используют следующие виды растений, содержащих флавоноиды:

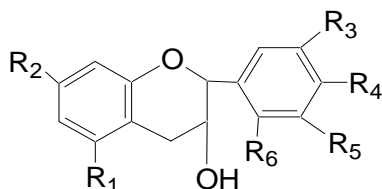
- корни солодки, кермека Гмелина, стальника и шлемника;
- листья чая, травы астрагала шерстистоцветкового, верблюжьей колючки, горца почечуйного, горца перечного, горца птичьего, зверобоя, пустырника, сушеницы топяной, хвоща полевого и череды трехраздельной;
- цветки и плоды боярышника и софоры японской, цветки бессмертника, василька синего, липы и пижмы;
- плоды citrusовых (лимон, мандарин) и т.д.

Мономерные флаван-3-олы или катехины относятся к классу флавоноидов с дифенилпропановым скелетом C₆-C₃-C₆ и они являются их наиболее восстановленными

формами. В растениях катехины встречаются либо в свободных фенольных формах, либо в виде галлатов, метиловых, ацилированных и гликозидных производных.

Среди флаван-3-олов, отличающихся по степени гидроксирования ароматических колец А и В (рисунок 23), в растениях наиболее распространены стереоизомеры 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавана {(+)-катехин и (-)-эпикатехин}.

В молекуле флаван-3-олов содержатся два асимметрических атома углерода С-2 и С-3, обуславливающие наличие четырех оптических изомеров и двух рацематов. Для катехина: (+)- и (-)-катехин являются транс-, а (+) и (-)-эпикатехины – цис-изомерами.



$R_1=R_2=R_3=R_4=OH, R_5=R_6=H$	катехин, эпикатехин
$R_1=R_2=R_3=R_4= R_5=OH, R_6=H$	галлокатехин, эпигаллокатехин
$R_1=R_2=R_4=OH, R_3=R_5=R_6=H$	афцелехин
$R_2=R_3=R_4=OH, R_1=R_5=R_6=H$	физетинидол
$R_2=R_3=R_4=R_5=OH, R_1=R_6=H$	робинетинидол
$R_2=R_4=OH, R_1=R_3=R_5=R_6=H$	гуибоуртинидол
$R_1=R_2= R_5=OH, R_3=R_4=R_6=H$	3,5,7,2',5'-пентагидроксифлаван
$R_1=R_2=R_3=R_5=OH, R_4=R_6=H$	3,5,7,3',5'-пентагидроксифлаван
$R_1=R_2= R_3=R_4=R_6=OH, R_5=H$	3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван

Рис. 23. Общая структурная формула природных флаван-3-олов

Абсолютная конфигурация асимметрических атомов углерода катехинов была установлена работами Хардеггера, Бирча, Кларка-Льюиса и Робертсона. Ими показано, что (+)-катехин имеет 2R, 3S - конфигурацию, (-)- эпикатехин – 2R, 3R, а их энантиомеры соответственно 2S, 3R и 2S, 3S – конфигурацию асимметрических центров (рисунок 24).

В природе обычно встречаются изомеры с 2R-конфигурацией.

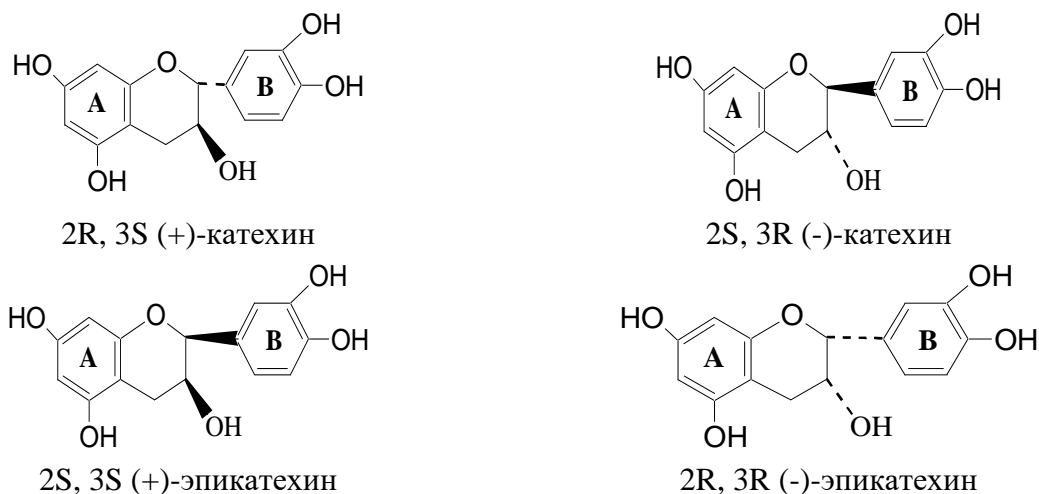


Рис. 24. Абсолютная конфигурация катехинов
 Методы установления строения мономерных флаван-3-олов:

Мономерные флаван-3-олы:

- с ванилиновым реактивом окрашиваются в красный цвет с возникновением системы сопряженных связей в продукте взаимодействия флаван-3-ола с ванилиновым альдегидом (рисунок 25).
- при щелочной деструкции образуются соответствующие фенолы и фенолокислоты, что позволяет определить степень гидроксирования их ароматических колец;
- с солями железа дают зеленое окрашивание при наличии в кольце В орто-диоксигруппировки и синее – в случае присутствия в нем трех вицинальных гидроксильных групп.

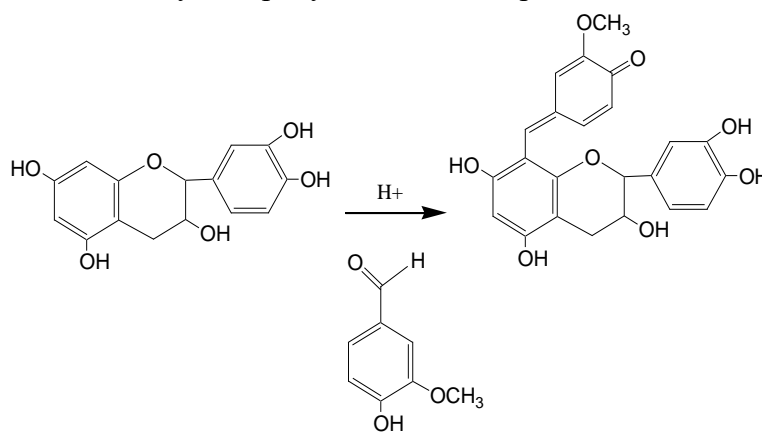


Рис. 25. Взаимодействие флаван-3-ола с ванилиновым альдегидом

Качественной реакцией на бесцветные мономерные флаван-3-олы и их различные другие формы полимеризации (димеры, тримеры и т.д.) является их взаимодействие с ванилиновым альдегидом (ванилин) в кислой среде с появлением окрашивания от слабо-розовой окраски до темно-красного цвета, обусловленных появлением сопряженных связей в структуре.

ЯМР-спектроскопия позволяет определить относительную конфигурацию асимметрических центров флаван-3-олов, степень окисления ароматических колец, наличие эфирных группировок в ароматических циклах, наличие заместителей у атома углерода С-3.

В ^1H ЯМР-спектре 2,3-транс-изомеров протон Н-2 гетерокольца резонирует при δ 4,53-4,57 м.д. в виде дублета с $J_{2,3}$, равной 6,0-8,0 Гц, протон Н-3 в виде мультиплета при δ 3,00-5,49 м.д. Аксиальный протон метиленовой группы у С-4, взаимодействуя с протоном Н-3, дает дублет с $J_{3,4a}$, равной 8,0-8,2 Гц (δ 2,48-2,50 м.д.), а экваториальный протон – дублет с $J_{3,4e}$, равной 3,4-5,6 Гц (δ 2,87-2,92 м.д.).

В ^1H ЯМР-спектре 2,3-цис-изомеров сигналы протонов гетерокольца испытывают парамагнитный сдвиг и прописываются в более слабом поле: Н-2 резонирует в виде синглета при δ 4,81-5,18 м.д., Н-3 в виде уширенного синглета или мультиплета при δ 4,18-5,60 м.д. Протоны метиленовой группы прописываются в виде мультиплета в области 2,56-3,23 м.д.

Таким образом, по величине КССВ и форме сигналов протонов гетероколец можно судить об относительной конфигурации асимметрических центров молекул флаван-3-олов.

Степень гидроксирования ароматических колец А и В определяют по количеству и форме сигналов протонов. Протоны Н-6 и Н-8 флороглюцинового кольца А резонируют в виде двух однопротонных дублетов с $J_{6,8} = J_{8,6} = 2,0-2,2$ Гц, что характерно для метарасположенных протонов. При этом сигнал протона Н-8 прописывается в более слабом поле. В 5,7,3',4'-тетраоксифлаван-3-олах протоны кольца В Н-2', Н-5' и Н-6' чаще всего прописываются в виде трехпротонного мультиплета в области 5,96-7,16 м.д. В 5,7,3',4',5'-пентаоксифлаван-3-олах сигналы симметрично расположенных атомов водорода Н-2' и Н-6' резонируют в виде двухпротонного синглета при δ 6,57-6,60 м.д. Метилирование всех фенольных групп индуцирует заметные парамагнитные сдвиги сигналов ароматических протонов: Н-6 ($\Delta\delta + 0,2$ м.д.), Н-8 ($\Delta\delta + 0,1$ м.д.), Н-5' ($\Delta\delta + 0,1$ м.д.) и Н-6' ($\Delta\delta + 0,15$ м.д.). Дополнительное ацилирование гидроксильной группы у С-3 вызывает сдвиг сигналов протонов гетерокольца в более слабое поле на $\Delta\delta + 0,6$ м.д. (Н-2) и на $\Delta\delta + 1,3$ м.д. (Н-3). Ацетилирование всех гидроксильных групп флаван-3-олов приводит к парамагнитному сдвигу сигналов всех протонов. По числу ацетильных групп можно рассчитывать количество фенольных и спиртовых гидроксигрупп. Алифатическая ацетильная группа у С-3, как правило, резонирует в более сильном поле при δ 1,86-1,93 м.д. Галлоилирование флаван-3-олов как с 2,3-цис-, так и 2,3-транс-конфигурацией индуцирует парамагнитный сдвиг сигналов всех протонов.

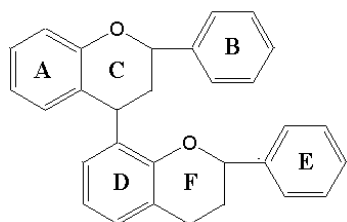
Димерные проантоцианидины. Проантоцианидинами называют бесцветные вещества, образующие при нагревании с минеральными кислотами антоцианидины. В зависимости от получающихся при этом красителей различают пропеларгонидины, процианидины, продельфинидины и т.д. Мономерные, олиго- и полимерные формы флаван-3-олов могут быть выделены из растений экстракцией водой, спиртом, ацетоном и их смесью с водой. Отделение флаванов от сопутствующих веществ проводят последовательной экстракцией с применением растворителей с возрастающей полярностью. В большинстве случаев для разделения проантоцианидинов пользуются колоночной хроматографией с использованием различных адсорбентов и методом ВЭЖХ.

Все известные в настоящее время проантоцианидины можно разделить на три группы: мономерные флаван-3,4-диолы (лейкоантоцианидины), олигомерные и полимерные флаван-3-олы. Лейкоантоцианидины в отличие от катехинов, имеют три асимметрических центра (C_2 , C_3 и C_4) и для каждого из них теоретически возможны 8 изомерных форм и 4 рацемата. Это объясняет их природное многообразие. Димерные проантоцианидины являются продуктами конденсации флаван-3-олов или флаван-3,4-диолов. Олиго- и полимерные формы флаванов построены по тем же структурным принципам, что и димеры.

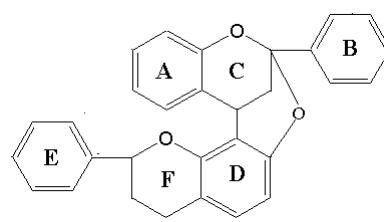
Димерные проантоцианидины разделяют условно по типу межфлавановой связи на две группы – «А» и «В». К группе В относятся димеры с простой С-С связью, а к группе А димеры с двумя формами связи С-С и С-О-С.

Димерные проантоцианидины группы В. В димерных проантоцианидинах группы В межфлавановая связь может быть C_4-C_8 или C_4-C_6 . Наличие в кольце А (D) катехинов двух фенольных гидроксильных групп с их согласованной орто- и пара-ориентацией создает два

центра с избыточной электронной плотностью при С-6 и С-8 углеродных атомах, тем самым предоставляя место присоединения к С-4 углероду гетероцикла С.

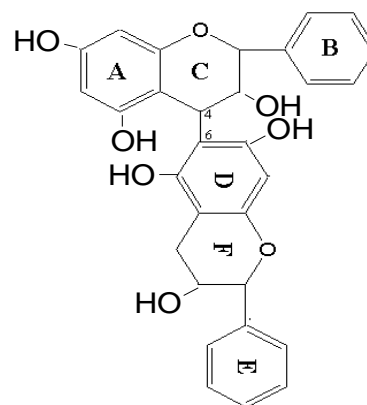
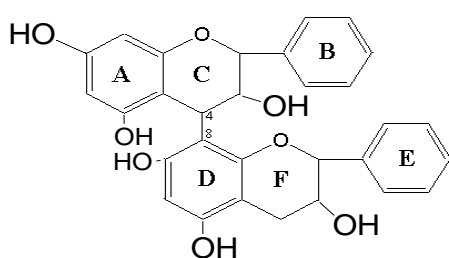


димеры группы В



димеры группы А

Атом углерода С-4, находясь между ароматическим кольцом и гидроксильной группой при С-3, подвергается их электронным эффектам. В результате этого водородные атомы при С-4 становятся подвижными, что объясняет вероятность образования 4→6 и 4→8 связей между мономерными единицами в природных димерах.



Димерные протоанцианидины с 4→8 и 4→6 связями

Долгое время вопрос об участии С₈ или С₆ углеродных атомов в образовании межфлавановой связи однозначно решен не был. В диастереомерах В₁-В₂ авторы обычно указывали альтернативное положение межфлавановой связи С₈ или С₆.

Вейгенс и Пернер полагали, что межфлавановая связь в димерах В₁-В₂ проходит по положению С₈, поскольку в синтетических димерах именно этот атом углерода участвует в образовании связи. Изучая ЯМР-спектры метиловых эфиров катехинов, дейтерированных по С₆ или по С₈ положениям, они дифференцировали сигналы протонов Н-6 и Н-8.

Кроме того, они предложили метод бромлирующего расщепления. С помощью этого метода можно по соотношению образующихся бромпроизводных однозначно решить вопрос об участии связи С₆ или С₈ углеродных атомов. В случае С₄-С₈ связи образуется 50% - бромпроизводного, а в случае С₄-С₆ формы связи – 20 % - бромпроизводного. Иное соотношение и других образующихся производных. Но этот метод достаточно сложный.

Древес и Ру, исследуя ПМР-спектры ацетатов метиловых эфиров профизетинидинов, сделали вывод о наличии в них С₄-С₆ связи, т.к. протоны у С₅ и С₈ «нижнего» ароматического кольца резонируют в виде острых синглетов (4,58 и 4,39 м.д.). Однако это справедливо для флаванов с резорциновым кольцом. Замещение же водорода на оксигруппу в С₅ положении делает протоны Н-8 и Н-6 равноценными.

Позднее Хундт и Ру, анализируя данные ПМР-спектров, полученных для модельных 6- и 8-замещенных катехинов и 4,6-связанных бифлаванолов, пришли к заключению о возможности выбора между С₄-С₆ и С₄-С₈ формами связи. Ими было показано, что сигналы флороглюцинового кольца Н-6 и Н-8 попадают в узкий интервал вне взаимного перекрытия: δ (СДС₁₃) 3,76-3,93 м.д. (Н-6), 3,51-3,70 м.д. (Н-8). Однако такие близкие значения химсдвигов не дают однозначного решения. Нахождение в растениях димерных процианидинов В₅-В₈, которые по стерическим формам флавановых единиц являются аналогами ранее обнаруженных димеров В₁-В₄, позволило более детально изучить изомерию этих соединений. Хаслэм с сотрудниками, опираясь на биосинтетические исследования, предположили, что в растениях синтезируются димеры с той и с другой формой связи. После того, как были найдены в растениях димерные процианидины В₅-В₈, которые по стерическим формам флавановых единиц являются аналогами ранее обнаруженных димеров В₁-В₄, позволило более детально изучить изомерию этих соединений.

На основании спектральных исследований этих изомеров Хаслэм пришел к заключению, что наиболее распространенные процианидины В₁-В₄ имеют С₄-С₈ межфлавановую связь, а редко встречающиеся димеры В₅-В₈ являются их структурными изомерами с С₄-С₆ формой связи. При этом он исходил из различной устойчивости конформационных изомеров, возникающих при повороте относительно С₄-С₆ и С₄-С₈ межфлавановых связей. Хаслэм с сотрудниками показали, что соотношение димерных проантоцианидинов с 4→6 и 4→8 связями составляет 1:3. Однако, как было показано авторами работы, относительное соотношение димеров с (4 α →6)- и (4 α →8)-связями, выделенных из *Cistus incanus*, составило 1:10. Как видно, приведенные литературные данные достаточно сильно отличаются между собой, но они однозначно свидетельствуют о доминирующем присутствии в растениях димеров с (4 α →8)-связями между мономерными единицами.

Димерные проантоцианидины имеют 5 хиральных центров и могут существовать в виде 32 диастереомерных форм. Так как в природе обычно встречаются (+)-катехин и (-)-эпикатехин, то количество возможных изомеров сокращается до 8 и их всех относят к группе В. Эти соединения обозначают В₁-В₈, исходя из тривиальных названий так называемых «верхней» и «нижней» половин молекулы. Они представляют собой диастереомеры. Димеры типа В могут быть образованы двумя одинаковыми или разными флавановыми единицами, поэтому их можно условно разделить на гомогенные и смешанные димеры. Среди гомогенных димерных проантоцианидинов наиболее распространенными и изученными являются процианидины В₁-В₄ (продукты конденсации двух молекул флаван-3-ола с С₄-С₈ формой связи). Димеры В₅-В₈ с С₄-С₆ формой связи менее распространены в природе.

Согласно системе IUPAC абсолютные конфигурации асимметрических центров обозначают символами R и S. Портер с сотрудниками, учитывая большое многообразие и сложность поликонденсированных систем, построенных по типу димеров, предложил называть их по аналогии с олиго- и полисахаридами. При этом атом углерода С-4 в проантоцианидинах обозначают аналогично аномерному углеродному атому сахарной единицы в олигосахаридах α и β , т.е. символы R, S у С₄ заменены соответственно на α и β .

Согласно этой номенклатуре строение димерных процианидинов выражают следующим образом:

- V_1 – (-)-эпикатехин-(4 β →8)-(+)-катехин
- V_2 – (-)-эпикатехин-(4 β →8)-(-)-эпикатехин
- V_3 – (+)-катехин-(4 α →8)- (+)-катехин
- V_4 – (+)-катехин-(4 α →8)- (-)-эпикатехин
- V_5 – (-)-эпикатехин-(4 β →6)-(-)-эпикатехин
- V_6 – (+)-катехин-(4 α →6)- (+)-катехин
- V_7 – (-)-эпикатехин-(4 β →6)-(+)-катехин
- V_8 – (+)-катехин-(4 α →6)- (-)-эпикатехин.

Реже, чем процианидины, в растениях встречаются продельфинидины и пропеларгонидины. Пропеларгонидины, образованные конденсацией (-)-эпиафцелехина и оуретеа-катехина (-)-4-О-метилэпикатехина, являются единственными представителями метилированных проантоцианидинов. Проантоцианидины присутствуют в растениях не только в свободной форме, но и галлоилированных и гликозидированных формах, а также в виде метиловых эфиров. При этом конфигурация асимметрических центров сохраняется независимо от степени гидроксирования ароматических колец и присутствия заместителей. Для установления строения димерных проантоцианидинов используют методы щелочной деструкции, кислотного расщепления и спектрального анализа.

Проантоцианидиновая природа димеров определяется по их способности образовывать под действием минеральных кислот (2-5 н. HCl) антоцианидиновые красители. Разбавленные минеральные кислоты (0,05-0,1 н HCl) разрывают лабильную С-С межфлавановую связь, подтверждая димерность проантоцианидинов. При этом из «нижней» половины молекулы образуется соответствующий флаван-3-ол, а из «верхней» – карбкатион. При расщеплении межфлавановой связи тиосодержащими соединениями (толуол- α -тиол или тиогликолевая кислота) из «нижней» половины образуется мономерный флаван, а из «верхней» – через карбкатион флаванил-4-тиоэфир, который восстанавливается на никеле Ренея до соответствующего флавана (рисунок 26).

Таким образом, результаты кислотного расщепления дают возможность идентифицировать обе составляющие флавановые единицы, т.е. определить степень гидроксирования и конфигурацию асимметрических центров в сравнении с известными мономерными флаванами, а также сделать вывод о наличии лабильной связи.

Методы ЯМР-спектроскопии дают возможность решить ряд вопросов, связанных с установлением строения димерных проантоцианидинов, а именно определить: относительную конфигурацию асимметрических центров, степень гидроксирования ароматических колец, наличие и местоположение межфлавановой связи. В димерных проантоцианидинах, так же как в мономерных флаван-3-олах, относительную

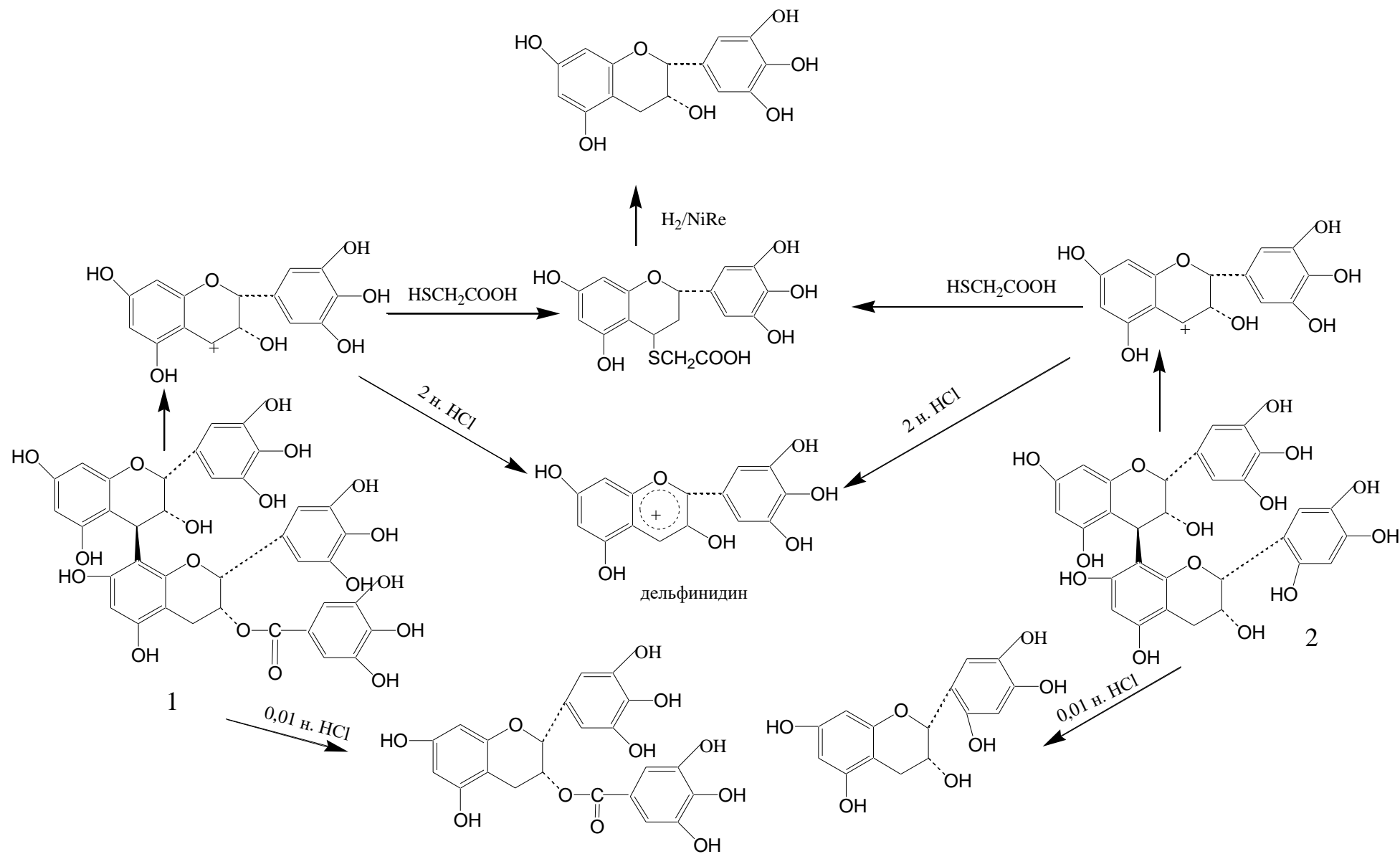


Рис. 26. Химические превращения димерных продельфинидинов (1 и 2)

конфигурацию хиральных центров определяют по КССВ протонов в гетерокольце.

Масс-спектрометрия. Фрагментация димерных проантоцианидинов осуществляется, как и в случае мономерных флаван-3-олов, по ретро-диеновому механизму и сопровождается последовательным отщеплением двух молекул уксусной кислоты от диацетилполиметоксифлавана. Двойное элиминирование уксусной кислоты дает устойчивый бифлаван (m/z 654) при отщеплении уксусной кислоты от «верхней» половины молекулы при одновременном ретро-диеновом расщеплении гетерокольца «нижней» половины образуется характеристичный 4-замещённый полиметоксифлаван (m/z 492).

Вейнгес, изучая процесс фрагментации этого ключевого иона на модельных 4-замещённых флавенах, показал, что они не подвергаются ретро-диеновому расщеплению. Возможен лишь разрыв С-С связи и отщепление бокового фенильного кольца.

Таким образом, обобщая знания о механизме фрагментации мономерных флаван-3-олов и учитывая полученные экспериментальные данные, Вейнгес предложил механизм фрагментации димерных проантоцианидинов (рисунок 27).

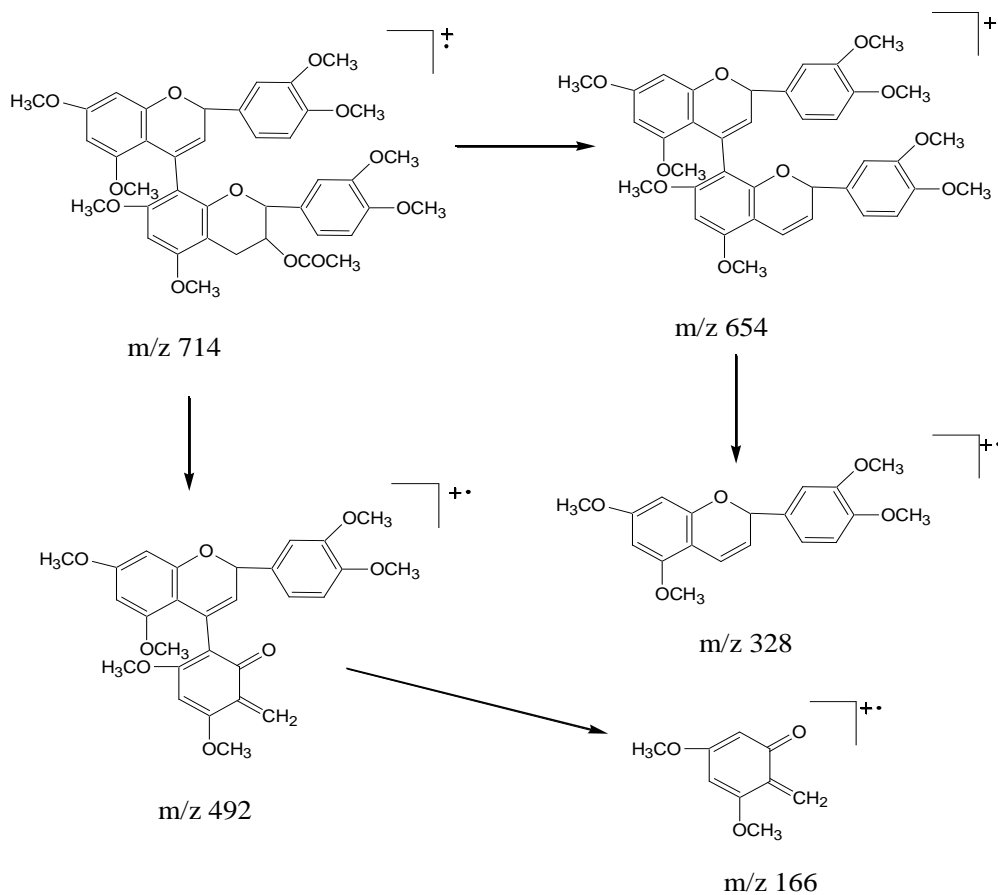


Рис. 27. Механизм фрагментации димерных проантоцианидинов

Согласно этой схеме фрагмент с m/z 492 распадается до фрагментов с m/z 328 и 166, что свидетельствует о разрыве С₄-С₈ связи.

Олигомерные и полимерные проантоцианидины. Олигомерные проантоцианидины являются переходными соединениями от мономерных к полимерным формам. В большинстве случаев олигомерные проантоцианидины представляют собой продукты конденсации 5,7,3',4'-тетрагидрокси- и 5,7,3',4',5'-пентагидроксифлаван-3-олов с С₄-С₈ (или С₆) формой межфлавановой связи.

Значительно реже встречаются олиго- и полимерные пропеларгонидины. Так, из растения *Cassia fistula* выделено два тримера (-)-эпиафцелехина. Достаточно широко описаны олигомерные проантоцианидины группы А, являющиеся продуктами конденсации 5,7,4'-тригидрокси-, 5,7,3',4'-тетрагидрокси- и 5,7,3',4',5'-пентагидроксифлаван-3-олов.

Олигомерные проантоцианидины встречаются в растениях не только в свободной фенольной форме, но и в виде гликозидов и галлоильных производных.

Методы установления строения олигомерных и полимерных проантоцианидинов. Качественные реакции и химические превращения для олигомерных и полимерных проантоцианидинов аналогичны тем, что и для димерных проантоцианидинов.

В ^1H ЯМР-спектрах олигомерных проантоцианидинов с 2,3-цис-конфигурацией асимметрических центров сигналы атомов водорода гетероколец резонируют, как правило, в виде синглетов. Спектр олигомерных проантоцианидинов, содержащих флавановые единицы с 2,3-транс-конфигурацией, сложнее спектров их диастереоизомеров, что обусловлено заторможенным вращением вокруг С-С связи. Тем не менее, характеристичные сигналы протонов Н-2, Н-3 и Н-4 резонируют в виде дублетов с КССВ от 8,5 до 1,2 Гц или в виде двойных дублетов (Н-3) с суммарной КССВ от 18,9 до 19,2 Гц.

В спектрах ^{13}C ЯМР олигомерных проантоцианидинов характеристичные сигналы атомов углерода С-2, определяющие стереохимию флавановых составляющих, в флавановых единицах с 2,3-транс-конфигурацией прописываются в области 82-83 м.д., с 2,3-цис-конфигурацией – в области 75-77,9 м.д.; сигнал атома углерода С-3 испытывает диамагнитный сдвиг на 1-2 м.д. в обоих диастереоизомерах; сигнал атома углерода С-4 в 2,3-цис-изомерах резонирует в области 36-37 м.д., а в 2,3-транс-изомерах – при 38-38,8 м.д. Сигналы незамещенных атомов углерода флороглюциновых колец резонируют в области 95-98 м.д., сигналы углерода, участвующие в образовании межфлавановой связи, резонируют в более слабом поле при 106-107,5 м.д. В спектрах полифлаванов сохраняются все закономерности, выявленные для их димерных форм. При этом наблюдается уширение всех сигналов, что обусловлено, по всей вероятности, повышением вязкости растворов полимеров, с одной стороны, а с другой – заторможенным вращением молекулы вокруг С-С межфлавановых связей. Поскольку в растениях в большинстве случаев встречаются олиго- и полимеры со смешанной стереохимией флавановых единиц, то стероспецифическим является сдвиг сигнала атома углерода С-2.

Флаван-3-олы или флавонолы. Самыми распространенными флавонолами в растениях являются кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлаван), кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван) и мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлаван). Если флаван-3-олы относятся к восстановленным формам флавоноидов (рис. 23), то флаван-3-олы являются их окисленными формами (рис. 28). Как видно из рисунков 23 и 28, разница между катехином (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван), кверцетином (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван) и мирицетином (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлаван) заключается в окисленности гетероциклического кольца в кверцетине и мирицетине: наличием двойной связи между 2-ым и 3-им углеродными атомами и наличием оксогруппы или карбонильной группы у углерода в С-4-положении (рисунок 28).

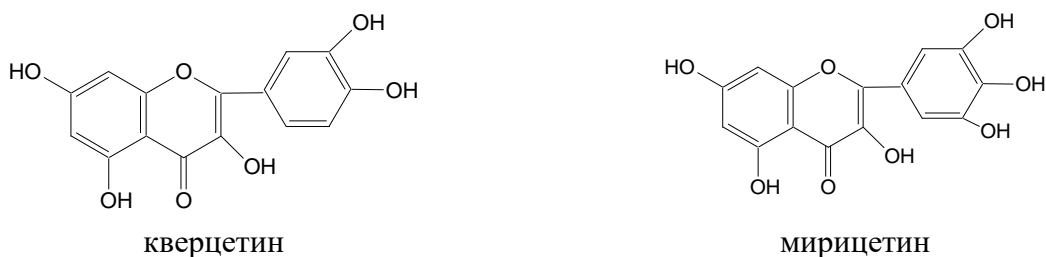


Рис. 28. Структуры кверцетина и мирицетина

Рассмотрим установление структуры кверцетина:

Если в продуктах щелочной деструкции сравнением с аутентичными образцами будут обнаружены флороглюцин и протокатеховая кислота, то это указывает на наличие гидроксильных групп у C₅, C₇, C_{3'} и C_{4'} молекулы флавонола кверцетина. Положение первого максимума поглощения в УФ-спектре соединения в метаноле при 372 нм указывает на флавоноловую природу исследуемого образца со свободной 3-гидроксигруппой. Ионизация гидроксигрупп флавонола от добавления алюминия хлорида обнаруживалась по батохромному смещению полос I (на +56) и II (на +19) нм. Образовавшийся при этом ярко-желтый комплекс устойчив к действию разбавленной соляной кислоты, что свидетельствует о наличии 3,5-диоксигруппировки в молекуле.

В ЯМР ¹H-спектре вещества содержатся два дублетных сигнала в области 6,17 и 6,39 м.д с константой мета-расщепления, которые соответствуют сигналам кольца А и указывают на 5,7-тип его замещения. Два однопротонных дублета в области 6,86 с J=8,46 Гц и 7,62 с J= 8,21 Гц, а также однопротонный уширенный синглет в области 7,7 м.д. подтверждают наличие 3',4'-диоксизамещения в кольце В.

На основании полученных результатов и пробы смешения температуры плавления с достоверным образцом, это вещество идентифицировано как 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонол (кверцетин).

Рассмотрим установление структуры мирицетина:

В УФ-спектре (в метаноле) вещества содержится длинноволновый максимум при 374 нм, что свидетельствует о наличии в нем свободной 3-ОН-группы. Образование комплекса при добавлении хлорида алюминия ($\Delta\lambda_I = +79$ нм и $\Delta\lambda_{II} = 15$ нм), устойчивого к действию разбавленной соляной кислоты, свидетельствует о наличии в положениях 3,5- и 3',4',5'- свободных гидроксильных групп. Найденные в продуктах щелочной деструкции вещества флороглюцин и галловая кислота указывают на наличие гидроксигрупп в 5,7 и 3',4',5' положениях и подтверждают мирицетиновую его природу. В ЯМР ¹H - спектре вещества содержатся два дублетных сигнала в области 6,21 и 6,41 м.д. с константой мета-расщепления, что соответствует сигналам кольца А и указывает на 5,7-тип его замещения. Один двухпротонный синглет в области 7,3 м.д. подтверждает наличие 3',4',5'-триоксизамещения в кольце В. На основании полученных данных вещество идентифицировано как 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонол (мирицетин).

На рисунке 29 показан кверцетин, который, как и другие окисленные формы флавоноидов, при восстановлении металлическим магнием в кислоте дают красное или

оранжевое окрашивание, обусловленное образованием антоцианидинов; из кверцетина образуется антоцианидин под названием цианидин.

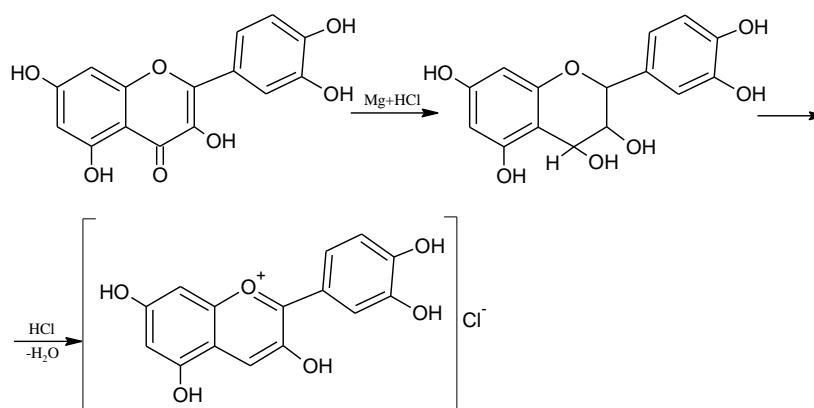


Рис. 29. Цианидиновая проба или проба Шинода

Для выполнения цианидиновой реакции в пробирку добавляют извлечение из лекарственного растительного сырья и к нему добавляют небольшое количество порошка магния и затем несколько капель концентрированной кислоты хлороводородной.

При отрицательной реакции, т.е. если окраска извлечения не изменилась, что может быть при незначительном количестве флавоноидов в сырье, необходимо провести нагревание содержимого пробирки на водяной бане в течение 10 мин. При восстановлении в кислой среде флавонов, флаванонов и флавонолов образуются различные антоцианидины, дающие оранжевое, красное или розовое окрашивания.

Другие качественные реакции:

- реакция с хлоридом железа (III). К 1 мл фильтрата добавляют 2-3 капли 1% раствора хлорида железа (III). При этом образуются окраски от зеленой (флавонолы) до коричневой (флаваноны, халконы, ауроны) и красновато-бурой (флавоны). При наличии веществ с рядовой, т.е. вицинальной три-оксигруппировкой в кольце В появляется черно-синее окрашивание и осадок.

- реакция с хлоридом алюминия. К 1 мл фильтрата добавляют 2-3 капли 5% спиртового раствора хлорида алюминия. При наличии флавоноидов, имеющих две оксигруппы, в С₃ и С₅ положениях, появляется лимонно-желтое окрашивание.

- реакция с раствором аммиака. К 1 мл фильтрата добавляют 3-5 мл раствора аммиака. Флавоны, флавонолы, флаваноны приобретают желтое окрашивание, при нагревании переходящее в оранжевое или красное окрашивание.

Вопросы для самоконтроля:

1. Классификация флавоноидов, их распространение и биологическая роль. Основные представители окисленных и восстановленных форм флавоноидов.
2. Обнаружение окисленных и восстановленных форм флавоноидов.
3. Мономерные флаван-3-олы, их димерные, олигомерные и полимерные формы. Их идентификация.
4. Как провести идентификацию кверцетина и мирицетина?

2.2.2.5 Углеводы

Углеводы наряду с белками и липидами являются представителями одного из трех основных классов природных веществ, входящих в состав живых организмов.

Центральное место углеводы занимают в метаболизме зеленых растений и других фотосинтезирующих организмов, которые утилизируют солнечную энергию для синтеза углеводов из CO_2 и H_2O . Образующиеся в результате фотосинтеза огромные количества крахмала и других углеводов являются главными источниками энергии и углерода для клеток животных, растений и микроорганизмов, неспособных к фотосинтезу. Углеводы (рибоза, дезоксирибоза) используются для синтеза нуклеиновых кислот, они являются составными компонентами нуклеотидных коферментов, играющих исключительно важную роль в метаболизме живых существ. В последнее время все большее внимание к себе привлекают смешанные биополимеры, содержащие углеводы: гликопептиды и гликопротеины, гликолипиды и липополисахариды, гликолипопротеины и т.д. Эти вышеуказанные биополимеры, являясь структурными элементами клеточных мембран, претерпевают существенные изменения в процессах трансформации нормальных клеток и, возможно, играют важную роль в процессах межклеточного узнавания и контактного торможения при росте и размножении клеток.

У человека и животных углеводы выполняют ряд важных функций:

1. Энергетическая функция углеводов (главный вид клеточного топлива и основной энергетический субстрат мозга). В качестве основного энергетического источника в организме используется свободная глюкоза или гликоген. Энергия, высвобождаемая в организме, при распаде углеводов аккумулируется в молекулах АТФ или рассеивается в виде тепла. Углеводы обеспечивают около 50-60 % суточного энергопотребления организма, а при мышечной деятельности на выносливость – до 70 %. При окислении 1 г углеводов выделяется 17 кДж энергии (4,1 ккал).

2. Структурная или скелетная функция углеводов (обязательный компонент большинства внутриклеточных структур).

3. Защитная функция углеводов заключается в участии углеводных компонентов иммуноглобулинов в поддержании иммунитета; защиты органов от проникновения бактерий и вирусов, а также от механических повреждений.

4. Пластическая функция углеводов. Углеводы (рибоза, дезоксирибоза) используются для построения АТФ, АДФ, коферментов, нуклеозидов, нуклеотидов, а также нуклеиновых кислот. Они входят в состав некоторых ферментов. Отдельные углеводы являются структурными компонентами клеточных мембран. Продукты превращения глюкозы (глюкуроновая кислота, глюкозамин и др.) входят в состав полисахаридов и сложных белков хрящевой и других тканей.

5. Специфическая функция углеводов. Отдельные углеводы участвуют в обеспечении специфичности групп крови, исполняют роль антикоагулянтов (вызывающие свертывание), являясь рецепторами цепочки гормонов или фармакологических веществ, оказывая противоопухолевое действие.

6. Регуляторная функция углеводов. Клетчатка пищи не поддается процессу расщепления в кишечнике, однако активизирует перистальтику кишечника, ферменты,

использующиеся в пищеварительном тракте, улучшают пищеварение и усвоение питательных веществ. С нарушением обмена углеводов тесно связан ряд заболеваний, таких как сахарный диабет, галактоземия, нарушение в системе депо гликогена, непереносимость лактозы и т.д.

В растительных организмах за счет целлюлозы на долю углеводов приходится до 80% от сухой массы, поэтому в целом в биосфере углеводов больше, чем всех других органических соединений вместе взятых. Объясняется это главным образом повсеместным распространением в больших количествах двух полимеров D-глюкозы, а именно целлюлозы и крахмала. Целлюлоза – главный внеклеточный структурный компонент волокнистых и одревесневших растительных тканей. Крахмал тоже содержится в растениях в чрезвычайно больших количествах; он служит той главной формой, в которой запасается клеточное топливо.

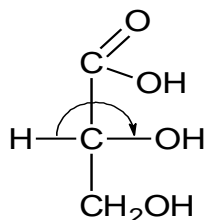
Углеводы являются полигидроксиальдегидами или полигидроксикетонами, которые могут также содержать атомы азота, фосфора или серы.

Согласно принятой в настоящее время классификации, углеводы в зависимости от числа содержащихся в них остатков моносахаридов подразделяются на три основные группы: *моносахариды, олигосахариды и полисахариды.*

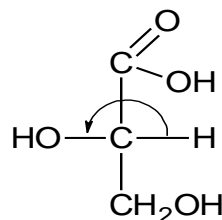
Моносахариды можно классифицировать как альдозы или кетозы в зависимости от того, содержат они альдегидную или кетонную группу в своей структуре. В альдозах карбонильная группа находится вначале углеродной цепи, в кетозах внутри цепи. Для альдоз генетический ряд начинается с глицеринового альдегида, а для кетоз – с диоксиацетона (рисунки 30, 31). Среди альдоз наиболее распространены такие моносахариды как рибоза, ксилоза, арабиноза, глюкоза, манноза, галактоза, а среди кетоз – фруктоза.

Моносахариды представляют собой бесцветные, твердые кристаллические вещества, которые легко растворяются в воде, но нерастворимы в неполярных растворителях.

Все углеводы являются оптически деятельными веществами (оптические изомеры), так как в своей структуре содержат ассиметрические или хиральные атомы углерода. Число *оптических изомеров (диастереоизомеров)* определяется как 2^n , где n- число хиральных атомов углерода. Для определения абсолютной конфигурации углеводов D или L ряда в качестве эталона служат D- и L-глицериновый альдегиды. Их конфигурация установлена рентгеноструктурным анализом и поэтому они получили название конфигурационных стандартов:



D-глицериновый альдегид



L-глицериновый альдегид

D-глицериновый и L-глицериновый альдегиды являются *зеркальными отображениями друг друга.* Такие диастереоизомеры называются *энантиомерами.*

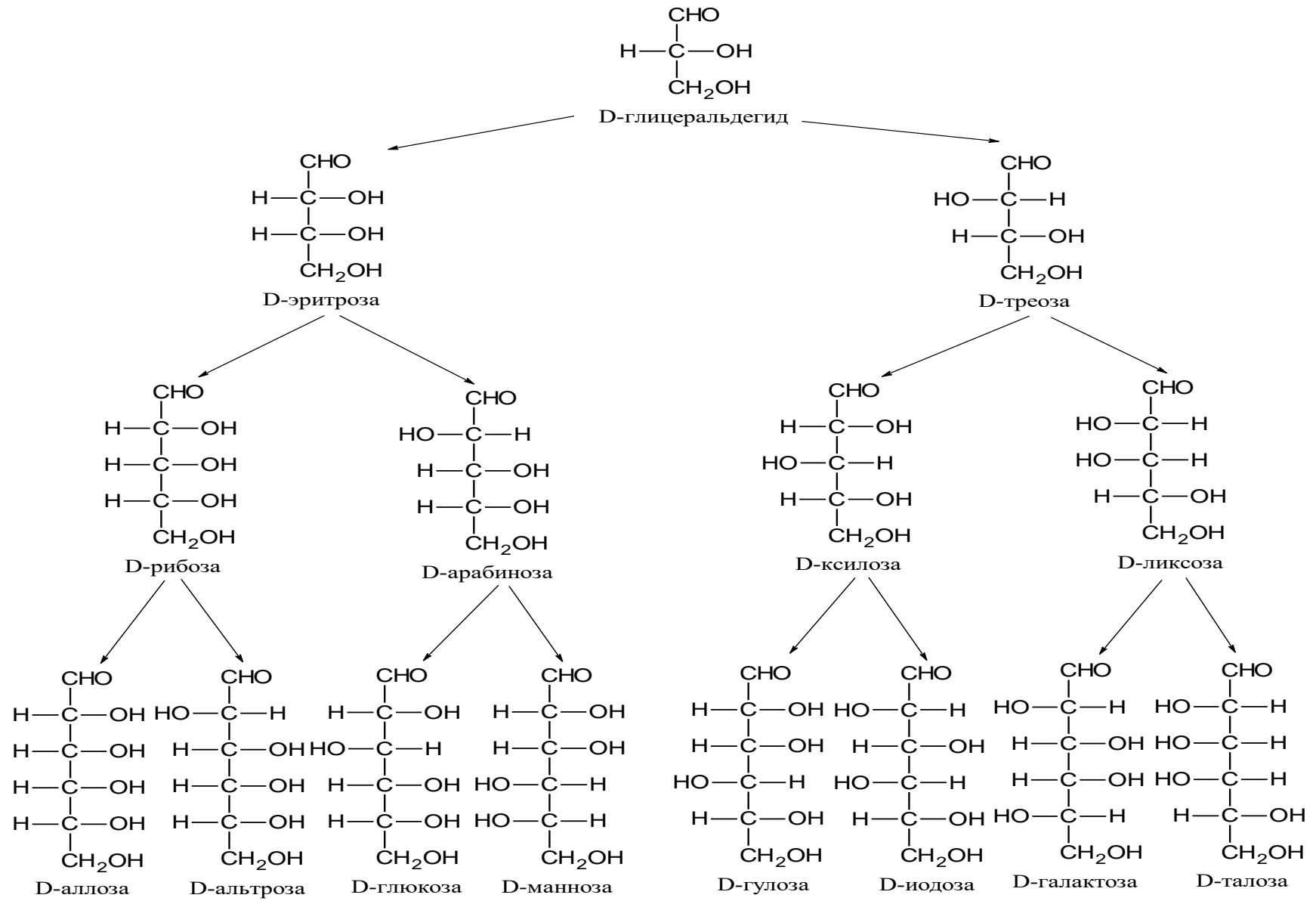


Рис. 30. Генетический ряд альдоз D-ряда

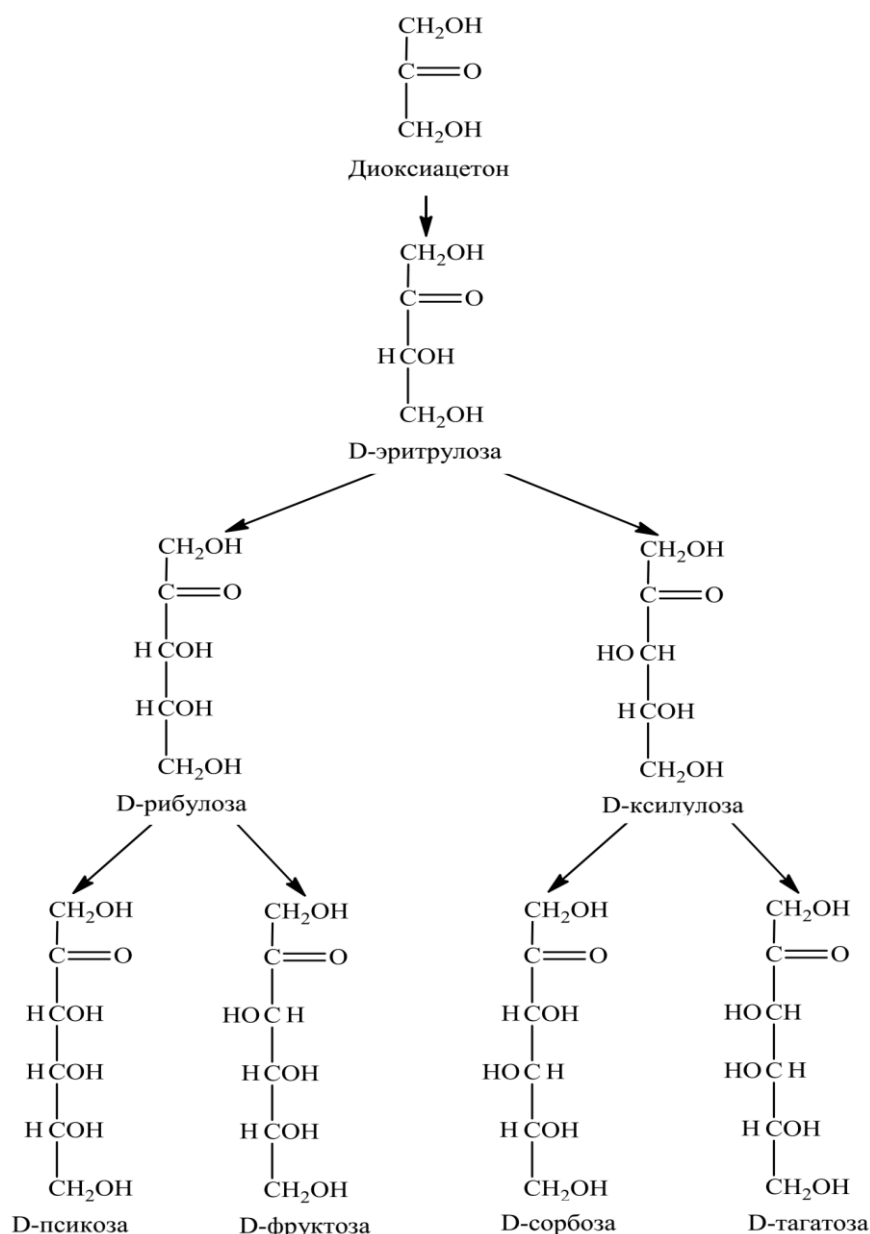
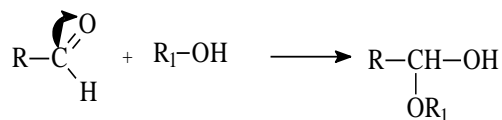


Рис. 31. Генетический ряд кетоз D-ряда

Принадлежность моносахаридов к D-ряду или L-ряду определяется сопоставлением конфигурации с наибольшим порядковым номером их асимметрического атома углерода и конфигурации асимметрического атома углерода глицеринового альдегида. Если конфигурация асимметрического атома углерода моносахарида с наибольшим порядковым номером такая же, как в D-глицериновом альдегиде, то моносахарид принадлежит к D-ряду и наоборот: если конфигурация асимметрического атома углерода моносахарида с наибольшим порядковым номером такая же как в L-глицериновом альдегиде, то моносахарид принадлежит к L-ряду. Для рибозы, например, при трех хиральных атомах углерода известно 8 изомеров: по 4 изомера D-ряда и L-ряда. Все известные природные моносахариды относятся к D-ряду. Было установлено, что качественная реакция на карбонильную группу, содержащуюся в моносахаридах, с бисульфитом натрия дает отрицательную реакцию, т.е. при этом бисульфитное

производное не образуется. Этот факт связан с тем, что при растворении моносахаридов в воде концентрация их открытой формы с карбонильной группой незначительна, преобладают циклические формы, которые образуются при взаимодействии между собой карбонильной группы с наиболее удаленной от нее спиртовой группой по типу образования полуацетала:



Открытая и циклические формы начинают взаимопревращаться в друг друга до установления динамического равновесия между ними во времени. Процесс взаимопревращения открытой и циклических форм углеводов друг в друга с установлением динамического равновесия и определенного значения величины удельного вращения называется *мутаротацией*. Причем, в момент равновесия в растворе в основном содержатся циклические формы (в сумме более 99 %) и лишь незначительная часть принадлежит открытой форме.

Приведем примеры мутаротации D-рибозы, D-глюкозы и D-фруктозы в проекциях Фишера и Хеурса. В *проекции Фишера* (проекционная формула Фишера, формула Фишера) углеродный скелет изображают вертикально, при этом сверху находится атом углерода, с которого начинается нумерация скелета (например, альдегидный C-атом для альдоз). Проекция Фишера представляет собой способ изображения трёхмерной молекулы в виде проекции, в которой вертикальные связи удаляются за проекционную плоскость (удалены от наблюдателя), а горизонтальные связи выступают перед этой плоскостью (направлены в сторону наблюдателя). *Проекция Хеурса* (в честь английского химика Уолтера Нормана Хоурса) – распространенный способ изображения циклической структуры моносахаридов в простой трехмерной перспективе (рисунки 32-34).

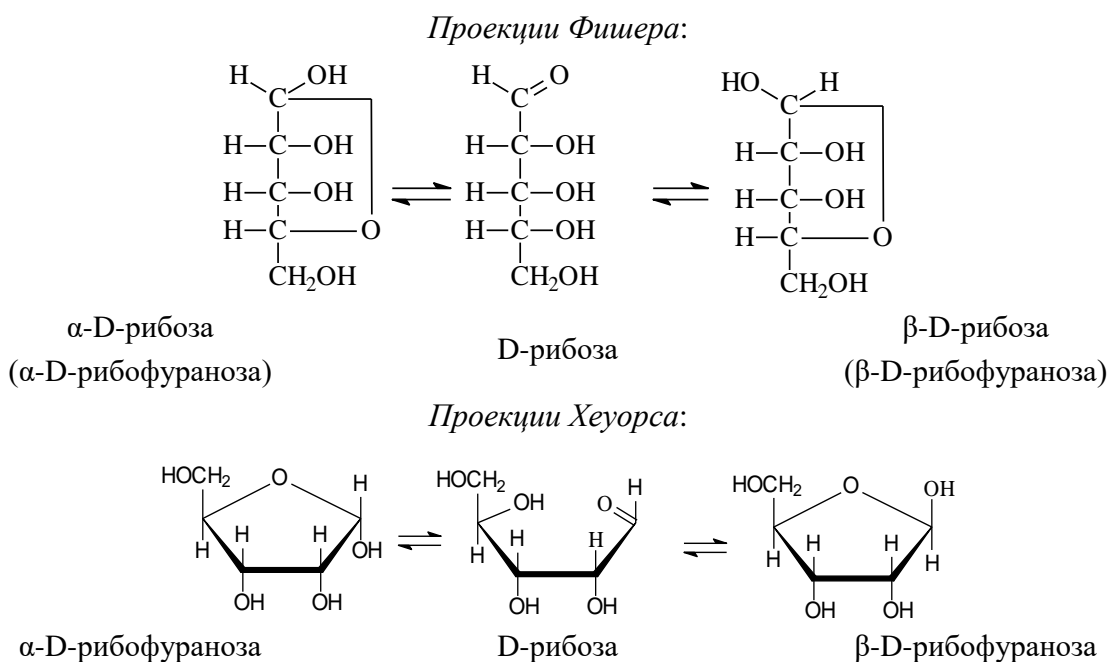
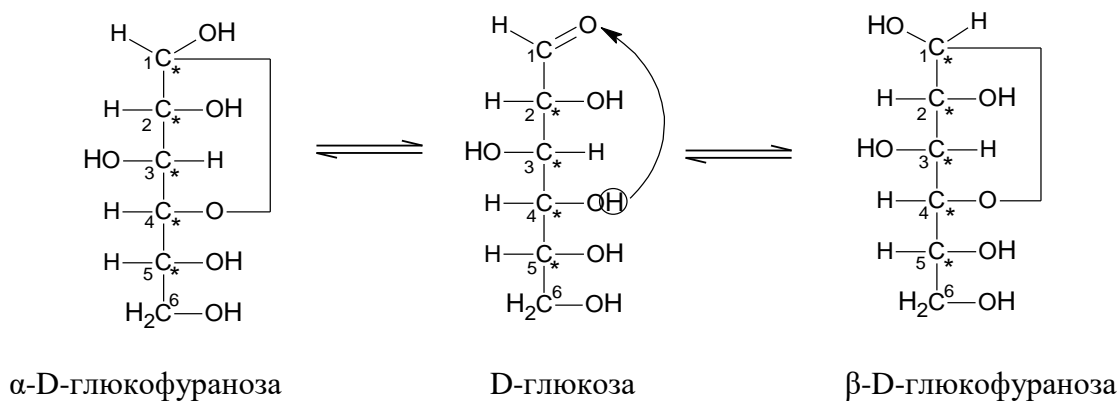


Рисунок 32 – Мутаротация D-рибофуранозы

Проекция Фишера:



Проекция Хеурса:

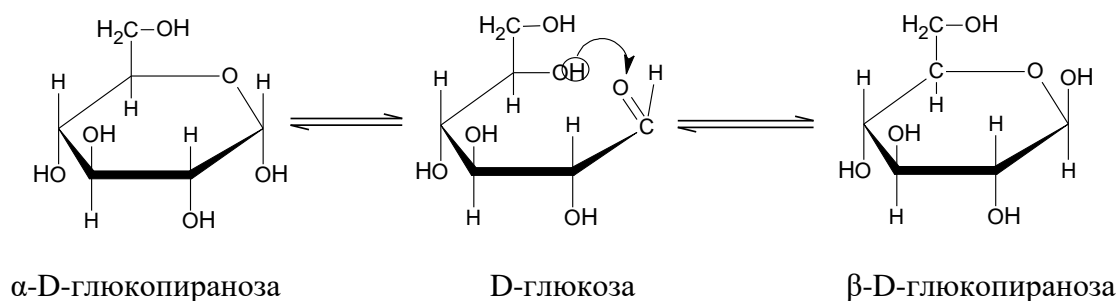
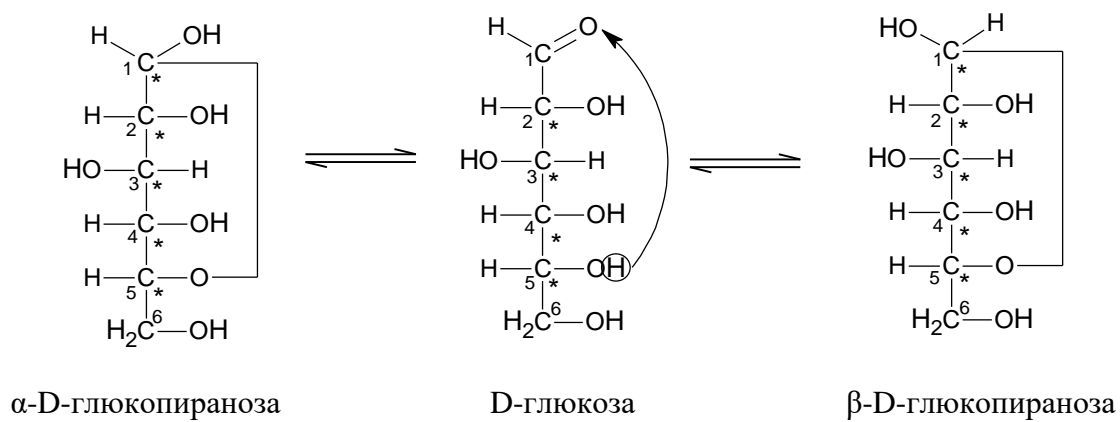
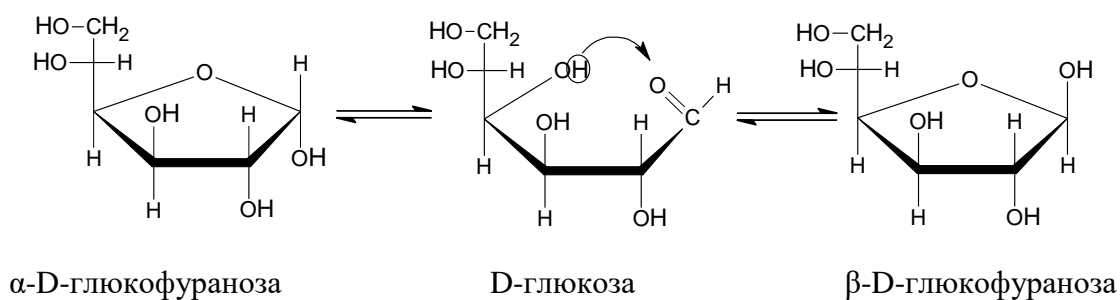
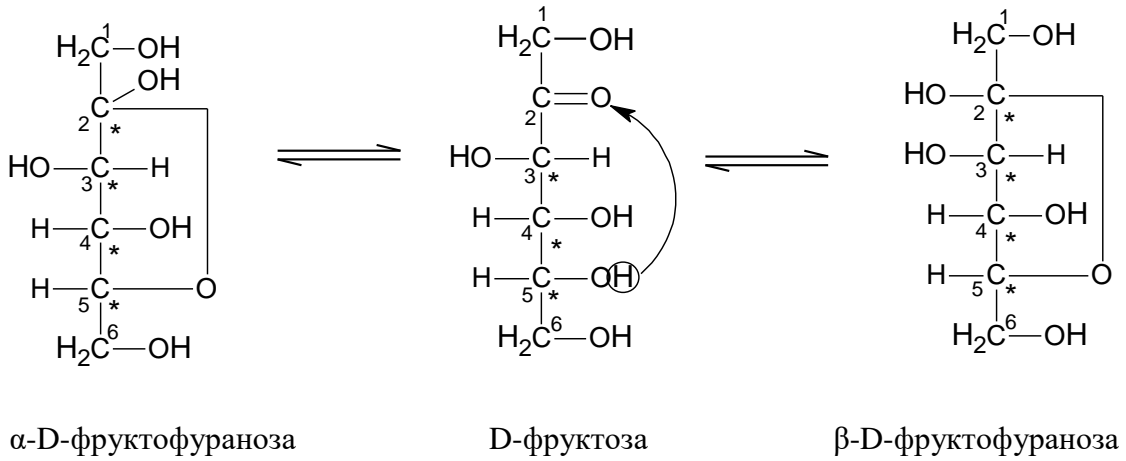


Рис. 33. Мутаротация D-глюкозы с образованием ее фуранозных и пиранозных форм в проекциях Фишера и Хеурса

Проекция Фишера:



Проекция Хеуорса:

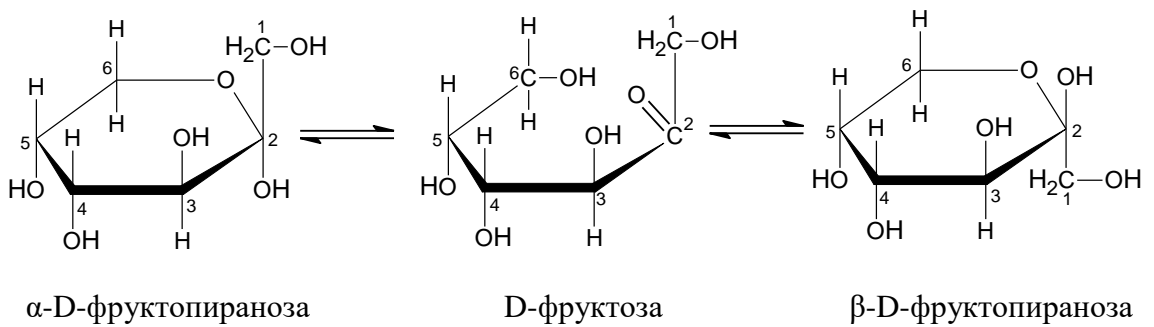
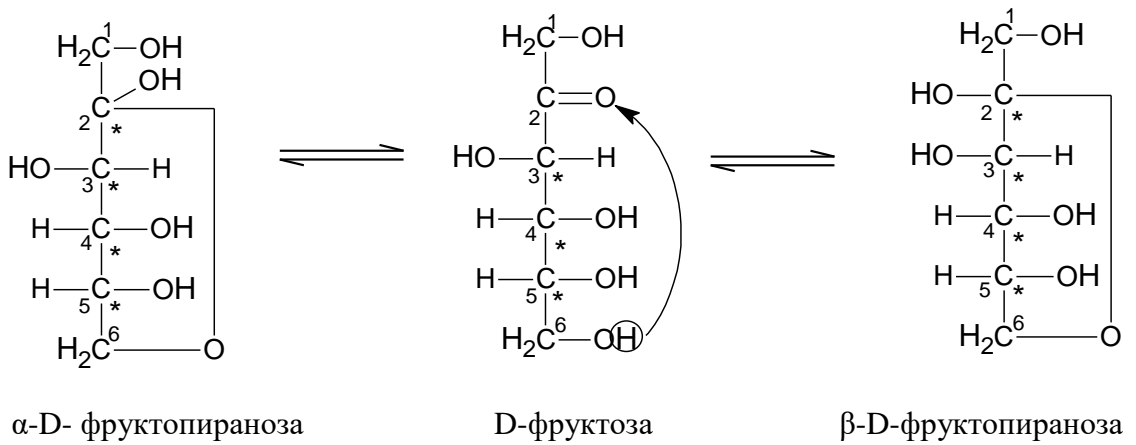
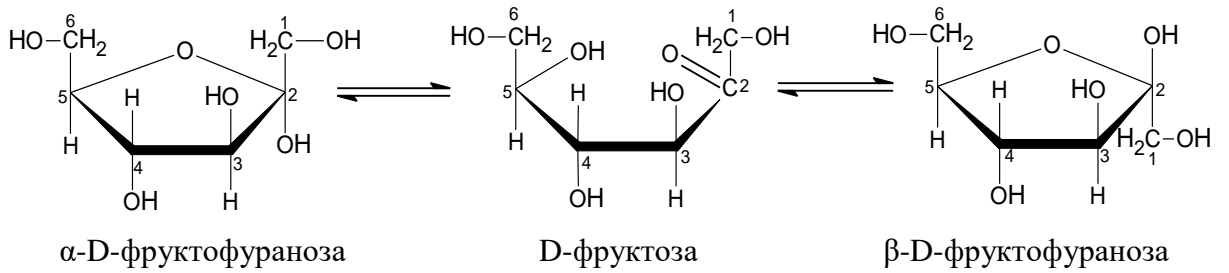


Рис. 34. Мутаротация D-фруктозы с образованием

ее фуранозных и пиранозных форм в проекциях Фишера и Хеурса

Как видно из приведенных выше примеров (рисунки 32-34), при мутаротации моносахаридов (D-рибозы, D-глюкозы и D-фруктозы), возникают пятичленные (фуранозные) и шестичленные (пиранозные) циклические формы. Название циклов соответствуют названиям гетероциклов фурану (пятичленный гетероцикл) и пирану (шестичленный гетероцикл). При циклизации моносахаридов возникает новый асимметрический или хиральный атом углерода (его называют аномерным) и новый гидроксил, который имеет три названия: полуацетальный, или гликозидный, или аномерный. Возникающие циклические формы моносахаридов представляют собой два новых оптических изомера, которые называются α - и β -аномерами и они отличаются между собой только расположением вновь образованной гликозидной гидроксильной группы относительно образуемого цикла. Гликозидная гидроксильная группа может находиться в одной плоскости с циклом или же в противоположных плоскостях. Исходя из этого, необходимо определиться с их обозначениями в проекциях Фишера и Хеурса.

В проекции Фишера:

в α -аномере гликозидный гидроксил и цикл находятся в одной плоскости (*цис-расположение*); в β -аномере – наоборот, гликозидный гидроксил и цикл находятся в разных плоскостях (*транс-расположение*).

В проекции Хеурса:

В α -аномере гликозидный гидроксил находится под плоскостью кольца моносахарида, в β -аномере он расположен над плоскостью кольца.

При мутаротации в случае D-глюкозы преобладают пиранозные формы, а для D-фруктозы преимущественны фуранозные формы.

В зависимости от того, из какого растворителя была перекристаллизована D-глюкоза, она получается либо в виде α -D-глюкопиранозы, либо в виде β -D-глюкопиранозы. При кристаллизации из спирта или воды получают α -D-глюкопиранозу, из пиридина – β -D-глюкопиранозу. Обе эти формы отличаются по растворимости в воде, β -D-глюкопираноза более растворима нежели α -D-глюкопираноза. Величина удельного вращения для α -D-глюкопиранозы составляет $+113^\circ$, для β -D-глюкопиранозы она равна $+19^\circ$. Если любой из этих индивидуальных аномеров растворить, то у каждого из свежеприготовленных растворов будет наблюдаться постепенное изменение величины удельного вращения, которое в процессе мутаротации и установления динамического равновесия становится равным $+52,5^\circ$. Это значение постоянно и одинаково как для одного, так и для второго растворов.

В водном растворе при мутаротации углеводов сумма их циклических форм является доминирующей, однако количество таутомеров может различаться. Например, при мутаротации D-глюкозы количество β -аномера – более 60 %, α -аномера составляет более 30 % и открытой формы около 0,02 %. Таким образом, при динамическом равновесии, устанавливаемом при мутаротации, содержание β -аномера практически в два раза выше, чем α -аномера. Такое различие в их содержании связано с тем, что в β -аномере гликозидный гидроксил занимает энергетически выгодное экваториальное расположение

в отличие от α -аномера, в котором гликозидный гидроксил аксиален (аксиальное расположение), как представлено на рисунке 35. Необходимо отметить, что β -D-глюкопираноза является уникальным моносахаридом с полным экваториальным расположением заместителей:

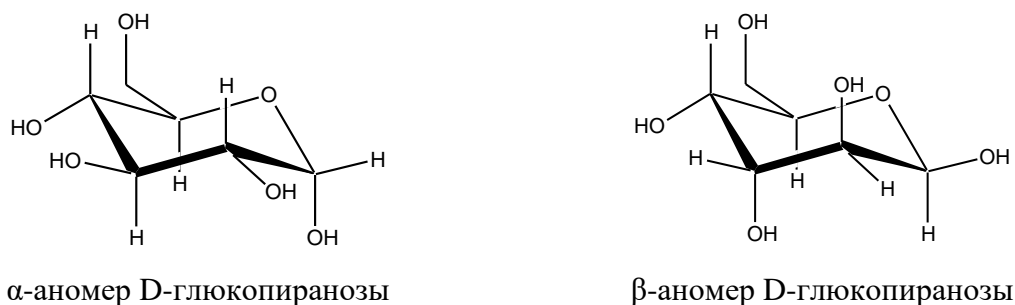


Рис. 35. Конформации α - и β -аномеров D-глюкопиранозы

Рибоза входит в состав нуклеиновых кислот, а в виде восстановленного спирта входит в состав биологически активных соединений, таких как витамины и коферменты. Дезоксирибоза входит в состав дезоксирибонуклеиновых кислот и соответствующих им нуклеотидов и нуклеозидов. Арабиноза широко распространена в гемицеллюлозах и пектиновых веществах. Ксилоза – древесный сахар. Восстановленный спирт на основе ксилозы в виде ксилита применяют больные сахарным диабетом. Самым распространенным моносахаридом является гексоза – глюкоза (виноградный сахар), который содержится во всех фруктах, ягодах и меде. В крови человека содержание глюкозы составляет 0,08-0,12 %. Глюкоза служит главным видом клеточного топлива у большинства организмов и выступает в роли строительных блоков или предшественников наиболее распространенных полисахаридов. Она входит в состав сахарозы, крахмала, гликогена, целлюлозы и т.д. Фруктоза является плодовым сахаром, встречается обычно вместе с глюкозой. В свободном виде находится в плодах, нектаре и меде. В связанном виде входит в состав сахарозы, полисахарида – инулина, который содержится в растениях. Галактоза в свободном виде не встречается, входит в состав дисахаридов – лактозы и мелибиозы, а также цереброзидов и ганглиозидов. Манноза образует сложные природные углеводы – маннаны, входит в состав гликопротеидов. Встречается в растениях, в составе слизей, гемицеллюлоз, содержится в ячмене и корках апельсина.

Отличие альдоз от кетоз устанавливают реакцией восстановления (в присутствии палладия и никеля) по продуктам реакции, так как восстановление альдоз дает один продукт в виде соответствующего спирта, при восстановлении же кетоз возникают два диастереомера из-за образования нового асимметрического центра (рисунок 36).

При восстановлении ксилозы образуется ксилит, рибозы – рибит, галактозы – дульцит, маннозы – маннит, глюкозы – глюцит (сорбит). Восстановление глюкозы в сорбит является одной из стадий промышленного синтеза аскорбиновой кислоты.

Реакции окисления используют в структурных исследованиях и биохимических анализах для обнаружения моносахаридов в биологических жидкостях – моче и крови.

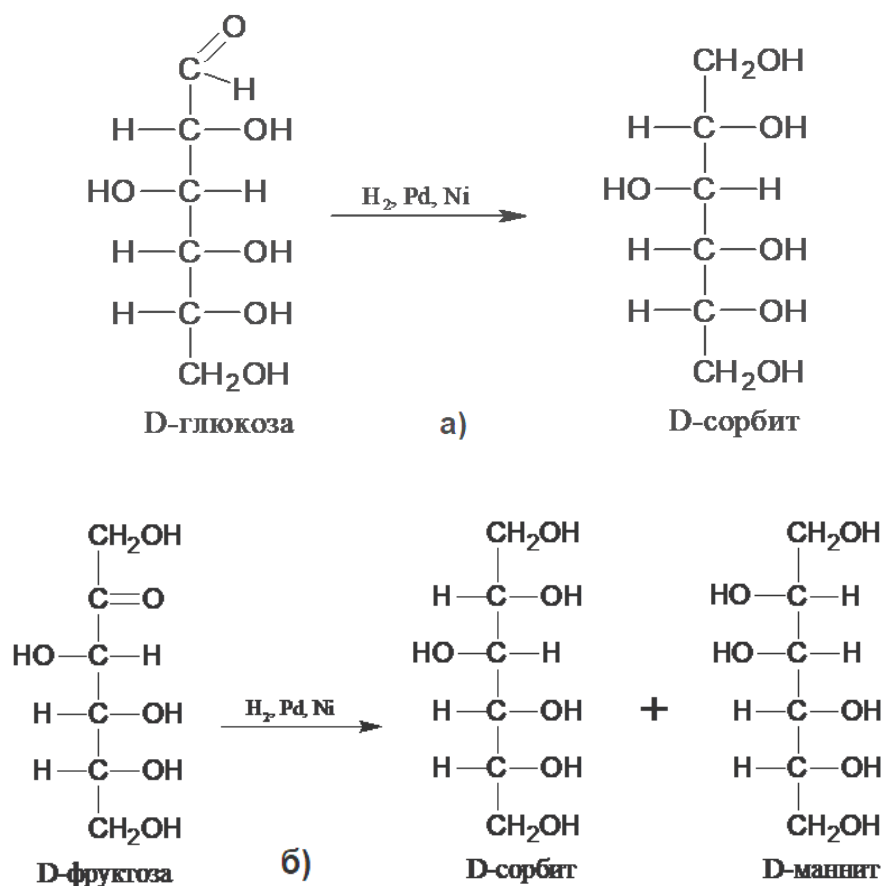


Рис. 36. Восстановление D-глюкозы (а) и D-фруктозы (б)

При окислении альдозы в мягких условиях с использованием бромной воды образуется монокарбоновая кислота. Например, в случае D-глюкозы получают D-глюконовую кислоту, которая представлена на рисунке 37. Окислением D-глюконовой кислоты в более жестких условиях, например с применением азотной кислоты получают дикарбоновую D-глюкартовую кислоту (рисунок 37). Кетозы реагируют с бромной водой менее охотно и поэтому с помощью этой реакции можно отличить альдозы от кетоз.



Рис. 37. Окисление D-глюкозы до D-глюкартовой кислоты

В медицине широкое применение получил глюконат кальция как общеукрепляющее средство.

При окислении только первичной спиртовой группы альдозы без затрагивания легко окисляющейся альдегидной группы получают гликуроновые (уроновые) кислоты, синтез которых представляет собой сложную задачу. При проведении синтеза необходимо предварительно «защитить» гликозидный гидроксил (рисунок 38), т.е. окислению подвергают моносахарид с защищенной альдегидной группой, например в виде гликозида.

Уроновые кислоты легко образуют лактоны.

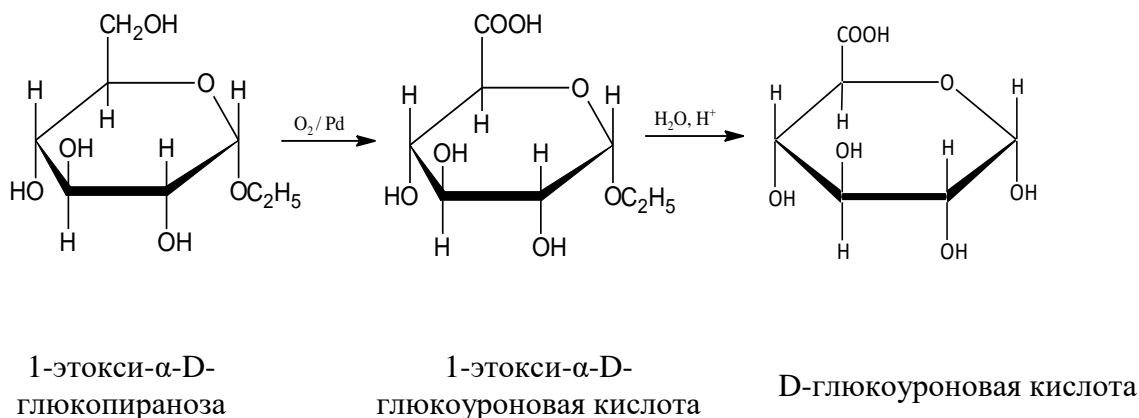


Рис. 38. Получение глюкуроновой кислоты

Взаимодействие с фенилгидразином. Три моносахарида в виде D-маннозы, D-глюкозы и D-фруктозы при взаимодействии с избытком фенилгидразина дают один и тот же озон (рисунок 39). Эти моносахариды называются *эпимерами*, у всех соединений конфигурация нижнего тетраэдра одинакова.

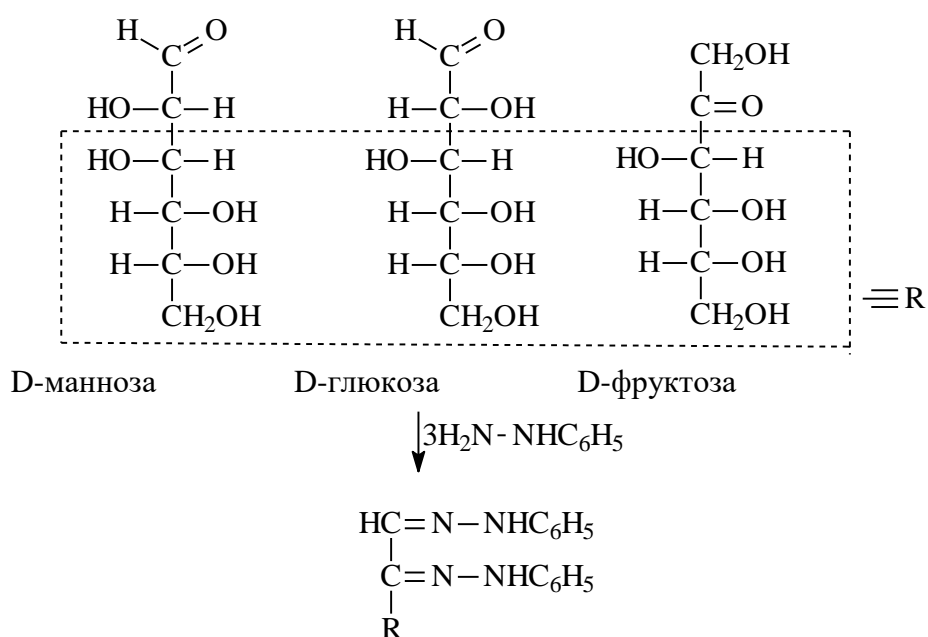


Рис. 39. Получение озона маннозы, глюкозы и фруктозы

Расщепление глюкозы йодноватой кислотой (рисунок 40):

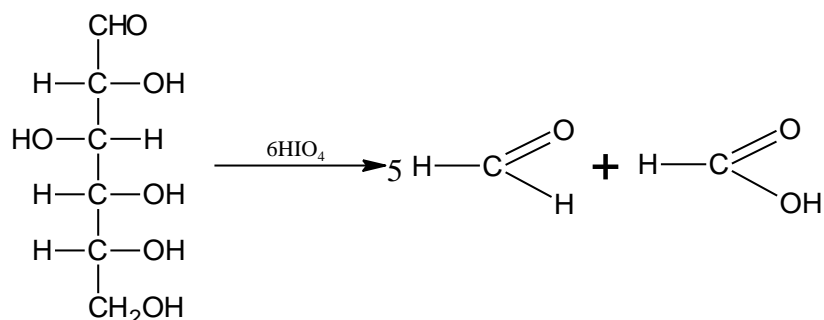
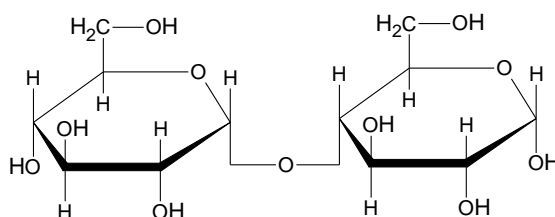


Рис. 40. Идентификация D-глюкозы йодноватой кислотой

Олиго- и полисахариды. Олигосахариды включают в себя от двух до 10 моносахаридных остатков. Все олигосахариды делятся на две группы: восстанавливающие и невосстанавливающие. Классификация олигосахаридов начинается с дисахаридов, представляющих собой два моносахаридных остатка, связанных гликозидной связью, которая образуется в результате отщепления молекулы воды между ними. Среди дисахаридов, присутствующих в растениях особенно широко известны мальтоза, лактоза и сахароза. Из них мальтоза и лактоза относятся к восстанавливающим дисахарам, сахароза – к невосстанавливающим дисахарам соответственно.

Восстанавливающие дисахара. Мальтоза, образующаяся в качестве промежуточного продукта при действии фермента амилазы на крахмал, содержит два остатка D-глюкозы. Она представляет собой смешанный ацеталь аномерного углеродного атома D-глюкозы, соединенных гликозидной связью между первым атомом углерода (аномерным углеродом) одного остатка глюкозы и четвертым атомом углерода второго остатка, а конфигурация гликозидной связи, в образовании которой участвует аномерный атом углерода, относится к α-типу. Эта связь обозначается как α (1→4):



4-(α-D-глюкопиранозил)-α-D-глюкоза или мальтоза

Если в образовании гликозидной связи участвует гликозидный гидроксил первого моносахарида и спиртовый гидроксил второго моносахарида, то такие дисахара относятся к восстанавливающему типу. В мальтозе свободный гликозидный гидроксил моносахарида глюкозы, не участвующий в образовании гликозидной связи, способен в процессе мутаротации дать открытую форму, в которой альдегидная группа может быть

восстановлена до спиртовой гидроксильной группы или окислена до карбоксильной группы (рисунок 41).

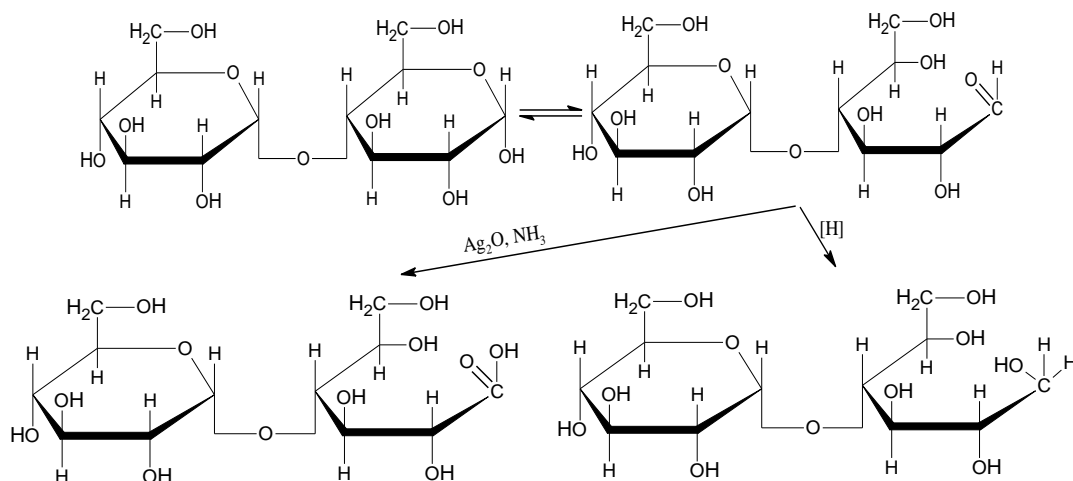
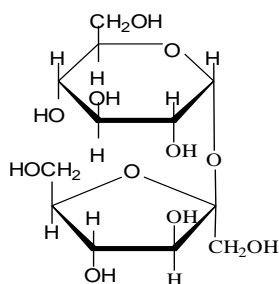


Рис. 41. Окисление и восстановление мальтозы

Невосстанавливающие дисахара. В невосстанавливающих дисахарах гликозидная связь образуется за счет двух гликозидных гидроксил соответствующих моносахаридов. Таким образом, если в образовании гликозидной связи дисахарида участвуют два гликозидных гидроксила обоих моносахаридов, то возникают невосстанавливающие дисахара. Примером невосстанавливающего сахара может быть сахароза, в которой образование гликозидной связи осуществлено с участием гликозидных гидроксил α -D-глюкозы и β -D-фруктозы соответственно:



Общая схема установления строения дисахаров:

- 1) В результате кислотного гидролиза и последующего хроматографирования гидролизата определяют моносахаридные остатки, входящие в состав дисахарида.
- 2) Действием реактива Толленса $[Ag(NH_3)_2]OH$ на дисахарид и последующим восстановлением продукта реакции определяют, является ли исследуемый дисахарид восстанавливающим или невосстанавливающим.
- 3) Действием фермента определяют природу гликозидных связей (α - или β -) моносахаридных остатков: α -гликозидную связь расщепляет фермент α -глюкозидаза (мальтаза), β -гликозидную связь – β -эмульсин.
- 4) Для установления местоположения гликозидной связи в дисахариде вначале получают его перметильное производное и для него снимают ПМР-спектр, затем его гидролизуют и снимают ПМР-спектр полученного продукта. Сопоставлением ПМР-

спектров перметильного производного и продуктов его гидролиза отмечают, какие гидроксильные группы остались свободными, так как они участвовали в образовании гликозидной связи.

Олигосахариды, как и моносахариды, являются бесцветными веществами, следовательно, для их качественного обнаружения необходимо использовать специфический реагент, например о-толуидин. В случае лактозы после ее кислотного гидролиза гидролизат вместе со стандартными образцами наносятся на стартовую линию хроматографической бумаги, которую затем помещают в камеру для хроматографирования с системой растворителей. После прохождения системы растворителей по хроматограмме до фронта растворителя ее вынимают, сушат и затем обрабатывают о-толуидином, который при взаимодействии с моносахаридами при температуре 100 °С дает окрашенные соединения в результате создания системы сопряженных связей. На рисунке 42 представлено взаимодействие D-глюкозы с о-толуидином.

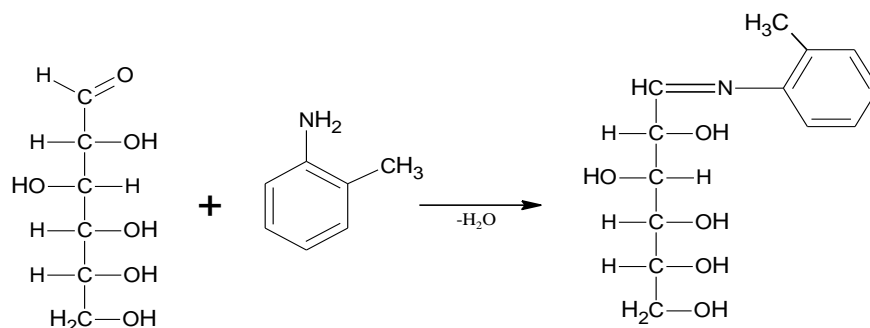
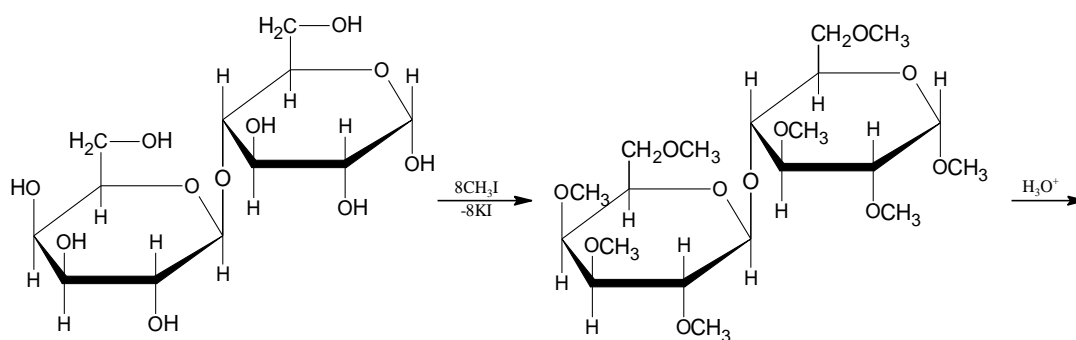


Рис. 42. Взаимодействие D-глюкозы с о-толуидином

Пример получения перметильного производного лактозы представлен на рисунке 43, после получения перметильного производного лактозы снимают его ¹H-ЯМР-спектр, затем проводят его гидролиз, разделяют и выделяют продукты гидролиза. Затем записывают для продуктов гидролиза их ¹H-ЯМР-спектр и по расположению появившихся сигналов соответствующих гидроксильных групп, образующихся при кислотном гидролизе, устанавливают местоположение гликозидной связи.



перметильное производное лактозы

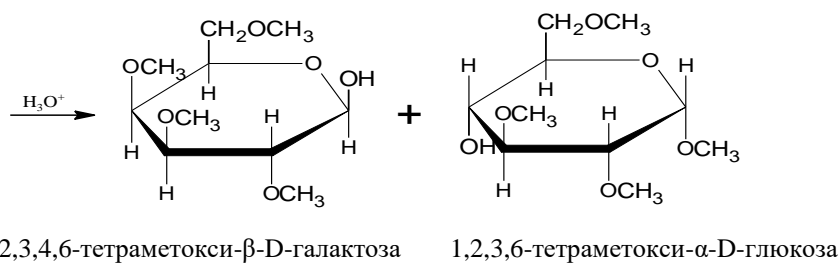


Рис. 43. Получение перметильного производного лактозы и его гидролиз

Полисахариды. 80 % органических веществ составляют полисахариды, состоящие из остатков моносахаридов и их производных (в виде урановых кислот), связанных О-гликозидными связями. Им присущ характерный для высокомолекулярных веществ более высокий уровень структурной организации макромолекул. Полисахариды (называемые также *гликанами*) отличаются друг от друга природой повторяющихся моносахаридных единиц, длиной цепи и степенью ее ветвления. Различают *гомополисахариды*, состоящие из моносахаридных единиц только одного типа, и *гетерополисахариды*, содержащие моносахаридные единицы двух или нескольких типов цепей. Полисахариды под действием света в результате фотосинтеза из углекислого газа и воды образуются во всех зеленых растениях.

Лекарственные растения, которые являются основными источниками полисахаридов, можно разделить на следующие группы:

- крахмалоносные (картофель, кукуруза, пшеница и рис),
- инулинсодержащие (топинамбур, цикорий, одуванчик, девясил),
- слизесодержащие (лен посевной, алтей лекарственный и армянский, мать-и-мачеха, подорожник большой и блошный, липа сердцевидная, ромашка аптечная и череда трехраздельная), камедоносные (виды астрагала, абрикос, др.),
- пектинсодержащие (ламинария сахарная, пальчатая и японская, хлопчатник, др.).

Полисахариды и их модифицированные производные используются в медицине как кровезаменители и наполнители, как радиопротекторные, отхаркивающие, иммунозащитные, противоязвенные средства, обладают способностью пролонгировать действие лекарств, повышают резистентность слизистой оболочки желудка, оказывая противовоспалительное, обволакивающее и ранозаживляющее действие. Полисахариды некоторых грибов (дождевики) показали ингибирующий эффект в отношении клеток саркомы *in vitro*. Главными резервными полисахаридами растений и животных являются крахмал и гликоген, которые откладываются в цитоплазме.

Строение и физиологическая роль крахмала (рисунок 44). Крахмал представляет собой смесь двух полисахаридов и состоит из амилозы (10-20%) и амилопектина (80-90%). Амилоза является неразветвленным полисахаридом, включает от 200 до 1000 глюкозных остатков, молекулярная масса 160 000. В амилозе D-глюкопиранозные остатки соединены между собой α (1→4) гликозидной связью. Амилопектин является разветвленным полисахаридом. В цепи D-глюкопиранозные остатки соединены α (1→4) гликозидными связями, а в точках разветвления они связаны α (1→6) гликозидными связями. Между

точками разветвления располагаются 20-25 глюкозных остатков. Молекулярная масса амилопектина достигает от 1 до 6 млн.

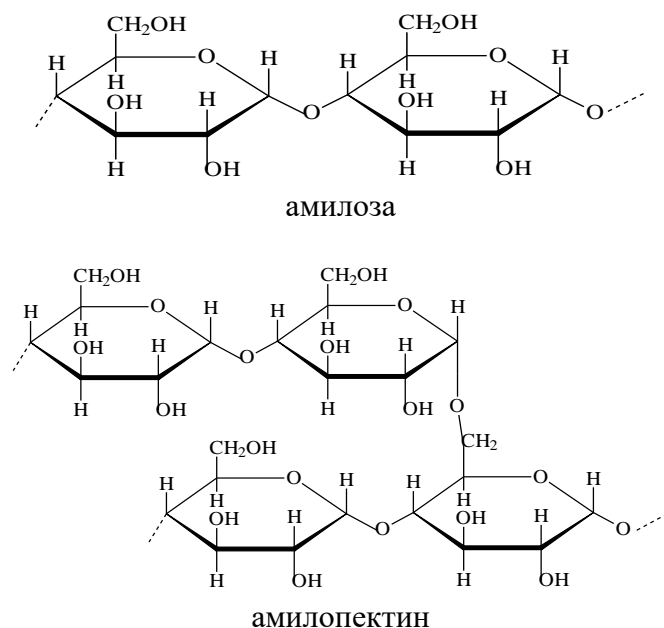


Рис. 44. Структура крахмала

В состав *целлюлозы* (клетчатки) входит более 50% всего органического углерода биосферы. Целлюлоза — простейший и наиболее широко распространенный структурный полисахарид растительного мира. Целлюлоза является линейным, неразветвленным гомополисахаридом, состоящим из 10000 и более остатков D-глюкозы, связанных друг с другом β (1→4) гликозидной связью (рисунок 45).

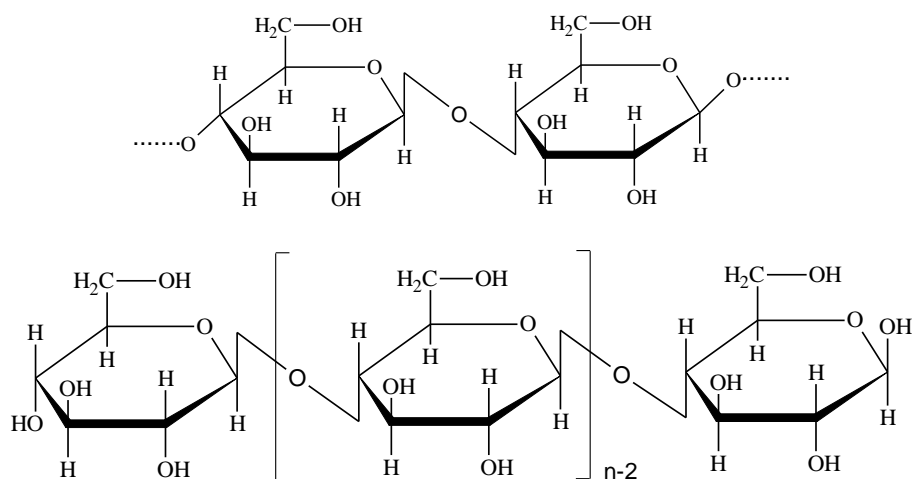


Рис. 45. Структура целлюлозы

Многие виды лекарственного растительного сырья, содержащего полисахариды, в процессе промышленной обработки поступает в аптеки и магазины в виде высушенных порошков и чаев (листья подорожника, листья мать-и-мачехи, цветки шипы, семена льна, семена подорожника блошного, слоевища ламинарии) для отпуска населению.

Из лекарственного растительного сырья полисахариды экстрагируются водой очищенной при нагревании до 100 °С, экстракцию ведут дробно для максимального извлечения полисахаридов, отделение от сырья лучше проводить центрифугированием во избежание потери полисахаридов, забивающих поры фильтра. Полисахариды осаждают из водного экстракта при температуре 30 °С добавлением равного или большего объема 95 % спирта (соотношение от 1:1 до 1:4 в зависимости от вида сырья, определяется экспериментально), затем раствор выдерживают в течение 1 часа и фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР 16. Осадок промывают последовательно этанолом, ацетоном и этилацетатом для удаления низкомолекулярных сопутствующих веществ. Для определения мономерных единиц в полисахариде, полученном по вышеописанной методике, его гидролизуют до мономерных составляющих и затем проводят качественный анализ гидролизата методом хроматографирования на бумаге с применением стандартных образцов моносахаридов. Рассмотрим установление строения полисахарида, выделенного из сока растений вида подорожник большой, который включает в себя мономерные единицы в виде глюкозы и арабинозы.

Определение моносахаридных остатков в полисахариде, выделенного из подорожника большого, проводят по методике: осадок с фильтра количественно переносят с помощью 5 мл раствора кислоты трифторуксусной в круглодонную колбу вместимостью 25 мл с притертой пробкой, закрывают, пробку закрепляют и нагревают смесь в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 3 ч. Колбу с гидролизатом охлаждают, переносят содержимое колбы с помощью 10 мл воды в фарфоровую чашку и упаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 2 мл воды и пропускают полученный раствор через стеклянную колонку размером 8×50 мм с 0.5 г алюминия оксида основного; промывают колонку 3 мл воды, собирают раствор в фарфоровую чашку и упаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 0.1 мл воды очищенной при перемешивании стеклянной палочкой, прибавляют 1 мл метанола и фильтруют через воронку с кусочком ваты (испытуемый раствор). На линию старта ТСХ наносят 10 мкл испытуемого раствора и 5 мкл (2.5 мкг глюкозы, 2.5 мкг арабинозы) раствора сравнения. Пластинку с нанесенными пробами сушат в потоке теплого воздуха, затем помещают в камеру с системой растворителей вода-метанол-кислота уксусная безводная-этиленхлорид (10:15:25:50) (компоненты указанной смеси набирать пипетками) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в потоке теплого воздуха и сразу повторно хроматографируют в той же свежеприготовленной системе растворителей. Пластинку вновь сушат в потоке теплого воздуха и равномерно опрыскивают раствором, который состоит из 0.5 г тимола, растворенного в смеси 5 мл кислоты серной и 95 мл 96 % спирта (раствор при приготовлении охлаждают). После опрыскивания пластинку нагревают в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение 10 мин и просматривают при дневном свете. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться пятна на уровне пятен на хроматограмме раствора сравнения (глюкоза и арабиноза). Допускается наличие дополнительных пятен.

Примечание. Приготовление раствора сравнения: 12.5 мг глюкозы (СО) и 12.5 мг арабинозы (СО) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в смеси вода-метанол (2:3), доводят объем раствора той же смесью растворителей до метки и перемешивают. Приготовление раствора кислоты трифторуксусной: к 0.8 мл кислоты трифторуксусной прибавляют 4.2 мл воды и перемешивают.

Вопросы для самоконтроля:

1. Проанализируйте углеводы как важнейшие биологически активные вещества живых организмов, их химические свойства, идентификацию и применение.

2. Проанализируйте мутаротацию D-рибозы D-глюкозы D-фруктозы D-галактозы в проекциях Фишера и Хеурса и назовите написанные структуры. Особенности гликозидного гидроксила.

3. Экспертиза моно- и дисахаридов, представленных в Фармакопеях ведущих стран мира, ГФ РК, авторефератов диссертаций, справочных руководств по лекарственным средствам для врачей и т.д.

4. Проанализируйте структуры восстанавливающих и невосстанавливающих сахаров и на примере лактозы и фруктозы проведите идентификацию их структур.

5. Проанализируйте особенности строения природных полисахаридов на примере крахмала и целлюлозы.

2.3 ИСПЫТАНИЯ

В условиях Надлежащей производственной практики (GMP) чрезвычайно важными и несомненно актуальными являются проблемы унификации и совершенствования нормативных документов по контролю качества лекарственного растительного сырья, поскольку только на основе доброкачественного и стандартизированного лекарственного сырья можно осуществлять его промышленную переработку для его использования как в нативном состоянии, так и для получения лекарственных препаратов на его основе.

В настоящем разделе будут представлены данные по определению показателей качества лекарственного растительного сырья, которые устанавливаются в соответствии с нормативными требованиями международных стандартов [14, 15, 23-26].

2.3.1 Посторонние примеси

Посторонние примеси определяют согласно требованиям ГФ РК, Т.1, монография 2.8.2. Под примесями в лекарственном сырье подразумевают посторонние части, попавшие в него в процессе заготовки. Сырье проверяют на посторонние примеси путем визуального осмотра или с помощью лупы. Посторонние примеси отделяют, взвешивают и рассчитывают содержание примесей в процентах.

2.3.2 Потеря в массе при высушивании

Важным показателем качества лекарственного растительного сырья является так называемая товарная влажность, при которой сырье может храниться в сухих помещениях без порчи. Влажность, как корней, так и надземной части растений не должна превышать значений данного показателя для фармакопейных образцов (от 10 до 20% для надземной части растений и 12-15% для корней). *Под влажностью понимают потерю в массе при высушивании* за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в сырье при его высушивании до постоянной массы. В ЛРС находится в свободном состоянии 70-90% влаги, в связанном состоянии не более 5 %, которая прочно удерживается клеточными коллоидами.

Методика проведения. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц около 10 мм, перемешивают и берут две навески массой 3-5 г, взвешенные с погрешностью $\pm 0,01$ г. Каждую навеску помещают в предварительно высушенный и взвешенный вместе с крышкой бюкс и ставят в нагретый до 100-105 °С сушильный шкаф. Время высушивания отсчитывают с того момента, когда температура в сушильном шкафу вновь достигнет 100-105 °С. Первое взвешивание листьев, трав и цветков проводят через 2 часа, корней, корневищ, коры, плодов, семян и других видов сырья – через 3 часа. Высушивание проводят до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 минут высушивания и 30 минут охлаждения в эксикаторе не превышает 0,01 г.

Определение потери в массе при высушивании для пересчета количества действующих веществ и золы на абсолютно сухое сырье проводят в навесках 1-2 г (точная навеска), взятых из аналитической пробы, предназначенной для определения содержания золы и действующих веществ вышеописанным методом, но при разнице между взвешиваниями, не превышающей 0,0005 г.

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m - m_1) * 100}{m},$$

где m – масса сырья до высушивания в граммах;

m₁ – масса сырья после высушивания в граммах.

2.3.3 Зольность

Существенным показателем доброкачественности сырья служит содержание в нем золы. В растениях найден 21 элемент, из которых 16 встречаются во всех живых системах: Н, С, N, О, Р, S, Na, К, Са, Cl, Mg, Fe, Со, Cu, Zn; а 5 – только в некоторых видах: В, Al, V, Мо, I. Определяют общий минеральный состав лекарственного растительного сырья, характерный как для самого растения, так и минералы от примесей.

2.3.3.1 Общая зола

Показатель «Общая зола» показывает количество минеральных веществ, содержащихся как в самом сырье, так и в примесях. Определение общей золы проводят по следующей методике. В предварительно взвешенный и доведенный до постоянного веса фарфоровый тигель помещают 1.00 г измельченного в порошок лекарственного растительного сырья, равномерно распределяя его по дну тигля. Высушивают при температуре от 100 °С до 105 °С в течение 1 ч, сначала тигель осторожно нагревают, давая сначала веществу сгореть или улетучиться при возможно более низкой температуре. При неполном сгорании частиц угля остаток охлаждают, смачивают водой или насыщенным раствором аммония нитрата, выпаривают на водяной бане и остаток прокаливают. В случае необходимости такую операцию повторяют несколько раз.

Прокаливание ведут при слабом красном калении (около 500 °С-600 °С) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания со стенками тигля.

По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

$$X = \frac{m * 100 * 100}{m_1 * (100 - W)}$$

где m – масса золы в граммах;

m₁ – масса навески сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.3.3.2 Зола, нерастворимая в 10 % кислоте хлороводородной

Показатель «Зола, нерастворимая в 10 % HCl» отслеживает минеральные примеси, т.е. характеризует примесь кремнезема, которого тем больше, чем больше было в растительном сырье минеральных примесей. Данный показатель характеризует исследуемые растения как достаточно качественное лекарственное сырье.

В тигель с общей золой, полученному после сжигания препарата или лекарственного растительного сырья, прибавляют 10 мл 10 % раствора хлороводородной кислоты, тигель накрывают часовым стеклом и нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. К содержимому тигля прибавляют 5 мл горячей воды, обмывая ею часовое стекло. Жидкость фильтруют через беззольный фильтр, перенося на него остаток с помощью горячей воды. Фильтр с остатком промывают горячей водой до отрицательной реакции на хлориды в промывной воде, переносят его в тот же тигель, высушивают и сжигают, прокаливают, как указано выше и взвешивают.

$$X = \frac{(m_1 - m) * 100 * 100}{m_2 * (100 - W)}$$

где m – масса золы фильтра в граммах;

m_1 – масса золы в граммах;

m_2 – масса навески сырья в граммах;

W – потеря в массе сырья при высушивании в процентах.

2.3.3.3 Сульфатная зола

Количество сульфатной золы хорошо коррелирует с содержанием в лекарственном растительном сырье тяжелых металлов, которые образуют при действии серной кислоты в соответствующих условиях нерастворимые в воде сульфаты, т.е. показатель «Сульфатная зола» соизмерима с содержанием металлов в растениях, образующих нерастворимые сульфаты. Определение сульфатной золы проводят по нижеследующей методике.

Фарфоровый тигель прокаливают при температуре 600 ± 50 °С в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе над осушителем и взвешивают. Количество испытуемого вещества, указанное в частной статье помещают в тигель, взвешивают, смачивают небольшим количеством кислоты серной (обычно 1 мл), осторожно нагревают как можно при низкой температуре до полного обугливания испытуемого вещества и охлаждают в эксикаторе. Полученный остаток в тигле снова смачивают небольшим количеством кислоты серной, осторожно нагревают на сетке или песчаной бане до удаления белых паров и затем прокаливают при температуре 600 ± 50 °С до полного сгорания остатка. В продолжение всей процедуры в тигле не должно появляться пламя. Затем тигель охлаждают в эксикаторе над осушителем, взвешивают и вычисляют массу остатка. Если масса остатка превышает указанный предел, остаток снова смачивают кислотой серной и повторяют прокаливание, как описано выше, до постоянной массы.

$$X = \frac{m_2 * 100 * 100}{m_1 * (100 - W)}$$

где m_2 – масса золы в граммах;

m_1 – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.3.4 Тяжелые металлы

Загрязнения тяжелыми металлами являются одними из наиболее вредных для биосферы Земли загрязнений, которые имеют самые разнообразные последствия, как для здоровья людей, так и для жизнедеятельности живых организмов. При этом тяжелые металлы обнаруживаются практически во всех элементах биосферы. Их большое количество поступает в окружающую среду вследствие сжигания угля и нефти, использования удобрений, а также со сточными водами. Увеличивающийся масштаб загрязнений окружающей среды тяжелыми металлами оборачивается ростом генетических, раковых, сердечно-сосудистых заболеваний и они наряду с пестицидами, диоксинами, нефтепродуктами, фенолами, фосфатами и нитратами ставят под угрозу само существование цивилизации. Установлено, что содержание токсичных веществ в лекарственном растительном сырье может достигать более высоких концентраций, чем в пищевых продуктах, что и послужило причиной изучения этой проблемы в разных странах. Общеизвестно, что наиболее опасными элементами для человека, да и вообще для теплокровных животных, являются кадмий, ртуть и свинец (*Cd, Hg, Pb*).

Избыток тяжелых металлов, в частности кадмия, ртути и свинца разрушают нервную, сердечно-сосудистую и иммунную системы живого организма. Основным фактором высокой токсичности тяжелых металлов лежит их способность вызывать многочисленные нарушения метаболизма в организме. Так, избыток кадмия нарушает метаболизм металлов, особенно железа и кальция, нарушает действие цинковых и иных металло-ферментов, блокирует сульфгидрильные группы ферментов, нарушает синтез ДНК, легко замещает металл в флавопротеиновых комплексах, где главенствующую роль играют железо и молибден. Хроническое отравление кадмием приводит к сильнейшему нарушению функции почек и разрушает печень. Ртуть токсична в любой своей форме. В организме ионы метилртути быстро попадают в эритроциты, печень и почки, оседают в мозге, вызывая серьезные необратимые кумулятивные нарушения центральной нервной системы, что приводит к общему и церебральному параличу, деформации конечностей, особенно пальцев, затрудненному глотанию, конвульсиям и смерти. Она блокирует активность ряда важнейших ферментов, в частности карбоангидразы, карбоксипептидазы и щелочной фосфатазы. Легко замещает кобальт в корриноидах, тем самым извращает метаболические реакции, связанные с витамином B_{12} , в частности, механизма биосинтеза ДНК, что приводит к дегенеративным изменениям нервной системы. Источником загрязнения свинцом считаются выхлопы бензиновых двигателей автомашин из-за добавляемого в бензин тетраэтилсвинца для повышения его октанового числа. Свинец препятствует одной из ступеней биосинтеза гема, считается сильнейшим нейротоксином, приводит к анемии и нарушениям функций почек, образует комплексы с фосфатными группами рибозы в нуклеотидах и тем самым быстро разрушает РНК, ингибирует ферменты, в частности карбоксипептидазу. Причем, токсичность свинца увеличивается при недостатке в организме кальция и железа.

Содержание тяжелых металлов не должно превышать 10^{-3} % при отсутствии других указаний в частной статье.

В приложении Б (рис. Б-1) представлены данные по определению тяжелых металлов в траве и корнях кермека Гмелина.

2.3.5 Радионуклиды

Рассматривая лекарственные растения, мы утверждаем, что они не могут относиться к источникам поступления в организм человека ксенобиотиков, этим термином условно обозначают чужеродные для живых организмов химические вещества. Но при этом необходимо учитывать специфику кумуляции в лекарственном растительном сырье как отдельных радионуклидов, так и суммарную их удельную активность, так как некоторые лекарственные растения способны накапливать определенное количество радионуклидов, которые переходят в человеческий организм по следующей схеме: из почвы в лекарственное растительное сырье, затем в лекарственный препарат и к человеку. При чем радиоактивные изотопы, находящиеся в почве, как правило, переходят в корневые системы растений точно так же, как и стабильные изотопы тех же элементов и в случае сходства химических свойств стабильных и радиоактивных элементов они в исходных пропорциях поступают в растения. Попадая из почвы в лекарственные растения, они проникают в наземные части или задерживаются в корневой системе в зависимости от своих химических свойств.

Лекарственные растения могут рассматриваться, с одной стороны, как биогенные индикаторы радиоэкологической обстановки территории, подвергшейся радиоактивному загрязнению в результате ядерных взрывов, а с другой стороны – как объекты эколого-гигиенического регламентирования, требующие несколько иного подхода по сравнению с нормированием пищевого и водного факторов. ПДК для лекарственного растительного сырья: удельная активность для Sr-90 составляет 200 Бк/кг; для Cs-137 – 100 Бк/кг.

В приложении В (рис. В-1) представлены данные по определению радионуклидов в траве и корнях кермека Гмелина.

2.3.6 Афлатоксины

Афлатоксины относятся к пятичленным многоядерным гетероциклическим соединениям и являются токсичными продуктами жизнедеятельности различных видов микроскопических грибов (нескольких видов высших плесневых грибов рода аспергилл, главным образом *Aspergillus flavus* и *A.parasiticus*). Высокая устойчивость спор, находящихся в почве (на глубине до 80 см), способствует повсеместному распространению плесневых грибов. Большое значение имеет наличие определенных химических веществ. Так, повышенное количество липидов (жиров) в семенах масличных культур (например, на семенах арахиса) увеличивает подверженность их загрязнению афлатоксинами. Эти природные токсины являются канцерогенными веществами, вредны для клетки уже в незначительных концентрациях, их ПДК составляет 0,5 мкг/кг, в то время как встречаются штаммы грибов, продуцирующие токсины в концентрации 40 000 мг/кг. Они вызывают тяжелые заболевания у животных и человека, относятся к ядам

экзогенного действия, так как в основном выделяются и находятся в субстрате, на котором растет гриб, а не в структуре гриба. Обладают очень высокой устойчивостью к длительному УФ-облучению, нагреванию, некоторые устойчивы к действию кислот и щелочей. Механизм действия микотоксинов заключается в блокировке жизненно важных аминокислот (аланина, тирозина, триптофана) и образовании аминов, которые даже в незначительных количествах могут сильно воздействовать на кровеносные сосуды. Они накапливаются в тканях или органах отдельных видов растений, особенно произрастающих в тропическом поясе. У растений под влиянием токсичных веществ гриба теряется тургор, обесцвечиваются листья, отмечается побурение сосудов и ухудшаются обменные процессы.

2.3.7 Пестициды

Пестициды представляют собой химические или биологические препараты, которые используются для борьбы с вредителями и болезнями растений, вредителями сельскохозяйственной продукции при их хранении сорными растениями, а также для регулирования роста растений, предуборочного удаления листьев (дефолианты) и подсушивания растений (десиканты). Единица измерения означает количество мг пестицида в 1 кг лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата и обозначается мг/кг. Для обеспечения достоверности полученных результатов анализируемое на содержание остаточных пестицидов лекарственное растительное сырье/препараты, как правило, должно иметь влажность не более 15 %.

В лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах определяют содержание остаточных пестицидов, в том числе хлорсодержащих: гексахлорциклогексана (ГХЦГ) и его изомеров (α -, β -, γ -ГХЦГ), дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и его метаболитов (ДДД – дихлордифенилдихлорметилметана, ДДЕ – дихлордифенил-хлорэтилена), гексахлорбензол (ГХБ), алдрин, гептахлор и других.

Основные этапы определения содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах заключаются в следующих этапах: 1) отбор и подготовка пробы для определения остаточных пестицидов 2) определение содержания остаточных пестицидов в испытуемых образцах и обработка результатов измерений; 3) определение соответствия сырья допустимым нормам. Пробы должны анализироваться немедленно во избежание возможного разрушения остатков пестицидов. Если это невозможно, пробы сохраняют в защищенном от света месте в герметичных контейнерах, пригодных для контакта с пищевыми продуктами, при температуре ниже 0 °С. Все реактивы и растворители не должны содержать примесей, особенно пестицидов, которые могут влиять на результаты анализа (таблица 6). Для определения содержания пестицидов в пробе используется газовая (ГХ/МС) или жидкостная (ВЭЖХ/МС) хроматография с масс-спектрометрическим детектором. При поставке *культивируемого* лекарственного растительного сырья поставщик должен предоставить протокол анализа на поставляемую партию лекарственного растительного сырья, в котором указываются использованные пестициды и содержание остаточных

пестицидов. Отбор проб для проведения испытаний осуществляют в соответствии с действующими санитарно-гигиеническими правилами и условиями, исключающими дополнительное загрязнение сырья.

Таблица 6 – Аналитические характеристические параметры в различных диапазонах концентрации вещества

Диапазон концентрации вещества, мг/кг	Повторяемость (относительное стандартное отклонение, %)	Воспроизводимость (относительное стандартное отклонение, %)
0,001-0,01	30	60
>0,01-0,1	20	40
>0,1-1	15	30
>1	10	20

Определение остаточных пестицидов (хлорсодержащих). Подготовка проб к анализу. Пробы лекарственного растительного сырья/препарата измельчают и просеивают через сито с размером отверстий 0,5 мм. Затем около 5 г сырья/препарата (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мкл стандартного раствора внутреннего стандарта с общей концентрацией 1 мкг/мл и 50 мл перегнанного гексана, перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 ч при нагревании с использованием обратного холодильника. Затем полученное извлечение отфильтровывают через стекловату и проводят повторную экстракцию 30 мл гексана. Остаток на фильтре промывают 30 мл гексана и промывную жидкость объединяют с полученными извлечениями. К объединенному извлечению добавляют натрия сульфат безводный в соотношении 1:10 и выдерживают 1-1,5 ч, а затем упаривают на роторном вакуумном испарителе до объема 10-15 мл. В делительную воронку вместимостью 100 мл помещают 10-15 мл полученного объединенного извлечения и прибавляют 20-25 мл серной кислоты концентрированной. Содержимое делительной воронки осторожно встряхивают 5-10 раз и оставляют до расслоения фаз, после чего нижний слой (кислотный) отбрасывают. Очистку повторяют несколько раз до получения бесцветного слоя серной кислоты. Очищенные извлечения нейтрализуют натрия гидрокарбоната раствором 0,5 М и промывают водой очищенной до нейтральной реакции промывных вод, после чего извлечения пропускают через колонку (длиной 10 см и диаметром 1 см), последовательно заполненную алюминия оксидом (высота слоя 3 см) и натрия сульфатом безводным (высота слоя 3 см). Колонку промывают 20 мл метилхлорида. Полученное очищенное извлечение упаривают на роторном вакуумном испарителе досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона.

Альтернативный способ пробоподготовки. Для проведения анализа может быть использован альтернативный способ пробоподготовки. Измельчают около 50 г лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата (проба для определения остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка) и просеивают через сито с размером отверстий 0,5 мм. Помещают 10 г (точная навеска) измельченного образца в тefлоновую пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, добавляют 10 мл ацетонитрила для хроматографии, тщательно встряхивают в течение 1 мин,

добавляют 4 г безводного магния сульфата, 1 г натрия хлорида и опять тщательно встряхивают содержимое пробирки в течение 1 мин. Затем экстракт центрифугируют в течение 3 мин при 5000 об/мин. После центрифугирования из верхнего слоя содержимого пробирки переносят аликвоту объемом 6 мл в тefлоновую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 мл, содержащую 150 мг сорбента, представляющего собой смесь первичных и вторичных аминов, и 950 мг магния сульфата безводного, и снова центрифугируют в течение 3 мин при 5000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм. 1,5 мл полученного фильтрата переносят в хроматографическую виалу, содержащую 15 мкл муравьиной кислоты раствора 5 % в ацетонитриле (для стабилизации экстракта). Проводят определение содержания остаточных пестицидов методом ГХ/МС или ВЭЖХ/МС.

В качестве внутреннего стандарта может быть использован трифенилфосфат. Его добавляют в начальной стадии пробоподготовки одновременно с ацетонитрилом в концентрации 1 мкг/мл для ВЭЖХ/МС или 10 мкг/мл для ГХ/МС.

Могут быть использованы другие методики пробоподготовки при условии их валидации. Хроматомасс-спектрометрический анализ полученных растворов проводят на газовом хроматографе с масс-селективным детектором с использованием стандартных веществ (стандартный образец состава: α -гексахлорциклогексан, γ -гексахлорциклогексан, ДДТ, ДДЕ, ДДД, альдрин, гептахлор), а также внутреннего стандарта – 4,4'-дибромдифенила. Для анализа используют 30 м кварцевую капиллярную колонку HP-5MS (сополимер 5% дифенила и 95% диметилсилоксана) с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,3 мкм или любую аналогичную. Анализ осуществляют при условиях, указанных в таблице 7.

Таблица 7 – Условия хроматомасс-спектрометрического анализа остаточных пестицидов (хлорсодержащих) на колонке HP-5MS

$T_{нач.}, ^\circ\text{C}$	$v, ^\circ\text{C}/\text{мин}$	$T_{конеч.}, ^\circ\text{C}$	$T_{исп.}, ^\circ\text{C}$	$T_{инт.}, ^\circ\text{C}$	$V, \text{мкл}$
70	10	300	280	280	1
Примечание: $T_{нач.}$ – начальная температура термостата колонки (выдержка 4 мин.); v – скорость линейного нагрева колонки; $T_{конеч.}$ – конечная температура колонки (выдержка 5 мин.); $T_{исп.}$ – температура испарителя; $T_{инт.}$ – температура интерфейса; V , мкл – объем вводимой пробы.					

Масс-спектры регистрируют при ионизации электронным ударом с энергией ионизации 70 эВ. Скорость сканирования должна составлять 1 скан/с при диапазоне сканирования 40-600 а.е.м. Хроматомасс-спектрометрический анализ проводят в режиме селективного детектирования индивидуальных ионов с идентификацией пестицидов по характеристическим ионам и времени удерживания с использованием растворов стандартных образцов (табл. 8).

Критериями идентификации являются:

- времена удерживания, которые не должны отличаться более чем на 0,5 мин от времени удерживания стандартного вещества;

- относительные интенсивности пиков характеристических ионов на

реконструированной хроматограмме не должны отличаться более чем на 20% от относительной интенсивности этих пиков в масс-спектре стандартного вещества, полученного на данной хроматомасс-спектрометрической системе;

- синхронность максимумов пиков характеристических ионов;
- соотношение сигнал/шум, которое должно быть не менее 3:1.

Таблица 8 – Хроматографические и масс-спектрометрические данные анализа растворов стандартных образцов хлорорганических пестицидов (ХОП) и полихлорбифенилов (ПХБ)

Наименование ХОП или ПХБ	Время удерживания, мин	Характеристические ионы, m/z	Относительное время удерживания
α-ГХЦГ	17,26	219, 183, 217, 181	0,848
β-ГХЦГ	17,82		0,874
γ-ГХЦГ	17,96		0,881
ДДТ	23,49	235, 237, 165	1,152
ДДД	22,80		1,118
ДДЕ	22,02	318, 246, 248	1,080
Альдрин	20,14	263, 298, 66	0,988
Гептахлор	19,45	272, 274, 339, 237	0,954
4,4'-Дибром-дифенил	20,39	312, 310, 314, 152	1,000
Примечание: Данные представлены для колонки НР-5MS			

Условия проведения измерений могут быть иными при использовании других детекторов, при этом методика должна быть валидирована для применяемых условий.

Содержание пестицидов в лекарственном растительном сырье/препарате рассчитывают методом внешнего стандарта, в качестве которого используют растворы стандартных веществ определяемых соединений. Для количественной оценки используют пробы, извлечение из которых внутренних стандартов составляет 70-110 %. Рассчитывают среднее значение из трех измерений площадей пиков анализируемых веществ.

Количество определяемого компонента ($C_{исп}$) в нг/г или нг/мл вычисляют по формуле:

$$C_{исп} = \frac{S}{S_{ст} \cdot P(V)} \cdot C_{ст} - C_{контр}, \text{ где}$$

$C_{контр}$ – концентрация определяемого соединения в контрольной пробе, нг/г или нг/мл;

S – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме испытуемого раствора;

$C_{ст}$ – концентрация определяемого соединения в стандартном растворе;

$S_{ст}$ – площадь пика определяемого соединения на хроматограмме стандартного раствора;

$P(V)$ – навеска в г или объем пробы в мл.

Для перевода концентрации в мг/кг полученное значение следует разделить на 1000.

Пределы допустимого содержания остаточных хлорсодержащих пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах не должны

превышать значения, указанные в таблице 9.

Таблица 9 – Пределы допустимого содержания остаточных пестицидов (хлорсодержащих) в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
Гексахлорциклогексан и его изомеры (в сумме)	0,1
ДДТ и его метаболиты (в сумме)	0,1
Алдрин	Не допускается
Гептахлор	Не допускается

Если нет других указаний в фармакопейной статье, количество других остаточных пестицидов не должно превышать значений предельно допустимого содержания, указанных в таблице 10.

Таблица 10 – Пределы допустимого содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

N п/п	Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
1	2	3
1	Азинфос-метил	1,0
2	Азинфос-этил	0,1
3	Алахлор	0,02
4	Ацефат	0,1
5	Бромид, неорганический (в пересчете на бромид ион)	50
6	Бромфос-метил	0,05
7	Бромфос-этил	0,05
8	Бромпропилат	3,0
9	Винклозолин	0,4
10	Гексахлорбензол	0,1
11	Дельтаметрин	0,5
12	Диазинон	0,5
13	Дихлофлуанид	0,1
14	Дихлорфос	1,0
15	Дикофол	0,5
16	Диметоат и ометоат (в сумме)	0,1
17	Дитиокарбаматы (в пересчете на CS ₂)	2,0
18	Квиналфос	0,05
19	Квинтоцен (в сумме с пентахлоранилином и метилпентахлорфенилсульфидом)	1,0
20	Малатион (в сумме с малаксоном)	1,0
21	Мекарбам	0,05
22	Метакрифос	0,05
23	Метамидофос	0,05
24	Метидатион	0,2
25	Метоксихлор	0,05
26	Мирекс	0,01
27	Монокротофос	0,1

N п/п	Вещество	Пределы допустимого содержания, мг/кг
1	2	3
28	Паратион-метил и параоксон-метил (в сумме)	0,2
29	Паратион-этил и параоксон-этил (в сумме)	0,5
30	Пендиметалин	0,1
31	Пентахлоранизол	0,01
32	Перметрин и изомеры (в сумме)	1,0
33	Пиперонилбутоксид	3,0
34	Пиретрум (цинерин I, цинерин II, джасмолин I, джасмолин II, пиретрин I и пиретрин II в сумме)	3,0
35	Пиримифос-метил и с N-дезэтил-пиримифос-метил в сумме	4,0
36	Пиримифос-этил	0,05
37	Протиофос	0,05
38	Профенофос	0,1
39	Процимидон	0,1
40	C-421	0,02
41	Текназен	0,05
42	Тетрадифон	0,3
43	Фенвалерат	1,5
44	Фенитроцион	0,5
45	Фенпропатрин	0,03
46	Фенсульфотион (в сумме)	0,05
47	Фентион (в сумме)	0,05
48	Фенхлорофос (сумма фенхлорофоса и фенхлорофосоксона)	0,1
49	τ-Флувалинат	0,05
50	Флуцитринат	0,05
51	Фонофос	0,05
52	Фозалон	0,1
53	Фосмет	0,05
54	Хлордан (сумма <i>цис</i> -, <i>транс</i> - и оксихлордана)	0,05
55	Хлорпирифос-метил	0,1
56	Хлорпирифос-этил	0,2
57	Хлортал-диметил	0,01
58	Хлорфенвинфос	0,5
59	λ-Цигалотрин	1,0
60	Циперметрин и изомеры (в сумме)	1,0
61	Цифлутрин (в сумме)	0,1
62	Эндосульфат (изомеры и эндосульфата сульфат в сумме)	3,0
63	Эндрин	0,05
64	Этион	2,0
65	Этримфос	0,05

Значение пределов допустимого содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье (ПДСОП_{ЛРС}), не включенных в табл. 5, рассчитывают по формуле с учетом значения уровня допустимого суточного потребления вещества, рекомендованного FAO/ВОЗ, и величины дозы суточного потребления лекарственного растительного сырья/препарата:

$$\text{ПДСОП}_{\text{ЛРС}} = \frac{\text{ДСП} \cdot \text{М}}{\dots},$$

где ДСП – допустимое суточное потребление вещества* в мг на кг массы тела;

М – масса тела, кг (60 кг);

МСД – суточная доза лекарственного растительного сырья, кг;

100 – фактор потребления (относится к требованию ВОЗ о том, что количество остаточных пестицидов, потребляемых из ЛРС, не должно превышать 1% от общего количества потребляемых пестицидов).

2.3.8 Микробиологическая чистота

Микробиологические испытания, описанные ниже, позволяют осуществлять количественное определение мезофильных бактерий и грибов, способных расти в аэробных условиях. Испытания предназначены в первую очередь для того, чтобы определить, удовлетворяет ли исследуемое лекарственное сырье требованиям по микробиологической чистоте, изложенным в разделе «Микробиологическая чистота лекарственных средств» (ГФ РК, монография 5.1.4). В этом случае порядок проведения испытания, в том числе количество образцов, отбираемых для анализа, и интерпретацию полученных результатов производитель устанавливает по согласованию с компетентным уполномоченным органом. Испытания проводят в условиях, позволяющих предотвратить случайное микробное загрязнение испытуемого образца. Меры, принимаемые для предотвращения микробного загрязнения испытуемого образца, не должны оказывать влияния на микроорганизмы, которые могут быть выявлены при проведении испытания. В том случае, если испытуемое лекарственное средство обладает антимикробной активностью, оно должна быть подходящим образом нейтрализована. При использовании для этой цели инактиваторов следует подтвердить их нейтрализующую эффективность и безвредность для микроорганизмов. Определение общего числа аэробных микроорганизмов проводят методом мембранной фильтрации или методом посева на чашки Петри. Метод наиболее вероятного числа (НВЧ) предназначен для использования в тех случаях, когда невозможно применить другие методы. При выборе метода испытания необходимо учитывать природу испытуемого лекарственного образца и ожидаемое количество микроорганизмов. Следует должным образом провести проверку пригодности выбранной методики. В том случае, если цель проведения испытания связана со статьями 5.1.3 или 5.1.4, следует использовать метод глубинного или поверхностного посева на чашки Петри или метод мембранной фильтрации.

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и т. 2, 2.6.13. Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4.

Препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В 1 г препарата допускается наличие не более 10^4 аэробных бактерий, 10^2 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). В 1 г препарата не допускается наличие *Escherichia coli*, *Salmonella* и *Staphylococcus aureus*.

В приложении Г (рис. Г-1) представлены данные по определению микробиологической чистоты травы и корней кермека Гмелина.

Таким образом, если в ходе анализа установлено превышение допустимых норм

тяжелых металлов, радионуклидов, остаточных пестицидов, аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов и других показателей качества лекарственного растительного сырья, организация, проводившая анализ, должна поставить в известность производителя, через которого данное лекарственное растительное сырье поступило на реализацию. Только на основе идентифицированного лекарственного растительного сырья, показатели качества которого соответствуют требованиям международных стандартов, может быть осуществлена его переработка для получения на его основе субстанции (в виде густого и сухого экстрактов) или же лекарственной формы в виде настойки.

Вопросы для самоконтроля:

1. Классификация этапов определения доброкачественности лекарственного растительного сырья.
2. Дайте объяснение сущности определения показателей «Общая зола», «Зола, нерастворимая в 10% HCl», «Сульфатная зола» для ЛРС.
3. Дайте объяснение сущности определения показателей «Тяжелые металлы», «Радионуклиды», «Афлотоксины», «Микробиологическая чистота».

2.4 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Методы количественного определения. Для определения количественного содержания анализируемых групп биологически активных веществ, присутствующих в исследуемом лекарственном растительном сырье, используют классические титриметрические методы, а также современные методы хроматографии и спектрометрии.

Титриметрические или объёмные методы отличаются разнообразием и зависят от строения исследуемых соединений и, соответственно, от их химических свойств. В основе данного метода лежат реакции различных типов, а именно окислительно-восстановительные и кислотно-основные, реакции осаждения и образования комплексных соединений. Широко распространены методы титрования окислителями — перманганометрия (определение дубильных веществ в сырье), йодометрия (определение арбутина в листьях толокнянки и брусники) и др. Точку эквивалентности фиксируют с помощью цветных индикаторов или потенциометрически (за счёт скачка потенциала индикаторного электрода). Потенциометрическое титрование в анализе лекарственного растительного сырья используется сравнительно редко, например, при количественном определении суммы аралозидов в корнях аралии маньчжурской или определении дубильных веществ.

Современные физико-химические методы анализа имеют ряд преимуществ перед классическими химическими методами. На сегодняшний день существует большое количество аналитических приборов, выпускаемых отечественными и зарубежными фирмами и позволяющих анализировать практически любые органические соединения, содержащиеся в природных объектах. Они отличаются избирательностью, высокой чувствительностью, высокой степенью автоматизации.

К наиболее широко распространённым в настоящее время современным методам анализа растительного сырья относятся хроматографические методы и методы фотометрического анализа. Важнейшей особенностью этих методов является объективность оценки количественного содержания фармакологически активных веществ, что, в свою очередь, определяет качество растительного сырья.

Хроматографические методы анализа используются для разделения смеси веществ или частиц (например, ионов) и основаны на различии в скорости их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз. При этом идентификация компонентов проводится по параметрам их удерживания в сравнении со стандартными образцами (свидетелями).

Использование метода ТСХ на стадии пробоподготовки в количественном анализе лекарственного растительного сырья предусматривает элюирование действующих веществ с хроматографической пластины и последующий анализ элюата другими методами (рис. 46).

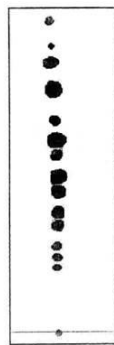


Рис. 46. ТСХ гинсенозидов экстракта женьшеня

Разделение суммы флавоноидов цветков боярышника проводят на пластинах «Силуфол» или «Сорбфил», после чего пятно гиперозида элюируют с пластины, а его содержание в элюате определяют спектрофотометрическим методом. В последнее время активно развивается метод количественной ТСХ с использованием специального прибора — денситометра, работа которого основана на измерении плотности флуоресценции или окраски пятна анализируемого компонента непосредственно на пластине. Для этого денситометр снабжён цифровой видеокамерой или сканером, а обработка полученных результатов производится с помощью специальной программы на компьютере. Применение денситометрии позволяет проводить экспресс-анализ компонентов сырья без их элюирования с пластины. Производство денситометров активно развивается, например активным поставщиком является швейцарская фирма «Camag» (спектро-денситометр «SAMAG Scanner 3»).

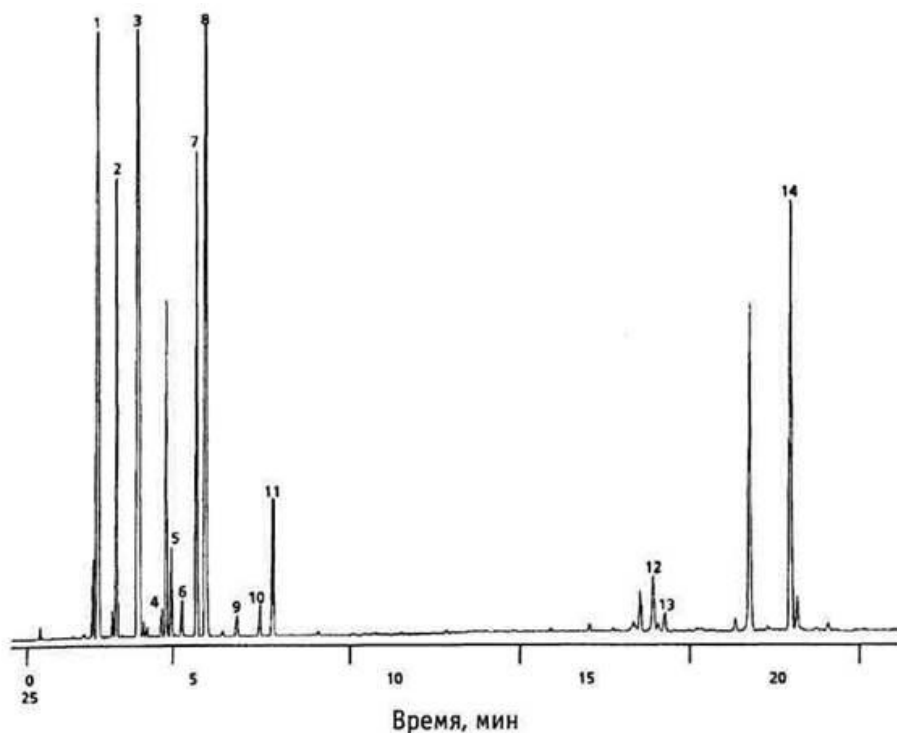
К строго приборным методам хроматографического анализа относятся газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография.

Газовая хроматография (ГХ) – это хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара. В фармацевтическом анализе находят применение газо-жидкостная (ГЖХ) и газоадсорбционная хроматографии. В газо-жидкостной хроматографии неподвижной фазой служит жидкость, нанесённая на твёрдый носитель, т.е. используется распределительный механизм разделения компонентов. В газоадсорбционной хроматографии неподвижной фазой является твёрдый адсорбент.

Также возможно проведение химической модификации (derivatизации) компонентов анализируемой смеси с целью получения летучих производных и их последующий анализ методом ГХ. В качестве примера газохроматографического анализа с использованием derivatизации можно привести анализ летучих производных карбоновых кислот и моносахаридов, в том числе и растительного происхождения.

Метод газовой хроматографии применяется для анализа летучих веществ. На рисунке 47 представлена хроматограмма скипидара, полученная методом ГЖХ (колонка DB-WAX 30 м Ч 0,25 мм, газ-носитель водород, градиент температур 70-200 °С (3 °С/мин), ПИД (220 °С)). Детектирование на выходе из газохроматографической системы производится несколькими способами. Наиболее часто применяют детекторы теплопроводности (ДТП, или катарометр) и пламенно-ионизационный (ПИД). Реже

используют селективные детекторы, такие как электронно-захватный (ЭЗД) и термоионный (ТИД).



1 – *альфа*-пинен; 2 – камфен; 3 – *бета*-пинен; 4 – 3-карен; 5 – *альфа*-фелландрен; 6 – *альфа*-терпинен; 7 – лимонен; 8 – *бета*-фелландрен; 9 – *гамма*-терпинен; 10 – *пара*-цимен; 11 – терпинолен; 12 – кариофиллен; 13 – терпинен-4-ол; 14 – *альфа*-терпинеол

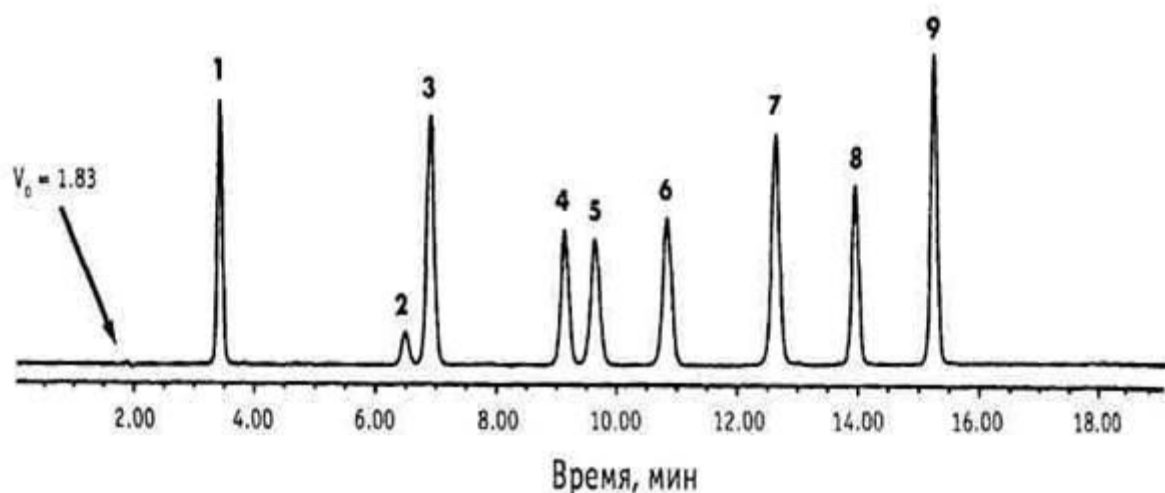
Рис. 47. ГЖХ-хроматограмма скипидара

На базе колоночной хроматографии возникла *высокоэффективная жидкостная хроматография* (ВЭЖХ). От классической колоночной хроматографии ВЭЖХ отличается использованием сорбентов с размером частиц 3-10 мкм, что обеспечивает быстрый массоперенос при очень высокой эффективности разделения. Для обеспечения беспрепятственного прохождения элюента через колонку с ультрамелким сорбентом на входе в хроматографическую систему создается высокое давление. Поэтому другим названием ВЭЖХ является «жидкостная хроматография высокого давления».

Лидирующее положение занимает обращённо-фазовая ВЭЖХ, в которой используются сорбенты на основе силикагеля с привитыми на его поверхности молекулами неполярных соединений, таких как высокомолекулярные углеводороды, фенолы и их производные. При этом хроматографическое разделение происходит за счёт распределительного (главным образом) и адсорбционного (в меньшей степени) механизмов, детектирование в ВЭЖХ осуществляется с помощью фотометрических и электрохимических методов анализа. Основное значение имеет спектрофотометрическая детекция в УФ области.

Преимуществом ВЭЖХ (особенно обращённо-фазовой) перед газовой хроматографией является возможность исследования практически любых объектов без

каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам. Поэтому подавляющее большинство действующих веществ лекарственного растительного сырья может быть проанализировано этим методом. На рисунке 48 представлена хроматограмма галловой кислоты, кофеина и различных производных флаван-3-ола (катехин, эпикатехин, эпигаллокатехин, галлокатехингаллат, катехингаллат, эпикатехингаллат, эпигаллокатехингаллат). Условия хроматографирования: колонка Atlantis 4,6 Ч 150 мм (5 μ м), метанол – вода – 1 % HCOOH (pH 2,3), градиентный режим; скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 30 °С; спектрофотометрическая детекция (280 нм)



1 – кислота галловая; 2 – эпигаллокатехин; 3 – катехин; 4 – кофеин; 5 – эпигаллокатехингаллат; 6 – эпикатехин; 7 – галлокатехингаллат; 8 – эпикатехингаллат; 9 – катехингаллат

Рис. 48. Хроматограмма полифенолов

В фармацевтическом анализе метод ВЭЖХ в настоящее время используется главным образом при анализе препаратов на основе лекарственного растительного сырья, такого как женьшень, родиола розовая, шиповник и др.

Спектрофотометрический анализ — анализ поглощения веществом монохроматического излучения с определённой длиной волны. Здесь выполняется основной закон поглощения - закон Бугера-Ламберта-Бэра:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = kcb,$$

где I_0 – интенсивность излучения, падающего на раствор; I – интенсивность излучения, прошедшего через раствор; c – концентрация вещества в растворе; b – толщина слоя, см; D – оптическая плотность; k – коэффициент поглощения вещества

Этот вид анализа выполняется на спектрофотометрах видимого диапазона (ВИД) и УФ-диапазона (обычно 200-1100 нм). Регистрируется спектр поглощения (зависимость поглощенного излучения от длины волны) или часть спектра поглощения (отдельная

полоса поглощения). Измерение оптической плотности производится на фиксированной длине волны (как правило, в максимуме полосы поглощения).

При анализе растительного сырья наиболее распространено количественное определение суммы действующих веществ в пересчёте на конкретное соединение, которое должно отвечать определённым требованиям: это соединение должно входить в состав суммы действующих веществ и для него должен существовать *стандартный образец* (СО). Например, в траве зверобоя спектрофотометрически оценивается содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин. В случаях отсутствия СО в качестве стандарта используют иное соединение, имеющее сходный с определяемым коэффициент поглощения на аналитической длине волны. Подобным приёмом пользуются при фотоколориметрическом определении суммы антраценпроизводных, где в качестве стандарта используют кобальта хлорид (кора крушины, корни ревеня и др.). Определение концентрации веществ в растворе проводят тремя основными способами.

Первый способ основывается на измерении оптической плотности с последующим применением закона Бугера-Ламберта-Бэра для расчёта концентрации. Этот способ применим, когда известен коэффициент поглощения исследуемого вещества на данной длине волны. Таким образом, определяют количественное содержание суммы антоцианов в пересчёте на цианидин-3,5-дигликозид в цветках василька синего.

Второй способ — определение концентрации исследуемого соединения путём сравнения величин оптических плотностей его раствора и раствора стандартного образца в известной концентрации. Так определяют содержание суммы флавоноидов в пересчёте на изосалипурпозид в цветках бессмертника песчаного.

Третий способ — построение калибровочного графика с использованием серии растворов стандартного образца известной концентрации, например количественное определение суммы флавоноидов в пересчёте на ононин в корнях стальника.

Современный фармакогностический анализ также предусматривает использование многих других физико-химических методов. При выделении из растений органических веществ, требующих идентификации и определения их количественного содержания, успешно используются такие методы, как поляриметрия, люминесцентный анализ, ИК-спектроскопия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, хромато-масс-спектрометрия, электрохимические методы и др.

В тех случаях, когда качество лекарственного сырья невозможно удовлетворительно определить химическими или физико-химическими методами, используют *биологический анализ*. Этот метод, в частности, является определяющим при анализе лекарственного растительного сырья, содержащего кардиотонические гликозиды. Следует отметить, что биологическая стандартизация имеет ряд существенных недостатков: трудоёмкость, высокая стоимость анализа, малая точность. Кроме того, биологические методы анализа зачастую не отражают истинного содержания действующих веществ в лекарственном растительном сырье.

2.4.1 Количественное определение аминокислот

Количественное содержание аминокислот во всех исследуемых образцах можно определять на аминокислотном анализаторе, но каждый этап этой процедуры является дорогостоящим. Можно также проводить данный анализ, используя метод ГХ, который проводится по следующей методике: 1 г сухого остатка гидролизуют в 5 мл 6 н хлороводородной кислоты при 105 °С в ампулах, запаянных под аргоном в течение 24 ч. Полученный гидролизат концентрируют досуха на вакуумном роторном испарителе при 40 °С, осадок растворяют в 5 мл 5% сульфосалициловой кислоты. Раствор центрифугируют, надосадочную жидкость пропускают через ионообменную колонку с Даукс 50 Н-8, 200-400 м. Элюирование аминокислот ведут 6 н раствором NH₄OH, после концентрирования которого к нему добавляют свежеприготовленного SnCl₂, 1 каплю 2,2-диметоксипропана, 1-2 мл пропанола, насыщенного HCl и нагревают до 110 °С. Эту температуру выдерживают в течение 20 мин, а затем реакционную смесь концентрируют на роторном испарителе. К концентрату добавляют 1 мл свежеприготовленного ацильного реактива (1 объем уксусного ангидрида, 2 объема триэтиламина, 5 объемов ацетона), нагревают его при температуре 60 °С в течение 1,5-2 мин и концентрируют досуха. К остатку добавляют 2 мл этилацетата и 1 мл насыщенного раствора NaCl, содержимое колбы тщательно перемешивают. Из образовавшихся двух слоев жидкостей для газохроматографического анализа используют верхний этилацетатный слой.

2.4.2 Количественное определение витаминов

Методом ВЭЖХ по приведенной ниже типовым методикам можно количественно определить следующие витамины: витамин А (ретинол, ретинола ацетат и ретинола пальмитат), витамин D (холекальциферол и эргокальциферол), витамин Е (α-токоферол и α-токоферола ацетат), витамин К₁ (фитоменадион), β-каротин, витамины В₁ (тиамина хлорид, тиамина бромид и тиамина мононитрат), В₂ (рибофлавин, рибофлавинмононуклеотид), В₃ (кислоту никотиновую, никотинамид), В₅ (кислоту пантотеновую и ее соли, пантенол), В₆ (пиридоксина гидрохлорид), В₉ (кислоту фолиевую), В₁₂ (цианокобаламин), витамин С (кислоту аскорбиновую или ее натриевую или кальциевую соли, аскорбилпальмитат), В₇ или Н (биотин), витамин Р (рутин).

Условия хроматографирования. Используют колонку длиной 250 мм, диаметром 4,6 мм с октадецилсилилсиликагелем с размером частиц 5 мкм. Объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин. Допустимо использование колонок других размеров с той же или большей эффективностью, а также других объемов введения и скоростей потока подвижной фазы при условии пригодности хроматографической системы.

Проверка пригодности хроматографической системы. Разрешение между двумя соседними пиками должно быть не менее 1,5. Факторы асимметрии пиков должны быть близки к единице, в предельном случае не менее 0,8 и не более 2.

Содержание витамина в анализируемой субстанции в процентах (X_1) или в анализируемом препарате в миллиграммах (X_2) вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{S \cdot a_0 \cdot N \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot N_0} ,$$

$$X_2 = \frac{S \cdot a_0 \cdot N \cdot G \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot N_0 \cdot 100} ,$$

где: S и S₀ – площади пиков определяемого витамина на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов соответственно;

a – навеска испытуемого препарата или субстанции в граммах;

a₀ – навеска стандартного образца в граммах;

N и N₀ – разведения при приготовлении испытуемого и стандартного растворов соответственно;

G – среднее значение массы единицы лекарственной формы в мг;

P – содержание основного вещества в стандартном образце в процентах.

2.4.3 Количественное определение карбоновых кислот

Метод А. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. 25 г измельченных плодов помещают в колбу вместимостью 250 мл, заливают 200 мл воды и выдерживают в течение 2-х часов на кипящей водяной бане, затем охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают. Отбирают 10 мл извлечения, помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200-300 мл свежeproкипяченной воды, 1 мл 1% спиртового раствора фенолфталеина, 2 мл 0,1% раствора метиленового синего и титруют раствором натрия едкого (0,1 моль/л) до появления в пене лилово-красной окраски.

Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,0067 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 10 \cdot (100 - W)} ,$$

где: 0,0067г – количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл раствора натрия едкого (0,1 моль/л) в граммах

V – объем раствора натрия едкого (0,1 моль/л), пошедшего на титрование в мл

m – масса сырья в граммах

W- потеря в массе при высушивании в процентах.

Метод Б. Около 1 г (точная навеска) образца заливают 10 мл хлороформа, выдерживают при перемешивании 30 минут, фильтруют в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем до метки хлороформом. К аликвоте анализируемого раствора и к СО (1% раствор пальмитиновой кислоты в хлороформе) добавляют по 15 мл 0.5% раствора дифенилкарбазона и дифенилкарбазида (5:95) и измеряют оптическую плотность

испытуемого и стандартного раствора при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Контрольный раствор: 0.5% раствор дифенилкарбазона и дифенилкарбазида (5:95) в метаноле.

Содержание жирных кислот в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * C * 100}{D_0 * m}$$

где: C – содержание стандартной жирной кислоты;

D – оптическая плотность испытуемого образца при длине волны 550 нм;

D₀ – оптическая плотность СО при длине волны 550 нм;

m – масса навески испытуемого образца в граммах.

Метод В. Испытуемый раствор. 2.0 мл субстанции помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл 10% раствора натрия хлорида, колбу присоединяют к установке для перегонки с водяным паром и отгоняют эфирные масла с водяным паром в течение 10 мин, собирая около 30 мл отгона. Охлажденный остаток в колбе помещают в делительную воронку вместимостью 50 мл с помощью 10 мл циклогексана, встряхивают в течение 5 мин, отстаивают до полного разделения слоев. Верхний (циклогексановый) слой фильтруют через бумажный фильтр с 0.5 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 20 мл. Воронку и фильтр промывают 5 мл циклогексана, присоединяя промывные растворы к предыдущим фильтратам. Объем раствора в мерной колбе доводят циклогексаном до метки и перемешивают (раствор 1).

0.5 мл раствора 1 помещают в круглодонную колбу вместимостью 10 мл прибавляют 0.5 мл эфира, 5 мл метанола и при непрерывном перемешивании прибавляют 0.1 мл ацетила хлористого. К колбе присоединяют обратный холодильник и нагревают при температуре 65-75⁰С в течение 20 мин. Потом раствор выпаривают в токе инертного газа до остаточного объема около 0.25 мл, прибавляют 1.0 мл циклогексана и 0.5 мл воды очищенной. Смесь взбалтывают и выдерживают до полного разделения слоев. Используют верхний (циклогексановый) слой.

Раствор сравнения. По 0.20 г капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой и миристиновой кислот помещают в коническую колбу и растворяют в 10 мл метиленхлорида.

0.5 мл полученного раствора помещают в круглодонную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 5 мл метанола и при непрерывном перемешивании прибавляют 0.1 мл ацетила хлористого. К колбе присоединяют обратный холодильник и нагревают при температуре 65-75⁰С в течение 20 мин. Затем раствор испаряют в токе инертного газа до остаточного объема около 0.25 мл, прибавляют 1.0 мл циклогексана и 0.5 мл воды очищенной. Смесь взбалтывают и выдерживают до полного разделения слоев. Используют верхний (циклогексановый) слой. Срок годности раствора 1 мес при температуре не выше +5⁰С.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором при следующих условиях:

- колонка капиллярная кварцевая размером 25м x 0.20 мм;
- неподвижная фаза – SE-54 с толщиной слоя 0.25 мкм или аналогичная для которой выполняются требования теста "Проверка пригодности хроматографической системы";
- температура колонки – 170⁰С;
- температура испарителя – 220⁰С;
- температура детектора – 220⁰С;
- скорость газа-носителя (азот) – 0.85 мл/хв;
- коэффициент разделения потока 1:100.

Хроматографируют по 1 мкл раствора сравнения, получая не менее 5 хроматограмм.

Содержание каждой из жирных кислот в препарате, в процентах (X), вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_i * 100}{\sum S_i}$$

где S_i – среднее значение площадей пиков соответствующих кислот, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

∑S_i – среднее значение суммы площадей всех пиков, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора.

2.4.4 Количественное определение полифенолов

Количественное определение фенолов. Около 1 г мелко измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 50 мл и добавляют 30 мл этилового спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают при умеренном кипении на кипящей водяной бане. После охлаждения экстракт сливают через складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют в тех же условиях. Экстракт в колбе доводят до метки тем же растворителем. Аликвотную часть полученного экстракта (0,1-0,5 мл) доводят водой до 7 мл в градуированной пробирке с притертой пробкой. Смесь хорошо перемешивают и добавляют 0,5 мл реактива Фолина-Дениса. После перемешивания в течение 3 мин к смеси добавляют 1 мл насыщенного раствора карбоната натрия, затем хорошо перемешивают и оставляют на 40 мин. Измеряют оптическую плотность в кювете 1 см при 725 нм. В качестве контроля используют воду с реагентом (9,5 мл+0,5 мл реагента).

Расчет проводят по калибровочной кривой, построенной для известного фенола (пирокатехин), М 110; концентрация 1x10⁻⁴ моль/л или 1,10 мг в 100 мл воды (0,5;1,0;1,5;2,0;2,5;3,0 мл).

Примечание. Приготовление реактива Фолина-Дениса: 100 г NaWO х 2 Н₂О, 20 г фосфорномолибденовой кислоты, 750 мл воды кипятят 2 часа в колбе с обратным холодильником и доводят объем до 1000 мл.

Количественное определение полифенолов. Около 2 г (точная навеска) измельченного растительного сырья помещают в коническую колбу вместимостью

100 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной и кипятят содержимое на водяной бане в течение 2 часов. Смесь охлаждают, фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают.

5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл раствора кислоты вольфраматофосфорной, доводят объем 15% раствором натрия карбоната до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора через 2-3 мин после прибавления последнего реактива при длине волны 715 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду очищенную.

Параллельно измеряют оптическую плотность СО пирогаллола точно через 2 минуты после прибавления последнего реактива и в течение 15 минут после растворения пирогаллола.

Содержание суммы полифенолов (X) в процентах в пересчете на пирогаллол, вычисляют по формуле:

$$\frac{D_1 * m_0 * 100 * [25] * 50 * 5 * 5 * 100 * [100]}{D_0 * m_1 * [5] * 5 * 100 * 100 * 50 * [(100 - W)]}$$

где: D_1 – оптическая плотность анализируемого раствора при длине волны 715 нм;

D_0 – оптическая плотность раствора СО пирогаллола при длине волны 715 нм;

m_1 – масса измельченного лекарственного растительного сырья в граммах;

m_0 – масса навески СО пирогаллола, равная 0.05 грамм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Примечания: Приготовление раствора СО пирогаллола: 0,05 г (точная навеска) пирогаллола высшей очистки помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл раствора кислоты вольфраматофосфорной, перемешивают, доводят объем до метки 15% раствором натрия карбоната, перемешивают. Растворы готовят в защищенном от света месте.

Приготовление раствора кислоты вольфраматофосфорной: К 10 г натрия вольфрамата прибавляют 8 мл кислоты фосфорной 85%, 75 мл воды очищенной и нагревают в течение 3 часов с воздушным холодильником. Затем охлаждают, доводят объем водой очищенной до 100 мл и перемешивают.

В качестве СО может быть использован любой фенол или фенолокислота, аналогичные содержащимся в сырье.

Количественное определение дубильных веществ.

Перманганатометрический метод. Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито диаметром 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой воды до кипения и кипятят с обратным холодильником на электроплитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и

процеживают 100 мл в коническую колбу вместимостью 200- 250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Затем отбирают пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую коническую колбу вместимостью 750 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл индигокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0,02 моль/л) до золотистого цвета. Параллельно проводят контрольный опыт. 1 мл раствора перманганата калия соответствует 0,004157 г дубильным веществам в пересчете на танин.

Содержание дубильных веществ (X) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) * 0.004157 * 250 * 100 * 100}{M * 25 * (100 - W)},$$

где: V_1 – объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л) израсходованного на титрование извлечения в мл;

V_2 – объем раствора перманганата калия, израсходованного на титрование в контрольном опыте в мл;

m – масса в граммах;

250 – общий объем извлечения в мл;

25 – объем извлечения, взятого на титрование в мл;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Комплексометрический метод. Около 0,2 г (точная навеска) сухого экстракта, тщательно растертого помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте этиловом 30% при периодическом помешивании, доводят объем раствора спиртом этиловым 30% до метки и перемешивают. Отбирают из мерной колбы 10 мл извлечения, помещают в пробирку для центрифугирования, прибавляют 10 мл реактива осаждения, смесь перемешивают стеклянной палочкой, палочку промывают 5 мл воды очищенной, которую прибавляют к основной смеси. Через 30 мин смесь центрифугируют с частотой вращения 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, к осадку в пробирке прибавляют 20 мл 0,025 % раствора аммиака, содержимое размешивают стеклянной палочкой, которую промывают 5 мл 0,025 % раствора аммиака, прибавляя его к основной массе и центрифугируют при тех же условиях.

После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, осадок в пробирке растворяют в 3 мл 30 % уксусной кислоты, количественно переносят в колбу вместимостью 250 мл с помощью 80-100 мл воды очищенной, нейтрализуют 25 мл 5% раствора натрия гидрокарбоната, прибавляют 0,5 мл индикатора ксиленолового-оранжевого и титруют 0,01 М раствором динатриевой соли ЭДТА до желтого окрашивания. Содержание танина, в процентах, в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,0013 * K * V * 100 * 100 * 100}{10 * m * (100 - b)}$$

где: 0,0013 – количество танина, соответствующего 1 мл 0,01 М раствора динатриевой соли ЭДТА в граммах;

K – поправочный коэффициент к молярности 0,01 М раствора динатриевой соли ЭДТА;

V – расход раствора динатриевой соли ЭДТА в мл;

m – масса навески сырья в граммах»;

b – потеря в массе при высушивании в процентах.

Примечания: Приготовление 5 % раствора натрия гидрокарбоната. 50 г натрия гидрокарбоната помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют при слабом нагревании в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Приготовление реактива осаждения. 1 г цинка окиси, взвешенного с точностью до 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси 10 мл аммония гидроксида концентрированного с 2,5 г аммония хлористого, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Срок годности раствора 7 сут.

Приготовление 0,01М раствора динатриевой соли ЭДТА. 3,9 г динатриевой соли ЭДТА, взвешенного с точностью до 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 250 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Срок годности раствора 1 мес.

Приготовление ацетатного буферного раствора pH 5,5. 60 г натрия ацетата растворяют в 250 мл воды очищенной, прибавляют 10 мл 30 % раствора кислоты уксусной, доводят объем раствора водой очищенной до 1000 мл и перемешивают. Срок годности раствора 7 сут.

Приготовление 0,01 М раствора цинка. Около 0,3 г (точная навеска) цинка металлического помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 5 мл 16 % раствора кислоты серной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Установка титра 0,01 М раствора динатриевой соли ЭДТА. 5 мл (точный объем) 0,01 М раствора цинка помещают в колбу вместимостью 250 мл, содержащую 100 мл воды очищенной, прибавляют 0,5 мл раствора ксиленолового оранжевого и нейтрализуют по каплям 5 % раствором натрия гидрокарбоната до появления красно-фиолетового окрашивания. Затем прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора pH 5,5 и титруют из микробюретки 0,01М раствором динатриевой соли ЭДТА до изменения красно-фиолетовой окраски раствора в желтую.

Поправочный коэффициент к молярности (K) вычисляют по формуле:

$$K = \frac{5 * m}{500 * 0,0006538 * V}$$

где: m – масса навески цинка в граммах;

V – объем 0,01 М раствора динатриевой соли ЭДТА, израсходованный на титрование, в миллилитрах,

0,0006538 количество цинка, соответствующего 1 мл 0,01 М раствора динатриевой соли ЭДТА, в граммах.

Приготовление 0,025 % раствора аммония гидроксида. 1 мл аммония гидроксида концентрированного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 20 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл и титруют 0,1М кислотой хлороводородной (индикатор – метиловый оранжевый). 1 мл 0,1 М кислоты хлороводородной соответствует 0,001703 г NH₃ (аммиака).

Количественное определение флавоноидов.

Метод А. Водно-спиртовой экстракт исследуемого растения концентрируют для удаления спирта, полученный водный раствор помещают в делительную воронку и прибавляют *этилацетат*. Смесь отстаивают в течение 30 мин до полного разделения слоев растворителей. Верхний (этилацетатный) слой фильтруют в плоскодонную колбу через фильтр “белая лента”, на который предварительно помещают безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют трижды порциями по 20, 15 и 15 мл *этилацетата*, собирая этилацетатные извлечения в ту же колбу. В конце фильтр промывают *этилацетатом*. Этилацетатные извлечения концентрируют под вакуумом на водяной бане досуха. Остаток количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл *96 % спиртом* порциями по 3 мл (при необходимости нагревают), доводят *96 % спиртом* до метки и перемешивают (*раствор 1*). 2 мл раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 3 мл раствора 50 г/л *алюминия хлорида Р* в *96 % спирте Р*, нагревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора *96 % спиртом Р* до метки и перемешивают (*испытуемый раствор (а)*). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора (а) на спектрофотометре при длине волны от 350 нм до 500 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве контрольного раствора компенсационный раствор. Ультрафиолетовый спектр поглощения испытуемого раствора (а) в области от 350 нм до 500 нм, должен иметь максимум поглощения при длине волны (410±2) нм (*флавоноиды*).

Примечание. Приготовление компенсационного раствора. 2 мл раствора 1, приготовленного для получения испытуемого раствора (а), помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 3 мл *96 % спирта*, нагревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора *96 % спиртом* до метки и перемешивают.

Метод Б. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90% спирта, содержащего 1% концентрированной кислоты хлороводородной. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом. Извлечения объединяют, фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, промывают фильтр 90% спиртом и доводят объем фильтрата 90% спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 1 мл 1% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного до метки 95% спиртом в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{764 \cdot 6 \cdot M \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где: D – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 430 нм;
764.6 – удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с 1% раствором алюминия хлорида при длине волны 430 нм;

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.4.5 Количественное определение углеводов

Метод А. Определение восстанавливающих моносахаридов, входящих в состав полисахаридов подорожника.

25.0 мл препарата помещают в химический стакан, прибавляют 15 мл воды P, 120 мл 96 % спирта, перемешивают и нагревают в водяной бане при температуре 30 °С в течение 5 мин. Через 1 ч содержимое стакана перемешивают стеклянной палочкой, переливают в две центрифужные пластмассовые пробирки поровну и центрифугируют со скоростью вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок, который остался на дне пробирок, количественно переносят с помощью 25 мл смеси 96 % спирт P – вода P (3 : 1) на этот же фильтр ПОР 16 и последовательно промывают его 25 мл смеси 96 % спирт P – вода P (3 : 1), 10 мл ацетона P и 10 мл этилацетата P. Осадок количественно переносят в коническую колбу со шлифом вместимостью 25 мл с помощью 10 мл кислоты хлороводородной разбавленной P (два раза по 3 мл, сливая ее через верх фильтра

и два раза по 2 мл, пропуская ее через фильтр в колбу). Колбу с содержимым закрывают стеклянной пробкой, помещают в сушильный шкаф и нагревают при температуре от 100 °С до 105 °С в течение 1ч. Содержимое колбы охлаждают, помещают в колбу кусочек бумаги конго красной и нейтрализуют последовательно раствором натрия гидроксида концентрированного *P* до покраснения бумаги, потом кислотой хлороводородной разбавленной *P* до посинения бумаги, а потом раствором натрия гидроксида разбавленного *P* до покраснения бумаги и фильтруют через бумажный фильтр “синяя лента” в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой *P* до метки и перемешивают (А).

В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл раствора кислоты пикриновой *P*, 3 мл раствора 200 г/л натрия карбоната безводного *P*, 1 мл раствора А и нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Содержимое колбы охлаждают, количественно переносят водой *P* в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой *P* до метки и перемешивают (испытываемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора сравнения на спектрофотометре при длине волны 460 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя компенсационный раствор.

Содержание восстанавливающих моносахаридов (X), в пересчете на глюкозу, в препарате, в процентах, вычисляют по формуле:

Содержание восстанавливающих моносахаридов (X), в пересчете на глюкозу, в препарате, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 * m_0 * 50 * 25 * 10 * 1 * 100}{D_0 * 25 * 1 * 100 * 25 * 25} = \frac{D_1 * m_0 * 0.8}{D_0}$$

где: D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора сравнения;

m_0 – масса навески СО глюкозы в граммах.

Примечания: Приготовление раствора сравнения (а). 0,14 г глюкозы (ГФ РК I, т. 1, с. 360), предварительно высушенной при температуре от 100 °С до 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде *P*, доводят объем раствора водой *P* до метки и перемешивают.

10.0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25.0 мл, доводят объем раствора водой *P* до метки и перемешивают. Срок хранения раствора 10 суток.

К 1 мл раствора кислоты пикриновой *P* прибавляют 3 мл раствора 200 г/л натрия карбоната безводного *P*, 1 мл раствора сравнения и нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, переносят количественно водой *P* в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой *P* до метки и перемешивают.

Приготовление компенсационного раствора. К 1 мл раствора кислоты пикриновой *P* прибавляют 3 мл раствора 200 г/л натрия карбоната безводного *P* и 1 мл воды *P*, нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, переносят количественно водой *P* в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой *P* до метки и перемешивают.

Метод Б. Навеска сырья (точная) около 2 г помещают в мерную колбу на 100 мл. Добавляют 70-80 мл горячей воды и выдерживают колбу на водяной бане при температуре 80-90⁰С в течение 1 часа. Затем колбу охлаждают. Для осаждения белков прибавляют 5 мл 10% ацетата свинца, перемешивают и доводят до метки. Затем отфильтровывают через бумажный фильтр в сухую колбу. Из полученного фильтрата берут 10 мл и осаждают 100 мл этилового спирта, затем отцентрифугируют. Осадок небольшими порциями воды переносят в мерную колбу на 25 мл, объем в колбе доводят до метки дистиллированной водой, отфильтровывают. После этого, из полученного фильтрата берут 1 мл, прибавляют 1 мл 5% раствора фенола и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают при помощи палочки с пропеллером, оставляют на 30 мин. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 490 нм. Построение стандартной кривой: концентрация глюкозы от 1*10⁻⁵ до 6*10⁻⁵ г/мл. К 1 мл раствора прибавляют 1 мл 5% раствора фенола и 5 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают при помощи палочки с пропеллером, оставляют на 30 мин. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 490 нм.

Содержание углеводов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * 25 * 100}{490 * 1 * 2 * (100 - W)}$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 272 нм;

490 – длина волны;

W – влажность в массе при высушивании сырья в процентах.

Вопросы для самопроверки:

1. Как осуществить оценку количественного содержания аминокислот и карбоновых кислот в лекарственном растительном сырье?
2. Изложите методику определения количественного содержания витаминов в ЛРС?
3. Определение количественного содержания полифенолов в ЛРС?
4. Как осуществить оценку количественного содержания углеводов в лекарственном растительном сырье?

Таким образом, для оформления нормативных документов на лекарственное растительное сырье, предназначенного для промышленной переработки, необходимо выполнить весь вышеизложенный алгоритм действий, оформить полученные результаты в виде Временного аналитического нормативного документа, других требуемых документов, оформить регистрационное досье для его экспертизы и утверждения в Министерстве здравоохранения РК.

На корни и надземную часть растений вида кермек Гмелина, надземную часть верблюжьей колючки и гребенщика щетинистоволового, которые исследуются на кафедре, в МЗ РК утверждены нормативные документы и получены регистрационные

удостоверения. Полученные разрешения позволяют использовать указанные растения в медицине в виде порошков, чаев настоек, а также для получения на их основе субстанций и различных лекарственных препаратов в виде различных лекарственных форм.

В приложении А представлены монографии на корни и надземную часть растений вида кермек Гмелина, опубликованные в ГФ РК.

3 ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ КОРНЕЙ КЕРМЕКА ГМЕЛИНА. РАЗРАБОТКА НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ

В настоящем третьем разделе будут рассмотрены вопросы технологии переработки лекарственного растительного сырья, которое по всем показателям соответствует требованиям надлежащей производственной практики [25, 26].

3.1 Степень измельчения перерабатываемого лекарственного растительного сырья

При промышленной переработке лекарственного растительного сырья одним из определяющих факторов является размер его частиц. Для определения степени измельчения растительного сырья проводят ситовой анализ с помощью сит, используемых для анализа лекарственного сырья по общепринятой методике. Аналитическую пробу сырья помещают на сито с размером отверстий, указанным в частной статье, и просеивают, не допуская при этом его дополнительного измельчения. Если количество сырья, прошедшего сквозь сито при дополнительном просеве в течение 1 мин, составляет менее 1 % сырья, оставшегося на сите, то просеивание измельчённых частей считают законченным. Для цельного сырья частицы, прошедшие сквозь сито, взвешивают и вычисляют их содержание в процентах. В случае просеивания резаного, дроблёного, порошкообразного сырья используют 2 сита. Аналитическую пробу сырья помещают на верхнее сито и просеивают. Затем отдельно взвешивают сырьё, оставшееся на верхнем сите и прошедшее сквозь нижнее сито, и вычисляют содержание частиц, в процентах, не прошедших сквозь верхнее сито, и частиц, прошедших сквозь нижнее сито. Взвешивание проводят с погрешностью ± 0.1 г при массе аналитической пробы свыше 100 г и ± 0.05 г при массе аналитической пробы 100 г и менее.

Допустимая норма содержания измельчённых частиц для каждого вида сырья должна быть указана в соответствующей частной статье. В соответствии с полученными экспериментальными данными при установлении оптимальных условий выделения субстанций из корней *L. gmelinii*, промышленном получении субстанции «Лимонидин» и настойки «Лимонидин» из корней *L. gmelinii* использовалось измельченное сырьё с размером частиц не более 3,0 мм. При более интенсивном измельчении сырья с получением более мелких частиц может произойти закупорка центров фильтрации нутч-фильтров (закупорка пор любых других фильтрующих поверхностей), что затруднит процесс фильтрации и усложнит технологический процесс. При увеличении размера частиц более 3,0 мм не будет достигнут высокий выход выделяемого комплекса биологических активных веществ из них при их экстракции.

**3.2 Разработка и оптимизация технологии выделения
из корней кермека Гмелина субстанции
в виде сухого экстракта и ее стандартизация.
Разработка нормативной документации**

При производстве растительных субстанций, выделяемых в виде жидких, густых или сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья, определяющими факторами являются продолжительность экстракций и их число, обеспечивающие полноту извлечения биологически активных веществ из сырья, а в равновесных способах равновесие в системе твердое тело-жидкость. Продолжительность экстракций зависит от ряда факторов, основными из которых являются размер частиц сырья, температура, природа и объём используемого растворителя.

При промышленной обработке растений вида кермек Гмелина, как было показано выше, используется сырьё размером не более 3,0 мм. Именно при такой измельченности исходного сырья в нем сохраняется клеточная структура и преобладают диффузионные процессы, а полученная вытяжка содержит меньше механических примесей и легче очищается. При экстракции вначале происходит смачивание и набухание сырья, затем извлечение экстрагируемых веществ. Настаивание сырья с растворителем проводится до уравнивания количества веществ, переходящих из сырья в экстрагент и из полученного извлечения в сырьё в единицу времени, т.е. до достижения динамического равновесия между ними.

Наиболее приемлемыми растворителями, обеспечивающими максимальное извлечение полифенолов и других БАВ из растительного сырья, являются спирт, ацетон и их водные растворы в различных концентрациях. Именно поэтому эти растворители использовались в качестве экстрагентов для получения субстанций в виде сухих экстрактов из исследуемых объектов (таблица 11). Во всех вариантах процесса экстракции параметром оптимизации служила количественная оценка выделяемой субстанции.

Таблица 11 – Выход субстанций (%), выделяемых из надземной части (н.ч.) и корней видов растений кермек Гмелина, при использовании различных экстрагентов

Экстрагенты	кермек Гмелина		Экстрагенты	кермек Гмелина	
	н.ч.	корни		н.ч.	корни
10% EtOH	17,24	20,64	10% ацетон	23,0	20,21
20% EtOH	23,96	28,1	20% ацетон	24,3	27,46
30% EtOH	26,26	32,03	30% ацетон	26,93	30,61
40% EtOH	30,24	34,76	40% ацетон	29,88	34,83
50% EtOH	31,12	35,69	50% ацетон	31,35	35,8
60% EtOH	29,84	35,36	60% ацетон	30,88	35,41
70% EtOH	30,46	34,54	70% ацетон	30,44	34,62
80% EtOH	25,34	29,07	80% ацетон	26,33	29,71
96% EtOH	19,5	22,38	90% ацетон	20,53	24,0

В эксперименте установлено, что наиболее подходящими растворителями, извлекающими наибольшую сумму экстрактивных веществ из исследуемых растений, являются этиловый спирт (40-70%) и водный раствор ацетона (40-60%). Максимальное же их извлечение достигается при использовании в качестве экстрагента 50% этилового спирта и 50% ацетона.

Из отобранных в эксперименте двух экстрагентов был выбран 50% этиловый спирт, так как он отличается от 50% ацетона, прежде всего, своей значительно меньшей токсичностью для организма, а также и стоимостью, что обуславливает, в свою очередь, экономическую и экологическую выгодность его применения.

Кроме того, применение 50% этилового спирта для экстракции лекарственного растительного сырья в отличие от 50% ацетона не требует определения остаточных количеств растворителя в субстанциях, получаемых в виде сухих экстрактов, при их стандартизации для составления нормативной документации и регистрационного досье. Выбор данного экстрагента для растений рода кермек был правилен и с учетом данных, полученных при определении антиоксидантной активности их различных экстрактов в Институте химии, Карачи, Пакистан (рисунок 49, образцы Zh-1, Zh-2, Zh-3, Zh-4).

Как видно из данных, представленных на рисунке 49, антиоксидантная активность субстанции (условное обозначение Zh-2), полученной при экстрагировании корней растений вида *L. gmelinii* 50% этиловым спиртом, выше, чем таковая для субстанции (Zh-1), извлеченной из этого же вида сырья 50% ацетоном. Установлено также, что до извлечения субстанций из рассматриваемых объектов нет необходимости в их предварительной обработке хлороформом, традиционно используемым для обезжиривания растительного сырья и увеличения суммарного выхода конечных целевых продуктов. Обработка хлороформом, наоборот, снижала антиоксидантную активность комплекса БАВ (Zh-3) данного сырья, так как, по-видимому, с ним удалялись гидрофобные биологически активные соединения. В хлороформный экстракт исследуемых растений экстрагируются такие биологически активные вещества как каротиноиды, хлорофиллы, насыщенные и ненасыщенные (полиеновые) карбоновые кислоты жирного ряда и другие. Каждый из перечисленных классов органических соединений вносит свой вклад в фармакологическую активность выделяемой субстанции и поэтому, конечно же, они должны были оставаться в ней. Данный факт существенен также и с экономической и с экологической точек зрения, так как свидетельствует об упрощении технологического процесса производства субстанций на одну стадию и исключения при этом из применения токсичного растворителя хлороформа. Показано, что антиоксидантная активность субстанции, выделенной из надземной части *L. gmelinii* при ее экстракции 50% этиловым спиртом (Zh-4), практически одинакова с таковой для корней (Zh-2), что делает возможным использование этих растений в целом для получения на их основе субстанций.

Следующим этапом оптимизации получения субстанций из исследуемых видов растительного сырья было выяснение оптимального соотношения сырья и выбранного в эксперименте экстрагента.

International Center for Chemical Sciences
HEJ Research Institute of Chemistry
University of Karachi

Results of the Antioxidative Assays

DPPH RADICAL SCAVENGING
 ANTIOXIDANT ASSAY

Date: 20-7-20

Serial No.	Group No.	Code of Sample	Conc. (mM)	(%Inhibition)
1.		PA-1	200 µg/ml	-
2.		LR-1	200 µg/ml	95.00%
3.		DK-6	200 µg/ml	94.21%
4.		DK-2	200 µg/ml	-
5.		Zh-2	200 µg/ml	96.11%
6.		Zh-4	200 µg/ml	95.24%
7.		Zh-3	200 µg/ml	90.67%
8.		Zh-1	200 µg/ml	92.13%
9.		KH-1	200 µg/ml	93.67%
Standard	31	Propyl gallate	200 µg/ml	94.12%

Key:- QNS = Quantity not sufficient PPT = Precipitation of sample - = Activation

All samples showed significant antioxidant activity against 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) except PA-1 and DK-2. These two samples were completely inactive.

Conducted by Talat Makhmoor Submitted by Alfira

Supervised by Dr. M. Iqbal Choudhary For Abdul

These studies are done on collaborative basis and data will be reported in joint publications.

Рис. 49. Данные антиоксидантной активности ряда субстанций, выделенных на кафедре из различных дикорастущих растений, в том числе и из растений кермек

Известно, что движущей силой массопереноса является разность концентраций веществ внутри и вне растительной клетки. Очевидно, что при неизменном количестве растительного материала, чем больше экстрагента будет участвовать в экстракционном процессе, тем больше вещества будет растворено и вынесено за пределы клетки в межклеточное пространство. Вместе с тем, увеличение количества экстрагента приведет к уменьшению концентрации БАВ в экстракте, поэтому оно не может быть бесконечным [25, 26]. В силу этого, при определении оптимального объема выбранного экстрагента, изменяли соотношение сырья и экстрагента от 1:3 до 1:12. При этом постоянными факторами процесса экстракции были: масса сырья (50 г), время экстракции (24 часа) и температура 20-23 °C (таблица 12). Через каждые 0,5 часа экстракции в течение 5 минут проводили интенсивное перемешивание экстрагируемого растительного сырья. Из данных таблицы 12 следует, что при использовании выбранного экстрагента наибольшее извлечение экстрактивных веществ из исследуемых объектов возможно при соотношении сырье-экстрагент от 1:5 до 1:8, тогда как изменение этого соотношения в меньшую или большую сторону существенно снижает их выход. Так как максимальное извлечение

субстанции наблюдается при использовании шестикратного избытка экстрагента (1:6) для экстракции корней всех видов сырья и восьмикратного для их надземной части (1:8), то эти соотношения и были взяты за основу для их экстрагирования.

Таблица 12 – Выход субстанций (%), выделяемых из растений вида кермек Гмелина, в зависимости от соотношения «сырье-экстрагент»

Кермек Гмелина	Соотношение сырья (г) и экстрагента (мл)								
	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8	1:9	1:10	1:12
Надземная часть	16,33	22,92	28,32	30,2	30,97	31,12	28,71	24,04	20,35
Корни	19,13	25,63	30,2	35,69	34,92	34,47	32,13	27,86	23,58

Известно, что на первой стадии экстрагирование из обезвоженного сырья с клеточной структурой начинается с проникновения экстрагента в материал, смачивания веществ, находящихся внутри клетки, растворения и десорбции их. Далее следует молекулярный перенос растворенных веществ вначале в экстрагент, находящийся в межклеточном пространстве, затем в экстрагент, заполняющий микро- и макротрещины, и, наконец, на поверхность кусочков материала. В связи с этим, было изучено оптимальное время экстракции, необходимое для максимального извлечения субстанции из сырья и оно варьировалось от 1 до 72 часов (таблица 13).

Таблица 13 – Выход субстанций (%), выделяемых из надземной части (н.ч.) и корней растений вида кермек Гмелина, в зависимости от времени процесса экстракции

Время	Кермек Гмелина		Время	Кермек Гмелина	
	н.ч.	корни		н.ч.	корни
1	16,51	20,45	8	29,7	34,43
2	25,1	28,02	10	29,35	32,87
3	28,6	30,55	14	28,86	32,24
4	30,6	33,62	18	27,91	30,26
5	31,12	35,69	20	27,2	30,09
6	30,54	35,43	48	25,03	27,12
7	29,98	34,67	72	29,7	25,37

При этом другие параметры экстракции были неизменными: масса сырья (50 г), объем экстрагента (300 мл для корней, 400 мл для надземной части), температура экстракции (20-23°C). Как следует из данных таблицы 13, наиболее интенсивное извлечение экстрактивных веществ происходит за первые 3 часа экстракции, а их максимальное содержание достигается в течение 5-7 часов. При дальнейшей экстракции перехода экстрактивных веществ в экстрагент не наблюдается. Учитывая полученные данные, а также сменность на производстве, было выбрано 5-и или 6-и часовое время экстракции для исследуемых видов сырья.

Далее необходимо было рассмотреть влияние температуры реакции на процесс максимального извлечения экстрагируемых веществ из растительных объектов. Температурный режим процесса экстракции изменяли от 20-25°C до 60°C (таблица 14)

при постоянстве всех других параметров: массы сырья (50 г), объема растворителя (300 мл для корней, 400 мл для надземной части) и времени экстракции (5 часов). Как видно из данных таблицы 14, количество экстрактивных веществ увеличивается с повышением температуры до 50 °С, но это изменение было незначительным при сравнении с таковым при температуре 20-23 °С. Начиная с 50 °С, наблюдается тенденция его снижения, что, по-видимому, связано с экстрагированием наряду с целевыми соединениями балластных веществ из растительного сырья или же возможным осмолении выделяемых олигосахаридов и восстановленных форм флавоноидов.

Таблица 14 – Выход субстанций (%), выделяемых из растений вида кермек Гмелина, в зависимости от температуры процесса экстракции

Кермек Гмелина	Температурный режим экстракции, °С				
	23-25	30	40	50	60
Надземная часть	31,12	31,66	31,77	31,91	30,94
Корни	35,69	37,47	37,77	38,0	35,35

При проведении экстракции сырья путем его настаивания без использования интенсифицирующих этот процесс факторов, ее скорость обеспечивается только скоростью молекулярной диффузии внутри кусочков растительного материала. Диффузионный поток возникает при этом за счет кинетической энергии молекул диффундируемого вещества. Кроме того, большой слой неподвижного экстрагента может тормозить процесс массопереноса в жидкой фазе. В связи с этим была проведена серия опытов по установлению влияния периодического перемешивания сырья на полноту его экстракции при постоянстве массы сырья, его соотношения с экстрагентом, времени и температуры экстракции (таблица 15).

Таблица 15 – Выход субстанций (%), выделяемых из растений вида кермек Гмелина, в зависимости от режима экстракции

Кермек Гмелина	Сумма экстрактивных веществ, %	
	С перемешиванием	Без перемешивания
Надземная часть	31,12	17,44
Корни	35,69	19,7

Из данных таблицы 15 следует, что периодическое перемешивание сырья интенсифицирует процесс экстракции всех исследуемых объектов и при этом количество извлекаемой суммы экстрактивных веществ увеличивается.

В силу своей поглощающей способности, сырье удерживает часть экстрагента внутри клеток, на своей поверхности и между кусочками сырья. Концентрация экстрагируемых веществ в нем будет равна концентрации их в слитом экстракте, т.е. не все извлеченные вещества из растений перейдут в соответствующий экстракт.

В связи с вышесказанным, при производстве экстрактов необходимо было установить возможное число экстракций, требуемых для максимального истощения сырья (таблица 16).

Таблица 16 – Выход субстанций (%), выделяемых из растений вида кермек Гмелина, в зависимости от числа экстракций

Кермек Гмелина	Сумма экстрактивных веществ, %		
	1 экстракция	2 экстракция	3 экстракция
Надземная часть	31,25	11,27	3,95
Корни	36,09	15,56	4,42

Как следует из данных таблицы 16, экстракция должна быть проведена дважды, так как именно двукратность, как показал эксперимент, способствует максимальному извлечению комплекса БАВ из сырья. Результаты анализа на количественное содержание дубильных веществ в третьем экстракте показали их достаточно содержание в нем, несмотря на низкое содержание суммы экстрактивных веществ. Исходя из этого, для более полного извлечения экстрактивных веществ из сырья целесообразно было извлечь экстрагент, остающийся внутри клеток, на их поверхности и между кусочками сырья. Для этого к остатку сырья, полученному после его двукратного экстрагирования, прибавляли воду очищенную, тщательно перемешивали содержимое в течение 15-30 минут и затем фильтровали. Водный фильтрат, содержащий относительно невысокое количество экстрактивных и действующих веществ, нецелесообразно присоединять к первым двум экстрактам из-за возможного их сильного разбавления и в соответствии с этим усложнения технологического процесса выделения субстанции из сырья. Полагая, что полученный водный экстракт можно будет использовать в производственных условиях для приготовления экстрагента при получении нескольких партий одной и той же субстанции или же для производства настойки «Лимонидин» из корней кермека Гмелина, данная стадия была введена в промышленные регламенты их производства. Анализируя вышеприведенные условия экстракции, была отработана оптимальная методика выделения субстанции из растений вида кермек Гмелина: масса сырья (50 г), объем экстрагента (300 мл для корней, 400 мл для надземной части), температура экстракции (20-23 °С), время экстракции – 5 часов при периодическом перемешивании сырья.

Таким образом, оптимальными условиями извлечения комплекса БАВ из исследуемых растений рода кермек являются пятичасовая двукратная их экстракция шестикратным избытком 50% этилового спирта (для корней) и восьмикратным (для надземной части) при температуре 20-23 °С и последующее их промывание водой для удаления остатков экстракта. Первый и второй экстракты каждого вида сырья объединяли, концентрировали до сухого состояния в мягких условиях (водяная баня, температура 30-45°С, вакуум) с получением соответствующих субстанций в виде сухих экстрактов. Полученная методика была стандартизирована на основе сходимости в пяти ее повторениях. После получения субстанций был установлен их химический состав с определением качественного и количественного содержания основных групп БАВ в них, их выделением, разделением и идентификацией. Для установления биологической активности выделенных субстанций осуществлялся их скрининг на антиоксидантную, антимикробную и противовирусную активности. После первичного испытания фитопрепаратов на эти виды активности для расширенных доклинических исследований

была рекомендована субстанция, именуемая в дальнейшем как субстанция «Лимонидин», полученная из корней кермека Гмелина. Доклинические исследования данной субстанции подтвердили первичный прогноз и показали ее высокие антиоксидантные, гепатопротекторные, антимикробные, антимутагенные и противовирусные свойства, а также способность к улучшению иммунного статуса организма. Установлено также, что «Лимонидин» является активным модификатором метаболических нарушений опухоли и тканей организма опухоленосителей, смещает окислительно-восстановительный процесс в сторону образования пировиноградной кислоты, тем самым, повышая потенциальную возможность усиления анаболических процессов.

Субстанция представляет собой кристаллическое вещество с горьковатым, вяжущим вкусом, со слабым специфическим запахом. Форма частиц – анизодиаметрическая кристаллическая структура в виде пластинок, поверхность сложная, разнообразная. Нерастворима в гидрофобных растворителях, растворима в гидрофильных растворителях – диметилсульфоксиде, диметилформамиде, в водных растворах этилового спирта (30 % и 50 %), умеренно растворима в воде при 25 °С, растворима при 40-50 °С и очень легко растворима в воде при температуре 100 °С. Характеризуется низкой сыпучестью за счет сильной гигроскопичности. Смачиваемость – частичная. К поляризации склонны лишь наимельчайшие частицы порошка.

Высокая эффективность субстанции «Лимонидин» объясняется наличием в ней уникального набора полифенолов (фенолокислоты, в основном галловая кислота, окисленные формы флавоноидов, в основном агликон мирицетин и его гликозидные формы, гидролизуемые и конденсированные дубильные вещества), а также витаминов, полиеновых кислот, моно-, олиго- и полисахаридов с доминированием в ней конденсированных дубильных веществ, представленных в субстанции димерными и олигомерными формами флаван-3-олов.

При химическом исследовании субстанции «Лимонидин» были идентифицированы флавонолы (мирицетин, кверцетин, изорамнетин, монометиловый эфир мирицетина и новый флавонол, ранее не описанный в литературе 3,4,5,3',4',6'-гексагидроксиофлаван), их гликозиды (мирицитрин, рутин, 3-β-галактозилкверцетин и 3-β-галактозилмирицетин и другие моно- и биозиды, а также впервые описанные в литературе 3-α-галактопиранозидмирицетин и 3-O-α-L-(2"-галлоил)-арабинопиранозид мирицетин), пирогаллол, галловая и эллаговая кислоты. Основным мономерным флаваном является (-)-эпигаллокатехингаллат, идентифицированы также новые, не описанные в литературе различные формы флаван-3-олов: 3,5,7,3',4',6'-гексагидроксиофлаван, (-)-эпигаллокатехин-(4β→8)-(-)-3,5,7,3',4',6'-гексагидроксиофлаван и (+)-галлокатехин-(4α→8)-[(-)-эпигаллокатехин]₅-(4β→8)-(-)-эпигаллокатехингаллат.

Разработанная лабораторная технология получения субстанции «Лимонидин» была адаптирована к опытно-промышленным условиям АО «Химфарм». Производство субстанции «Лимонидин» из корней растений вида кермек Гмелина осуществляется по простой, экономически и экологически целесообразной технологической схеме с высоким выходом при использовании в качестве эксципиента водного раствора этилового спирта, который генерируется в процессе производства (рисунок 50).

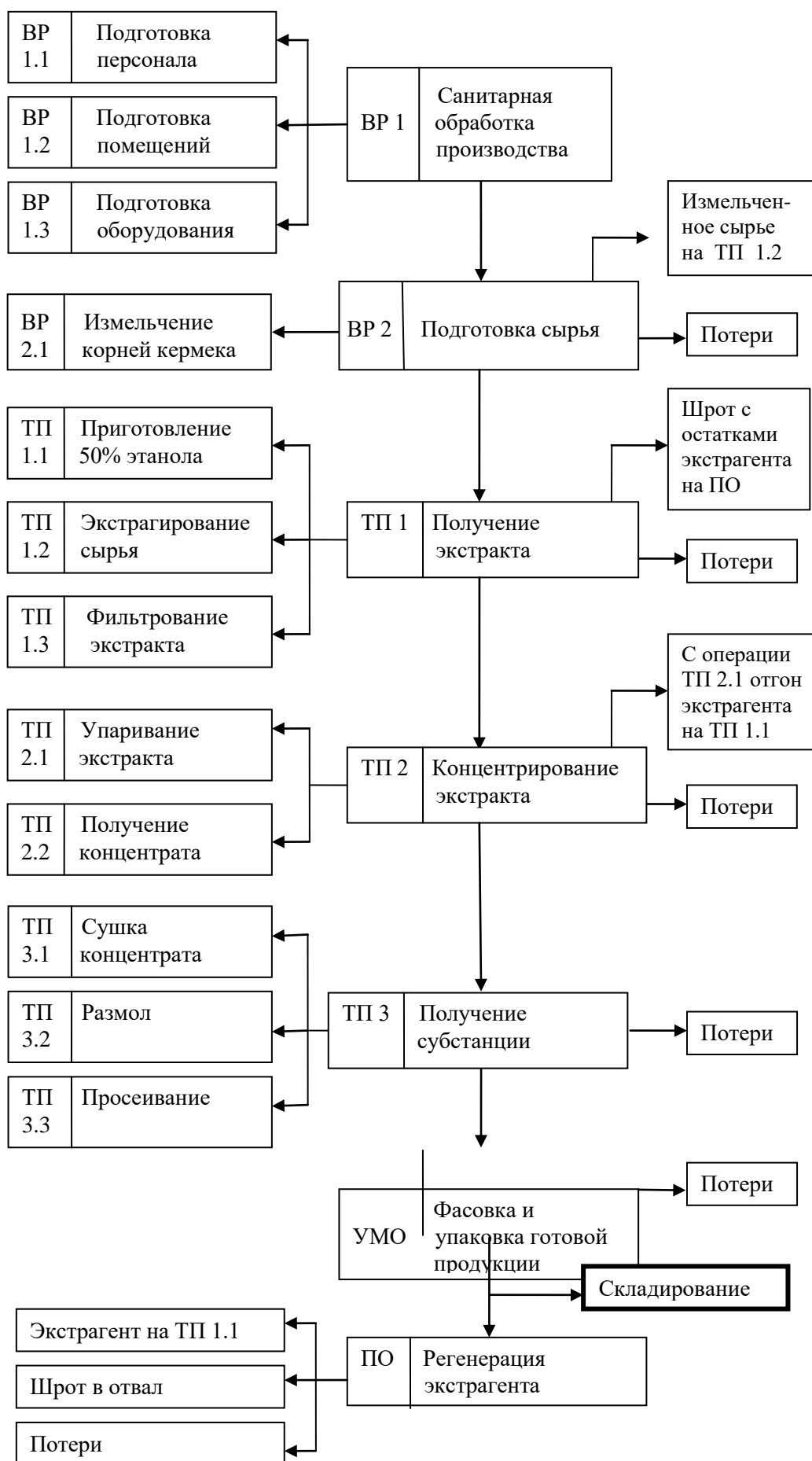


Рис. 50. Технологическая схема производства субстанции Лимонидин

В отработанном лекарственном растительном сырье – шроте, остающемся после двукратного его экстрагирования 50% спиртом и затем промывания водой очищенной, количество дубильных веществ составило около 0,3 %, что свидетельствует о достаточно высокой степени истощения исходного растительного сырья. Шрот, остающийся после извлечения из растительного сырья экстрагируемых веществ и сбрасываемый, как правило, в отвал, как показали проведенные испытания, целесообразно использовать для сохранения яблок и шерсти животных (приложение Д).

3.3 Разработка и создание нового эффективного лекарственного средства в виде настойки из корней кермека Гмелина и ее стандартизация. Разработка нормативной документации

Для приготовления настоек, используемых в настоящее время в медицине, соотношение сырья и этилового спирта составляет 1:5 и 1:10, концентрация этилового спирта 40 % или же 70 %, причем последняя из них является более предпочтительной. Так, в производстве настойки из травы зверобоя, используемый в качестве экстрагента 40 % спирт этиловый, был заменен на 70 %, что привело к улучшению качества получаемой настойки, так как выход дубильных веществ остался на том же уровне, а содержание экстрактивных веществ, осаждаемых в процессе отстоя, резко снизилось.

Определение соотношения различных лекарственных форм, зарегистрированных в Казахстане, было проведено по данным Комитета фармации МЗ РК, публикуемым в журнале «Фармация Казахстана». Установлено, что из общего количества лекарственных препаратов, зарегистрированных на фармацевтическом рынке Казахстана, на долю настоек различного назначения приходится 1,53 %, причем все они являются импортными и воспроизведенными, т.е. генериками (рисунок 51).

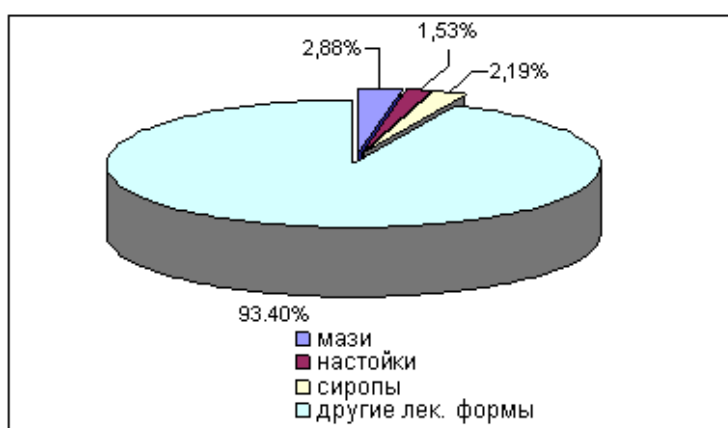
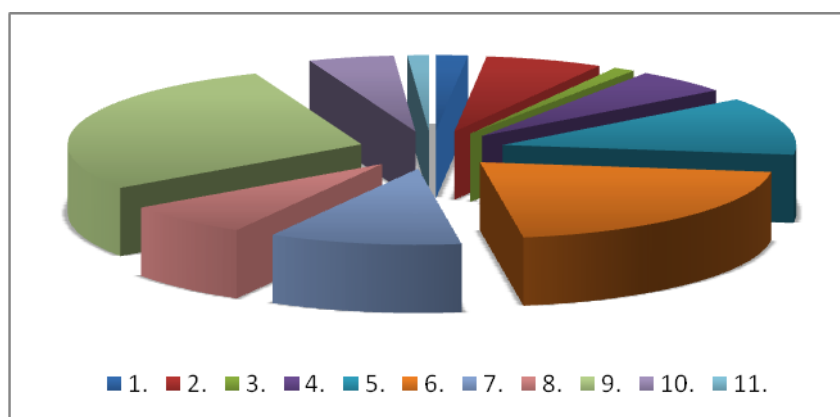


Рис. 51. Соотношение мазей, настоек и сиропов к общему числу лекарственных препаратов, зарегистрированных в Казахстане

Как видно из рисунка 51, процентное соотношение лекарственных настоек составляет менее 2 % от общего количества лекарственных препаратов на фармацевтическом рынке Казахстана.

Зарегистрированные в Казахстане настойки являются настойками широкого спектра действия и классифицируются в зависимости от назначения следующим образом (рис. 52):

- для лечения полости рта (1,76 %);
- для лечения функциональных нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта (6,47 %), печени и желчевыводящих путей (1,18 %), заболеваний сердца (12,35 %);
- для лечения дыхательной системы (4,71 %);
- как тонизирующие (5,29 %), иммуностимулирующие (10,59 %), снотворные и седативные (28,82 %),
- для лечения кожи (20,59 %) и для наружного применения при болевом синдроме при заболеваниях костно-мышечной системы (7,06 %);
- другие препараты (1,18 %).



1. Препараты для лечения полости рта. 2. Препараты для лечения функциональных нарушений со стороны ЖКТ. 3. Препараты для лечения заболеваний печени и желчевыводящих путей. 4. Тонизирующие препараты. 5. Препараты для лечения заболеваний сердца. 6. Препараты для лечения заболеваний кожи. 7. Иммуностимулирующие препараты, 8. Препараты для наружного применения при болевом синдроме при заболеваниях костно-мышечной системы. 9. Снотворные и седативные препараты. 10. Препараты для лечения дыхательной системы. 11. Другие препараты.

Рис. 52. Классификация зарегистрированных в Казахстане настоек по терапевтическому действию

Потребности по Республике Казахстан в новых, экологически чистых, импортозамещающих отечественных настойках противовоспалительного и антимикробного действия растительного происхождения велики в связи с их острой дефицитностью из-за их отсутствия на фармацевтическом рынке Казахстана.

Показатели качества для настоек в соответствии с требованиями ГФ РК: описание, методы ее идентификации, определение массы сухого остатка, относительная ее плотность, содержание спирта этилового, наличие и содержание тяжелых металлов, оценка количественного содержания действующих веществ.

Технологическая схема производства настойки «Лимонидин» противовоспалительного действия приведена на рисунке 53, нормативные документы представлены в приложении Е.

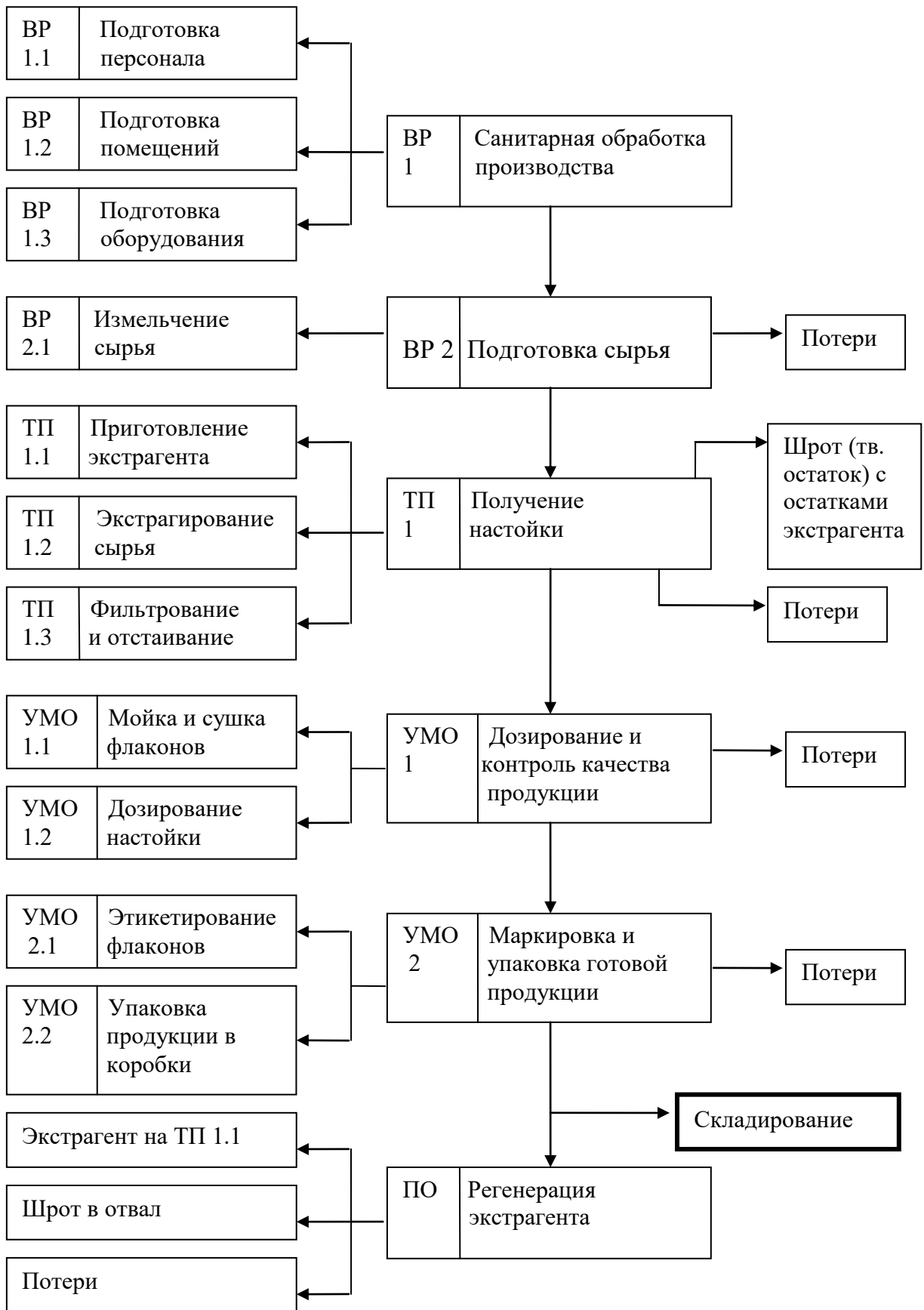


Рис. 53. Технологическая схема производства настойки «Лимонидин»

В настоящее время лечение заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), гастро-эзофагального рефлюкса (ГЭР), гастрита, дуоденита неспецифической этиологии, неязвенной диспепсии является актуальной проблемой, хотя для ее решения имеется ряд медикаментозных препаратов, таких как антациды, H₂-блокаторы гистамина, ингибиторы протонной помпы, а также средства, стимулирующие моторику желудочно-кишечного тракта и другие. Несмотря на их высокую эффективность, данные препараты при длительном применении имеют ряд серьезных побочных эффектов и осложнений. Кроме того, пациенты, как правило, более расположены к лечению натуральными растительными препаратами по сравнению с синтетическими медикаментами.

Особой проблемой в клинике внутренних болезней является ведение пациентов, длительно получающих неспецифические противовоспалительные препараты (НПВП) и глюкокортикостероиды (ГКС) по основному заболеванию (например, бронхиальная астма, ревматические заболевания и др.). НПВП и ГКС при длительном приеме нарушают защитные свойства слизистой желудка и 12-перстной кишки в результате общего и местного действия этих препаратов. Местное действие более выражено в желудке и обусловлено их прямым токсическим воздействием или их метаболитов на эпителий. Общее действие связано с подавлением активности циклооксигеназы. При этом в эпителии синтезируется меньше простагландинов, нарушается секреция слизи, кровоснабжения слизистой, транспорт ионов и другие защитные механизмы; в результате пепсин и соляная кислота повреждают слизистую. Из-за общего действия НПВП язвы образуются даже при внутривенном введении этих препаратов или приеме таблеток в кислотоустойчивой оболочке. Такие больные вынуждены принимать препараты под защитой H₂-блокаторов гистамина, ингибиторов протонной помпы или антацидов. Постоянный прием этих средств также не может быть рекомендован из-за наличия побочных эффектов:

- *Магний содержащие антациды – вызывают диарею;*
- *алюминий и кальций содержащие антациды – запоры, остеомаляцию, за счет нарушения всасывания фосфора;*
- *ингибиторы H₂-блокаторов гистамина - гинекомастия, импотенцию, психоз, гепатит, могут взаимодействовать с другими препаратами (варфарином, теофиллином) и оказывать токсическое действие;*
- *омепразол – существует риск развития злокачественных опухолей, а также возможность взаимодействия с другими препаратами и тем самым оказывать токсическое действие.*

Поэтому 71,6 % испытуемых больных при 2 фазе клинических испытаний настойкой «Лимонидин», проведенных во 2-ой городской поликлинике г. Алматы, составили лица, страдающие неспецифическими воспалительными заболеваниями ЖКТ, вызванными длительным приемом медикаментов. Основанием для апробации растительного препарата в виде лекарственной формы настойки в данной категории больных явились рекомендации конференции Маастрихт 2 – 2000, обобщившей ряд научных достижений в этой области. В данных рекомендациях на примере больных с наличием *Helicobacter pylori* продемонстрировано, что прием НПВП значительно

усиливает повреждение слизистых. Проведение только эрадикационной терапии *H.pylori* не ускоряет их заживление. Поэтому, в связи с высоким риском развития кровотечения у всех пациентов, длительно принимающих НПВП и ГКС при наличии эрозий, были применены препараты, уменьшающие агрессивные свойства желудочного сока, соответственно протоколу лечения, рекомендованному Американской Ассоциацией гастроэнтерологов.

В испытываемой группе на фоне приема этих препаратов дополнительно назначали настойку «Лимонидин», с целью сравнения клинической эффективности со стандартной схемой лечения и возможностью сокращения длительности приема Н2-блокаторов гистамина или ингибиторов протонной помпы.

Полный комплекс клинических испытаний настойки «Лимонидин» подтвердил ее противовоспалительное и цитопротекторное действие.

Оценка сравнительной клинической эффективности применения настойки «Лимонидин» и используемых в медицине антацидов при «катаральных» формах поражения ЖКТ при лечении больных опытной и контрольной групп, не выявило достоверных различий при сроке наблюдения в течение 10 дней. Эти данные свидетельствуют о высокой эффективности настойки «Лимонидин», что делает его перспективным в лечении «катаральных» форм поражения ЖКТ в качестве монотерапии. Важными факторами для приверженности пациентов к лечению является также то, что это натуральный растительный и более дешевый препарат по сравнению с антацидами.

Кроме того, настойка «Лимонидин» может применяться для длительной терапии, тогда как антациды не могут быть рекомендованы из-за наличия вышеуказанных побочных эффектов.

Оценка сравнительной клинической эффективности применения настойки «Лимонидин» у больных с «эрозивными» формами заболевания в опытной группе дополнительно к стандартной схеме лечения позволило снизить интенсивность клинических симптомов быстрее, чем в контрольной группе. По 10-бальной шкале оценки интенсивность клинических симптомов на 3 день не превышала 3 баллов, в то время как в контрольной группе – отмечалась на уровне 5 баллов и выше. Результаты эндоскопического исследования также продемонстрировали преимущество настойки «Лимонидин» (90,9 % положительной динамики на ЭФГДС в опытной группе и 86,7% - в контрольной группе).

Важным аспектом клинического применения растительного препарата из корней кермека Гмелина, настойки «Лимонидин», является возможность его применения с профилактической целью у больных, длительно применяющих НПВП или ГКС. Наблюдение за 63 пациентами в течение 60 дней показало, что в испытываемой группе достоверно реже регистрируется болевой синдром в течение всего срока наблюдения по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). ЭФГДС у пациентов после 1,5-2 мес наблюдения выявило в группе контроля у всех больных признаки «эрозивного» гастрита и дуоденита, в испытываемой группе – только у одного больного наблюдались единичные эрозии.

В настоящее время больные с хроническими заболеваниями (ревматическими, аллергическими и др.), вынужденные длительно применять НПВП или ГКС, являются сложным контингентом для практического врача из-за отсутствия препаратов, которые можно было бы длительно и безопасно им назначать. В связи с этим, выявление противовоспалительного, цитопротекторного действия настойки «Лимонидин» делает его перспективным в качестве «защитного» препарата у больных длительно применяющих НПВП или ГКС.

Кроме того, была показана эффективность настойки «Лимонидин» у больных с антибиотик-ассоциированной диареей (ААД), обусловленной сочетанным семидневным приемом двух антибиотиков – амоксициллина и кларитромицина при проведении эрадикационной терапии по поводу *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний желудка и 12-ти перстной кишки при их лечении. Лечение было проведено в амбулаторных условиях на базе научно-клинического диагностического центра МЗ РК.

Комплекс патологических сдвигов вследствие применения антибиотиков, обуславливающий соответствующие клинические проявления, в литературе обозначают как «антибиотик-ассоциированная диарея». Оптимальным является использование средств, оказывающих минимальное влияние на симбионтную микрофлору и подавляющих рост агрессивных штаммов, а также условно-патогенных микроорганизмов (протей, стафилококков, дрожжевых грибов и других). Следует отметить, что вопросы профилактики и лечения ААД в литературе освещены фрагментарно и противоречиво. Практические рекомендации по этому вопросу, имеющие в основе принципы доказательной медицины, могут быть выработаны только после проведения рандомизированных клинических испытаний различных режимов на основе применения пробиотиков и энтеросептиков. Показано, что при добавлении к стандартной геликобактер-эрадикационной терапии пробиотики не улучшают эффективность эрадикации, но уменьшают частоту и выраженность нежелательных интестинальных симптомов и эффективны в качестве профилактики ААД.

Механизм развития ААД включает в себя избыточный рост указанных выше транзиторных форм микроорганизмов, что сопровождается снижением конкурентной способности «дружественных» микроорганизмов к захвату питательных веществ, связанной с повреждением рецепторов лектинов или участков фиксации (экзополисахаро-муциновых комплексов) у нормальной симбионтной микрофлоры. Наблюдается снижение количества короткоцепочных жирных кислот вследствие отсутствия у транзиторных (условно-патогенных) бактериальных штаммов свойств метаболизировать сложные карбогидраты. В рекомендациях по лечению ААД предлагается пероральный прием метронидазола или ванкомицина, однако прекращение их приема у 20 % вновь приводит к рецидивированию диареи.

Пациентам назначался препарат «Лимонидин» в течение 10 дней. При этом эрадикационная терапия продолжалась и завершалась независимо от приема «Лимонидина». Во время его приема пациентами велся дневник, в котором записывались клинические симптомы, нежелательные эффекты, а также частота и характер стула. Использовался модифицированный (APACHE) индекс, оценивающий состояние здоровья:

АСТ, АЛТ, общий белок, глюкоза крови, артериальное давление, калий и натрий крови, измерение температуры тела. При назначении настойки «Лимонидин» у большинства пациентов наблюдалась нормализация стула на 3-4 дни лечения, причем у всех пациентов, у которых диарея возникла после завершения курса лечения антибиотиками, установлена нормализация стула. Назначение настойки «Лимонидин» не привело к усугублению указанных проявлений или возникновению новых нежелательных эффектов. У пациентов, получавших только Лимонидин, его прием не привел к появлению нежелательных эффектов.

Таким образом, настойку «Лимонидин» рекомендуется применять для лечения воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта: эзофагита, гастрита, дуоденита, у пациентов с неинфекционной природой заболевания, особенно у больных длительно принимающих неспецифические противовоспалительные препараты или глюкокортикостероиды. Кроме того, положительная клиническая и бактериологическая динамика при отсутствии побочных эффектов, связанных с приемом препарата, позволяет рекомендовать настойку «Лимонидин» для лечения диареи, обусловленной воздействием на микробиоценоз кишечника амоксициллина в сочетании с кларитромицином на фоне приема ингибитора протонной помпы при проведении эрадикационной терапии при Нр-ассоциированных заболеваниях желудка и 12-ти перстной кишки.

Терапевтический эффект связан с высоким содержанием в настойке полифенольных соединений – восстановленных форм флавоноидов, представляющих собой сумму различных форм флаван-3-олов (димерных, олигомерных и полимерных), а также окисленных форм флавоноидов с преобладанием в них агликонов кверцетина, кемпферола, мирицетина и их гликозидов. Спектр их воздействия на биологические процессы многогранен и распространяется от образования комплексов с биологическими макромолекулами до влияния на физиологические процессы, такие как воспаление, сердечно-сосудистые заболевания и другие. Влияя на активность многих ферментов, участвуя в специфической и неспецифической защите организма, вовлекая большое разнообразие клеток и органов, флавоноиды изменяют метаболические процессы в иммунных клетках организма. Так, фисетин, кверцетин, лютеолин, генистеин, мирицетин, апигенин были наиболее активными ингибиторами киназ, которые вовлечены в широкий перечень активностей, включая промoцию опухоли, секреторные процессы, процессы регуляции клеточного роста, экспрессии генов прикрепления клеток друг к другу, воспалительные клеточные процессы и Т-лимфоцитарную функцию. Кверцетин, кемпферол, мирицетин, кверцетагетин, кемпферол-3-О-галактозид оказались эффективными ингибиторами фосфолипазы A_2 – важного внутри- и межклеточного медиатора воспаления, а также других медиаторов, таких как гистамин, серотонин, лизосомные энзимы (гиалуронидаза, коллагеназа), секретируемых при воспалении. Полагают, что ингибирующая активность флавоноидов на циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ), регулирующих многие клеточные процессы, такие как клеточное деление, сокращаемость гладких мышц, секреторные функции, иммунологические процессы, агрегацию тромбоцитов, может быть связана со структурной схожестью пиримидинового кольца цАМФ и пиранового кольца активных флавоноидов. Байкалин,

мирицетин, морин, кверцетин и фисетин ингибировали репликацию вируса HTLV-1 в инфицированных Т и В клетках, действуя на ВИЧ-1 протеиназу, необходимого фермента для процессинга и репликации ВИЧ-1. Оказалось, что уровень ксантиноксидазы увеличивается у пациентов с гепатитом и раком мозга, вероятно, выбранные флавоноиды могут использоваться при лечении этих расстройств. Кроме того, растительные полифенолы являются антиоксидантами и способны связывать активные радикалы кислорода, такие как супероксид и гидроксил. Мишенями свободных радикалов могут быть многие биомолекулы, в том числе белки, ДНК, но особенно страдают при этом липиды клеточных мембран. Липидные пероксиды потенциально токсичны и обладают способностью повреждать большинство клеток. Они накапливаются в атеросклеротических бляшках, в мозговой ткани, поврежденной травмой или в состоянии гипоксии, в тканях, насыщенных токсинами. Продукты перекисного окисления липидов могут проявлять гепатотоксичность, способствовать старению, гемолизису, развитию воспаления, даже раковой опухоли. Флавоноиды способны подавить перекисное окисление липидов в модельных системах, в нескольких биологических системах, таких как митохондрии, микросомы печени крысы, хлоропласты и эритроциты. Легко окисляясь, фенольные соединения в силу сопряженности окислительно-восстановительных реакций способствуют восстановлению других веществ в реакционной смеси либо препятствуют их окислению. В присутствии фенольных соединений интенсивность окисления падает, число активных продуктов медленно нарастает или остается на прежнем уровне, а весь процесс резко замедляется. Интересно, что антиоксидантная эффективность флавоноидов усиливалась при их применении с другими антиоксидантными соединениями (α -токоферол, β -каротин или витамин С), что вероятно связано с их синергическим эффектом.

4 КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА КОРЫ СОСНЫ С ПОЛУЧЕНИЕМ АССОРТИМЕНТА ВОСТРЕБОВАННЫХ ПРОДУКТОВ (ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ, ПЕКТИНОВ И АНТОЦИАНИДИНХЛОРИДОВ)

Интересным объектом для получения ассортимента востребованных продуктов является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*), которая широко используется в качестве древесного сырья на территории стран СНГ. В литературе имеются сведения о выделении из древесной коры пектина и фенольных соединений.

Последовательной экстракцией растворителями с возрастающей полярностью из коры сосны, являющейся отходом при производстве древесины, были извлечены различные группы органических веществ, которые затем были переработаны в продукты с высокой потребностью.

Технология переработки растительного сырья включала в себя ряд этапов:

- сырье в виде коры сушат в течение 5-6 часов при температуре 104-105 °С, затем измельчают, отбирая фракции с размером частиц, равным 1,0-2,0 мм;

- отобранное сырье в течение 10 часов экстрагируют в аппарате Сокслета объемом 250 мл вначале гексаном, затем сливают *гексановую* фракцию, продолжают экстрагировать в течение 8 часов этанолом, сливают этанольную фракцию. Оставшуюся кору при постоянном перемешивании по 30 мин дважды промывают водой при температуре 60 °С. Полученные этанольный и водные экстракты концентрируют под вакуумом и объединяют с получением *дубильного экстракта*;

- из новой порции коры, обессмоленной гексаном, экстракцией 15% этанолом при его кипении в течение 0,5-1,0 часа и последующим добавлением в концентрированный водно-этанольный экстракт хлорида натрия удаляют выпавший в осадок ряд полифенольных соединений, а водно-спиртовой раствор трижды экстрагируют этилацетатом. Все этилацетатные экстракты объединяют, концентрируют и из концентрированного остатка добавлением хлороформа осаждают *проантоцианидины*;

- из новой порции коры, обессмоленной гексаном, получают *антоцианидинхлориды*. Для этого к сырью в колбе с обратным холодильником добавляют этиловый спирт, содержащий 1-3% хлороводородной кислоты (HCl), содержимое колбы нагревают на водяной бане при температуре 75-80 °С в течение 3 ч, фильтруют, фильтрат концентрируют до уменьшения объема в 4 раза, разбавляют водой, антоцианидинхлориды, выпавшие в осадок, фильтруют;

- из коры, обессмоленной гексаном, и из которой удалили дубильный экстракт, выделяют *пектин*. Для этого это сырье обрабатывают при постоянном перемешивании при температуре 80 °С в течение 1 часа водными растворами кислот (азотной, или лимонной, или серной, или ортофосфорной, или хлороводородной) с рН от 1,1 до 2,2. Раствор фильтруют, концентрируют под вакуумом и из него этиловым или изопропиловым спиртом (ацетоном) осаждают пектин, его фильтруют и дважды промывают этиловым спиртом или изопропиловым спиртом и сушат. Необходимо

обратить внимание, что можно проследить эффективность выхода пектиновых веществ от действия различных водных растворов вышеперечисленных кислот.

Анализируя вышеописанные этапы, можно видеть поэтапное получение востребованных продуктов в виде гидрофобной (гексановой) фракции, дубильного остатка, проантоцианидинов, антоцианидинхлоридов и пектина.

Было установлено, что выделенный *гексановый экстракт* обладает биоцидными и гидрофобными свойствами, что сделало возможным его применение в косметической, фармацевтической промышленности, а также для защиты древесных материалов в качестве покрытий от воздействия бактерий, влаги и грибков.

Пектиновые вещества оказывают на организм человека положительное воздействие, поскольку являются природным сорбентом радиоактивных и тяжелых металлов, различных шлаков. Пектиновые вещества, обладая хорошими желирующими свойствами, традиционно используются в производстве фруктовых, молочных, десертных продуктов, а также в фармацевтике.

Проантоцианидины, выделенные из коры сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), показали высокую антикоагулянтную активность. Проантоцианидины относятся к полифенольным соединениям и являются одними из наиболее широко применяемых антиоксидантов растительного происхождения с высокой биологической активностью.

Вопросы для самопроверки:

1. Распространение сосны на территории Казахстана и ее использование в народном хозяйстве республики?
2. На каких деревообрабатывающих комбинатах и заводах используют сосну? Является ли кора отходом производства на этих предприятиях?
3. Приведите технологическую схему получения гексанового экстракта из коры.
4. Приведите технологическую схему получения дубильного экстракта из обессмоленной коры.
5. Приведите технологическую схему получения антоцианидинового экстракта из обессмоленной коры.
6. Приведите технологическую схему получения проантоцианидинов из обессмоленной коры.
7. Приведите технологическую схему получения пектинов из обессмоленной коры.

5 ПРИМЕРЫ ПЕРЕРАБОТКИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ДИКОРАСТУЩЕГО ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

1 Технологические особенности получения препаратов аскорбиновой кислоты

На рисунке 54 изображена процессуальная схема комплексной переработки плодов шиповника.

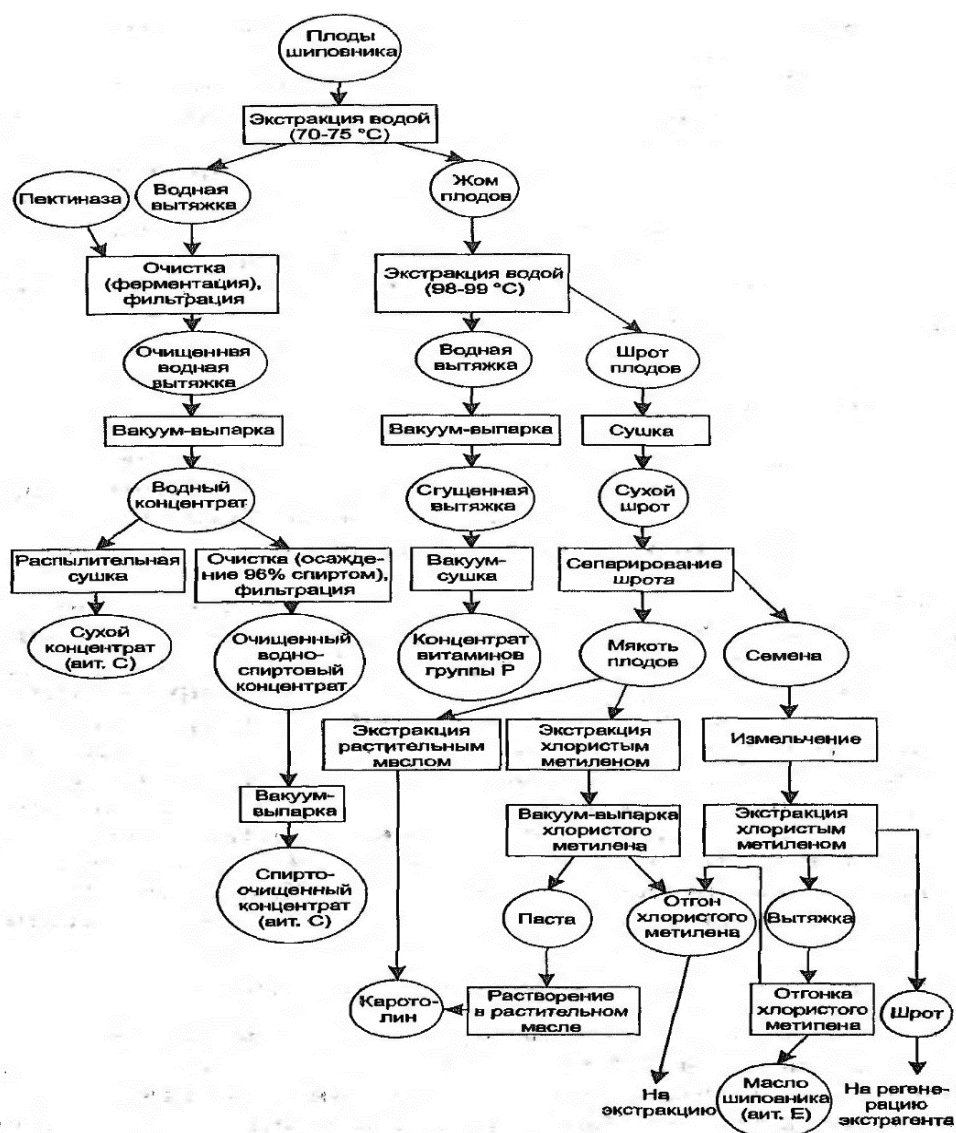


Рис. 54. Процессуальная схема комплексной переработки плодов шиповника

Технология производства препаратов из плодов шиповника *Fructus rosae* включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – экстракция плодов шиповника горячей водой (70-75 °C) до получения 10 – кратного извлечения;

ТП.2 – очистка от пектиновых веществ ферментативным путем;

ТП.3 – сгущение извлечения на вакуум-выпарной установке до получения водного концентрата, который содержит 50-55 % сухих веществ и 3-5% аскорбиновой кислоты;

ТП.4 – получение сухого концентрата. Водный концентрат высушивают на распылительной сушилке;

ТП.5 – получение спиртоочищенного концентрата. Водный концентрат очищают в коагуляторе от белковых веществ 96% спиртом (при соотношении 2:1) при нагревании 60-65⁰С, перемешивают и через 10 мин фильтруют через фильтр-пресс. Осадок на фильтре промывают спирто-водной смесью. Полученный фильтрат и промывную смесь упаривают в вакуум-выпарной установке до получения темно-бурой жидкости, которая содержит не менее 2,2% аскорбиновой кислоты и не менее 65% сухих веществ.

2 Технология производства масла облепихи

На рисунке 55 представлена технологическая схема комплексной переработки плодов облепихи крушиновидной. Действующими веществами растительного сырья являются каротиноиды, витамин F и витамин P.

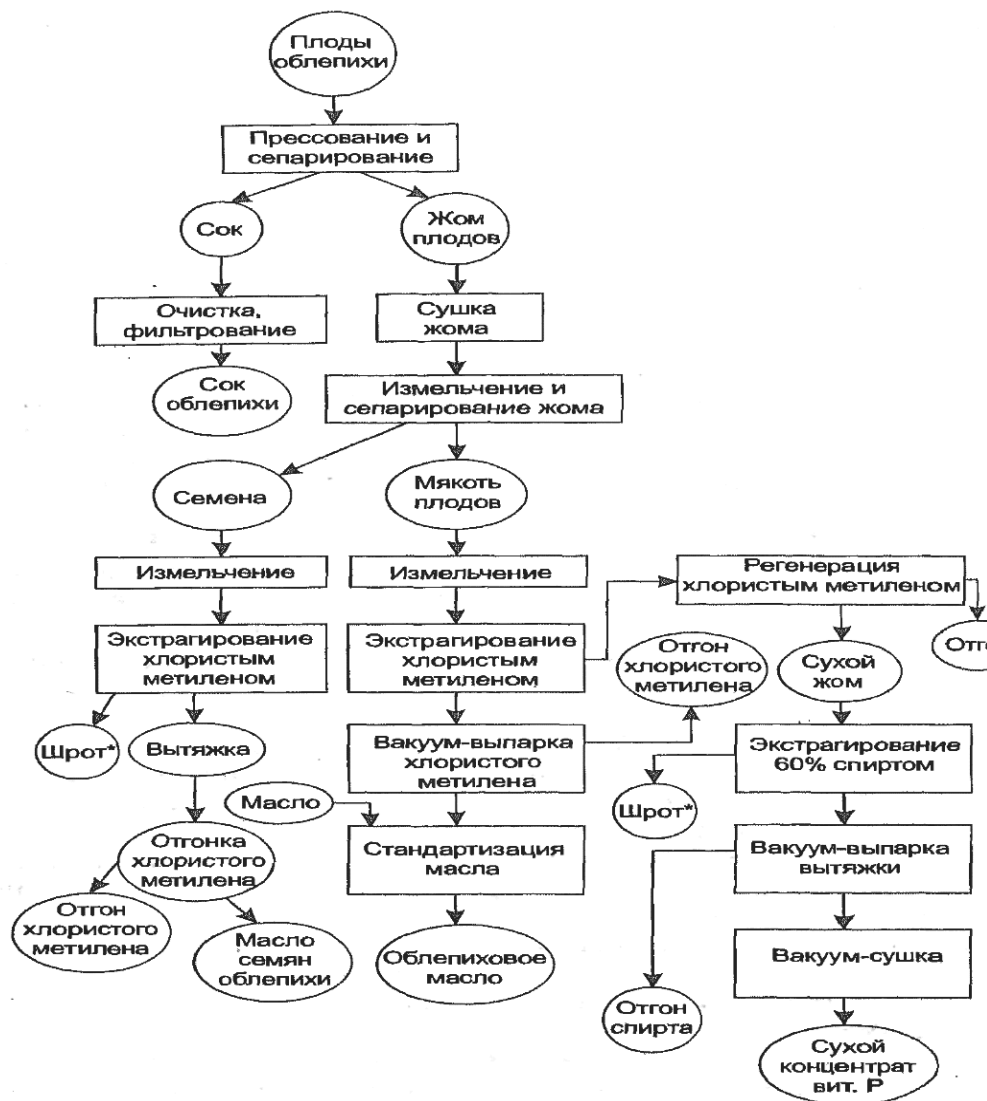


Рис. 55. Процессуальная схема комплексной переработки плодов облепихи

Технология производства масла включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение плодов на дробилке;

ТП.2 – выделение сока. Измельченные плоды поступают в вальцовый пресс, в котором осуществляется отжатие сока. Затем сок очищают и фильтруют;

ТП.3 – сушка жома. Жом высушивают в вакуум-вальцовой сушилке. Затем его измельчают в дробилке.

ТП.4 – экстракция масла из мякоти жома 4-5 кратным количеством хлористого метилена при температуре 40⁰С;

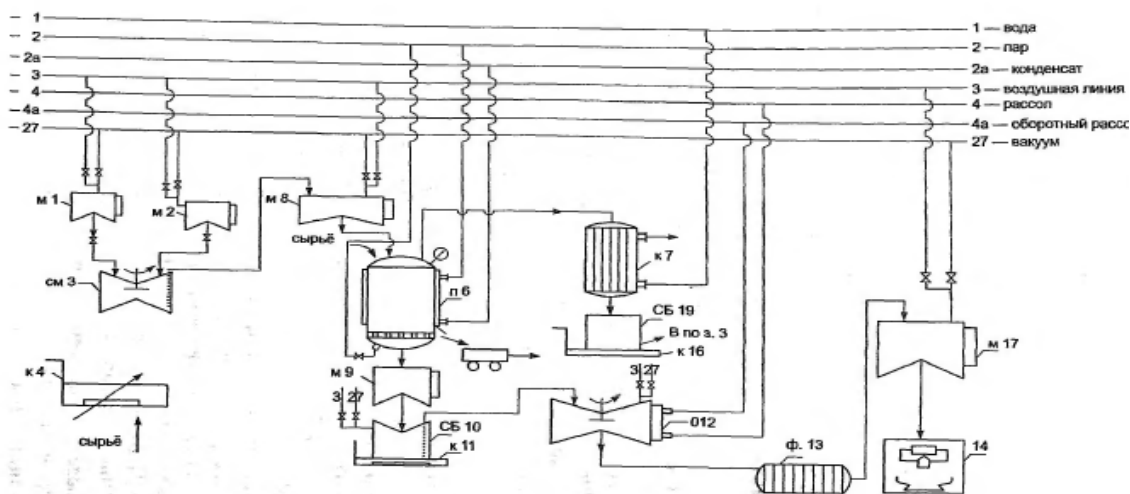
ТП.5 – переработка семян облепихи. Семена облепихи измельчают на дробилке в порошок и его экстракцию осуществляют хлористым метиленом. Затем извлечение поступает в испаритель, где отгоняют хлористый метилен до получения остатка масла.

ТП.6 – из шрота мякоти плодов отгоняют хлористый метилен. Затем сухой остаток экстрагируют 5-6 кратным количеством 60% этилового спирта. Отгоняют спирт из вытяжки до сухого остатка с помощью вакуум-испарителя.

Таким образом, полученный сухой остаток сушат в вакуум-вальцовой сушилке.

3 Технология производства настойки валерианы

Технология производства настойки из валерианы представлена на рисунке 56.



м 1, м 2, м 5, м 8, м 9, м 17 – мерники; см 3 – мерник-смеситель;
к 4, к 11, к 16 – весы; п 6 – перколятор; к 7 – холодильник; м 9, сб 10 – сборники;
о 12 – сборник-отстойник; ф 13 – фильтр-пресс; 14 – фасовочная машина

Рис. 56. Аппаратная схема производства настойки из валерианы:

Процесс приготовления настойки включает в себя следующие основные стадии:

- измельчение растительного сырья – корней и корневищ валерианы до размера частиц 0,5-1 мм;
- приготовление 70%-го водно-этилового спирта;

- загрузка перколятора измельченным растительным сырьем;
- процесс вытеснения экстрагента;
- отстаивание и стандартизация 70%-го водно-этанольной вытяжки;
- фильтрация настойки через фильтр-пресс и расфасовка по бутылочкам.

Технология производства настойки из валерианы включает в себя процесс настаивания 70%-ным водно-этиловым спиртом корней и корневищ валерианы лекарственной (*Rhizomata and radicus valerianae*) в соотношении сырье: экстрагент 1:5.

В корнях и корневищах валерианы содержится эфирное масло (примерно 0,5- 2%), представленное, в основном, сложным эфиром борнеола и изовалериановой кислоты, также содержатся сложные эфиры борнеола с уксусной и муравьиной кислотами, терпинеол, пинен, камфен, изовалериановая кислота; обнаружены алкалоиды, хатинин и валериан, гликозидные соединения (валерозиды), дубильные вещества и смолы.

Препараты, полученные из корней и корневищ валерианы, оказывают успокаивающее (седативное) и спазмолитическое действия. Их применяют при повышенной возбудимости, бессоннице.

4 Технология переработки цветков бессмертника песчаного, содержащего флавоновые гликозиды

На рисунке 57 представлена принципиальная схема производства фламина из цветков бессмертника песчаного.

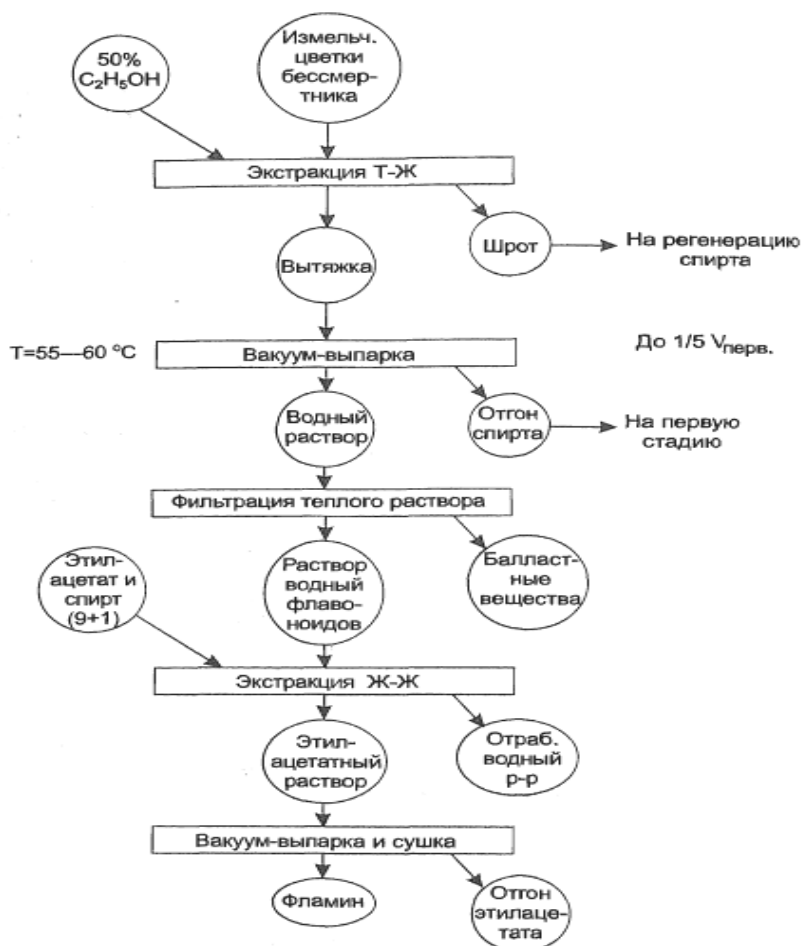


Рис. 57. Принципиальная схема получения фламина

Технология производства фламина из цветков бессмертника песчаного включает в себя следующие технологические процессы:

ТП.1 – измельчение цветков бессмертника песчаного на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 1-2 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья 50%-ным водно-этиловым спиртом методом противоточной экстракции;

ТП.3 – выпарка извлечения осуществляется в роторном испарителе под вакуумом;

ТП.4 – фильтрация концентрата через нутч-фильтр и освобождение от неполярных балластных веществ;

ТП.5 – экстракция жидкость – жидкость, которую осуществляют смесью этилацетат-этиловый спирт при соотношении 9:1;

ТП.6 – выпарка извлечения осуществляется в роторной пленочной установке под вакуумом;

ТП.7 – сушка в полочной вакуумной сушилке;

ТП.8 – измельчение фламина.

Фламин – порошок желтого цвета с содержанием флавоноидов до 95% и более, со слабым специфическим запахом и горьким вкусом.

Методы выделения и очистки флавоновых гликозидов основаны на их специфических свойствах, т. е., в основном, на растворимости.

Экстракция гликозидов обычно проводится концентрированным этиловым спиртом или кипящей водой, так как флавоновые гликозиды являются термостабильными. Очистку их осуществляют обычно методом замены одного растворителя другим, например, спирта водой, экстракцией жидкости жидкостью (этилацетат или его смесь со спиртом), а также колоночной хроматографией на сорбенте полиамид с избирательным экстрагированием сопутствующих и действующих веществ.

Фламин представляет собой смесь флавоноидов. Сырьем для его получения служат цветки бессмертника песчаного (*Flores Helychrysi arenarii*). Цветки бессмертника песчаного содержат флавоновые гликозиды, которые относятся к флавонам, флавонолам, флаванонам, халконы, стерины, эфирные масла, смолы, фенольные соединения.

Фламин оказывает желчегонное и противовоспалительное действие, его назначают при холецистите и холангите.

5 Технологические особенности производства антрасеннина

Антрасеннин является новогаленовым препаратом, который содержит сумму антрагликозидов листьев сенны (кассии остролистной) *Cassia acutifolia* Del.

Технология производства антрасеннина включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – подготовка сырья, то есть измельчение листьев сенны до размеров частиц 3 мм;

ТП.2 – экстрагирование 3-х кратным количеством 65% этиловым спиртом при соотношении сырье: экстрагент (1:7) при постоянном перемешивании в течение 1 часа;

ТП.3 – упаривание водно-спиртовой вытяжки в циркуляционном вакуум-выпарном аппарате при температуре 40⁰С. Затем водный остаток отстаивают при температуре 8-10⁰С в течение 3-х часов. В осадок выпадают смолы, которые не растворяются в воде и отделяются на центрифуге;

ТП.4 – осаждение кальциевых солей антрагликозидов 10% спиртовым раствором кальция хлорида (16:1), перемешивают в течение 15-20 минут, затем прибавляют смесь аммиака со спиртом, строго выдерживая рН смеси в пределах 6,5-6,7. При осаждении спиртом появляется кроваво-бурое окрашивание, образуется хлопьевидный осадок кальциевых солей антрагликозидов, который отделяют на центрифуге. Осадок на фильтре промывают ацетоном и сушат в вакуум- сушильном шкафу при температуре 35-40⁰С.

6 Технология переработки растительного сырья, содержащего дубильные вещества

Технология производства танина из листьев скумпии включает в себя следующие технологические процессы (рисунок 58):

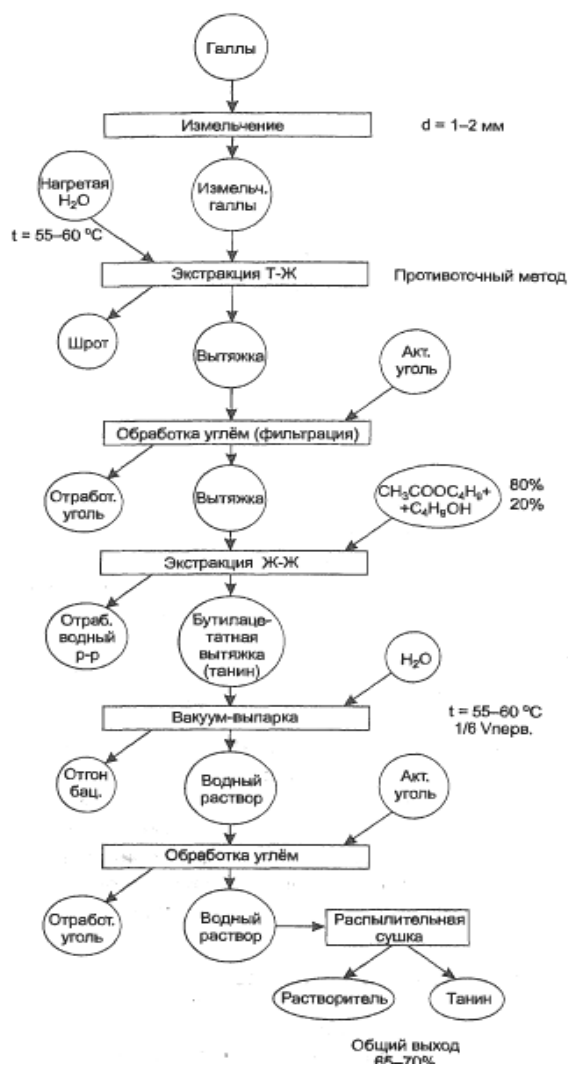


Рис. 58. Принципиальная схема получения танина

Технология производства танина из листьев скумпии включает в себя следующие технологические процессы (рисунок 58):

ТП.1 – измельчение листьев скумпии на мельнице-эксцельсиоре до размера частиц 2-3 мм;

ТП.2 – экстрагирование сырья водой, нагретой до 60 – 65 °С методом непрерывной действующей экстракцией;

ТП.3 – обработка полученного извлечения 0,6%-ным активированным углем (для уменьшения растворимости танина) и 8%-ным раствором хлорида натрия (для высаливания);

ТП.4 – экстракция танина из водного раствора органическими растворителями (смесь, состоящая из 80% бутилацетата и 20% бутанола);

ТП.5 – упаривание эфирного извлечение в вакуум-выпарном аппарате при 55 – 60°С до 1/6 первоначального объема;

ТП.6 – отгонка растворителя полностью;

ТП.6 – выпарка извлечения осуществляется в роторной пленочной установке под вакуумом;

ТП.7 – обработка водного остатка 1%-ным активированным углем, затем фильтрация;

ТП.8 – сушка концентрированного раствора в двухступенчатой распылительной сушилке.

7 Технологические особенности производства келлина

Келлин впервые был выделен египетским химиком Мустафи в 1896 году.

Химики Шпетом и Губером разработан метод выделения келлина, который включает в себя следующие технологические процессы (ТП):

ТП.1 – измельчение плодов амми зубной (*Ammi visnagae*);

ТП.2 – экстракция измельченных плодов этиловым эфиром;

ТП.3 – разбавление остатка после отгонки петролейным эфиром;

ТП.4 – осаждение келлина;

ТП.5 – процесс очистки путем растворения в этиловым эфире, упарки и осаждения петролейным эфиром повторяют еще раз;

ТП.6 – экстрагирование остатка горячим хлороформом;

ТП.7 – сгущение хлороформной вытяжки;

ТП.8 – охлаждение в течение 4 часов;

ТП.9 – фильтрование келлина;

ТП.10 – сушка и перекристаллизация из метилового спирта

8 Технологические особенности производства рутина из бутонов сафоры японской

На рисунке 59 изображена принципиальная схема получения рутина из бутонов сафоры японской.

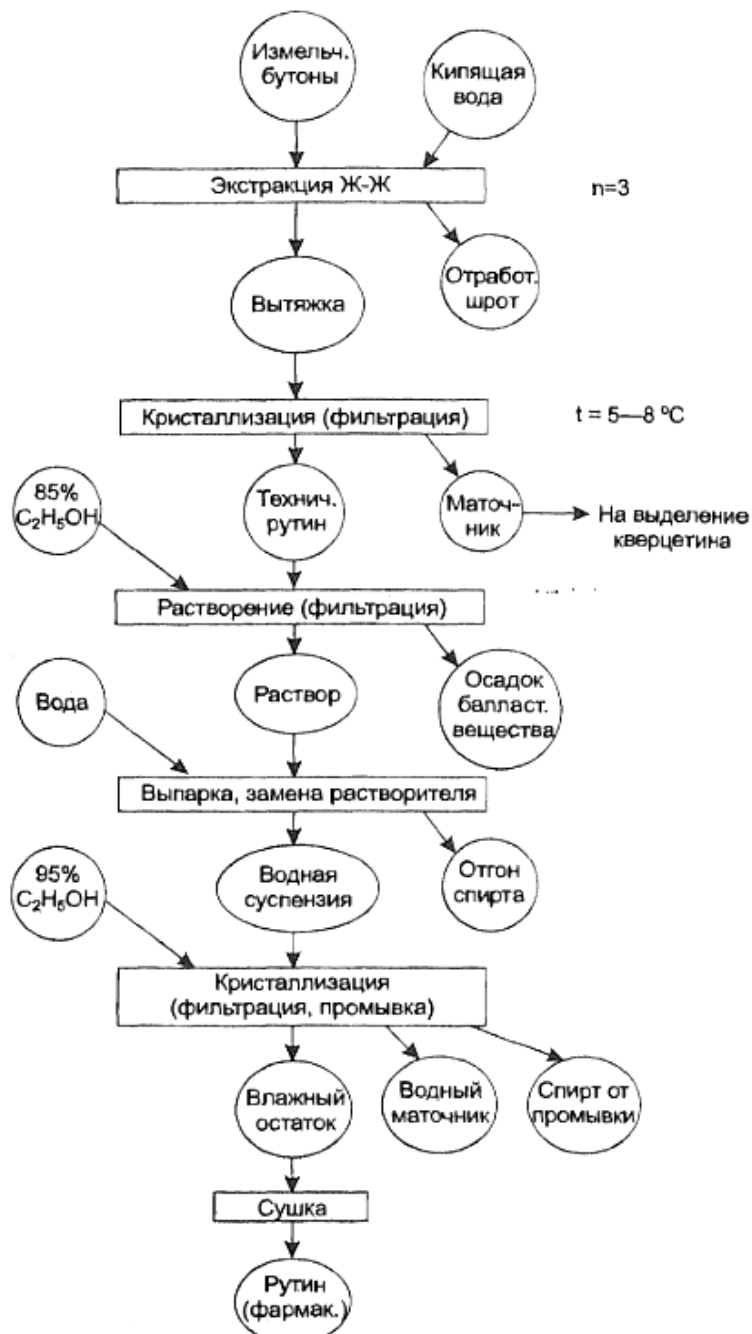


Рис. 59. Принципиальная схема получения рутина из бутонов сафоры японской

Сырьем для получения рутина служат: боярышник, шиповник, бессмертник песчаный, цветки сафоры японской, цветки гречихи посевной; трава пустырника и другие растения.

Метод основан на первичной водной экстракции и последующей очистке.

Технология производства рутина из бутонов сафоры японской включает в себя следующие технологические процессы:

ТП.1 – измельчение бутонов сафоры японской;

ТП.2 – экстракция измельченных бутонов сафоры японской водой при кипячении в реакторе с рубашкой и обратным холодильником в течение 1,5 часа;

ТП.3 - фильтрация полученной насыщенной вытяжки через обогреваемый нутч-фильтр;

ТП.4 – вытяжку сливают в кристаллизатор, где охлаждают до 5-8⁰С в течение 24 часов;

ТП.5 – выпадают микрокристаллы рутина, которые центрифугируют и получают рутин-сырец;

ТП.6- оставшееся сырье после первой экстракции повторно последовательно экстрагируют еще 4 раза в реакторе кипящей водой; каждый раз заливают 200 л воды (при соотношении 1:10) и кипятят в течение 1 ч;

ТП.7 – фильтрация извлечений через обогреваемый нутч-фильтр;

ТП.8 - заливают вытяжки в другой кристаллизатор отдельно от первой вытяжки и охлаждают до 6-8⁰С в течение 24 часов;

ТП.9 – выпавший рутин отфуговывают;

ТП.10 – перекристаллизация рутина-сырца из 95% этилового спирта;

ТП.11 – очистка рутина: отфильтрованный рутин помещают в кристаллизатор и обрабатывают ацетоном для удаления примесей. Смесь рутина с ацетоном снова центрифугируют и полученный чистый рутин высушивают в вакуум-сушилке при 60-70⁰С до остаточной влаги 7-8%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время Республика Казахстан вовлечена в глобальный процесс интеграции в рамках Евразийского экономического союза. На этом фоне еще большую актуальность и чрезвычайную важность обретает вопрос обеспечения лекарственной независимости страны через становление собственной, конкурентоспособной фармацевтической промышленности. В соответствии с международной практикой для обеспечения национальной безопасности любого государства необходимо, чтобы не менее 20% лекарств производилось внутри страны. Чтобы снизить риски, связанные с импортозависимостью в сфере лекарственных средств и тем самым укрепить национальную безопасность, для начала необходимо довести до 50 % долю отечественной продукции в государственном заказе. Неиссякаемым источником для получения отечественной продукции является богатая дикорастущая флора Казахстана, химическим, биологическим и технологическим исследованием которой занимаются многие разработчики лекарств. Промышленная переработка лекарственного растительного сырья предусматривает его выпуск в виде порошков (фасованных, в том числе чаев), а также получения лекарственных средств в виде субстанции или лекарственных препаратов в виде настоек, эфирных масел и других. Для осуществления указанной глобальной проблемы необходимо использовать для промышленной переработки качественное растительное сырье, показатели которого должны соответствовать требованиям ведущих Фармакопей мира, и, прежде всего, ГФ РК.

В данном учебном пособии изложены требуемые показатели к лекарственному растительному сырью, касаемые его идентификации (макроскопия, микроскопия, определение активных или действующих биологически активных веществ) и испытаний (посторонние примеси, зольность, тяжелые металлы, радионуклиды, пестициды, афлотоксины, микробиологическая чистота, количественное содержание действующих веществ), определяемые по методикам в соответствии с требованиями Надлежащей фармакопейной практики.

Важно обратить внимание на установление условий хранения лекарственного растительного сырья и сроки его хранения. Сроки хранения лекарственного растительного сырья определяются его стабильностью в процессе хранения в выбранной упаковке при конкретной температуре и относительной влажности в месте хранения.

После определения всех показателей качества лекарственного растительного сырья, подтверждения его биологической безопасности и специфического фармакологического действия отечественными производителями разрабатывается и составляется Временный аналитический нормативный документ (ВАНД), технологическая схема переработки сырья, адаптированная на основе лабораторного регламента к условиям его промышленной переработки. Рассмотрены технологические схемы выделения субстанций и настоек из фармакопейного лекарственного растительного сырья, а также вопросы их стандартизации с определением и идентификацией в них

действующих веществ и составлением технологических схем в условиях их лабораторных разработок и опытно-промышленного получения. Эта часть позволит студентам разработать оптимальную технологию выделения комплекса биологически активных веществ из исследуемых растительных объектов, необходимую для их стандартизации при промышленной переработке.

Помимо разработки ВАНД при составлении регистрационного досье на лекарственное растительное сырье следует представить данные об его ресурсной обеспеченности с указанием места и времени заготовки с непременным учетом при этом экологических факторов. Как правило, такого типа исследования по лекарственному растительному сырью проводятся в специализированных учреждениях во время экспедиций в различные области Казахстана с составлением ареала произрастания исследуемых растений и определения их запасов. Оптимальное время заготовки лекарственного сырья устанавливается в ходе эксперимента при определении содержания в нем действующих веществ в различные фазы вегетации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сур С.В., Гриценко Э.Н. Проблемы и перспективы разработки и внедрения современных лекарственных средств растительного происхождения // Фарматика. - 2001. - № 9/10. - С. 10-14.
2. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганапольский В.П. и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии // Фитофармакология. - 2017. - Т. 15, № 2. - С. 56-63.
3. Quality control methods for medicinal plant materials. - Geneva: World Health Organization, 1998. - 123 p., revised: Malta, 2011. - 187 p.
4. WHO monographs on selected medicinal plants. - Spain, 1999. - Volume 1. - 295 p., 2004. - Volume 2. - 358 p., 2007. - Volume 3. - 390 p., Volume 4. - 2009. - 456 p.
5. Руководящие принципы ВОЗ по надлежащей практике культивирования и сбора (GACP) лекарственных растений / Всемирная организация здравоохранения. - Женева, 2003. - 86 с.
6. Растительные ресурсы СССР / Гл. ред. П.Д. Соколов. - Л. (С.-Пб): Наука, 1984. - Т.1. - 461 с., 1986. - Т.2. - 336 с., 1987. - Т.3. - 328 с., 1988. - Т.4. - 359 с., 1990. - Т.5. - 328 с., 1991. - Т.6 - 200 с., 1993. -Т.7. - 351 с.
7. Флора СССР / Гл. ред. В.Л. Комаров. - М.: АН СССР, 1934-1960. - тома 1-30 с соответствующими описаниями в свободном доступе, например на: <http://uipmgu.ru/catalog/item80.html>
8. Флора Казахстана / Гл. ред. Н.В. Павлов. - Алма-Ата: АН КазССР, 1956. - Т.1. - 354 с., 1958. - Т.2. - 292 с., 1960. - Т.3. - 460 с., 1961. - Т.4. - 548 с., 1961. - Т.5. - 515 с., 1963. - Т.6. - 465 с., 1964. - Т.7. - 497 с., 1965. - Т.8. - 447 с., 1966. - Т.9. - 640 с.
9. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений Казахстана. - Алматы: ЫЛЫМ, 1994. - 167 с.
10. Куkenov M.K. Ботаническое ресурсоведение Казахстана. - Алматы: ЫЛЫМ, 1999. - 160 с.
11. Лекарственные растения Казахстана и их использование. - Алматы: ЫЛЫМ, 1996. - 344 с.
12. Егеубаева Р.А., Айдарбаева Д.К. Проблемы, тенденции и перспективы ботанического ресурсоведения Казахстана // Известия НАН РК, серия биологическая, 2007. - №4. - С. 25-27.
13. Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г. Список лекарственных растений Казахстана. - Алматы, 2012. - 123 с.
14. Государственная фармакопея Республики Казахстан. - Алматы: Жибек жолы, 2008-2014. - 1-е издание в 3-х томах, 2015-2017. - 2-е издание в 2-х томах.
15. European pharmacopoeia. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2017-2019. - 9th ed., <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-9th-edition>

16. Good manufacturing practices: supplementary guidelines for the manufacture of herbal medicinal products: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation. Thirty-fourth Report. - Geneva: World Health Organization, 1996. - Annex 8. (WHO Technical Report Series. - No. 863.)
17. Товмасын Е.К., Котов А.Г., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. К вопросу о введении в Государственную Фармакопею Украины общих статей на лекарственное растительное сырье и средства // Фармаком. - 2004. - № 4. - С. 17-23.
18. Растения для нас / под редакцией Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. - Санкт-Петербург: Учебная книга, 1996. - 654 с.
19. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. - Москва, 2005. - 832 с.
20. Достанова Р.Х. Фенольный комплекс растений при засолении среды: автореф. ... д-ра биол. наук. - Новосибирск, 1994. - 34 с.
21. Волынец А.П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. - Минск: Беларус. навука, 2013. - 283 с.
22. Жусупова Г.Е. Химический состав растений рода *Limonium Mill* и создание препаратов на их основе: диссерт. ... д-ра хим. наук. - Алматы, 2007. - 271 с.
23. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. - М.: Высшая Школа, 1983. - 175 с.
24. Dey P.M. Methods in plant biochemistry. - NY: Academic Press, 2012. - 608 p.
25. Чуешов В.И., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. и др. Промышленная технология лекарств. - Харьков: НФАУ, 2002. - С. 393-415.
26. Поверин Д.И., Поверин А.Д., Технология промышленной переработки лекарственного растительного сырья. - М.: Изд-во МСХА, 2001. - 208 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ЦВЕТНЫЕ

Рис. А-1. Внешний вид растений кермека Гмелина

Рис. А-2. Внешний вид растений гребенщика щетинистоволового

Рис. А-3. Гербарий 6 видов растений рода кермек

Рис. А-4. Монография в ГФ РК на траву кермека Гмелина

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Протокол исследования растений кермек на присутствие тяжелых металлов

ПРИЛОЖЕНИЕ В
Протокол исследования радионуклидности растений кермек

ПРИЛОЖЕНИЕ Г
Протокол санитарно-микробиологического исследования растений кермек

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Рис. Д-1. Акт о возможности использования шрота
(отходы после выделения субстанции) из корней кермека Гмелина

ПРИЛОЖЕНИЕ Е НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ НА НАСТОЙКУ ЛИМОНИДИН

