

Министерство здравоохранения Республики Казахстан
Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет
Караганды»

Солянов Д.

«Разработка технологии получения биологически активных веществ из
Tanacetum Vulgare методом ультразвуковой экстракции»

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА
специальность 6В07201 – «Технология фармацевтического производства»

Караганда 2021

Министерство образования и науки Республики Казахстан
Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет
Караганды»

«Допущен (а) к защите»
Зав. кафедрой _____

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

**На тему: «Разработка технологии получения биологически активных
веществ из *Tanacetum Vulgare* методом ультразвуковой экстракции»**

»

специальность 6В07201 – «Технология фармацевтического производства»

Выполнил:

Солянов Д.

Научный руководитель:

к. х. н., ассоциированный профессор

Бурдельная Е.В.

Караганда 2021

Содержание

Нормативные ссылки
Обозначения и сокращения
Введение

Заключение
Список использованной литературы

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие документы:

- Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 г. № 407-IVЗРК;
- ГОСО РК 5.04.034-2011: Государственный общеобязательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. № 1080);
- Правила присуждения ученых степеней от 31 марта 2011 года № 127;
- Межгосударственные стандарты: ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;
- ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.
- ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
- ГОСТ 8.417-81. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2008. -592 с;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2009. – 804 с.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 3. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2014. – 872 с.
- ОСТ 91500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения;
- СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. 115

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей дипломной работе применяются следующие термины с соответствующими определениями и сокращениями:

ВОЗ–Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ –высокоэффективная жидкостная хроматография

г -грамм

ГФ РК –Государственная Фармакопея Республики Казахстан

ГХ –газовая хроматография

д. -дублет

К-коэффициенту распределения

к. -квартет

кв. -квинтет

кг –килограмм

ЛР –лабораторный регламент

ЛС -лекарственное средство

м. -мультиплет

МГц -мегагерц

м.д. –миллионная доля

мкл –микролитр

мкм -микрометр (μм)

мл –миллилитр

Мг–молекулярная масса

нм -нанометр

об -оборот

о.с.ч. –особо чистый

ОФС –общая фармакопейная статья

РСА –рентгеноструктурный анализ

с. -синглет

см -сантиметр

СО –стандартный образец

т. -триплет

ТП –технологический процесс

УЗЭ – ультразвуковая экстракция

УФ–спектр –ультрафиолетовый спектр

Установка HPLC–установка ВЭЖХ

ФСО –фармакопейный стандартный образец

х.ч. –химически чистый

Введение

Актуальность темы

На сегодняшний день для лечения многих хронических заболеваний широко используются препараты на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС). Данные препараты, как правило, сочетают в себе высокую эффективность, относительную безопасность и широту терапевтического действия. Это стало возможным благодаря разработке более совершенных технологий выделения суммарных экстрактов, действующих веществ и методов стандартизации лекарственного сырья, субстанций и фитопрепаратов. Тем не менее многие лекарственные растения (ЛР) остаются недостаточно изученными в плане химического состава, фармакологических свойств и мягких условий для экстракции биологически активных веществ. В полной мере это относится и к цветкам пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.)

Целительные свойства пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) известны с древних времен и на протяжении многих веков используются в народной медицине для лечения органов пищеварительной системы, для нормализации аппетита и уничтожения паразитов. Благодаря высокому содержанию витаминов, а особенно витамина С трава способна укрепить иммунитет и замедлить процессы старения. Кроме всего прочего, пижма оказывает положительное влияние на нервную систему. Она помогает бороться со стрессами, снижает чувство тревожности, применяется при депрессиях.

Цветы пижмы обыкновенной включены в Государственные Фармакопеи Казахстана, Российской Федерации, Украины, а также в фармакопеи Бельгии, Финляндии, а также Португалии, в официальной медицине применяется как лекарственное растительное сырье, желчегонного, глистогонного, кровоостанавливающего и антисептического действия, используется в виде отваров и настоев, часто состоит в сборах, разного назначения.

Современная наука уделяет большое внимание изучению химического состава пижмы обыкновенной, благодаря фармакологическим свойствам данного растения, а также возможности получения экстрактов пижмы обыкновенной экологически безопасными способами.

Доступность сырьевой базы пижмы обыкновенной на территории Республики Казахстан, а также высокая биологическая активность веществ, выделенных из пижмы делает данное сырье перспективным для дальнейшего исследования, и разработки новых ресурсонеобремененных, экономичных и экологичных технологий получения БАВ из пижмы обыкновенной, что делает нашу работу в данном направлении актуальной.

Цель работы и основные задачи исследования.

Целью настоящей работы является разработка технологии ультразвуковой экстракции листьев и цветков пижмы обыкновенной, собранной на территории Акмолинской области Республики Казахстан.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Разработать новый способ технологии получения суммы экстрактивных веществ из пижмы обыкновенной, произрастающей на территории Центрального Казахстана с применением ультразвуковой экстракции.
- Исследовать химический состав терпеновых и полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов листьев и цветков пижмы обыкновенной с применением современных инструментальных методов.
- Создание технологической схемы получения ультразвуковых экстрактов в лабораторных условиях

Новизна и теоретическая значимость работы.

- Разработан новый способ получения суммы экстрактивных веществ из травы и цветков пижмы обыкновенной с применением ультразвуковой экстракции;
- впервые исследован химический состав терпеновых и полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов травы и цветков пижмы обыкновенной методом ГЭЖХ и ВЭЖХ-УФ, всего идентифицировано и количественно определено фенольных соединений, из которых фенольные кислоты, –флавоноиды.
- разработана эффективная технология получения ультразвукового экстракта пижмы обыкновенной;

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биологическое описание и фармакологические свойства пижмы обыкновенной (*Tanacetum Vulgare L*)

Пижма обыкновенная - это многолетнее травянистое растение, высотой 50-100 см., распространена в природе очень широко. Этот вид пижмы можно встретить на территории России и в Казахстане, в ряде европейских стран, Монголии, Киргизии, Китае и Японии. Также пижма произрастает в некоторых частях Северной Америки [1].



Рисунок.1 Пижма обыкновенная

Лесная и лесостепная зоны являются наиболее благоприятными для роста этого растения. Пижма хорошо приживается в полях, степных лугах, березовых лесах, вдоль дорог и поймах рек. Довольно агрессивна в отношении культурных растений, засоряет насаждения многолетних трав и огородных посадок.

Соцветия щитковидные, цветки трубчатые, цвета золотиста-жёлтого (рисунок.1). Растительное сырьё пижмы, как и само растение, обладает сильным, выделяющимся запахом, который сохраняется даже при длительном хранении растения. Заготовка сырья происходит при цветении: оно начинается в июле и заканчивается в сентябре. Интерес представляют щитки с цветоносами, которые срезают, а затем, перед сушкой, удаляют цветные корзинки. Растение не рекомендуется пересушивать или хранить при высокой температуре – это грозит улетучиванием эфирного масла из пижмы. Цветки измельчают до состояния порошка. Порошок представляет собой смесь кусочков трубчатых цветков, листочков обертки, цветоносов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм (Рис.2). Цвет порошка желтовато-зеленый с желтыми, зелеными, коричневато-зелеными, желтовато-серыми вкраплениями, редко встречаются вкрапления темно-коричневого и зеленовато-фиолетового цвета. Запах своеобразный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый. [2]

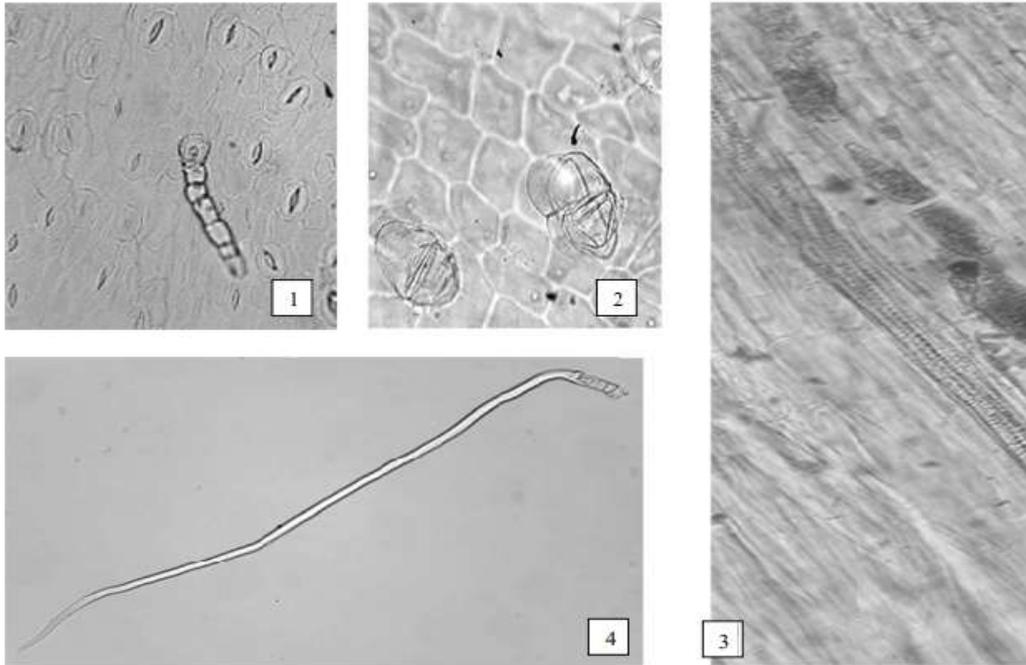


Рисунок 2 1 – фрагмент эпидермиса листочка обертки: а – устьица аномоцитного типа, (200×); 2 – эфирномасляные железки (400×); 3 – секреторный ход с маслянистым содержимым вдоль центральной жилки (200×); 4 – фрагмент бичевидного волоска (200×)

Целительные свойства пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) известны с древних времен и на протяжении многих веков используются в народной медицине для лечения органов пищеварительной системы, для нормализации аппетита и уничтожения паразитов. Благодаря высокому содержанию витаминов, а особенно витамина С трава способна укрепить иммунитет и замедлить процессы старения. Кроме всего прочего, пижма оказывает положительное влияние на нервную систему. Она помогает бороться со стрессами, снижает чувство тревожности, применяется при депрессиях [10].

Наружно применяется в виде полосканий, ванн, компрессов, примочек как обезболивающее и ранозаживляющее средство при ранах, язвах, гангрене, болезнях горла, жирной себорее, зудящих дерматитах, судорогах ног, вывихах, ушибах, артритах, ревматизме, подагре, болях в суставах [11]. Описано применение отвара цветочных корзинок при раке кожи [12].

Применение в народной медицине разнится в зависимости от региона. В Украине растение применяют как навар из цветков при несварении желудка, а также как глистогонное и инсектицидное, потогонное средство. В болгарской народной медицине её используют в качестве успокоительного в виде чая, измельчённое в кашу растение втирают в виски от головной боли, а также применяют как abortивные средства, хотя известно, что в крупных дозировках она ядовита [13]. Монгольская народная медицина взяла в оборот другое интересное свойство пижмы – кровоостанавливающее. Монголы используют растёртые в порошок растения при лечении ран [14]. Марокканская народная медицина использует *Tanacetum Vulgare* при высоком давлении [15].

Сырье пижмы обыкновенной и препараты на ее основе, используется в современной медицине. Цветки обладают желчегонным [47, 48, 50,], спазмолитическим (снижают частоту и амплитуду маятникообразных сокращений кишечника) действием, противовоспалительными свойствами [51], проявляет противомикробную, противовирусную, противопротозойную, антигельминтную активность [47,48]. Препараты соцветий пижмы обыкновенной оказывают тонизирующее воздействие на холино- и адренореактивные структуры организма [4,9].

Цветы пижмы обыкновенной включены в Государственные Фармакопеи Казахстана, Российской Федерации [2], Беларуси [15], а также в фармакопеи Бельгии, Финляндии, а также Португалии [4].

В патентах [6] указано применение Пижмы, как желчегонного и антигельминтного средства. Помимо главных своих свойств, препараты на основе пижмы обладают асептическим свойством, а глистогонный эффект Пижмы (одно из альтернативных народных названий растений – глистник) могут объединять с другими подобными растениями для усиления эффекта лекарственного средства. Авторы [6] нам показывают эффективность сбора из полыни, пижмы и гвоздики, где молотое природное сырье первых двух растений уничтожает взрослых паразитов, а гвоздика уничтожает яйца гельминтов.

При клинических испытаниях оказывает положительное действие при лечении язвы желудка и 12-перстной кишки, диареи и энтероколитов, холецистита и гепатита. Экстракт в эксперименте на кошках оказывает гипотензивное и коронарорасширяющее действие, усиливает амплитуду сердечных сокращений, замедляет ритм сердца [4,7,8,9]

Соцветия пижмы используют в виде водного извлечения как желчегонное и противоглистное лекарственное средство (при аскаридозе и острицах) [4,7,8], а также проявляет антиоксидантную, желчегонную и гепатопротекторную активность [51]. Сырье входит также в состав препаратов «Танацехол», «Беллацехол», «Сибектан», желчегонного сбора № 3, применяемых при различных заболеваниях печени и желчевыводящих путей [4, 48], разрешено к использованию в гомеопатии [36]

1.2 Биологически активные вещества пижмы обыкновенной (*Tanacetum Vulgare* L.).

Основные лечебные свойства пижмы Обыкновенной связаны с содержанием эфирных масел, которые находятся, как в цветках, так и во всех частях растения. Однако основное количество полезных для медицины веществ содержится именно там. Основное действие растение можно описать, как глистогонное, желчегонное, кровоостанавливающее, антисептическое, что вызвано высоким содержанием терпенов и их производными такими как: камфен, кариофиллен, борнеол, цинеол, сабинен [49,50] Химический состав может разительно отличаться в зависимости от выбора части растительного сырья: цветки или стебли. Примерное содержание эфирного масла в соцветиях

до 2%. Эфирное масло Пижмы придаёт растению сильный пряный горький запах, который даёт растению кариофиллен. Высокое содержания туйона в траве Пижмы обыкновенной может вызвать отравление, что делает сырье пижмы не интересным для животноводства. Согласно источнику [2] в данном лекарственном сырье установлено высокое содержание флавоноидов в цветах (не менее 2,5%), дубильных веществ (таннины) в количестве до 6%, горечей около 4%.

Биологически активное вещество	Содержание, %
Эфирное масло	До 2%
Терпены	До 2%
Флавоноиды	Не менее 2,5%
Дубильные вещества	До 6%
Алкалоиды (пирролизидиновые)	2,5%
Горечи	До 4%

1.2.1 Терпены *Tanacetum Vulgare* L. Их методы определения, строение и свойства.

Терпены – это группа обычно ненасыщенных углеводородов, высоко распространённых в природе, а, по большей части, в растениях. Монотерпены и сесквитерпены широко известны за свои пахучие свойства. Именно они наделяют запахом цветы, хвойные и многие другие растения.

Основная структура терпенов – это связанные меж собой изопреновые цепи. От количества звеньев изопрена зависит группа терпена (Рис.4). Существуют монотерпены, сесквитерпены и дитерпены. Терпены с количеством больше 2 образуют смолы или каучук и являются соответственно тритерпенами, тетратерпенами и политерпенами. Если вещество является производным терпена, например, кислородные производные, то мы назовём его терпеноидом [24].

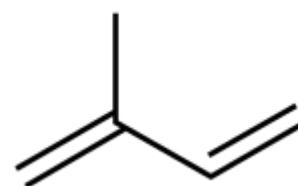
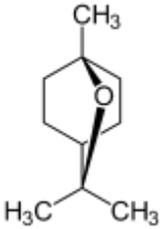
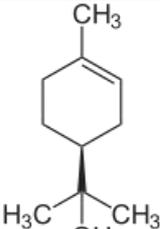
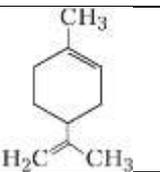
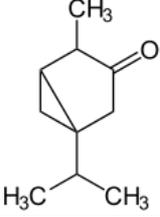
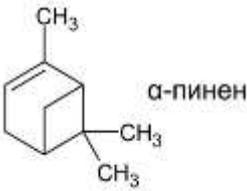
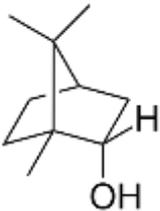


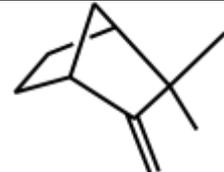
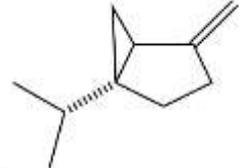
Рисунок. 4 Скелет терпена

Извлечение терпенов не представит большого труда опытному исследователю. Да и новичок легко извлечёт терпены из природного сырья, так вещества эти крайне реакционноспособны. Терпены легко окисляются на воздухе, при повышении температуры изомерируются, при той же процедуре, но без доступа к воздуху вовсе могут раскрыть свои кольца, а двойные связи в их структуре позволяют легко их гидрировать. Так что извлечь терпен из растения вы можете путём водяной перегонки, экстракцией с использованием летучих растворителей, например гексана, или же анфлеражем.

Для извлечения конкретных соединений исследователями может использоваться ТСХ, хроматография, вымораживание или же фракционная перегонка в вакууме.

Камфен и его производные влияет на свёртывание крови. Антикоагуляционные свойства обусловлены способностью терпенов стабилизировать клеточные мембраны за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий с их фосфолипидами. Сесквитерпеновые лактоны, которые можно найти в цветках пижмы, обладают цитологическими свойствами при взаимодействии с раковыми клетками легких. Лактон Партенолид известен за противовирусные свойства, из-за чего есть теории о применении экстракта пижмы для лечения герпеса [16]. Лекарственные средства на основе Пижмы имеют ярко выраженное токсическое действие из-за туйона, поэтому пижма не вызывает отравление у животных при поедании в большом количестве [13] Лекарственные средства на основе пижмы не рекомендуется применять при беременности, т.к. эфирное масло, содержащееся в ней, повышает тонус миометрия и может вызывать аллергические реакции [47,48].

1,8-цинеол	C ₁₀ H ₁₈ O	
α-терпинеол	C ₁₀ H ₁₈ O	
Лимонен	C ₁₀ H ₁₆	
Туйон	C ₁₀ H ₁₆ O	
Пинен	C ₁₀ H ₁₆	
Борнеол	C ₁₀ H ₁₈ O	

Камфен	C ₁₀ H ₁₆	
Сабинен	C ₁₀ H ₁₆	

1.2.2 Флавоноиды. Методы определения, строение и свойства.

Флавоноиды – это полифенольные соединения. Они широко известны за свои противовирусные, противовоспалительные свойства [21].

Флавоноиды являются вторичными метаболитами и встречаются почти во всех частях растения, но больше всего их содержание обычно можно обнаружить в листьях и стеблях или во внешних оболочках растений (кожура у плодов, так как их роль и функции в растениях защитные). Флавоноиды представляют собой один из трёх наиболее встречающихся пигментов растений наряду с хлорофиллом и каротиноидами. [22]

Структура скелета многих флавоноидов идентична в своей основе, состоит из двух ароматических колец, что связаны меж собой трёхуглеродной структурой, что в науке называется “флавоновым ядром” (Рис.3). Углевод, образующий связь между кольцами, может представлять собой несколько соединений: L-рамнозу, D-глюкозу, глюкорамнозу, галактозу. Если флавоноидных групп несколько, то скелетная структура может образовывать оксигенированные гетероциклы.

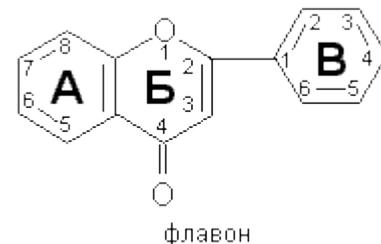


Рисунок.3 Флавоновое ядро

Флавоноиды в чистом виде — это кристаллические соединения с определенной температурой плавления, которые приобретают светло-желтую, желтую или желтовато-зеленую (флавоны, флавонолы), оранжевую или оранжево-красную (ауроны), красную или синюю окраску (антоцианы).

Порой, весьма часто можно встретить и бесцветные разновидности флавоноидов — изофлавоны, катехины, флаваноны, флаванололы.

Агликоны флавоноидов обычно растворяются в этиловом эфире, ацетоне, спиртах и практически нерастворимы в воде. Однако большинство метоксилированных флавоноидов (например, пиностробин) растворяются в хлороформе.

Гликозиды флавоноидов, что содержат в своей молекуле 1-2 сахара (монозиды, иозиды, дигликозиды) хорошо растворимы в этиловом и метиловом спиртах, водных спиртах (в особенности хорошо в 70% этиловом спирте), n-бутаноле, гораздо слабее — в ацетоне, этилацетате, но не растворяются в

хлороформе и диэтиловом эфире. Гликозиды флавоноидов, что содержат в молекуле уже 3 моносахаридных остатка и более, хорошо растворяются в воде, хуже — в водных спиртах, но не растворяются в крепких спиртах, в хлороформе и диэтиловом эфире. У агликонов и гликозидов флавоноидов отсутствует запах, но некоторые из них обладают горьким вкусом. Вкус горьких веществ обусловлен строением углеводного компонента неогесперидозы.

Что касается методик определения флавоноидов, то выбор весьма обширен. Исследователю будет доступна хроматография, ТСХ, масс-спектрометрия, УФ спектрометрия, вакуумная хроматография, ВЭЖХ и т. д. Прикладным аналитическим методом является ВЭЖХ, его часто сочетают с другими методиками, например, с УФ- или масс-спектрометрией. Однако, несмотря на общую распространённость вышеперечисленного, электрофорез и ТСХ также применяют для определения флавоноидов. [29]

Растительный материал для выделения флавоноидов экстрагируют этиловым, метиловым спиртом или водными спиртами. Самым оптимальным экстрагентом считается (по мнению автора статьи) 70% этиловый спирт).

Спиртовое или водно-спиртовое извлечённый экстракт упаривают, после чего к остатку обычно добавляют горячую воду, что после охлаждения позволит удалить неполярные соединения (хлорофилл, каротиноиды, эфирное масло, смолы, жиры, стеринны и другие липофильные вещества) из водной фазы при использовании хлороформа или четыреххлористого углерода. Флавоноиды из водной фазы можно извлечь, используя последовательно последовательно этиловым эфиром (агликоны), этилацетатом (в основном монозиды), н-бутанолом (биозиды, дигликозиды). При этом в водной фазе остаются более полярные флавоноиды (триозиды) и другие гидрофильные вещества.

Выбор методики извлечения зависит от того, хотим ли мы получить целевое соединение и сохранить свойства этого соединения, или получить суммарный экстракт. Биодоступность флавоноидов определяется следующими свойствами: химическая структура, полярность, кислотную природу, растворители. рН комбинация выбранного растворителя и флавоноида может повлиять на эффективность, как растворителя, так и выбранной методики.

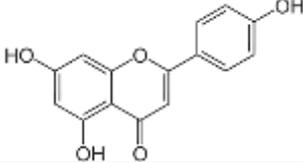
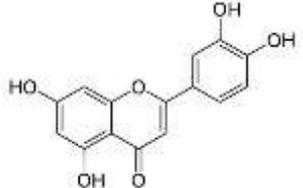
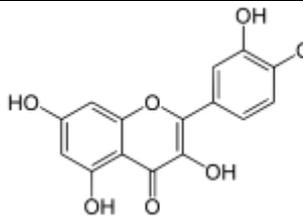
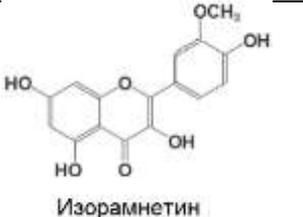
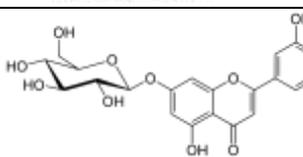
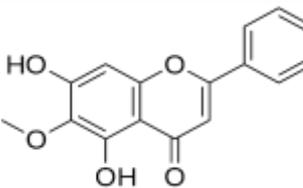
Фенильные кольца, из которых состоят флавоноиды, легко обнаруживаются в УФ-спектре из-за своей УФ-активности. Эти же спектры снабжают нас достаточным количеством информации, чтобы узнать о структурной информации соединения, что делает УФ- спектрометрию наиболее выбираемым методом, если нам необходимо количественно определить мономерные антоцианы. Их спектры поглощения при обратимых структурных изменениях с повышением или понижением уровня рН заметно разнятся, что и является причиной столь частого выбора. Высокоэффективная жидкостная хроматография была специально разработана для *in vivo* определения и анализа.

Установлено, что в цветках пижмы обыкновенной содержится комплекс флавоноидов: лютеолин, апигенин, акацетин, кверцетин, изорамнетин, цинарозид, эупатилин, яцеидин, тилианин, яцеозидин, скутелларин, космосин [50,4,7,8,9]

Одним из интересных экземпляров является флавоноид лютеолин (Л.) тетрагидроксифлавонон, который, согласно исследованиям, улучшает симбиотическое взаимодействие между бактериями *Rhizobium meliloti* и бобовыми растениями для создания на корне клубеньков. Лютеолин в народной медицине используется в качестве антимикробного средства, а многочисленные исследования раскрывают его антибактериальную, противовирусную и противогрибковую активность. [34]

Апигенин ингибирует рост клеток рака молочной железы. Данный флавоноид в высоких дозах (50 мкМ) ингибирует активность рецепторов эстрогенов, индуцированную 17β -эстрадиолом без проявления эстрогеноподобной активности. [33]

Кверцетин обладает не только антиоксидантными свойствами и гипополипидемические препараты, но также антидиабетическую, помогает при ожирении, ожогах. [35]

Апигенин	C₁₅H₁₀O₅	
Лютеолин	C₁₅H₁₀O₆	
Кверцетин	C₁₅H₁₀O₇	
Изорамнетин	C₁₆H₁₂O₇	 Изорамнетин
Цинарозид	C₂₁H₂₀O₁₁	
Эупатилин	C₁₈H₁₆O₇	

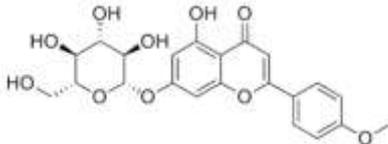
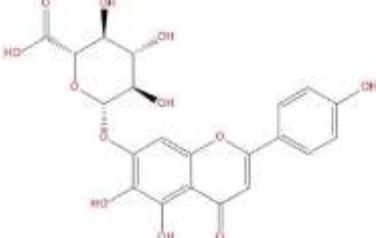
Тилианин	C₂₂H₂₂O₁₀	
Скутелларин	C₂₁H₁₈O₁₂	

Таблица-

1.3 Способы получения биологически активных веществ из растительного сырья

Масляная экстракция

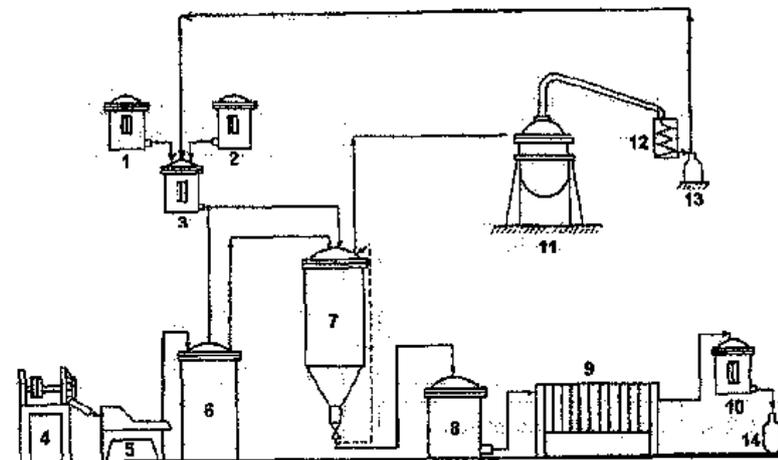
Масляная экстракция одна из простейших видов экстракций, где метод заключается в нагревании масла до 70 градусов, а затем пропускании экстрагента через сырьё. Хотя способ и довольно примитивен, он обладает и большим количеством недостатков. Масло, нагретое до высоких температур, разрушает целый ряд биоконпонентов в растительном сырье. Метод не позволит нам извлечь полярные соединения внутри растения. Однако методика может стать сложнее и интереснее: перед экстракцией маслом сырьё измельчают до частиц не более 10 мм, чтобы затем замочить их в этиловом спирте в соотношении сырья к экстрагенту 1:0.1-1 и настаивают таким образом от 1 часа до 3. Затем природное сырьё можно экстрагировать маслом в соотношении 1:5-14, однако экстракция может повторяться до 250 раз. Таким образом изначально простая методика позволит нам получать экстракты средней полярности с богатым спектром биологически активных компонентов ценой больших время затрат. Малое количество спирта гарантирует его летучесть, что не даёт экстракту эмульгироваться и он легко отделяется от сырья. Одновременная же двухфазная масляная экстракция с использованием одновременно масла и спирта грозит нам как малым процентом извлечения малополярных соединений, так и, в конце концов, получением той самой неразделяемой эмульсии, образование которой мы пытались избежать в комплексном методе.

Перколяция

Основная мысль метода перколяции – пропускание через сырьё потока экстрагента с некоторой скоростью. Состоит он из трёх основных частей, идущих последовательно: намачивание, настаивание и сама перколяция.

Количество экстрагента может быть, как половинным, так и равным, на протяжении долгого времени (4-5 часов). После намачивания сырьё набухает – значительное облегчение проникновения экстрагента внутрь клетки.

Аппаратурная схема производства настоек методом перколяции



Обозначения в схеме: 1, 2, 10 – мерник; 3 – реактор-смеситель; 4 – измельчитель; 5 – сито-трясунок; 6 – мацерационный бак; 7 – перколятор; 8 – отстойник; 9 – пресс-фильтр; 11 – вакуум-выпарной аппарат; 12 – поверхностный конденсатор; 13, 14 – сборник;

Рисунок.- 7 Схема перколяции

Само намачивание производится вне реактора-перколятора, набухшее сырьё помещают в перколятор и, добавив экстрагент, начинают этап настаивания. Этот этап может длиться уже 24-28 часов. Только после него начинается перколяция, которую проводят вплоть до полного истощения сырья или для получения нужного объёма. (Рис. 7) [27]

Мацерация

Метод мацерации один из самых старых и традиционных методик. Растительное сырьё настаивают с экстрагентом в мацерационном баке-реакторе на протяжении 7 суток с периодическим перемешиванием. Основной механика данной методики - молекулярная диффузия. В виду этого данный способ крайне устаревший, малоэффективный и применяется редко.

Микроволновая экстракция

Микроволновая экстракция – это одна из самых передовых методик, развитие которой продолжается последние 40 лет. Этот метод с каждым годом всё популярнее для количественного определения и извлечения из природного сырья флавоноидов. Основные преимущества микроволновой экстракции — это значительное сокращение времени экстракции и расхода растворителя, и увеличение процента выхода целевого продукта. Данный метод экстракции признан эффективнее традиционных методик экстракции. Если рассматривать данный способ с экономической стороны, то он, в целом, лучше или сопоставим с несколькими передовыми методами извлечения, но в то же время его

относительно легко применять для извлечения компонентов из природного сырья, обладающих разными физико-химическими характеристиками.

Микроволны являются неионизирующими электромагнитными волнами с частотным диапазоном между 300 МГц и 300 ГГц. Микроволновые частоты 915 и 2450 МГц - две самые выбираемые и используемые частоты для нагрева растительного сырья. Эти частоты буквально разрывают клетки, содержащие нужные нам вещества, который затем смешиваются с растворителем. Самая используемая частота в химической промышленности – 915 МГц. Однако, 2450 МГц нашла своё место, как частота для применения в бытовой технике, например, микроволновых печах и для аналитических целей. Микроволновые системы обычно состоят из трех основных частей: микроволновый источник (магнетрон), линии передачи и волновод. (Рис.5) [26]



Рисунок. 5 Микроволновой экстрактор

Ультразвуковая экстракция

Ультразвуковая экстракция (УЗЭ) – одна из передовых методик, где основной механизм – механическое воздействие на стенки растения ультразвуком для извлечения из него активных биоконпонентов.

Ультразвук относится к механическим звуковым волнам, чья частота варьируется от 20 кГц до 10 МГц. Исследователи обычно используют меньший диапазон (16 кГц-100 кГц), так более высокие частоты часто приводят к большому выделению энергии, что, в свою очередь, способствует выделению активных компонентов в растении.

В акустическом поле, наряду со снятием диффузионных ограничений, большое значение для интенсификации процесса экстракции имеет также увеличение межфазной удельной поверхности реагирующих компонентов. Диспергирование при этом идет как за счет разрушения частичек твердой фазы, так и за счет поверхностного трения между твердыми и жидкими фазами. Использование ультразвуковых волн для экстракции биологического сырья обеспечивает сочетание механического воздействия (размол, разрыв клеток при ультразвуковой обработке) с турбулизацией среды [47].

Данная методика невозможна без наличия жидкой среды, через которую ультразвук будет проникать в клетки растения (звук гораздо лучше распространяется через жидкости, нежели через воздух). Она позволяет экстрагировать необходимый нам материал без нарушения целостности молекул, неважно термолабильны ли они, термостабильны, водорастворимые или жирорастворимые. Не нарушаемая смесь извлечённых биоконпонентов в течение минут, а не часов, как при традиционных методиках. (Рис.6)

Один из частых способ улучшения методики – это предварительное измельчение природного сырья с использованием обыкновенной мельницы с последующим предварительным смешиванием с растворителем. Таким образом растворитель заранее проникает в растительное сырье, впитывается в него и увеличивает его объём, что затем сильно упрощает попадание ультразвука в

клетки растения. Если для мягких частей растений данная операция эффективна, но необязательно, то при экстракции веществ из жёстких частей растений (например, коры) – это необходимый шаг для экстракции. [27]

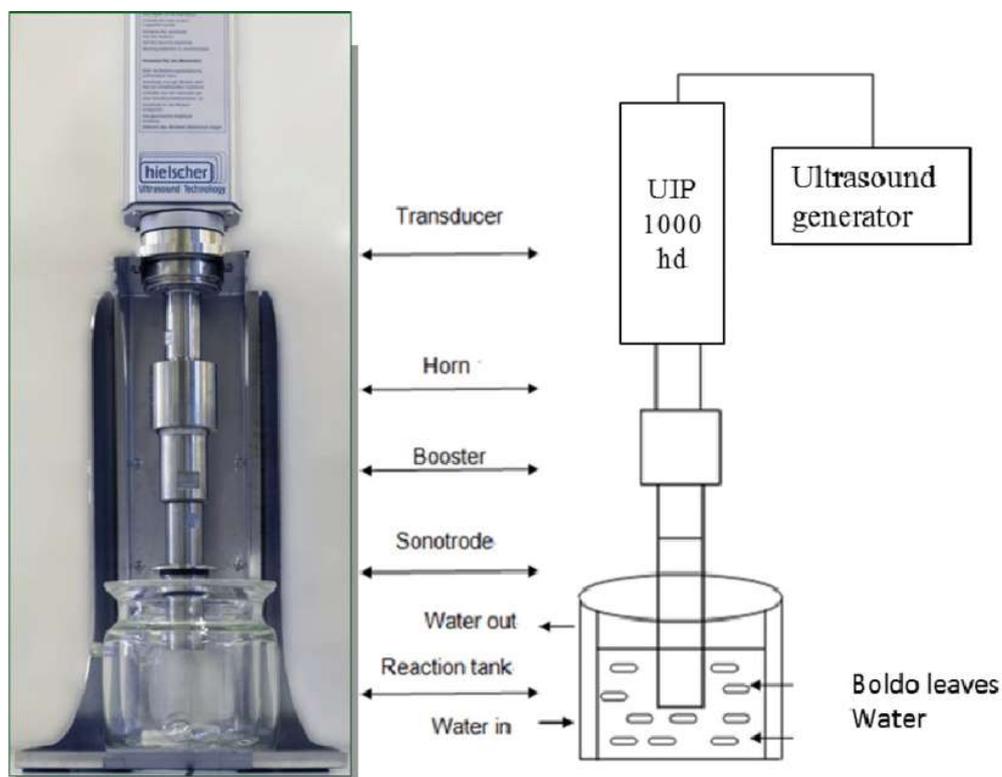


Рисунок. 6 Конструкция ультразвукового экстрактора

Сверхкритическая флюидная экстракция

Один из современных и эффективных методов экстракции. Она используется в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности для экстракции и дальнейшей обработки активных элементов из синтетического или природного сырья. Методика эффективная, как на лабораторном, так и на промышленном уровне. Основными преимуществами можно назвать более высокую производительность по сравнению с традиционными жидкостными экстракциями, возможность настройки растворяющей способности за счёт эффектов сверхкритического растворителя, а также довольно крупного разброса выбора давления и температуры процесса. Нельзя забывать и о том, что при помощи введения дополнительных веществ мы можем сильно увеличить селективность и эффективность извлечения целевых продуктов.

Как только в экстрагенте растворяются компоненты, раствор отправляется в ту часть установки, что называют сепаратором (Рис. 8), где производим сброс давления. По этой причине произойдёт раздел фракции: тяжёлые фракции утратят растворимость, лёгкие её сохранят. Эти же тяжёлые фракции останутся в первом сепараторе, а остальная часть сверхкритического раствора экстракта перейдёт в следующий сепаратор, где мы снова сбрасываем давление, но на этот раз ещё ниже. Этот ступенчатый сброс может помочь нам

проводить фракционирование в системе. Подобный подход к онлайн-фракционированию невозможно при использовании жидких экстрактов. [28]

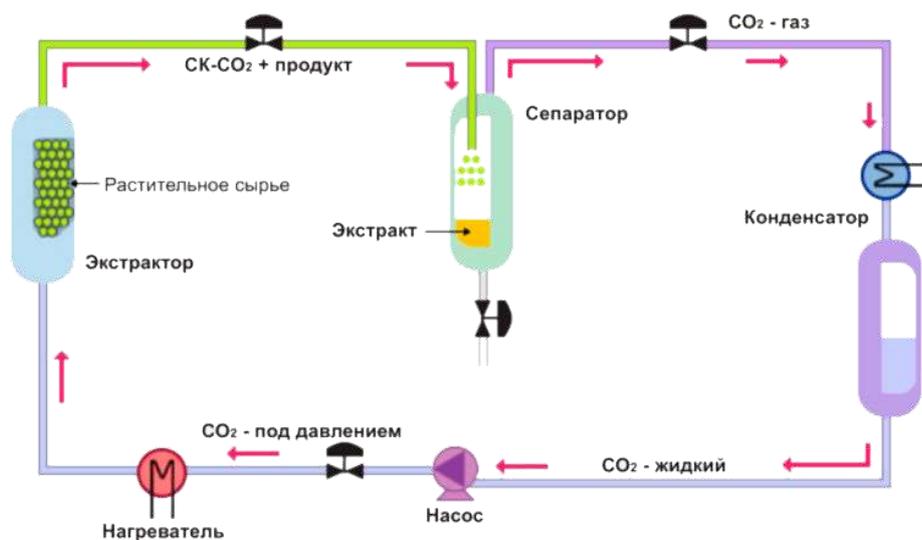


Рис. 8. Схема СФЭ

Виброкавитационная экстракция

Данная технология также обеспечивает многоступенчатую обработку растительного материала. Сначала мы проводим предварительное смешивание, затем диспергирование и гомогенизация до не превышающих 5 мкм частиц. Данные компоненты мы подаем в смеситель для первичной обработки. В многоступенчатом гомогенизаторе, что имеет коаксиальные части: статор и ротор, где экстрагируемый раствор подвергается одновременно диспергированию и гомогенизации. На выходе из аппарата нас ждёт сепаратор, который отгонит крупные фракции на дополнительную обработку. Данный тип экстракции позволяет получать хороший выход продукта в течение короткого времени, однако один из крупных минусов – весьма специфичное оборудование.

В литературе [45] приводится сравнительная экстракция *Tanacetum Vulgare* L. с использованием гидродистилляции и по технологии Headspace (диоксид углерода) в которой замечено, что благодаря CO₂-экстракция идет с более большим выходом терпеновых соединений до 57,4%.

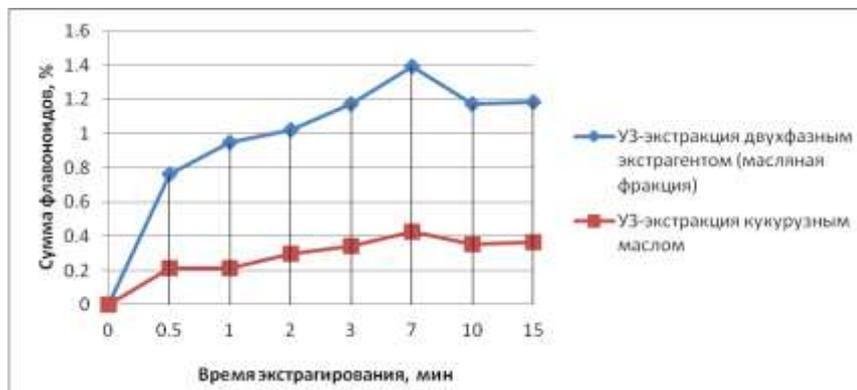
Авторы Guy J. Collin, Ifélène Deslauriers, Nathalie Pageau and Michel Gtrgnon в своем исследовании провели экстракцию разными способами пижмы обыкновенной 1 – это механическая экстракция гексаном, 2 – паровая дистилляция и 3- микроволновая экстракция. Согласно их выводам, выход экстрактивных веществ из данного вида растительного сырья наибольший с помощью микроволновой экстракции до 0,15% с преобладанием таких терпенов как туйон, 1,8-цинеол и борнеол.

Российскими исследователями [16] проведена последовательная экстракция флавоноидов из пижмы сначала хлороформ, затем этиловый спирт 80% и повторная экстракция 95% этанолом, методика оказалась трудоемкой с

затратой большого количества реагентов и времени, но давала большой выход флавоноидов - 1,03%.

Вакуумная дистилляция дихлорэтаном авторами [43], где экстрагент загружается в систему в пропорции 1:2 от водной фазы раствора в системе, после чего выпаривание происходит при температуре от 30 градусов при условии вакуума, удалось выделить из пижмы обыкновенной пирролизидиновые алкалоиды.

Российскими учеными показана целесообразность производства спирто-масляного экстракта цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) методом ультразвуковой экстракции с использованием двухфазного экстрагента. Метод ориентирован на выделение суммы флавоноидов, как ценных веществ в укреплении стенок сосудов и защите от активных форм кислорода [43]. Для сравнительной УЗ-экстракции было использовано масло зародышей кукурузы и двухфазный экстрагент - это же масло и 70%-й этанол. Ими было найдено, что при экстрагировании двухфазным экстрагентом извлекается больше флавоноидов, чем при воздействии чистым маслом, а так же что наибольшее количество флавоноидов извлекается в масляную фазу при времени экстрагирования – 7 минут. Они отметили, что, несмотря на то, что флавоноиды должны преимущественно переходить в водно-спиртовую фазу, авторы наблюдали, что флавоноиды распределяются в масляной фазе и лишь при увеличении времени экстрагирования (больше 15-ти минут) в водно-спиртовой.



Их исследования показали, что флавоноиды сосредотачиваются в масляной фазе и лишь при увеличении времени экстрагирования (больше 15-ти минут) в водно-спиртовой. Возможно это связано с тем, что в процессе экстрагирования двухфазной системой экстрагентов происходит ослабление связи гидрофильных БАВ с материалом клеточных структур.

Таким образом, работы, связанные с выделением, определением биологической активности веществ, различные способы получения данных веществ и разработка новых препаратов на основе лекарственного растительного сырья - пижмы обыкновенной, позволяет рассматривать данный вид растения как перспективное сырье для практического использования в медицине.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследований

В качестве материалов использовали:

Лекарственное растительное сырье. Надземная часть пижмы обыкновенной была собрана в популяциях Акмолинской области, по берегам реки Ишим Республики Казахстан в июле 2020г., в фазу полного цветения. Ботаническая идентификация подтверждена сотрудником кафедры Биомедицины НАО МУК к.б.н. Бек С.А.

Ультразвуковые экстракты из пижмы обыкновенной получали двукратной экстракцией воздушно-сухого сырья (листья, стебли и цветочные корзинки) гексаном и 70% этанолом, без замачивания, последовательно друг за другом, соотношение массы сырья и объема экстрагента 1:20, на ультразвуковой бане при частоте ультразвукового излучения 20 кГц, при комнатной температуре (20-22⁰С), в течение 15, 30 и 45 минут. После ультразвуковой обработки жидкие экстракты отфильтровывают и упаривают растворитель воздушным путем, при комнатной температуре, после высушивания сырье повторно экстрагировали 70% этанолом УЗЭ в течении этого же времени (15, 30 и 45 мин). Для интенсификации процесса экстракции в листьях и цветах пижмы обыкновенной использовали ультразвуковую ванну «Град 40-35» с частотой 20 КГц. Варьировали кратностью экстрагирования.

Растворители и реактивы:

В экспериментальных исследованиях использованы химические реактивы и растворители квалификации «о.с.ч.», «х.ч.», «ч.д.а.».

Гексан. C₆H₁₄. (Mr 86.2). 1042600. [110-54-3]. Бесцветная воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворяется в воде, смешивается с 96 % спиртом (ГФ РК с. 529). Этилацетат используется в качестве растворителя.

96 % спирт этиловый. C₂H₅OH. (Mr 46.07). 102500. [64-17-5]. Бесцветная, прозрачная, летучая, легковоспламеняющаяся жидкость. Гигроскопична. Смешивается с водой и метилхлоридом. Горит голубым бездымным пламенем. Спирт этиловый широко используется в качестве растворителя и экстрагента. (ГФ РК, том II, с. 581).

Вода очищенная. H₂O. (Mr 18, 02). 1095500. [7732-18-5]. Вода, предназначенная для приготовления лекарственных средств, кроме стерильных и апиrogenных, при отсутствии других указаний. (ГФ РК, том II, с. 168).

Металлический цинк. Zn. (Ar 65.38). 1049500. [7439-95-4]. проволока серебристо-белого цвета, или порошок серого цвета. (ГФ РК, том I, с. 381)

Уксусная кислота. C₂H₄O₂. (Mr 60.1). 1000300. [64-19-7]. Бесцветная жидкость или белые блестящие папоротникообразные кристаллы. Легко смешивается или легко растворяется в воде, 96 % спирте, глицерине (85 %) и в большинстве жирных и эфирных масел. (ГФ РК, том I, с. 432).

Хлороводородная кислота. HCl (Mr 36.46). 1043500. [7647-01-0]. Прозрачная бесцветная дымящая жидкость. Смешивается с водой. (ГФ РК, том I, с. 439).

2.2 Методы исследований

Для проведения физико-химических и фармацевтических исследований использованы следующие приборы: ультразвуковая баня Ultrasonic cleaner Sonic-9 (Польша), спектрофотометр «Helios-β» (Великобритания), газовый хроматограф Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (США).

Физико-химические методы

Газовая хроматография

Компонентный состав эфирного масла и количественное содержание в ультразвуковом экстракте пижмы обыкновенной определяли методом газовой хроматографии-масс-спектрографии (ГХ/МС).

Анализ ГХ/МС проводили на газовом хроматографе Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (MSD). Капиллярная колонка HP-5MS30 м x 0,25 мм (толщина пленки 0,25 мкм). Анализ проводили с использованием следующей температурной программы: изотерма печи при 70°C в течение 2 мин, затем от 70 до 270°C при 20°C/мин и 270°C в течение 30 мин. Гелий использовали в качестве газа-носителя при скорости потока 2 мл/мин без разделения. Температура испарителя 250°C и детектора составляла 230°C. Масс-спектры регистрировали с использованием энергии ионизации 70 эВ и температуры разделения 280°C, диапазон масс масс m/z 10-650.

Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их записанных масс-спектров с данными, хранящимися в библиотеке масс-спектрометров библиотеки NIST2011 MSBundle (G1033A) системы данных GC-MS.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для анализа полифенольных соединений экстрактов была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с ультрафиолетовым детектором (УФ) и тандемной масс-спектрометрией в реальном времени (ESI-MS/MS).

В исследовании были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (ACN) для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Франция), муравьиная кислота (99-100%, AnalaR NORMAPUR®, VWR Chemicals, Франция), вода высокой степени очистки приготовлена с использованием системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция). Стандарты 20 фенольных соединений: кофейная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин 3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол (Sigma-Aldrich, США).

Анализ выполняли на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» (Agilent Technologies, США), оборудованном четырехканальным насосом G1311C1260 Pump VL, автосамплером G1329B1260 ALS, термостатом колонки G1316A1260 TCC; детектором с переменной длиной

волны G1314C1260 VWDVL+ и масс-спектрометром G6130AQuadrupoleLC-MS/MS. Использовалось программное обеспечение ChemStation с управлением WindowsNT. Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом «ZorbaxEclipsePlusC18» (150 мм × 4,6 мм, 3,5 мкм, AgilentTechnologies, США). Для разделения использовали градиент подвижной фазы А(2,5% раствор муравьиной кислоты в воде) и подвижной фазы В(2,5% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле). Профиль градиента был установлен следующим образом: 0,00 мин 3% элюент В, 7,00 мин 20% элюент В, 7,10 мин 30% элюент В, 27,00 мин 40% элюент В, 35,00 мин 50% элюент В, 35,10 мин 20% элюент В и 40.00 мин. 3% элюент В. Скорость потока 0,4 мл/мин, температура колонки 30 °С. Ультразвуковые экстракты и стандарты растворяли в смеси растворителей ацетонитрил: вода = 1:1 (об./об.). Объем инъекции составлял 20 мкл для растворов экстрактов и стандартов. Выходящий из колонки поток проходил через УФ-детектор до попадания на интерфейс MS. Длины волн УФ-детектирования составляли 280 нм и 360 нм. Детектирование масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением проводили в отрицательном режиме со следующими оптимизированными параметрами: температура капилляра 350°С; осушающий газ N₂ 8 л/мин; давление распылителя 45 фунтов на квадратный дюйм. Сбор данных осуществлялся с использованием метода мониторинга множественных реакций (MRM), который отслеживает только определенные массовые переходы в течение заданного времени удерживания.

Идентификация каждого соединения была выполнена путем сравнения их времени удерживания с аутентичными стандартами, а также подтверждена спектрометром AgilentG6130ALC-MS/MS, оборудованным источником ионизации электрораспылением. Уровень содержания фенольных соединений в экстрактах рассчитывали методом внешнего стандарта.

Химические методы (качественное определение):

Точную навеску 0,02 г экстракта растворяют в 25 мл 70% этанола (испытуемый раствор). К 2 мл испытуемого раствора прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной и 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).

Тонкослойная хроматография

Для терпеновых соединений

Для ТСХ использовали пластины Silufol с накатанным тонким слоем Al₂O₃. Система элюентов гексан – этилацетат (4:0,5). Проявитель – кристаллический йод. Стандартные образцы: 1,8 – цинеол, камфора.

Для флавоноидных соединений

Для ТСХ использовали пластины Silufol с накатанным тонким слоем Al₂O₃. Система элюентов бутиловый спирт – вода – уксусная кислота (4:1:5), в качестве проявителя выбрано хлористое железо.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Разработка нового способа получения суммы экстрактивных веществ с применением ультразвуковой экстракции и разработка технологической схемы получения ультразвукового экстракта из пижмы обыкновенной

Пижма обыкновенная (*Tanacetum Vulgare* L.), относится к ценным лекарственным растениям, благодаря своим фармакологическим свойствам: желчегонной, противопаразитарной, кровоостанавливающей и противомикробной активности [17,21,22]. Но не смотря на широкий спектр биологической активности пижмы обыкновенной использование растительного сырья или экстрактов на ее основе в режиме моно-использования в мире очень мало. Возможно это благодаря достаточно высокому содержанию бициклических монотерпеновых кетонов: β -туйон и α -туйон (до 47-70%) [45,46] являющемуся токсичным в большом количестве. Исследования, проведенные [4,7,45,46] указывают на высокое содержание биологически активных флавоноидов в пижме обыкновенной. В цветках содержится значительное количество флавоноидов которые представлены лютеолином, апигенином, акацетином, кверцетином, изорамнетином, цинарозидом, эупатилином, яцеидином, тилианином, яцеозидином, скутелларином и их производными. Вследствие этого работа по разработке новой технологии получения экстрактивных веществ из пижмы обыкновенной, учитывающей все тонкости БАВ в экстрактах является актуальной.

Анализируя литературные данные, мы пришли к выводу, что большое количество работ по экстракции проведено сложной технологией выделения экстрактивных веществ из пижмы обыкновенной, согласно которым процесс идет либо много ступенчато и трудоемко, либо с использованием большого количества реагентов, либо ресурсозатратно. Поэтому целью нашего исследования стало разработка технологии получения биологически активных веществ экстракцией листьев и цветков пижмы обыкновенной с применением ультразвука.

Под действием ультразвуковых колебаний происходит более быстрое и активное разрушение тканей растительного сырья, что приводит к интенсификации процесса экстракции и дает возможность увеличить содержание биологически активных соединений в растворе [40, 41]

Можно выделить несколько основных параметров, которые собственно и делают процесс ультразвукового экстрагирования более эффективным по сравнению с традиционными методами экстракции:

- увеличение скорости обтекания;
- ускорение пропитки твердого тела жидкостью;
- увеличение коэффициента внутренней диффузии;
- кавитационный эффект, влияющий на структуру пористых тел и приводящий к появлению микротрещин.

Установлено, что ультразвуком частотой 19-44кГц из растений можно извлекать биологически активные вещества с сокращением процесса экстракции на 1-2 порядка. При этом имеет место не только значительное ускорение процесса извлечения, но и увеличение по сравнению с другими методами экстрагирования выхода основного продукта [44]. Специфические свойства ультразвука обусловлены малой длиной волны и высокой частотой ультразвуковых колебаний.

Для экстракции нами была использована трава Пижмы обыкновенной (цветки и листья), собранная на территории Акмолинской области, на берегу реки Ишим в июле 2020 года в фазу полного цветения. Сырье было высушено в темном и проветриваемом месте. Измельчено до состояния 2-3 мм, проходящие сквозь сито диаметром 5мм.

Нами впервые для извлечения суммы экстрактивных веществ из травы пижмы обыкновенной, произрастающей в природе Центрального Казахстана, применена ультразвуковая экстракция.

Для исследования влияния экстрагента на качественный и количественный состав была проведена ультразвуковая экстракция, которую проводили в ультразвуковой бане «Град 40-35» с частотой 20 КГц. В качестве первого растворителя для УЗ экстракции был выбран неполярный растворитель – гексан, нашей целью было извлечь неполярные биологические вещества проводили в экстракты из пижмы обыкновенной получали двукратной экстракцией воздушно-сухого сырья (листья, стебли и цветочные корзинки) гексаном и 70% этанолом, без замачивания, последовательно друг за другом, соотношение массы сырья и объема экстрагента 1:20, на ультразвуковой бане при частоте ультразвукового излучения 20 кГц, при комнатной температуре (20-22⁰С), в течение 15, 30 и 45 минут. После ультразвуковой обработки жидкие экстракты отфильтровывают и упаривают растворитель воздушным путем, при комнатной температуре, после высушивания сырье повторно экстрагировали 70% этанолом УЗЭ в течении этого же времени (15, 30 и 45 мин). Для интенсификации процесса экстракции в листьях и цветах пижмы обыкновенной использовали ультразвуковую ванну «Град 40-35» с частотой 20 КГц. Варьировали кратностью экстрагирования



Схема – Технологическая схема получения ультразвуковых экстрактов из пижмы обыкновенной

В настоящее время в фармацевтической промышленности для получения жидкого экстракта.

Недостатки технологии –производственный процесс является многоступенчатой, трудоемкой и время затратной (90 часов или 3,75 суток).

Нами впервые для извлечения суммы экстрактивных веществ из травы тимьяна ползучего, произрастающей в природе Центрального Казахстана, применена ультразвуковая экстракция.

Для исследования влияния выбора экстрагента и частоты ультразвукового излучения на выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего, нами впервые проведена двукратная экстракция воздушно-сухого сырья (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли) ультразвуком, измельченного доразмера 2-3 мм, 96% этанолом, 70% этанолом, без замачивания, соотношение массы сырья и объема экстрагента 1:20, на ультразвуковой бане, при частоте ультразвукового излучения 28 кГц, 40 кГц, при комнатной температуре (20-22 °С), в течение 30 минут. После ультразвуковой обработки жидкие экстракты

отфильтровали, объединили и упарили экстрагент на роторном испарителе при температуре 50°C досуха. Полученные результаты представлены в таблице 7. Таблица 7-Условия экстракции и выходы суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего, в пересчете на воздушно-сухое сырье

3.2 Исследование химического состава терпеновых и полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов пижмы обыкновенной

В настоящее время повышается интерес к изучению химического состава лекарственных растений. Это обусловлено: возросшей потребностью использования лекарственного растительного сырья в медицине, а также большим перерывом исследовательских работ в данном направлении. Кроме этого, экологическая обстановка заметно ухудшается, поэтому появилась необходимость более тщательного изучения лекарственных растений. Научно-исследовательская работа направлена на изучение качественных показателей

В ходе выполнения

Идентификацию сырья также подтверждали, исходя из химического состава пижмы обыкновенной, реакцией на наличие в нем флавоноидов. Сумму флавоноидов выделяли из растительного материала 3-х кратной экстракцией 70% этанолом. К 20 мг экстракта, растворенного в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).

Наличие флавоноида цинарозида

По результатам изучения компонентного состава эфирных масел исследуемых образцов методом хромато-масс-спектрометрии (таблица 4), установлено, что основными компонентами эфирного масла тимьяна ползучего, произрастающего в Каркаралинске, являются карвакрол (37.44 %), тимол (16.26 %), О-цимен (16.11 %), γ -терпинен (11.85 %), β -бисаболен (4.74 %), а эфирное масло тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, содержит неролидол (33.72 %), β -линалоол (6.21 %), 1,8-цинеол (5.92 %), α -терпинеол (5.40 %).

Таблица 4 –Компонентный состав терпеновой фракции пижмы обыкновенной

Анализ полученных спектров показывает, что выбранные оптимальные параметры ультразвуковой обработки не вносят существенных изменений в структуру полисахаридов льна (на спектрах полностью сохраняются все пики, соответствующие функциональным группам полисахаридов льна (CН₂2720 см⁻¹); C–O–C (1090 см⁻¹); ОН (1380 см⁻¹); C=O (1670 см⁻¹), нет смещения полос). Особенно четко обозначены пики, отвечающие колебаниям карбоксильной

группы (1360-1470 см⁻¹), что позволяет отнести выделенные полисахариды к полиуронидам.

Таким образом, установлено, что ультразвуковое воздействие существенно повышает эффективность экстракции полисахаридов *Linum usitatissimum L.*, а также сокращает время процесса с 24 ч до нескольких минут, не вызывая деструкции гликанов. Проведенные анализы подтверждают, что использование ультразвуковой обработки не приводит к качественному изменению фракционного состава гликановых экстрактов, но позволяет получить более однородные по составу экстракты. Выделенные из семян льна и льняного жмыха полисахариды не имеют неприятного запаха, улучшают структуру продукта; являются перспективными пребиотиками, нетоксичны, и могут использоваться в качестве компонентов при создании функциональных продуктов питания

Таблица – Компонентный состав гексановых ультразвуковых экстрактов при разном времени УЗЭ (15, 30, 45 мин)

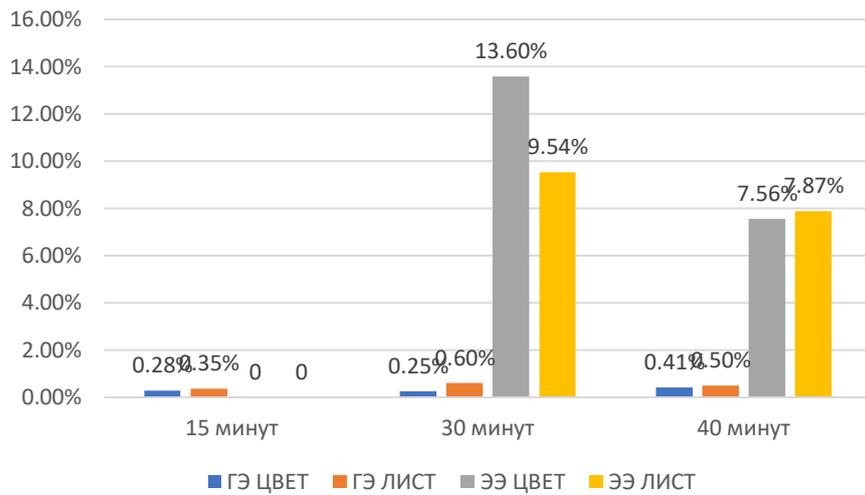
aIR	Содержание (%)				
	1	2	3	4	5
1	α -Thujen	929	0.54	-	-
2	α -Pinene	934	0.41	-	0.71
3	Camphene	948	-	-	0.82
4	Sabinene	962	-	-	0.35
5	β -Pinene	976	0.23	-	2.28
6	1-octen-3-ol	979	0.64	-	-
7	3-Octanone	983	0.27	-	-
8	β -Myrcene	991	-	-	-
9	α -Phellandrene	1002	0.13	-	-
10	α -Terpinene	1008	1.74	-	-
11	(+)-4-Carene	1011	-	-	-
12	<i>O</i> -Cymene	1015	13.17	-	0.46
13	Limonene	1023	0.43	-	0.47
14	1,8-Cineole	1030	1.95	-	5.91
15	Δ -3-Carene	1033	0.07	-	-
16	<i>cis</i> - β -Ocimene	1037	-	-	1.87
17	γ -Terpinene	1057	11.13	-	0.41
18	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1070	0.89	-	-
19	<i>cis</i> - β -Terpineol	1080	-	-	0.52
20	α -Terpinolene	1092	-	-	0.19
21	β -Linalool	1103	0.71	-	6.19

22	(+)-Camphor	1144	-	0.76
23	Nerol oxide	1155	-	0.25
24	endo-Borneol	1161	2.60	1.28
25	(-)-Terpinen-4-ol	1177	1.04	3.25
1	2	3	4	5
26	<i>cis</i> -Verbenol	1180	-	0.16
27	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1183	0.08	0.13
28	α -Terpineol	1189	0.05	5.39
29	<i>cis</i> -Geraniol	1228	0.49	0.11
30	Thymol methyl ether	1235	0.53	0.16
31	β -Citral	1240	-	-
32	Isothymol methyl ether	1244	0.27	0.19
33	Thymoguinone	1249	0.14	-
34	<i>trans</i> -Geraniol	1263	-	1.50
35	α -Citral	1270	-	0.79
36	<i>iso</i> -Bornyl acetate	1286	-	0.20
37	Thymol	1293	14.78	0.45
38	Carvacrol	1304	26.06	-
39	α -Terpineol acetate	1316	1.18	-
40	(<i>R</i>)-Lavandulyl acetate	1344	-	0.25
41	<i>cis</i> -Geraniol acetate	1367	-	-
42	α -Copaene	1376	0.10	0.23
43	Nerol acetate	1387	0.90	-
44	<i>trans</i> -Geraniol acetate	1396	-	-
45	(-)- β -Bourbonene	1404	0.19	0.67
46	Caryophyllene	1423	2.00	3.10
47	1H-Cyclopro[<i>e</i>]azulene	1449	0.69	0.10
48	Humulene	1454	-	0.11

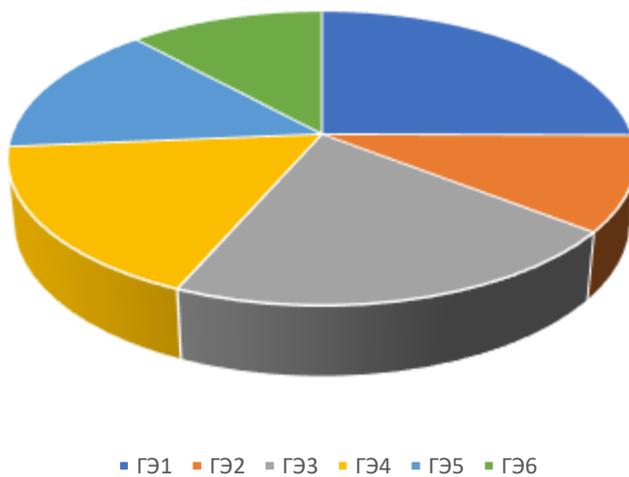
49	<i>cis</i> - α - Bisabolene	1461	0.12	0.13
50	γ -Muurolene	1477	0.78	-
51	β -Copaene	1486	0.35	1.42
52	γ -Elemene	1498	-	1.00
53	α -Muurolene	1505	0.24	0.94
54	β -Bisabolene	1540	5.16	0.16
55	γ -Cadinene	1542	0.65	-
56	Δ -Cadinene	1552	1.38	-
57	(\pm)- <i>trans</i> - Nerolidol	1571	-	33.59
58	(-)- Spathulenol	1582	1.60	3.99
59	Caryophylle ne oxide	1593	0.92	4.60
60	Alkofen B	1627	-	1.24
61	α - <i>epi</i> - Cadinol	1649	0.14	0.90
62	Juniper camphor	1709	-	4.16
63	Ledene oxide-(I)	1890	0.24	-
Identification (%)		94.99		91.39
Monoterpenes hydrocarbons		27.85		7.56
Monoterpenes oxygenated		51.67		27.49
Sesquiterpenes hydrocarbons		11.66		7.86
Sesquiterpenes oxygenated		2.90		47.24
Others		0.91		1.24

ACompound: Listed in order of elution from a HP-5MScolumn;
aIR: Identification based on retention index and basedon comparison of
mass spectra.

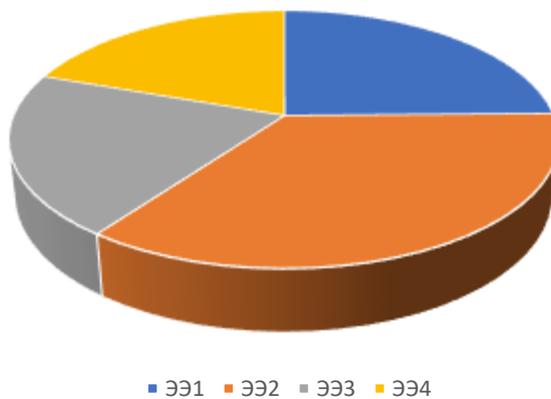
Выход экстрактивных веществ



Выход гексановых экстрактов



Выход этаноловых экстрактов



Список используемой литературы

1. Pavlov N.V. Flora of Kazakhstan. Almaty: Publishing House of the Academy of Sciences of the Kazakh SSR. 1964. Vol. 7. 497 p.
2. Государственная фармакопея СССР XI, вып. 2. – Москва: Медицина, 1990. – с. 15.
3. Дудченко Л. Г., Козьяков А. С., Кривенко В. В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. — К.: Наукова думка, 1989. — 304 с. — 100 000 экз. — [ISBN 5-12-000483-0](#)
4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae) / Г.М. Балабас; под ред. П.Д. Соколова. – СПб.: Наука, 1993. - С. 190-192.
4. Лавренов, В.К. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины / В.К. Лавренов, Г.В. Лавренова – СПб.: Издательский Дом «Нева», 2003. – 272 с.
5. Guy Collin Essential Oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian Origin/ Journal of essential oil research. – November 1993 – с. 631-632
6. С.М. НиколаевЦ.Н. БазаровС.А. НайдановЖ.Б. ДашинамжиловП.-Н.Б. ЛубсандоржиеваЕ.В. ПинаеваТ.А. Асеева RU2178707C2 Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, 2000г.
7. Атлас лекарственных растений России / под общей ред. академика РАМН и РАСХН, профессора Быкова. – М., 2006. – 346 с
8. Гуревич, И. Я., Получение галеновых препаратов из цветов пижмы и их фармакологическое исследование: автореф. дисс... канд. фарм. наук / Гуревич Исаак Яковлевич. – Тарту, 1953. – 14 с.
9. Гуревич, И. Я., Получение галеновых препаратов из цветов пижмы и их фармакологическое исследование: дисс... канд. фарм. наук / Гуревич Исаак Яковлевич. – Тарту, 1953. – 204 с.
- 10.А. А. Рахматуллина, Р. Г. Тураев, С. В. Киселёв, Л. Е. Никитина, А. В. Бодров ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КАМФЕНА НА ПРОЦЕССЫ СВЁРТЫВАНИЯ КРОВИ/ Казанский медицинский журнал, 2015 г., том 96, №3 – с. 455–456
- 11.А. В. Куркина ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА ЦВЕТКОВ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Tanacetum Vulgare*)/ Химия растительного сырья, 2011 г., №4 – с. 209–212
- 12..Rosselli S., Bruno M., Raimondo F.M., Spadaro V., Varol M., Koparal A.T., Maggio A. Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *Siculum* - *Molecules*. 2012, Jul 9, 17(7), 8186-8195
- 13.Robert Tisserand, Rodney Young Essential Oil Safety (Second Edition), 2014 – с. 5-22
- 14..Godinho L.S., Aleixo de Carvalho L.S., Barbosa de Castro C.C., Dias M.M., Pinto Pde F., Crotti A.E., Pinto P.L., de Moraes J., Da Silva Filho A.A. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni* - *Scientific World Journal*. 2014, Feb 2, 2014, 460342.

15. Coté H., Boucher M.A., Pichette A., Legault J. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents - Medicines (Basel). 2017, May 25, 4(2)
16. Орлин Н.А. ИЗВЛЕЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ/ Успехи современного естествознания. – 2005. – № 8 – С. 47–47
17. Angel L Alvarez, Solomon Habtemariam, Malindra Juan-Badaturuge, Caroline Jackson, Francisco Parra In vitro anti HSV-1 and HSV-2 activity of *Tanacetum vulgare* extracts and isolated compounds: an approach to their mechanisms of action/ *Phytother Res*, 2011 Feb;25(2) -296-301.
18. Кароматов И.Д. Простые лекарственные средства Бухара – 2012
19. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. – Т. 2. – Минск, 2007. – 471 с
20. Кароматов И.Д., Абдуховидов А.Т. ПРИМЕНЕНИЕ ПИЖМЫ В НАРОДНОЙ И НАУЧНОЙ МЕДИЦИНЕ/ Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина» №9 – октябрь (26) 2018 – С. 77-78
21. Lahlou S., Tangi K.C., Lyoussi B., Morel N. Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: in vitro pharmacological study - *J. Ethnopharmacol.* 2008, Oct 30, 120(1), 98-102
22. Schinella G.R., Giner R.M., Recio M.C., Mordujovich de Buschiazzo P., Ríos J.L., Mániz S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare* - *J. Pharm. Pharmacol.* 1998, Sep., 50(9), 1069-1074
23. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «Сам ГМУ», 2004. – 1180с
24. Федосеева Г.М., Мирович В.М., Горячкина Е.Г., Переломова М.В. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды.: учеб. пособие для студ. вузов/ Иркутск 2009 – С. 18-19
25. Д. А. Пономарёв, Э. И. Фёдорова ОСНОВЫ ХИМИИ ТЕРПЕНОВ: учеб. пособие для студ. вузов/ Сыктывкар 2014 – с. 7–8
26. И.А. Шорский, Автореф. дис. канд. техн. наук., Краснодар – 2016 г.
27. В.Н. Хмелёв, Ультразвук. Аппараты и технологии., Издательство Алтайского государственного технического университета, Бийск – 2015
28. О.С. Бровко, И.А. Паламарчук, Т.А. Бойцова, Фундаментальные исследования, 4(11), 2015 – С. 659-663 Г.И. Касьянов, Вестник ВГУИТ, №1, 130-135 (2014)
29. Максютин Н.П., Литвиненко В.И. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений. – М.: Фенольные соединения и их биологическая функция, 1968. – с. 81-82
30. 181. Ivancheva, S. Dynamic and content of tannins and flavonoids in *Achillea millefolium* L. and *Tanacetum vulgare* L. / S. Ivancheva, M. Kurteva, B. Stancheva// *Pharmacia*. – 2000. – Vol. 47, No. 1-2. – P. 17-20.
31. 180. Ivancheva S. Comparative analysis of leaf exudate flavonoids in genus *Tanacetum*/ S. Ivancheva, R. Tsvetkova // 7th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Dimitrovgrad (Yugoslavia), 2002. - P. 71-75.

32. Самылина, И.А. Атлас лекарственных растений и сырья: Учебное пособие по фармакогнозии / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – М.: Автор. академия; Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 318с.
Гаммерман, А.Ф. Дикорастущие лекарственные растения СССР / А.Ф. Гаммерман, И.И. Гром. – М.: Медицина, 1976. 288 с.
33. А. М. Щербаков, О. Е. Андреева Апигенин ингибирует рост клеток рака молочной железы: роль ER α и HER2/neu/ Acta Naturae номер 3 (26) том 7 2015.
34. Н.В. Попова, С.И. Дихтяров, Н.Ф. Маслова, В.И. Литвиненко АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЮТЕОЛИНА/ УКРАЇНСЬКИЙ БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ, №6(17) 2011
35. Alexander Victor Anand David, Radhakrishnan Arulmoli, and Subramani Parasuraman Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid/ Pharmacogn Rev. 2016 Jul-Dec; 10(20): 84–89.
36. Гомеопатическая фармация: введение и руководство // Сборник учебных пособий для послевузовского профессионального образования провизоров / Т.Л. Киселева, А.А. Карпеев; под ред. чл.-корр. РАМН, проф. И.А. Самылиной. – М.: Издательство ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2005. – 438
37. Сокольская, Т.А. Гомеопатические лекарственные средства для терапии заболеваний ЖКТ и гепатобилиарной системы /Т.А. Сокольская // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы VIII Международного съезда. Миккели, Финляндия, 2004. - С. 371-376.
38. Куркин В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
39. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2004. – 1180 с.
40. Новицкий, Б.Г. Применение акустических колебаний в химико-технологических процессах / Б.Г. Новицкий. – М. : Химия, 1983. – 192 с,
41. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs / M. Vinatoru // Ultrasonic Sonochemistry. – 2001. – № 8. – P. 303–313
42. Молчанов Г.И. Фармацевтические технологии: современные электорофизические биотехнологии в фармации: учебное пособие Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. – М.: Альфа-М, 2011. – 336 с.
43. Goldman M.P., Hexsel D. Cellulite: Pathophysiology and Treatment. – UK.: Informa Healthcare, 2010. – P. 216
44. Large scale extraction of pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (Senecio jacobaea) **A. Morrie Craig**
45. Volatiles of Tanacetum macrophyllum Obtained by Different Extraction Methods Biljana M Nikolic
46. Маргулис, М.А. Основы звукохимии / М.А. Маргулис. – М.: Высшая школа, 1984. – 272

47. Куркин В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
48. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2004. – 1180 с.
49. Рыжикова, М. А. Фитопрепарат из пижмы - природный антиоксидант и гепатопротектор / М. А. Рыжикова // Новые медицинские технологии в хирургической и терапевтической практике в Республике Башкортостан. – 2000. – С. 105-106.
50. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Электрон. дан., 2014. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
51. Кириченко, Е.Е. Определение противовоспалительной активности полисахаридов цветков пижмы обыкновенной / Е.Е. Кириченко, И.А. Сычев, Г.Ю. Чекулаева // XIX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов. – Москва, 2012. – С. 385 - 386.
52. Raal A., Orav A., Gretchushnikova T. Essential Oil Content and Composition in *Tanacetum vulgare* L. Herbs Growing Wild in Estonia // ТЕОР. – 2014; 17: 670–675