Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 66:615.322

На правах рукописи

ШЕВЧЕНКО АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

«Разработка технологии комплексной переработки фармакопейных видов растений рода *Polygonum* L.»

6D072100 – Химическая технология органических веществ

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
доктор химических наук
профессор Музычкина Р.А.

PhD, профессор
Университета Миссисипи
Самир А. Росс

Республика Казахстан
Алматы, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	
	ОПРЕДЕЛЕНИЯ	
	ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	
1	**ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**	13
1.1	Краткое описание растений рода *Polygonaceae Juss.*	13
1.2	Характеристика объектов исследования	14
1.2.1	Ботаническое описание	14
1.2.2	Физиотерапевтические свойства растений *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus*	17
1.2.2.1	Горец перечный *Polygonum hydropiper* L.	17
1.2.2.2	Горец птичий *P. aviculare*	17
1.2.2.3	Горец малый *P. minus*	18
1.3	Химический состав растений *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus*	19
1.4	Биофлавоноиды и их структурное разнообразие	25
1.4.1	Путь биосинтеза флавоноидов	26
1.4.2	Растительные источники и биологические свойства флавоноидов	28
1.5	Экстракция	32
1.5.1	Термодинамика процессов экстракции	34
1.5.2	Особенности экстрагирования флавоноидов	35
2	**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**	39
2.1	Материалы и реактивы	39
2.2	Методы исследований	39
2.2.1	Хроматографические методы	39
2.2.2	Спектральные методы	40
2.2.3	Хромато-масс спектроскопия	41
2.2.4	Определение подлинности сырья и числовых показателей	41
2.2.5	Определение макро- и микроэлементного состава	42
2.2.6	Фитохимические методы исследования	42
2.2.7	Количественное определение основных групп БАВ	42
2.3	Методы выделение БАВ из *Polygonum hydropiper*	44
2.4	Методы выделения БАВ из *Polygonum aviculare*	46
2.5	Методы отработки технологии выделения БАВ	47
2.6	Фармакологические методы исследования	50
2.6.1	Противомикробный и противомикробный скрининг	50
2.6.2	Противомалярийный биотест	51
2.6.3	Опиоидная активность	51
2.6.4	Каннабиноидная активность	52
3	**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**	53
3.1	Фармакогностический анализ	53
3.1.1	Микро- и макроэлементный анализ	53
3.1.2	Качественнный и количественный групповой анализ	55

3.2	Отработка методик количественного определения флавоноидов	57
3.3	Отработка технологических параметров	59
3.3.1	Подбор оптимального экстрагента	59
3.3.2	Степень измельчения сырья	60
3.3.3	Соотношения сырье - экстрагент	61
3.3.4	Метод экстракции	61
3.3.5	Длительность экстракции	62
3.3.6	Технологические свойства растительного сырья	63
3.4	Технология получения сухого экстракта из травы *P. hydropiper*	64
3.4.1	Описание технологического процесса	64
3.4.2	Материальный баланс	71
3.4.3	Расчет экономических затрат	77
3.4.3.1	Организация труда	77
3.4.3.2	Расчет численности рабочих, служащих, руководителей и специалистов	78
3.4.3.3	Расчет общего годового фонда заработной платы персонала	79
3.4.3.4	Расчет стоимости оборудования	80
3.4.3.5	Общепроизводственные расходы	81
3.4.3.6	Расчет технологических затрат	82
3.4.3.7	Калькуляция себестоимости и рентабельности передела	82
3.5	Технология получения сухого экстракта из травы *P. aviculare*	86
3.5.1	Описание технологического процесса	86
3.5.2	Материальный баланс	92
3.6	Технология получения сухого экстракта из травы *P. minus*	97
3.7	Стандартизация сухих экстрактов	98
3.7.1	Хромато-масс анализ липофильных фракций	99
3.7.2	Жирнокислотный анализ	103
3.7.3	Вещества, выделенные из *Polygonum hydropiper*	104
3.7.4	Вещества, выделенные из *Polygonum aviculare*	116
3.8	Результаты испытаний биологических активностей фракций и индивидуальных веществ	119
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	126
	ПРИЛОЖЕНИЕ А	145
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б	146
	ПРИЛОЖЕНИЕ В	147
	ПРИЛОЖЕНИЕ Г	148

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 2.105-95 – Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ 24027.0-80 – Сырье лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб.

ГОСТ 24027.1-80 – Сырье лекарственное растительное. Методы определения подлинности, зараженности амбарными вредителями, измельченности и содержания примесей.

ГОСТ 24027.2-80 – Сырье лекарственное растительное. Методы определения подлинности, содержания золы, экстрактивных, дубильных веществ, эфирного масла.

ГОСТ 2237-75 – Лекарственное растительное сырье. Цветы, листья, травы.

ГОСТ 57251-2016 – Спирт этиловый технический. Правила приемки и методы анализа.

ГОСТ 17299-78 – Спирт этиловый технический. Технические условия.

ГОСТ Р 52249-2009 – GMP Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

ГОСТ Р 52379-2005 – Надлежащая клиническая практика (GCP).

ГОСТ 6077-80 – Сырье лекарственное растительное. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.

ОСТ 64-031-87 – Система стандартов безопасности труда, технологические процессы производства готовых лекарственных средств, производства лекарственных форм.

ОСТ 42-3-84 – Сырье лекарственное растительное, порядок установления сроков годности. Лекарственные растения – Контроль качества.

ОСТ 64-060-88 – Сырье лекарственное растительное, нормы естественной убыли при хранении и железнодорожных перевозках, нормы расхода при переработке, порядок разработки, согласования и утверждения.

ОФС 42-0087-08 – Потеря в массе при высушивании.

ОФС 42-0055-07 – Общая зола.

ОФС 1.5.3.0005.15 – Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.

ОФС.1.2.1.1.0007.15 – Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

ОФС.1.4.1.0021.15 – Экстракты.

ОФС 1.5.3.0006.15 – Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах.

МУ 64-09-001-2002 – Производство лекарственных средств. Персонал фармацевтических предприятий. Основные требования.

СанПин 2.3.2.1078-01 – Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Государственная фармакопея (ГФ) — сборник государственных стандартов (ГОСТ) качества ЛС, имеющий законодательный характер.

Извлечение (вытяжка) — полупродукт, получаемый в результате экстрагирования растительного сырья растворителем.

CAS Номер - уникальный численный идентификатор химических соединений, полимеров, биологических последовательностей нуклеотидов или аминокислот, смесей и сплавов, внесённых в реестр Chemical Abstracts Service.

Материальный баланс – сравнение теоретически возможного и практически полученного выхода готового продукта (ОСТ 64-02-003-2002).

Стадия производства — совокупность технологических операций, приводящих к получению промежуточного продукта (на конечной стадии — конечного продукта), определяемого качественно (ОСТ 64-02-003-2002).

Субстанция — вещество растительного, животного, микробного или синтетического происхождения, обладающее фармакологической активностью и предназначенное для производства и изготовления лекарственных препаратов.

Сухие экстракты — это твердые препараты, полученные удалением растворителя, использованного для их приготовления.

Технология — наука о способах и средствах проведения технологических процессов.

Технологическая норма — регламентированные верхняя и/или нижняя границы технологически допустимых значений параметра процесса при проведении элемента операции (работы), отклонение за которые приводит к снижению выхода или качества (браку) продукции.

Технологическая операция (ТО) – элементарная часть технологической стадии, выполняемая за один приём отдельным оператором или работником (ОСТ 64-02-003-2002).

Технологический выход — процентное отношение количества полученной продукции к теоретически возможному количеству.

Технологический процесс (ТП) – комплекс действий, необходимых для получения готового продукта (ОСТ 64-02-003-2002).

Экстракты – это концентрированные препараты жидкой, твердой или густой консистенции, обычно полученные из высушенного растительного или животного материала.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БАВ	Биологически-активные вещества
ПДК	Предельно допустимая концентрация
НД	Нормативная документация
ЛРС	Лекарственное растительное сырья
DMSO-d6	Дейтерированный диметилсульфоксид
$CDCl_3$	Дейтерированный хлороформ
CD_3OD	Дейтерированный метиловый спирт
MeOH	Метанол
ИК	Инфракрасный спектр
УФ	Ультрафиолетовый спектр
MS	Масс – спектр
^1H – ЯМР	Спектр протонного магнитного резонанса
^{13}C – ЯМР	Спектр ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C
d	Дублет
dd	Дублет-дублет
λ	Длина волны
s	Синглет
m	Мультиплет
t	Триплет
EtOAc	Этилацетат
Hex	Гексан
H_2O	Вода
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation - корреляция между протонами и ядрами ^{13}C, разделенными двумя или тремя связями (в редких случаях большим числом связей).
HPLC	High performance liquid chromatography – Высоко-эффективная жидкостная хроматография
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence - корреляция между химическими сдвигами протонов и химическими сдвигами ядер ^{13}C через прямое спин-спиновое взаимодействие (^1J) между ядрами.
COSY	Correlated Spectroscopy – Корреляция протонов испытывающих спин-спиновое взаимодействие
Hz	Hertz - Герц
IC_{50}	Концентрация ингибирования 50%
J	Константа связи
m/z	Соотношение масса-заряд
ВЭЖХ	Высоко-эффективная жидкостная хроматография
ЭВ	Экстрактивные вещества

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Настоящая работа посвящена разработке технологии получения сухих экстрактов из некоторых фармакопейных растений рода *Polygonum* L., их стандартизации и изучению их биологической активности.

Оценка современного состояния решаемой задачи.

В связи с увеличением промышленных выбросов и ухудшением экологической обстановки увеличивается потребность в средствах улучшения здоровья. Одним из путей решения этой проблемы является использование лекарственных препаратов на растительной основе. А поскольку Казахстан является богатейшим регионом по разнообразию видов растений (более 6000 видов), то его малая изученность приводит к тому, что значительные объемы лекарственного сырья и фитопрепаратов импортируются из ближнего и дальнего зарубежья (более 70% фармацевтического рынка). В настоящее время в Казахстане и странах СНГ в научной медицине используется 250-300 официнальных видов. Непосредственно в качестве лекарственных средств применяется лишь часть официнальных видов растений, другая часть используется для переработки с целью выделения индивидуальных веществ и получения фитопрепаратов. В настоящее время фармацевтический рынок Казахстана насыщен разнообразной продукцией, в то же время ассортимент отечественной продукции не полностью удовлетворяет внутренний спрос потребителей.

Так, импорт продуктов фармацевтической отрасли в десятки раз превышает объем экспортируемых товаров. Существенное сокращение импортных поставок наблюдается в 2015 году – порядка 35.5% или 13.5 тыс. тонн основной фармацевтической продукции. При этом основное сокращение наблюдалось по фармацевтическим препаратам, где снижение объема импортируемых поставок составило 36.1%.

Экспорт основных фармацевтических продуктов за период 2012-2015 гг. варьировался в пределах 500-600 тонн. Значительный прирост в 161% наблюдается с 2016 года, по итогам 2017 года Рейтинговое агентство Регионального Финансового Центра города Алматы прогнозирует существенный прирост в объеме порядка 6 000 тонн продукции.

Правительство нашего государства взяло курс на насыщение отечественного фармацевтического рынка лекарственными средствами собственного производства и, в первую очередь, на основе местных (региональных) растительных ресурсов. К тому же Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) признает использование растений в качестве сырья для фармации как одно из самых приоритетных.

В силу особенностей своего географического положения Республики Казахстан представляет собой перспективную базу для производства лекарственных средств из растительного сырья. Кроме того, экспериментально доказано, что казахстанские аналоги отличает повышенное содержание

полифенольных соединений и, в частности, флавоноидов, а это известные и признанные в мире антиоксиданты. В связи с этим изучение местного растительного сырья является актуальным.

Сведения о патентных исследованиях и планируемом научно-техническом уровне разработки.

Анализ патентных данных для установления степени изученности химического состава и биологической активности растений рода *Polygonum* L. показал, что основной процент исследований по данной теме приходится на Китай, Японию и Пакистан. Разработка принципиальной технологической схемы сухого экстракта из фармакопейных растений рода *Polygonum* осуществлена впервые. Основная часть БАВ в составе исследуемых растений представляет собой полифенольные соединения [1-6], которые обладают выраженной антивирусной, противоопухолевой, противовоспалительной, ранозаживляющей, антиоксидантной, кровоостанавливающей активностью [6-8].

Актуальность проблемы.

В настоящее время на мировом рынке фармпрепаратов доля средств растительного происхождения составляет более 40 %. Причем в последние годы проявляется выраженная тенденция к ее увеличению и по прогнозам Всемирной организации здравоохранения в течение ближайших десяти лет доля фитопрепаратов в общем объеме лекарственных средств составит более 60 %. Спрос здравоохранения на лекарственные препараты в Казахстане почти на 90% покрывается за счет импорта, доля отечественных препаратов составляет лишь 9-10%. Это вдвое ниже уровня в 20%, рекомендованного Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для обеспечения стратегической безопасности государства.

Передовые научные исследования в области создания новых высокоэффективных отечественных фитопрепаратов и их внедрения в промышленное производство в республике выполняются и рамках Государственной программы развития здравоохранения Республики Казахстан «Денсаулық» на 2016 - 2019 годы. Разработчиком и головной организацией по выполнению данной программы является Республиканское государственное предприятие "Институт фитохимии" Министерства образования и науки Республики Казахстан.

В Республике Казахстан имеется значительный научно - технический потенциал в области разработки и производства лекарственных препаратов растительного происхождения, обширная сырьевая база и возможности ее дальнейшего укрепления.

Работы по созданию новых оригинальных лекарственных препаратов растительного происхождения и внедрению их в промышленное производство, обеспечению конкурентоспособности производимой фармацевтической продукции являются науко- и ресурсоемкими, что делает их в сложившейся в республике экономической ситуации малопривлекательными для инвестирования частными компаниями. Однако зарубежный опыт показывает перспективность и приоритетность данных работ. С учетом сложившейся

инфраструктуры фармацевтической промышленности республики, ее ориентирования на производство лекарственных средств на основе импортируемых субстанций ("дженериков") или завершающие стадии производства готовых лекарственных средств (упаковка), а также концентрацию основного научно - технического потенциала республики в государственном секторе экономики, наиболее рациональным путем финансирования научных разработок в сфере создания оригинальных лекарственных средств является целевое государственное бюджетное финансирование.

Уникальность лекарственных препаратов, создаваемых на основе местного растительного сырья с использованием высоких технологий, обеспечивающих высокое качество лекарственных средств при их низкой себестоимости, послужат решающими факторами в обеспечении конкурентоспособности препаратов, и их дальнейшего ориентирования на внешний рынок.

Научная новизна.

1. Разработаны оригинальные методики спектрометрического количественного определения флавоноидов в надземных частях *Polygonum hydropiper* L.*, P. aviculare* L. и *P. minus* Huds.

2. Установлен качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ (БАВ) в исследуемых видах растений;

3. Разработаны и установлены оптимальные технологические параметры получения сухих экстрактов из исследуемых растений;

4. Впервые составлены лабораторные регламенты выделения суммарных фитопрепаратов из исследуемых растений;

5. Для стандартизации субстанций, разработаны и составлены оптимальные схемы разделения их комплексов БАВ на индивидуальные соединения. Были выделены 10 флавоноидов, 2 жирные кислоты, 3 стерина, 1 фенолкарбоновая кислота, 3 сесквитерпена, 1 эфир жирной кислоты. Арахидоновая кислота и изополипиперовая кислота были выделены впервые из надземной части *P. hydropiper*.

6. Изучены противомикробная, противомалярийная, каннабиноидная и опиоидная виды активностей выделенных соединений и фракций из сухих экстрактов для их возможного применения в медицине.

7 Впервые изучена каннабиноидная активность 3,3’-диметилэллаговой кислоты.

Связь данной работы с другими научно-исследовательскими работами.

Результаты диссертационной работы были включены в отчеты о научно-исследовательской работе по проекту: 2048/ГФ4 «Разработка универсальных экономически эффективных методов селективного выделения промышленно значимых классов биологически активных веществиз растений Казахстана» (№ госрегистрации 0115РК00563), 2015-2017 гг.

Объект исследования – надземные части казахстанских фармакопейных видов растений рода *Polygonum L.*семейства *Polygonaceae Juss* (аптечные образцы): *Polygonum hydropiper, Polygonum aviculare, Polygonum minus.*

Предмет исследования – надземные части трех фармакопейных казахстанских видов по нормативным показателям их качества (фармакопейные статьи) и количественного содержания действующих и сопутствующих веществ, выбор оптимальных экстрагентов, соотношения сырье: экстрагент, метод экстракции и времени экстракции. Биоскрининг полученных потенциальных фитопрепаратов на тест-пробах.

Целью исследования является определение оптимальных параметров технологии выделения субстанций из растений рода *Polygonum* L., и их стандартизация.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать показатели качества изучаемых видов растений (*P. hydropiper, P. aviculare, P. minus*);
2. Установить качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ (БАВ) в исследуемых видах растений;
3. Разработать и установить оптимальные технологические параметры получения сухих экстрактов из исследуемых растений;
4. Разработать лабораторный регламент выделения суммарных фитопрепаратов из исследуемых растений;
5. Для стандартизации субстанций разработать и составить оптимальные схемы разделения их комплексов БАВ на индивидуальные соединения и идентифицировать выделенные вещества.
6. Изучить новые виды активности выделенных веществ и фракций из сухих экстрактов для их применения в медицине.

Сведения о метрологическом обеспечении и методологическая база.

Структуры всех выделенных веществ идентифицированы методами спектрального анализа одномерной (^{1}H и ^{13}C ЯМР, DEPT), двумерной (HMQC, HMBC, COSY). УФ-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

ЯМР-спектры записаны на спектрометрах Bruker Avance DRX - 400 МГц (с экранированным магнитом, зонд 3 мм). 500 МГц (с переменным контролем температуры, зонд 3 мм и 4 мм) и Varian- 400 МГц (с переменным контролем температуры, зонд 3 мм), 600 МГц (с угловым зондом 3 мм для измерения данных ЯМР с микрограммов образца и подавлением воды).

ИК-спектры получены на ПК-спектрофотометре Bruker Vector 33. с возможностями ИК-Фурье в ближней и средней областях (оснащен аксессуарами волоконной оптики для дистанционного зондирования, и HYPERION IRScope с возможностью нарушенного полного отражения для твердофазного анализа).

УФ-спектры записаны на приборе UV-VIS-спектрофотометр компании Hewlett-Packard 8453 с диодной матрицей, который оснащен 7 передвижными термостатированными ячейками и отдельным циркулятором воды. Программный комплекс «Биохимический анализ» позволяет проводить кинетический анализ и мониторинг в режиме реального времени.

Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) были получены на масс-спектрометре Micromass Q-TOF Micro с закрытым источником распыления.

Хроматографическое разделение проводилось на силикагеле (размер пор 70-230, 200-300, 300-400, Merck) и сефадексе LH-20 (Mitsubishi Kagaku. Токио. Япония). Пластинки ТСХ (силикагель 60 А F254) были использованы для мониторинга фракций колоночной хроматографии. Визуализация ТСХ-пластинок проводилась с помощью УФ-лампы (длина волны 254 и 365 нм) и распыления реагента-проявителя: ванилиновый реактив (2 г ванилин + 90 мл этанола + 10 мл серной кислоты) с последующим нагреванием.

Анализ ВЭЖХ проводили на системе HP серии 1100 (Hewlett-Packard, Avondale, Пенсильвания), установленной для определения UV / DAD в интервале 210 и 400 нм. Хроматограммы регистрировали при 280 нм, а пики интегрировали с использованием программного обеспечения HP Chemstation. Колонка была Econosil RP C18, 5 мкм, 250 × 4,6 мм (Alltech, Дирфилд, Иллинойс).

Анализ хромато-масс проводили на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS-QP2010 Shimadzu (Shimadzu Co., Токио). Хроматографические и масс-спектрометрические условия: капиллярная колонка DB-5MS (30 м× 0,25 мм ×0,25 мкм, Agilent, США), начальная температура термостата колонки – 60 ℃ (2 минуты) до 260 ℃ со скоростью нагревания 5℃/мин, время программы - 57 мин. Температура инжектора - 270 ℃, источника ионов - 200 ℃, интерфейса-270 ℃. Газ-носитель – гелий (99.999%) с объемной скоростью 1,0 мл / мин.

Результаты жирнокислотного анализа получали на газовом хроматографе Varian CP-3800 GC с пламенно-ионизационным детектором. Условия хроматографирования: капиллярная колонка DB-23 (Agilent Technologies) (60 м × 0.25 мм), температура инжектора – 270 ^{0}C, детектора – 300 ^{0}C, колонки – 130 - 230 ^{0}C; время детектирования – 38.5 мин.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- сравнительный анализ качественного и количественного содержания основных групп БАВ надземных частей трех дикорастущих видов: *P. hydropiper, P. aviculare, P. minus* произрастающих на территории Республики Казахстан;
- описание технологии получения сухих экстрактов из надземных частей исследуемых растений рода *Polygonum* L.;
- разделение суммарных субстанций на индивидульные компоненты, с последующей спектральной идентификацией;
- результаты биологических тестов выделенных фракций и индивидуальных веществ.

Апробация практических результатов

Основные выводы по теме диссертации нашли отражение в докладах, представленных на международных конференциях и форумах: Young generation forum, World Conference of Scientists and Engineers (WCSE) (Южная Корея, Сеул, 2016 г.), II Евразийском форуме молодых ученых “YES-Forum” при Фонде Первого Президента Республики Казахстан – Лидера Нации (Алматы, 2016 г.), VI Международная научно-практическая конференция «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям» (Полтава, 2017 г.), XI Международная научная конференция

«Инновационное развитие и востребованность науки в современном казахстане» (Алматы, 2017 г.).

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертации опубликованы 9 научных работ, из них 3 статьи в изданиях из перечня, утвержденного Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК: 1 публикация в рейтинговом журнале «Chemistry of natural compounds» и 5 тезисов в материалах профильных международных конференций.

Практическая значимость исследования связана с использованием местной флоры в качестве основного сырья для отечественной фармацевтической промышленности, а также расширением ассортимента лекарственных препаратов собственного производства из фармакопейного сырья, что в перспективе обеспечит внедрение препаратов в медицину. Практическое значение определяется по результатам биоскрининга. Полученные экспериментальные данные могут служить основой для разработки новых лекарственных средств из травы Горец.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Краткое описание растений рода *Polygonaceae Juss.*

Семейство *Polygonaceae* Juss. (Гречишные) – довольно древнее семейство, имеющее около 900 видов из 40 родов [1, с. 11]. Общее распространение: в теплоумеренных и тропических областях северного полушария.

Семейство Гречишные относится к отделу *Magnoliophyta (Angiospermae)*, классу *Magnolyopsida (Dicolydones)*, подклассу *Caryophyllidae,* надпорядку *Polygonanae,* монотипному порядку Гречихоцветные *(Polygonales)*. По строению эндосперма и расположению околоцветника семейство гречишных делится на 3 подсемейства: Щавелевые – *(Rumicoideae*), Гречишные *(Polygonoideae)*, Эригоновые *(Erigonoideae)*, и Кокколобовые *(Coccoloboideae)* – обычно с нециклическим околоцветником.

Подсемейство гречишные включает три трибы: I. *Atraphaxideae* (Курчавка *(Atraphaxis)* и Джузгун *(Calligonum)* – Центральная и Средняя Азия, Северная Африка (роль листьев выполняют ассимилирующие побеги); Птеропирум *(Pteropyrum)* – Иран, юг Средней Азии; II. *Polygoneae* (Горец *(Polygonum)* – около 300 видов, космополит; Гречиха *(Fagopyrum)* – Азия, Кенигия *(Koenigia)* – тундра, альпийский пояс Азии, Европы; *Oxygonum)*; III. *Rumiceae (Rheum, Rumex, Оксирия (Oxyria))* – 1 вид арктический и альпийский, 1 вид в Центральной Азии; Эмекс *(Emex)* – Южная Европа, Южная Африка и Австралия) [5, с.21].

Флора России насчитывает 9 родов подсемейства Гречишных, из которых наиболее широко представлены горцы, щавели и ревени [6]. Во Флоре европейской части России указаны 6 родов. По литературным данным 23 вида трех родов флоры европейской части России относят к сорным – Щавель, Горец, Гречиха [4, с. 77]. Во Флоре РК насчитывается 11 родов семейства Гречишных: кисличник, щавель, ревень, курчавка, жузгун, гречиха, кенигия, горец, аконогонон, фалопия, каллифиза [2,с. 127; 7]. Среди них наибольшее значение имеют щавель (*Rumex*), горец (*Polygonum*), жузгун (*Calligonum*), гречиха (*Fagopyrum*), ревень (*Rheum*).

Род Горец насчитывает около 300 видов; наиболее распространены они в умеренных и тропических широтах. В СНГ насчитывают около 150 видов, во Флоре СССР описано 124 вида; для европейской части СССР приводится 49 видов, Флора Казахстана включает 48 видов [3, с. 442; 7, с. 147].

Из Флоры Казахстана 15 видов имеют промышленные запасы; в медицину внедрено 4 видов [7, с. 147]; один вид является эндемичным видом *P.betpakdalense* Bait.- горец бетпакдалинский, который встречается в Бетпакдалинском раойне и Чу-Илийских горах [2, с. 66; 7, с. 147]. В Растительных ресурсах России описано 49 синонимичных видов горцев, из них 16 казахстанских аналогов [6, с. 127].

4 вида рода Горец включены в ГФ РФ XII: горец перечный (*P. hydropiper*), Г. почечуйный (*P. persicaria*), Г. змеиный (*P. bistorta*), Г. птичий (*P. aviculare*) [8-10]. Таким образом, поиск новых источников биологически активных

соединений среди дикорастущих растений семейства Гречишных далеко не исчерпан.

1.2 Характеристика объектов исследования

1.2.1 Ботаническое описание

Доброкачественность лекарственного растительного сырья в значительной степени зависит от соблюдения сроков заготовки, правильной технологии сбора и режима сушки. При заготовке следует учитывать морфологические особенности лекарственных растений, избегая возможных близких примесей; динамику накопления действующих веществ в сырье, календарный срок сбора.

Травы *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus* заготавливают в фазу цветения, но до фазы бутонизации, в сухую погоду: *P. hydropiper* – в июле или в августе; *P. minus* – в августе и в начале сентября, *P. aviculare* – в период с июля по сентябрь. После сушки собранное лекарственное сырьё содержит до 25 % влаги [9, с. 265].

В таблице 1 приведены внешние диагностические *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus* [9, с. 356; 11-15], необходимые при заготовке этих видов.

Таблица 1 – Морфологическое описание *P. hydropiper и P. aviculare*

Морфологические характеристики	Название растения		
	P. aviculare	*P. hydropiper*	*P. minus*
1	2	3	4
Стебли	приподнимающийся, лежачий или реже прямостоячий, простой или от основания ветвистый, голый, до 30 см	прямостоячий, зелёный или красноватый со слегка вздутыми узлами	цилиндрический, зеленый и слегка красноватый, с короткими междоузлиями с легко укореняемыми узлами
Листья	одинаковые, от узколанцетных до широко эллиптических; различаются только по величине	очередные, продолговато-ланцетные	длинные и узко-сужающиеся, попеременно расположенные
Раструбы	длиннозаостренные, пленчатые, почти до основания прозрачно-серебристые, длиной до 1.0 см	бурые, по краю короткореснитчатые	светло-коричневый, по краю короткореснитчатые по 2-3 мм
Соцветия	мелкие, зеленовато-белые; расположены в пазухах мелких листьев по 2-5	мелкие, невзрачные, с зеленовато-беловатым околоцветником, собраны в узкие прерывистые поникающие колосовидные соцветия	мелкие, бледно-фиолетовые, длиной от 12 до 15 см

Продолжение талицы 1

1	2	3	4
Плоды	почти черный, трехгранный матовый орешек	Трехгранные орешки, блестящие, коричневые или темно-бурые.	черный блестящий выпуклый орешек длиной 1-2 мм
Плоды	почти черный, трехгранный матовый орешек	Трехгранные орешки, блестящие, коричневые или темно-бурые.	черный блестящий выпуклый орешек длиной 1-2 мм
Анатомическая характеристика	околоцветник простой, пятичленный, примерно до половины надрезанный, при плодах растрескивающийся. Тычинок 8	в паренхиме всех надземных органов имеются погружённые вместилища. На околоцветнике они выглядят бурыми точками	околоцветник 2-3 мм, розовый и пурпурно-красный, без желёзок, вместилища отсутствуют

Горец перечный (каз. Бұрыш Таран, с лат. Водяной перец, т.к. влаголюбивое и имеет перечный вкус, *Polygonum hydropiper* L.) – широко распространенное однолетнее травянистое растение, произрастающее по берегам рек и водоемов, заболоченным местам, сырым лугам [14, с. 591]. Широко распространён почти по всей европейской части СНГ (кроме Крайнего Севера), на Кавказе, Западной и Восточной Сибири, южных районах Дальнего Востока. В Средней Азии и Казахстане растет, главным образом, в горных районах [7, с. 147; 9, с. 456].

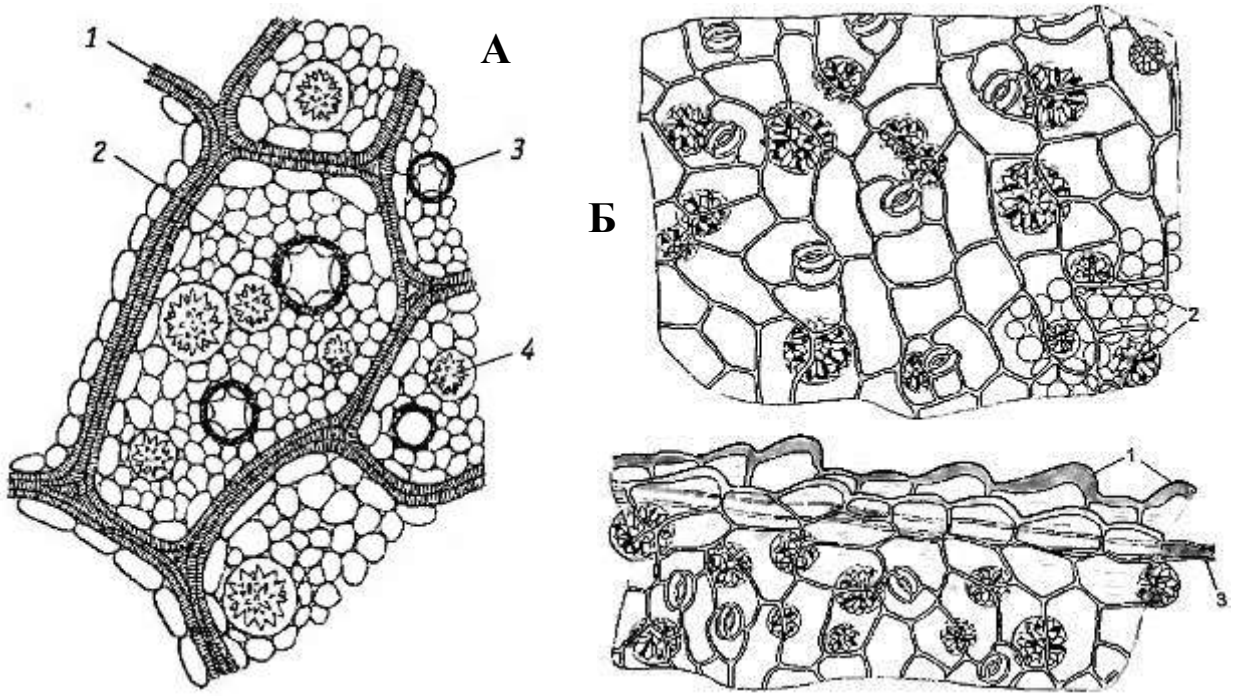
Горец перечный был известен как лекарственное растение в Древней Греции и Риме, о нем упоминает Диоскорид как средство, очищающее раны и разрушающее опухоли. Швейцарский алхимик, врач Парацельс XV-XVI вв. описывал его в качестве наружного раздражающего средства и как болеутоляющее [15, с. 270].

Горец малый (каз. Кіші Таран, *Polygonum minus* Huds., син. *Persicaria minor*) – широко известный как «кесум» в Малайзии, является одним из наиболее часто используемых пищевых добавок, ароматизаторов и традиционно используется для лечения болей в животе и теле. Сырые или вареные листья *P. minus* используются при расстройствах пищеварения в виде отвара, а масло используется при перхоти.

P. minus обычно известен как *phakphai* в Таиланде, *Kleiner Knöterich* в Германии и *Chakhong-machain Manipuri* – в Индии. *P. minus* происходит из стран Юго-Восточной Азии, а именно из Малайзии, Таиланда, Вьетнама и Индонезии. Растет во влажных местах возле рвов, берегов рек и озер. Хорошо выживает в прохладных и холмистых местах [7, с. 147; 16].

Близкие по морфологическим признакам к *P.hydropiper* являются *P. minus* и *P. mite*. Однако отличить данные виды горцев возможно по тонким соцветиям, «растения-примеси» не имеют железок на околоцветнике, а раструбы у них длиннореснитчатые и опушенные. Во всех сомнительных

случаях прибегают к микроскопии [14, с. 591]. Отличительным признаком горца малого является наличие крупных желёзок с многоклеточной головкой, которые обнаружены на листьях и цветках. Клетки эпидермиса г. перечного имеют извилистые стенки, устьица многочисленные, мелкие сидячие железки из 2-4 клеток; «пучковые» волоски, сросшиеся по длине из нескольких одноклеточных волосков, расположены по краю листа и по жилке. Наличие погруженных вместилищ в паренхиме листьев, стебля, околоцветника и раструба является наиболее важным признаком, по которому возможно верно идентифицировать г. перечный. На рисунке 1а изображены основные диагностические признаки во внутреннем строении листа *P. hydropiper* при 280-кратном увеличении [14, с. 593].



1 – жилка, 2 – клетка палисадной ткани, 3 – вместилище, 4 – друза кальция оксалата.

1 – сосочковидные выросты; 2 – друзы кальция оксалата; 3 —механические волокна.

Рисунок 1 – Основные диагностические признаки *P. hydropiper* (А) и *P. aviculare* (Б)

Горец птичий (каз. Кызыл Таспа, *Polygonum aviculare* L., спорыш, птичья гречихи, травка-муравка). Название рода происходит от греческих слов «*poly*» - много и «*gonum*» - сустав или колено, ссылаясь на явно сочлененные стебли. Видовое определение в переводе с латинского означает «птичий», т.к. траву охотно поедают птицы и другие животные [14, с. 595; 17]. *P. aviculare* впервые упоминается канадским путешественником и естествоиспытателем Корнута в книге «*Canadensium Plantarum*» (1635 г.), а также германским ученым Гроновием (1762 г.) во «Флора Вирджинии» [17, с. 482].

Растет вдоль пешеходных троп, в деревнях, по улицам без твердого покрытия, на пашнях, у дорог и водоемов. Встречается как сорное растение на всей территории СНГ, во всех районах Казахстана, европейской части Евразия и Сибири, Северной Америки, Африки, Австралии. Благодаря тому, что *P. aviculare* относят к сорным растениям, промышленные запасы данного вида неограниченны.

При изучении микродиагностических признаков (рисунок 1Б) обращают внимание на следующие особенности [13, с. 99; 16, с. 432]:

1) клетки эпидермиса имеют прямые утолщенные стенки. Стенки клеток верхнего эпидермиса нередко четковидно-утолщенные;

2) устьица окружены обычно тремя околоустичными клетками (анизоцитный тип);

3) по краю листа расположены клетки, вытянутые в сосочек наподобие коротких волосков;

4) в паренхиме листа содержится большое количество крупных друз оксалата кальция.

1.2.2 Физиотерапевтические свойства растений *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus*

1.2.2.1 Горец перечный *Polygonum hydropiper* L.

Настой и жидкий экстракт травы *P. hydropiper* применяют в качестве кровоостанавливающего средства при маточных и геморроидальных кровотечениях, одновременно они обладают болеутоляющим действием [14].

В литературе описаны фармакологические свойства *P. hydropiper:*

– антиоксидантное: изокцерцетрин, 7,4'-диметилкверцетин [18]; 3-сульфат кверцетина, изорамнетин-3,7-дисульфат и 3-глюкозид-7-сульфат тамариксетина [19]; кверцитрин, 3-глюкозид кемпферола, 6-гидроксиапигенин, галлоид-кемпферол-3-глюкозид, 6-гидроксилейтолин, 7-O-β-D-глюкопиранозид 6-гидроксилейтолина, 3-O-β-D-глюкуронид кверцетина, галлоил кверцитрина, кверцетин [20]; гидропипероиды B и ваникозид A [21]; этилацетатная фракция метанольного экстракта листьев [22];

– противогрибковое: конфертифолин [23], полигодиал [25-32];

– антибактериальное: конфертифолин [23], полигодиал [24]; хлороформный экстракт корней [55];

– противогельминтное: метанольный экстракт [33];

– антифедрантное: горячий водный экстракт [34], варбурганал [35,36], полигодиал [36-39];

– цитотоксическое: различные фракции метанольного экстракта надземной части и корней [33,40], полигодиал [41];

– противовоспалительное: метанольный экстракт листьев [42], полигонолид [43], полигодиал [44,45];

– антиноцицептивное: этилацетатный экстракт травы [46], полигодиал [47,48];

– эстрогенность и антифертильность: этанольный экстракт корней [49], стероид-содержащая фракция метанольного экстракта корней [50-52];

– антиадипогенность: метанольный экстракт, изокверцетрин, изорамнетин [53];

– токсикологические эффекты: персикарин [54].

1.2.2.2 Горец птичий *P. aviculare*

Трава *P. aviculare* оказывает благотворное влияние на сердечно-сосудистые проблемы, инфекции [56] и недостатки иммунитета [57,58]. Экстракт был испытан с хорошими результатами против гингивита [59]. Традиционно это растение используется в качестве гемостатического, противомикробного, мочегонного и заживляющего средства [14, с. 597].

Ряд научных работ посвящены изучению следующих фармакотерапевтических эффектов *P. aviculare:*

– антиоксидантный: спиртовый экстракт надземной части [60], водный экстракт [61], 80% метанольный экстракт [62], гексановый, дихлорметановый, метанольный экстракты [63], метанольный экстракт [64];

– противовоспалительный: водный экстракт [61], хлоформный экстракт [65], этанольный экстракт [66-68],

– токсилогический: этанольный экстракт [68];

– ингибирующий клеточное старение: 3-O-β-D-глюкуронид кверцетина [69];

– аллелопатический: этанольный экстракт [70];

– антиатеросклеротический: этанольный экстракт [71];

– антифиброзный: метанольный экстракт [72];

– простатозащитный: водно-спиртовый экстракт [73];

– эякулятивный: водный экстракт [74].

1.2.2.3 Горец малый *P. minus*

Фармакологические исследования *P. minus* продемонстрировали антиоксидантную, *in vitro* ингибирование окисления LDL, противоязвенную активность, анальгетическую, противовоспалительную, антиагрегантную активность *in vitro*, антимикробную активность, пищеварительное свойство и цитотоксическую активность.

Иследованные фармакотерапевтические свойства *P. minus*:

– антиоксидантное: водный, этанольный и метанольные экстракты [75,76];

– противомикробное: петролейный, метанольный и хлороформные экстракты [77];

– антипролиферативное: метанольный [78], гексановый и этилацетатный экстракты [76];

– противоязвенное: метанольный экстракт [75,76];

– противогрибковое: метанольный экстракт [75];

– антивирусное: этанольный экстракт [75];

– пищеварительное: щавелевая кислота;

– цитотоксичность: экстракт петролейного эфира, метанольный и хлороформные экстракты [75];

– противовоспалительное и анальгетическое: водный и метанольный экстракты [78].

Проявление того или иного лечебного действия растительного сырья напрямую связана с качественным и количественным содержанием биологически активных веществ в заготовляемом сырье, а также в зависимости от процессов заготовки, сушки и от активности ферментов [79].

1.3 Химический состав растений *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus*

Для рода *Polygonum* L. характерны следующие классы БАВ: флавоноиды, танины, антоцианы, антрахиноны и стильбены [18, с. 1349]. Однако, *P. aviculare* и *P. hydropiper* относят к перечню флавоноид-содержащих растений с широким спектром фармакологических эффектов [7, с. 147; 14, с. 591, 15, с. 270].

По данным Фармакогнозии [14, с. 592] допускается содержание флавоноидов в растительном сырье *P. aviculare* в пределах 0.2-1% в пересчете на кверцетин, в *P. hydropiper* 2-2.5% в пересчете на авикулярин. Авторы статьи предлагают авторскую методику количественного определения суммы флавоноидов в траве *P. aviculare* в пересчете на рутин методом дифференциальной спектрофотометрии [12, с. 76].

В таблице 2 приведены сравнительные количественные характеристики флавоноидов в *P. hydropiper* и *P. aviculare* по литературным данным и данным, полученным опытным путем из казахстанского сырья. Как видно по результатам таблицы, установленные процентные содержания сумм флавоноидов в казахстанском аналоге *P. aviculare* превышены в 3 и в *P. hydropiper* – 1.5 раза, чем в сырье описанном в литературе.

Таблица 2 – Сравнение количественных оценок содержания суммы флавоноидов по литературным источникам и экспериментальным данным

Растение	Содержание флавоноидов, %	
	Лит. источники	Экспериментальные
Горец птичий	0.2-1 [9,14]	3.41±0.6
Горец перечный	2-2.5 [8]	2.96±0.14
Горец малый	-	2.30±0.32

В исследованиях горцев *P. aviculare*, *P. hydropiper* и *P. minus* были выявлены: амино- и фенолокислоты, флавоноиды, углеводы, полисахариды, сесквитерпены и сесквитерпеноиды, антоцианы. В таблице 3 представлен список химических соединений, выделенных из изучаемых нами растений.

Таблица 3 – Химический состав горцев *P. aviculare*, *P. hydropiper* и *P. minus*

Группы БАВ	*P. aviculare*	Ссылки	*P. hydropiper*	Ссылки	*P. minus*	Ссылки
1	2	3	4	5	6	7
Флавоноиды	7-О-β-D-глюкопиранозид 5,3'-дигидрокси-4'-О-ангелоилфлавона	6	7-метиловый эфир персикарина	6	мирицетин	104, 129
	3-О-α-рамнопиранозид кверцетина	6	мирицетин	6	кверцетин	104, 129
	2’-галлоилмирицетрин, 5,7-дигидрокси-6-метоксифлавон	6	кверцитрин	82, 109	метилфлавонол	104
	5,7-дигидроксифлаван	6	авикулярин	82	флавон	104
	4'-гидрокси-5,7-диметоксифлаван	6, 81	3-О-глюкуронид кверцетина	82	6,7-метилендиокси-5,3″,4″,5″-тетраметоксифлавон	127, 128
	7-О-рутинозид 5-гидрокси-3'-метоксифлаванона	6, 81	3-О-β-(6”-галлоил) глюкозид кверцетина	82		
	изокверцитрин	82	3-О-β-(6”-галлоил) галактозид кверцетина	82	6,7-4″,5″-диметилендиокси-3,5,3″-триметоксифлавон	127, 128
	3-О-β-(6”-галлоил) галактозид кверцетина	82	4’-О-β-глюкозид кверцетина	82		
	кверцетин-3-О-β-(6”-галлоил) глюкозид	82	астрагалин	82	рутин	127, 128
	3-О-β-галактозид кверцетина	82	3-О-β-глюкозид изорамнетина	82	лютеолин	6
	4’-О-β-глюкозид кверцетина	82	7-О-глюкозид лютеолина	82	кемпферол	6
	3-О-рутинозид кемпферола	82	ориентин	82		
	3-О-β-глюкозид изорамнетина	82	пиностробин	110		
	3-О-рутинозид изорамнетина	82	онисилин	110		
	ориентин	82	2',6'-дигидрокси-3',4'-диметоксихалкон	110		
	лютеолин	87, 101	2',6'-дигидрокси-4',5'-диметоксихалкон	110		
	рутин	87	3-О- глюкозид кемпферола	111		

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
	(+)-катехин	87, 106	кверцетин-3-О-глюкозид	111		
	(-)-эпикатехин	87	кемпферол-3-О-глюкозид	111		
	3-О-галлат эпикатехина	84	галлоил-кемпферол-3-О-глюкозид	111		
	ликвиритин	88	апигенин-7-О-глюкозид	111		
	авикулярин	84, 88, 89,	галлоил-кверцетин-3-О-рамнозид	111		
	цинарозид	88	рутинозид кемпферола	111		
	мирицетин	89, 90, 96	кверцетин	111, 116, 117,118		
	кверцетин	84, 89, 91, 96, 97, 103, 107	рамнетин	111		
	югланин	84, 89, 96, 97, 100, 103	гидропиперизод	111		
	астрагалин	90, 97, 100, 105	персикарин	6		
	десмантин-1	90, 96, 97, 103, 105	(2R,3R)-(+)-таксифолин	112		
	кемпферол	91, 96, 97, 103	3,7,3',4'-таксифолина тетраацетат	112		
	кверцитрин	91, 96, 97, 103, 107	5,7,3',4'-таксифолин-тетраметиловый эфир	112		
	мирицетин 3-О-(3"-О-галлоил)-рамнопиранозид	91	3-О-α-L-рамнопиранози-локси-3',4',5,7-тетрагидрокси флавон	113		
	5-гидрокси-3'-метоксифлаванон-О-рутинозид	99				

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
	5,6,7,4,-тетраметоксифлаванон	6	3-О-β-D-глюкопиранозилокси-4 ', 5,7-тригидроксифлавона	113		
	авиквинин	97	6-гидроксиапигенин	113		
	3-О-(3"-О-галлоил)-рамнопиранозид мирицетина	91	6"- О- (3,4,5-тригидроксибензоил) 3-О-β-D-глюкопиранозилокси-3',4',5,7-тетрагидроксифлавон	113		
	3-О-β-D-глюкуронид кверцетина	92 , 93, 94, 95	6-гидрокси лютеолин	113		
	3-О-маннопиранозид кверцетина	6, 81, 96	2"- О- (3,4,5 - тригидроксибензоил) кверцитрина	113		
	мирицитрин	84, 97, 103	3 ', 4', 5, 6, 7-пентагидроксифлавон	113		
	7-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина	98, 81	7-О-β-D-глюкопиранозид 6-гидроксилютеолина	113		
	5-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина	98, 81	скутеллярин	113		
	3-О-β-D-глюкопиранозид кверцетина	98, 81	3-сульфат кверцетина,	114, 120, 121		
	витексин	98, 101	3,7-бисульфат изорамнетина,	114		
	5,7-дигидроксифлаван	99	3-глюкозид-7-сульфат тамариксетина	114		
			7,4'-диметилкверцетин	115		

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
	5,7-дигидрокси-6-метоксифлаван	99	изокверцитрин	115, 116,117, 118		
	5,7-диметокси-4'-гидроксифлаван	99	рутин	116, 117, 119		
	7-О-β-глюкозид морина	81, 99	6,4'-диметоксикверцетин	118		
	авикалин	100	3',4'-диметоксикверцетин	118		
	бетмидин	100	3-О-галактопиранозил кверцетина	118		
	изовитексин	101	3'-метоксикверцитрин	118		
	3-арабинозид кемпферол	101	гиперин	119		
	3-галактозид рамнетина	101	изорамнетин	115, 119, 124		
	3-галактозид кверцетина	101	кемпферол	119		
	арабинозид кемпферола	101	кверцетин-3-О-α-L-рамнозид,	120		
	галактозид рамнетина	101	(+) - катехин	120		
	кверцетин-3-арабинозид, 3-гидрокси-5,7,3',4'-тетраметоксифлавон	102	7-глюкозид кверцетина	122		
	гиперин	103	4',5-дигидрокси-3',7-диметокси-3-флавонол	123		
			3 ',4',5,7-тетраметилкверцетина	123		
			3,7-дигидрокси-5,6-диметоксифлавон	124		
Аминокислоты	аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин,	83	аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин,	83	аспарагиновая кислота, цистеин, пролин, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, триптофан, аланин, валин,	121

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
	лизин, аргинин		тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин		метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин	
Феноло-кислоты	протокатеховая	84, 85, 86, 106	галловая	6, 81, 116, 125	галловая	127
	кофейная	80	метиловый эфир коричной кислоты	109	кумаровая	127
	галловая	80	3,3'-диметиловый эфир эллаговой кислоты	109		
	n-кумаровая,	80	эллаговая кислота 3,3'-ди-О-метиловый эфир	109		
	хлорогеновая,	80				
	метил галлат	80	хлорогеновая	109		
	протокатеховая	80	эллаговая	109		
	феруловая	80				
	сиреневая	80				
Углеводы, полисахариды	глюкоза	81, 126	галактоза	11, 108		
	левулоза (фруктоза)	81	глюкоза	11, 108		
	галактоза	81, 126	арабиноза	11, 108		
	глюконовая и галактуроновая кислоты	81	галактуроновая кислота	11, 108, 126		
	сахароза	81	рамноза	108		
	арабиноза	81, 126				
	рамноза	81, 126				

1.4 Биофлавоноиды и их структурное разнообразие

Флавоноиды – наиболее многочисленная группа природных полифенольных веществ, включающая более 8000 известных отдельных соединений, встречающихся практически во всех частях растений, особенно фотосинтезирующих растительных клетках. Они являются основными компонентами, придающим окраску цветковым растениям Флавоноиды являются неотъемлемой частью питания человека и животных. Потребление флавоноидов может варьироваться от 50 до 800 мг в сутки в зависимости от потребления овощей и фруктов, а также от конкретных напитков. Будучи фитохимическими веществами, флавоноиды не могут быть синтезированы организмами людей и животных [130].

Флавоноиды связаны с широким спектром фармакологических эффектов и являются незаменимым компонентом в различных нутрицевтических, фармацевтических, лекарственных и косметических применениях. Это связано с их малой токсичностью, антиоксидантными, противовоспалительными, противомутагенными и антиканцерогенными свойствами в сочетании с их способностью модулировать ключевые функции клеточных ферментов. Они также известны как сильные ингибиторы для нескольких ферментов, таких как ксантиноксидаза, циклооксигеназа, липоксигеназа и фосфоинозитид-3-киназа [131-134].

Флавоноиды играют разные роли в экологии растений. Из-за их терпкости катехины и другие флаванолы могут представлять собой систему защиты от насекомых, вредных для растения [135]. Флавоноиды действуют как катализаторы в легкой фазе фотосинтеза и/или в качестве регуляторов железных каналов, участвующих в фосфорилировании [136]. Они также могут функционировать как стресс-защитные средства в растительных клетках, создаваемых фотосинтетической системой транспорта электронов [137]. Кроме того, флавоноиды защищают растения от ультрафиолетового излучения Солнца [138].

Благодаря ряду преимуществ, в настоящее время флавоноиды находятся в центре внимания исследователей в области фармакогнозии, фармации и медицины как одни из перспективных и потенциальных источников фитопрепаратов.

Химически флавоноиды основаны на пятнадцатиуглеродном скелете (C_6-C_3-C_6), состоящем из двух бензольных колец (A и B), связанных через гетероциклическое кольцо пирана (C) [131, с. 1898; 132, с. 2; 133, с. 439; 134, с. 1067].

Флавоноиды встречаются как агликоны, гликозиды и метилированные производные. Основная структура флавоноидов - агликон (рисунок 2). Шесть членных циклов, конденсированных с бензольным кольцом, представляет собой либо α-пирон (флавонолы и флаваноны), либо его дигидропроизводные (флавонолы и флаваноны). Положение бензоидного заместителя делит класс флавоноидов на флавоноиды (2-положение) и изофлавоноиды (3-положение).

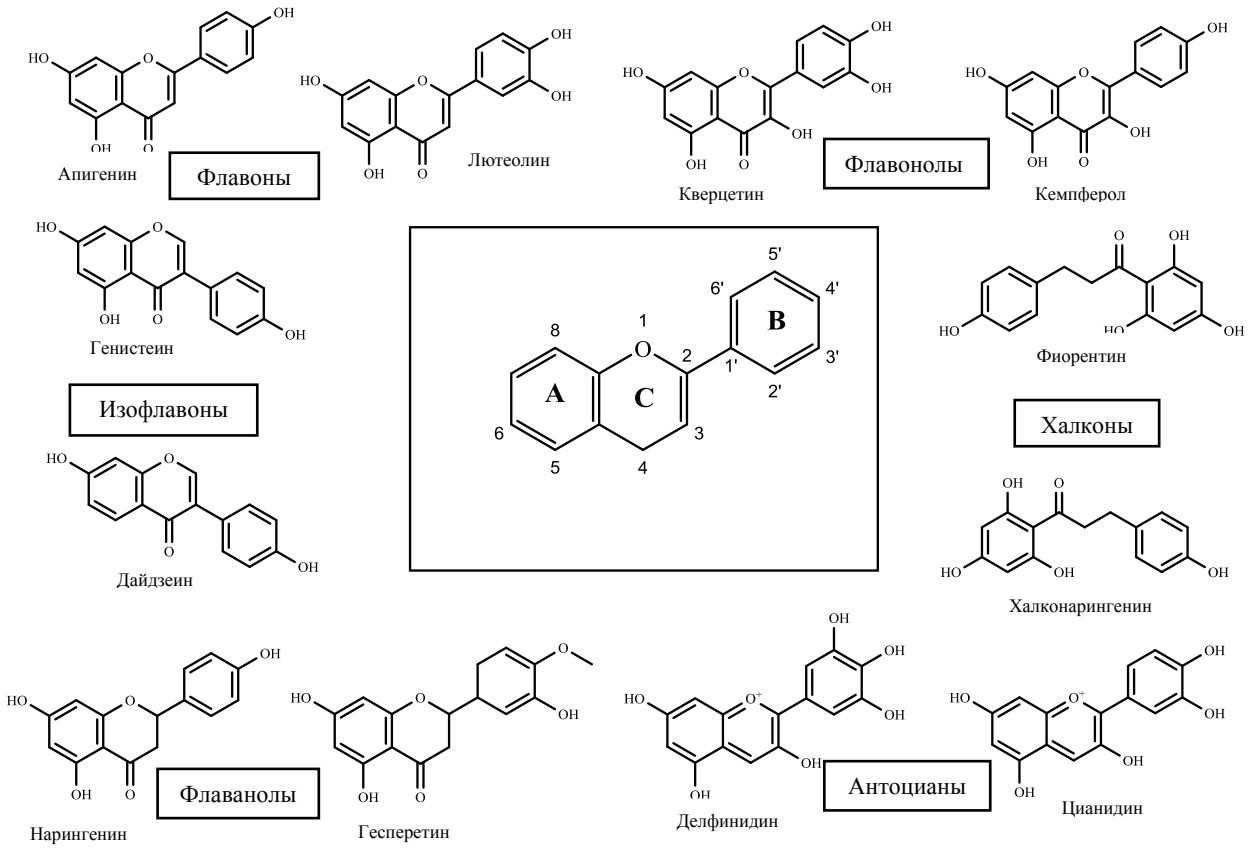


Рисунок 2 – Классы флавоноидов

Флавонолы отличаются от флаванонов гидроксильной группой в 3-положении и двойной связью C2-C3 [139]. Флавоноиды часто являются гидроксилированными положением 3, 5, 7, 2, 3', 4' и 5'. Известны метиловые эфиры и ацетиловые эфиры спиртовой группы. Гликозидная связь обычно находится в положениях 3 или 7, а углевод может быть L-рамнозой, D-глюкозой, глюкорамнозой, галактозой или арабинозой [140].

1.4.1 Путь биосинтеза флавоноидов

Флавоноиды образуются в растениях и участвуют в световой фазе фотосинтеза, в ходе которой они катализируют электронную транспортировку [141]. Они синтезируются из ароматических аминокислот – фенилаланина и тирозина вместе с ацетатными единицами [142]. Фенилаланин и тирозин превращаются в коричную кислоту и парагидроксикоричную кислоту, соответственно, под действием фенилаланина и тирозиновых лиаз [143]. Коричная кислота (или парагидроксикоричная кислота) конденсируется с ацетатными единицами для образования циннамоильной структуры флавоноидов (перестановка Фриза). Различные фенольные кислоты, такие как кофеиновая кислота, феруловая кислота и хлорогеновая кислота, являются производными коричной кислоты.

Затем происходит катализируемая щелочью конденсация орто-гидроксиацетофенона с производным бензальдегида, генерирующим халконы и флавононы (рисунок 3), а также аналогичную конденсацию орто-

гидроксиацетофенона с производным бензойной кислоты (хлорангидридом кислоты или ангидридом), что приводит к к 2-гидроксифлаванонам и флавонам [144].

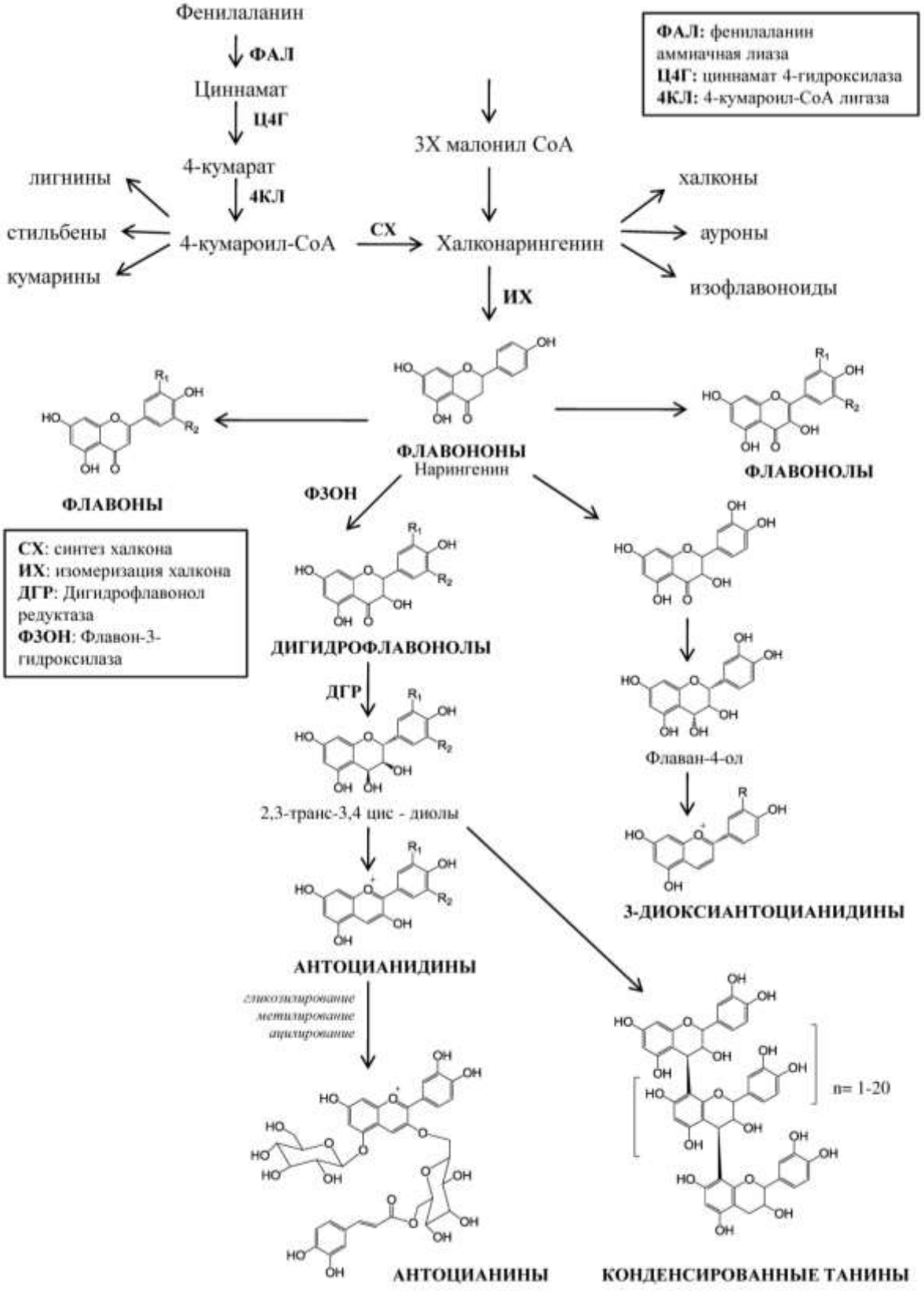


Рисунок 3 – Путь биосинтеза флавоноидов

Синтез халконов и антоцианидинов подробно описал в своей работе Dhar D. N. [145]. Биотрансформация флавоноидов в кишечнике может высвобождать эти производные коричной кислоты (фенольные кислоты) [146]. В терминах их биосинтеза путь фенилпропаноида образует ряд вторичных метаболитов, таких как фенольные кислоты, лигнины, лигнаны и стилбены, в качестве предшественника выступают фенилаланин и тирозин [147].

1.4.2 Растительные источники и биологические свойства флавоноидов

Флавонолы являются наиболее распространенными флавоноидами в продуктах питания. Флавоноиды в пище обычно отвечают за цвет, вкус, профилактику жирового окисления и защиту витаминов и ферментов. Флавоноиды, обнаруженные в больших количествах в рационе человека, включают изофлавоны сои, флавонолы и флавоны. Хотя большинство фруктов и некоторые бобовые содержат катехины, их количество варьируются от 4,5 до 610 мг / кг. Обработка и тепловая обработка пищевых продуктов может снизить уровень флавоноидов в зависимости от используемых методов [141, с. 410].

В таблице 4 приведены некоторые лекарственные растения, содержащие флавоноиды в качестве ведущей группы биологически активных соединений [7, с. 23; 8, с. 45; 13, с. 56; 14, с. 569].

Таблица 4 – Фармакопейные флавоноид-содержащие растения

Растение	Семейство	Орган	Флавоноид	Количественное определение
1	2	3	4	5
Арония черноплодная *Aroniae melanocarpae*	Розоцветные	Плоды	Рутин	1,5%
Астрагала серпоплодный *Astragali falcati*	Бобовые	Цветки и листья	Фларонин или робиния	2%
Бархат амурский *Folia Phellodendroni*	Рутовые	Листья	Флакозид	2,5%
Бессмертник песчаный *Helichrysi arenarii*	Астровые	Цветки	Изосалипурпозид	6%
Бессмертник итальянский *Helichrysi italicae*	Астровые	Цветки	Кверцетин	6-10%
Боярышник обыкновенный *Crataegus laevigata*	Розоцветные	Плоды	Гиперозид	0,06%
Боярышник обыкновенный *Crataegus laevigata*	Розоцветные	Цветки	Гиперозид	0,5%
Бузина черная *Sambuci nigrae*	Адоксовые	Цветки	-	-
Василек синий *Centaureae cyani*	Астровые	Цветки	цианидин-3,5 - дигликозид	0,6%

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Володушка многожильчатая *Bupleuri*	Зонтичные	Трава	Сумма флавонолов	2%
Гинкго двулопастный *Ginkgo bilobae*	Гинкговые	Листья	Рутин	1,5%
Горец почечуйный *Polygoni persicariae*	Гречишные	Трава	Сумма флавоноидов	-
Датиска коноплевая *Datiscae cannabinae*	Датисковые	Листья	Датисцин	8-10%
Зверобой обыкновенный *Hypericum perforatum*	Зверобойные	Трава	Рутин	1,5%
Золотарник канадский *Solidaginis canadensis*	Астровые	Трава	Рутин	3%
Каланхое перистое *Kalanchóe pinnáta*	Толстянковые	Побеги	Флавоноиды и катехины	-
Леспедеца копеечниковая *Lespedezae hedysaroidis*	Бобовые	Трава	Ориентин	1,4%
Леспедеца двуцветная *Lespedezae hedysaroidis*	Бобовые	Трава	Цинарозид	0,25 %
Овес посевной *Avenae sativae*	Злаки	Трава	Сумма флавоноидов	1,5%
Очиток большой *Sedum maximum*	Толстянковые	Трава свежая	Рутин	4%
Пустырник японский *Leonurus japonicus*	Губоцветные	Трава	Гликозиды	-
Расторопша пятнистая *Silybi mariani*	Астровые	Плоды	Силибин	2,4 %
Софора японская *Sophorae japonicae*	Бобовые	Бутоны	Рутин	16%
Софора японская *Sophorae japonicae*	Бобовые	Плоды	-	-
Стальник желтый *Ononis natrix*	Бобовые	Корни	Ононин	1,5%
Фиалка трехцветная *Violae tricolor*	Фиалковые	Трава	Сумма флавоноидов	-
Хвощ полевой Equisetum arvense	Хвощовые	Трава	Сумма флавоноидов	-
Шлемник байкальский *Scutellaria baicalensis*	Яснотковые	Корни	Сумма флавоноидов	10%
Эрва шерстистая *Aerva lanata*	Амарантовые	Трава	Тилирозид	0,5%

Как видно из результатов таблицы 4 для некоторых растений не приводятся значения количественного содержания одного или суммы действующих веществ. Подлинность лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, оценивают с помощью качественных реакций и хроматографических методов. Однако в последнее время активно стали внедряться хроматографические методы. Например, с использованием ТСХ определяют подлинность листьев датиски коноплевой, плодов боярышника,

плодов расторопши пятнистой [7,8,10], причем в этих случаях применяют соответствующие стартартные вещества (датисцин, гиперозид, силибин) [148].

Флавоноиды связаны с широким спектром эффектов, способствующих укреплению здоровья. Они являются неотъемлемым компонентом в различных нутрицевтических, фармацевтических, лекарственных и косметических применениях. Это объясняется их антиоксидантными [149], противовоспалительными [150], антимутагенными [151] и антиканцерогенными [152] свойствами в сочетании с их способностью модулировать ключевые функции клеточных ферментов [153]. В растениях флавоноиды действуют как антиоксиданты, противомикробные средства, фоторецепторы, визуальные аттракторы, подающие репелленты и для светового скрининга. Многие исследования показали, что флавоноиды проявляют биологическую активность, включая антиаллергенные, противовирусные, противовоспалительные и сосудорасширяющие действия [132, с. 132]. На рисунке 4 перечислены основные физиологические роли флавоноидов.

Флавоноиды, содержащиеся в ягодах, могут оказывать положительное влияние на болезнь Паркинсона и могут помочь улучшить память у пожилых людей. Антигипертензивный эффект наблюдался в общей флавоноидной фракции *Astragalus complanatus* у гипертензивных крыс [154]. Потребление антиоксидантных флавоноидов было обратно связано с риском заболеваемости деменцией [155]. Hwang & Yen [156] и Jager & Saaby [157] предположили, что цитратные флаваноны, такие как гесперидин, гесперетин и нарингенин, могут проходить через гематоэнцефалический барьер и могут играть эффективную роль в отношении нейродегенеративных заболеваний.

Флавоноиды обладают способностью действовать как антиоксиданты с помощью механизма освобождения свободных радикалов с образованием менее реакционноспособных флавоноидных феноксильных радикалов (1 и 2); с другой стороны, благодаря их известной способности хелатировать переходные металлы, эти соединения могут инактивировать ионы железа путем комплексообразования, тем самым подавляя реакцию Фентона, вызванную супероксидом (3 и 4), которая в настоящее время считается наиболее важный путь к активным кислородным видам.

$$ROO^{\cdot} + \text{Fl-OH} \longrightarrow ROOH + \text{Fl-O}^{\cdot} \quad (1)$$

$$HO^{\cdot} + \text{Fl-OH} \longrightarrow H_2O + \text{Fl-O}^{\cdot} \quad (2)$$

$$O_2^{\cdot -} + \text{Fe (III)} \longrightarrow O_2 + \text{Fe (II)} \quad (3)$$

$$\text{Fe (II)} + H_2O_2 \longrightarrow \text{Fe (III)} + HO^{\cdot} + OH^{-} \quad (4)$$

Антиоксидантная способность флавоноидов заключается, главным образом, в их способности подавать атомы водорода и тем самым удалять свободные радикалы, образующиеся при перекислении липидов [151, с. 112]. Показано, что кверцетин и силибин, действующие как акцепторы свободных

радикалов, оказывают защитное действие при реперфузионном повреждении ишемической ткани [158, 159]. Улавливающая активность флавоноидов изменяется в следующем порядке: мирицетин > кверцетин > рамнетин > морин > диосметин > нариненин > апигенин> катехин > 5,7-дигидрокси-3 ', 4', 5'-триметоксифлавон > робинин > кемпферол > флавон [160]. Было обнаружено, что кверцетин, мирицетин, кверцетрин и рутин достаточно эффективны в предотвращении перекисного окисления липидов, отвечающее за различные заболевания, такие как атеросклероз, диабет, гепатотоксичность и воспаление, а также старение [161-163].

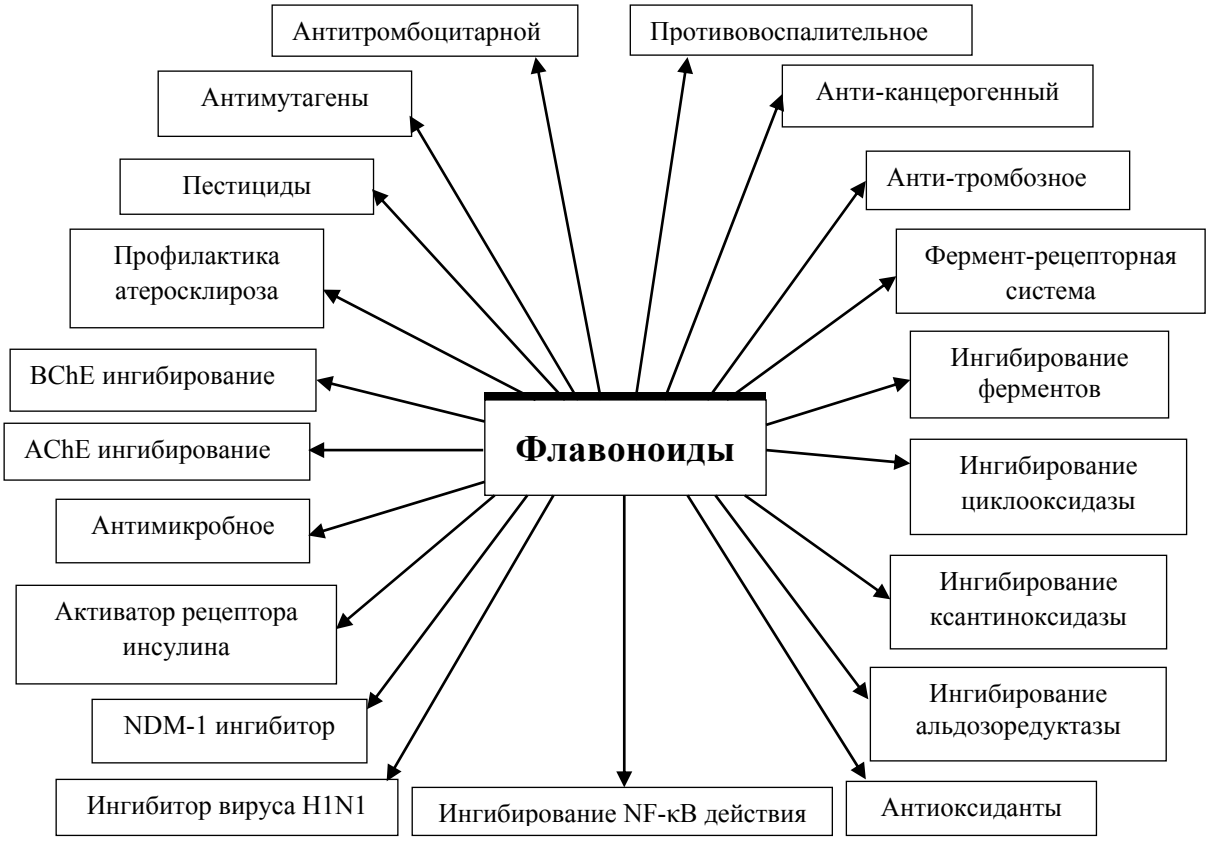


Рисунок 4 – Кумулятивное представление ролей флавоноидов в различных биоактивных веществах, здоровье человека и сельском хозяйстве

Гесперидин, цитрусовый флавоноид обладает значительными противовоспалительными и обезболивающими эффектами [164]. Апигенин, лютеолин и кверцетин проявляют противовоспалительную активность. [165, 166].

Рен и др. [133, с. 440; 167] определили два основных молекулярных механизма действий флавоноидов в качестве противоопухолевых агентов: влияние на цитохром P450, чтобы ингибировать активность некоторых изоферментов P450, которые ответственны за производство ряда прокарциногенов. Также флавоноиды помогают в производстве метаболизирующих ферментов, таких как глютион-S-трансфераза, хинонредуктаза и уридин-5-дифосфо-глюкуронилтрансфераза, с помощью

которых канцерогены детоксифицируются и безопасно выводятся из организма. Это также способствует предотвратить химиотерапевтический эффект флавоноидов против канцерогенов. Ряд исследователей определили противораковые эффекты флавоноидов, таких как тангеритин, 3-гидроксифлавон, 3',4'-дигидроксифлавон, 2', 3'-дигидроксифлавон, физетин, апигрин, лютеолин дайдзеин и генистеин [168, 169].

Антивирусный эффект флавоноидов в терапии вирусной инфекции был изучен Ванг [170]. Флавоноиды, такие как кверцетин, нарингин, гесперетин и катехин, обладают различной степенью противовирусной активности. Они влияют на репликацию и инфекционность определенных РНК и ДНК-вирусов [171]. Кверцетин и апигенин относятся к числу наиболее изученных флавоноидов, которые, как известно, проявляют антибактериальную активность [172]. Некоторые флавоноиды проявляют гормоноподобную активность, и они имеют сходство с стероидными гормонами, особенно с эстрогеном. Исследования определили потенциал генистеин, дайдзеин и эксол для лечения хронических заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания и остеопороз [173, 174].

1.5 Экстракция

Экстракция является первым шагом в анализе лекарственных растений, поскольку для дальнейшего разделения и характеристики необходимо извлечь желаемые химические компоненты из растительных материалов. Основная операция включает в себя этапы, такие как предварительная очистка, сушка растительных материалов или сушка вымораживанием, измельчение для получения гомогенного образца и часто улучшение кинетики аналитической экстракции, а также увеличение контакта поверхности образца с системой растворителей. Необходимо предпринять правильные действия, чтобы гарантировать, что потенциальные активные вещества не будут потеряны, искажены или разрушены во время подготовки экстракта из растительного сырья.

Выбор растворителей во многом зависит от специфики целевого биоактивного соединения. Существуют различные системы растворителей для извлечения биологически активного вещества из натуральных продуктов.

При экстракции гидрофильных соединений используют полярные растворители, такие как метанол, этанол или этилацетат. Для экстракции более липофильных соединений используют дихлорметан или смесь дихлорметан / метанол в соотношении 1:1. В некоторых случаях экстракция гексаном используется для удаления хлорофилла [175]. Поскольку целевые соединения могут быть неполярными и полярными и термически лабильными, следует учитывать пригодность методов извлечения. Обычно используются различные методы, такие как ультразвуковое обследование, нагревание при рефлюксе, экстракция в аппарате Сокслет и др. [176-179].

Кроме того, растительные экстракты также получают путем мацерации или перколяции свежих зеленых растений или высушенного порошкообразного растительного материала в воде и/или системах органических растворителей.

Краткое описание условий эксперимента для различных способов извлечения показано в таблице 5. Другие современные методы извлечения включают твердофазную микроэкстракцию, экстракцию сверхкритической текучей средой, экстракция под давлением, экстракция с помощью микроволн, твердофазная экстракция и методы, опосредованные поверхностно-активными веществами, которые обладают определенными преимуществами. Это сокращение потребления органических растворителей и деградации экстрактов, избежание дополнительных этапов очистки и концентрирования образцов перед хроматографическим анализом, улучшение эффективности экстракции, селективность и кинетика экстракции. Легкость автоматизации этих методов также способствует их использованию для извлечения материалов растений [180].

Таблица 5 – Экспериментальные условия различных способов экстракции

Условия	Экстракция в аппарате Сокслет	Ультразвуковая экстракция	Мацерация
Используемые экстрагенты	Метанол, этанол, смеси спирта и воды	Метанол, этанол, смеси спирта и воды	Метанол, этанол, смеси спирта и воды
Температура, ^{0}C	В зависимости от применяемого экстрагента	Возможно нагревание	Комнатная температура
Давление, атм.	Нет	Нет	Нет
Время, ч	3-18	1	3-4 дня
Объем экстрагента, мл	150-200	50-100	В зависимости от степени измельченности сырья
Ссылки	[181,182]	[181,182]	[183,184]

В последнее время, широко ведутся разработки в применении современных интенсивных методов экстрагирования, очистки и концентрации экстрактов из лекарственных растений. Эти современные методы включают в себя твердофазную микроэкстракцию, экстракцию сверхкритической текучей средой, экстракцию под давлением-жидкости, экстракцию с помощью излучения сверхвысокой частоты (СВЧ-излучение), твердофазную экстракцию и опосредованную поверхностно-активным веществом экстракцию [185-188].

Общим недостатком классических и современных методов экстракции при подготовке образцов для сложных матриц является то, что перед анализом газов или жидкостной хроматографии часто требуются дополнительные процедуры очистки. Для лекарственных растений использование методов отбора проб, таких как Сокслет, СВЧ или PLE, часто приводит к неселективной совместной экстракции относительно большого количества нежелательных компонентов (например, липиды, стерины, хлорофиллы и т. д.), которые могут

серьезно влиять на характеристики разделения и обнаружения последующего анализа ГХ или ВЭЖХ [189-195].

1.5.1 Термодинамика процессов экстракции

Под экстракцией, в общем случае, понимают процесс распределения вещества между двумя смешивающимися жидкостями [196], который предусматривает две технологические операции:

– контактирование исходной смеси с растворителем (массообмен);

– отделение полученного раствора от оставшейся жидкой смеси.

В процессе протекания экстракции для преодоления сил, удерживающих ионы в водной фазе, главным образом вследствие гидратации, необходима химическая связь экстрагента с извлекаемым соединением, но не слишком сильная, так как это затруднит последующую реэкстракцию.

Из правила фаз Гиббса: когда в двухфазной системе растворено два компонента, т.е. нет третьей фазы, то можно фиксировать концентрацию каждого вещества в одной из фаз, т. е. равновесному состоянию соответствует определённое отношение между концентрациями растворённого вещества [197].

Для описания равновесия процесса экстракции используются следующие характеристики:

– коэффициент распределения элемента α;

– константа распределения соединения K_α ,

– коэффициент разделения двух компонентов β.

Коэффициент распределения α есть отношение (5), общей концентрации элемента в органической фазе “y” к общей концентрации его в водной фазе “x” при установлении равновесия.

$$\alpha = \frac{y_{равн}}{x_{равн}} = \frac{y_1 + y_2 + \cdots + y_i}{x_1 + x_2 + \cdots + x_j} \quad (5)$$

где x_1, y_1, x_j, y_i – концентрации элемента в различных химических формах.

Константа распределения соединения K_α – отношение концентрации распределяемого соединения в органической и водной фазах. В частном случае, когда в органической и водной фазах соединение экстрагируемого элемента имеет одинаковый состав, то α и K_α совпадают. При постоянных температуре и давлении условием равновесия является равенство химических потенциалов распределяемого вещества в обеих фазах (6), (7).

$$\mu_{водн} = \mu_{орг} \quad (6)$$

$$\mu^0_{в.ф.} + RT\ln(a_{в.ф.}) = \mu^0_{о.ф.} + RT\ln(a_{о.ф.}) \quad (7)$$

где μ^0в.ф и μ^0о.ф – стандартные химические потенциалы в водной и органической фазах;

$a_{в.ф}$ и $a_{о.ф.}$– активности соединений в водной и органической фазах. Отсюда:

$$К_р = \frac{a_{о.ф.}}{a_{в.ф.}} = \frac{y\gamma_{о.ф.}}{x\gamma_{в.ф.}} = exp\left(\frac{\mu^0_{в.ф.} - \mu^0_{о.ф.}}{RT}\right) \quad (8)$$

где γ_i – коэффициенты активности.

Связь между константой распределения и константой равновесия определяется выражением:

$$К_\alpha = К_р \frac{\gamma_{о.ф.}}{\gamma_{в.ф.}} \quad (9)$$

Из данных эксперимента можно определить $\gamma_{о.ф}$, если известен $\gamma_{в.ф.}$.

Коэффициент разделения β – частное от деления отношений количеств разделяемых элементов в органической и водной фазах:

$$\beta = \frac{y_1/y_2}{x_1/x_2} = \frac{y_1/x_1}{y_2/x_2} = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \quad (10)$$

то есть коэффициент разделения есть отношение коэффициентов распределения двух элементов.

Важной количественной характеристикой экстракционного процесса является степень извлечения элемента ε в органическую фазу от общего количества его в обеих фазах (11).

$$\varepsilon = \frac{yV_{о.ф.}}{yV_{о.ф.} + xV_{в.ф.}} = \frac{y/x}{y/x + V_{в.ф.}/V_{о.ф.}} = \frac{\alpha}{\alpha + V_{в.ф.}/V_{о.ф.}} = \frac{1}{1 + V_{в.ф.}/\alpha V_{о.ф.}} \quad (11)$$

1.5.2 Экстракция флавоноидов

Вся процедура экстракции может быть разделена на различные этапы: предварительная обработка, экстракция, выделение и очистка [198]. Стадии предварительной обработки, представленные на рисунке 5, могут включать мацерацию, гомогенизацию, измельчение, измельчение или сушку (обычно сушка с вымораживанием для предотвращения разложения флавоноидов). Сушка может быть полезна для увеличения выхода на единицу массы сырья, увеличения срока хранения сырья, уменьшения потребности в пространстве и в некоторых случаях для облегчения дальнейшей обработки. Мацерация, измельчение, измельчение и гомогенизация увеличивают площадь контактной поверхности между растворителем и образцом, содержащим растворенное вещество; растворенное вещество представляет собой флавоноид, содержащийся в клеточных структурах биологических образцов. Эти этапы предварительной обработки приводят к разрушению клеточных структур, что дополнительно увеличивает выход биоактивных соединений. Использование вихреобразования с последующим центрифугированием [199], механическое

перемешивание и непрерывная роторная экстракция [200] являются некоторыми другими способами, которые могут быть применены для дальнейшего увеличения молекулярных взаимодействий. Из различных исследований экстракции отмечается, что выбор предварительной обработки не является когерентным, что можно объяснить сложностью свойств флавоноидов. Полярность, кислотность, присутствие гидроксильных групп и ароматических колец являются некоторыми из этих свойств.



Рисунок 5 – Обобщенный путь выделения флавоноидов из растительного сырья

Выбор метода экстракции зависит от источника и типа выделяемого флавоноида. Критерий отбора наилучшего метода экстракции основан на самом высоком восстановлении, для которого деградация соединений из-за разных этапов процесса должна быть минимальной. Сообщается, что некоторые формы флавоноидов (агликоны) легче усваиваются организмом в качестве биологически активного соединения, чем другие формы флавоноидных гликозидов. Таким образом, наряду с параметрами решение о выборе метода экстракции также зависит от требуемого конечного продукта. Жидкостная экстракция является наиболее распространенным методом извлечения

флавоноидов. В настоящее время используются различные типы методов экстракции растворителем, из которых экстракция горячей воды [201, 202] и метод экстракции в аппарате Сокслет [203] являются наиболее распространенными для экстракции БАВ включая флавоноиды. Для сравнения передовых методов с точки зрения их выхода, экстракция в аппарате Сокслет по-прежнему используется в качестве стандарта почти во всех случаях [204, 205]. Метанол или ацетон используют в качестве растворителя для экстракции флавоноидов в аппарате Сокслет.

Процесс экстракции в аппарате Сокслет, используемый в промышленности нутрицевтики, был кратко описан Вангом и Уэллером [206]. Основным недостатком использования экстракции в аппарате Сокслет является сочетание длительных часов экстракции и высокой температуры, которые влияют на извлечение преимущественно термолабильных компонентов, что вызывает беспокойство в случае флавоноидов. Использование больших количеств растворителей также является проблемой с точки зрения устойчивости и защиты окружающей среды. Другой метод экстракции растворителем, такой как экстракция с помощью ультразвука, также используется для экстракции флавоноидов [207]. Использование ультразвука (звуковые волны с частотами выше 20 кГц) может разрушить стенки стенок растений с последующим увеличением проникновения растворителя, что помогает получить более высокий выход экстракции. Ультразвуковая экстракция может быть методом выбора для термолабильных компонентов, так как рабочая температура может оставаться низкой во время этого процесса, тем самым сохраняя качество экстракта [206].

Многие существующие способы извлечения имеют некоторые существенные недостатки, такие как длительное время процесса, что в конечном итоге приводит к термической деградации флавоноидов [201, с. 31] и высоким требованиям к растворителям, повышению затрат на процесс и снижению экологической устойчивости. Присутствие кислорода и света во время экстракции способствует дополнительной деградации целевых соединений. Некоторые из новых методов экстракции, таких как экстракция под давлением, ускоренная флюидная экстракция, докритическая флюидная экстракция и сверхкритическая экстракция, полезны для опосредования связанных с этим проблем добычи наряду с увеличенными извлеченными выходами. Для экстракции флавоноидов в последние годы широко применялась экстракция под давлением [207,208]. Это контролируемый метод извлечения, при котором поддерживаются относительно высокие температуры и давления, тем самым значительно сокращая время экстракции, вплоть более 50% времени, требуемого большинству других методов [209]. Из-за применения высокого давления и высокой температуры скорость экстракции увеличивается с увеличением диффузии растворителя в биологическую матрицу. Этот процесс требует меньшего количества растворителя, а окислительная деградация флавоноидов ниже, поскольку этот процесс не содержит кислорода и света [198,210]. Ускоренная экстракция растворителем представляет собой тип экстракции под давлением под давлением, где диапазон температур составляет

от 50 до 200 °C, давление обычно изменяется от 10 до 15 МПа, а растворитель остается в критическом состоянии в жидком состоянии [206, с. 300].

Растворитель в случае ускоренной экстракции растворителем обычно представляет собой органический растворитель [211,212]. Вода также может использоваться в качестве экстракционной среды; где применение высокого давления позволяет использовать растворитель выше его точки кипения. Как упоминалось Райни (2006), вода теряет свою эффективную полярность при этих высоких температурах, что позволяет ей действовать как растворитель как для полярных, так и для неполярных соединений. Этот метод также известен как докритическая экстракция или экстракция горячей водой под давлением. Добыча горячей воды была эффективно использована для экстракции флавоноидов [213,214].

Сверхкритическая флюидная экстракция – еще один популярный метод, применяемый для извлечения многих биологически активных соединений. Суперкритическое состояние достигается, когда температура и давление повышаются выше их критического значения. Это увеличивает текучесть, что объясняет увеличение массопереноса. Это чистый метод, считающийся экологически чистым, поскольку CO_2 обычно используется в качестве растворителя. Это очень эффективный способ извлечения неполярных соединений, поскольку CO_2 является неполярным растворителем, однако для увеличения растворимости полярных соединений, растворителей, таких как метанол, этанол, ацетонитрил, ацетон, вода, этиловый эфир и дихлорметан может быть добавлен [206, с. 303]. Это увеличивает селективность экстракции этого метода экстракции. Как видно из литературы, модификация композиции растворителя привела к успешной экстракции флавоноидов из биологических матриц, однако для некоторых очень полярных соединений, эффективность экстракции сверхкритической экстракции довольно низкая [215, 216].

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы, реактивы и методы

Объектами исследования явились надземные части фармакопейных растений горец птичий *Polygonum aviculare*, горец перечный *Polygonum hydropiper* и горец малый *Polygonum minus*. Трава была приобретена на заводе-заготовителе ТОО «ТЕС», г. Алматы в 2015 г. Мелкоизмельченная трава расфасована по 50 грамм в полимерные пакеты и картонную коробку, с нанесенной маркировкой. Маркировка включает полное название травы (на русском, латинском и казахском языках), основное фармакологическое и побочные действия, рекомендованная дозировка, срок годности, т.е. подтверждающие соответствия продукта фармакопейной статье [217].

При экстракции сырья, колоночной, ТС-хроматографии, хроматографии на бумаге, для качественного анализа, разделения веществ и кристаллизации использовали растворители марки «Sigma-Aldrich©» (Poole, Dorset, U.K.), за исключением специфических реагентов для проведения биологических исследований: [^{3}H]CP 55,940 (174.8 Ci/mmol), [^{3}H]DAMGO (53.4 Ci/mmol), [^{3}H]U-69,593 (42.7 Ci/mmol) и [^{3}H] энкефалин (45 Ci/mmol) – PerkinElmer Life Sciences Inc. (Бостон, Массачусетс, США). CP 55,940, DAMGO, DPDPE и налоксон гидрохлорид – Tocris Bioscience (Эллисвилль, Миссури, США).

Для экстракции и реэкстракции: метанол, этанол, этилацетат, дихлорметан, бутанол, гексан;

Для колоночной, бумажной и тонкослойной хроматографии: бутанол, уксусная кислота, вода дистиллированная, этилацетат, дихлорметан, гексан;

Для ЯМР-анализа: дейтерохлороформ, дейтерометанол, дейтеродиметилсульфоксид, дейтеропиридин.

Определение температуры плавления веществ проводили на блоке Кофлера.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Хроматографические методы

Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли пластинки на алюминиевой подложке TLC Silica gel 60 W F254S; обращенно-фазовый слой силикагеля TLC RP_8, размер частиц 11-13 мкм (Merck, Германия).

Системы растворителей, применяемые для элюирования ТСХ хроматограмм:

- н-бутиловый спирт-уксусная кислота-вода (40:12.5:29);
- диметилхлорид – метанол – вода (4:3:2);
- дихлорметан:метанол: вода 4:1:0.02;
- дихлорметан:метанол: уксусная кислота 7:3:1;
- дихлорметан:метанол: уксусная кислота 90:10:0.05
- ацетон: петролейный эфир в различных соотношениях;
- этилацетат: гексан 2-30%;

В качестве сорбентов при колоночной хроматографии использовали:

1. Сефадекс LH-20, Sigma Aldrich;
2. Силикагель 200-400 меш., Merck;
3. Обращенно-фазовый силикагель Superspher® 60 RP-8, размер частиц 0.04 - 0.63 мм, Sigma Aldrich;
4. Целит Celite® 545 размер частиц 0.02-0.1 мм, Sigma Aldrich.

Подбор систем элюентов для колоночной хроматографии осуществлялся на основе ТСХ систем растворителей.

Анализ ВЭЖХ проводили на системе HP серии 1100 (Hewlett-Packard, Avondale, Пенсильвания), установленной для определения UV / DAD в интервале 210 и 400 нм. Хроматограммы регистрировали при 280 нм, а пики интегрировали с использованием программного обеспечения HP Chemstation. Колонка была Econosil RP C18, 5 мкм, 250 × 4,6 мм (Alltech, Дирфилд, Иллинойс).

Фракционное разделение растительных экстрактов метод VLC (*vacuum liquid chromatography)* проводили на стеклянных хроматографических колонках различного диаметра, снабженных стеклянным фильтром. Сбор фракций осуществляли в колбы Бунзена, герметично соединенными с колонкой при пониженном давлении. Главное отличие VLC от классического метода жидкостного хроматографирования является проведение первого под вакуумом.

2.2.2 Спектральные методы

УФ-спектры соединений снимали с диагностическими добавками, на приборах СФ-56 и “Specord UV”, ИК-спектры – на приборе UR-75 (таблетки KBr).

^{1}H и ^{13}C ЯМР-спектры были получены на ЯМР спектрометре модели Bruker AMX 500 и 400 со стандартными импульсными последовательностями, работающие на частотах 500 и 400 МГц в ^{1}H и 125 МГц и 100 МГц в ^{13}C соответственно. $CDCl_3$, DMSO-d_6 и CD_3OD использовали в качестве растворителей, а TMS использовали в качестве внутреннего стандарта.

При описании спектров ЯМР обязательно указывают тип растворителя, в котором растворено вещество, и его концентрацию. Так атомы растворителя легко идентифицируются по их химическому сдвигу и могут использоваться для калибровки оси химического сдвига [218]. В таблице 6 описаны химические сдвиги сигналов протонов дейтерированных растворителей [219].

Таблица 6 – Химические сдвиги растворителей, применяемых в ЯМР спектроскопии, м.д.

Спектр	$CDCl_3$ хлороформ	$(CD_3)_2CO$ ацетон	$(CD_3)_2SO$ ДМСО	C_6D_6 бензол	CD_3CN ацетонитрил	CD_3OD метанол	D_2O вода
$\delta^{1}H$	7.26	2.05	2.50	7.16	1.94	3.31	4.79
$\delta^{13}C$	77.16	29.84	39.52	128.06	1.32	49.00	

Наряду с одномерными в аналитических целях использовали гомо- и гетероядерные двумерные корреляционные спектры, основанные на определенной последовательности импульсов (COSY, HMBC, HSQC и др.). В двумерных спектрах взаимодействие между ядрами проявляется в виде сигналов. Положение кросс-пиков определяется значениями химических сдвигов двух взаимодействующих ядер.

Масс-спектры с высоким разрешением (HRMS) регистрировали на масс-спектрометре Micromass Q-Tof Micro с источником блокирующего спрея.

Установление тонкой структуры всех выделенных соединений проводилось в аккредитованной лаборатории Национального центра исследования природных соединений на базе Университета Миссисипи, США и на факультете фармации Хунаньского университета традиционной китайской медицины, Китай.

2.2.3 Хромато-масс спектрометрия

Данные были получены на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS-QP2010 Shimadzu (Shimadzu Co., Токио). Хроматографические и масс-спектрометрические условия: в ГХ системе использовали капиллярную колонку DB-5MS (30 м× 0,25 мм × 0,25 мкм, Agilent, США). Программа температуры была оптимизирована следующим образом: начальная температура термостата колонки – 60 ℃ (2 минуты), запрограммированная до 260 ℃ со скоростью нагревания 5℃/мин, и далее температура поддерживалась в течение 15 минут. Общее время программы составило 57 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий (99,999%) с объемной скоростью 1,0 мл / мин. Объем инъекции составил 2 мл при соотношении 20:1. Температура инжектора, источника ионов и интерфейса составляла 270 ℃, 200 ℃ и 270 ℃ соответственно. Масс-спектрометр работал в режиме электронного воздействия (ЭИ) при энергии 70 ЭВ и напряжении детектора 0,96 кв в режиме полного сканирования при 0,2 С на сканирование (м/з 35-650).

2.2.4 Определение подлинности сырья и числовых показателей

Фармакогностический анализ нормативно регулируется соответствующими общими статьями, определяющие требования к конкретному виду сырья.

Он включает качественные и количественные тесты для проверки или установления идентичности, чистоты и качества растительного лекарственного сырья.

Влажность сырья определяли по методике соответствующей статьи «2.2.32. Потеря в массе при высушивании» [220], содержание золы общей определяли по методике статьи [221], содержание золы нерастворимой в 10% HCl – по методике фармакопейной статьи «2.8.1. Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной» [217,222], содержание экстрактивных веществ определяли по методике [217,223].

2.2.5 Определение макро- и микроэлементного состава

Микро- и макроэлементный состав сырья определяли атомно-адсорбционным методом [217] в РГП КазНУ им. аль-Фараби «Центр физико-химических методов анализа» по следующей методике на атомно-абсорбционном спектрометре Shimadzu 6200 series по ГОСТ 26929-94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов» (2010 г.), ГОСТ 30178-96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов» (2010 г.).

Около 3 г сырья (точную навеску) помещали в предварительно прокаленный и точно взвешенный фарфоровый тигель, смачивали несколькими каплями азотной кислоты концентрированной и осторожно нагревали до удаления паров кислоты и обугливания сырья. Затем тигель помещали в муфельную печь и прокаливали при t=500ºС. Несколько остывший, но еще горячий тигель охлаждали в эксикаторе, после чего содержимое растворяли в минимальном количестве азотной кислоты концентрированной и количественно переносили с помощью дистиллированной воды в мерную колбу на 25 мл. Объем раствора доводили водой дистиллированной до метки. Параллельно проводили холостой опыт, проводя те же самые процедуры, но без растительного сырья.

2.2.6 Фитохимические методы исследования

Качественный состав растений и фракций определяли методами БХ и ТСХ с использованием специфических цветных реакций на основные группы природных соединений. О наличии той или иной группы соединений судили по изменению окраски, появлению мути или выпадению осадка, характерном свечении в УФ-свете. Специфические реактивы на главные группы БАВ, используемые в данной работе были подготовлены согласно источнику [224].

2.2.7 Количественное определение основных групп БАВ

Количественное определение обнаруженных групп природных соединений (дубильные вещества, флавоноиды, кумарины, сумма фенолов и фенолокислот, сапонины, полисахариды, органические кислоты), идентифицированных в растительном сырье горцев проводили по методикам [224, с. 34]. Для анализа применяли одинаковые фармакопейные методы, за исключением методик определения количественного содержания флавоноидов. Для проведения количественной оценки флавоноидов спектрофотометрическим методом предварительно определена длины волны (λ_{max}) с максимальным значением оптической плотности изучаемых экстрактов.

Для установления жирнокислотного состава [225]: 10 г сухого растительного сырья экстрагировали 30 мл C_6H_{14} дважды в течение часа при комнатной температуре. 1 мг высушенного гексанового экстракта, растворенного в 2 мл диэтилового эфира, экстрагировали 2 мл раствора CH_2N_2 в диэтиловом эфире при 20^0С. После полного удаления растворителя и CH_2N_2, исследуемый образец растворили в диэтиловом эфире для анализа на газовом

хроматографе Varian CP-3800 GC с пламенно-ионизационным детектором. Условия хроматографирования: капиллярная колонка DB-23 (Agilent Technologies) (60 м × 0.25 мм), температура инжектора – 270 ^{0}C, детектора – 300 ^{0}C, колонки – 130 - 230 ^{0}C; время детектирования – 38.5 мин.

Реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в слабокислой среде наиболее избирательна, специфична и дает стабильные результаты. Эта реакция положена в основу разрабатываемой нами методики количественного определения суммы флавоноидов в изучаемых объектах.

Определение количественной оценки **флавоноидов** в растительном сырье *P. aviculare* проводили по следующей методике: около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 70% спирта, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще 2 раза указанным выше способом. Объединенные извлечения повторно фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывают 70 % спиртом и доводят объем фильтрата тем же спиртом до метки (раствор А).

4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2 % раствора алюминия хлорида в 95 % спирте и доводят объем раствора 95 % спиртом до метки; через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 385 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 4 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной хлороловодородной кислоты и доводят объем раствора 95 % спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на авикулярин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 12:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{330 \cdot m \cdot (100 - \omega)} \qquad (12)$$

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

Определение количественной оценки **флавоноидов** в растительном сырье *P. hydropiper* проводили по следующей методике: около 1 г (точная навеска) сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90 % спирта, содержащего 1 % концентрированной хлористоводородной кислоты, 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 раз указанным выше способом, затем еще 1 раз 90 % спиртом в течение 30 мин. Извлечения

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 425 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного 95 % спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле 13:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{764.6 \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - \omega)} \quad (13)$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; 764.6 – удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом при 430 нм; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

2.3 Методы выделения БАВ из *Polygonum hydropiper*

Сухой спиртовый экстракт растворяли в 900 мл водного раствора метанола при помощи ультразвукового воздействия. Раствор, предварительно отфильтрованный через слой ваты, последовательно обрабатывали органическими растворителями различной природы: дихлорметан, этилацетат и н-бутанол. Каждым растворителем исчерпывающе экстрагировали 4 раза по 300 мл. Вытяжки объединяли, концентрировали и высушивали на ротационном испарителе. Так из 89 г сухой субстанции травы *Polygonum hydropiper* выделяли 4 фракции: дихлорметановая (5.5 г), этилацетатная (4.6 г), н-бутанольная (4.2) и водный остаток.

Дихлорметановую фракцию фракционируют на колонке, заполненной силикагелем (300 г) и элюируют последовательно системой экстрагентов этилацетат-гексан (0:100, 99:1), метанол-этилацетат (0:100, 14:86). Для этого сухую фракцию растворяют в минимальном объеме дихлорметана и смешивают с 10 г селита, далее смесь высушивают до полного удаления растворителя. Сухую массу вносят в колонку с сорбентом, заполненную «мокрым» способом гексаном. Далее колонку с фракцией элюируют указанными системами растворителей постепенно увеличивая полярность систем.

Вещества **1.1** (2.63 мг), **1.3** (36.4 мг), **1.5** (3.5 мг), **1.7** (39.1 мг) были обнаружены и перекристаллизованы из метанольного экстракта. Фракцию РН-3-3 (784 мг) анализируют на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS-QP2010 Shimadzu (Shimadzu Co., Токио).

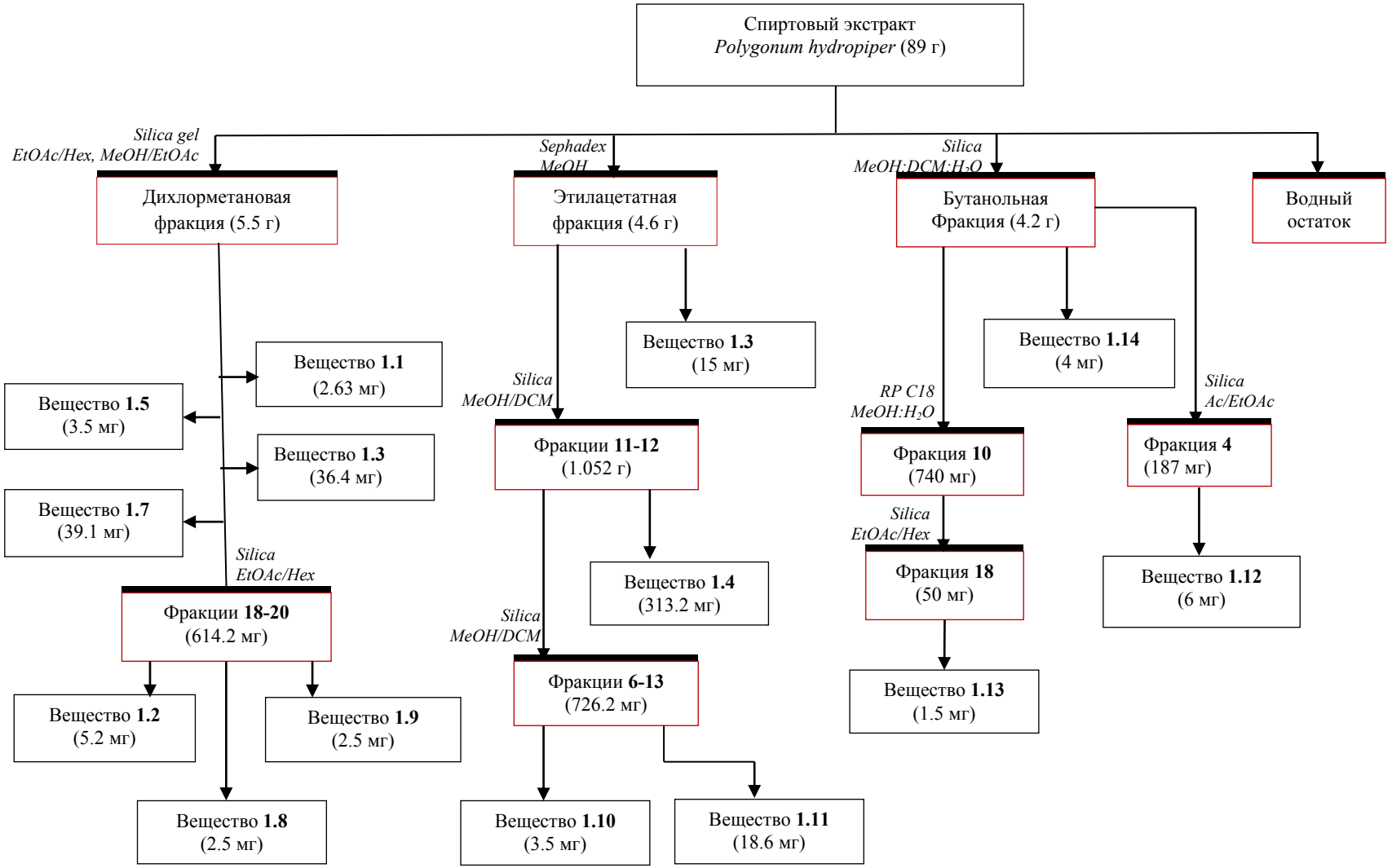


Рисунок 6 – Путь выделения индивидуальных веществ из экстракта *Polygonum hydropiper*

Объединенные фракции РН-3-(18-20) (614 мг) фракционировали в колонке заполненной силикагелем и элюировали системой растворителей этилацетат: гексан (10:90, 32:68). Были выделены и очищены перекристаллизацией горячим ацетоном вещества **1.2** (5.2 мг), **1.8** (2.5 мг), **1.9** (2.5 мг).

Этилацетатную фракцию (4.6 г) помещали в колонку заполненную сефадексом марки LP-20 (200 г) и элюировали метанолом.

Полученные фракции объединяли по схожему пробегу R*f* и концентрируют в мягких условиях. Вещество **1.3** (15 мг) было повторно выделено в чистом виде. Из фракции РН-4-(11-12) (1.052 г), которую повторно хроматографировали в хроматографической колонке заполненной силикагелем и проводили элюирование в системе растворителей метанол: дихлорметан (5:95, 12:88, 100:0), выделили чистое вещество **1.4** (313.2 мг). Из 13 объединенных фракций была отобрана фракция РН-6-13 (726.2 мг) для дальнейшего разделения, которую элюировали в колонке заполненной силикагелем системой растворителей метанол: дихлорметан (5:95, 20:80, 100:0). В результате были получены два вещества **1.10** (3.5 мг) и **1.11** (18.6 мг).

Бутанольную фракцию (4.2 г) хроматографировали через колонку заполненную силикагелем и элюировали системой растворителей метанол:дихлорметан:вода 20:78:2. Из выделенных 16 объединенных фракций, обнаружено и перекристаллизовано из дихлорметана вещество **1.14** (4 мг).

Фракция РН-17-10 массой 740 мг элюировали методом ТФЭ на обращенно-фазовом силикагеле (C_8-картридж, Supelco) системой растворителей метанол-вода (30:70). Полученные фракции проверяли на ТСХ и объединяди. Далее фракцию РН-18-18 (50 мг) помещали в микроколонку, заполненную силикагелем (200-300 мерш) элюировали этилцетат: гексан (1:99,5:95), что привело к получению вещества **1.13.** Фракцию РН-17-4 (187 мг), выделенная из колонки с бутанольной фракций, элюировали системой ацетон: этилацетат (5:95, 20:80) через слой силикагеля. Было выделено вещество **1.12.**

На рисунке 6 представлен схематически общий подход к выделению индивидуальных веществ из травы *Polygonum hydropiper*.

2.4 Методы выделения БАВ из *Polygonum aviculare*

Сухую массу экстракта *Polygonum aviculare* (93 г) растворяли в водном растворе метанола при ультразвуковом воздействии, далее раствор фильтровали через ватный слой для отделения не растворившихся балластных веществ. Фильтрат последовательно обрабатывали до полного извлечения органическими растворителями различной природы с полученим следующих фракций: дихлорметановая, этилацетатная, н-бутанольная массами 6.0, 8.3, 5.6 г, соответственно.

Высушенную дихлорметановую фракцию с селитом вносили в колонку, заполненную силикагелем (300 г) и элюировали этилацетат: гексан (1:99, 25:75), метанол-дихлорметан (1:99, 10:90). Выделили 3 индивидуальных вещества: **2.1** (25.1 мг), **2.2** (19.3 мг), **2.3** (34 мг). Фракцию РА-2-7 (421 мг) анализировали на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS-QP2010 Shimadzu (Shimadzu Co., Токио).

Этилацетатную фракцию элюировали через обращеннофазовый силикагель С18 (300 г) через колонку высотой 20 см и диаметром 7 см системой растворителей 40, 60, 80, 100% метанол: вода. Полученные четыре фракции, концентрировали на ротационном испарителе под вакуумом. Одну, из полученных фракций, РА-20-4 (830.3 мг) вносили вместе с селитом в колонку с силикагелем и элюировали метанол: дихлорметан (0:100, 10:90). Фракцию РА-21-3 (400 мг) элюировали ацетон: гексан (1:99, 10:90) и дихлорметан (100%) через слой силикагеля. Было выделено вещество **2.4** (3.5 мг) и перекристаллизовано из горячего ацетона. Далее одну полученных фракций РА-22-2, повторно элюировали метанол: дихлорметан (0:100, 10:90), что привело к выделению вещества **2.5** (5.7 мг).

На рисунке 7 представлен схематически общий подход к выделению некоторых метаболитов из травы *Polygonum aviculare.*

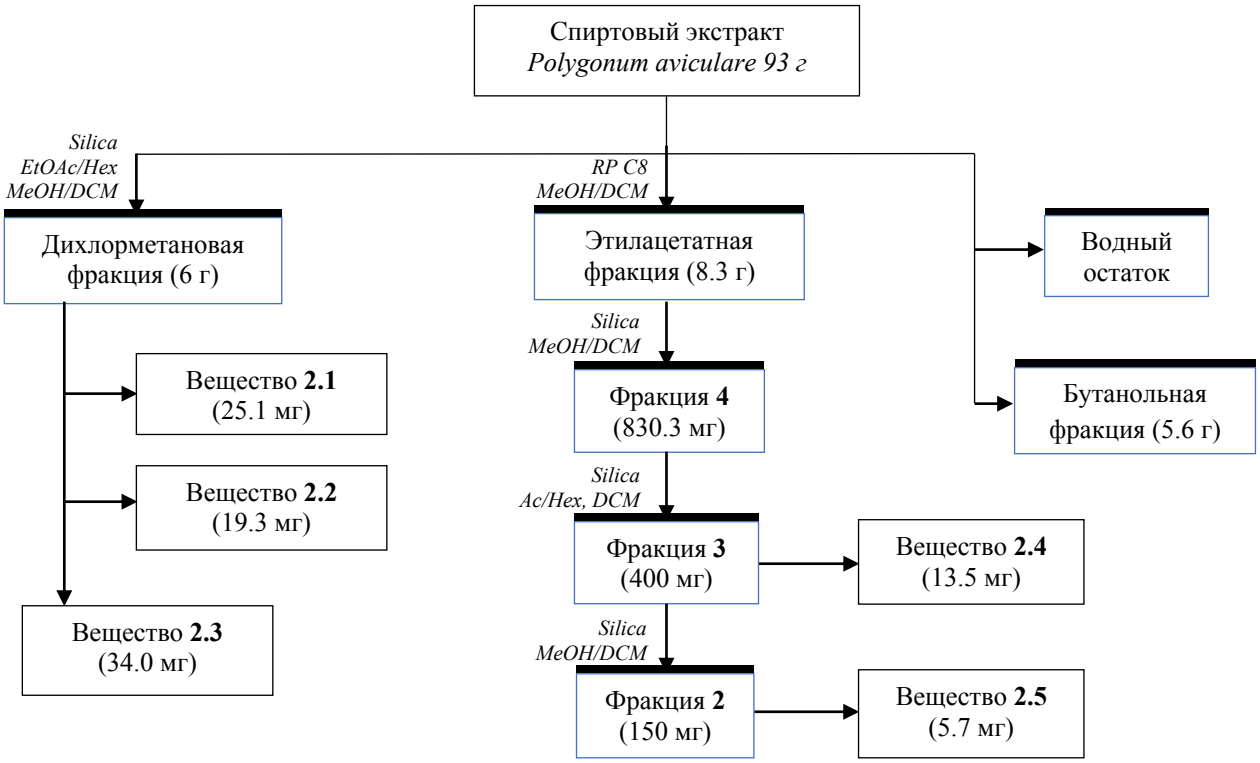


Рисунок 7 – Путь выделения индивидуальных веществ из экстракта *Polygonum aviculare*

2.5 Методы отработки технологии выделения БАВ

Подбор **оптимального экстрагента** осуществляли на основе результатов качественного анализа основных групп БАВ и количественного выхода экстрактивных веществ методом настаивания и при нагревании в течение 1 часа. Было отработано 12 разнополярных экстрагентов: индивидуальные растворители и их смеси в различных соотношениях. Природа экстрагентов подобрана таким образом, чтобы определить весь комплекс соединений в растительном сырье, а также выявить преимущественное содержание некоторых из них.

К оптимальному экстрагенту предъявляют ряд требований:

– избирательность – максимально извлекать действующие вещества из сырья и минимально - балластные;

– смачиваемость - экстрагент должен хорошо смачивать растительный материал с тем, чтобы он мог свободно проникать через клеточные мембраны;

– дешевизна и доступность для производства с экономической точки зрения;

– экологичность – выбор экстрагента обусловлен экологическими требованиями к производству и обнаруженной зависимостью массовой доли экстрактивных веществ в сырье и массовой доли флавоноидов в извлечениях от состава экстрагента.

По сравнению со всеми органическими растворителями, применяемыми в качестве экстрагентов, этиловый спирт имеет следующие преимущества: не образует вредных соединений с экстрагируемым веществом, не вызывает коррозии оборудования, доступен как многотоннажный продукт химической промышленности, имеет относительно низкую температуру кипения. Также этиловый спирт является достаточно хорошим консервантом и экологически безопасен. Это позволяет использовать полученные на его основе препараты как в парфюмерно-косметической промышленности, так и в медицине.

Для изучения зависимости **соотношения сырье - экстрагент** на выход БАВ, измельченное сырье заливали пяти-, шести-, семи-, десяти-, двенадцати- и пятнадцатикратным количеством экстрагента настаивали в течение 1 часа, после чего определяли выход экстрактивных веществ и флавоноидов указанными выше методами.

Степень измельчения обеспечивающая наибольший выход экстрактивных веществ и наименьшие затраты экстрагента и времени, определяли непосредственно при получении экстракта из растительного сырья. Измельченное сырье с различными размерами дисперсности 0.5, 1.0, 2.0 и 3.0 мм заливали экстрагентом известным избытком и настаивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Экстракт фильтровали и определяли выход экстрактивных веществ и флавоноидов.

Метод экстракции. При методе бисмацерации рассчитанное количество экстрагента делили на две равные порции. Измельченное лекарственное сырье заливали первой порцией экстрагента и оставляли для настаивания на трое суток. Извлечение сливали, сырье отжимали, заливали второй порцией экстрагента и настаивали в течение 24 часов. Обе вытяжки объединяли и определяли выход экстрактивных веществ и флавоноидов указанными выше методами [210, 217, 223].

Метод перколяции включал стадии набухания в течение 1 часа, мацерационной паузы - 6 часов и собственно перколяции. Скорость перколяции рассчитывалась, исходя из рабочего объема перколятора, и составляла 15 капель в минуту.

Для проведения реперколяции лекарственное растительное сырье делили на 3 равные части, которые загружались в три перколятора.

Сырье в каждом последующем перколяторе экстрагировали извлечением, полученным из предыдущего перколятора. Готовый продукт получали из последнего перколятора.

Определение оптимальной **длительности экстракции** проводили после того как были отработаны предыдущие технологические параметры и определен оптимальный метод экстракции. Поскольку для травы *P. hydropiper* оптимальным явился метод бисмацерации, которая предполагает двухступенчатую экстракцию, то определяли оптимальную длительность каждой из ступеней экстракции. Для этого засыпали около 10 г сырья (точная навеска) в 5 круглодонных колб (100 мл), заливали подобранным экстрагентом в выбранном соотношении и настаивали 6, 12, 18, 24, 36 и 48 часов. Экстракты по истечению указанных временных интервалов, отфильтровывали и определяли содержание экстрактивных веществ и флавоноидов. После определения оптимального времени настаивания опыт повторили 3 раза. После первичной экстракции шрот заливали свежими порциями экстрагентов и настаивали каждую 2, 4, 6, 8 часов. Экстракты по истечению указанных временных интервалов, отфильтровывали и определяли содержание экстрактивных веществ и флавоноидов.

Как было описано выше, при отработке метода экстракции, метод перколяции (*P. aviculare*) включал стадии набухания в течение 1 часа, мацерационной паузы - 6 часов и собственно перколяции. После настаивания определенного времени (6, 12, 18, 24, 36 и 48 часов) экстракт сливали и направляли на экстракцию в перколятор 2, после второй экстракции экстракт сливали и направляли в перколятор 3. Экстракт сливали и определяли содержание экстрактивных веществ и флавоноидов [223, с. 3].

В перколятор 1 заливали свежую порцию спирта и повторяли выше описанные операции дважды.

Режим концентрирования экстракта подбирался, основываясь на доводах в пользу максимального сохранения полезных свойств экстрагента двумя параметрами: температура и давление. Соответственно, выбран режим концентрирования при температуре не выше 50ºС и давлении < 1 атм.

Технологические свойства растительного сырья включали следующие параметры: насыпную массу, степень и коэффициент набухания сырья в экстрагенте.

Насыпная масса (H_m) – в мерный, предварительно взвешенный цилиндр на 100 $см^3$ свободно насыпают измельченный растительный материал со стандартным уплотнением (сырье засыпают отдельными порциями при легком постукивании по стенке цилиндра) до метки (постоянного объема). Затем цилиндр с срьем или высыпанное сырье взвешивают с точностью до 0.01 г. Насыпную массу определяли отношением массы растительного сырья к его объему:

$$H_m = \frac{M}{V} \quad (14)$$

где М – масса сырья, г; V – объем сырья, см^3.

Угол естественного откоса (φ) определяли, насыпая измельченный материал в виде конуса на ровную поверхность и измеряя угол откоса при помощи визирной линейки или транспортира. Чем меньше угол, тем лучше сыпучесть материала.

Для расчета степени набухаемости сырья 10 г растительного сырья заливали отмеренным количеством экстрагента (100 мл) на 3 ч. Затем сливали свободный экстрагент в мерный цилиндр и определяли его объем, а увлажненный растительный материал взвешивают. Рассчитывали количество экстрагента, поглощенного единицей массы растительного сырья, и устанавливают увеличение объема растительного сырья.

Коэффициент поглощения сырья (К) определяли по формуле 15:

$$К = \frac{m}{m_0} \quad (15)$$

где m – масса сырья после набухания, г; m_0 – навеска сырья, г.

Степень набухания (α) определяли по формуле 16:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (16)$$

где m – масса сырья после набухания, г; m_0 – навеска сырья, г.

2.6 Фармакологические методы исследования

2.6.1 Противомикробный и противогрибковый скрининг

Все организмы были получены из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA) и включали грибы *Candida albicans* ATCC 90028, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 и *Aspergillus fumigatus* ATCC 90906, устойчивую к метициллину бактерию *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRS), *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068. Испытание на восприимчивость проводилось с использованием модифицированной версии метода CLSI (ранее NCCLS) [226]. Образцы серийно разводили в 20% ДМСО / физиологический раствор и переносили в двухслойные 96-луночные планшеты с плоским дном.

Микробные инокулы получали путем коррекции OD_{630} суспензий микробов в инкубационном бульоне с получением конечного целевого инокулята. Контроль лекарственных средств [Ципрофлоксацин (ICN Biomedicals, Огайо) для бактерий и амфотерицин B (ICN Biomedicals, Огайо) для грибов] были включены в каждый анализ. Все организмы считывали либо на 630 нм, используя EL-340 Biokinetics Reader (Bio-Tek Instruments, Вермонт), либо на 544ex/590em (*M. intracellulare, A. fumigatus*) с использованием Polarstar

Galaxy Plate Reader (BMG LabTechnologies, Германия) до и после инкубации. Минимальные бактерицидные концентрации (MBC) определяли удалением 5 мкл из каждой прозрачной лунки, переносом на агар и инкубацией. MBC определяется как самая низкая концентрация теста, которая убивает организм (не увеличивает рост агара).

2.6.2 Противомалярийный биотест

Метод проведения противомалярийного биоиспытания *in vitro* проводили по ранее опубликованной методике [227]. Анализ основан на определении активности плазмодиального лактатдегидрогеназы. Для анализа суспензию красных кровяных телец, инфицированных штаммами D6 или W2 *P. falciparum* (200 мкл, с 2% паразитемией и 2% гематокритом в среде RPMI 1640, дополненной 10% человеческой сывороткой и 60 мкг/мл Амикацина), добавляли в лунки 96-луночного планшета, содержащего 10 мкл испытуемых образцов, разбавленных в среде при различных концентрациях. Пластину помещали в модульную камеру инкубации (Billups-Rothenberg, Калифорния), промытую газовой смесью 90% N_2, 5% O_2 и 5% CO_2, и инкубировали при 37°C в течение 72 часов. Паразитарную активность лактатдегидрогеназы определяли с помощью Malstat™ реагента (Flow Inc., Портланд, Орегон) в соответствии с методикой Маклера и Хинрикса [228]. 20 мкл инкубационной смеси смешивали с 100 л Malstat™ реагента и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем добавляли 20 мкл смеси 1: 1 NBT / PES (Sigma, Святой Луис, Миссури) и планшет дополнительно инкубировали в темноте в течение 1 часа. Затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 5% раствора уксусной кислоты. Пластину считывали при 650 нм с использованием EL-340 Biokinetics Reader (Bio-Tek Instruments, Вермонт). Значения IC_{50} рассчитывались по кривым зависимости доза-реакция. Артемизинин и хлорохин включали в каждый анализ, когда контролировали лекарственное средство. ДМСО (0.25%) использовали в качестве контроля за подвижной фазой.

2.6.3 Опиоидная активность

Анализ опиоидных связываний проводили в следующих условиях: независимые триплетные разведения 10 мкМ соединения инкубировали с 0,85 нМ [^{3}H] -DAMGO (μ), 0.91 нМ [фенил-3,4-^{3}H] -U-69,593 (κ) или 0,99 нМ [^{3}H] -DPDPE (δ) в течение 60 мин в 96-луночном планшете в 0,2 мл конечного объема 50 мМ Трис-HCl, pH 7,4, с 15 мкг (κ) или 20 мкг (μ и δ) мембраны. Реакцию завершали быстрой вакуумной фильтрацией через фильтр UniFilter 96 GF / B, предварительно промытый 0,3% BSA, с последующим 10-тикратным промыванием при 4 °C 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Фильтры сушат, добавляют 50 мкл MicroScint20 и планшеты считывают с помощью сцинтилляционного счетчика микропланшета TopCount NXT. Полное связывание, специфическое связывание и смещение в процентах рассчитывали по следующей формуле 17:

$$\% \text{ связывания} = \frac{100 - [\text{СВ} - \text{НС}]}{\text{СС}} \times 100 \quad (17)$$

где СВ – связывание вещества, НС – неспецифическое связывание, СС – специфическое связывание.

Неспецифическим связыванием было связывание, наблюдаемое в присутствии 10 мкМ DAMGO (μ), U-69593 (κ) или DPDPE (δ). Анализ конкурентного связывания проводили путем тестирования 12 3-кратных серийных разведений 300 мкМ соединения и 3 мкМ контроля (налоксон-гидрохлорид) с 15 мкг мембраны δ и 1,87 нМ [^{3}H] -DPDPE. Значения Ki рассчитывались по модели нелинейной кривой, используя программное обеспечение GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, США) [229].

2.6.4 Каннабиноидная активность

Анализ связывания каннабиноидного рецептора проводили при следующих условиях: 10 мкМ каждого соединения из независимых трехкратных разведений инкубировали с 1675 нМ (CB_1) или 1,959 нМ (CB_2). [^{3}H]-CP 55,940, мощный агонист каннабиноидов с аффинностью как для подтипов рецепторов, так и 5 мкг CB_1 или 1 мкг мембраны CB_2 инкубировали в течение 90 минут при 37 ^{o}C осторожно перемешивая, в 96-луночном планшете в 0,2 мл конечного объема 50 мМ HCl, 20 мМ ЭДТА, 154 мМ NaCl и 0,2% радиоиммуноанализа BSA, pH 7,4. Реакцию останавливали путем быстрой вакуумной фильтрации через фильтр UniFilter 96 GF / C (PerkinElmer Life Sciences Inc., Бостон, Массачусетс, США), предварительно промывали 0,3% полиэтиленимином, а затем 10-тикратно промывали 50 мМ Трис-HCl, pH 7,4, буфер, содержащий 0,2% BSA. Фильтры сушили, добавляли 25 мкл MicroScint20, и планшеты считывали с использованием сцинтилляционного счетчика микропланшета TopCount NXT (PerkinElmer Life Sciences Inc., Бостон, Массачусетс, США). Полное связывание определяли как связывание в присутствии носителя (1,0% ДМСО). Неспецифическим связыванием было связывание, наблюдаемое в присутствии 10,0 мкМ CP-55,940. Специфическое связывание определяли как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Процентное смещение рассчитывали по формуле 17 [229, с.1464].

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Фармакогностический анализ

Фармакогностический анализ растительного сырья – это комплекс методов анализа, позволяющих определить подлинность и доброкачественность. Процесс стандартизации может быть достигнут путем ступенчатых фармакогностических исследований. Эти исследования помогают идентифицировать и аутентифицировать растительный материал. Корректная идентификация и обеспечение качества предпосылки для обеспечения воспроизводимого качества травяной медицины, которая будет способствовать повышению ее безопасности.

Простые фармакогностические методы, используемые при стандартизации растительного материала, морфологические, анатомические, фитохимические и товароведческие характеристики.

Фармакогностический анализ нормативно регулируется соответствующими общими статьями, определяющие требования к конкретному виду сырья [220, с. 54].

3.1.1. Микро- и макроэлементный анализ

С медицинской точки зрения наиболее важными компонентами растений являются фармакологически активные соединения, такие как флавоноиды, алкалоиды, гликозиды и многие другие органические вещества. Кроме того, лекарственные растения содержат существенные макро- и микроэлементы, которые могут быть доступны организму человека из любого вида потребления трав и их экстрактов.

Для многих химических элементов существует ограниченный диапазон между дефицитом и токсичностью для человеческого организма. Таким образом, адекватное установление руководящих принципов в отношении здоровья для пищевых продуктов часто затруднено. Содержание основных и микроэлементов в растениях определяется как геохимическими особенностями почвы, где растение растет, так и способностью растений аккумулировать элементы выборочно. Кроме того, растения могут накапливать элементы из окружающей воздушной или водной среды, позволяя некоторым растениям использоваться в качестве биомониторов для загрязнения окружающей среды. Возможное влияние металлов на фармакологическое действие травяных настоев является наиболее очевидной причиной того, что необходимо знать содержание металла. Кроме того, географическое происхождение растений, принадлежащих к одному и тому же виду, может привести к разным концентрациям элементов и их биодоступности в зависимости от особенностей почвы и загрязнения окружающей среды. Химическая характеристика может быть методом проверки подлинности происхождения элементов. Концентрация тяжелых металлов является одним из критериев, позволяющих получать сырые растения при производстве синтетических наркотиков. В настоящее время нет общих установленных ориентировочных значений для допустимых уровней основной части металлов или основных элементов в лекарственных травах.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) указывает предельно допустимые уровни в сырьевых материалах только для кадмия (0.3 мг/кг$^{-1}$), мышьяка (1 мг/кг$^{-1}$) и свинца (10 мг/кг$^{-1}$) [230, с. 51]

Предельно допустимые концентрации для БАД на растительной основе, действующие и для оценки качества ЛРС согласно проекту ОФС «Определение тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» и оптимальные физиологические потребности для взрослого человека в сутки приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Физиологические суточные потребности человека и предельно допустимые концентрации микро- и макро-элементов

Элементы	ПДК мк/мг	Оптимальная физиологическая потребность для взрослого человека в сутки, мг	Порог токсичности мг/сут	Всасываемость, %
Na	-	-	-	-
K	-	2500	-	100
Mg	-	400	-	30
Cu	5	2.0-2.5	200	50
Ni	3	0.6-0.8	-	-
Fe	5	15.0-20.0	200	10
Mn	-	5.0-6.0	40	10
Zn	10	10.0-12.0	600	50
Ca	-	800-1200	-	30
Cd	1.0	-	-	-
Pb	6.0	-	-	-

Таблица 8 – Макро-и микроэлементный анализ некоторых растений рода *Polygonum* L. , мкг/мл

Элементы	*P. hydropiper*	*P. aviculare*	*P. minus*
1	2	3	4
Na	15.5	14.3	15.6
K	828.7	834.8	811.3
Mg	234.5	160.3	244.01
Cu	0.103	0.094	0.106
Ni	0.031	0.047	0.025
Fe	7.71	6.05	6.15
Mn	1.73	9.41	4.86
Zn	0.867	1.04	0,942
Ca	308.2	268.3	254.56
Cd	0.011	0.037	0.096

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4
Pb	—	—	—

Отсутствие и низкие концентрации тяжелых металлов свидетельствуют об экологической безопасности и чистоте изучаемого растительного материала (таблица 8).

Проведённый анализ показал, что сырьё горцев содержит широкий спектр эссенциальных элементов (микроэлементов), включающих Zn, Ni, Cr, Cu, Mn, Co, Mg в зольных остатках после сжигания растительного материала (общая зола *P. hydropiper* – 12.68%, *P. aviculare* – 8.21%, *P. minus* – 10.32%) [231,232]. Можно отметить высокое содержание фосфора и марганца, что согласуется с их важной ролью в процессе биосинтеза продуктов первичного и вторичного метаболизма. Фосфор участвует во всех видах обмена веществ, необходим для нормального функционирования нервной системы, сердечной мышцы. Довольно высокое содержание магния объясняется тем, что он входит в состав хлорофилла. Магний способствует выведению холестерина из организма, усилению перистальтики кишечника и секреции желчи. Известно, что достаточное количество цинка активизирует Т-клеточный иммунитет. Медь участвует в окислительном фосфорилировании, влияет на функции желез внутренней секреции, оказывает инсулиноподобное действие и обуславливает антиоксидантную активность. Велико ее значение в процессах кроветворения, при синтезе гемоглобина и фермента цитохрома.

Содержание токсичных тяжелых металлов (ртуть, мышьяк, кадмий, свинец) в исследуемых образцах ЛРС не превышает рекомендованных нормативов [233].

Следует помнить, что биогенность большинства тяжёлых металлов позволяет отнести их к микро- и ультрамикроэлементам, поэтому употребление терминов «тяжёлые металлы» и «микроэлементы» связано с их концентрацией в живых организмах и окружающей их среде. В исследуемом сырье для ряда элементов отмечены превышения предельно допустимых концентрации (установленные для овощей и зелени) по содержанию меди, кобальта, цинка, никеля и хрома. Подобные нормативы для ЛРС не разработаны. Однако, показатель зольности сырья (таблица 7), характеризующего общее количество элементов и минеральных примесей, соответствует требованиям современной НД [234].

3.1.2. Качественнный и количественный групповой анализ

Для проведения химического анализа в исследуемых растительных образцах проводили экстракцию по известным методикам и методом капельного анализа исследовали на наличие основных групп БАВ. На обнаруженные классы БАВ был проведен количественный анализ согласно фармакопейным статьям. Результаты приведены в таблицах 9-11. Числовые значения количественного анализа выражены в процентных долях в пересчете на сухое растительное сырье в пересчете на коэффициент влажности.

Содержание влаги в растительном сырье: *P. hydropiper* составило 7.66 %, в траве *P. aviculare* – 5.18%, *P. minus* – 7.10%.

Таблица 9 – Качественный и количественный групповой состав *P. hydropiper*

Группа БАВ	Качественная реакция	Наблюдения	Количество, %
Флавоноиды	Хлорид алюминия (III)	Образование желтого цвета, обесцвечивается при добавлении кислоты	2.96
Дубильные вещества	10% раствор ацетата свинца	Выпадение творожистого осадка	2.11
Кумарины	Лактонная проба	Образование белого осадка	0.42
Сапонины	Пенообразование	Устойчивая пена в HCl растворе (тритерпеновые спонины)	2.89
Аминокислоты	Нингидриновая реакция	Фиолетовое окрашивание	7.72
Фенолокислоты	Метод Фолина – Чикольте	Изменение цвета раствора на желто-оранжевый	1.01
Алкалоиды	Реактив Драгендорфа	Без изменений	-
Полисахариды	Осаждение спиртом	Образование белого осадка	4.15

Таблица 10 – Качественный и количественный групповой состав *P. aviculare*

Группа БАВ	Качественная реакция	Наблюдения	Количество, %
1	2	3	4
Флавоноиды	Хлорид алюминия (III)	Осадок ярко-желтого цвета, обесцвечивается при добавлении кислоты	3.41
Дубильные вещества	10% раствор ацетата свинца	Выпадение творожистого осадка	1.27
Кумарины	Лактонная проба	Образование белого осадка	0.26
Сапонины	Пенообразование	Устойчивая пена в HCl растворе (тритерпеновые спонины)	2.33
Аминокислоты	Нингидриновая реакция	Фиолетовое окрашивание	0.48
Фенолокислоты	Метод Фолина – Чикольте	-	-

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
Алкалоиды	Реактив Драгендорфа	Без изменений	-
Полисахариды	Осаждение спиртом	Образование белого осадка	5.13

Таблица 11– Качественный и количественный групповой состав *P. minus*

Группа БАВ	Качественная реакция	Наблюдения	Количество, %
Флавоноиды	Хлорид алюминия (III)	Осадок ярко-желтого цвета	6.21
Дубильные вещества	10% раствор ацетата свинца	Выпадение творожистого осадка	2.7
Кумарины	Лактонная проба	Образование белого осадка	0.36
Сапонины	Пенообразование	Устойчивая пена в HCl растворе (тритерпеновые спонины)	1.42
Аминокислоты	Нингидриновая реакция	Фиолетовое окрашивание	6.16
Фенолокислоты	Метод Фолина- Чикольте	-	1.20
Алкалоиды	Реактив Драгендорфа	-	-
Полисахариды	Осаждение спиртом	Образование белого осадка	2.29

Из таблиц 9-11 можно сделать вывод о том, что качественный групповой состав исследуемых растений рода *Polygonum* L. схож, однако количественная оценка показала расхожесть в результатах по содержанию основных групп БАВ. По количественному содержанию, полисахариды доминируют в надземной части *P. aviculare*, дубильные вещества – в *P. hydropiper,* флавоноиды - *P. aviculare* и *P. minus*, аминокислоты – *P. hydropiper* и *P. minus* [235-238].

3.2 Отработка методик количественного определения флавоноидов

Эффективность технологических параметров определяли по выходу флавоноидов и экстрактивных веществ. Во время экстракции в извлечение переходят не только биологически активные, но и балластные вещества. Поэтому о конце процесса извлечения необходимо судить не по сумме экстрактивных, а по количеству действующих веществ. Количественное содержание флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом.

Для проведения количественного определения биологически активных веществ спектрофотометрическим методом предварительно определена длина волны (λ_{max}) с максимальным значением оптической плотности исследуемого раствора.

Реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в слабокислой среде наиболее избирательна, специфична и дает стабильные результаты.

Близкие по значению максимумов поглощения (λ_{max}) комплекса авикулярина (*P. aviculare)* и кверцетина (*P. hydropiper)* с 2%-ным раствором хлорида алюминия позволяет выбрать их в качестве стандартных образцов. Спектр поглощения комплекса с алюминия хлоридом флавоноидов экстракта *P. hydropiper* и кверцетина представлены на рисунке 8; флавоноидов экстракта *P. aviculare* и авикулярина представлены на рисунке 9. Максимум поглощения комплексов флавоноидов *P. hydropiper* наблюдается при λ_{max}=425 нм, *P. aviculare* – при λ_{max}=385 нм.

Для определения содержания суммы флавоноидов в *P. minus* применяли также реакцию комплексообразования с 1% хлоридом алюминия в пересчете на кверцетин с λ_{max}=430 нм [121, с. 38].

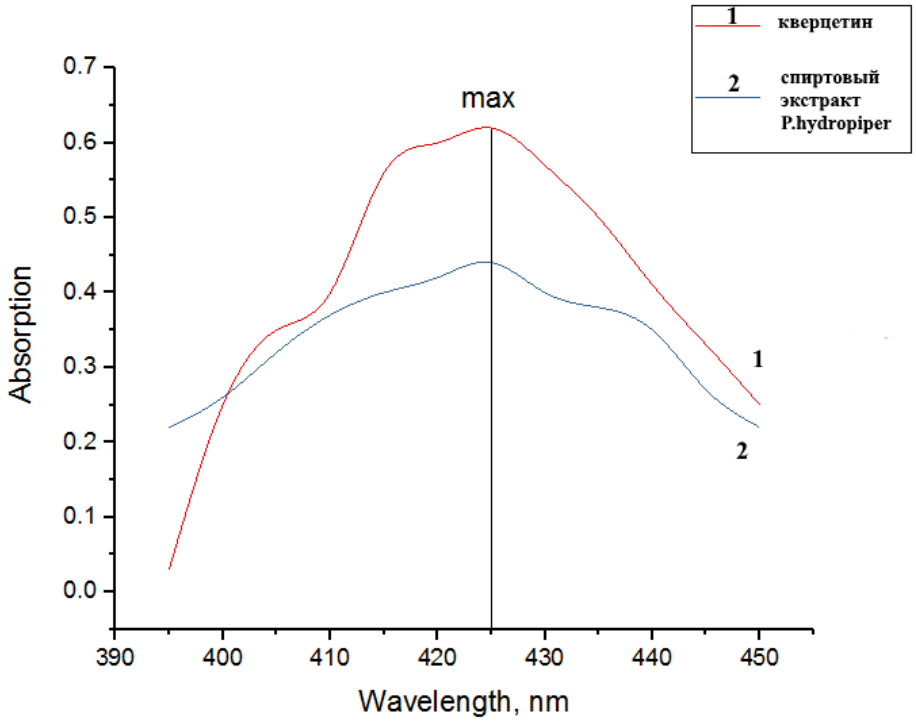


Рисунок 8 – Спектр поглощения комплекса спиртового экстракта *P. hydropiper* и кверцетина с хлоридом алюминия

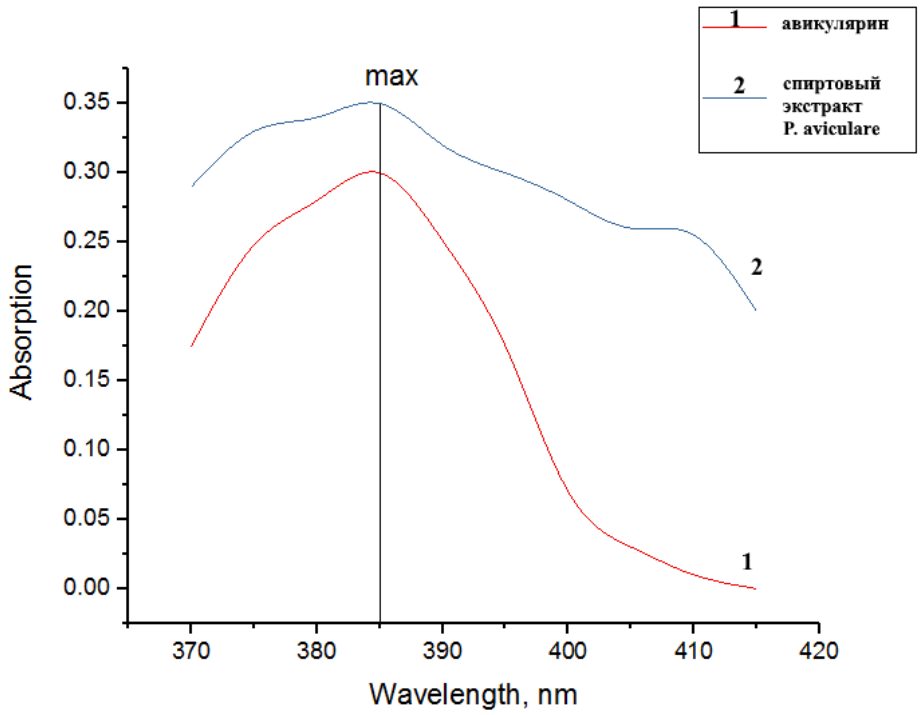


Рисунок 9 – Спектр поглощения комплекса спиртового экстракта *P. aviculare* и авикулярина с хлоридом алюминия

3. 3 Отработка технологических параметров

3.3.1 Подбор оптимального экстрагента

При выборе экстрагента использовали спирт этиловый различной концентрации и воду. Экстрагент подбирают экспериментально с таким учетом, чтобы он максимально растворял действующие и минимально - балластные вещества. Выбор оптимальных параметров экстрагирования сырья контролировали по содержанию суммы экстрактивных веществ (по методике ГФ X) и суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин – для *P. hydropiper,* авикулярин – для *P. aviculare* для *P. minus* по разработанной нами методике. Результаты исследований выбора оптимального экстрагента представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Влияние экстрагента на выход экстрактивых веществ и суммы флавоноидов из травы рода *Polygonum* L.

Экстрагент	*P. hydropiper*		*P. aviculare*		*P.minus*	
	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %
Вода	18.00	2.55	28.30	3.01	19.12	2.10
10% этанол	22.30	2.56	23.26	2.85	16.36	1.85
30% этанол	21.77	2.65	24.03	2.95	15.81	1.87
50% этанол	25.10	2.96	26.80	3.12	24.19	2.30
70% этанол	20.53	2.92	21.60	3.25	28.55	1.85
96% этанол	16.72	2.95	18.25	3.20	26.01	1.09

На основании полученных результатов выхода экстрактивных веществ, а также флавоноидов, можно сделать вывод, что оптимальным экстрагентом для *P. hydropiper* и *P.minus* явился 50% этанол (ЭВ 26.80 и 14.19%, флавоноиды 2.96 и 2.30%, соответственно), для *P. aviculare* - 70% этанол (ЭВ 21.60%, флавоноиды 3.25%).

3.3.2 Степень измельчения сырья

Для каждого растительного материала оптимальная степень измельчения и его характер зависят от анатомического строения и химического состава экстрагируемого сырья. Характер измельчения растительного сырья оказывает большое влияние на процесс экстракции и качество вытяжки.

Степень измельчения определяет поверхность соприкосновения фаз (чем она больше, тем скорее протекает диффузия). Однако очень мелкие растительные порошки для экстрагирования применять не следует, так как мелкие порошки содержат много разрушенных клеток, из них в извлечение переходит большое количество балластных веществ, нерастворимых частиц и коллоидов. В результате получается мутная, трудно очищаемая жидкость.

Обычно для различного растительного материала рекомендуют следующую крупность измельчения (более крупное измельчение нецелесообразно, так как в слое замедляется процесс экстракции лекарственных веществ, а при длительном настаивании в извлечение переходит много балластных веществ): листья, цветки и травы - до частиц размером 3-5 мм, стебли, корни и кора - до частиц размером 1-3 мм, плоды и семена - до частиц размером 0.3-0.5 мм (так как оболочка их клеток покрыта гидрофобными веществами).

Так как надземные части растений *P. hydropiper* и *P. aviculare* были приобретены на заводе-заготовителе в измельченном виде и размер частиц определен до 3 мм. Мы дополнительно измельчали сырье до 0.5 мм. Сырье *P. minus* измельчали до фракций от 3 мм до 0.5 мм. В таблице 13 представлены результаты зависимости выхода экстрактивных веществ и флавоноидов от степени измельчения растительного материала.

Таблица 13 – Влияние степени измельчения на выход экстрактивых веществ и суммы флавоноидов из некоторых растений рода *Polygonum* L.

Степень измельчения, мм	*P. hydropiper*		*P. aviculare*		*P. minus*	
	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %
0.5	21.16	1.93	19.39	2.95	19.56	2.18
1.0	23.47	2.03	22.41	3.78	18.97	2.29
2.0	25.94	2.85	24.61	2.69	19.05	2.28
3.0	24.38	3.01	19.85	2.50	21.89	2.35
5.0	-	-	-	-	20.11	2.26

Как видно из результатов таблицы 13, оптимальным размером частиц для *P. hydropiper* и *P.minus* явился 3.0 мм (ЭВ 24.38 и 21.89%, флавоноды 3.01 и 2.35%, соответственно), для *P. aviculare* – 1.0 мм (ЭВ 22.41%, флавоноиды – 3.78%).

3.3.3 Соотношения сырье - экстрагент

Разность концентраций является основной движущей силой диффузионного процесса. Диффузионный процесс при экстракции протекает до установления динамического равновесия концентраций в системе твёрдое тело-жидкость. Поэтому в процессе экстракции необходимо поддерживать максимальную разность концентраций, чего на практике достигают перемешиванием, циркуляцией экстрагента или заменой извлечения чистым экстрагентом (можно осуществлять периодически и непрерывно).

В таблице 14 представлены результаты зависимости выхода экстрактивных веществ и флавоноидов от соотношения сырье-экстрагент.

Таблица 14 – Влияние соотношения сырье-экстрагент на выход экстрактивых веществ и суммы флавоноидов из некоторых растений рода *Polygonum* L.

Соотношение	*P. hydropiper*		*P. aviculare*		*P. minus*	
	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %
1:5	22.31	2.98	-	-	22.87	1.15
1:7	16.97	3.23	20.02	3.23	22.97	2.37
1:10	16.74	3.11	21.35	3.72	21.05	2.18
1:12	16.76	2.95	20.91	3.68	22.89	2.29
1:15	18.13	3.21	20.34	3.01	22.11	2.09

Как видно из результатов таблицы 14, оптимальным для *P. hydropiper* и *P. minus* явился семи-кратный избыток экстрагента (ЭВ 16.97 и 22.97%, флавоноды 3.01и 2.37%). Хотя наибольший выход экстрактивных веществ для *P. hydropiper* был достигнут при пяти-кратном избытке экстрактивных веществ, однако наибольший выход флавоноидов наблюдался при семи-кратном. Для *P. aviculare* оптимальным соотношением был определен 1:10 (ЭВ 21.35%, флавоноиды – 3.72%).

3.3.4 Метод экстракции

Были использованы следующие методы экстрагирования: бисмацерация, перколяция и реперколяция. Бисмацерация или неоднократное настаивание сырья широко применяется в фармацевтической практике. Ее по характеру протекания можно отнести к статическим прямоточным периодическим процессам, когда свежий экстрагент подается на постепенно истощаемое сырье, процесс протекает ступенчато. Процессы перколяции и реперколяции относятся к динамическим способам экстракции, которая предусматривает движение экстрагента относительно сырья, при котором происходит удаление

проэкстрагированных веществ из зоны экстрагирования или перенос в следующие слои материала.

В соответствии с результатами предыдущих исследований в качестве экстрагента использовали 50% спирт этиловый – для *P. hydropiper* и *P. minus,* 70% спирт этиловый – для *P. aviculare*. Извлечения готовили в соотношении 1:7 - *P. hydropiper* и *P. minus,* 1:10 - *P. aviculare*. Степень измельчения сырья 3 мм – *P. hydropiper* и *P. minus,* 1 мм - *P. aviculare*. Результаты количественного определения выхода экстрактивных веществ и флавоноидов представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Влияние метода экстракции на выход экстрактивых веществ и суммы флавоноидов из травы рода *Polygonum* L.

Метод экстракции	*P. hydropiper*		*P. aviculare*		*P. minus*	
	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %
Бисмацерация	35.16	3.22	34.61	2.55	32.01	3.20
Перколяция	35.47	2.86	39.39	3.95	31.47	2.75
Реперколяция	37.94	2.78	37.41	2.61	30.89	2.48

На основе полученных результатов таблицы 15 установлено, что оптимальным методом экстракции для получения сухих биологически активных экстрактов из *P. hydropiper* и *P. minus* явился метод бисмацерации; для *P. aviculare* – перколяция.

3.3.5 Длительность экстракции

В большинстве случаев экстракция наиболее активно протекает в первые часы, а затем, несмотря на использование новой порции экстрагента, её скорость заметно снижается, и полнота извлечения наступает через сравнительно длительное время. Поэтому процесс экстракции целесообразно прекратить, когда предполагаемая (расчётная) дополнительная экстракция остатков действующих веществ не окупится избыточными расходами на экстрагенты.

Действующие вещества (например, алкалоиды, гликозиды и т.д.) имеют меньшую молекулярную массу (300-500), благодаря чему диффундируют быстрее высокомолекулярных веществ, поэтому в ряде случаев увеличение длительности экстракции нецелесообразно (ухудшается качественный состав извлечения вследствие большого содержания балластных веществ). Поэтому необходимо стремиться к ускорению полноты извлечения, используя все факторы, ведущие к интенсификации процесса экстракции. Ускорение процесса экстракции целесообразно и с экономической точки зрения (увеличивается массоотдача).

Зависимость длительности экстракции на установление динамического равновесия концентраций в процессе экстрагирования определяли по выходу экстрактивных веществ и флавоноидов (таблица 16).

Таблица 16 – Влияние длительности экстракции на выход экстрактивых веществ и суммы флавоноидов из травы рода *Polygonum* L.

Время экстракции, ч	*P. hydropiper*		*P. aviculare*		*P. minus*	
	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %	ЭВ, %	Флавоноиды, %
I – экстракция						
6	24.53	1.93	21.95	2.98	18.21	2.98
12	28.89	2.03	23.27	3.29	22.84	3.35
24	28.77	2.85	23.59	3.28	22.53	3.32
36	28.50	2.84	23.88	3.21	22.01	3.39
48	28.69	2.87	23.85	3.24	21.81	3.41
II – экстракция						
2	10.33	0.52	12.32	0.32	8.10	0.87
4	12.69	0.79	11.89	0.56	8.12	0.99
6	15.68	1.25	13.81	1.45	8.54	1.15
8	15.88	1.26	14.96	1.43	8.32	1.17

Как видно из результатов таблицы 16, для *P. hydropiper* установление динамического равновесия концентраций в системе твердое тело-жидкость наступает через 24 часа (ЭВ 23.77 %, флавоноды 2.85 %), для *P. aviculare* – через 12 часов (ЭВ 23.27 %, флавоноды 3.29 %), для *P. minus* – через 24 часа (ЭВ 22.84%, флавоноиды 3.35%) за первую экстракцию и через 6 часов для трех растений – за вторую экстракцию. Хотя наибольший выход экстрактивных веществ для первых двух растений составил через 8 часов, однако разница между выходом экстрактивных веществ и флавоноидов за 6 часов и 8 часов явилась минимальной, что явилось причиной нецелесообразности увеличивать время экстрагирования на 2 часа.

3.3.6 Технологические свойства растительного сырья

Насыпная масса (Нμ) - это объемная характеристика сырья, а, именно, масса единицы объема свободно насыпанного измельченного растительного сырья. Она необходима для выбора размера экстрактора.

Сыпучесть (φ) – свойство растительного сырья свободно высыпаться. Этот показатель используется при выборе загружающих и дозирующих устройств. Один из методов определения сыпучести основан на измерении угла естественного откоса.

При расчете необходимого количества экстрагента и выборе коэффициента заполнения экстракторов следует учитывать объем жидкой фазы, остающейся в растительном материале за счет набухания, и увеличение объема набухшего сырья [239].

Мы определяли степень набухания и коэффициент поглощения сырья в 50% спирте этиловом – для *P. hydropiper* и *P. minus* в 70% этиловой спирте – *для P. aviculare* (таблица 17).

Таблица 17 – Технологические свойства растительного сырья *Polygonum* L.

Показатель	Значения		
	P. hydropiper	*P. aviculare*	*P. minus*
Насыпная масса (H_m), г/см^3	0.14	0.15	0.17
Угол естественного откоса (φ), º	50	55	45
Степень набухания в растворителе	0.80	0.44	0.76
Коэффициент поглощения растворителя	1.80	1.44	1.75

3.4 Технология получения сухого экстракта из травы *P. hydropiper*

На основе результатов подбора эффективных технологических параметров была составлена технологическая схема выделения суммы БАВ из травы *P. hydropiper* в лабораторных условиях. На рисунке 10 представлена процессуальная технологическая схема выделения суммарного фитокомплекса, с максимально возможным выходом флавоноидов и с полным описанием всех процессов протекающим в течение всего производственного процесса. На рисунке 11 представлена технологическая схема получения субстанции из растительного материала *P. hydropiper* в лабораторных условиях.

3.4.1 Описание технологического процесса

Технологический процесс состоит из следующих этапов (рисунок 11) [240]:

ВР 1 – Санитарная обработка и подготовка производства

При производстве фитопрепаратов соблюдение правил производственной и личной гигиены обслуживающего персонала должно обеспечить выпуск высококачественного готового продукта, охрану здоровья работающего персонала, безопасные условия труда, исключить микробное обсеменение препарата во время производства, хранения и транспортирования.

Подготовка персонала

В соответствии с инструкцией МУ 64-09-001-2002 «Производство лекарственных средств. Персонал фармацевтических предприятий. Основные требования» персонал должен быть одет в технологическую одежду (халат, куртку и брюки или комбинезон, шапочку или косынку, полностью закрывающую волосы), необходим респиратор или маска, перчатки резиновые или хлопчатобумажные, обувь или бахилы. Обработка рук обязательна. Не реже 1 раза в год проводятся инструктаж по правилам личной гигиены и медицинское обследование персонала.

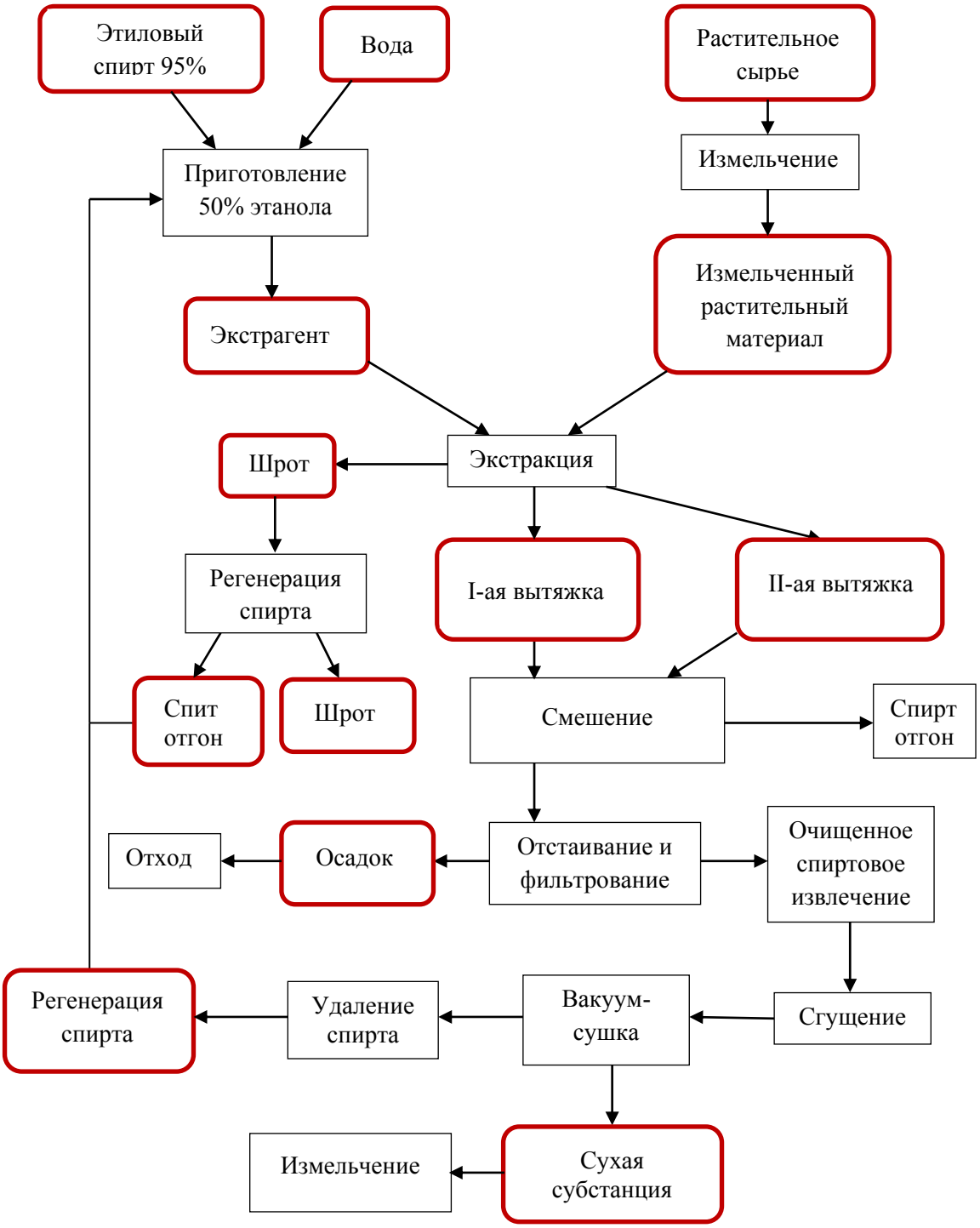


Рисунок 10 – Процессуальная схема получения субстанции *P. hydropiper*

Приготовление дезинфицирующих растворов

Дезинфицирующие растворы применяют для обработки рук персонала, оборудования, поверхностей. Растворы готовят в специально отведённом помещении и затем фильтруют во избежание попадания механических включений. Емкости с дезинфицирующим раствором хранят в специально отведённом, закрывающемся помещении. В качестве дезинфицирующих растворов применяют 76-80% раствор спирта этилового, растворы перекиси водорода (1-6%) с 0.5% моющего средства, раствор хлоргексидина.

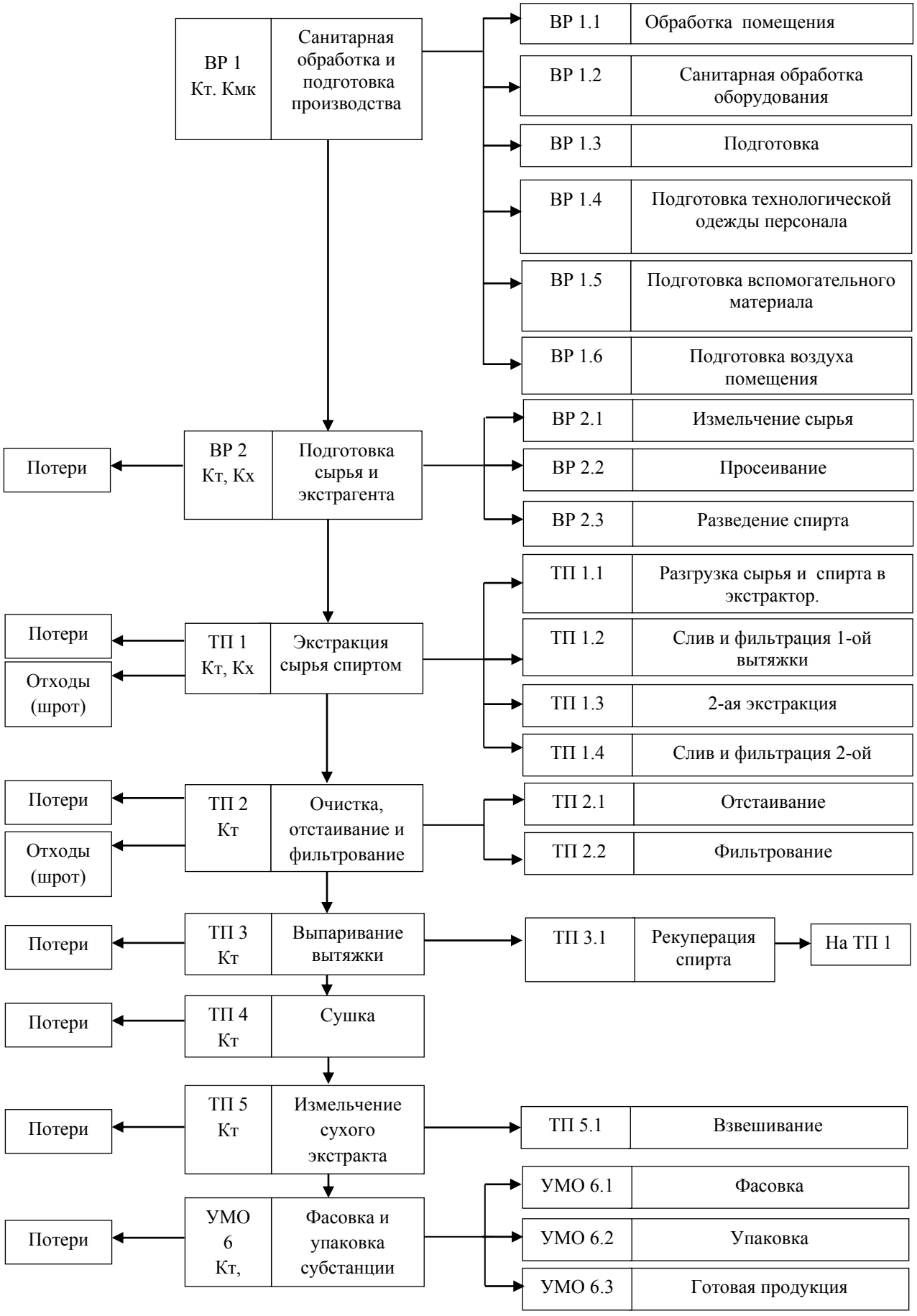


Рисунок 11 - Принципиальная схема получения субстанции из *P. hydropiper*

Дезинфицирующие растворы рекомендовано менять еженедельно во избежание появления устойчивых штаммов микроорганизмов.

Подготовка и санитарная обработка производственных помещений

Производственные помещения должны отвечать требованиям НД. Ограничено перемещение персонала без производственной необходимости. В производственных помещениях запрещаются курение и приём пищи. Ежедневно после чистки оборудования и складирования остатков сырья полы. Уборочный материал и инвентарь хранят в специальном шкафу. Все ёмкости и инвентарь должны быть маркированы.

Подготовка оборудования

Перед началом работы начальник смены (или технолог, или бригадир) проверяет готовность оборудования к работе: отсутствие остатков сырья и полупродуктов, чистоту рабочих частей, исправность пускателей и наличие этикетки с указанием наименования, серии, даты, выпуска, фамилии и инициалов оператора.

По окончании работы оператор (или уборщик) производит полную уборку оборудования согласно стандартной инструкции и прикрепляет этикетку с указанием наименования оборудования, текста «машина очищена», даты, фамилии и инициалов оператора и мастера, принявшего чистую машину (оборудование, весы и т.п.). Используемое в производстве оборудование, промежуточную тару и инвентарь необходимо периодически подвергать мойке, чистке, дезинфекции 0,5-1% раствором перекиси водорода с 0.5% моющего раствора с последующей промывкой горячей водой. После удаления остатков продукта внутреннюю поверхность аппаратов, трубопроводов, шланги, промежуточную и вспомогательную тару тщательно промывают водой, нагретой до 60-70 ºС. По окончании дезинфицирующей обработки всё оборудование 2-3 раза споласкивают очищенной водой до полной нейтральной реакции и высушивают пуском пара в рубашку аппарата.

Пуск в эксплуатацию оборудования, аппаратуры после ремонта и реконструкции разрешает только технолог после их мытья, дезинфекции и осмотра.

Технологи, связанные с основным производством, хранением и обеспечением производства сырьём и материалами, несут ответственность и осуществляют постоянный контроль за соблюдением требований личной гигиены персонала и санитарным состоянием помещений.

ВР 2.1 – Измельчение сырья осуществляется в измельчителе до 3 мм. Измельчённую массу сырья не подвергают просеиванию, так как действующие вещества в мякоти и прожилках листьев, стеблях и других органах растения распределены неравномерно. Поэтому в экстракторы загружают после смачивания в ёмкости измельчённую массу сырья, состоящую из частиц различных размеров до 3 мм.

ВР 2.3 – Приготовление экстрагента. Для проведения процесса экстрагирования сначала готовят экстрагент, состоящий из смеси спирта и воды. Расчётное количество спирта-ректификата из мерника загружают в мерник-смеситель и затем добавляют расчётное количество очищенной воды из

мерника, в результате разности плотностей происходит самопроизвольное перемешивание растворителей. С учетом технологических свойств растительного сырья, соотношение сырье:экстрагент составляет 1:7.

ТП 1 – Экстрагирование сырья. Экстрагирование сырья осуществляют методом бисмацерации в течение 24 часов (I экстракция) и 6 часов (II экстракция).

ТП 2 – Отстаивание и фильтрование. Одним из важных этапов повышения эффективности технологии производства препаратов является этап по очистке вытяжки выделенных биологически активных компонентов.

Извлечения, полученные при экстрагировании сырья, отстаивают в отстойнике при 8-10 ºС в течение 36 часов. Низкая температура в помещении способствует уменьшению растворимости балластных веществ (белков, слизи и др.) и их осаждению. В период отстаивания осуществляют постадийный контроль полученных вытяжек на содержание действующих веществ или сухого остатка, концентрацию спирта и (при необходимости) корректируют эти показатели. В процессе экстрагирования лекарственного сырья из разрушенных клеток растительного материала в извлечение переходят (механически вымываются) белки, слизи, мельчайшие частички оболочек органоидов и ряд малорастворимых веществ. В результате воздействия ферментов и различных окислительно-восстановительных процессов в извлечении также образуется дополнительная взвесь. Для облегчения удаления осадка и его формирования извлечения отстаивают при пониженной температуре (ниже 10 ºС). В этих условиях резко снижается растворимость труднорастворимых соединений и быстрее формируется осадок. Это предотвращает возможность образования осадка, недопустимого в процессе хранения жидких фитопрепаратов в складских помещениях, где обычно поддерживают низкую температуру.

Отстоявшийся слой сливают с осадка и фильтруют. Очищенную вытяжку подвергают дальнейшему сгущению.

ТП 3 – Выпаривание вытяжки. Процесс выпаривания в производстве фитопрепаратов — важная ТС, от условий проведения которой в значительной степени зависят качество и выход готовой продукции. Выпаривание проводят с целью удаления растворителя (экстрагента) и получения концентрированных остатков экстрактивных веществ, в том числе для изготовления густых и густоватых экстрактов. Стадия выпаривания на производстве наиболее энергоёмкая, на процесс расходуется большое количество тепла. Теплоносителем служит греющий водяной пар. Для концентрирования извлечений используются вакуум-выпарные установки, т.к. при выпаривании в вакууме позволяет проведение процесса при низких температурах, что важно в случае концентрирования растворов термолабильных веществ, какими являются природные соединения лекарственных растений.

ТП 4 – Сушка. Для данной технологической схемы нами предложено применение вакуум-сушилок. Вакуум при сушке так же, как и в процессе выпарки, используют для снижения температуры и увеличения скорости сушки, что способствует повышению качества экстрактов. Также, вакуум-сушилки позволяют регенерировать растворители. К сушилкам контактного

типа, в которых теплообмен осуществляют через обогреваемую поверхность. В таблице 22 представлен материальный баланс процесса сушки объединенного сгущенного экстракта.

ТП 5 – Измельчение сухого экстракта производят на шаровой мельнице до мелкодисперсного состояния.

УМО 6 – Фасовка и упаковка субстанции. В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». В упаковке, обеспечивающей защиту от света. На этикетке должно быть указано: происхождение сырья; концентрация спирта, использованного при экстракции; содержание действующих веществ; наименование и концентрация добавленных антимикробных консервантов.

Сухой экстракт, отличающийся большой гигроскопичностью, необходимо хранить в банках, герметически укупоренных, объемом не более 100 мл, в защищенном от света месте при комнатной температуре.

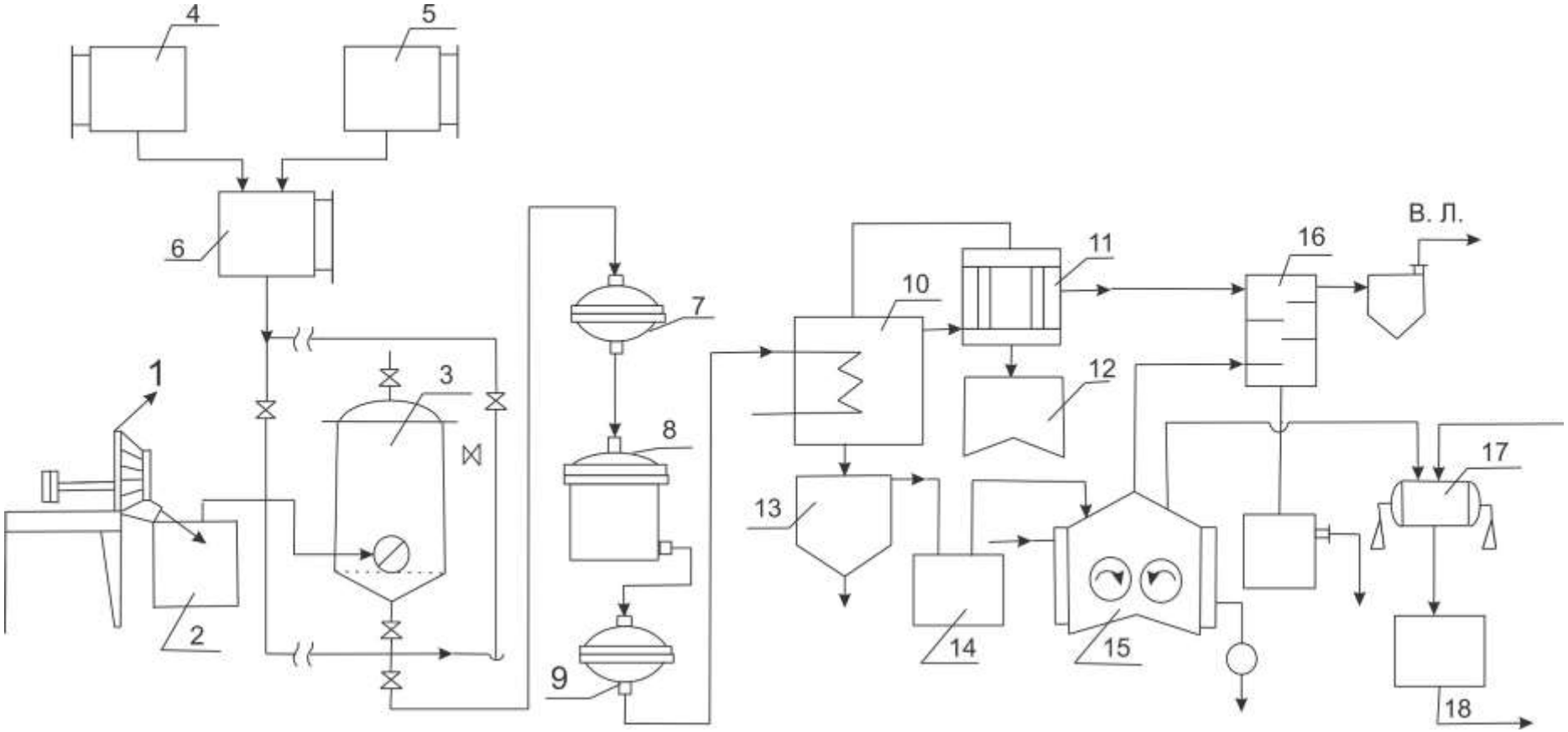
На рисунке 12 представлена аппаратурная схема получения сухого экстракта *Polygonum hydropiper*. Траву измельчают на эксцельсиоре (1) до крупности частиц основной массы сырья 1-3 мм. Измельчённое сырьё собирают в сборник (2).

В качестве экстрагента используют 50% спирт этиловый. Для его приготовления из мерника (4) сначала загружают в мерник 6 расчётное количество спирта-ректификата 95%, затем из мерника (5) заливают расчётное количество очищенной воды. В результате разности плотностей происходит перемешивание растворителей.

Экстракцию осуществляют методом бисмацерации для достижения максимального выхода флавоноидов. Сырье загружают в экстрактор (3) с мешалками для интенсификации процесса экстракции на 24 часа. К истощённому сырью подают свежую порцию спирта и оставляют на 6 часов. Отфильтрованный разбавленный экстракт фильтруют минуя фильтр (7) и присоединяют к концентрированному экстракту в сборнике (8), где остаивают объединенную вытяжку в течение 2 суток при температуре 8-10 ºС. Вытяжку пропускают через друк-фильтр (9) для очистки от балластных веществ.

Спиртовую вытяжку подвергают выпарке до 1/4 части первоначального объёма в вакуум-испарителе. На схеме приведена роторная вакуум-выпарная установка, состоящая из испарителя (10), конденсатора (11) и сборника (12). Отгон спирта используют для приготовления экстрагента. Водный остаток, полученный после отгонки спирта подают на трубчатую центрифугу (13), где отделяют тонкодисперсный осадок балластных веществ, а водный раствор собирают в сборник (14). Далее водный раствор вновь поступает в циркуляционный вакуум-аппарат (10).

После отгонки половины растворителя густоватый остаток направляют в вакуум-вальцовую сушилку (15) с барометрическим конденсатором смешения (16) для получения сухого экстракта до содержания остаточной влаги 5%. Комковатую сухую массу высушенного экстракта измельчают на шаровой мельнице (17). Получают аморфный порошок коричневого цвета, который направляют на линию упаковки (18).



1 – эксцельсиор; 2 – сборник измельченного сырья; 3 – экстрактор; 4 – мерник спирта-ректификата; 5 – мерник воды очищенной; 6 – мерник-смеситель; 7,9 – друк-фильтр; 8 – отстойник; 10 – испаритель; 11 – конденсатор; 12 – сборник для отгона; 13 - центрифуга; 14 - сборник; 15 – вакуум-вальцовая сушилка; 16 – барометрический конденсатор смещения; 17 – шаровая мельница; 18 – машина упаковки готовой продукции.

Рисунок 12 – Технологическая схема производства сухого экстракта *Polygonum hydropiper*.

3.4.2 Материальный баланс

В таблицах 18-24 представлены результаты постадийного материального баланса и в таблице 25 – суммарный материальный баланс технологического процесса получения сухого экстракта *Polygonum hydropiper*. Так, для производства 10 кг субстанции потребуется 53 кг измельченного растения и 158 кг спирта 95%.

Таблица 18 – Материальный баланс процесса измельчения растительного сырья (ВР 2.1)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
Израсходовано:					
А. Сырье					
1. Трава *P. hydropiper*, в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 7.66 27.03 2.96	4	 0.31 1.08 0.12	28.6	Нμ = 140 кг/м3
2. Итого		4			
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Трава *P. hydropiper*, в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 7.66 27.03 2.96	3.85	 0.29 1.04 0.11		ρ=200 кг/м3
Б. Потери					
2. Трава *P. hydropiper*, в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 7.66 27.03 2.96	0.15	 0.01 0.04 0.004		
2. Итого		4			

Таблица 19 – Материальный баланс приготовления 50% этанола (ВР 2.3)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5	6
Сырье					
1. Этиловый спирт 95%, в нем: - спирт безводный - вода	95 100	19.14	 18.18 0.96	23.59	ρ=811,4 кг/м3
2. Вода очищенная		22.54	22.54	22.54	ρ=1000 кг/м^3
3. Итого		41.68	41.68	46.13	
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Этиловый спирт 50%, в нем: - спирт безводный - вода	50 100	41.63	 20.815 20.815	44.76	ρ=930.1 кг/м^3
Б. Потери					
1. Этиловый спирт 50%, в нем: - спирт безводный - вода	50 100	0.05	 0.025 0.025		
2. Итого		41.68	41.68		

Таблица 20 – Материальный баланс экстрагирования сырья (ТП 1)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Трава *P. hydropiper,* в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 7.66 27.03 2.96	3.85	 0.31 1.08 0.12	27.5	Нμ = 140 кг/м^3
2. Этиловый спирт 50%, в нем: - спирт безводный - вода	50 100	41.63	 20.815 20.815	44.76	ρ=930.1 кг/м3
3. Итого		45.48		72.26	
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Спиртовое извлечение, - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды		38.73	 0.98 0.10	39.98	ρ=968.8 кг/м3

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6
- этиловый спирт 50%, в нем: • спирт безводный • вода	100		37.75 18.87 18.87		
Б. Отходы					
1. Шрот		6.43			
2. Фильтрат (балластные вещества)		0.32			
3. Итого		45.48			

Таблица 21 – Материальный баланс выпаривания спиртовой вытяжки (ТП 3)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Спиртовое извлечение, - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - этиловый спирт 50%, в нем: • спирт безводный • вода	100	38.73	 0.98 0.10 37.75 18.87 18.87	39.67	ρ=968.8 кг/м3
2. Итого		38.73	38.73		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Сгущенное извлечение, в нем: - жидкая фаза - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды		1.37	 0.74 0.63 0.19		
Б. Отходы					
1. Отгон жидкой фазы в нем: • спирт безводный • вода	44.5 (по массе)	35.83	 15.94 19.89		
В. Потери					

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6
1. Жидкая фаза, в ней - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - этиловый спирт 50%, в нем: • спирт безводный • вода		1.53	 0.09 $2 \cdot 10^{-3}$ 1.44 0.48 0.96		
2. Итого		38.73	38.73		

Таблица 22 – Материальный баланс сушки экстрактов (ТП 4)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Сгущенное извлечение, в нем: - жидкая фаза - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды		1.37	 0.74 0.63 0.19		
2. Итого		1.37	1.37		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. hydropiper,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	1.06	 1.02 0.10 0.046	2.14	ρ=495 кг/м^3
Б. Отходы					
1. Влага		0.25			
В. Потери					
1. Сухой экстракт *P. hydropiper*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	0.06	 0.057 $5.94 \cdot 10^{-3}$ $2.6 \cdot 10^{-3}$		
2. Итого		1.37	1.37		

Таблица 23 – Материальный баланс измельчения сухого экстракта (ТП 5)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. hydropiper*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	1.06	 1.02 0.10 0.046	2.14	ρ=495 кг/м3
2. Итого		1.06	1.06		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. hydropiper,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	1.04	 0.99 0.10 0.044	2.10	ρ=495 кг/м^3
Б. Потери					
1. Сухой экстракт *P. hydropiper*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	0.023	 0.022 $2.28\cdot10^{-3}$ $1.00\cdot10^{-3}$		
2. Итого		1.06	1.06		

Таблица 24 – Материальный баланс фасовки и упаковки готовой субстанции (УМО 6)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. hydropiper,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	1.04	 0.99 0.10 0.044	2.10	ρ=495 кг/м^3

Продолжение таблицы 24

1	2	3	4	5	6
2. Итого		1.04	1.04		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Расфасованный сухой экстракт *P. hydropiper,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	1.01	 0.97 0.10 0.044		
Б. Потери					
1. Порошок сухого экстракта *P. hydropiper*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 95.64 10.36 4.36	0.03	 0.029 $2.97 \cdot 10^{-3}$ $1.3 \cdot 10^{-3}$		
2. Итого		1.04	1.04		

Таблица 25 – Материальный баланс (суммарный) технологии получения сухого экстракта *P. hydropiper*

Израсходовано		Получено	
Наименование сырья	Значение, кг	Наименование конечного продукта, отходов и потерь	Значение, кг
1	2	3	4
Этиловый спирт 95%, в нем: - спирт безводный - вода	19.14 (18.18) (0.96)	Сухой экстракт *P. hydropiper,* в нем: - экстрактивные вещества, в т.ч. флавоноиды - влажность	1.01 (0.68) (0.07) (0.031)
Вода очищенная	22.54	Отгон спирта в нем - спирт безводный - вода	35.83 (15.94) (19.89)
Трава *P. hydropiper,* в нем: - влажность 7.66% - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды 2.96%	4.0 (0.31) (1.08) (0.12)		
		Отходы	
		Шрот	6.43
		Фильтрат	0.32

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4
		Потери - экстракт - экстрактивные вещества - спирт безводный - вода	2.09 1.611 (0.169) (0.49) (0.96)
Итого	45.68	**Итого**	45.68

3.4.3 Расчет экономических затрат

Целью экономического расчета является определение себестоимости технологического процесса, расходов на монтаж, обслуживание и эксплуатацию оборудования [241].

3.4.3.1 Организация труда

Баланс времени одного рабочего устанавливает число дней, подлежащих отработки одним среднесуточным рабочим в год, в зависимости от принятого режима работы цеха, продолжительности работы цеха и продолжительности рабочего дня. Цех будет работать в две смену продолжительностью по 8 часов.

Составим баланс рабочего времени среднесуточного рабочего, с целью определения фонда рабочего времени. Баланс представлен в таблице 26.

Таблица 26 – Баланс рабочего времени среднесуточного работника

Элементы времени	Прерывное производство, две рабочие смены по 8 часов	
	дней	часов
Календарное число дней	365	5840
Выходные дни	52	832
Праздничные и перенесенные дни	20	320
Номинальный фонд рабочего времени	293	4688
Планируемые невыходы:		
Очередные и дополнительные отпуска	56	896
Невыходы по болезни	12	192
Отпуск, в связи с учёбой без отрыва от производства	14	224
Итого (планируемые невыходы):	82	1312
Эффективный фонд рабочего времени	211	1688

3.4.3.2 Расчет численности рабочих, служащих, руководителей и специалистов

Численность производственных рабочих определяется, исходя из прогрессивных норм обслуживания при полном обеспечении рабочими всех мест. Число рабочих мест определяется, исходя из необходимых точек наблюдения и операций обслуживания процесса, а также объема работы на управление каждым участком.

1. Определим явочное число основных рабочих по формуле 18:

$$R_{яв} = \frac{F \times C}{H_{обс}} \quad (18)$$

где $H_{обс}$ - норма обслуживания; F - количество установок; С - количество смен в сутки.

Учитывая, что работа основных производственных рабочих заключается в наблюдении за ходом процесса, а также, учитывая уровень автоматизации оборудования, цеха, примем 2 человека.

$$R_{яв} = 3 \cdot 2 = 6 \text{ рабочих.}$$

2. Определим списочное число основных рабочих

$$R_c = R_{яв} \frac{T_{эф.обор.}}{T_{эф.раб.}} \quad (19)$$

где $T_{эф.обор.}$ – проектируемое число дней работы оборудования в год; $T_{эф.раб.}$ – проектируемое число дней работы в год одного рабочего.

$$R_c = 5 \times \frac{293}{211} = 7 \text{ чел}$$

Состав персонала приведен в виде таблицы 27.

Таблица 27 – Численность управляющего, основного и вспомогательного персонала

Занимаемая должность	Количество в смене, человек	Смен в сутки	Количество в сутки	Списочная численность, чел
1	2	3	4	5
Управляющий персонал				
Главный технолог	1	1	1	1

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5
Начальник цеха	1	1	1	1
Основной персонал				
Инженер экстрактора	1	1	1	1
Инженер установки фильтра	1	1	1	1
Инженер установки испарителя	1	1	1	1
ОТК	1	1	1	1
Вспомогательный персонал				
Слесарь	1	1	1	1
			Итого	7

3.4.3.3 Расчет общего годового фонда заработной платы персонала

Основной фонд заработной платы (ЗП) расчитывается по формуле 20:

$$З_{осн} = З_{тар} + Д_{пр} + Д_{н.вр.} + Д_{праз} + Д_{вред} \quad (20)$$

где $З_{тар}$ – тарифный фонд; $Д_{пр}$ – доплата премий; $Д_{н.вр.}$ – доплаты за ночные смены; $Д_{праз.}$ – доплата за работу в праздничные дни; $Д_{вред}$ – доплата за вредность. $Д_{праз.}$

а) Тарифный фонд:

$$З_{тар}=З^{и}_{тар}+ З^{уп}_{тар} \quad (21)$$

где $З^{и}_{тар}$, $З^{5}_{тар}$, $З^{6}_{тар}$, $З^{м}_{тар}$ – заработная плата по тарифным ставкам рабочих различной квалификации.

$$З_{тар} = R_{сп} \cdot T_{эф} \cdot T_{сп} \quad (22)$$

где $R_{сп}$ - списочное число рабочих; $T_{эф}$ - эффективное время работы одного среднесписочного рабочего; $T_{сп}$ - тарифная часовая ставка.

Часовая тарифная ставка для управляющего персонала составляет 320.42 тг/час; инженеров – 290.24 тг/час.

$$З^{и}_{тар} = 5 \cdot 1688 \cdot 290.24 = 2\ 449\ 625.6 \text{ тг}$$
$$З^{уп}_{тар} = 2 \cdot 1688 \cdot 320.42 = 1\ 081\ 737.9 \text{ тг}$$
$$З_{тар} = 2\ 449\ 625.6 + 1\ 081\ 737.9 = 3\ 531\ 363.5 \text{ тг}$$

б) Доплата за работу в праздничные дни расчитывается по формулам 23 и 24. Принято 20 праздничных и перенесенных дней в 2019 году. Доплата в праздничные дни осуществляется в 15% от основного оклада:

$$Д_{пр} = Д^{и}_{пр} + Д^{уп}_{пр} \quad (23)$$

$$Д_{пр} = R_{яв} \cdot N \cdot T_{ст} \cdot t_{см} \quad (24)$$

где N - число праздничных дней в году;

$$Д^{и}_{пр} = 5 \cdot 20 \cdot 8 \cdot 0.15 \cdot 290.24 = 34\,828.8 \text{ тг}$$
$$Д_{пр}^{уп} = 2 \cdot 20 \cdot 8 \cdot 0.15 \cdot 320.42 = 15\,380.2 \text{ тг}$$
$$Д_{пр} = 34\,828.8 + 15\,380.2 = 50\,208.9 \text{ тг}$$

в) Доплата за вредные условия труда составляет 30 % от базового должностного оклада рабочих согласно Приложению 18 к постановлению Правительства Республики Казахстан от 27 ноября 2015 года № 957 и вычисляется по формуле 25.

$$Д_{пр} = З_{тар} \cdot \frac{П}{100} = 3\,531\,363.5 \cdot \frac{30}{100} = 1\,059\,409.05 \text{ тг} \quad (25)$$

Таблица 28 – Расчет годового фонда заработной платы основного и обслуживающего персонала

Категория работников	Основная, вспомогательная и управляющая			
Система оплаты труда	Повременно - премиальная			
Должность	Инженер	5	7	Уп
Тарифная ставка, тг/час	387.06	389.06	391.66	430.42
Численность списочных рабочих	4	1	1	2
Фонд рабочего времени, час	1688			
Тарифный фонд, тг/час	3 531 363.5			
Доплата за праздничные дни,	50 208.9			
Доплата за вредность, тг/час	1 059 409.05			
Основной фонд ЗП, тг/час	4 640 981.45			

3.4.3.4 Расчет стоимости оборудования

В технологической части была рассчитана спецификация оборудования цеха экстрагирования травы *P. hydropiper*. Расчет капитальных затрат на приобретение и монтаж оборудования представлен в таблице 29.

Таблица 29 – Количество и стоимость оборудования

Оборудование	Количество, шт.	Цена, тыс тенге	Стоимость, тыс. тенге
1. Экстрактор с мешалкой	1	440	440
2. Эксцельсиор	1	175	175
3. Цетрифуга	1	650	650
4. Вакуум-выпарная установка	1	974	974
5. Друк-фильтр	2	348	696
6. Сборник-отстойник	3	31	93
7. Шаровая мельница	1	200	200
8. Вакуум-вальцовая сушилка	1	760	760
		Итого	3988

Расходы на наладку и монтаж оборудования приведены в таблице 30.

Таблица 30 – Расходы на наладку и монтаж оборудования

Наименование нормативов	Процент от стоимости оборудования, %	Стоимость, тыс. тенге
Антикоррозионные работы	5	199.4
Кабельные разводки	5	199.4
КИПиА	10	398.8
Монтаж оборудования	22	877.4
Вспомогательное оборудование	5	199.4
	Итого:	1 874.4

Для расчета капитальных затрат производства сухой лекарственной субстации из *P. hydropiper* использовали формулу 26:

$$C_{кап.затр} = C_{обор} + \sum C_{затр} \quad (26)$$

$$C_{кап.затр} = 3\ 988 + 1\ 874.4 = 5\ 762.4 \text{ тыс. тг}$$

3.4.3.5 Общепроизводственные расходы

– Содержание и эксплуатация оборудования

Ремонтный фонд составляет 5 % от стоимости оборудования:

$$Ф_{т.р} = 5\ 762.4 \cdot 0.08 = 288.1 \text{ тыс.тг/год}$$

– Отчисления на амортизацию и содержание оборудования составляют 10 % от стоимости оборудования и рассчитывают по формуле 27:

$$А_{об}= С_{затр} \cdot \alpha = 5\ 762.4 \cdot 0.1 = 576.2 \text{ тыс.тг/год} \quad (27)$$

Сумма расходов на содержание и эксплуатацию оборудования рассчитывают по формуле 28:

$$\sum З_1= А_{об} + Ф_{т.р.} = 576.2 + 288.1 = 864.3 \text{ тыс.тг/год} \quad (28)$$

3.4.3.6 Расчет технологических затрат

– Затраты на электроэнергию рассчитывают по формуле 29:

$$З_{эл}=С_{эл} \cdot W \cdot Т_{р.обор.} \quad (29)$$
$$З_{эл} = 17.81 \cdot 1688 \cdot (6 \cdot 1.1 + 5 \cdot 0.5) = 273\ 575.8 \text{ тг}$$

где $С_{эл.}$ – стоимость 1 кВт·ч электроэнергии, тенге (17.81 тенге за 1кВт·ч с НДС для юридических лиц в г. Алматы); W – потребляемая мощность, кВт; $Т_{р.обор}$ – время работы оборудования в год (211 · 8 = 1688 ч).

– Затраты на ОТ и ТБ

Затраты, связанные с организацией труда и техникой безопасности, принимаются равными 8 % от полного годового фонда заработной платы:

$$З_{ОТиТБ} = 4\ 640\ 981.45 \cdot 0.08 = 371\ 278.5 \text{ тг/год}$$

3.4.3.7 Калькуляция себестоимости и рентабельности передела

Себестоимость произведенной продукции представляет собой общую стоимость продукции, которая была произведена в течение текущего периода.

Калькуляция себестоимости представляет собой расчёт затрат на производство и реализацию единицы продукции. Калькуляция себестоимости составляется на основе постатейной классификации затрат. Сущность постатейной классификации заключается в том, что в первую очередь в калькуляции себестоимости определяются затраты, которые непосредственно связаны с технологическим процессом, а затем к ним добавляются затраты, необходимые на содержание и обслуживание производства, а так же на управлении производством на разных уровнях.

В таблице 31 представлены расчеты расхода сырья. Предлагаемая технология предполагает регенерацию отогнанного этилового спирта. Степень регенерации спирта принимаем за 30%.

Таблица 31 – Расход сырья и материалов

Наименование	Часов в год, ч	Годовой расход, кг/год	Цена за единицу, тг/кг	Итоговые затраты, тыс. тг
Спирт этиловый 95%	1688	7714.42	450.0	3 471
Трава *P. hydropiper*		2204.12	600.0	2 424
Вода очищенная		11020.60	10.0	110.2
Упаковочный материал		10 000	5.0	50 000
			Итого	6 708.2

Калькуляция себестоимости и основных затрат приведена в таблице 32 и на рисунке 13.

Таблица 32 – Калькуляция стоимости передела

Статьи затрат	Единица измерения	Цена единицы продукта, тг	Норма в год	Сумма тг/год
Спирт этиловый 95%	кг	450.0	7 714.42	3 471 489
Трава *P. hydropiper*	кг	600	2 204.12	1 322 472
Вода очищенная	кг	10.0	11 020.60	110 206
Упаковочный материал	шт	5.0	10 000	50 000
Электроэнергия	кВт	17.81		273 575.8
Итого условно-переменные затраты				5 227 742.8
Основной фонд ЗП: основных рабочих, руководителей и вспомогательного персонала				4 640 981.45
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования: - амортизация оборудования - тек.и кап. ремонты - содержание оборудования				864 300
Цеховые расходы: расходы на ОТ и ТБ				371 278.5
Итого условно-постоянные затраты				5 876 559.9
Себестоимость передела				11 104 302.7

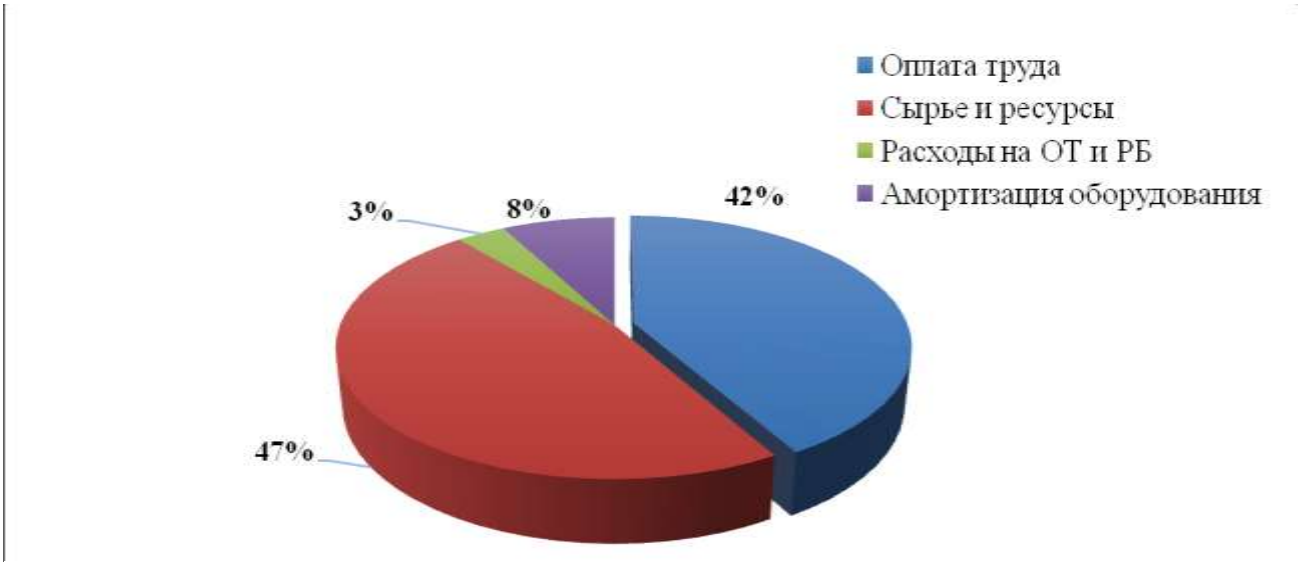


Рисунок 13 – Диаграмма основных затрат

Рассчитаем цену производства одного килограмма сухого экстракта *P. hydropiper*, а также его рыночную стоимость.

Цена производства определяется по формуле (30):

$$Ц = \frac{Р_{год}}{В_{год}} = \frac{11\,104\,302.7}{720} = 15\,442 \text{ тг/кг} \quad (30)$$

где Р – годовые расходы; В – годовой выпуск.

Рыночную стоимость определим по формуле (31):

$$С_{рын} = С_{1\ кг} + С_{доб} + НДС \quad (31)$$

где $С_{1\ кг}$ – себестоимость 1 кг; $С_{доб}$ – добавочная стоимость; НДС – налог на добавленную стоимость.

– Добавочная стоимость равна 15%, тогда:

$$С_{доб} = 15\,442 \cdot 0.15 = 2\,316.3 \text{ тг}$$

– НДС законодательством РК установлен на отметке 12%, тогда

$$НДС = (15\,442 + 2\,316.3) \cdot 0.12 = 2\,131 \text{ тг}$$
$$С_{рын} = 15\,442 + 2\,316.3 + 2\,131 = 19\,889 \text{ тг/кг}$$

В таблице 33 представлены результаты расчетов стоимости 1 кг лекарственной субстанции, выделенной из *P. hydropiper*.

Таблица 33 – Стоимость производства 1 кг лекарственной субстанции

Параметр	Значение, тг/кг
1. Себестоимость 1 кг	15 442
2. Добавочная стоимость	2 316.3
3. Цена с добавочной стоимостью	17 758.3
4. НДС	2 131
5. Рыночная цена	19 889

Годовой доход рассчитавается по формуле 34:

$$Д = C_{1\ кг} \cdot N \quad (34)$$
$$Д = 19\ 889 \cdot 720 = 14\ 320\ 080\ тг$$

где N – количество произведенного БАВ;
Прибыль определим по формуле 35:

$$П = Д - Р \quad (35)$$

Тогда годовая прибыль будет составлять:

$$П = 14\ 320\ 080 - 11\ 104\ 302.7 = 3\ 215\ 777.3\ тг$$

Срок окупаемости определим по формуле 36:

$$C_{окуп} = \frac{C_{передела}}{П} \quad (36)$$
$$C_{окуп} = \frac{11\ 104\ 302.7}{3\ 215\ 777.3} = 3.5\ года$$

где $C_{передела}$ – себестоимость передела.

В таблице 34 представлены итоговые расчеты рентабельности производства.

Таблица 34 – Рентабельность производства

Параметр	Значение
1. Доход	14 320 080 тг
2. Прибыль	3 215 777.3 тг
3. Срок окупаемости	3.5 года

Таким образом, данный цех, спроектированный на производство сухой лекарственной субстанции из *P. hydropiper* и рассчитанный на производство 720 кг/год, будет приносить прибыль 3 215 777.3 тг и окупится через 3.5 года. При этом, используя эффект масштаба и выпуская широкий ассортимент лекарственных субстанций, в том числе микрокапсул БАВ, можно достичь увеличения доходов, как минимум, в 5 раз.

3.5 Технология получения сухого экстракта из травы *P. aviculare*

На основе результатов подбора эффективных технологических параметров была составлена технологическая схема выделения суммы БАВ из травы *Polygonum aviculare* в лабораторных условиях. На рисунке 14 представлена процессуальная технологическая схема выделения суммарного фитокомплекса, с максимально возможным выходом флавоноидов и с полным описанием всех процессов. На рисунке 15 представлена технологическая схема получения субстанции из растительного материала *P. aviculare* в лабораторных условиях. Разработанная нами технология составлена в соответствии с нормативными документами.

3.5.1 Описание технологического процесса

Технологический процесс состоит из следующих технологических процессов:

ВР 1 – Санитарная обработка и подготовка производства включает 5 этапов для обеспечения готовности производства, включающие: обработку помещения, санитарная обработка помещения, подготовка воздуха помещения, подготовка технологической спец.одежы персонала и инструктаж персонала о технике безопасности и подготовка вспомогательных материалов. Подробное описание каждого из этапов указано в технологической схеме производства получения сухого экстракта из травы *P. hydropiper*.

ВР 2 – Подготовка сырья и экстрагента включили следующие этапы: измельчение и просеивание растительного материала; разведение спирта-ректификата. Сырье измельчали на эксцельсиоре до 1 мм. В мернике смешивают рассчитанный объем спирта 95% и воды.

ТП 1 – Экстрагирование методом перколяции. Измельченное сырье смачивают в отдельном закрытом сосуде достаточным количеством экстрагента, добавляя его до полного и равномерного смачивания сырья. Оставляют все это на 4 ч, после чего набухший материал плотно укладывают в перколятор и добавляют такое количество экстрагента для образования «зеркало» над поверхностью. Вытекающую жидкость из экстрактора возвращают обратно в перколятор, закрывают кран и оставляют на 12 ч. Одновременно с истечением вытяжки перколятор пополняется свежим экстрагентом. Процесс перколяции считается завершенным, если одновременно с израсходованием всего объема экстрагента будет достигнуто полное извлечение действующих веществ, что устанавливается

по бесцветности стекающего экстракта из перколята с помощью соответствующих качественных реакций.

Для предотвращения спрессовывания растительного материала в экстракторе, сырье предварительно смачивают экстрагентом в отдельной емкосте до получения равномерной смоченной массы, в среднем расход экстрагента составляет 50-100% по отношению к массе сырья. Для окончательного пропитывания экстрагентом и набухания сырую массу оставляют в закрытом сборнике на 4 ч. Подготовленное таким образом сырье укладывают в перколятор равномерно и достаточно плотно на 12 часов. После того как перколятор загружен с достаточной плотностью, поверхность материала накрывают куском полотна и металлическим грузом.

Первую вытяжку как достаточно концентрированную собирают отдельно (концентрированная вытяжка), целиком спуская ее из перколятора. Затем перколятор заполняют свежим экстрагентом, который после настаивания в течение 6 ч и более несколько раз пропускают через перколятор, в минимальной степени насыщая его действующими веществами. Далее вторую вытяжку (разбавленная вытяжка) спускают, концентрируют и присоединяют к первой.

ТП 2 - Очистка, отстаивание и фильтрование вытяжек. После растворения сгущенного экстракта в концентрированной вытяжки, раствор отстаивают в течение трех суток, выдерживая температуру 8-10 ºС. Далее экстракт отфильтровывают от балластных веществ, выпавших в осадок. Спирт регенерируют из шрота для ТП 1.

ТП 3 – Выпаривание вытяжки. Выпаривание осуществляют греющим водяным паром в вакуум-выпарных аппартах. При этом отогнанный спирт возвращают на ТП 1.

ТП 4 – Сушка. Сгущенный экстракт поступает на вакуум-вальцевую сушилку для удаления остаточной влаги из экстракта.

ТП 5 – Измельчение. Сухой экстракт измельчают в шаровой мельнице.

УМО-6. Фасовка и упаковка субстанции. В соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы». В упаковке, обеспечивающей защиту от света.

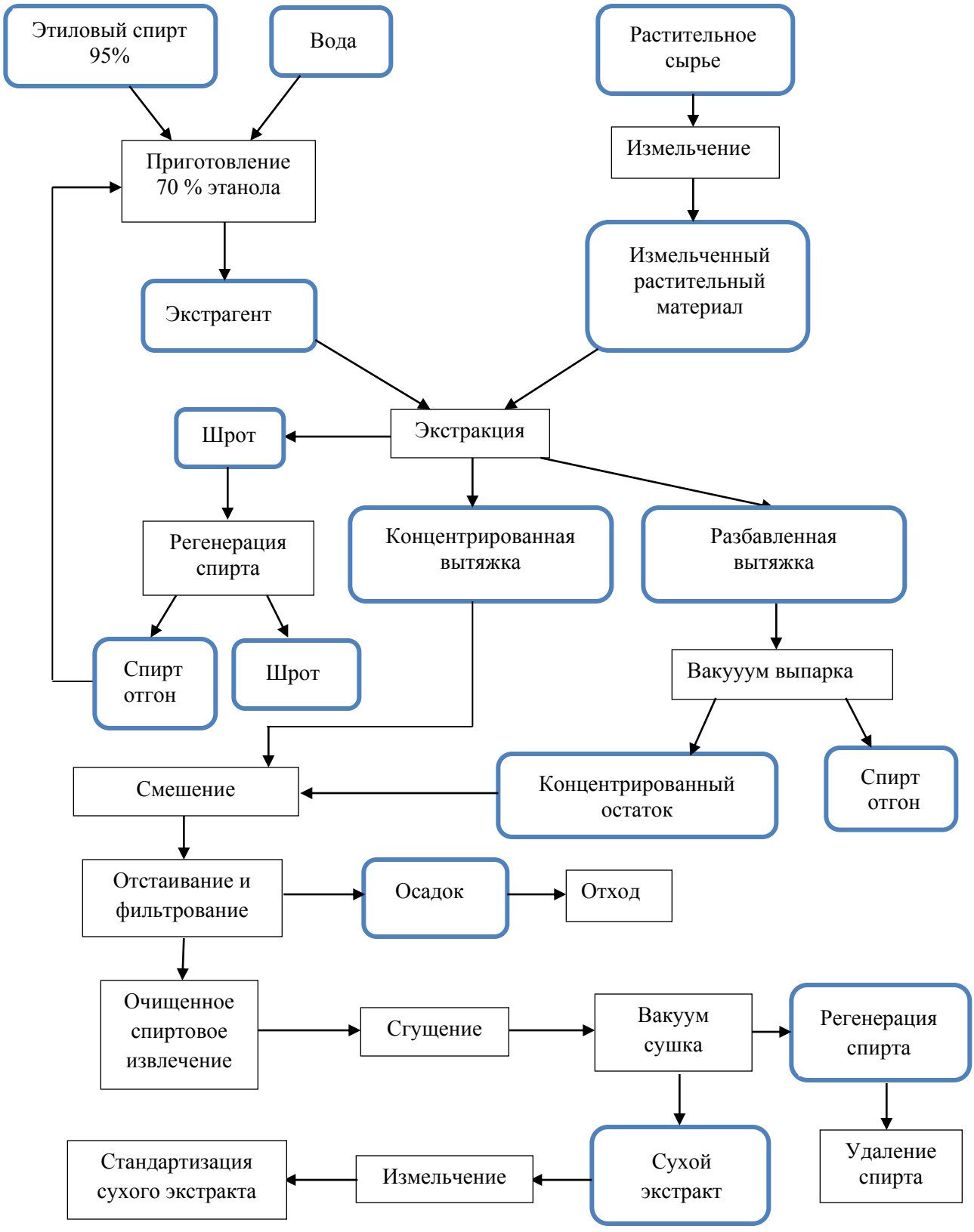


Рисунок 14 – Процессуальная схема получения субстанции *P. aviculare*

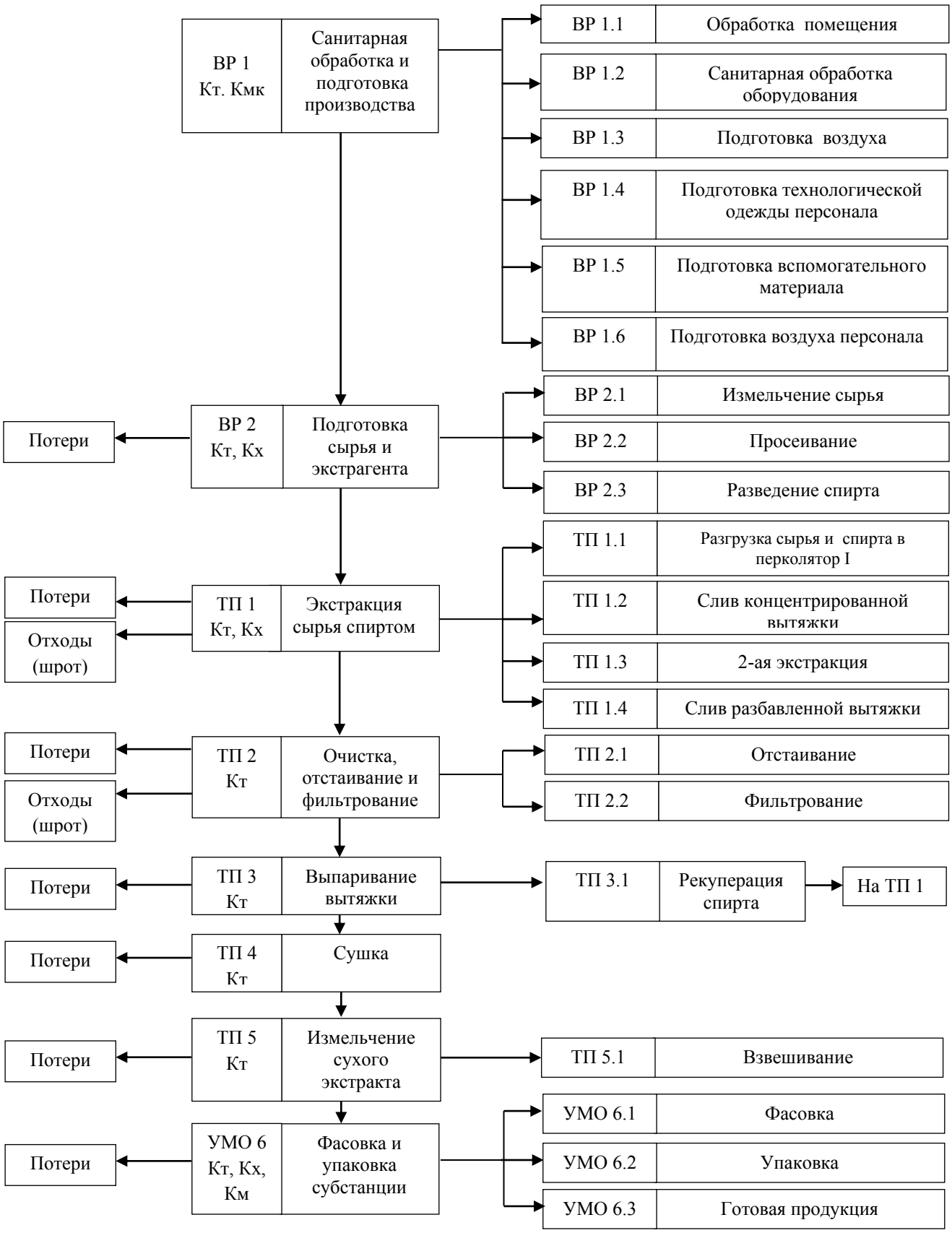


Рисунок 15 – Принципиальная схема получения субстанции из *P. aviculare*

На рисунке 16 представлена технологическая схема производства сухого экстракта *Polygonum aviculare.*

Траву измельчают на эксцельсиоре (1) до крупности частиц основной массы сырья до 1 мм. Измельчённое сырьё собирают в сборник (2).

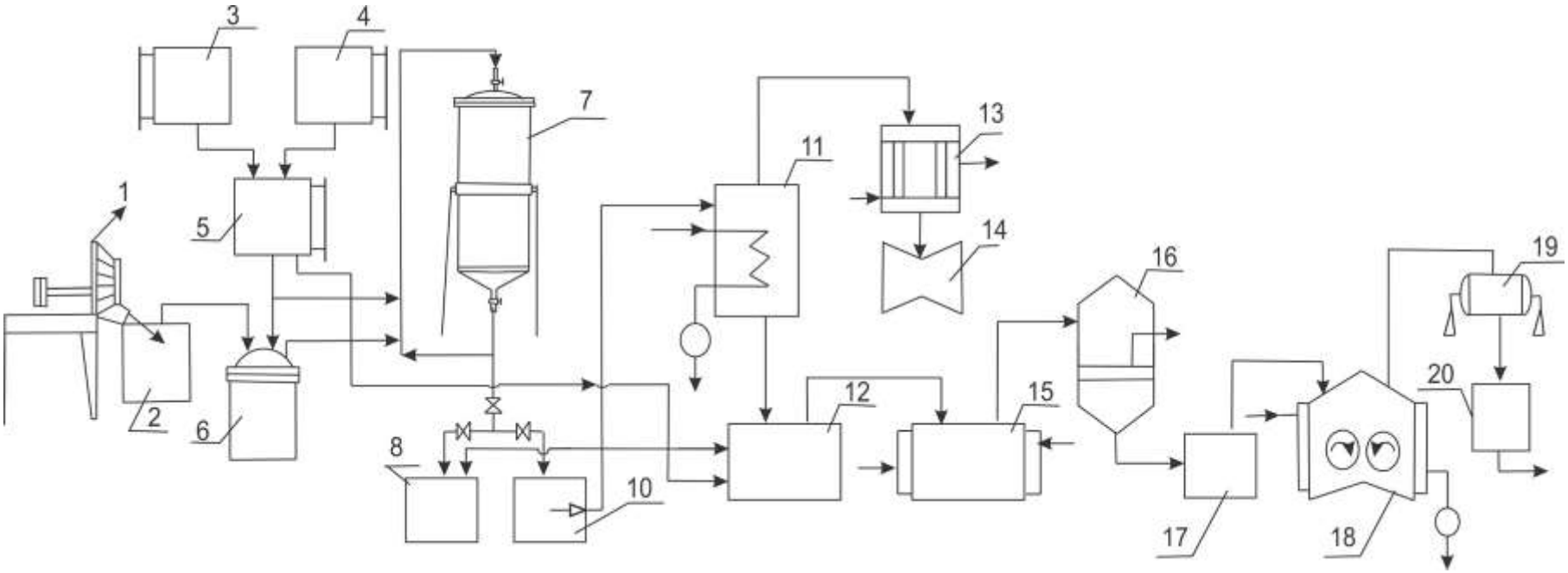
В качестве экстрагента используют 70% спирт этиловый. Для его приготовления из мерника (4) сначала загружают в мерник 6 расчётное количество спирта-ректификата 95%, затем из мерника (5) заливают расчётное количество очищенной воды. В результате разности плотностей происходит их перемешивание.

Измельченное сырье небольшими порциями засыпают в емкость для замачивания (6) и заливают расчетный объем экстрагента и выдерживали в течение 4 ч, после чего набухший материал плотно укладывают в перколятор (7) (рисунок 16) и при открытом спускном кране добавляют такое количество экстрагента, чтобы слой его над поверхностью составлял 30-40 мм и оставляют на 12 часов. Затем затем медленно перколируют. Концентрированную вытяжку собирают в приемник концентрированной вытяжки (8). Затем перколятор заполняют свежим экстрагентом, который после настаивания в течение 6 ч и несколько раз пропускают через перколятор. Менее концентрированную вытяжку сливают приемник разбавленной вытяжки (9). Спирт, содержащийся в отработанном материале, регенерируют для приготовления экстрагента.

Полученную разбавленную вытяжку из приемника (9) с помощью фильтра-грибка (10) и вакуума загружают в вакуум-выпарной аппарат (11) и ведут концентрирование при температуре 50-60 ºС до получения сконцентрированного густого остатка, который сливают в приемник сгущенной вытяжки (12). Вторичный пар поступает из вакуум-выпарного аппарата (11) поступает в конденсатор (13) и сборник (14), затем конденсат используют для приготовления экстрагента (50%).

Густоватый остаток растворяют в первой (концентрированной) вытяжке, направляют в сборник-отстойник (15) и отстаивают при пониженной температуре (8 ºС) в течение 3-х суток. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через друк-фильтр (16) в сборник (17).

После отгонки большей половины растворителя густоватый остаток направляют в вакуум-вальцовую сушилку (18) для получения сухого экстракта до содержания остаточной влаги 5%. Комковатую сухую массу Высушенный экстракт измельчают на шаровой мельнице (19). Получают аморфный порошок коричневого цвета. После стадии стандартизации готовый продукт направляют на линию упаковки (20).



1 – эксцельсиор; 2 – сборник измельченного сырья; 3 – емкость для замачивания сярья; 4 – мерник спирта-ректификата; 5 – мерник воды очищенной; 6 – емкость для замачивания сырья; 7 – перколятор; 8 – приемник концентрированной вытяжки; 9 – приемник разбавленной вытяжки; 10 – фильтр-грибок; 11 – вакуум-выпарной аппарат; 12 – приемник сгущенной вытяжки;13 – конденсатор; 14 – сборник отгона; 15 – сборник-отстойник; 16 – друк-фильтр; 17 – сборник; 18 – вакуум-вальцовая сушилка; 19 – шаровая мельница; 20 – машина упаковки готовой продукции.

Рисунок 16 – Аппаратурная схема производства сухого экстракта *Polygonum aviculare*

3.5.2 Материальный баланс

В таблицах 35-41 представлены постадийные и в таблице 42 – суммарный материальный баланс технологии получения сухого экстракта из травы *Polygonum aviculare* с входными и выходными данными. Так, для получения 10 кг субстанции требуется 44 кг мелкоизмельченного растительного материала *P. aviculare* и 445 кг спирта 95%.

Таблица 35 – Материальный баланс процесса измельчения растительного сырья (ВР 2.1)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
Израсходовано:					
А. Сырье					
1. Трава *P. aviculare*, в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 5.18 26.80 3.41	2.0	 0.10 0.54 0.07	13.3	Нμ = 150 кг/м3
2. Итого		2.0			
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Трава *P. aviculare*, в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 5.18 26.80 3.41	1.90	 0.098 0.51 0.06		ρ=230 кг/м3
Б. Потери					
2. Трава *P. aviculare*, в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 5.18 26.80 3.41	0.10	 $5.18 \cdot 10^{-3}$ 0.027 $3.41 \cdot 10^{-3}$		
2. Итого		2			

Таблица 36 – Материальный баланс приготовления 70% этанола (ВР 2.3)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
Сырье					
1. Этиловый спирт 95%, в нем:	95	20.23		24.93	ρ=811,4 кг/м3

Продолжение таблицы 36

1	2	3	4	5	6
- спирт безводный - вода	100		19.22 1.01		
2. Вода очищенная		8.13	8.13	8.13	ρ=1000 кг/м^3
3. Итого		28.36	29.76		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Этиловый спирт 70%, в нем: - спирт безводный - вода	50 100	28.25	 19.78 8.48	31.91	ρ=885.4 кг/м^3
Б. Потери					
1. Этиловый спирт 70%, в нем: - спирт безводный - вода	50 100	0.11	 0.08 0.03		
2. Итого		28.36	28.36		

Таблица 37 – Материальный баланс экстрагирования сырья (ТП 1)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Трава *P. aviculare,* в нем: - влажность - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды	 5.18 26.80 3.41	1.90	 0.098 0.51 0.06		ρ=230 кг/м^3
2. Этиловый спирт 70%, в нем: - спирт безводный - вода	50 100	28.25	 19.78 8.48	31.88	ρ=930.1 кг/м3
3. Итого		30.15			
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Спиртовое извлечение, - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - этиловый спирт 70%, в нем: • спирт безводный • вода	 100	26.08	 0.67 0.05 25.41 17.79 7.62	26.61	ρ= 980.25 кг/м3

Продолжение таблицы 37

1	2	3	4	5	6
Б. Отходы					
1. Шрот		3.89			
2. Фильтрат (балластные вещества)		0.18			
3. Итого		30.15			

Таблица 38 – Материальный баланс выпаривания спиртовой вытяжки (ТП 3)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Спиртовое извлечение, - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - этиловый спирт 70%, в нем: • спирт безводный • вода	100	26.08	 0.67 0.05 25.41 17.79 7.62	26.61	ρ= 980.25 кг/м^3
2. Итого		26.08	26.08		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Сгущенное извлечение, в нем: - жидкая фаза - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды		1.38	 0.67 0.71 0.05		
Б. Отходы					
1. Отгон жидкой фазы в нем: • спирт безводный • вода	58 (масса)	24.17	 14.02 10.15		
В. Потери					
1. Жидкая фаза, в ней - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - этиловый спирт 70%, в нем:		0.53	 0.02 0.51		

Продолжение таблицы 38

1	2	3	4	5	6
• спирт безводный • вода			0.36 0.15		
2. Итого		26.08	26.08		

Таблица 39 – Материальный баланс сушки экстрактов (ТП 4)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Сгущенное извлечение, в нем: - жидкая фаза - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды		1.38	 0.67 0.71 0.05	1.16	
2. Итого		1.38	1.38		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. aviculare*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3.2	0.48	 0.46 0.058 0.015	0.95	ρ=505 кг/м^3
Б. Отходы					
1. Влага		0.87			
В. Потери					
1. Сухой экстракт *P. aviculare,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3	0.03	 0.029 $3.6\cdot10^{-3}$ $9\cdot10^{-4}$		
2. Итого		1.38	1.38		

Таблица 40 – Материальный баланс измельчения сухого экстракта (ТП 5)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P.*		0.48		0.95	ρ=505 кг/м^3

Продолжение таблицы 40

1	2	3	4	5	6
aviculare, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3.2		 0.46 0.058 0.015		
2. Итого		0.48	0.48		
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. aviculare*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3.2	0.47	 0.45 0.054 0.015	0.86	ρ=548 кг/м^3
Б. Потери					
1. Сухой экстракт *P. aviculare,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3.2	0.012	 0.0116 $1.44\cdot10^{-3}$ $3.84\cdot10^{-4}$		
2. Итого		0.48	0.48		

Таблица 41 – Материальный баланс фасовки и упаковки готовой субстанции (УМО 6)

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Масса, кг		Объем, л	Примечание
		Техническая	Составных частей		
1	2	3	4	5	6
Израсходовано:					
А. Полупродукты					
1. Сухой экстракт *P. aviculare*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3.2	0.47	 0.45 0.054 0.015	0.86	ρ=548 кг/м^3
2. Итого					
Получено:					
А. Полупродукты					
1. Расфасованный сухой экстракт *P. aviculare*, в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	 96.8 12 3.2	0.455	 0.44 0.05 0.014		

Продолжение таблицы 41

1	2	3	4	5	6
Б. Потери					
1. Порошок сухого экстракта *P. aviculare,* в нем: - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды - влажность	96.8 12 3.2	0.015	0.014 $1.74 \cdot 10^{-3}$ $4.8 \cdot 10^{-4}$		
2. Итого		0.48	0.48		

Таблица 42 – Материальный баланс (суммарный) технологии получения сухого экстракта *P. aviculare*

Израсходовано		Получено	
Наименование сырья	Значение, кг	Наименование конечного продукта, отходов и потерь	Значение, кг
Этиловый спирт 95%, в нем: - спирт безводный - вода	20.23 (19.22) (1.10)	Сухой экстракт *P. aviculare*, в нем: - экстрактивные вещества, в т.ч. флавоноиды - влажность	0.455 (0.44) (0.05) (0.014)
Вода очищенная	8.13	Отгон спирта в нем - спирт безводный - вода	24.56 (14.88) (10.77)
Трава *P. aviculare*, в нем: - влажность 5.18 % - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды 3.41%	1.90 (0.098) (0.51) (0.06)		
		Отходы	
		Шрот	3.89
		Фильтрат	0.18
		Потери - экстракт - экстрактивные вещества - спирт безводный - вода	1.18 (0.59) (0.075) (0.255) (0.255)
Итого	30.26	Итого	30.26

3.6 Технология получения сухого экстракта из травы *P. minus*

Поскольку значения отработанных технологических параметров для надземной части *P. minus* во многом совпадает с параметрами технологии получения сухого экстракта из травы *P. hydropiper*: оптимальный экстрагент – 50% спирт, соотношение сырье: экстрагент 1:7, степень измельчения растительного материала – 3 мм, метод экстракции – перколяция, время I экстракции – 12 часов, время II экстракции – 6 часов. Поэтому технология получения фитокомплекса из травы *P. hydropiper*, обладающего биологической активностью применительная для получения сухого экстракта из травы *P.*

minus. Однако трава *P. minus* имеет отличительные технологические свойства растительного материала, поэтому в таблице 43 приводится суммарный материальный баланс для данной технологии.

Таблица 43 – Материальный баланс (суммарный) технологии получения сухого экстракта *P. minus*

Израсходовано		Получено	
Наименование сырья	Значение, кг	Наименование конечного продукта, отходов и потерь	Значение, кг
Этиловый спирт 95%, в нем: - спирт безводный - вода	5.13 (4.87) (0.26)	Сухой экстракт *P. minus*, в нем: - экстрактивные вещества, в т.ч. флавоноиды - влажность	0.23 (0.021) (0.011)
Вода очищенная	6.04	Отгон спирта в нем - спирт безводный - вода	9.81 (4.51) (5.30)
Трава *P. minus*, в нем: - влажность 7.10 % - экстрактивные вещества, т.ч. флавоноиды 3.41%	0.93 (0.066) (0.19) (0.04)		
		Отходы	
		Шрот	1.42
		Фильтрат	0.11
		Потери - экстракт - экстрактивные вещества - спирт безводный - вода	0.43 (0.14) (0.075) (0.12) (0.092)
Итого	12.10	Итого	12.10

3.7 Стандартизация сухих экстрактов

Согласно ГФ XIII, сухие экстракты стандартизируют по следующим показателям [232] :

1. Содержание действующих веществ

Поскольку группой действующих веществ для растений рода *Polygonum L*. считаются флавоноиды, то и изучаемые виды *P. hydropiper*, *P. aviculare, P. minus* стандартизируют по сумме флавоноидов. Методики определения флавоноидов приводятся в подглаве 2.2.6.

2. Определение содержания тяжелых металлов.

В пересчете на свинец, не выше 60 мкг/г. Поскольку в изучаемых растительных материалах свинец не был обнаружен. Определение свинца в полученных сухих экстрактах не проводилось в данной работе.

3. Определение потери в массе при высушивании проводят по фармакопейным методом. Если нет иных указаний в частных статьях, сухие экстракты должны содержать не более 5 % влаги.

В таблице 44 проводятся данные стандартизации полученных сухих экстрактов *P. hydropiper, P. aviculare* и *P. minus*.

Таблица 44 – Данные стандартизации полученных сухих экстрактов и количественный состав основных групп БАВ

Показатель	*P. hydropiper*	*P. aviculare*	*P. minus*
Органолептические свойства	Сыпучий порошок темно-коричневого цвета с горьким вкусом	Сыпучий порошок светло-коричневого цвета с горьким вкусом	Сыпучий порошок светло-коричневого цвета с горьким вкусом
Влажность, %	4.34	3.08	4.7
Содержание флавоноидов, %	10.27	11.36	8.92
Экстрактивные вещества, %	19.00	22.75	24.73
Дубильные вещества, %	5.96	4.12	3.58
Полисахариды, %	1.01	0.95	1.53
Кумарины, %	6.85	7.23	4.41
Сапонины, %	3.17	2.16	4.03

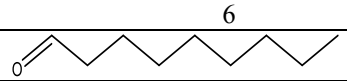
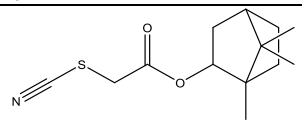
Как видно из результатов таблицы, выход экстрактивных веществ для трех растений составил 19-25% в пересчете на сырье. Содержание флавоноидов превышает содержание флавоноидов в фитопрепаратах в 3-4 раза, чем в сухом сырье. Наименьший выход составляет для полисахаридов в сухом экстракте, поскольку в технологических линиях присутствует стадия отстаивания экстракта при пониженной температуре для отделения экстракта от высокомолекулярных веществ. А благодаря своей химической природе, полисахариды осаждаются вместе с остальными балластными веществами

3.7.1 Хромато-масс анализ липофильных фракций

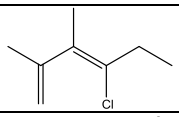
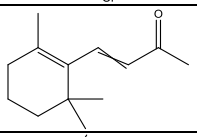
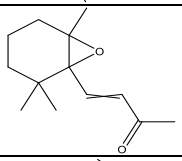
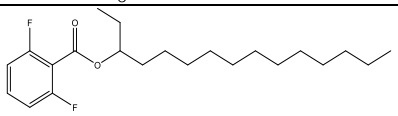
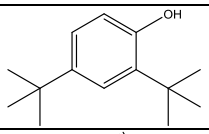
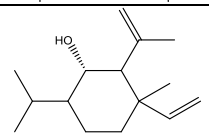
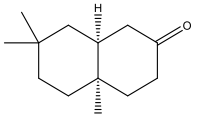
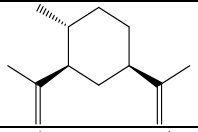
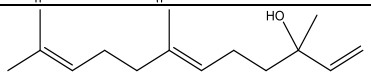
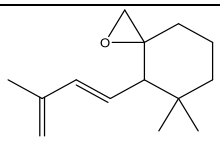
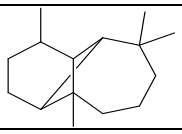
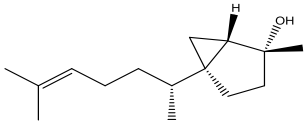
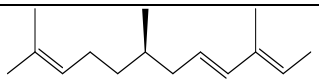
Липофильные фракции выделяли из дихлорметановых фракций двух этанольных экстрактов экстракцией их системой метанол-дихлорметан.

Методом хромато-масс спектроскопией анализировали липофильные фракции РН-3-3 экстракта *P. hydropiper* (таблица 45) и РА-2-7 – *P. aviculare* (таблица 46) на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS-QP2010 Shimadzu (Shimadzu Co., Токио).

Таблица 45 – Компонентный состав липофильной фракции *P. hydropiper*

Время удер-жива-ния, мин	%	Название	CAS-номер	Брутто-формула	Структурная формула
1	2	3	4	5	6
10.726	4.80	1-нональ	124 - 19 - 6	$C_9H_{18}O$	
15.256	6.85	Изоборнил-тиоцианоацетат	115 - 31 - 1	$C_{13}H_{19}NO_2S$	

Продолжение таблицы 45

1	2	3	4	5	6
18.959	0.11	Тетрадекан	629 - 59 - 4	$C_{14}H_{30}$	
20.803	2.96	(Z)-4-хлоро-2,3-диметил-1,3-гексадиен	105977 - 13 - 7	$C_8H_{13}Cl$	
20.803	2.62	4-(2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-ил)-3-бутен-2-он	79 - 77 - 6	$C_{13}H_{20}O$	
21.147	2.02	4- (2,2,6-триметил-7-оксабицикло [4.1.0] гепт-1-ил) - 3-бутен-2-он	23267 - 57 - 4	$C_{13}H_{20}O_2$	
21.294	3.59	2,6-дифтор-бензойная кислота, 3-пентадециловый эфир	-	$C_{22}H_{34}F_2O_2$	
21.760	2.65	2,4-бис (1,1-диметилэтил) фенол	96 - 76 - 4	$C_{14}H_{22}O$	
22.274	3.39	элем-1,3-диен-6.альфа.-	-	$C_{15}H_{26}O$	
22.873	2.23	2 (1H) - нафталинона, октагидро-4a, 7,7-триметил-, цис-(6CI, 8CI)	7056 - 56 - 6	$C_{13}H_{22}O$	
22.934	2.44	Циклогексан, 1-метил-2,4-бис (1-метилэтенил) -, (1α, 2β, 4β) - (9CI)	62337 - 95 - 5	$C_{13}H_{22}$	
23.918	2.93	1,6,10-додекатриен-3-ол, 3,7,11-триметил-, (6E) -	40716 - 66 - 3	$C_{15}H_{26}O$	
24.997	11.87	5,5-диметил-4 - [(1e) -3-метил-1,3-бутадиенил] -1-оксаспиро [2.5] октан	-	$C_{14}H_{22}O$	
25.630	2.75	2,6,6,9-тетраметил-трицикло [5.4.0.02,8] ундекан	-	$C_{15}H_{26}$	
25.825	2.50	(1S,2R,5R)-2-метил-5 - ((r) -6-метилгепт-5-ен-2-ил) бицикло [3.1.0] гексан-2-ол	58319 - 05 - 4	$C_{15}H_{26}O$	
25.898	2.39	2,4,10-Додекатриен, 3,7,11-триметил-, (2E, 4E, 7R) -	172549 - 29 - 0	$C_{15}H_{26}$	

Продолжение таблицы 45

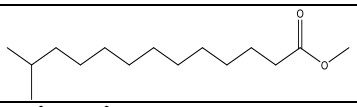
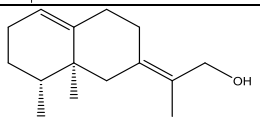
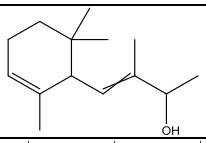
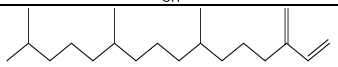
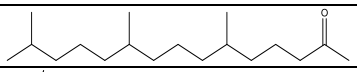
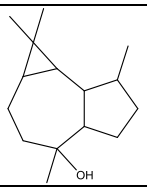
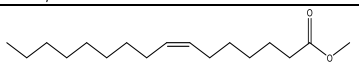
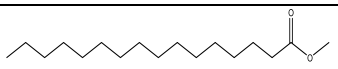
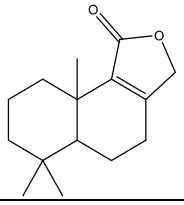
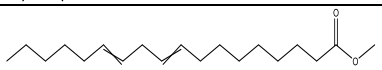
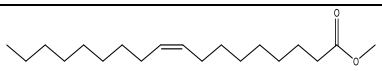
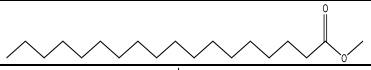
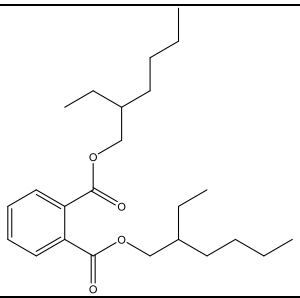
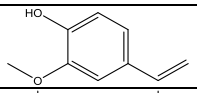
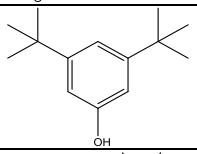
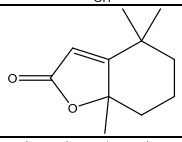
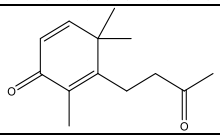
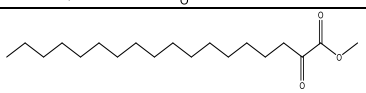
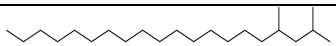
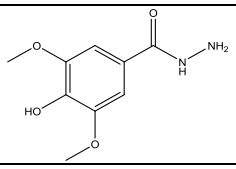
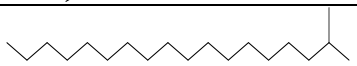
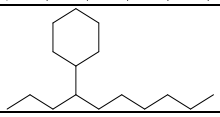
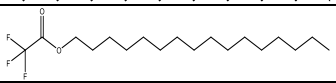
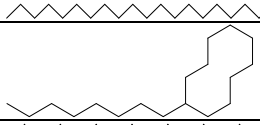
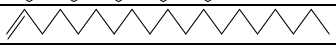
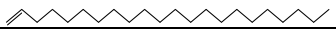
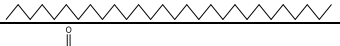
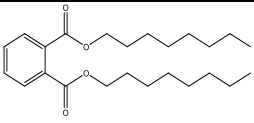
1	2	3	4	5	6
26.791	3.03	Тридекановая кислота, 12-метил-, метиловый эфир	5129 - 58 - 8	$C_{15}H_{30}O_2$	
27.354	3.68	(E)-2-((8R,8aS)-8,8a- диметил-3,4,6,7,8,8a-гексагидронафтале-2 (1H) илиден) пропан-1-ол	22387 - 74 - 2	$C_{15}H_{24}O$	
28.388	2.61	3-бутен-2-ол, 3-метил-4- (2,6,6-триметил-2-циклогексен-1-ил)	70172 - 00 - 8	$C_{14}H_{24}O$	
29.070	2.80	7,11,15-триметил-3-метиленгексадек-1-ен	504 - 96 - 1	$C_{20}H_{38}$	
29.240	2.42	6,10,14-триметил-2- пентадеканон	502 - 69 - 2	$C_{18}H_{36}O$	
30.041	3.01	эпиглобулол; 1,1,4,7-тетраметил-декагидро-1H-циклопропа [e] азулен-4-ол	552-02-3	$C_{15}H_{26}O$	
30.819	2.02	7-гексадеценовую кислоту, метиловый эфир, (Z) -	56875 - 67 - 3	$C_{17}H_{32}O_2$	
30.947	2.36	Гексадекановая кислота, метиловый эфир	112 - 39 - 0	$C_{17}H_{34}O_2$	
32.436	17.52	6,6,9a-триметил-4,5,5a, 6,7,8,9,9a-октагидронафто [1,2-C] фуран-1 (3H) -он	36506 - 91 - 9	$C_{15}H_{22}O_2$	
34.066	3.32	9,12-октадекадиеновой кислоты, метилового эфира	2462 - 85 - 3	$C_{19}H_{34}O_2$	
34.391	3.61	9-октадеценовая кислота (Z)-, метиловый эфирый	112 - 62 – 9	$C_{19}H_{36}O_2$	
34.511	2.41	Метилстеарат	112 - 61 - 8	$C_{19}H_{38}O_2$	
42.657	25.94	Фталевая кислота, бис (2-этилгексил) эфир	117 - 81 - 7	$C_{24}H_{38}O_4$	

Таблица 46 – Компонентный состав липофильной фракции *P. aviculare*

Время удер-жива-ния, мин	%	Название	CAS-номер	Брутто-формула	Структурная формула
16.673	1.73	2-метокси-4-винилфенол	7786 - 61 - 0	$C_9H_{10}O_2$	
21.679	1.81	3,5-ди-трет-бутилфенол	1138 - 52 - 9	$C_{14}H_{22}O$	
22.181	3.04	2(4H)-бензофуранон, 5,6,7,7a?4,4,7a-триметил-	15356 - 74 - 8	$C_{11}H_{16}O_2$	
23.869	7.06	Гептадекан	629 - 78 - 7	$C_{17}H_{36}$	
26.079	0.98	2,3-дегидро-4-оксо-7,8-дигидро-.бетта.-ионон	83646 - 60 - 0	$C_{13}H_{18}O_2$	
27.101	1.05	Октадекановая кислота, 2-оксо-, метиловый эфир	2380 - 18 - 9	$C_{19}H_{36}O_3$	
27.257	0.95	Эйкозан, 2,4-диметил-	75163 - 98 - 3	$C_{22}H_{46}$	
27.693	3.02	Бензойная кислота, 4-гидрокси-3,5-диметокси-, гидразид	1443 - 76 - 1	$C_9H_{12}N_2O_4$	
27.701	3.24	Октадекан, 2-метил-	1560 - 88 - 9	$C_{19}H_{40}$	
28.186	1.31	(10E)-10-геникозин	95008 - 11 - 0	$C_{21}H_{42}$	
28.335	16.67	Октадекан	593 - 45 - 3	$C_{18}H_{38}$	
28.532	1.62	Декан, 4-циклогескил-	13151 - 75 - 2	$C_{16}H_{32}$	
31.815	0.94	Эйкозан, 2-метил-	1560 - 84 - 5	$C_{21}H_{44}$	
32.255	2.01	Трифторацетокси-гексадекан	6222 - 03 - 3	$C_{18}H_{33}F_3O_2$	
32.384	12.75	Тетракозан	646 - 31 - 1	$C_{24}H_{50}$	
32.656	1.91	Циклодекан, октил-	16539- 09 - 6	$C_{18}H_{36}$	
35.980	1.46	Нонандека-1-ен	18435- 45 - 5	$C_{19}H_{38}$	
36.084	6.9	Гексакозан	630 - 01 - 3	$C_{26}H_{54}$	
39.399	0.99	1-докозен	1599 - 67 - 3	$C_{22}H_{44}$	
39.487	3.29	Октакозан	630 - 02 - 4	$C_{28}H_{58}$	
41.516	0.99	1,2-Бензол-дикарбоновая кислота, диоктиловый эфир	117 - 84 - 0	$C_{24}H_{38}O_4$	
42.670	1.01	Тетратриконтан	14167- 59 - 0	$C_{34}H_{70}$	

Так, из фракции выделенной из экстракта *P. hydropiper* по времени удерживания идентифицировали 29 липофильных веществ. Изоборнил-тиоцианоацетат (6.85%), 5,5-диметил-4 - [(1e) -3-метил-1,3-бутадиенил] -1-оксаспиро [2.5] октан (11.87%), 6,6,9a-триметил-4,5,5a, 6,7,8,9,9a-октагидронафто [1,2-C] фуран-1 (3H) -он (17.52%), фталевая кислота, бис (2-этилгексил) эфир (25.94%) обнаружены в наибольших концентрациях. Фракция *P. aviculare* РА-2-7 содержала 22 липофильных вещества, из них гептадекан (7.06%), октадекан (16.67%), тетракозан (12.75%) в наибольших концентрациях в пересчете на массу фракции.

3.7.2 Жирнокислотный анализ

Глицириды жирных кислот являются физиологически активными, особенно глицириды некоторых жирных ненасыщенных кислот. К ним относятся линоленовая, олеиновая, линолевая и арахидоновая кислоты, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности живого организма (фактор витамина F).

Методом ГЖХ был проведен жирнокислотный анализ экстрактов *P. hydropiper*, *P. aviculare* и *P. minus* [242]. Образцы для анализа были подготовлены в соотвествии с известными методикой (таблица 47 и рисунок 17).

Таблица 47 – Жирнокислотный анализ сухих экстрактов

Формула	Название кислоты	*P. hydropiper*	*P. aviculare*	*P. minus*
8:0	Каприловая	63.37	40.43	-
15:0	Пентадекановая	-	-	3.20
16:0	Пальмитиновая	13.39	16.40	12.30
16:1	Пальмитолеиновая	-	-	4.50
18:0	Стеариновая	2.09	-	5.20
18:1∆9	Олеиновая	3.08	9.76	52.20
18:2∆6	Линолевая	7.48	13.01	20.60
18:3∆3	Линоленовая	5.59	20.40	0.9
20:0	Арахидоновая	3.03	-	-

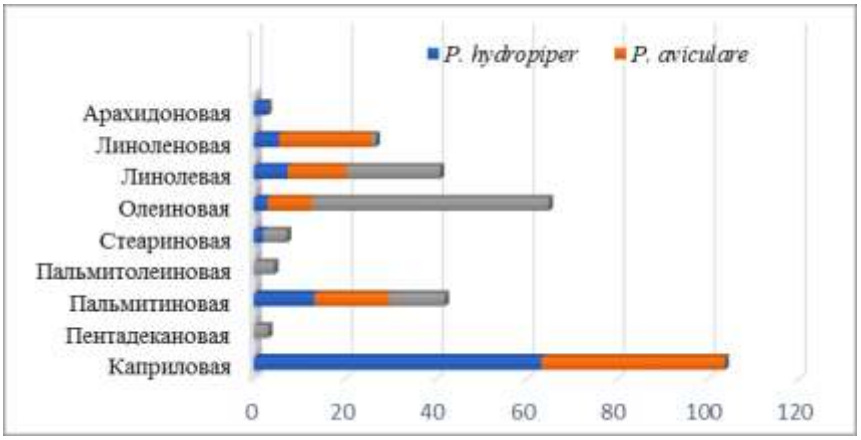


Рисунок 17 – Жирнокислотный анализ сухих экстрактов

В результате проведенного анализа идентифицированы 7 жирных кислот в составах *P. hydropiper* и *P. minus,* 5 жирных кислот – в *P. aviculare*. В составах *P. hydropiper* и *P. aviculare* преобладает каприловая кислота 8:0 в концентрациях 63.37% и 40.43%, соответственно; олеиновая – в *P. minus*. В меньших концентрациях в *P. hydropiper* содержатся пальмитиновая 16:0 (13.39%) и линолевая 18:2∆6 (7.48%) кислоты; в *P. aviculare* – линоленовая 18:3∆3 (20.40%) и пальмитиновая 16:0 (16.40%) кислоты; в *P. minus* – линолевая 18:2∆6 (52.20%) и пальмитиновая 16:0 (12.30%). Впервые составе в *P. hydropiper* была идентифицирована арахидоновая кислота.

3.7.3 Вещества, выделенные из *Polygonum hydropiper*

На рисунке 18 представлены структурные формулы, выделенных веществ из экстракта надземной части *Polygonum hydropiper*.

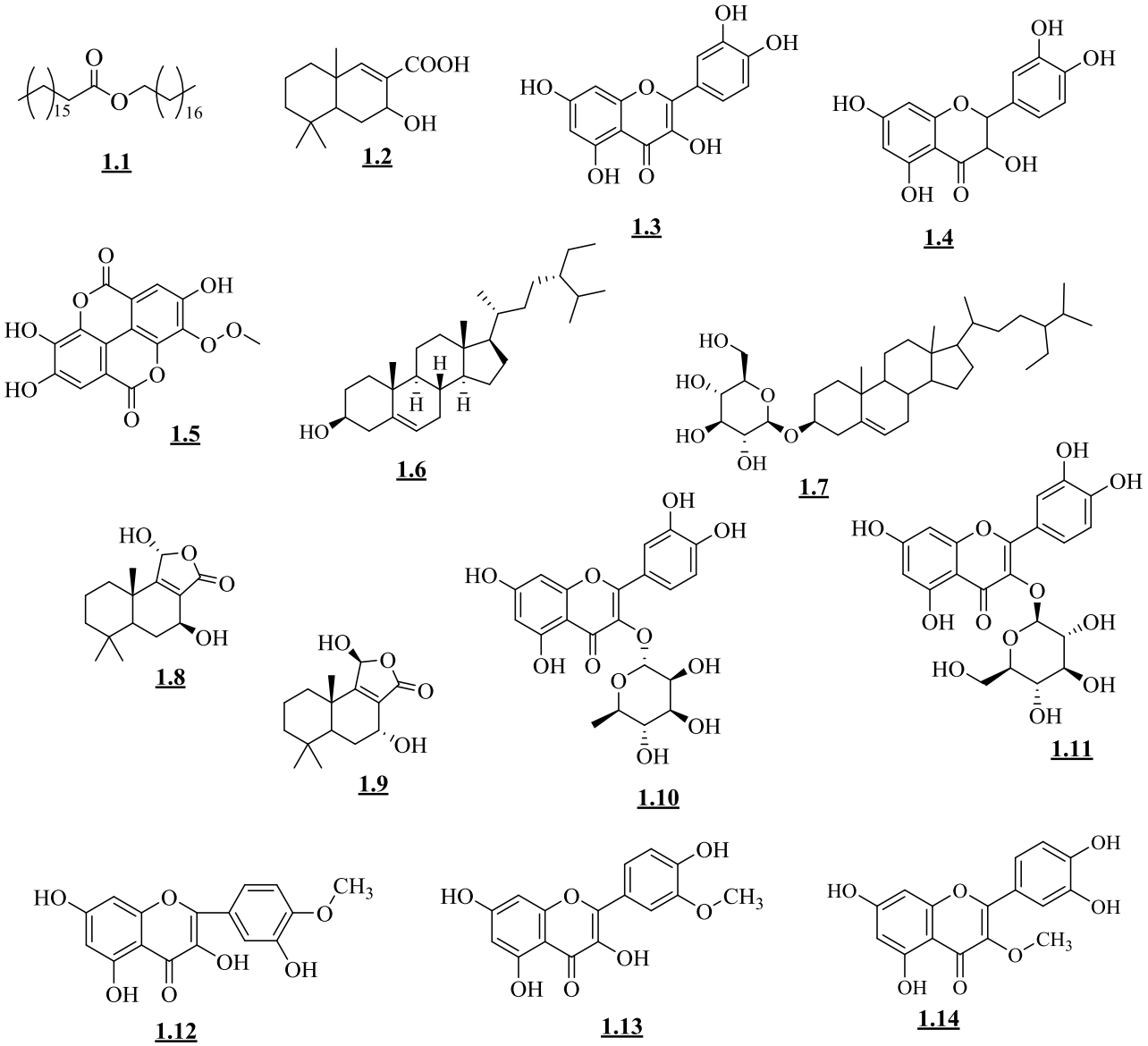
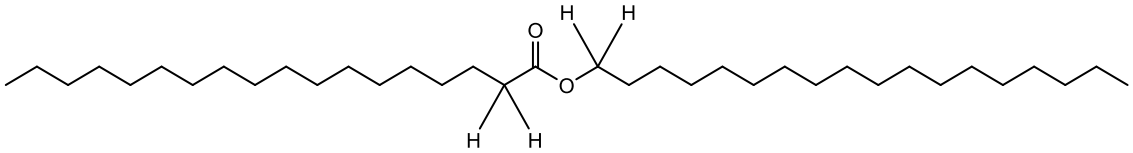


Рисунок 18 – Вещества, выделенные из *P. hydropiper*

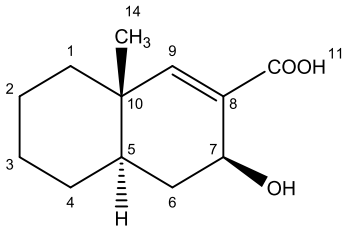
Соединение (**1.1**), $C_{36}H_{72}O_2$, белое аморфное вещество, было идентифицировано как **стеарил стеарат** (таблица 48). Молекулярная формула подтверждена масс-спектром ES-MS (*m/z*)*:* 536 (M^+), 285.



Соединение (1.1)

Одно- и двумерный спектры вещества (**1.1**) показали 18 пиков среди которых один первичный и 17 вторичных атомов углерода. ^{1}H ЯМР-спектр показал наличие пяти сигналов: одного синглета интенсивностью в 28 протона при δ 1.25; 3 триплета при δ 4.05, 2.28, 0.88 интенсивностью в один протон и один метильный мультиплет δ 1.64 – 1.58.

Соединение (**1.2**), $C_{14}H_{22}O_3$, бесцветные кристаллы, ES-MS (*m/z*)*:* 261,14 (M^+) было идентифицировано как **изополипиперовая кислота** (таблица 48).



Соединение (1.2)

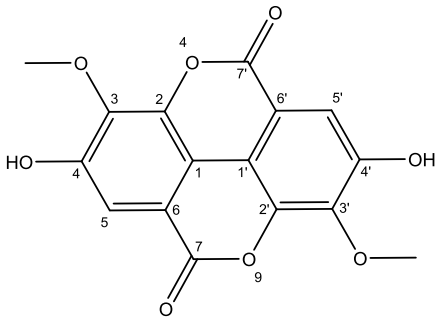
Одно- и двухмерный анализ ЯМР показал, что его структура была такой же, как и полипиперовая кислота; однако сравнение его данных ЯМР с данными полипипероновой кислоты показало незначительные различия в данных, связанных главным образом с положениями С-5-С-7, что указывает на то, что конфигурация на С-7 была инвертирована. Протон Н-7 в спектре ^{1}Н-ЯМР полипипероновой кислоты показал лишь небольшую корреляцию (4.7 Гц) с Н-6α и вообще не связывал с Н-6β, тогда как Н-7 в изополипиперовой кислоте показывал связь 9.6 Гц с Н-6α и связь 7.6 Гц с Н-6β. Это согласуется с тем, что Н-7 является осевым. Экваториальная конфигурация 7-ОН в изополипиперовой кислоте также согласуется со сдвигом Н-5 в верхнее поле на 0.30 м.д. по сравнению с Н-5 в полипиперовой кислоте.

Ранее данное соединение было выделено из растения *Tasmannia lanceolata,* но было выделено впервые из *P. hydropiper* [243].

Соединение 1.5, **C**$_{16}$H$_{10}$O$_8$, ES-MS (*m/z*)*:* 330 (M^+), 259, 287, 315, было идентифицировано как **3,3'-ди-О-метилэллаговая кислота**.

УФ-спектр, λ^{EtOH}_{max} nm: 247, 286 (sh), 358, 375.

ИК спектр (KBr): 3400, 2960, 2850, 1725, 1610, 1580, 1485, 1440, 1355, 1285, 1215, 1175, 1105s, 1070, 990, 915, 870, 795, 760, 740, 625, 575, 535 см$^{-1}$.



Соединение (1.5)

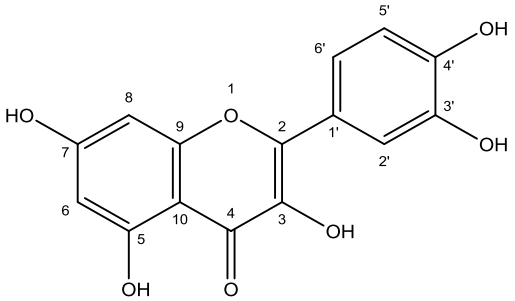
Таблица 48 – ЯМР спектральные данные соединений (**1.1**), (**1.2**) и (**1.5**)

Соединение	^{13}C NMR	^{1}H NMR
Стеарил стеарат (**1.1**)	δ (101 MHz, $CDCl_3$) 174.16, 64.55, 34.58, 32.09, 29.87, 29.82, 29.77, 29.70, 29.64, 29.53, 29.44, 29.42, 29.33, 28.82, 26.11, 25.20, 22.85, 14.27.	δ (400 MHz, $CDCl_3$) 4.05 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 1.64 – 1.58 (m, 3H), 1.25 (s, 28H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).
Изополипиперовая кислота (**1.2**)	δ (101 MHz, $CDCl_3$) 38.26 (C-1), 18.62 (C-2), 41.57 (C-3), 33.06 (C-4), 49.02 (C-5), 27.19 (C-6), 68.32 (C-7), 128.14 (C-8), 156.98 (C-9), 37.17 (C-10), 173.32 (C-11), 21.39 (C-12), 32.79 (C-13), 20.05 (C-14).	δ (400 MHz, $CDCl_3$) 1.59 (m), 1.27 (m) (H-1), 1.72 (dt, *J*= 3.3, 13.0 Hz) (H-2), 1.53 (m) (H-2), 1.48 (m), 1.18 (m) (H-3), 1.19 (m) (H-5), 2.18 (dd, 1H, *J*=6.7, 13.0 Hz) (H-6), 4.62 (t, *J*=7.1) (H-7), 6.85 (s, 1H) (H-9), 0.90 (s, 1H) (H-10), 0.93 (s, 1H) (H-11), 1.12 (s, 1H) (H-12)
3,3'-ди-О-метилэллаговая кислота (**1.5**)	δ (101 MHz, DMSO) 111.53 (C-1 и C-1'), 141.27 (C-2 и C-2'), 140.31 (C-3 и C-3'), 152.37 (C-4 и C-4'), 111.53 (C-5 и C-5'), 112.61 (C-6 и C-6'), 158.47 (C-7 и C-7'), 61.00 (OCH_3)	δ (400 MHz, DMSO) 7.52 (s) (H-5 и H-5'), 4.05 (OCH_3)

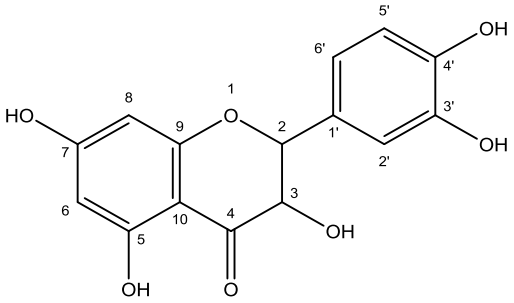
Соединение (**1.3**), $C_{15}H_{10}O_7$, желтое кристаллическое вещество, ES-MS (*m/z*): 302, 272, 245, 153, 134, 109, 69; идентифицировано как **3,5,7,3',4' – пентагидроксифлавоном (кверцетин)**. Два дублетных сигнала в области 6.17 и 6.37 м.д. с константой мета-расщепления 2.0 и 8.0 Гц соответсвенно, принадлежат сигналам кольца А и указывают на 5,7-тип замещения. Однопротонный дублет-дублета в области 7.62 м.д. с *J*=8.5 Гц и дублет 6.88 м.д. с *J*=8.5 Гц и, а также однопротонный уширенный синглет в области 7.72 м.д. подтверждают наличие 3',4'- замещения в кольце В.

Соединение (**1.4**), $C_{15}H_{12}O_7$, желкое кристаллическое вещество, ES-MS (*m/z*): 210 (M^+); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 289, 228 нм; было идентифицировано как **2 – (3,4 – дигидроксифенил) - (2R,3R) – 3,5,7 – тригидроксихроман – 4 – он (таксифолин)** (таблица 49).

В спектре вещества **(1.4**) углеродные атомы А-кольца и В-кольца имеют аналогичные химические сдвиги, как и те же атомы углерода в кверцетине. Однако наличие кратной связи в С-кольце приводит к сдвигу в область слабого поля. Так сигналы С-2 и С-3 вещества (**1.3**) прописываются в области 146.19 и 137.55 м.д. соответственно, сигналы вещества (**1.4**) сдвигаются на 60 м.д. при введении кратной связи.



Соединение (1.3)



Соединение (1.4)

Таблица 49 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для соединений (**1.3**) и (**1.4**)

No	**Соединение 1.3**		**Соединение 1.4**	
	^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ	^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ	^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ	^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ
2	146.19		84.99	4.91 (s)
3	137.55	9.60 (s, OH)	73.57	4.54 (s, OH), 4.20 (s, 1H)
4	173.71		198.28	
5	162.95	12.50 (s, OH)	168.57	9.74 (s, OH)
6	99.27	6.17 (d, 1H, J=2.0 Hz)	95.80	5.92 (s, 1H)
7	165.58	10.76 (s, OH)	165.15	10.29 (s, OH)
8	94.44	6.37 (d, 1H, J=8.0 Hz)	94.61	5.88 (s, 1H)
9	158.19		164.38	
10	104.48		101.75	
1’	124.12		129.78	
2’	115.99	7.72 (d, J=2.1 Hz)	114.55	6.99 (s, 1H)
3’	146.19	9.31 (s, OH)	146.19	5.48 (s, 2H, OH)
4’	147.99	9.39 (s, OH)	147.02	
5’	116.23	6.88 (d, 1H, J=8.5 Hz)	116.06	6.84 (d, 1H, J=11.2 Hz)
6’	121.68	7.62 (dd, 1H, J=8.5, 2.1 Hz)	120.90	6.82 (d, 1H, J=9.3 Hz)

Соединение (**1.6**), $C_{29}H_{50}O$, белый порошок, MS (*m/z*): 414 (M+), 396, 339, 325, 310, 298, 257, 227, 140, 139, 125, 97, 71, 57; было идентифицировано как **β-ситостерол.**

^{1}H ЯМР-спектр показал наличие шести метильных сигналов, которые прописались в виде двух трехпротонных синглетов при δ 0.65 и 0.85 м.д.; три дублета, которые появились при δ 0.85, 0.83 и 0.90 м.д.; и триплет при δ 0.89

м.д. Спектры ^{1}H-ЯМР соединения (**1.6**) также показали один олефиновый протон при δ 5.36 вместо трех. Спектры соединения (**1.6**) показали протон, соответствующий протону, связанному с гидроксильной группой при С-3, который появился как триплет дублетов дублетов при δ 3,53 м.д. ^{13}C-ЯМР показал двадцать девять сигналов углерода, включая шесть первичных, одиннадцать вторичных, десять третичных и три четвертичных атома углерода. Таким образом, структура (**1.6**) был определена как β-ситостерол, что соответствует указанным литературным значениям [244] и был дополнительно подтвержден корелляцией COZY и HMBC, как показано на рисунках 19-21.

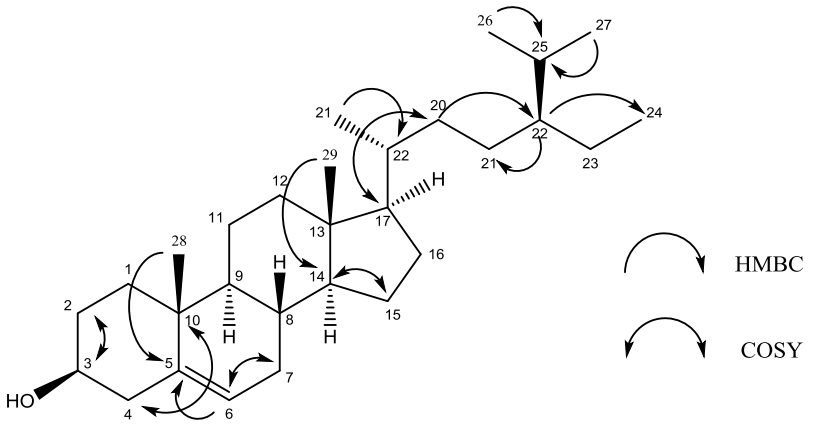


Рисунок 19 – HMBC и COSY корреляция ситостерола (соединение **1.6**)

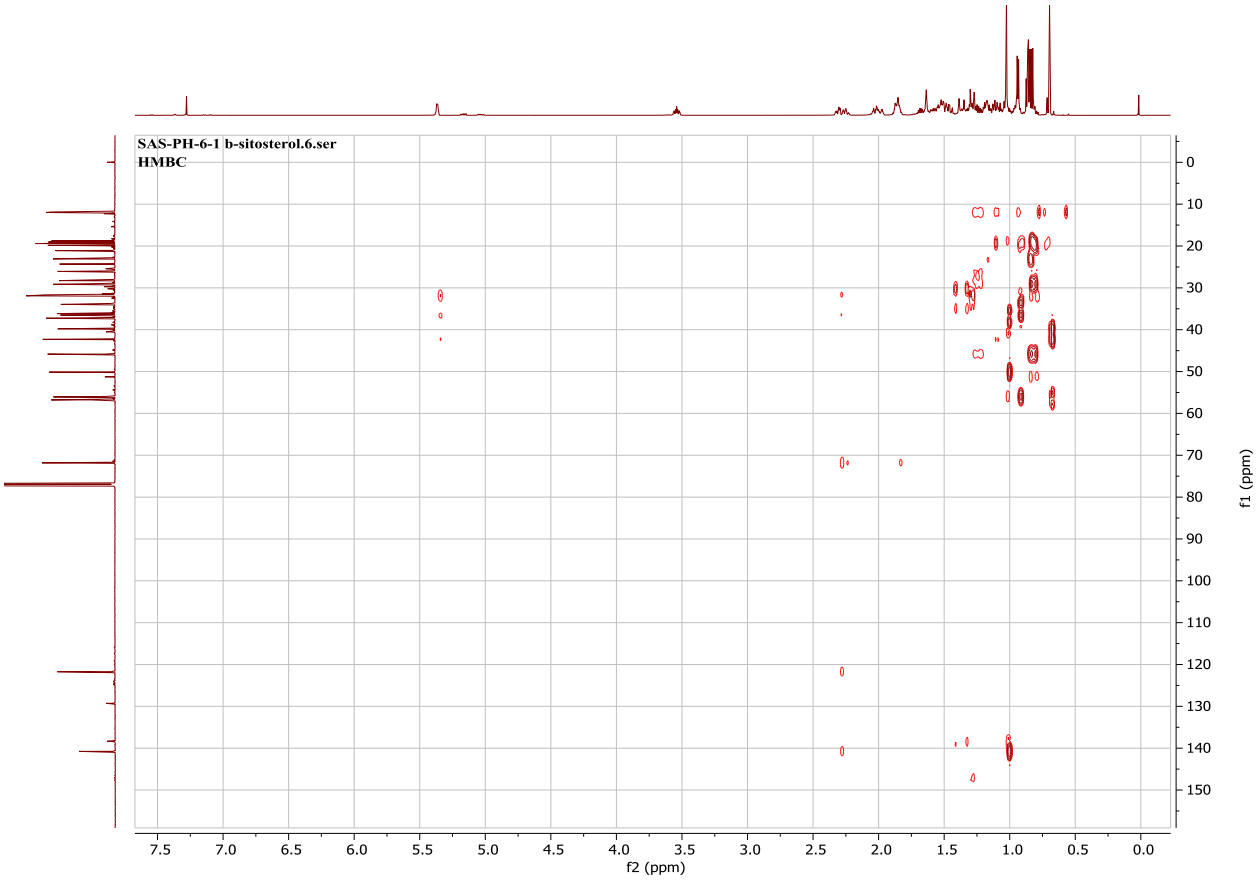


Рисунок 20 – HMBC спектр вещества (**1.6**)

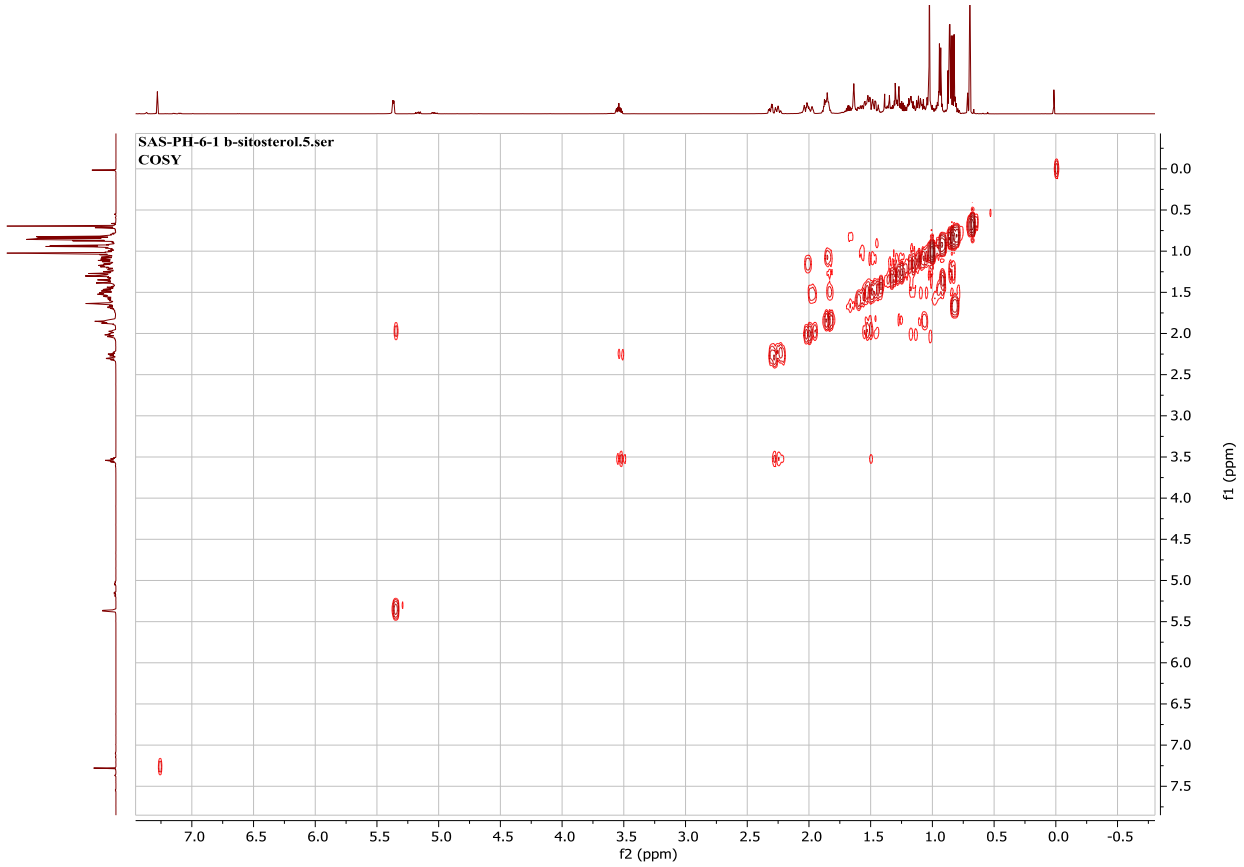
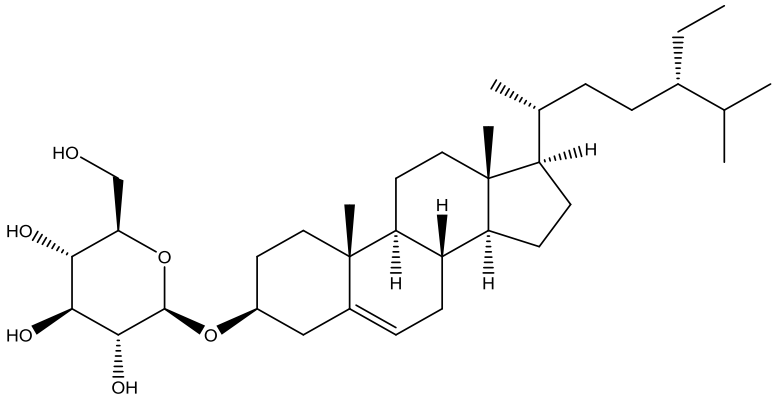


Рисунок 21 – COSY спектр вещества (**1.6**)

Соединение (1.7), $C_{35}H_{60}O_6$, белое аморфное вещество, EI-MS (*m/z*): 576 [M^+] было идентифицировано как **β-ситостерол-β-D-глюкозид (даукостерол)** [245].

Одномерные и двумерные спектры показали структуру сахарного фрагмента в веществе (**1.7**) как β-D-глюкозу. Аномерный протонный сигнал (H-1') рассматривается как дублет при 4.41 м.д. при значении *J*=7.8 Гц. Это свидетельствует о транс-диаксиальной конфигурации между H-1 и H-2, то есть сахара является α-аномером. COSY спектр показал связь между δ 4.41 (H-1) и 3.23 м.д. (H-2); 3.23 и кластер 3.4 (H-3 / H-4); 3.4 и 3.28 м.д. (H-5); 3,28 и 3,85 м.д. (H-6) и 3.75 (H-6); 3.85 и 3.75 м.д. Частичное перекрытие между кластером 3.4 и пиком CD_3OD, но из спектра корреляции CH видно, что эти протоны прикреплены к двум атомам углерода при 70.7 и 76.9 м.д. Константы связи приблизительно *J*=9 Гц для H-2 и H-5 устанавливают их транс-диаксиальную конфигурацию с H-3 и H-4 соответственно. Протонные сигналы для H-2-H-5 имеют точное расщепление с константой связи, равной 1.7 Гц (таблица 50).

Также структура вещества была доказана дальнейшим кислотным гидролизом с 5% HCl и получением агликона-β-ситостерин и D-глюкозы в сравнении со стандартными веществами на ТСХ.



Соединение 1.7

Таблица 50 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для соединений (**1.6**) и (**1.7**)

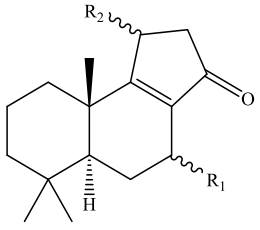
No	**Соединение 1.6**		**Соединение 1.7**	
	^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ	^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ	^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ	^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ
1	2	3	4	5
1	33.26	1.90 (m, 1H, Hα), 1.13 (1H, m, Hβ),	37.6	1.88 (m,1H, Hα), 1.08 (m, 1H, Hβ)
2	31.92	1.88 (m, 1H, Hα), 1.56 (m, 1H, Hβ),	29.9	1.91 (m, 1H, Hα), 1.62 (m, 1H, Hβ)
3	71.81	3.58 (tt, 1H, *J* = 11.3; 5.3 Hz),	79.5	3.59 (m, 1H,)
4	43.32	2.34 (ddd, 1H, *J* = 13.0; 5.0; 2.0 Hz, Hα), 2.30 (td,1H, *J* = 11.0; 2.0 Hz, Hβ),	39.0	2.42 (dm,1H, *J* = 10.0 Hz, Hα), 2.28 (tl, 1H, *J* = 10.0 Hz, Hβ)
5	140.76		140.7	
6	121.73	5.40 (dd, 1H, *J* = 5.2; 2.3 Hz)	122.4	5.37 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz)
7	31.66	1.50 (m, 1H)	32.3	1.47 (m, 1H),
8	31.92	2.03 (td, 1H, *J* = 12.1; 2.4 Hz)	32.3	1.97 (m, 1H),
9	50.13	0.98 (m, 1H)	50.6	0.96 (m, 1H)
10	36.51		37.1	
11	21.09	1.55 (m, 1H, Hα), 1.50 (qd, 1H, J = 10.8; 4.6 Hz, Hβ),	21.2	1.02 (m,1H, Hβ) 1.45 (1H, m, Hα),
12	39.78	2.06 (dt, 1H, *J* = 12.8; 3.6 Hz, Hα), 1.21 (m, 1H, Hβ),	40.8	2.01 (m, 1H, Hα), 1.17 (m, 1H, Hβ),
13	42.30		42.7	
14	56.77	1.04 (m, 1H)	57.2	1.03 (m, 1H)
15	26.06	1.63 (1H, m, Hα), 1.11 (tm, 1H, *J* = 11.2 Hz, Hβ),	24.6	1.59 (m, 1H, Hα) 1.11 (m, 1H, Hβ),
16	28.26	1.89 (m, 1H, Hα), 1.30 (m, 1H, Hβ),	28.6	1.84 (1H, m, Hα), 1.29 (1H, m, Hβ),
17	56.05	1.16 (1H, t, *J* = 10.0	56.4	1.14 (m, 1H),

Продолжение таблицы 50

1	2	3	4	5
		Hz)		
18	36.15	0.74 (s, 1H)	12.1	0.70 (s, 1H)
19	19.04	0.90 (s, 1H)	19.5	1.03 (s, 1H)
20	33.94	1.40 (m, 1H)	36.5	1.37 (m, 1H)
21	25.42	0.93 (d, 1H, *J* = 6.5 Hz)	18.9	0.95 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz)
22	45.83	1.36 (m, 1H, Hα), 1.07 (m, 1H, Hβ),	34.3	1.04 (m, 1H, Hβ) 1.34 (m, 1H, Hα),
23	24.31	1.21 (m, 1H)	26.4	1.19 (m,1H),
24	11.99	0.89 (m, 1H)	46.2	0.93 (1H, m)
25	29.14	1.71 (m, 1H)	29.5	1.68 (m, 1H)
26	19.83	0.85 (d, 1H, *J=6.25* Hz)	19.9	0.94 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz)
27	19.40	0.83 (d, 1H, *J*=6.25 Hz)	19.2	0.83 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz)
28	18.78	0.65 (m, 1H)	23.4	1.26 (m, 1H)
29	11.86	0.89 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz)	12.3	0.85 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz)
1’			101.5	4.41 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz),
2’			74.0	3.23 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz)
3’			76.9	3.42 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz)
4’			70.7	3.42 (m, 1H)
5’			76.5	3.29 (m, 1H,)
6’			62.2	3.84 (dl, 1H, *J* = 10.0 Hz, Hα) 3.75 (dd, 1H, *J* = 10.0; 5.0 Hz, Hβ)

Вещество (1.8) $C_{15}H_{22}O_4$, идентифицировано как **фуегин** [246]. EI-MS (*m/z*): 265 [M^+], 255, 233, 221, 198, 185, 166, 153, 129, 112 (Приложение А).

Вещество (**1.9**) $C_{15}H_{22}O_4$, идентифицировано в диастереомерной смеси в виде **дендокарбина L.** из *Dendrodoris carbunculosa* [247]. Его ^{13}C-ЯМР-спектроскопические данные были пересмотрены и скорректированы на C-7 (δ 60.16, как указано в δ 65.1), как и в случае α-гидроксильной группы при C-7, ^{13}C-ЯМР-резонанс будет составлять около δ 65 м.д. (C-7). Для фуегина β-OH при C-7 ^{13}C-ЯМР-резонанс будет составлять около 65.05 м.д. (C-7) (таблица 51).



R_1 = β-OH, R_2 = α-OH – **Вещество (1.8)**
R_1 = α-OH, R_2 = β-OH – **Вещество (1.9)**

Таблица 51 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для веществ **(1.8)** и **(1.9)**

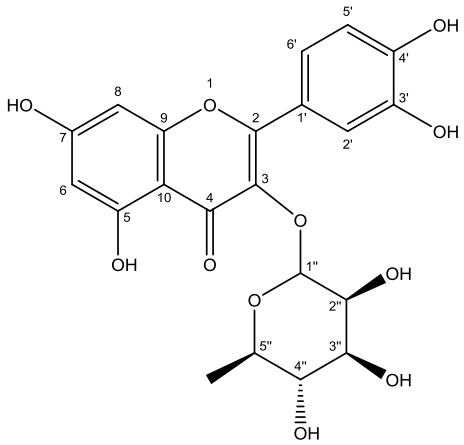
No	**Вещество 1.8**		**Вещество 1.9**	
	^{13}C NMR (101 MHz, CDCl3) δ	^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ	^{13}C NMR (101 MHz, Pyr) δ	^{1}H NMR (400 MHz, Pyr) δ
1	2	3	4	5
1	34.9	1.35, 1.60 (m)	35.20	1.30, 0.02 (m)

Продолжение таблицы 51

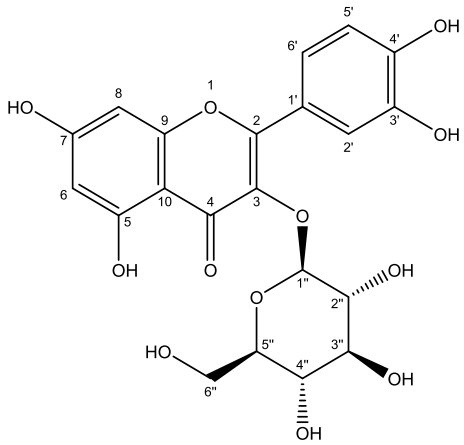
1	2	3	4	5
2	18.16	1.57, 1.72 (m)	18.82	1.43, 1.67 (m)
3	41.28	1.20, 1.51 (m)	42.07	1.16, 1.39 (m)
4	33.25		33.33	
5	51.25	1.26	46.51	1.87
6	27.62	1.57, 2.21 (m)	29.88	1.81, 2.08 (m)
7	65.05	4.59 (s)	60.16	4.87 (s)
8	128.61		129.70	
9	171.36		171.21	
10	38.01		37.90	
11	97.63	6.09 (s)	98.48	6.48 (s)
12	171.36		171.79	
13	33.41	0.95 (s)	33.61	0.98 (s)
14	21.65	0.95 (s)	21.97	0.85 (s)
15	18.16	1.72 (s)	18.29	1.38 (s)

Соединение (**1.10**), $C_{21}H_{20}O_{11}$, желтого цвета было идентифицировано как **кверцетин 3-О-рамнозид (кверцитрин)**. УФ спектр (MeOH) λ_{max} nm: 259, 272, 298, 353 [18, с. 1350].

Соединение (**1.11**), $C_{21}H_{20}O_{12}$ желтого цвета было идентифицировано **кверцетин 3-О-β-глюкопиранозид (изокверцитрин)**. EI-MS (*m/z*): 302 [M^+] , 274, 153, 137 [248].



Соединение (**1.10**)



Соединение (**1.11**)

Спектры ^{1}H-ЯМР этих двух веществ показывали схожую характерную картину гликозилированного производного кверцетина. Сигналы при δ 6.14 и 6.30 м.д. (*J*=2.5 Гц) – для (**1.10**); δ 6.12 и 6.32 м.д. (*J*=1,6 Гц) – для (**1.11**) предназначены для кольца А и сигналы при δ 6.87, 7.25 и 7.25 м.д. – для (**1.10**); δ 6.79, 7.63 и 7.52 м.д. – для (**1.11**) для кольца В. Данные подтвержаются спектром ^{13}C ЯМР, показывающим наличие 21 сигнала, разрешаемых посредством DEPT спектра: одна -CH_3, десять -CH и 10 четвертичных атомов углерода – для (**1.10**); один -CH_2, десять -CH и 10 четвертичных атомов углерода – для (**1.11**).

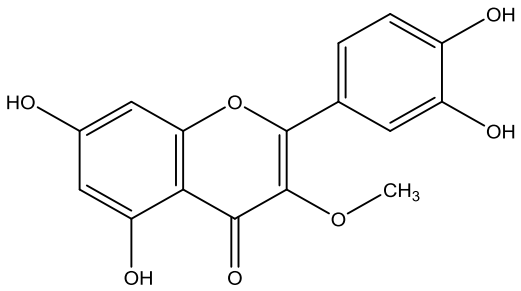
Углеводный фрагмент в структуре вещества (**1.11**) определяли через протонный сигнал, приписываемый аномерному протону при δ 5.33 м.д. (*J*=7.7 Гц), и мультиплет сигналов в области δ 3.33-3.25 показывают OH-CH глюкозида.

Данные, полученные из двумерных спектров, в сравнении с литературой, устанавливают сахара в виде одной единицы β-D-глюкопиранозы. β-аномерную конфигурацию для единицы глюкозы определяли по ее большой константе связи $J_{H1, H2}$ (7.7 Гц) [249]. В таблице представлены ЯМР данные веществ (**1.10**) и (**1.11**).

Таблица 52 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для соединений (**1.10**) и (**1.11**)

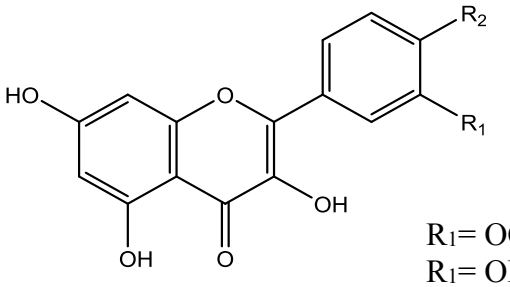
No	**Соединение 1.10**		**Соединение 1.11**	
	^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ	^{1}H NMR (500 MHz, MeOD) δ	^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ	^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ
2	158.14		156.50	
3	135.95		133.51	
4	179.28		177.39	
5	159.00	12. 48 (s, 1H)	161.26	
6	99.76	6.30 (d, 1H, *J*=2.5 Hz)	99.08	6.12 (d, 1H, *J*=1.6 Hz)
7	165.45		163.94	
8	94.71	6.14 (d, 1H, *J*=2.5 Hz)	93.83	6.32 (d, 1H, *J*=1.6 Hz)
9	162.80		157.00	
10	105.63		103.81	
1’	131.03		122.03	
2’	116.13	7.25 (d, 2H, *J*=2.1 Hz)	116.00	7.52 (d, 1H, *J*=2.1 Hz)
3’	146.02		144.97	
4’	149.43		147.83	
5’	116.75	6.87 (d, 1H, *J*=7.8 Hz)	117.84	6.79 (d, 1H, *J*=8.5 Hz)
6’	122.71	7.25 (d, 2H, *J*=2.1 Hz)	121.26	7.63 (dd, 1H, *J*=8.5, 2.1 Hz)
1’’	103.40	3.74 (d, 1H, *J*=2.1 Hz)	102.05	5.33 (d, 1H, *J*=7.7 Hz)
2’’	71.93		73.31	
3’’	72.02		73.92	
4’’	73.19		71.33	
5’’	71.81		75.92	
6’’	17.59		60.25	
Me-rham		0.92 (d, 3H, *J*=5.8 Hz)		
Углевод. протоны		3.44-3.26 (m, 4H)		3.33-3.25 (m, 4H)

Соединение (**1.12**) $C_{16}H_{12}O_7$, желтые кристаллы, EI-MS (*m/z*): 315 [M^+] было идентифицировано как **3,5,7,3',4'– пентагидрокси-3-метоксифлавон (3 – О – метиловый эфир кверцетина.** На основании качественных реакций, хроматографического сравнения со стандартным образцом, по данным ЯМР-спектра вещество (**1.12**) совпадает с 3-О-метиловым эфиром кверцетина [250].



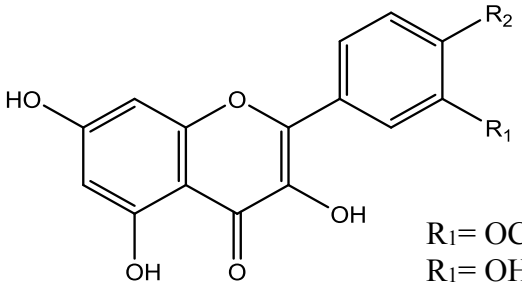
Соединение 1.12

Соединение (1.13), $C_{16}H_{12}O_7$, желтые кристаллы, EI-MS (*m/z*): 315 [M^+] было идентифицировано как **3,5,7,4'–тетрагидрокси-3'-метоксифлавон (изорамнетин).** Два дублетных сигнала в области δ 6.81 и 6.92 м.д. с константой мета-расщепления, соответствуют сигналам кольца А и указывают на 5,7-тип замещения. Два однопротонных дублет-дублета в области δ 6.92 м.д. с *J=8.5* Гц и δ 7.38 м.д. с *J=2* Гц, а также однопротонный уширенный синглет в области 7.85 м.д. подтверждают наличие 3',4'- замещения в кольце В, то есть метоксигруппа находится в С-3' положении, прописывается в области δ 3.30 м.д. (s, 3H). Кроме того, в спектре ^{1}H – ЯМР в области сильного поля δ 7.85 м.д. прописывается Н-2', что указывает на расположение метоксигруппы в С-3' положении.



R_1= OCH_3; R_2=OH – Соединение **(1.13)**
R_1= OH; R_2=OCH_3 – Соединение **(1.14)**

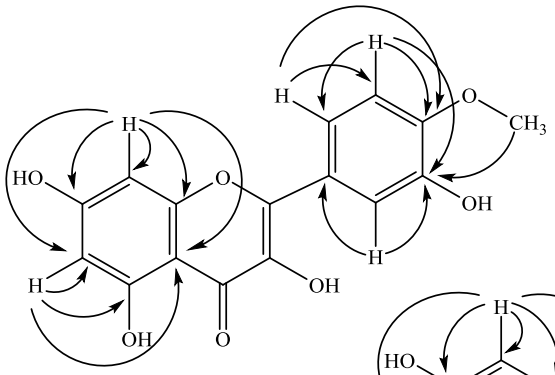
Соединение (**1.14**), $C_{16}H_{12}O_7$, желтое вещество, ES-MS (*m/z*) 315 [M^+] было идентифицировано как **3,5,7,3'–тетрагидрокси-4'-метоксифлавон (тамариксетин).** Спектр ^{1}H-ЯМР показал три протонных сигнала при δ 7.38 (d, 1H, *J*=1.6 Гц), 8.26 (dd, 1H, *J*=8.3, 1.7 Гц) и 8.33 м.д. (d, 1H, *J*=8.4 Гц), относящиеся к Н-2', Н-6' и Н-5', соответственно, и два метасвязанных дублета в 6.91 и 6.76 м.д. с константой мета-расщепления *J*=1.9 Гц для Н-8 и Н-6. В НМВС спектре было показано, что протонный сигнал при δ 3.89 м.д. коррелирует с углеродом С-3' (136.2 м.д.), указывая, что метокси группа находится у С-4'. С помощью спектра НМВС и НМQС, соединение (**1.14**) определили как тамариксетин (рисунок 23). НМВС-спектры для соединений (**1.12**), (**1.13**) и (**1.14**) представлены в приложениях Б, В и Г.



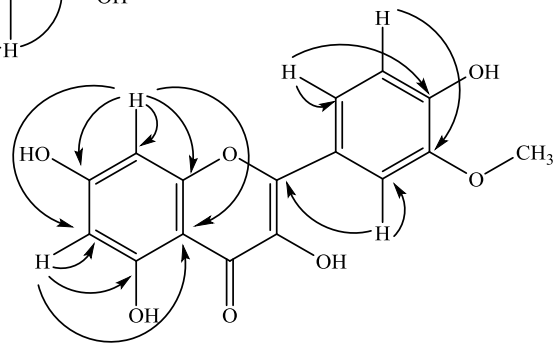
R_1= OCH_3; R_2=OH – Соединение **(1.13)**
R_1= OH; R_2=OCH_3 – Соединение **(1.14)**

Таблица 53 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для соединений (**1.12**), (**1.13**) и (**1.14**)

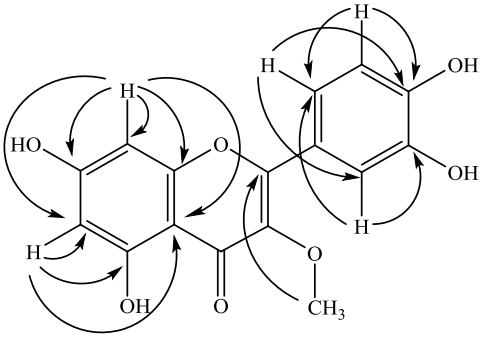
No	**Соединение 1.12**		**Соединение 1.13**		**Соединение 1.14**	
	^{13}C NMR (151 MHz, Pyr) δ	^{1}H NMR (600 MHz, Pyr) δ	^{13}C NMR (151 MHz, Pyr) δ	^{1}H NMR (600 MHz, Pyr) δ	^{13}C NMR (151 MHz, Pyr) δ	^{1}H NMR (600 MHz, Pyr) δ
2	150.86		147.97		147,98	
3	138.43		135.63		138.43	
4	177.81		177.80		177.70	
5	162.93		162.92		163.07	
6	99.73	6.77 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	99.97	6.81 (d, 1H, *J*=2.1 Hz)	99.61	6.76 (d, 1H, *J*=1.9 Hz)
7	166.07		166.06		165.98	
8	94.91	6.88 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	94.90	6.92 (d, 1H, *J*=2.1 Hz)	94.80	6.91 (d, 1H, *J*=1.9 Hz)
9	157.95		157.86		157.83	
10	104.94		104.93		104.82	
1’	123.28		124.16		123.50	
2’	113.08	8.30 (dd, 1H, *J*=8.4, 2.1 Hz)	117.09	7.41 (s, 1H)	116.98	7.38 (d, 1H, *J*=1.6 Hz)
3’	147.98		148.90		148.91	
4’	148.91		148.90		150.86	
5’	117.10	7.32 (d, 1H, *J*=8.4 Hz)	113.08	8.25 (dd, 1H, *J*=8.4, 2.1 Hz)	112.97	8.33 (d, 1H, *J*=8.4 Hz)
6’	123.31	8.30 (d, 1H, *J*=2 Hz)	123.61	7.21 (dd, 1H, *J*=8.4, 2.1 Hz)	122.97	8.26 (dd, 1H, *J*=8.3, 1.7 Hz)
OCH_3	56.44 (d)	3.83 (s, 3H)	56.43	3.90 (s, 3H)	56.33	3.89 (s, 3H)



Соединение (1.12)



Соединение (1.13)

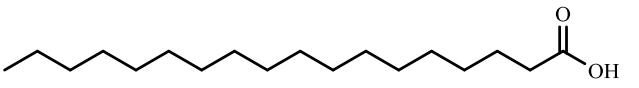


Соединение (1.14)

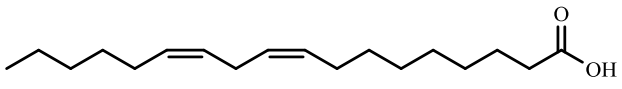
Рисунок 23 – HMBC корреляция в соединениях **(1.12**), **(1.13**) и **(1.14)**

3.7.4 Вещества, выделенные из *Polygonum aviculare*

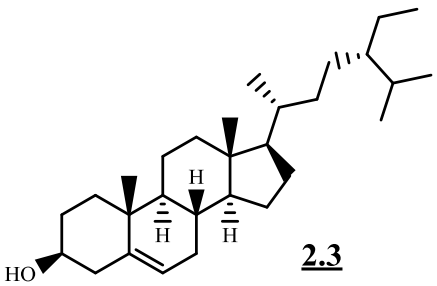
На рисунке 24 приведены структурные формулы веществ, выделенных из экстракта надземной части *Polygonum aviculare.*



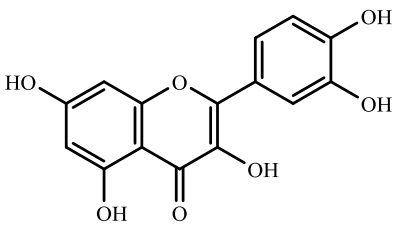
2.1



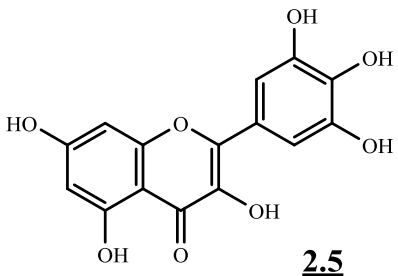
2.2



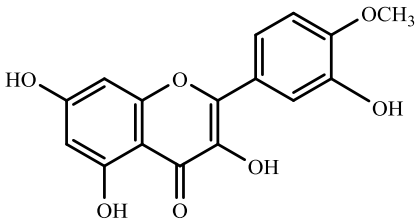
2.3



2.4



2.5



2.6

Рисунок 24 – Вещества, выделенные из *Polygonum aviculare*

Соединение (2.1), $C_{18}H_{36}O_2$, белый порошок, ES-MS (*m/z*): 284 (M^+), было идентифицировано как **стеариновая кислота**.

Соединение (**2.2**), $C_{18}H_{32}O_2$, белый порошок, ES-MS (*m/z*): 280 (M^+), было идентифицировано **линолевая кислота**.

Соединение (2.3), $C_{29}H_{50}O$, белый порошок, MS (*m/z*): 414 (M+), было идентифицировано как **β-ситостерол**. Спектральные данные соединений (**2.1**), (**2.2**) и (**2.3**) описаны в таблице 54. Описанные данные соответствуют литературным ЯМР данным [251].

Таблица 54 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для соединений

Соединение	^{13}C NMR	^{1}H NMR
1	2	3
Стеариновая кислота (**2.1**)	δ (101 MHz, $CDCl_3$) 16.48 (C-1), 26.06 (C-2), 31.63 (C-3), 28.94 (C-4), 29.13 (C-5), 31.63 (C-6), 28.94 (C-7), 29.13 (C-8), 31.63 (C-9), 29.39 (C-10), 29.06 (C-11), 28.76 (C-12), 29.39 (C-13), 29.07 (C-14), 28.76 (C-15), 27.03 (C-16),36.40 (C-17), 180.78 (C-18)	δ (400 MHz, $CDCl_3$) 0.91 (s, 3H) (H-1, H-2, H-3), 1.28 (s, 28H) (H-4-31), 1.66 (s, 2H) (H-32, H-33), 2.38 (s, 2H) (H-34, H-35)
Линолевая кислота (**2.2**)	δ (126 MHz, $CDCl_3$) 14.57 (C-1), 23.08 (C-2), 32.03 (C-3), 26.13 (C-4), 29.77 (C-5), 128.56 (C-6), 128.39 (C-7), 27.68 (C-8), 130.72 (C-9), 130.52 (C-10), 27.68 (C-11), 29.77 (C-12), 27.18 (C-13), 29.77 (C-14), 26.13 (C-15), 25.15 (C-16), 34.55 (C-17), 180.67 (C-18)	δ (500 MHz, $CDCl_3$) 0.95 (s, 3H) (H-21-23), 1.39 (s, 16H) (H-39-47, H-24-31, H-34, H-35), 2.43 (H-50, H-51), 2.89 (H-40-49), 5.65 (H-36, H-37, H-31, H-33)
β-ситостерол (**2.3**)	δ (126 MHz, $CDCl_3$) 33.26 (C-1), 31.63 (C-2), 71.92 (C-3), 43.27 (C-4), 140.82 (C-5), 121.83 (C-6), 31.18 (C-7), 31.68 (C-8), 50.24 (C-9), 36.27 (C-10), 21.20 (C-11), 39.89 (C-12), 42.43 (C-13), 56.88 (C-14), 26.27 (C-15), 27.32 (C-16), 56.17 (C-17), 36.61 (C-18), 19.16 (C-19), 34.15 (C-20), 25.73 (C-21), 45.94 (C-22), 24.18 (C-23), 12.10 (C-24), 29.78 (C-25), 19.94 (C-26), 19.51 (C-27), 18.74 (C-28), 11.98 (C-29)	δ (500 MHz, $CDCl_3$) 1.90 (m, 1H) (Hα -1), 1.13 (1H, m) (Hβ-1), 1.88 (m, 1H) (Hα-2), 1.56 (m, 1H, Hβ-2), 3.54 (tt, 1H, *J* = 11.0; 5.0 Hz) (H-3), 2.30 (ddd, 1H, *J* = 13.0; 5.0; 2.0 Hz) (Hα-4), 2.35 (td,1H, *J* = 11.0; 2.0 Hz, Hβ-4), 5.40 (dd, 1H, *J* = 5.2; 2.3 Hz) (H-6), 1.57 (m, 1H) (H-7), 2.0 (td, 1H, *J* = 12.1; 2.4 Hz) (H-8), 0.98 (m, 1H) (H-9), 1.55 (m, 1H) (Hα-11), 1.50 (qd, 1H, J = 10.5; 5.0 Hz) (Hβ-11), 2.06 (dt, 1H, *J* = 12.5; 3.5 Hz) (Hα-12), 1.21 (m, 1H) (Hβ-12), 1.04 (m, 1H) (H-14), 1.63 (1H, m) (Hα-15), 1.18 (tm, 1H, *J* = 11.0 Hz) (Hβ-15), 1.89 (m, 1H) (Hα-16), 1.30 (m, 1H) (Hβ-16), 1.15 (1H, t, *J* = 10.0 Hz) (H-17), 0.74 (s, 1H) (H-18), 0.95 (s, 1H) (H-19), 1.49 (m, 1H) (H-20), 0.93 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz) (H-21), 1.33 (m, 1H) (Hα-22), 1.17 (m, 1H) (Hβ-

Продолжение таблицы 54

1	2	3
		22), 1.24 (m, 1H) (H-23), 0.85 (m, 1H) (H-24), 1.75 (m, 1H) (H-25), 0.85 (d, 1H, *J=6.0* Hz) (H-26), 0.83 (d, 1H, *J=6.5* Hz) (H-27), 0.65 (m, 1H) (H-28), 0.89 (t, 1H, *J* = 7.25 Hz) (H-29)

Соединение (2.4), $C_{15}H_{10}O_7$**,** желтого цвета, ES-MS (*m/z*) 301, было идентифицировано как **3,3′,4′,5,6-пентагидроксифлавон (кверцетин).**

Соединение (2.5), $C_{15}H_{10}O_8$, желтого цвета, ES-MS (*m/z*) 317, было идентифицировано как **3, 3', 4', 5, 5', 7-гексагидроксифлавон (мирицетин).**

Два однопротонных дублетных сигнала в области 6.19 и 6.37 м.д. с константой мета-расщепления соответствуют сигналам кольца А и указывают на 5,7-тип замещения. Один двухпротонный синглет в области 7.26 м.д. подтверждает наличие 3᾽,4᾽,5᾽ – тригидроксизамещения в кольце В.

На основании качественных реакций, хроматографического сравнения со стандартным образцом, по данным ЯМР-спектра вещество (**2.5**) совпадает с мирицетином.

Соединение (2.6), $C_{16}H_{12}O_7$, ES-MS (*m/z*) 315, желтого цвета было идентифицировано как **4'-метиловый эфир кверцетина (тамариксетин).**

Спектральные данные соединений (**2.4**), (**2.5**) и (**2.6**) представлены в таблице 55. Идентификация флавоноидов из *P. hydropiper* согласуется с предыдущими химическими исследованиями [109, с. 5; 252].

Таблица 55 – ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектральные данные для соединений (**2.4**), (**2.5**) и (**2.6**)

No	**Вещество 2.4**		**Вещество 2.5**		**Вещество 2.6**	
	^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ	^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ	^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD δ	^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ	^{13}C NMR (151 MHz, Pyr) δ	^{1}H NMR (600 MHz, Pyr) δ
1	2	3	4	5	6	7
2	148.75		145.85		147.53	
3	137.23	9.60 (s, OH)	134.98		135.19	
4	177.32		174.76		177.36	
5	162.48	12.50 (s, OH)	161.65		162.48	
6	99.23	6.18 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	98.26	6.19 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	99.29	6.77 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)
7	165.55	10.76 (s, OH)	163.19		165.63	
8	94.10	6.38 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	92.41	6.37 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	94.47	6.92 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)
9	158.21		155.17		159.50	
10	104.51		104.49		104.69	

Продолжение таблицы 55

1	2	3	4	5	6	7
1'	124.14		120.07		123.17	
2'	115.98	7.73 (d, 1H, *J*=2.0 Hz)	107.11	7.26 (s, 2H)	112.64	8.33 (d, 1H, *J*=1.6 Hz)
3'	146.20	9.31 (s, OH)	144.83		149.83	
4'	147.99	9.39 (s, OH)	135.24		148.46	
5'	116.21	6.88 (d, 1H, *J*=8.5 Hz)	144.83		116.65	7.41 (d, 1H, *J*=8.0 Hz)
6'	121.67	7.63 (dd, 1H, J=8.5, 2.0 Hz)	107.11	7.26 (2H, s)	122.86	8.24 (dd, 1H, J=8.3, 1.7 Hz)
OCH_3					56.00	3.89 (3H, s)

3.8 Результаты испытаний биологических активностей фракций и индивидуальных веществ

Определение биологической активности выделенных фракций и веществ проводили в аккредитованных скрининговых лабораториях для определения биологической активности природных соединений в Национальном исследовательском центре природных соединений Университета Миссисипи (г. Оксфорд, США).

Тестирование противомикробной активности изучаемых образцов проводили против микроорганизмов *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumonia* и устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus (MRSa).*

При проведении первичного анализа определяется процент ингибирования для выявления потенциально активных компонентов. Таковыми считались образцы с показателями выше 50 %. Далее проводился вторичный анализ, где устанавливали IC_{50} для соединений при трех различных концентрациях, что является показателем концентрации лекарственного вещества, необходимого для 50 % ингибирования тестовой реакции *in vitro*. Результаты анализа противомикробной активности представлены в таблице 56.

Противогрибковые действия оценивали по группе патогенных грибов (*C. albicans, Cryptococcus neoformans* и *Aspergillus fumigatus),* связанных с оппортунистическими инфекциями. Этилацетатная фракция *P. hydropiper* показала ингибирующую активность роста против *C. neoformans* и *E. coli* с значениями IC_{50} 13.0 и 10.0 мкг / мл, соответственно, как показано в таблице 38. Однако EtOH-PH показал сравнительно более сильную активность против *A. fumigates* и *K. pneumoniae* с активной концентрации 6.0 и 9.0 мкг / мл.

Все образцы неактивны против *MRS. aureus* и *P. aeruginosa,* а также они показали слабую противогрибковую активность против *E. coli* (IC_{50} = 20,0, 10.0; 20.0 и 14.0 мкг / мл соответственно) и *C. albicans* (IC_{50} = 18.0; 43.0; 17.0 и 28.0 мкг / мл соответственно). EtOAc-PH проявляла противогрибковую активность с величиной IC_{50} 6.0 мкг / мл против *A. fumigatus* и значения IC_{50} 17.0 мкг / мл

против *K. pneumonia*. Хотя DCM-PH и MeOH-PH неактивны против *A. fumigatus* и *K. pneumonia.*

Все образцы *P. aviculare* не показали никакой ингибирующей активности против роста *MRS. Aureus* и *P. aeruginosa,* в то время как показали хорошую противогрибковую активность против *A. fumigatus* и *VRE* со следующими значениями IC_{50} для EtOH-PA – 9.0 и 4.0 мкг / мл; для DCM-PA – 3.0 и 1.0 мкг / мл; EtOAc-PA – 8.0 и 6.0 мкг / мл соответственно. Также EtOAc-PA показал хорошую ингибирующую активность против *C. albicans* со значением IC_{50} = 1.0 мкг / мл и умеренную активность против *E. coli* и *K. Pneumonia* (IC_{50} = 21.0; 30.0 мкг / мл соответственно). DCM-PA показал слабую активность против *C. albicans, C. neoformans, E. coli* (IC_{50} = 29.0; 37.0; 20.0 мкг / мл соответственно). EtOH-PA показал умеренную активность против *E. coli* (IC_{50} = 14 мкг / мл).

Результаты противомалярийного скрининга показали, что DCM-PH и MeOH-PH демонстрируют низкую активность против клона *P. falciparum* D6 (IC_{50} = 15113.8 мкг / мл и 34774.3 мкг / мл) и клона W2 (IC_{50} = 8934.9 мкг / мл и 37637,7 мкг/мл) с индексом селективности от > 3,1 до > 5,3 (таблица 57) [253].

Опиоидные и каннабиноидные рецепторы являются рецепторами, связанными с G-белком, которые представляют собой группу сигнальных рецепторов, которые участвуют в распознавании и трансдукции сообщений через клеточные мембраны. Были признаны различные подтипы каждой рецепторной системы; система опиоидных рецепторов в основном включает μ, κ и δ-рецепторы, тогда как система каннабиноидных рецепторов включает CB1 и CB2-рецепторы. Опиоидные рецепторы, как известно, регулируют различные физиологические функции, включая нейрогормональную секрецию надпочечников и гипофиза, а также обладают прямым действием на надпочечники. Они играют важную роль в центральной нервной системе (ЦНС), а также в сердечно-сосудистой, иммунной, репродуктивной, эндокринной и желудочно-кишечные системы. Внутри эндоканнабиноидных систем рецептор CB1 в основном выражен в ЦНС, а CB2 преимущественно выражен в периферической нервной системе, где он играет решающую роль в стимуляции роста гемопоэтических линий [254,255].

Как отмечалось выше, каннабиноидные рецепторы принадлежат к классу метаботропных рецепторов, сопряженных с гуаниннуклеотид-связывающими белками. Их сходство состоит в том, что они передают информацию внутрь клетки с помощью систем трансдукции (циклазных, фосфоинозитидных, кальциевых и системы оксида азота). Возбуждение метаботропного рецептора приводит к активации G-белка, который взаимодействует с эффекторами системы трансдукции (ферменты, кальциевые каналы и т.д.). Образующиеся при этом вторичные мессенджеры модулируют функциональное состояние клетки посредством фосфорилирования различных белков.

Полипептидная цепь CB1-рецептора включает NH_2-терминаль (экстрацеллюлярная), семь транс-мембранных доменов (TM I—VII), карбоксильную терминаль (интрацеллюлярная) и экстра- и интрацеллюлярные петли [256].

Таблица 56 – Биоскрининг противомикробной активности исследуемых экстрактов и их фракций

Образцы	Микроорганизмы, IC_{50} мкг / мл								Тестовая концентрация
	Candida albicans Pinh	*Aspergillus fumigatus Pinh*	*Cryptococcus neformans Pinh*	*MRS Pinh*	*E. coli Pinh*	*Pseudomonas aeruginosa Pinh*	*Kp Pinh*	*VRE Pinh*	
EtOH-PH	18	6	59	0	20	0	9	6	200ug/mL
DCM-PH	43	0	13	0	10	0	0	0	200ug/mL
EtOAc-PH	17	6	89	0	20	0	17	7	200ug/mL
MeOH-PH	28	0	24	0	14	0	0	2	200ug/mL
EtOH- PA	0	9	0	0	14	0	0	4	200ug/mL
DCM-PA	29	3	37	0	20	0	0	1	200ug/mL
EtOAc-PA	1	8	0	0	21	0	30	6	200ug/mL
Примечание: **EtOH-PH** – этанольный экстракт *P. hydropiper*, **DCM-PH** – дихлорметановая фракция *P. hydropiper*, **EtOAc-PH –** этилацетатная фракция *P. hydropiper,* **MeOH-PH –** метанольный экстракт *P. hydropiper*									

Таблица 57 – Биоскрининг противомалярийной активности и цитотоксичности исследуемых экстрактов, их фракций и выделенных индивидуальных соединений

Образцы	Микроорганизмы				VERO IC_{50}	Тестовая концентрация
	P. falciparum D6 IC_{50}	*P. falciparum* D6 SI	*P. falciparum* W2 IC_{50}	*P. falciparum* W2 SI		
DCM-PH	15113.8	>3.1	8934.9	>5.3	>47600	47600-5288.9 ng/mL
EtOAc-PH	34774.3	>1.4	37637.7	>1.3	>47600	47600-5288.9 ng/mL
1.1	>4760	1	>4760	1	>4760	4760-528.9 ng/mL
1.3	>4760	1	>4760	1	>4760	4760-528.9 ng/mL
1.7	>4760	1	>4760	1	>4760	4760-528.9 ng/mL
1.4	>4760	1	>4760	1	>4760	4760-528.9 ng/mL
1.9	>4760	1	>4760	1	>4760	4760-528.9 ng/mL
1.10	>4760	1	>4760	1	>4760	4760-528.9 ng/mL
DCM-PA	>47600	1	>47600	1	>47600	47600-5288.9 ng/mL
EtOAc-PA	>47600	1	>47600	1	>47600	47600-5288.9 ng/mL

Места взаимодействия агонистов с каннабиноидным рецептором до конца не выяснены. Предполагается, что основную роль в этом процессе играют верхушки ТМ III, ТМ IV, ТМ V, ТМ VII. В молекулах лигандов существуют определенные группировки, обеспечивающие рецептирование. Так, для связывания Δ^9-ТГК точками фиксации являются радикал в девятом положении циклогексана, гидроксил фенола и неполярная алифатическая цепь в третьем положении. Для аминоалкилиндолов эту роль выполняют нафталиновое кольцо, карбонильная группа (С=О) и алифатический радикал (рисунок). Связывание эндогенного лиганда анандамида осуществляется с участием полиолефиновой петли, этанолгидроксильной группы и радикала пентила [257, 258].

Непосредственное действие опиоидных пептидов на клетку происходит, как для большинства гормонов и медиаторов, взаимодействующих с мембранными рецепторами, через посредников – циклические нуклеотиды и ионы кальция. При действии опиоидов на клетку происходит повышение активности аденилатциклазы за счет увеличения числа функционирующих молекул [259].

Сигнал опиоидных рецепторов передается в клетку с помощью $G_{i/o}$ белков; каскад внутриклеточной передачи сигнала включает ингибирование аденилатциклазы, открытие калиевых каналов и закрытие кальциевых каналов на мембране клетки, что вызывает гиперполяризацию мембраны и снижение возбудимости нейрона, что, в свою очередь, препятствует передаче боли в спинном мозге [260].

Для опиоидных рецепторов не описано специфического агониста или антагониста; все опиоидные агонисты/антагонисты в той или иной степени могут взаимодействовать с различными типами опиоидных рецепторов [261].

Для проведения анализа на опиоидную активность были использованы 2 экстракта, 2 фракции и 3 индивидуальных соединения надземной части *P. hydropiper*. Дихрометановую и этилацетатную фракции получили из водно-спиртового экстракта, а также был изучен метанольный экстракт [262]. В качестве позитивных проб использовали налоксон и СР 55.940. Результаты представлены в таблице 58.

Таблица 58 – Исследования каннабиноидной и опиоидной активностей экстрактов, фракций и выделенных веществ

Образец	Каннабиноидные рецепторы, %		Опиоидные рецепторы, %		
	CB1	CB2	δ-	κ-	μ-
1	2		4	5	6
1.2	8.2	39.8	-	-	26.2
1.5	**62.1**	-	0.5	0.2	23.7
1.8	25.6	33.3	-	-	7.4
EtOH-PH	**56.7**	18.4	-	-	-

Продолжение таблицы 57

1	2		4	5	6
DCM-PH	18.5	41.8	49.4	-	-
EtOAc-PH	38.2	9.3	**52.8**	11.9	21.1
MeOH-PH	6.9	11.5	0.5	-	-
Налоксон[1]			106.4	101.6	97.0
CP 55,940[2]	104.3	102.6			
Примечение. [1,2] Контрольные образцы.					

Все индивидуальные соединения, этанольный и метанольный экстракты не показали высокой опиоидной активности. Однако вещество (**1.5**) и этанольный экстракт проявили хорошую моделирующую активность по отношению к CB1 рецепторам с 62.1 и 56.7% связывания соответственно. Этилацетатная фракция показала хорошую активность связывания с δ- подтипу опиоидных рецепторов (52.8%). Вещества 1.2 и 1.8 показали слабую активность связывания с канабиноидными и опиоидными рецепторами. Дихлорметановая фракция проявила умеренную активность по отношению к CB2 подтипу каннабиноидные рецепторов (41.8%) и δ- подтипу опиоидных рецепторов (49.4%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования сделаны следующие выводы:

1. Отработаны методики спектрометрического количественного определения флавоноидов в надземных частях *P. hydropiper* и *P. aviculare*, *P. minus;*

2. Установлен качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ (флавоноиды, жирные кислоты и их эфиры, стерины, фенолкарбоновые кислоты, сесквитерпены) в исследуемых видах растений и выделенных из них суммы экстрактивных веществ;

3. Впервые составлены оптимизированные технологические блок-схемы и материальные балансы процессов получения фитопрепаратов из трех фармакопейных растений (*P. hydropiper, P. aviculare, P. minus);*

4. Впервые составлены технологиченские регламенты и рассчитано экономическое обоснования производства выделения суммарных фитопрепаратов из исследуемых растений;

5. Для стандартизации субстанций, разработаны и составлены оптимальные схемы разделения их комплексов БАВ на индивидуальные соединения. Из этанольных экстрактов были выделены 20 веществ различной природы, из них: стеарил стеарата, изополипиперовая кислота, 3,3’-ди-О-метилэллаговая кислота, кверцетин, таксифолин, β-ситостерол, β-ситостирол-β-D-глюкозид (даукостерол), фуегин, дендокарбин L, кверцитрин, изокверцитрин, 3-О-метиловый эфир кверцетина, изорамнетин, тамариксетин, мирицетин, линолевая и стеариновая кислоты. Также были обнаружены 7 жирных кислот в составах *P. hydropiper* и *P. minus,* 5 жирных кислот – в *P. aviculare* , а также во фракции, выделенной из экстракта *P. hydropiper* идентифицировали 29 липофильных веществ, *P. aviculare* – 22 веществ.

Арахидоновая кислота и изополипиперовая кислота были выделены впервые из надземной части *P. hydropiper*.

6. Изучены противомикробная, противомалярийная, каннабиноидная и опиоидная виды активностей выделенных соединений и фракций из сухих экстрактов. Этанольный экстракт показал сравнительно более сильную активность против микроорганизмов *A. fumigates* и *K. pneumoniae*. Этилацетатная фракция *P. hydropiper* показала ингибирующую активность роста против *C. neoformans* и *E. coli*. Этанольный экстракт, дихлорметановая и этилацетатная фракции *P. aviculare* показали хорошую противогрибковую активность против *A. fumigatus* и *VRE*. Этилацетатная фракция показала хорошую ингибирующую активность против *C. albicans* со значением и *E. coli* и *K. Pneumonia*

7. Впервые изучена каннабиноидная активность полифенольных соединений для их возможного потенциального применения. в медицине для лечения наркотической зависимости, так как флавоноиды обладают низкой биотоксичностью и потенциально не вызывают физическое привыкание. 3,3’-ди-О-метилэллаговая кислота и этанольный экстракт *P. hydropiper* проявили хорошую моделирующую активность по отношению к CB1 рецепторам.

Этилацетатная фракция показала хорошую активность связывания с δ- подтипу опиоидных рецепторов.

Оценка полноты решения поставленных задач.

Задачи, поставленные для достижения цели исследования, выполнены полностью.

- Проведен сравнительный качественный и компонентный анализ, определено количественное содержание основных групп БАВ трех фармакопейных растений рода *Polygonum* L., произрастающих на территории Казахстана.

- Отработан оптимальный режим экстракции и разработаны способы выделения и разделения БАВ.

- Выявлены основные группы БАВ, разработана блок-схема их разделения и выделения индивидуальных соединений, установлены структуры известных и новых, ранее не описанных в литературе соединений для данных видов растений.

- Получены условные фитопрепараты и выявлены различные виды их биологической активности.

Рекомендации по конкретному использованию полученных результатов исследований.

- Результаты диссертационной работы были включены в отчеты о научно-исследовательской работе по проекту: 2048/ГФ4 «Разработка универсальных экономически эффективных методов селективного выделения промышленно значимых классов биологически активных веществиз растений Казахстана» (№ госрегистрации 0115РК00563), 2015-2017 гг.

- Методы исследования и блок-схема фракционирования могут быть использованы в научно-исследовательской практике и учебном процессе.

Технико-экономический уровень в сравнении с лучшими достижениями в этой отрасли:

- Разработана общая схема выделения и разделения биологически активных веществ из растений рода *Polygonum* L., которая позволяет получать фитопрепараты и индивидуальные вещества. Структуры выделенных соединений охарактеризованы комплексом современных спектральных методов анализа. Выявлено одно новое соединение для *P. hydropiper*, а также ранее неупомянутое одно соединение для *P. aviculare.*

- Каннабиноидная и опиоидная виды активностей выделенных фракций из фармакопейных растений рода *Polygonum* L. были изучены впервые.

- По результатам биоскрининга выявлены: противомикробная, каннабиноидная и опиоидная виды активностей фитопрепаратов, которые могут в перспективе расширить ассортимент эффективных доступных отечественных лекарственных средств.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Авдеев В. И. Этапы формирования степных ландшафтов в Евразии. Аспекты эволюции видов Polygonaceae, Scrophulariaceae // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 31-1, №3.- С. 11-13.

2 Байтенов М.С. Флора Казахстана Т. 2. Родовой комплекс флоры. – Алматы: Гылым, 2001. – 280 с.

3 Комаров В.Л. Порядок 18. Гречихоцветные – Polygonales Lindl. / Флора СССР. – М; Л. Изд-во АН СССР, 1936. – № 5. – С. 442-704.

4 Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е изд. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2006. – 600 с.

5 Лазарев А. В. Обзор рода Polygonum L. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2009. – Т. 9, №. 11(66). – С. 18-24.

6 Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т1. Семейства Magnoliaceae-Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabinaceae, Urticaceae / Отв. ред Буданцев А. Л. – СПб.–М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2008. – 421 с.

7 Флора Казахстана: в 9 т. / под ред. Н.В. Павлова. – Алма-Ата: изд-во АН СССР, 1961. – Т. 3. – 460 с.

8 Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е изд-е. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.

9 Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия; учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева. – СПБ.: Спец. лит., 2006. – 845 с.

10 Курбатова Н.В., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Анатомо-диагностические и фитохимические особенности перспективных видов горцев (Polygonum L.). II // Experimental Biology. – 2016. – Т. 68, № 3. – С. 72-82.

11 Narasimhulu G., Reddy K. K., Mohamed J. The genus Polygonum (Polygonaceae): An ethnopharmacological and phytochemical perspectives: review // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 6, № 2. – P. 21-45.

12 Киселева Т.Л., Прохоренко О.А., Фролова Л.Н., Чаузова А.В. Разработка проекта фармакопейной статьи на свежую траву горца птичьего (Polygonum aviculare L.) // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2014. – № 4. – С. 71-77.

13 Попов В. И., Шапиро Д. К., Данусевич И. К. Лекарственные растения. 2-е изд. – Минск.: Полымя, 1990. – 304 с.

14 Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2002. – 656 с.

15 Banthorpe D. V. Polygonum hydropiper L. (Water Pepper): In Vitro Culture and the Production of the Aphid-Antifeedant Polygodial // Medicinal and Aromatic Plants IV. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1993. – C. 269-279.

16 Vikram P., Chiruvella K. K., Ripain I. H. A., Arifullah M. A recent review on phytochemical constituents and medicinal properties of kesum (Polygonum minus Huds.) // Asian Pacific journal of tropical biomedicine. – 2014. – Vol. 4, № 6. – P. 430-435.

17 Costea M., Tardif F. J. The biology of Canadian weeds. 131. Polygonum aviculare L. // Canadian journal of plant science. – 2005. – Vol. 85, № 2. – P. 481-506.

18 Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A. Antioxidative substances in leaves of Polygonum hydropiper // Journal of Agriculture and Food Chemistry. – 1992. – Vol. 40. – P. 1349–1351.

19 Yagi A., Uemura T., Okamura N., Haraguchi H., Imoto T., Hashimoto K. Antioxidative sulphated flavonoids in leaves of Polygonum hydropiper // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 35, № 4. – P. 885– 887.

20 Peng Z. F., Strack D., Baumcrt A., Subramanian R., Goh N. K., Chia T. F., Tan S. N., Chia L. S. Antioxidant flavonoids from leaves of Polygonum hydropiper L. // Phytochemistry (Elsevier). – 2003. – Vol. 62, № 2. – P. 219-228.

21 Kiem P. V., Nhiem N. X., Cuong N. X. New phenylpropanoid esters of sucrose from Polygonum hydropiper and their antioxidant activity // Archives of Pharmacal Research. – 2008. – Vol. 31, № 11. – P. 1477–1482.

22 Noor Hashim N. H., Abas F., Shaari K., Lajis N. H. LC-DAD-ESIMS/MS characterization of antioxidant and anticholinesterase constituents present in the active fraction from Persicaria hydropiper // LWT—Food Science and Technology. – 2012. – Vol. 46, № 2. – P. 468–476.

23 Duraipandiyan V., Indwar F., Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of confertifolin from Polygonum hydropiper // Pharmaceutical Biology. – 2012. – Vol. 48, № 2. – P. 187–190.

24 Kubo I., Fujita K.-I., Lee S. H., Ha T. J. Antibacterial activity of polygodial // Phytotherapy Research. – 2005. – Vol. 19, №. 12. – P. 1013–1017.

25 Malheiros A., Filho V. C., Schmitt C. B. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from Drimys brasiliensis using bioassay-guided fractionation // Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2005. – Vol. 8, №. 2. – P. 335–339.

26 Lee S. H., Lee J. R., Lunde C. S., Kubo I. In vitro antifungal susceptibilities of Candida albicans and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde // Planta Medica. – 1999. – Vol.65, №. 3. – P. 204–208.

27 Kubo I., Taniguchi M. Polygodial, an antifungal potentiator// Journal of Natural Products. – 1988. – Vol. 51, №. 1. – P. 22–29.

28 Taniguchi M., Yano Y., Tada E. Mode of action of polygodial, an antifungal sesquiterpene dialdehyde // Agricultural and Biological Chemistry. – 1988. – Vol. 52, №. 6. – P. 1409–1414.

29 Machida K., Tanaka T., Taniguchi M. Depletion of glutathione as a cause of the promotive effects of polygodial, a sesquiterpene on the production of reactive

oxygen species in Saccharomyces cerevisiae // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 1999. – Vol. 88, №. 5. – P. 526–530.

30 Lunde C. S., Kubo I. Effect of polygodial on themitochondrial ATPase of Saccharomyces cerevisiae // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. – Vol. 44, №. 7. – P. 1943–1953.

31 Castelli M.V., Lodeyro A. F., Malheiros A., Zacchino S.A.S., Roveri O. A. Inhibition of the mitochondrial ATP synthesis by polygodial, a naturally occurring dialdehyde unsaturated sesquiterpene // Biochemical Pharmacology. – 2005. – Vol. 70, №. 1. – P. 82–89.

32 Fujita K.-I., Kubo I. Multifunctional action of antifungal polygodial against Saccharomyces cerevisiae: involvement of pyrrole formation on cell surface in antifungal action // Bioorganic and Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 13, №. 24. – P. 6742–6747.

33 Raihan M. O., Khalequeuzzaman M., Brishti A., Tareq S. M., Hossain A., Rana S. Anthelmintic and Antiproliferative activity of aerial parts of Persicaria hydropiper // Der Pharmasia Sinica. – 2012. – № 3. – P. 104–110.

34 Das B. C., Sarker P. K., Rahman M. M. Aphidicidal activity of some indigenous plant extracts against bean aphid Aphis craccivora Koch (Homoptera: Aphididae) // Journal of Pest Science. – 2008. - Vol. 81, №. 3. – P. 153–159.

35 Kubo I., Lee Y.-W., Pettei M., Pilkiewicz F., K. Nakanishi. Potent army worm antifeedants from the east African Warburgia plants // Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1976. – № 24. – P. 1013–1014.

36 Asakawa Y., Dawson G.W., Griffiths D. C. Activity of drimane antifeedants and related compounds against aphids, and comparative biological effects and chemical reactivity of (-)-and (+)-polygodial // Journal of Chemical Ecology. – 1988. – Vol. 14, № 10 – P. 1845–1855.

37 Moreno-Osorioa L., Cortres M., Armstrong V., Bailrен M., Gonzralez-Coloma A. Antifeedant activity of some polygodial derivatives // Zeitschrift FËur Naturforschung C, A Journal of Biosciences. – 2008. – Vol. 63. – P. 215–220.

38 Zapata N., Budia F., Vinuela E., Medina P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of Drimys winteri stem bark against Spodoptera littoralis (Lep., Noctuidae) // Industrial Crops and Products. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 119–125.

39 Prota N., Bouwmeester H. J., Jongsma M. A. Comparative antifeedant activities of polygodial and pyrethrins against whiteflies (Bemisia tabaci) and aphids (Myzus persicae) // Pest Management Science. – 2013. – Vol. 70, №. 4. – P. 682–688.

40 Lajter I., Zupkro I., Molnrar J. Antiproliferative activity of Polygonaceae species from the Carpathian Basin against human cancer cell lines // Phytotherapy Research. – 2012. – Vol. 27, № 1. – P. 77–85.

41 Anke H., Sterner O. Comparison of the antimicrobial and cytotoxic activities of twenty unsaturated sesquiterpene dialdehydes from plants and mushrooms // Planta Medica. – 1991. – Vol. 57, № 4. – P. 344–346.

42 Yang Y., Yu T., Jang H.-J. In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of Polygonum hydropiper methanol extract // Journal of Ethnopharmacology. – 2012. – Vol. 139, № 2. – P. 616–625.

43 Fukuyama T.Y., Asakawa Y. Polygonolide, an isocoumarin from Polygonum hydropiper possessing anti-inflammatory activity // Phytochemistry. – 1986. – Vol. 25, № 2. – P. 517–520.

44 Sayah M. El, Cechinel Filho V., Yunes R. A., Pinheiro T. R., Calixto J. B. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from Drymis winteri, in the guinea-pig ileum and trachea “in vitro” // European Journal of Pharmacology. – 1998. – Vol. 344, № 2-3. – P. 215–221.

45 da Cunha F. M., FrËode T. S., Mendes G. L. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial // Life Sciences. – 2001. – Vol. 70, № 2. – P. 159–169.

46 Rahman E., Goni S. A., Rahman M. T., Ahmed M. Antinociceptive activity of Polygonum hydropiper // Fitoterapia. – 2002 – Vol. 73, № 7-8, P. 704–706.

47 Mendes G. L., Santos A. R. S., Campos M. M. Antihyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of Drymis winteri (Winteraceae) // Life Sciences. – 1998. – Vol. 63, № 5. - P. 369–381.

48 Mendes G. L., Santos A. R. S., Malheiros A., Cechinel V., Filho, Yunes R.A., Calixto J. B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2000. – Vol. 292, № 1. – P. 164–172.

49 Garg S. K., Mathur V. S., Chaudhury R. R. Screening of Indian plants for antifertility activity // Indian Journal of Experimental Biology. – 1978. – Vol. 16, № 10. – P. 1077–1079.

50 Hazarika A., Sarma H. N. Polygonum hydropiper crude root extract mimics estrogenic properties in females: evidence of uterine protein profiles studied by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis // ReproductiveMedicine and Biology. – 2006. – Vol. 5, № 2. – P. 155–160.

51 Goswami P., Hazarika A., Sarma H. N. Root extract of Polygonum hydropiper alters the expression of rat uterine protein profile in presence and absence of ovary in-situ during periimplantation period: evidence on SDA-PAGE // Journal of Reproduction and Contraception. – 2009. – Vol. 20, № 4. – P. 223–236.

52 Goswami P., Hazarika A., Sarma H. N. Chromatographic fraction of Polygonum hydopiper root modulates the expression of transforming growth factor-βI (TGF-βI) in rat uterus during days 2–6 of gestation // Journal of Reproduction and Contraception. – 2011. – Vol. 22, №. 3. – P. 153–167.

53 Lee S.-H., Kim B., Oh M. J. Persicaria hydropiper (L.) spach and its flavonoid components, isoquercitrin and isorhamnetin, activate theWnt/-βcatenin pathway and inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells // Phytotherapy Research. – 2011. – Vol. 25, № 11. – P. 1629–1635.

54 Ma C. J., Lee K. Y., Jeong E. J. Persicarin from water dropwort (Oenanthe javanica) protects primary cultured rat cortical cells fromglutamate-induced neurotoxicity // Phytotherapy Research. – 2010. – Vol. 24, № 6. – P. 913–918.

55 Hasan M. F. The Determination of Antibacterial and Antifungal Activities of Polygonum hydropiper (L.) Root Extract // Advances in Biological Research. – 2009. – Vol. 3, №. 1-2. – P. 53-56.

56 Tunon H., Olavsdotter C., Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis // Journal of Ethnopharmacology. – 1995. – Vol. 48, № 2. – P. 61-76.

57 Plachcinska J., Matacz D., Krzysztofik R., Dabrowa A., Brzosko W. J., Ozarowski, A. 1984. Influence of medicinal herbs on the immune system. I. Induction of endogenous interferon // Fitoterapia. – № 55. – P. 346–348.

58 Stajner D., Mimica-Dukic N., Braic, M. 1997. Oxygen radical scavenging activity of Reatival(R) // Fitoterapia. – 1997. – № 68. – P. 261–264.

59 Begné M. G., Yslas N., Reyes E., Quiroz V., Santana J., Jimenez G. Clinical effect of a Mexican sanguinaria extract (Polygonum aviculare L.) on gingivitis // Journal of ethnopharmacology. – 2001. – Vol. 74, № 1. – P. 45-51.

60 Hsu C. Y. Antioxidant activity of extract from Polygonum aviculare L // Biological Research. – 2006. – Vol. 39, № 2. – P. 281-288.

61 Ravipati A. S., Zhang L., Koyyalamudi S. R., Jeong S. C., Reddy N., Bartlett J., Satyanarayanan M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content // BMC complementary and alternative medicine. – 2012. – Vol. 12, № 173. – P. 1-14.

62 Gan R. Y. Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease // Molecules. – 2010. – Vol. 15, №. 9. – P. 5988-5997.

63 Milan P. B. Effects of Polygonum aviculare herbal extract on sperm parameters after EMF exposure in mouse // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2011. – Vol. 14, № 13. – P. 720.

64 Proestos C. Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms // Food Technology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 46, № 2. – P. 151-156.

65 Salama H. M. H., Marraiki N. Antimicrobial activity and phytochemical analyses of Polygonum aviculare L.(Polygonaceae), naturally growing in Egypt //Saudi journal of biological sciences. – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 57-63

66 Walker J. M. Identification of Magnolia officinalis L. bark extract as the most potent anti-inflammatory of four plant extracts // The American journal of Chinese medicine. – 2013. – Vol. 41, № 03. – P. 531-544.

67 Zhang L., Ravipati A. S., Koyyalamudi S. R., Jeong S. C., Reddy N., Bartlett J., Jiménez E. Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs // Asian Pacific journal of tropical medicine. – 2013. – Vol. 6, № 9. – P. 673-681.

68 Yang M. L., Ding J. H., Jiang R. Effects of Extracts from Polygonum aviculare L. Against some Agricultural Pests // Egyptian Journal of Biological Pest Control. – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 345.

69 Yang H. H. Quercetin-3-O-β-D-glucuronide isolated from Polygonum aviculare inhibits cellular senescence in human primary cells // Archives of pharmacal research. – 2014. – Vol. 37, № 9. – P. 1219-1233.

70 Alsaadawi I. S., Rice E. L. Allelopathic effects of Polygonum aviculare LI Vegetational patterning // Journal of Chemical Ecology. – 1982. – Vol. 8, № 7. – P. 993-1009.

71 Park S. H., Sung Y. Y., Nho K. J., Kim H. K. Anti-atherosclerotic effects of Polygonum aviculare L. ethanol extract in ApoE knock-out mice fed a Western diet mediated via the MAPK pathway // Journal of ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 151, № 3. – P. 1109-1115.

72 Nan J. X., Park E. J., Kim H. J., Ko G., Sohn D. H. Antifibrotic Effects of the Methanol Extract of Polygonum aviculare in Fibrotic Rats Insuced by Bile Duct Ligation and Scission // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2000. – Vol. 23, № 2. – P. 240-243.

73 Мантатов В.В., Башелханов И. С. Исследование фармакотерапевтической эффективности экстракта горца птичьего при экспериментальном хроническом простатите // Acta Biomedica Scientifica. – 2011. – Т. 4 , №80. – С. 263-264.

74 Хотимченко Ю. С., Кропотов Л. В., Лисаковская О. В. Влияние настоя горца птичьего на дискриминационные эякуляты крыс при воздействии алкерана // Бюллютень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – № 12. – С. 636-638.

75 Vikram P., Chiruvella K. K., Ripain I. H. A., Arifullah M. A recent review on phytochemical constituents and medicinal properties of kesum (Polygonum minus Huds.) //Asian Pacific journal of tropical biomedicine. – 2014. – Vol. 4, № 6. – P. 430-435.

76 Abdullah M. Z., Mavaddat M. H., Mohd Ali J. Antioxidant and Anticancer Activities of Polygonum Minus, Alpinia Galanga and Etlingera Elatior// The Open Conference Proceedings Journal. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 203.

77 Uyub A. M., Nwachukwu I. N., Azlan A. A., Fariza S. S. In-vitro antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on metronidazole-resistant-Helicobacter pylori and some pathogenic bacteria //Ethnobotany research and applications. – 2010. – Vol. 8. – P. 95-106.

78 Christapher P. V., Xin T. Y., Kiun C. F., Leng L. C., Fu N. G., Yuan G. L., Vikneswaran M. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and antiulcer effect of aqueous and methanol extracts of leaves of Polygonum minus Huds.(Polygonaceae) in rodents //Archives of Medicine and Health Sciences. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 12-17.

79 Воронин А. В., Редкокашин Д. Е., Шаталаев И. Ф. Исследование малатдегидрогеназы лекарственных растений семейства гречишные // Известия Самарского научного центра РАН. – 2015. – Т. 17, №5(3). – С. 935-939.

80 Waksmundzka-Hajnos M., Oniszczuk A., Szewczyk K., Wianowska D. Effect of sample-preparation methods on the HPLC quantitation of some phenolic acids in plant materials // Acta Chromatographica. – 2007. – Vol. 19. – P. 227-237.

81. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Magnoliaceae-Limoniaceae. / под ред. А.А. Федорова. – Л.: Наука, 1984. – С. 255-271.

82 Helena D. Smolarz. Flavonoid glycosides in nine Polygonum L. taxons // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2002. – Vol. 71, No. 1. – P. 29-33.

83 Yunuskhodzhaeva N. A., Abdullabekova V. N., Ibragimova K. S., Mezhlumyan L. G. Amino-acid composition of Urtica dioica leaves and Polygonum hydropiper and P. aviculare herbs // Chemistry of Natural Compounds. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 970-971.

84 Shin H., Chung H., Park, B., Lee K. Y. Identification of antioxidative constituents from Polygonum aviculare using LC-MS coupled with DPPH assay // Natural Product Sciences. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 64-69.

85. Li M.-M., Liu Z.-H., Wang H.-Y., Huang H.-M., Wang L.-L., Xu Y. Studies on antibacterial activities and chemical constituents of polygonum aviculare L. // Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. – 2014. – Vol. 26, № 4. – P. 526-530.

86 Chen X., Cheng D. Study on the chemical constituents of Polygonum aviculare L. // Zhongguo Zhongyao Zazhi. – 2004. – Vol. 29, № 9. – P. 918-919.

87 Proestos C., Boziaris I. S., Kapsokefalou M., Komaitis M. . Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms // Food Technology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 46, № 2. – P. 151-156.

88 Yunuskhodzhaeva N. A., Eshbakova K. A., Abdullabekova V. N. Flavonoid composition of the herb Polygonum aviculare // Chemistry of Natural Compounds. – 2010. – Vol. 46, No. 5. – P. 803-804.

89 Shin H., Chung H., Park B., Lee Ki Y. Identification of antioxidative constituents from Polygonum aviculare using LC-MS coupled with DPPH assay // Natural Product Sciences. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 64-69.

90 Sun Z.-L., Wang X., Wang D.-J., Li J., Duan W.-J.. Isolation and purification of flavones from Polygonum aviculare by polyamide chromatography combined with high-speed counter-current chromatography // Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. – 2015. – Vol. 27, № 5. – P. 854-858.

91 Li M.-M., Liu Z.-H., Wang H.-Y., Huang H.-M., Wang L.-L., Xu Y. Studies on antibacterial activities and chemical constituents of Polygonum aviculare L. // Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. – 2014. – Vol. 26, № 4. – P. 526-530.

92 Luksha E. A. The biological activity of Persicaria and Polygonum (Polygonaceae) species from flora of Siberia: according to the study conducted in 2006-2014 // Rastitelnye Resursy. – 2015. – Vol. 51, № 4. – P. 611–619.

93 Wang K. J., Zhang Y. J., Yang C. R. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of Polygonum paleaceum // Journal of ethnopharmacology. – 2005. – Vol. 96, № 3. – P. 483-487.

94 Kim J. R., Son J. K., Yang H. H., Hwangbo K. Composition for inhibiting cellular senescence comprising quercetin-3-O-β-D-glucuronide: заяв. пат. 14425951 США. – 2015.

95 Lee S. H., Kim B., Oh M. J., Yoon J., Kim H. Y., Lee K. J., Lee J. D., Choi K. Y. Persicaria hydropiper (L.) Spach and its flavonoid components, isoquercitrin

and isorhamnetin, activate the Wnt/b-catenin pathway and inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. – Phytotherapy Research. – 2011. – Vol. 25, № 11. – P. 1629-1635.

96 Chen X., Cheng D. Study on the chemical constituents of Polygonum aviculare L. // Zhongguo Zhongyao Zazhi. – 2004. – Vol. 29, № 9. – P. 918-919.

97. Zhao A., Zhao Q., Lin Z., Sun H. Chemical studies on Polygonum aviculare // Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa. – 2002. – Vol. 14, № 5. – P. 29-32.

98 Sun L., Zheng S., Wang J., Shen X., Zheng X. The flavonoids from Polygonum aviculare // Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. – 2002. – Vol. 41B, № 6. – P. 1319-1320.

99 Zheng X., Su Y., Shen X., Zheng S. Studies on flavone constituents from Polygonum aviculare L. // Xibei Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban. – 1999. – Vol. 35, № 2. – P. 47-49.

100 Kim H. J., Woo E. R., Park H. A novel lignan and flavonoids from Polygonum aviculare // Journal of natural products. – 1994. – Vol. 57, № 5. – P. 581-586.

101 Panosyan A. G., Barikyan M. L., Grigoryan R. T., Amroyan E. A.; Gabrielyan, E. S. The effect of Polygonum aviculare L. flavonoids on platelet aggregation // Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal. – 1986. – Vol. 20, № 2. – P. 190-194.

102 Ota T. The glycosides of Polygonum aviculare L. var. buxifolium Ledeb // Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. – 1940. – Vol. 263. – P. 221-223.

103 Nugroho A., Kim E. J., Choi J. S., Park H. J. Simultaneous quantification and peroxynitrite-scavenging activities of flavonoids in Polygonum aviculare L. herb // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2014. – № 15. – P. 93-98.

104 Imelda F., Faridah D. N., Kusumaningrum H. D. Bacterial inhibition and cell leakage by extract of Polygonum minus Huds. leaves //International Food Research Journal. – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 553-560

105 Kim H. J., Woo E. R., Park H. A novel lignan and flavonoids from Polygonum aviculare // Journal of natural products. – 1994. – Vol. 57, № 5. – P. 581-586.

106 Yuan C., Guo W. Ultrasonic and circulated extraction of total flavones from Polygonum aviculare // Chinese Traditional and Herbal Drugs. – 2006. – Vol. 37, № 9. – P. 1336.

107 Khvorost P. P. Flavonoids of Polygonum aviculare // Khimiya Prirodnykh Soedinenii. – 1980. – Vol. 6. – P. 840.

108 Yakovlev A.I., Churilov G.I. Characteristics and dynamics of the content of polysaccharides in the aboveground part of Polygonum hydropiper L. // Journal of Plant Research. – Vol.19, № 1. – P. 68-71.

109 Huq A. K. M., Jamal J. A., Stanslas J. Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological, and toxicological aspects of Persicaria hydropiper (L.) Delarbre //Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-11.

110 Kurkina A. V., Ryazanova T. K., Kurkin V. A. Flavonoids from the aerial part of Polygonum hydropiper // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 49, № 5. – P. 830-832.

111 Hashim N. H. N., Abas F., Shaari K., Lajis N. H. LC-DAD-ESIMS/MS characterization of antioxidant and anticholinesterase constituents present in the active fraction from Persicaria hydropiper // Food Science and Technology. – 2012. – № 46. – P. 468-476.

112 Miyazawa M., Tamura N. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of Polygonum hydropiper L. (Benitade) // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2007. – Vol. 30, № 3. – P. 595-597.

113 Peng Z. F., Strack D., Baumert A., Subramaniam R., Goh N. K., Chia T. F., Chia L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of Polygonum hydropiper L. // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 62, № 2. – P. 219-228.

114 Yagi A., Uemura T., Okamura N., Haraguchi H., Imoto T., Hashimoto K. Antioxidative sulphated flavonoids in leaves of Polygonum hydropiper // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 35, № 4. – P. 885-887.

115 Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A. Antioxidative substances in leaves of Polygonum hydropiper // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1992. – Vol. 40, № 8. – P. 1349-1351.

116 Huang J., Hou P., Wu L., Gao H. Isolation and identification of chemical constituents from whole plant of Polygonum hydropiper L. // Shenyang Yaoke Daxue Xuebao. – 2012. – Vol. 29, № 1. – P. 22-25.

117 Yang X., Wang B. C., Zhang X., Yang S. P., Li W., Tang Q., Singh G. K. Simultaneous determination of nine flavonoids in Polygonum hydropiper L. samples using nanomagnetic powder three-phase hollow fibre-based liquid-phase microextraction combined with ultrahigh performance liquid chromatography–mass spectrometry // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2011. – Vol. 54, № 2. – P. 311-316.

118 Starkenmann C., Luca L., Niclass Y., Praz E., Roguet D. Comparison of volatile constituents of Persicaria odorata (Lour.) Sojak (Polygonum odoratum Lour.) and Persicaria hydropiper L. Spach (Polygonum hydropiper L.) // Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – Vol. 54, № 8. – P. 3067-3071.

119 Zhang G.-Y., Zengg T. Study on chemical constituents of Polygonum hydropiper Linn // Linchan Huaxue Yu Gongye. – 2005. – Vol. 25, № 3. – P. 21-24.

120 Nguyen V. D., Vu N. T. Flavonoids from Polygonum hydropiper L. (Polygonaceae) // Tap Chi Hoa Hoc. – 2004. – Vol. 42, № 4. – P. 512-515.

121 Шевченко А.С. Отработка технологии и анализ фитопрепаратов травы горца малого Polygonum minus: диплом. раб. ...бакалавра техники и технологии: 5В072100 – Алматы, КазНУ, 2012. – 96 с.

122 Starkenmann C., Luca L., Niclass Y., Praz E., Roguet D. Comparison of volatile constituents of Persicaria odorata (Lour.) Sojak (Polygonum odoratum Lour.) and Persicaria hydropiper L. Spach (Polygonum hydropiper L.) // Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – Vol. 54, № 8. – P. 3067-3071.

123 Lajter I., Vasas A., Orvos P., Bánsághi S., Tálosi L., Jakab G., Hohmann J. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K+ channels by extracts of

Polygonum persicaria and isolation of new flavonoids from the chloroform extract of the herb // Planta medica. – 2013. – Vol. 79, № 18. – P. 1736-1741.

124 Xiao H., Rao Ravu R., Tekwani B. L., Li W., Liu W. B., Jacob M. R., Li X. C. Biological evaluation of phytoconstituents from Polygonum hydropiper // Natural product research. – 2017. – Vol. 31, № 17. – P. 2053-2057.

125 Fukuyama Y., Sato T., Miura I., Asakawa Y., Takemoto T. Hydropiperoside, a novel coumaryl glycoside from the root of Polygonum hydropiper // Phytochemistry (Elsevier). – 1983. – Vol. 22, № 2. – P. 549-552.

126 Yunuskhodzhaeva N. A., Abdullabekova V. N., Kurbanova A. D. Polysaccharide composition of Polygonum hydropiperis and P. aviculare // Chemistry of Natural Compounds. – 2006. – Vol. 42, № 5. – P. 600-601.

127 Vikram P., Chiruvella K. K., Ripain I. H. A., Arifullah M. A recent review on phytochemical constituents and medicinal properties of kesum (Polygonum minus Huds.) // Asian Pacific journal of tropical biomedicine. – 2014. – Vol. 4, № 6. – P. 430-435.

128 Qader S. W., Abdulla M. A., Chua L. S., Hamdan S. Potential bioactive property of Polygonum minus Huds (kesum) review // Scientific Research and Essays. – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. 90-93.

129 Christapher P. V., Parasuraman S., Christina J. M. A., Asmawi M. Z., Vikneswaran M. Review on Polygonum minus. Huds, a commonly used food additive in Southeast Asia // Pharmacognosy research. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 1-6.

130 Kumar S., Pandey A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview // The Scientific World Journal. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-16.

131 Куркин В. А., Куркина А. В., Авдеева Е. В. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений // Фундаментальные исследования. – 2013. – Т. 9, №. 11. – С. 1897-1901.

132 Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview // Journal of nutritional science. – 2016. – Vol. 5. – P.1-15

133 Batra P., Sharma A. K. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives // Biotechnology – 2013. – Vol. 3, № 6. – P. 439-459.

134 Metodiewa D., Kochman A., Karolczak S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N, diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action // IUBMB Life. – 1997. – Vol. 41, № 5. – P. 1067-1075.

135 Mazza G., Miniati E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains; CRC Press: Boca Raton, FL, 1993. – 362 p.

136 Pietta P. G. Flavonoids as antioxidants // Journal of natural products. – 2000. – Vol. 63, № 7. – P. 1035-1042.

137 Harborne J. B., Mabry T. J. The flavonoids: advances in research. – Springer, 2013. – 739 p.

138 Shirley B. W. Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway // Trends in plant science. – 1996. – Vol. 1, № 11. – P. 377-382.

139 Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishna D. R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential // Indian Journal of Pharmacology. – 2001. – Vol. 33, № 1. – P. 2–16.

140 Middleton E. The flavonoids // Trends in Pharmacological Sciences. – 1984 – Vol. 5. – P. 335–338.

141 Das D. K. Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high performance liquid chromatography methods for separation and characterization // Methods Enzymol. – 1994. – № 234. – P. 410–420.

142 Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // Free radical biology and medicine. – 1996. – Vol. 20, № 7. – P. 933-956.

143 Havsteen B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacology & therapeutics. – 2002. – Vol. 96, № 2-3. – P. 67-202.

144 Martens S., Mithöfer A. Flavones and flavone synthases // Phytochemistry. – 2005. – Vol. 66, № 20. – P. 2399-2407.

145 Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones // European journal of medicinal chemistry. – 2007. – Vol. 42, № 2. – P. 125-137.

146 Scheline R. R. Handbook of mammalian metabolism of plant compounds // CRC Press, Boca Raton, 2017 – 522 p.

147 Batra P., Sharma A. K. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives // Biotech. – 2013. – Vol. 3, № 6. – P. 439-459.

148 Куркина А. В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография Куркина А.В. – Самара: «Офорт», 2012. – 290 с.

149 Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacology & therapeutics. – 2002. – Vol. 96, № 67. – P. 202.

150 Hossain H., Shahid-Ud-Daula A. F. M., Jahan I. A., Nimmi I., Hasan K., Haq M. M. Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of Spilanthes paniculata growing in Bangladesh // International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research. – 2017. – Vol. 1, № 4. – P. 178-186.

151 Snijman P. W., Swanevelder S., Joubert E., Green, I. R., Gelderblom W. C. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (Aspalathus linearis): some dose–response effects on mutagen activation– flavonoid interactions // Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2007. – Vol. 631, № 2. – P. 111-123.

152 LeJeune T. M., Tsui H. Y., Parsons L. B., Miller G. E., Whitted C., Lynch K. E., Adams C. B. Mechanism of action of two flavone isomers targeting cancer cells with varying cell differentiation status. // PloS one. – 2015. – Vol. 10, № 11. – P. e0142928.

153 Kim H., Son K., Chang H. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms // Journal of pharmacological sciences. – 2004. – Vol. 96, № 3. – P. 229-245.

154 Li J. X., Xue B., Chai Q., Liu Z. X., Zhao A. P., Chen L. B. Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of Astragalus complanatus in

hypertensive rats // The Chinese Journal of Physiology. – 2005. – Vol. 48, № 2. – P. 101–106.

155 Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger-Gateau P., Dartigues J. F. Intake of flavonoids and risk of dementia // European journal of epidemiology. – 2000. – Vol. 16, № 4. – P. 357-363.

156 Hwang S. L., Yen G. C. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H2O2-induced cytotoxicity in PC12 cells // Journal of agricultural and food chemistry. – 2008. – Vol. 56, № 3. – P. 859-864.

157 Jäger A., Saaby L. Flavonoids and the CNS // Molecules. – 2011. – Vol. 16, № 2. – P. 1471-1485.

158 Santos A. C., Vyemura S. A., Lopes J. L., Bazon J. N., Mingatto F. E., Curtic C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria // Free Radical Biology and Medicine. – 1998. – Vol. 24, № 9. – P. 1455-1461.

159 Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? // The lancet. – 1994. – Vol. 344, № 8924. – P. 721-724.

160 Ratty A. K., Das N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship // Biochemical medicine and metabolic biology. – 1988. – Vol. 39, № 1. – P. 69-79.

161 Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Cross C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? // The Journal of laboratory and clinical medicine. – 1992. – Vol. 119, № 6. – P. 598-620.

162 Letan A. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives I. Primary activity // Journal of Food Science. – 1966. – Vol. 31, № 4. – P. 518-523.

163 Korkina L. G., Afanas'ev I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids // Advances in pharmacology. – 1996. – Vol. 38. – P. 151-163.

164 Shahidi F., Yang Z., Saleemi Z. O. Natural flavonoids as stabilizers // Journal of Food Lipids. – 1998. – № 1. – P. 69-75.

165 Morino M., Tsuzuki T., Ishikawa Y., Shirakami T., Yoshimura M., Kiyosuke Y., Matsunaga K., Yoshikumi C., Saijo N. Specific regulation of HSPS in human tumour cell lines by flavonoids // In vivo (Athens, Greece). – 1997. – Vol. 11, № 3. – P. 265-270.

166 Alcaraz M.J., Ferrandiz M.L. Modification of arachidonic metaboilism by flavonoids // Journal of ethnopharmacology. – 1987. – Vol. 21, № 3. – P. 209-229.

167 Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents // Medicinal research reviews. – 2003. – Vol. 23, № 4. – P. 519-534.

168 Fotsis T., Pepper M. S., Aktas E., Breit S., Rasku S., Adlercreutz H., Schweigerer L. Flavonoids, dietaryderived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. // Cancer research. – 1997. – Vol. 57, № 14. – P. 2916-2921.

169 Si H., Liu D. Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights // Current medicinal chemistry. – 2007. – Vol. 14, № 24. – P. 2581-2589.

170 Wang H. K., Xia Y., Yang Z. Y., Natschke S. L. M., Lee K. H. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents // Flavonoids in the living system. – 1998. – P. 191-225.

171 Kaul T., Middleton E., Ogra P. Antiviral effect of flavonoids on human viruses // Journal of medical virology. – 1985. – Vol. 15, № 1. – P. 71-79.

172 Wu D., Kong Y., Han C., Chen J., Hu L., Jiang H., Shen X. D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin // International journal of antimicrobial agents. – 2008. – Vol. 32, № 5. – P. 421-426.

173 Wiseman H. The therapeutic potential of phytoestrogens // Expert opinion on investigational drugs. – 2000. – Vol. 9, № 8. – P. 1829-1840.

174 Metzner J. E., Frank T., Kunz I., Burger D., Riegger C. Study on the pharmacokinetics of synthetic genistein after multiple oral intake in postmenopausal women // Arzneimittelforschung. – 2009. – Vol. 59, № 10. – P. 513-520.

175 Cosa P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., Mae L. Cos P. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept' // Journal of ethnopharmacology. – 2006. – Vol. 106, № 3. – P. 290-302.

176 Cannell J. P. Natural products isolation. – Human Press Totawa, New Jersy, 1998. – 560 p.

177 Kuang L., Zhang K. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2005. – Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. – Vol. 1 – 645 pp.

178 The Japanese Pharmacopeia. – Fourteenth ed., JP XIII, The Society of Japanese Pharmacopeia, 2001. – D-395 p.

179 Brodowska K. M. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues // European Journal of Biological Research. – 2017. – Vol. 7, № 2. – P. 108-123.

180 Huie C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2002. – Vol. 373, № 1-2. – P. 23-30.

181 Namieśnik J., Jastrzebska A., Zygmunt B. Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 1016, № 1. – P. 1-9.

182 Cunha I.B.S., Sawaya A.C.H.F., Caetano F.M., Shimizu M.T., Marcucci M.C., Drezza F.T., Povia G.S., Carvalho P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts // Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2004. – Vol. 15, №. 6. – P. 964-970.

183 Phrompittayarat W., Putalun W., Tanaka H., Jetiyanon K., Wittaya-areekul S., Ingkaninan K. Comparison of various extraction methods of Bacopa monnieri // Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST). – 2007. – Vol. 15, № 1. – P. 29-34.

184 Woisky R. G., Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control // Journal of apicultural research. – 1998. – Vol. 37, № 2. – P. 99-105.

185 Majors R. E. Sampler prep perspectives: Liquid extraction techniques for sample preparation // LC-GC. – 1996. – Vol. 14, № 11. – P. 88-90

186 Poole C. F., Poole S. K. Highlight. Trends in extraction of semivolatile compounds from solids for environmental analysis // Analytical communications. – 1996. – Vol. 33, № 7. – P. 11H-14H.

187 Routray W., Orsat V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review // Food and Bioprocess Technology. – 2012. – Vol. 5, № 2. – P. 409-424.

188 Camel V. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls // Analyst. – 2001. – Vol. 126, № 7. – P. 1182-1193.

189 Smith R. M., Burford M. D. Optimization of supercritical fluid extraction of volatile constituents from a model plant matrix // Journal of Chromatography A. – 1992. – Vol. 600, № 2. – P. 175-181.

190 Hedrick J. L., Mulcahey L. J., Taylor L. T. Supercritical fluid extraction // Microchimica Acta. – 1992. – Vol. 108. – №. 3-6. – P. 115-132.

191 Eskilsson C. S., Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction // Journal of Chromatography A. – 2000. – Vol. 902, № 1. – P. 227-250.

192 Richter B. E. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation // Analytical Chemistry. – 1996. – Vol. 68, № 6. – P. 1033-1039.

193 Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs // Ultrasonics sonochemistry. – 2001. – Vol. 8, № 3. – P. 303-313.

194 Fang Q., Yeung H. W., Leung H. W., Huie C. W. Micelle-mediated extraction and preconcentration of ginsenosides from Chinese herbal medicine // Journal of Chromatography A. – 2000. – Vol. 904. – № 1. – P. 47-55.

195 Lang Q., Wai C. M. An extraction method for determination of ginkgolides and bilobalide in ginkgo leaf extracts // Analytical Chemistry. – 1999. – Vol. 71, № 14. – P. 2929-2933.

196 Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии: учебник для вузов. – М.: ООО ИД «Альянс», 2008. – 753 с.

197 Rao N. V. R., Baird M. H. I. Davy mckee combined mixer settler: Some laboratory studies // The Canadian Journal of Chemical Engineering. – 1984. – Vol. 62, № 4. – P. 497-506.

198 Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids // Journal of Separation Science. – 2007. – Vol. 30, № 18. – P. 3268–3295.

199 Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1992. – Vol. 40, № 9. – P. 1571–1576.

200 Guillen D., Barroso C., Perez-Bustamante J. Automation of sample preparation as a preliminary stage in the highperformance liquid chromatographic determination of polyphenolic compounds in sherry wines // Journal of Chromatography A. – 1996. – Vol. 730, № 1–2. – P. 39–46.

201 de Rijke E., Out P., Niessen W., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids // Journal of Chromatography A. – 2006. – Vol. 1112, № 1–2. – P. 31–63.

202 Søltoft M., Christensen, J. H. Nielsen, J., Knuthsen P. Pressurised liquid extraction of flavonoids in onions. Method development and validation // Talanta. – 2009. – Vol. 80, № 1. – P. 269–278.

203 Kalia K., Sharma K., Singh H. P., Singh B. Effect of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of Potentilla atrosanguinea Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56, № 21. – P. 10129–10134.

204 Fan J. P., Zhang R. F., Zhu J. H. Optimization of microwave assisted extraction of total triterpenoid in Diospyros kaki leaves using response surface methodology // Asian Journal of Chemistry. – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 3487–3500.

205 Macdonald I. O., Oludare A. S., Olabiyi A. Phytotoxic and anti-microbial activities of flavonoids in Ocimum gratissimum // Life Science Journal-Acta Zhengzhou University Overseas Edition. – 2010. – Vol. 7, № 3. – P. 45–48.

206 Wang L., Weller C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants // Trends in Food Science and Technology. – 2006. – Vol. 17, № 6. – P. 300–312.

207 Chen X. J., Guo B. L., Li S. P., Zhang Q. W., Tu P. F., Wang Y.T. Simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography // Journal of Chromatography A. – 2007. – Vol. 1163, № 1–2. – P. 96–104.

208 Husni A., Shin I. S., You S., Chung, D. Antioxidant properties of water and aqueous ethanol extracts and their crude saponin fractions from a far-eastern sea cucumber, Stichopus japonicus // Food Science and Biotechnology. – 2009. – Vol. 18, № 2. – P. 419–424.

209 Qian Z. M., Lu J., Gao Q. P., Li S. P. Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in Folium ginseng and Radix ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry // Journal of Chromatography A. – 2009. – Vol. 1216, № 18. – P. 3825–3830.

210 Raynie D. E. Modern extraction techniques // Analitical Chemistry. – 2006. – Vol. 78, № 12. – P. 3997–4004.

211 Abourashed E. A., Vanderplank J. R., Khan, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants-I. Application to Passiflora flavonoids // Pharmaceutical Biology. – 2002. – Vol. 40, № 2. – P. 81–91.

212 Wianowska D., Hajnos M., Dawidowicz A. L., Oniszczuk A., Waksmundzka-Hajnos M., Gowniak K. Extraction methods of 10-deacetylbaccatin iii, paclitaxel, and cephalomannine from Taxus baccata L. twigs: a comparison // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. – 2009. – Vol. 32, № 4. – P. 589–601.

213 Ibanez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G., Hawthorne S. B. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 51, № 2. – P. 375–382.

214 Rodriguez-Meizoso I., Marin F. R., Herrero M., Señorans F. J., Reglero G., Cifuentes, A. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2006. – Vol. 41, № 5. – P. 1560–1565.

215 Catchpole O. J., Grey J. B., Mitchell K. A., Lan, J. S. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture // Journal of Supercritical Fluids. – 2004. – Vol. 29, № 1–2. – P. 97–106.

216 Liza M. S., Rahman R. A., Mandana B., Jinap S., Rahmat A., Zaidul I. S. M. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from Strobilanthes crispus (Pecah Kaca) // Food and Bioproducts Processing. – 2010. – Vol. 88, № C2-3. – P. 319–326.

217 Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек Жолы», 2008. – Т.1. - 592 с.

218 Ивлев В. А., Прокопьев А. С., Калабин Г. А. Количественная спектроскопия ЯМР в идентификации и контроле качества лекарственных препаратов и растительных биологически активных композиций // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2015. – № 1. – С. 5-14.

219 Gottlieb H. E., Kotlyar V., Nudelman A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities // The Journal of organic chemistry. – 1997. – Vol. 62, № 21. – P. 7512-7515.

220 Меркулов В. А., Саканян Е. И., Шемерянкина Т. Б., Мочикина О. А., Бунятян Н. Д. Общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – № 2. – С. 54-58.

221 Гравель И. В., Петров Н. В., Самылина И. А., Рудакова И. П., Яковлев Г. П., Стуловский С. С. Определение содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 3-5.

222 Миронов А. Н., Сакаева И. В., Саканян Е. И., Корсун Л. В., Мочикина О. А. Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 2. – С. 52-56.

223 Сорокина А. А., Молчан Н. В., Рудакова И. П., Самылина И. А. Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье // Фармация. – 2010. – № 3. – С. 3-4.

224 Музычкина Р. А., Корулькин Д. Ю., Абилов Ж. А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. - Алматы: Қазақ университеті, 2004. – 151 с.

225 Liu K. S. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1994. – Vol. 71, № 11. – P. 1179-1187.

226 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard M27-A2 // National Committee on Clinical Laboratory Standards. – 2002. – Vol. 22, № 15. – P. 1-51.

227 Bharate S. B., Khan S. I., Yunus N. A., Chauthe S. K., Jacob M. R., Tekwani B. L., Singh I. P. Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2007. – Vol. 15, № 1. – P. 87-96.

228 Makler M. T., Hinrichs D. J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of Plasmodium falciparum as an assessment of parasitemia // The American journal of tropical medicine and hygiene. – 1993. – Vol. 48, № 2. – P. 205-210.

229 Tarawneh A., León F., Pettaway S., Elokely K. M., Klein M. L., Lambert J., Cutler S. J. Flavonoids from Perovskia atriplicifolia and their in vitro displacement of the respective radioligands for human opioid and cannabinoid receptors //Journal of natural products. – 2015. – Vol. 78, № 6. – P. 1461-1465.

230 Thomas S., Patil D. A., Patil A. G., Chandra N. Pharmacognostic evaluation and physicochemical analysis of Averrhoa carambola L. fruit // Journal of Herbal Medicine and Toxicology – 2008. – Vol. 2, № 2. – P. 51-54.

231 Queralt I., Ovejero M., Carvalho M. L., Marques A. F., Llabres J. M. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques // X-Ray Spectrometry. – 2005. – Vol. 34, № 3. – P. 213-217.

232 Шевченко А.С., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Макро- и микроэлементный состав некоторых казахстанских растений рода Polygonum L. // Вестник КазНУ. Серия биологическая – 2016. – Т. 1, № 66. – С. 42-47

233 Шевченко А.С., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Сравнительный анализ микроэлементов трех видах Polygonum L. по органам растений и фазам вегетации // Мат. VI Международной научно-практической конференции «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям». – Полтава, 2017. – С. 235-236.

234 Государственная фармакопея РФ. XIII издание http://pharmacopoeia.ru/

235 Корулькин Д.Ю., Шевченко А.С., Музычкина Р.А., Урлибай Р.К. Сравнительное фитохимическое исследование некторых казахстанских видов Polygonum // Мат. XI Международной научной конференции "Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане" Фонд Первого Президента Республики Казахстан – Елбасы. – Алматы, 2017. – С. 106-107.

236 Shevchenko A.S., Muzychkina R.A., Korulkin D. Yu. Biologically active the sums of flavonoids obtained from plants of genus Polygonum L. // Materials of World conference of scientists and engineers. – Seoul, 2016. – P. 1-2.

237 Шевченко А.С., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Фитогенетические исследования растений рода Polygonum L., произрастающих на территории Казахстана // Мат. Международной научно-практической конференции «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям». – Полтава, 2016. – С. 282-283.

238 Шевченко А.С., Корулькин Д.Ю., Музычкина Р.А. Исследование некоторых казахстанских растений рода горец (Polygonum L.) // Вестник Национальной инженерной академии РК. – 2017.– Т. 3, № 65. – С. 60-63.

239 Латыпова Г. М., Давлетшина Р. Я., Бубенчикова В. Н., Романова, З. Р. Технология густого экстракта из травы первоцвета весеннего // Научные

ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – Т. 15, № 16 (111) – С. 226-231.

240 https://vuzlit.ru/849917/poluchenie_nastoek.

241 Зайцев Н. Л. Экономика промышленного предприятия: учеб. Пособие. – М.: Инфра-М, 2004. – 384 с.

242 Shevchenko A.S., Muzychkina R.A., Korulkin D. Yu. Amino- and Fatty-Acid Compositions of the Kazakhstan Plant Polygonum minus // Chemistry of Natural Compounds. – 2016. – Vol. 4, № 52 – P. 771-772.

243 Mathie K., Lainer J., Spreng S., Dawid C., Andersson D. A., Bevan S., Hofmann T. Structure–pungency relationships and TRP channel activation of drimane sesquiterpenes in Tasmanian Pepper (Tasmannia lanceolata) // Journal of agricultural and food chemistry. – 2017. – Vol. 65, № 28. – P. 5700-5712.

244 Habib M.R., Nikkon F., Rahman M., Haque M.E., Karim M.R. Isolation of Stigmasterol and b-Sitosterol from Methanolic Extract of Root Bark of Calotropis gigantean (Linn) // Pakistan Journal of Biological Sciences – 2007. – Vol. 10. – P. 4174-4176.

245 Mengyun L. I., Yangmin M. A., Qiao K., Guo L. Chemical constituents from Polygonum hydropiper // Chinese Traditional Patent Medicine. – 2017. – Vol. 39, № 4. – P. 769-773.

246 Banthorpe D. V. Polygonum hydropiper L. (Water Pepper): In Vitro Culture and the Production of the Aphid-Antifeedant Polygodial // Medicinal and Aromatic Plants IV. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 1993. – P. 269-279.

247 Sakio Y., Hirano Y. J., Hayashi M., Komiyama K., Ishibashi M. Dendocarbins A− N, New Drimane Sesquiterpenes from the Nudibranch Dendr o doris c arbunculosa // Journal of natural products. – 2001. – Vol. 64, № 6. – P. 726-731.

248 Yang X., Wang B. C., Zhang X., Yang S. P., Li W., Tang Q., Singh G. K. Simultaneous determination of nine flavonoids in Polygonum hydropiper L. samples using nanomagnetic powder three-phase hollow fibre-based liquid-phase microextraction combined with ultrahigh performance liquid chromatography–mass spectrometry // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2011. – Vol. 54, № 2. – P. 311-316.

249 Smolarz H. D. Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of Polygonum L // Acta poloniae pharmaceutica. – 2002. – Vol. 59, № 2. – P. 145-148.

250 Jung M., Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from Agrimonia pilosa // Molecules. – 2007. – Vol. 12, № 9. – P. 2130-2139.

251 Xiao H., Rao Ravu R., Tekwani B. L., Li W., Liu W. B., Jacob M. R., Li X. C. Biological evaluation of phytoconstituents from Polygonum hydropiper // Natural product research. – 2017. – Vol. 31, № 17. – P. 2053-2057.

252 Knothe G., Kenar J. A. Determination of the fatty acid profile by 1H-NMR spectroscopy // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2004. – Vol. 106, № 2. – P. 88-96.

253 Shevchenko A.S., Muzychkina R.A., Ross S.A. Antimicrobial and antimalarial activities of extracts isolated from herbal plant Polygonum hydropiper // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2018. – № 2. – P. 1-7.

254 Al-Hasani R., Bruchas M. R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior //Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists. – 2011. – Vol. 115, № 6. – P. 1363-1381.

255 Wu H., Dushenkov S., Ho C.-T., Sang S. Novel acetylated flavonoid glycosides from the leaves of Allium ursinum // Food Chemistry. – 2009. – Vol. 115, № 2. – P. 592–595.

256 Hungund B. L., Basavarajappa B. S. Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence // Alcohol and Alcoholism. – 2000. – Vol. 35, № 2. – P. 126-133.

257 Aggarwal S., Carter G., Sullivan M. Medicinal use of cannabis in the United States: historical perspectives, current trends, and future directions // Journal of opioid management. – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 153-168.

258 Karst M., Wippermann S. Cannabinoids against pain. Efficacy and strategies to reduce psychoactivity: a clinical perspective // Expert Opin Investig Drugs. – 2009. – Vol. 18, № 2. – P. 125-133.

259 McCarthy L., Wetzel M., Sliker J.K. et al. Opioids, opioid receptors, and the immune response // Drug and Alcohol Dependence. – 2001. – Vol. 62. – P. 111–123.

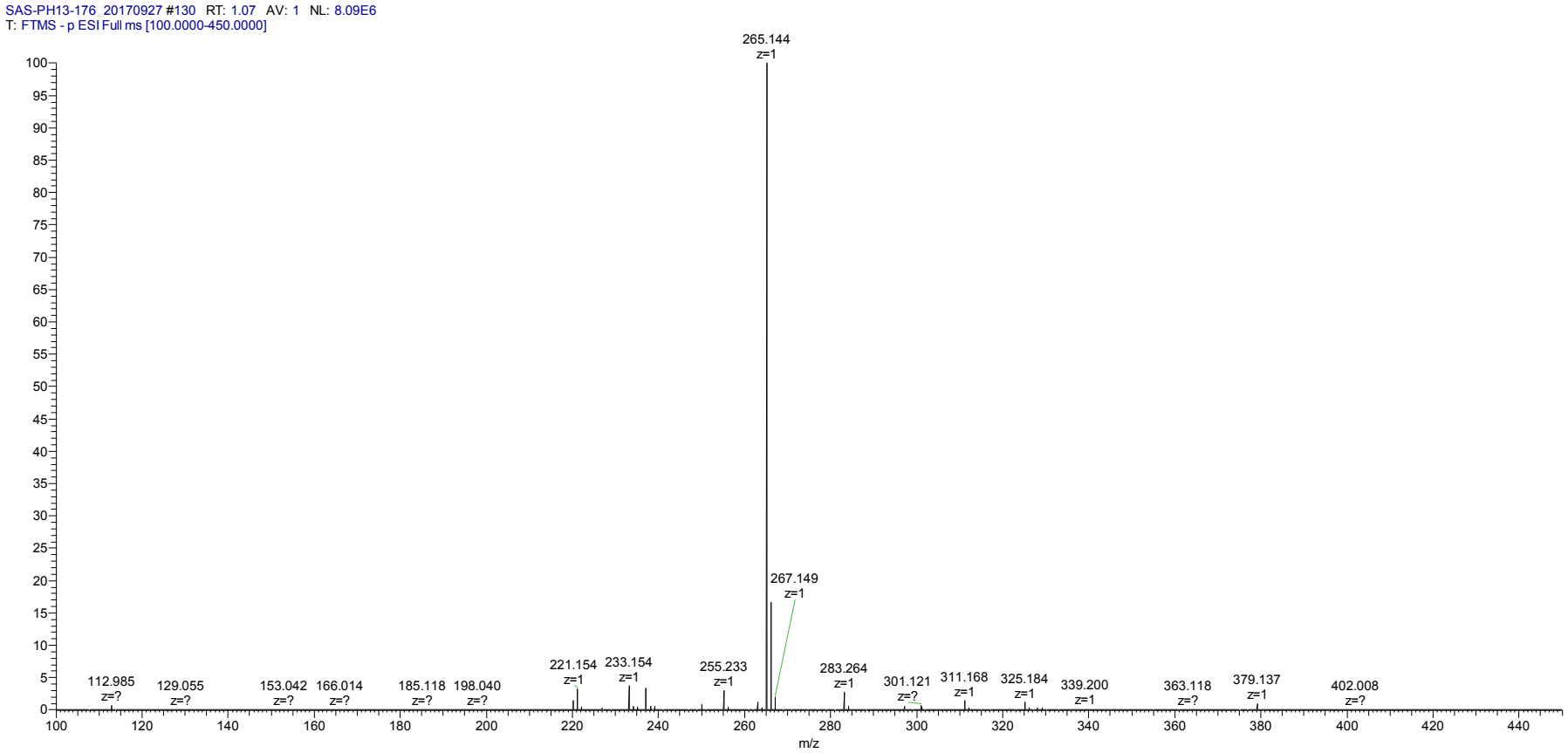
260 Зохиров А.Н., Михайлов К.А., Саргсян Э.Г., Сеин О.Б. Влияние синтетического аналога опиоидных пептидов даларгина на антиоксидантный статус собак // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016. – № 9. – С.165-170.

261 Al-Hasani R., Bruchas M.-R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior // Anesthesiology 12. – 2011. – Vol. 115. – P. 1363-1381.

262 Шимановский Н. Л., Епинетов М. А., Мельников М. Я. Молекулярная и нанофармакология // М.: Физматлит. – 2010. – 625 с.

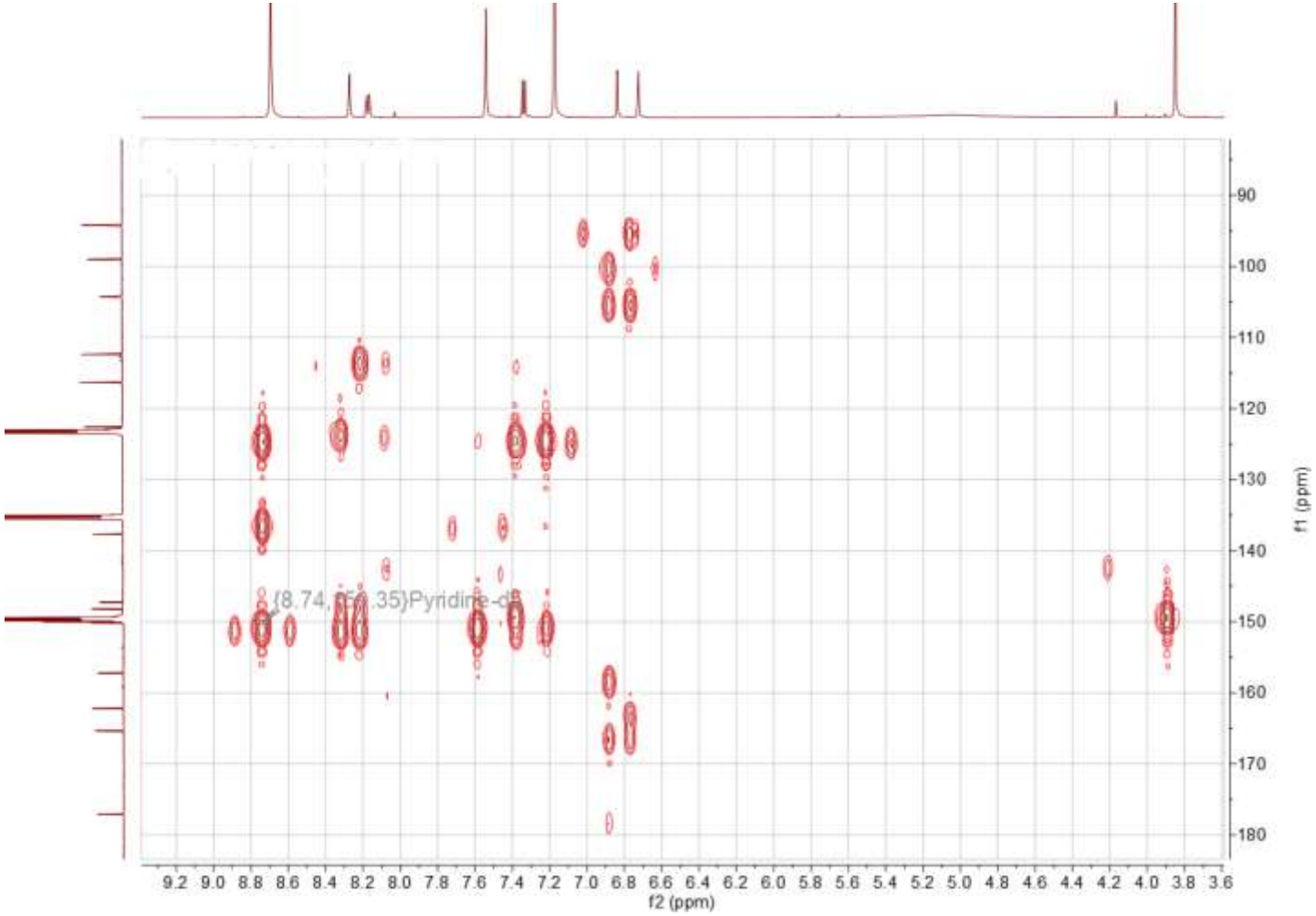
ПРИЛОЖЕНИЕ А

Масс-спектр соединения (1.8)



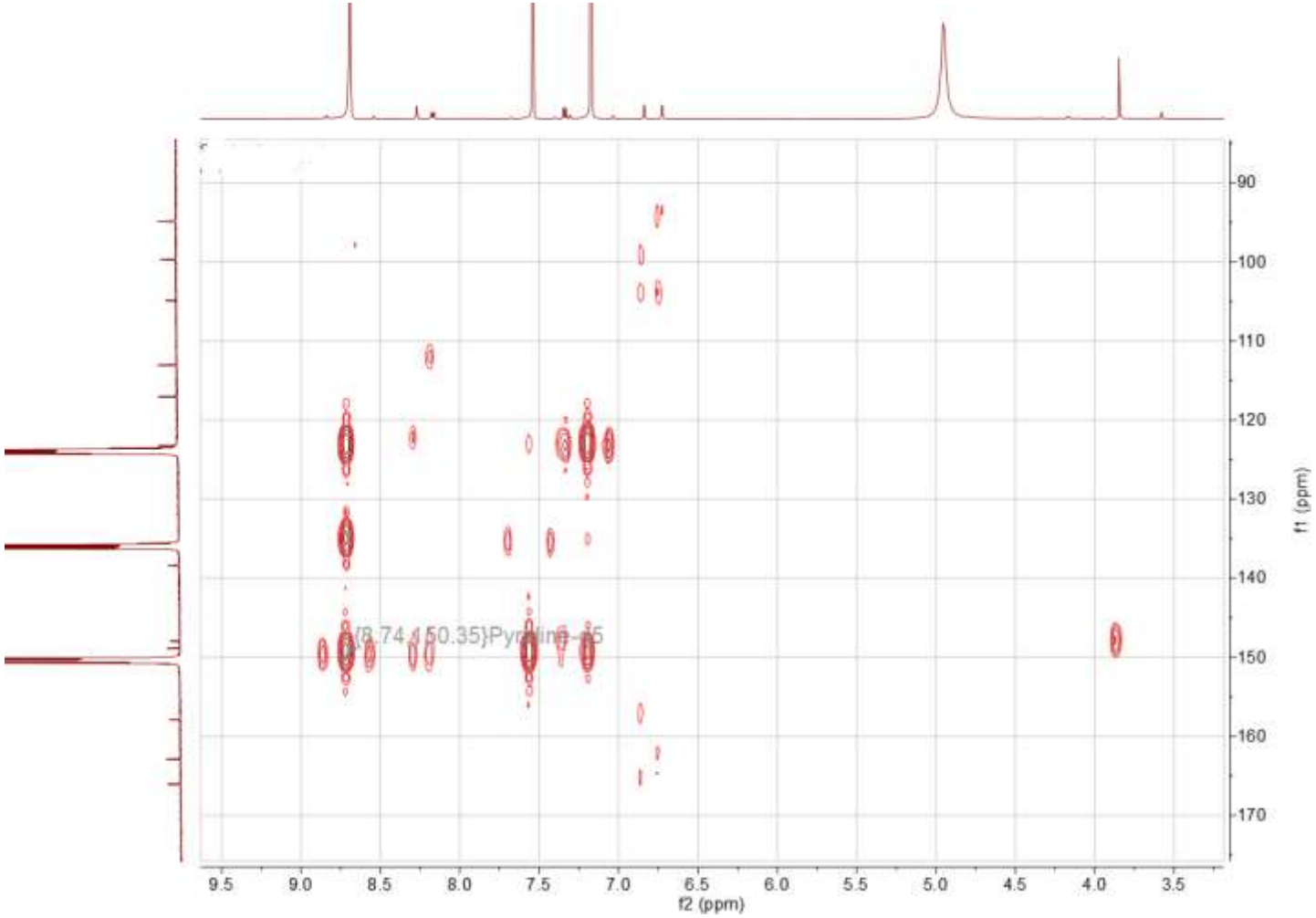
ПРИЛОЖЕНИЕ Б

HMBC-спектр соединения (1.12)



ПРИЛОЖЕНИЕ В

HMBC-спектр соединения (1.13)



ПРИЛОЖЕНИЕ Г

HMBC-спектр соединения (1.14)

