Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Кубанский государственный университет»

На правах рукописи



ЧУБУКИНА ТАТЬЯНА КОНСТАНТИНОВНА

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА АСТРОВЫЕ

1.4.2. Аналитическая химия (химические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Темердашев З.А.

Краснодар – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4
ВВЕДЕНИЕ 6
1 Аналитический обзор 11
1.1 Лекарственные растения семейства Астровые 11
1.2 Способы экстракции БАВ из ЛРС 16
1.2.1 Традиционные способы экстракции 16
1.2.2 Ультразвуковая экстракция 24
1.2.3 Микроволновая экстракция 26
1.2.4 Экстракция при повышенных температуре и давлении 27
1.3 Хроматографическое определение БАВ в ЛРС 33
1.3.1 ВЭЖХ определение 33
1.3.2 Газохроматографическое определение 37
1.4 Иные методы определения 39
1.5 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования .. 42
2 Экспериментальная часть 44
2.1 Исходные материалы, реактивы и вспомогательное оборудование 44
2.2 Объекты исследования 46
2.3 Приготовление рабочих растворов 48
2.4 Экстракция БАВ из ЛРС 48
2.4.1 Экстракция ФС 49
2.4.2 Экстракция ЭМК и ЛОС из ромашки аптечной 51
2.5 Определение БАВ в экстрактах ЛРС семейства Астровые 53
2.6 Оценка корреляционной зависимости содержания ФС от антиоксидантной активности экстрактов ЛРС семейства Астровые .. 61
3 Обсуждение результатов 62

3.1 Извлечение БАВ из ромашки аптечной 62

3.2 Извлечение ФС из стевии медовой 101

3.3 Извлечение ФС из полыни кавказской 115

3.4 Фенольные профили некоторых видов полыни по результатам ВЭЖХ-ДМД-анализа 126

3.5 Оценка суммарного содержания фенольных соединений и антиоксидантной актвности водных экстрактов из разных видов полыни 134

ВЫВОДЫ 140

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 143

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – апигенин-7-О-глюкуронид

АОА – антиоксидантная активность

АП – апигенин

БАВ – биологически активные компоненты

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭ-ТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГК – галловая кислота

ГФ – Государственная Фармакопея РФ

ГХ – газовая хроматография

ДКК – 3,5-дикофеилхинная кислота

ДМД – диодно-матричный детектор

ДЖЖМЭ – дисперсионная жидкостно-жидкостная микро-экстракция

ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КВТ – кверцитрин

ЛОС – летучие органические соединения

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МВЭ – микроволновая экстракция

метод Ф-Ч – метод Фолина-Чокалтеу

МС – масс-спектрометрический детектор

МС/МС – тандемный масс-спектрометрический детектор

МФК – моногликозид феруловой кислоты

н.у.м. – над уронем моря

ПИД – пламенно-ионизационный детектор

ПКО – предел количественного определения

ПО – предел обнаружения

ПУ – полиуретан

РК – розмариновая кислота

СКЭ – субкритическая экстракция

СФМ – спектрометрия в видимой области по образованию комплекса с хлоридом алюминия

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ – спектроскопия в ультрафиолетовой области спектра

УВЭЖХ – ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография

УЗ – ультразвук

УЗЭ – ультразвуковая экстракция

ФК – феруловая кислота

ФС – фенольные соединения

ХГК – 3-О-кофеилхинная кислота

ЭМК – эфирномасличные компоненты

ЭП – эупатилин

BSTFA – (N, O-бис(триметилсилил)трифторацетамид

DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом

FRAP – ferric reducing antioxidant power – метод определения суммарного содержания антиоксидантов

∑Ф – суммарное содержание флавоноидов

∑ФС – суммарное содержание фенольных соединений

ВВЕДЕНИЕ

Растительные объекты содержат богатый комплекс биологически активных веществ (БАВ), обусловливающие их физиологическую активность в организме человека/животного и позволяют использовать растительное сырье в медицинских целях, профилактике и лечении целого комплекса заболеваний. Широкое распространение при производстве препаратов терапевтического воздействия получили лекарственные растения семейства Астровые (*Asteraceae*) – полынь, эхинацея, тысячелистник, ромашка, арника, череда трёхраздельная и другие. Представители семейства Астровые включают более 32 тысяч видов, распространённых по всему земному шару и представленные во всех климатических зонах. В медицинских целях используют полынь, эхинацею, тысячелистник, некоторые виды ромашки, арнику, череду трёхраздельную и пр. Лекарственные растения этого семейства обладают антиоксидантной активностью, проявляют разнообразные терапевтические свойства, обусловленные наличием в их составе комплекса ряда действующих соединений. Одним из наиболее широко распространенных классов веществ в составе лекарственного растительного сырья (ЛРС) являются фенольные соединения (ФС), включающие в себя кумарины, флавоноиды, антраценпроизводные и дубильные вещества, определяющие их ценность и качество.

Несмотря на достаточную распространенность применения лекарственного сырья семейства Астровые, химический состав многих растений из этого семейства изучен не в достаточной мере. Сведения по содержанию БАВ в ЛРС пополняются благодаря совершенствованию способов извлечения из растительных матриц и разработке новых методик их определения. Существует значительное число нормативных документов по определению и контролю качества лекарственных трав и препаратов на их основе, но имеются недостатки, связанные со сложностью определения индивидуальных БАВ, низкой чувствительностью, трудоемкостью и продолжительностью пробоподготовки.

Важным и малоизученным аспектом являются взаимосвязи содержания БАВ в экстрактах ЛРС от места произрастания и морфологической части растения, используемой для их извлечения. Не только условия произрастания растения (влажность, освещенность, высота над уровнем моря), но и параметры извлечения (растворитель, температура, продолжительность, воздействие других физических факторов), могут влиять на селективность и эффективность экстракции.

Методы высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и газовой хроматографии (ГХ) наиболее полно позволяют идентифицировать и определять содержание БАВ в нативном виде в ЛРС семейства Астровые, что важно для оценки их фармакологической активности. Большое количество лекарственных растений из данного семейства, перспективных для фармакологического использования не в полной мере изучены, а публикации различных исследователей по компонентному составу экстрактов противоречивы, их сложно интерпретировать из-за отсутствия полноты сведений об условиях и месте произрастания, что подчеркивает актуальность выбранной темы.

Цель диссертационного исследования – идентификация, разработка методик хроматографического определения индивидуального и суммарного содержания фенольных соединений и эфирномасличных компонентов в экстрактах различными способами извлечения из ряда растений семейства Астровые (*Asteraceae*) – ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), стевии медовой (*Stevia rebaudiana Bertoni*) и полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.), Людовика (*Artemisia Ludoviciana* N.), лечебной (*Artemisia absinthium* L.), эстрагона (*Artemisia dracunculus* L.), однолетней (*Artemisia annua* L.) и кавказской (*Artemisia alpina* G.).

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

– изучение особенностей хроматографического определения ФС в экстрактах из ЛРС;

– идентификация и определение ФС в экстрактах из ЛРС;

– оценка эффективности различных способов извлечения ФС из ЛРС в водные и водно-спиртовые растворы для определения индивидуальных и суммарных их содержаний;

– ГХ-МС-определение ЭМК в экстракте из ромашки аптечной;

– влияние видовых особенностей, географических и морфологических факторов на формирование фенольного профиля исследуемых лекарственных растений;

– оценка влияния суммарного содержания определяемых аналитов в экстрактах разных видов полыни на их биологическую активность.

Научная новизна. Изучены особенности и разработаны схемы ВЭЖХ определения индивидуального и суммарного содержания фенольных соединений в экстрактах растений семейства Астровые (*Asteraceae*) - ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla L.*), стевии медовой (*Stevia rebaudiana Bertoni*) и полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris L.*), Людовика (*Artemisia Ludoviciana N.*), лечебной (*Artemisia absinthium L.*), эстрагона (*Artemisia dracunculus L.*), однолетней (*Artemisia annua L.*) и кавказской (*Artemisia alpina G.*) в различных условиях извлечения.

Оценена эффективность различных способов экстракции из ЛРС целевых компонентов, изучено влияние ряда физических, морфологических и географических факторов условий произрастания лекарственных трав на содержание в них ФС. Проведено ГХ-МС-определение летучих органических соединений (ЛОС) в экстрактах ромашки аптечной и оценено влияние способов экстракции на компонентный состав ЛОС, а также влияние суммарного содержания определеяемых аналитов в экстрактах разных видов полыни на их биологическую активность.

Практическая значимость. Хроматографическое определение ФС в экстрактах в обращенно-фазовом режиме с использованием колонки с модифицированным октадецильными группами силикагелем расширило возможность изучения трансформации компонентов в экстрактах ромашки

аптечной, стевии медовой и полыни кавказской в различных условиях их выделения, включая воздействие физических полей (УЗЭ, МВЭ, СКЭ).

Показано, что способы извлечения и составы экстрагентов существенно влияют на количественные и качественные характеристики извлекаемых компонентов. Данные по содержанию ФС в экстрактах цветов ромашки и стевии различных производителей позволили изучить зависимость концентрации целевых компонентов от географического места произрастания ЛРС. Оценка антиоксидантной активности (АОА) водно-спиртовых и водных экстрактов из образцов листьев стевии медовой разных производителей позволила установить различный вклад индивидуальных ФС в величину АОА. По результатам определения суммарного содержания ФС и АОА полыни Людовика показана возможность ее фармакологического применения.

Положения, выносимые на защиту:

– результаты исследований особенностей хроматографического определения ФС и ЭМК в экстрактах из ЛРС семейства Астровые;

– данные исследований по оценке эффективности различных способов извлечения ФС из ЛРС в водные и водно-спиртовые растворы по индивидуальным и суммарным их содержаниям;

– результаты исследований по влиянию видовых особенностей, географических и морфологических факторов на формирование фенольного профиля исследуемых лекарственных растений;

– условия извлечения различными способами ЛОС из ромашки аптечной и условия их ГХ-МС-определения.

Достоверность результатов, научных положений и выводов диссертационного исследования подтверждается удовлетворительным согласованием литературных и экспериментальных данных по теме исследования, репрезентативностью выборки полученного анализируемого материала, использованием методов хроматографии для получения экспериментальных данных, воспроизводимостью экспериментальных

результатов и не противоречивостью с литературных данными по данной тематике.

Результаты диссертационной работы обсуждены на I Международной научно-практической конференции (Кемерово, 2021 г.), Всероссийской научной конференции с международным участием «IV Байкальский материаловедческий форум» (Улан-Удэ – оз. Байкал, 2022 г.), VII– XI Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (г. Ростов-на-Дону, 2022–2026 г.), XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (г. Томск, 2023 г.), IV Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (г. Краснодар, 2023 г.), XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Федеральная территория «Сириус», 2024 г.), VII Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (г. Краснодар, 2025 г.), V Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии (г. Краснодар, 2026).

Диссертационное исследование выполнялось в рамках проекта Госзадания Минобрнауки РФ № FZEN–2023–0006 и № FZEN-2020-0022 с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого–аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

1 Аналитический обзор

1.1 Лекарственные растения семейства Астровые

Семейство Астровые (*Asteráceae*) или Сложноцветные (*Compósitae*) одно из самых больших семейств, включает 32913 видов растений. Среди них большое многообразие трав, реже – кустарники или небольшие деревья, и большинство из них обладают полезными свойствами [1].

Для ЛРС семейства Астровые по медицинскому назначению характерны противовоспалительное, обезболивающее, жаропонижающее воздействие и высокий антиоксидантный потенциал [1]. Цикориевая кислота, основной компонент эхинацеи, обладает антигилуронидазной и антиоксидантной активностью, защищает коллаген от деградации, вызванной свободными радикалами, ингибирует проникновение и репликацию вируса иммунодефицита человека, повышает активность фагоцитов *in vitro* и *in vivo*. Желчегонные и холеретические свойства растения обеспечиваются наличием 1,3-дикофеилхинной кислоты [2].


Рис. 1. Ромашка аптечная

Ромашка аптечная, ободранная (*Matricaria chamomilla* L.) – однолетнее травянистое растение высотой 15-30 см с полыми цветочными корзинками с желтыми внутренними и белыми краевыми цветками [3,4] (рисунок 1). Произрастает на лугах, полях, пустырях и обочинах дорог Южной и Восточной Европе, Северной Африке, Азии, Северной и Южной Америке, Австралии и Новой Зеландии, часто культивируется [3,5]. Из цветков ромашки готовят настой, применяемый как противовоспалительное, спазмолитическое, химиопрофилактическое и противораковое средство за счет наличия в составе апигенина, апигенин-7-оглюкозида и его ацетилированных производных [6]. Седативный эффект экстрактов обусловлен наличием апигенина [7]. Порошок используют наружно при кожных высыпаниях и инфекциях, плохо заживляющих ранах [3,5]. Эфирное

масло ромашки обладает антибактериальным и фунгицидным действием, а также применяется как мягкое седативное средство [5], за счет наличия в составе α-бисаболола, оксидов α-бисаболола А и В, матрицина и хамазулена проявляет противовоспалительные свойства [7].


Рис. 2. Ромашка пахучая

Ромашка ромашковидная, пахучая, безъязычковая (*Matricaria matricarioides* Less. Porter.) – однолетнее травянистое растение, высотой 15-60 см с цветочными корзинками из желто-зеленых трубчатых цветков [8,9] (рисунок 2). Произрастает близ жилья и на обочинах дорог. За счет наличия в составе производных лютеолина и кверцетина обладает противовоспалительными, спазмолитическими и антивирусными свойствами [9]. Из-за особенностей химического состава используется реже, чем ромашка аптечная [3].


Рис. 3. Стевия медовая

Стевия (*Stevia rebaudiana Bertoni*) – многолетний полукустарник, в диком виде произрастающий на северо-востоке Парагвая [10,11] (рисунок 3). В настоящее время культивируется по всему миру. Листья стевии непосредственно в сухом виде или в виде экстрактов используются в качестве подсластителей. Кроме этого, извлечения из стевии обладают желчегонным, мочегонным, антибактериальным, противовирусным и иммуномодулирующим действием [10]. Флавоноиды (рутин, кверцетин и другие) и фенольные кислоты (хлорогеновая, кофейная), витамины и аминокислоты из листьев обеспечивают их антиоксидантную, противовоспалительную, нейропротекторную активность [10,12–15].

Растения рода полынь представляют собой небольшие кустарники с характерным запахом, произрастающие в разных климатических зонах.



Рис. 4. Полынь обыкновенная

Экстракты полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.) проявляют антиоксидантные, антибактериальные, противоопухолевые и антигистаминные свойства благодаря наличию кофеилхинных кислот [16,17] (рисунок 4).



Рис. 5. Полынь Людовика

Полынь Людовика (*Artemisia Ludoviciana* Nutt.) широко применялась в традиционной медицине коренных народов некоторых стран для лечения репродуктивной, пищеварительной, мочевыделительной и нервной системы за счет наличия гидроксикоричных и гидроксибензойных кислот [18,19] (рисунок 5).



Рис. 6. Полынь кавказская

Полынь кавказская (*Artemisia caucasica* Wild / *Artemisia alpina* Pall. ex Willd.) распространена в Причерноморской Европе, в Предкавказье, Дагестане, в Закавказье (рисунок 6). Основной ареал находится во всех горных районах Северного Кавказа, особенно восточных [20,21]. Однако ее фитохимический состав до сих пор не описан в литературе.



Рис. 7. Полынь лечебная

Экстракты полыни лечебной (*Artemisia abrotanum* L.), богатые изохлорогеновой и розмариновой кислотами и кверцетином, проявляют антиоксидантную, антибактериальную, противогрибковую, антипролиферативную и цитотоксическую активность в отношении раковых клеток [22,23] (рисунок 7).



Рис. 8. Полынь эстрагон

Полынь эстрагонная, или эстрагон, тархун (*Artemisia dracunculus* L.) — многолетнее травянистое используют не только в медицинских целях, но и пищевой промышленности [24,25] (рисунок 8). Применяют в качестве ветрогонного, обезболевающего, противовоспалтельного средства,

при лечении микробных инфекций и нарушений метаболизма глюкозы, включая гипергликемию, сахарный диабет и связанные с ними метаболические синдромы. Эфирное масло, содержащее метилэвгенол, эстрагол, элемицин, терпинолен и другие, и флавоноиды (кверцетин, лютеолин, патулетин, кемпферол, изорамнетин, нарингенин, пиноцембрин, эстрагонозид и их гликозиды), фенольные кислоты (цихориновая, гидроксибензойная, хлорогеновая, кофейная, 5-О-кофеоилхиновая, 4,5-ди-О-кофеоилхинная кислоты и другие) и кумарины (герниарин, кумарин, эскулетин, эскулинин, капиллярин, 8-гидроксикапилларин, артемидин, 8-гидроксиартемидин, артемидинол) из экстрактов эстрагона используют для лечения кожных ран, раздражений, аллергической сыпи и дерматита [24].


Рис. 9. Полынь однолетняя

Химический состав единственного однолетнего вида полыни – полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) в основном представлен сесквитерпеноидами. Особое внимание уделяется артемизинину, признанному самым мощным и быстродействующим противомалярийным препаратом [26,27] (рисунок 9).

Одним из компонентов эфирного масла полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.) является монотерпеноид туйон, применяемый в медицине для лечения судорог, проблем, связанных с селезенкой и нарушениями мочеиспускания, а также при заживлении ран, обладает противомикробными, антиоксидантными, гепатопротекторными и нейропротекторными свойствами [28]. Терапевтические свойства эфирных масел полыни зависят от состава [29,30]. Однако стоит отметить, что содержание компонентов определяется видом растения и рядом других факторов (таблица 1).

Таблица 1 – Эфирномасличные компоненты в различных видах полыни (наличие или отсутствие указано по литературным данным)

Вид / Компонент	*A. absinthium* L.	*A. abrotanum* L.	*A. vulgaris* L.	*A. dracunculus* L.	*A. annua* L.	*A. herba-alba* Asso
Монотерпены						
α-,β-пинен	+[31–34]	+ [35]	+ [36]	+ [37,38]	+ [39,40]	+ [41–43]
α-,β-туйон	+ [31–34,44–46]	+ [35]	+ [36,47,48]	н.д.*	+ [37,40,45,49]	+ [41–43,50]
β-оцимен	+ [32,44,45]	+ [35,37]	+ [36]	+ [37,38,51]	+ [37]	н.д.
Камфен	+ [31,32,34]	+ [35,37]	+ [36,48]	+ [37,38,51]	+ [37,39,40,49]	+ [41–43,50]
Лимонен	+ [34]	+ [35]	+ [47]	+ [37,38,51]	+ [37]	н.д.
β-мирцен	+ [33,34]	н.д.	+ [36,38]	+ [37,38,51]	+ [31,37,39]	+ [42]
Сабинен	+ [33,34,44]	+ [35]	+ [36,47]	+ [38,51]	+ [37,39,40,49]	+ [41–43]
p-цимен	+ [34,52]	н.д.	н.д.	н.д.	+ [31]	+ [42,43,50]
Монотерпеноиды						
Борнеол	+ [34,44,46]	+ [35,37]	+ [47,53]	+ [51]	+ [37,39,45,49]	+ [41,43,50]
Терпинен-4-ол	+ [31,33,34,44,45]	+ [35]	+ [47]	н.д.	+ [40,49]	+ [42,43,50]
Камфора	+ [31,33,34,46]	+ [35,37]	+ [47]	н.д.	+[37,39,40,45,49]	+ [41–43,50]
Пинокарвон	+ [32]	н.д.	н.д.	н.д.	+ [45]	+ [42,50]
1,8-цинеол	+ [56,71]	+ [35]	+ [47]	+ [37,51]	+ [39,45,49]	+ [41,43,50]
Эстрагол	н.д.	н.д.	+ [47]	+[37,38,51]	н.д.	н.д.
Сесквитерпены и сесквитерпеноиды						
Бисаболол	+ [44]	+ [35,37]	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
α-гумулен	+ [44]	+ [35]	+ [36,53]	+ [51]	+ [40]	н.д.
Кариофиллен	+ [44,45,52]	+ [35]	+[36,47,48,53]	+ [51]	+ [39,40,45]	+ [41]
Спатуленол	н.д.	+ [35]	+ [36,47]	+ [37,51]	+ [39,40]	+ [42]
Цис-даванон	+ [31,32]	н.д.	+ [36,47]	н.д.	н.д.	+ [42]
Артемизинин	н.д.	+ [37]	н.д.	+ [37]	+ [37,54,55]	н.д.

* н.д. – нет данных

1.2 Способы экстракции БАВ из ЛРС

Определение БАВ в растительном сырье предполагает их предварительное извлечение. Важным этапом пробоподготовки является выбор растворителя и способа экстракции, влияющий на выход целевых компонентов и весь процесс в целом. Выбранный растворитель должен извлекать большее число БАВ, не взаимодействовать с аналитами, иметь низкую температуру кипения и быть доступным [3,56]. Выбор экстрагента зависит от физико-химических свойств аналитов (полярность, термостабильность и др.); сырье предварительно высушивают и измельчают.

Рассмотрим основные способы экстракции фенольных соединений и эфирномасличных компонентов из ЛРС.

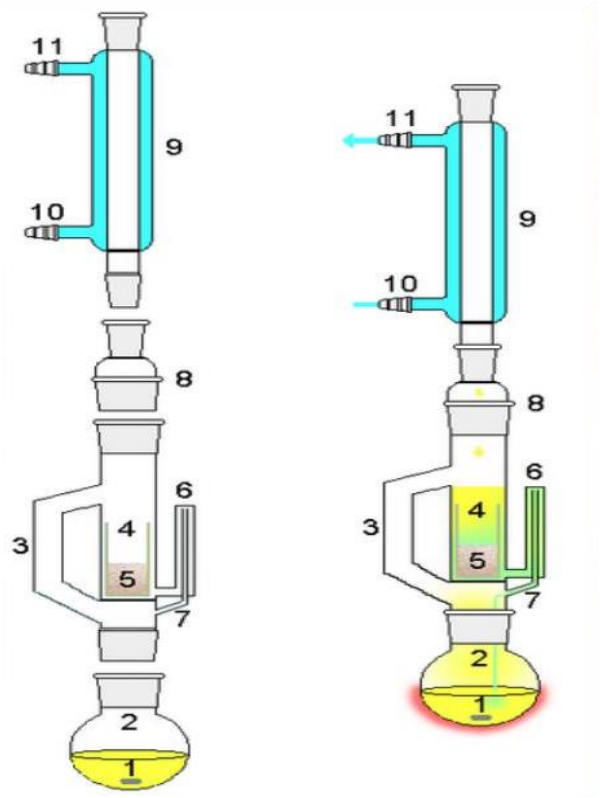
1.2.1 Традиционные способы экстракции

Для извлечения флавоноидов и фенольных кислот из ЛРС в соответствии с рекомендациями Государственной Фармакопеи РФ (ГФ) чаще всего используют кипячение в этиловом или метиловом спирте с обратным холодильником [57–60]. Выбор спирта в качестве экстрагента зависит от растворимости целевых аналитов и цели исследования. Однако возможная термодеструкция гликозидных и ацильных связей не позволяет определять фенольные соединения в нативном виде.

Целенаправленное разрушение связанных форм ФС при введении небольшого количества щелочи или кислоты для последующего гидролиза увеличивает выход экстракции за счет перехода связанных форм аналитов в свободные; иногда для этих целей используют ферменты [57]. Авторы работы [61] проводили щелочной гидролиз этанольного экстракта из цветков ромашки для разрушения гликозидных связей и деацилирования флавоноидов перед ВЭЖХ–УФ анализом, что позволило увеличить число идентифицируемых соединений. G. Haghi и др. [6] использовали щелочной гидролиз с гидроксидом

натрия для перевода различных ацетилированных производных апигенин-7-глюкозида в апигенин-7-глюкозид и определения его общего содержания. Далее кислотным гидролизом соляной кислотой получали агликон. Таким образом определили содержание свободного и общего апигенина и апигенин-7-глюкозида в метанольном, водно-метанольном и водном экстракте ромашки аптечной.

Традиционным способом извлечения фенольных соединений также является экстракция в аппарате Сокслета. Для этого экстрактор Сокслета (рисунок 10) с обратным холодильником (9) устанавливают на круглодонную колбу (2) с экстрагирующим растворителем (1). В центре аппарата находится резервуар, в который помещают гильзу (4) из плотного картона или бумаги, заполненную твёрдым образцом (5), из которого будет производиться экстракция. Растворитель нагревают до температуры кипения, он испаряется и, проходя по боковому отводу (3), попадает в обратный холодильник, где конденсируется и стекает в гильзу. Экстракция целевого вещества происходит до ее заполнения растворителем, и, как только уровень жидкости в гильзе достигает верхнего уровня сифона (6), экстракт сливается (7) в исходную колбу, и цикл повторяется снова. Таким образом, прибор позволяет производить многократную экстракцию за счёт повторного использования относительно небольшого объёма растворителя, при этом экстрагируемое вещество накапливается в основной колбе. Кроме того, гильза находится непосредственно над колбой и нагревается парами кипящего растворителя, что увеличивает эффективность экстракции даже труднолетучих компонентов.



1 – экстрагирующий растворитель с магнитной мешалкой, 2 – колба для кипячения экстрагента, 3- трубка для паров растворителя, 4 – гильза, 5 – сухая смесь, 6 – сифон, 7 – слив сифона, 8 – шлифовой переходник, 9 – обратный холодильник, 10, 11 – патрубки для холодной воды

Рисунок 10 – Экстрактор Сокслета

Такая экстракция занимает длительное время, требует относительно большого расхода растворителей, жесткого контроля условий проведения (температура, скорость перемешивания, чистота экстрагента, соотношение образец: растворитель, время проведения) для предотвращения окисления и деградации аналитов [62,63]. Дополнительная стадия концентрирования экстракта также осложняет пробоподготовку. Так, в работе [64] авторы определяли хлорогеновую, феруловую, кофейную, розмариновую, эллаговую кислоту, апигенин-7-глюкозид, апигенин, изорамнетин, лютеолин-4'-глюкозид и герниарин в метанольном экстракте из цветов ромашки аптечной методом ВЭЖХ-ДМД после проведения 25 циклов экстракции в аппарате Сокслета, промывки и сушки с дальнейшим перерастворением в метаноле. M. Bratty и др. [65] извлекали апигенин 80%-ным этанолом из цветков ромашки аптечной в аппарате Сокслета в течение 72 ч, упаривали на роторном испарителе под

вакуумом и определяли методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭ-ТСХ) для оценки цитотоксической противоопухолевой активности.

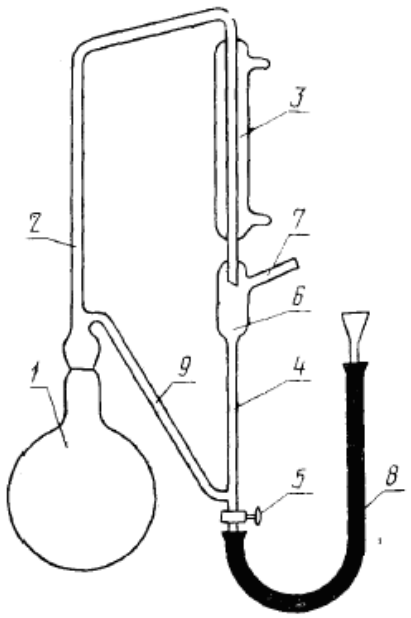
Наиболее простым в исполнении способом экстракции является мацерация. Для этого навеску сырья помещают в колбу, заливают растворителем и оставляют на некоторое время, от нескольких часов до нескольких суток [13,62,66,67]. Чтобы сократить продолжительность процесса и повысить его эффективность, используют нагревание или перемешивание [13,68–72]. Растворитель выбирают в зависимости от класса целевых соединений. Например, для извлечения флавоноидов обычно используют спирты или водно-спиртовые смеси различного состава. F. Sibul и др. [69] при определении флавоноидов и фенольных кислот в ромашке аптечной проводили мацерацию с 80%-ным метанолом в течение 90 мин при постоянном встряхивании. Методом обращено-фазовой ВЭЖХ–МС/МС в режиме градиентного элюирования удалось идентифицировать 25 компонентов: апигенин, апигенин-7-О-глюкозид, лютеолин, лютеолин-7-О-глюкозид, хинная кислота и 5-О-кофеоилхинная кислота и др.. Авторы работы [73] методом ВЭЖХ–ДМД определили в цветах ромашки аптечной апигенин-7-О-(4''-ацетил)-глюкозид, апигенин-7-О-(3''-ацетил)-глюкозид, апигенин-7-О-(6''-ацетил)-глюкозид, лютеолин, апигенин, эвпатолитин, хризоспленол D, хризосплентин после извлечения нагреванием пробы до 70°С в течение 20 мин в 70%-ном метаноле. Novakova, L. и др. [74] проводили мацерацию цветов ромашки 60%-ным метанолом встряхиванием в течение 30 мин, затем оставляли в темноте на 5 дней. Далее раствор фильтровали и анализировали методом УВЭЖХ–МС/МС. Таким образом удалось идентифицировать хлорогеновую и кофейную кислоты, умбеллиферон, кверцетин-3-глюкозид, рутин, апигенин-7-глюкозид, кверцитрин, кверцетин, лютеолин, кемпферол, апигенин и изорамнетин. Для сравнения составов экстрактов полыни лечебной и полыни эстрагон навески сырья выдерживали в течение 3 дней с 70%-ым этанолом при комнатной температуре [75]. Суммарное содержание фенольных соединений в обоих экстрактах составило около 14,5

мкг/г, однако по результатам ВЭЖХ-УФ-МС-анализа глюкозиды кофейной кислоты обнаружены только в экстракте полыни лечебной, а 5-феруолхинная кислота – в полыни эстрагон. Авторы работы [76] интенсифицировали мацерацию полыни однолетней с 70%-ым метанолом нагреванием при 60°С, что позволило сократить продолжительность процесса до 20 часов. По результатам ВЭЖХ-анализа, удалось извлечь 32 полифенольных соединения, среди которых были оксиметилированные флавоны, дикофеилхинные кислоты, гликозиды лютеолина и кверцетина. Сравнение эффективности экстракции фенольных соединений из полыни травянистой (*Artemisia herba-alba* Asso) в этанол показало, что при использовании аппарата Сокслета за 6 часов извлекается 14,3 мг/г фенольных соединений, в то время как мацерация при 30°С в течение 24 часов позволяет извлечь 35,7 м/г [77].

Настои (водные экстракты) достаточно популярны в народной медицине не только как ароматные чаи, но и как препараты, обладающие антиоксидантной активностью и терапевтическим действием [78]. Их часто принимают для лечения болезней ЖКТ в качестве спазмолитических, антисептических, противовоспалительных средств и т.д. Как было отмечено ранее, флавоноиды и фенольные кислоты растворимы в воде, особенно в горячей. Поэтому для исследования компонентного состава растительного образца готовят горячий настой. Навеску высушенной ромашки или фильтр-пакет заливают свежекипяченой водой и настаивают некоторое время, полученный раствор фильтруют и анализируют преимущественно хроматографическими методами или проводят исследования биологическими и другими методами [79–82]. Авторы [80] провели ВЭЖХ–МС/МС определение гиперозида, патулетин-7-О-глюкозида, лютеолин-7-О-глюкозида, апигенин-7-О-глюкозида после настаивания головок и цветов ромашки в горячей деионизованной воде в течение 10 мин. Sentkowska, A. и др. анализировали полученные аналогичным образом водные настои цветов ромашки [83] и ромашки из фильтр-пакетов [79] методом ВЭЖХ–МС/МС и определяли антиоксидантную активность последних. Авторы работы [84] методом ВЭЖХ–ДМД–МС/МС идентифицировали 12 фенольных

соединений в экстрактах коммерческих образцов ромашки разных производителей, используя для приготовления настоев рекомендации соответствующих изготовителей.

Для извлечения эфирномасличных компонентов из лекарственного растительного сырья обычно используют способ гидродистилляции [85–87], основанный на проникновении паров растворителя в клетки растения, высвобождении эфирномасличной эссенции и отгонке вместе с паром, как правило, в аппарате Клевенджера (рисунок 11). В колбу (1) помещают навеску пробы, заливают водой, соединяют с паропроводной трубкой (2) и заполняют водой градуированную (4) и сливную (9) трубки через кран (5) при помощи резинового шланга с воронкой (8).



1 — колба с деионизованной водой и пробой; 2 — паропроводная изогнутая трубка; 3 — холодильник; 4 — градуированная трубка-приемник; 5 – спускной кран; 6 – расширение приемника; 7 – боковая трубка приемника; 8 – резиновый шланг; 9 – сливная трубка

Рисунок 11 – Аппарат Клевенджера для гидродистилляции ЭФК

Группа исследователей под руководством K.B. Baczek [64] в экстрактах из ромашки, полученных после гидродистилляции в аппарате типа Клевенджера в течение 3 часов ГХ-МС определила α-пинен, сабинен, α-терпинен, 1,8-цинеол, γ-

терпинен, оцимен, р-цимен, полынь кетон, полыни спирт, β-кариофиллен, β-фарнезен, α-терпинеол ацетат, α-терпинеол, β-селинен, α- фарнезен, гермакрен В, оксид кариофиллена, неролидол, спатуленол, бисаболол оксид В, α-бисаболол, хамазулен, бисаболол оксид А методом. В работе [87] авторы проводили экстракцию в аналогичных условиях для дальнейшего изучения свойств эфирного масла (антибактериальные, противовирусные, противогрибковые и т.д.).

В работе [88] эфирное масло полыни горькой получали гидродистилляцией по Клевенджеру в соответствии с рекомендациями Европейской Фармакопеи: к 150 граммам растительного сырья добавляли 1 литр дистиллированной воды и кипятили в течение 3 часов. С помощью делительной воронки масло отделяли от водного слоя и затем высушивали добавлением безводного сульфата натрия для устранения следов влаги. Газохроматографическим анализом идентифицировали 34 соединения, основными среди которых были сесквитерпеноиды. Однако такой способ не лишен недостатков: длительность экстракции, возможность деградации некоторых термолабильных соединений, из-за чего состав экстракта может быть непостоянным.

Аналогичный принцип лежит в основе паровой дистилляции. Отсутствие прямого контакта между растительным сырьем и жидкой фазой предотвращает деградацию или химические изменения аналитов и способствует интенсификации процесса. Например, при одинаковых соотношениях сырье: экстрагент для получения эфирного масла полыни однолетней методом гидродистилляции авторам работ [89,90] потребовалось 3 часа, тогда как в исследовании [91] длительность экстракции водяным паром составила 90 мин.

Увеличить выход ЭМК можно сочетанием различных способов экстракции. Так, в работе [92] сравнивали компонентный состав эфирных масел полыни эстрагон, полученных классической гидродистилляцией и в сочетании с ультразвуковой обработкой. Образцы анализировали методом ГХ-МС. Установлено, что предварительная УЗ-обработка в течение 30 мин при мощности 350 Вт способствовала увеличению выхода некоторых компонентов:

содержание эстрагола повысилось с 76,67% до 83,06%, тогда как (E)-β-оцимен лучше извлекался без дополнительной обработки.

Побочным продуктом при извлечении эфирных масел из лекарственных растений являются ароматные воды (гидролаты) – эмульсии масел в воде, схожие с маслами по компонентному составу и свойствам [93–97]. Однако концентрации эфирномасличных компонентов в них ниже, они не вызывают головных болей или контактного дерматита, и их можно непосредственно наносить на кожу и принимать внутрь [98,99]. В большей степени в ароматной воде содержатся оксигенированные соединения: монотерпеновые и сесквитерпеновые спирты, альдегиды и кетоны [94,99,100]. Для расширения и/или ограничения практического применения ароматных вод требуется корректная оценка содержания ЭМК методом ГХ-МС после предварительного извлечения аналитов из водной в органическую фазу методами жидкость-жидкостной (ЖЖЭ) [101–104], твердофазной (ТФЭ) [94,102] или парофазной [102] экстракции.

Так, в ароматной воде ромашки аптечной после ЖЖЭ этилацетатом были идентифицированы оксид бисаболола А, оксид бисаболола В и 4-метилангелицин [12], петролейным эфиром – *цис*-анетол, α-оксид бисаболола А, α-оксид бисаболона А, карвакрол, карвон, 1,8-цинеол, 7-метокси-кумарин, нео-дигидрокарвеол, транс-дигидрокарвон, дилл-апиол, линалоол, пиперитенон, пулегон, α-терпинеол, тимол и *м*-ксилол [13]. Содержания компонентов в обоих случаях рассчитывали методом внутренней нормировки по площадям пиков, что усложняет сравнение эффективности извлечения ЭМК методами ЖЖЭ. Для интенсификации процесса и повышения степени концентрирования в систему вводят добавку другого органического растворителя (диспергента), но при этом возникает необходимость в оптимизции параметров дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции, которую часто проводят с использованием различных методов статистического моделирования: полнофакторного анализа [105,106], искусственных нейронных сетей [107] и других.

В целом состав эфирных масел ЛРС может быть связан с различными биотическими и абиотическими факторами, включая генетику, физиологию

(онтогенетическая фаза, орган растения) и окружающую среду (температура, влажность, интенсивность солнечной радиации, продолжительность светового дня и др.), технологию обработки, выделения эфирного масла и/или условия хранения [64,87,108].

При правильном подборе растворителя традиционные методы извлечения БАВ являются достаточно эффективными, но проигрывают современным по длительности. Недостатком традиционных методов экстракции БАВ из ЛРС также является сильное влияние мешающих компонентов.

1.2.2 Ультразвуковая экстракция

Эффективным способом извлечения флавоноидов и фенольных кислот из ЛРС является ультразвуковая экстракция (УЗЭ). Возникающий в процессе звукокапиллярный эффект не только увеличивает скорость вытеснения пузырьков воздуха, но и создает условия для их растворения в жидкости. В результате поглощения ультразвуковой энергии возникает тепловое воздействие. Интенсификация процесса происходит за счет кавитационного эффекта (образование в жидкости большого числа пульсирующих пузырьков с паром, газом или их смесью). В жидкости при распространении ультразвуковой волны возникает переменное звуковое давление, амплитуда которого достигает нескольких атмосфер. Жидкость испытывает сжатие и растяжение, образуются разрывы или пузырьки, которые быстро схлопываются; возникают зоны высокого локального давления, образуются сферические ударные волны, появляются микропотоки. Вследствие этих процессов происходит механическое разрушение поверхности твердого тела [62,63,85,109].

В качестве растворителя при ультразвуковой экстракции флавоноидов и фенольных кислот из ЛРС обычно используют метанол, этанол или их водно-спиртовые смеси [10,13,71,72,110–114]. Оптимальное время экстракции – 30 мин, что более экспрессно, чем при традиционных способах [85,86].

В работе [115] сравнивали эффективность извлечения фенольных соединений из ромашки ультразвуковой экстракцией при температуре 40°С и 60°С и мацерацией при 100°С и 120°С. Полученные экстракты анализировали методом ВЭЖХ–МС/МС. Результаты показали, что для извлечения большинства аналитов более предпочтительна ультразвуковая экстракция, кроме того, повышение температуры до 60°С приводило к увеличению выхода целевых компонентов без их деградации. Y. Kobayashi и др. [116] сравнивали эффективность ультразвуковой экстракции при использовании в качестве экстрагента этанола и этилацетата. По результатам ВЭЖХ–УФ определения оценивали выход флавоноидов по количеству апигенина и апигенин-7-О-глюкозида. Выявлено, что применение этанола увеличивает степень извлечения почти в три раза.

Авторы [72] изучили эффективность ультразвуковой экстракции ФС из листьев стевии медовой во времени и при разных содержаниях спирта в экстрагенте. С увеличением доли спирта до 50% и УЗ-воздействии до 5 мин суммарное содержание ФС было максимальным – 91,57±8,8 мг-экв галловой кислоты/г. Huang C. с соавторами [117] оценили выход суммарного содержания ФС из листьев стевии в зависимости от частоты излучения, времени, температуры и состава растворителя. Увеличение содержания спирта в экстрагенте повышало извлечение аналитов, а время и частота УЗ-излучения практически не влияли на процесс; оптимальными условиями извлечения целевых соединений были экстракция 40%-ым этанолом при частоте 22 кГц и 60°С в течение 20 мин.

УЗ-экстракцию ФС из полыни лечебной проводили в работах [118] и [119]. При УЗ обработке в течение 30 мин при 40°С в 70%-ный этанол удалось извлечь 13 аналитов, общее содержание ФС по методу Фолина-Чокалтеу составило 12,7 мг-экв галловой кислоты/г. При экстракции в 50%-ный этанол при 25°С длительностью 1 час были идентифицированы 8 компонентов при суммарном

содержании ФС 723,32 мкг-экв галловой кислоты/мл по методу Фолина-Чокалтеу.

К преимуществам данного метода экстракции можно отнести достаточную экспрессность, широкий диапазон выбора растворителей, простое и недорогое оборудование.

1.2.3 Микроволновая экстракция

Наличие полярных групп в структуре БАВ позволяет использовать для их извлечения микроволновое излучение. Нагрев пробы обусловлен двумя одновременно возникающими явлениями: диполярными вращениями молекул и ионной проводимостью. В качестве экстрагентов используют полярные растворители: этанол, метанол и воду [62,63,86,120–122]. Основным преимуществом этого способа является то, что вся энергия микроволнового излучения направлена непосредственно на нагревание пробы [62,121]. При анализе обычно выбирают мощность в диапазоне 300 – 450 Вт, так как при более высоких значениях возможен разрыв клеточной стенки и извлечение матричных компонентов в растворитель вместе с целевыми соединениями; также возможно их разрушение [123]. Важно учитывать время экстракции: при его увеличении количество извлеченных компонентов возрастает, но повышается и возможность их деструкции [124].

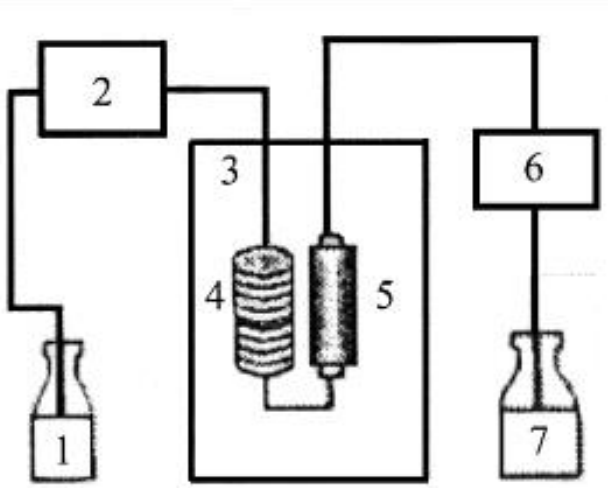
A. Cvetanovic и др. [125] проводили микроволновую экстракцию ФС из ромашки аптечной при мощности 480 Вт в течение 40 мин с 70%-ным этанолом в качестве растворителя. Методом УВЭЖХ–ДМД–МС/МС удалось идентифицировать 24 целевых соединения: флавоноиды, их гликозиды, фенольные кислоты и их производные. M.F.S. Ramos с соавторами [126] сравнивали эффективность извлечения флавоноидов из ромашки мацерацией, перколяцией и микроволновой экстракцией. В качестве растворителя

использовали этанол. Более эффективной оказалась микроволновая экстракция в течение 5 мин при минимальной мощности излучения.

Микроволновая экстракция флавоноидов и фенольных кислот из ЛРС имеет ряд преимуществ перед другими способами. Выигрыш во времени достигается за счет увеличения температуры кипения растворителя с повышением давления и равномерного нагрева пробы. Результаты анализа более воспроизводимы за счет контроля условий анализа. Степень извлечения можно повысить при правильном подборе растворителя, мощности излучения и температурного режима. Перспективным направлением пробоподготовки является сухая экстракция, то есть без участия экстрагента [33,127,128]. В ряде публикаций ее эффективность считают сопоставимой с результатами, получаемыми по Фармакопее [33,129–135].

1.2.4 Экстракция при повышенных температуре и давлении

Перспективным способом извлечения фенольных соединений из растительных материалов является субкритическая экстракция, причем чаще всего в качестве растворителя используют воду. При комнатной температуре вода слишком полярна для многих органических соединений, но при повышенной становится менее полярной, экологически чистой альтернативой органическому растворителю. При нормальных условиях вода имеет высокую диэлектрическую проницаемость, которая уменьшается с увеличением температуры, что повышает растворимость органических неполярных соединений и усиливает массообмен [136]. Экстракцию проводят при нагревании от 100°С до критической температуры на специальной установке (рисунок 12) при достаточно высоком давлении для достижения необходимых физико-химических свойств экстрагента. В этих условиях вода сохраняет жидкое состояние, но имеет низкую вязкость и малое поверхностное натяжение. Необходимо правильно подобрать условия, чтобы извлекать как можно больше веществ, но не допустить их деградации.



1 — колба с экстрагентом; 2 – насос; 3 — термостат; 4 — контур предварительного нагрева; 5 – ячейка-экстрактор; 6 – ограничитель противодавления; 7 – колба для сбора экстракта

Рисунок 12 – Установка для субкритической экстракции

Cvetanovic A. и др. [125] проводили субкритическую экстракцию ФС при температуре 200°C и давлении 1,6 бар в течение 40 мин с использованием воды и определяли флавоноиды и фенольные кислоты методом УВЭЖХ–ДМД–МС/МС. Для сравнения использовали экстракцию в аппарате Сокслета, микроволновую и ультразвуковую. Наибольшее общее содержание фенольных соединений в ромашке аптечной было достигнуто при субкритической экстракции, однако максимальное извлечение флавоноидов происходит в аппарате Сокслета.

Для извлечения фенольных компонентов субкритической экстракцией возможно использовать водно-спиртовые смеси различного состава. L. V. Pavlova с соавторами [137] сравнивали качественный и количественный состав экстрактов ромашки после субкритической экстракции водой и 10, 50, 70%-ным этанолом при температурах 150 и 200°C. Идентификацию компонентов проводили методами УФ-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, ГХ-МС и гравиметрически. Максимальный выход компонентов получен при субкритической экстракции 50%-ным этанолом при 150°C. Использование субкритической воды при 200°C и 5 МПа целесообразно в случае извлечения нелетучих БАВ. Из анализа сухих остатков следует, что оптимальная

экстракция лютеолина и апигенина (основные нелетучие БАВ) в этих условиях происходит 10% раствором этанола в воде. В полученных извлечениях методом ГХ–МС идентифицированы около 90 компонентов, среди которых основными ЛОС были 7-метоксикумарин, оксид бисаболола и хамазулен. Максимальное извлечение ЛОС из цветков ромашки происходило при 150°С и 5 МПа с экстрагентом 50% этанола в воде. После дериватизации нелетучих БАВ в экстрактах идентифицированы фенольные кислоты, оксифенолы, кумарины, углеводороды, глицерол и другие соединения.

Извлечение ФС из листьев стевии медовой по их суммарному содержанию оценивали в работах [15,138–141]; показано, что выходы ФС в условиях МВЭ, СКЭ и мацерации сопоставимы [141]. При этом в водных экстрактах идентифицирован 31 компонент с суммарным содержанием ФС 67±1 мг/г, а в водно-этанольных – 35 компонентов с содержанием ФС 68±4 мг/г. Анализ компонентного состава экстрактов показал наличие лимонной и кофейной кислот, кверцетин-3-О-арабинозида / кверцетин-3-О-ксилозида, маннозилглюкозида кауреновой кислоты только в водном, а кофеилхинной, дикофеилхинной и диметоксицинамоилкофеилхинной кислот, изомеров этилхлорогената, кверцетина – в водно-этанольном экстрактах [141].

Авторы [140] оценивали общее содержание ФС, флавоноидов, стевиолгликозидов и антиоксидантной активности экстрактов из стевии в зависимости от параметров СКЭ (температура, давление, состав экстрагента). Наибольшие выходы активных компонентов наблюдали при использовании 70% этанола, а увеличение времени экстракции более 10 мин и повышение давления выше 50 бар практически не оказывали влияния; суммарное содержание ФС максимально извлекалось при 125°С – 310,41±0,28 мг-экв галловой кислоты/г экстракта. Значения антиоксидантной активности экстрактов по методу DPPH (по реакции с 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом) варьировали в диапазоне от 8,07±0,27 до 11,46±0,28 ммоль-экв-тролокса/г экстракта и не коррелировали с суммарными содержаниями ФС, флавоноидов и стевиолгликозидов.

Перспективно использование в качестве экстрагента углекислого газа [142,143] благодаря химической стабильности, негорючести, невысокой стоимости, относительно низкой токсичности и практически отсутствию поверхностного натяжения. Он является неполярным эстрагентом, и поэтому хорошо извлекает неполярные эфирномасличные компоненты. На рисунке 13 представлена принципиальная схема установки для докритической CO_2-экстракци. В экстракционную ёмкость (3) закладывают измельчённое сырьё, и экстрактор герметично закрывают. Через конденсатор (1) из стандартного углекислотного баллона (5) в накопительную ёмкость (2) закачивается углекислота и через систему вентилей подаётся в экстрактор (3). Протекая через растительное сырьё в экстракторе, углекислота вымывает гидрофобную составляющую растительной клетки и в виде мисцеллы поступает в испаритель (4), где происходит процесс разделения мисцеллы на экстракт и углекислоту, которая вновь закачивается в систему.

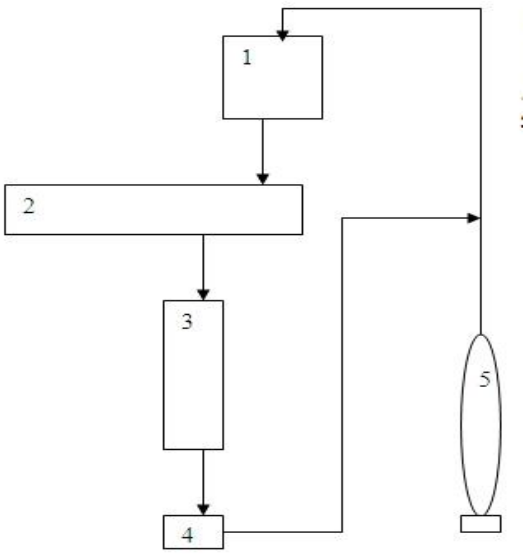


Рисунок 13 – Установка для субкритической экстракции с углекислым газом в качестве экстрагента

Благодаря достаточно мягким и щадящим условиям достигается высокая эффективность извлечения термолабильных аналитов.

Альтернативой жидкостной экстракции может быть экстракция сверхкритическими флюидами – это особое состояние вещества, промежуточное по свойствам между жидкостью и газом, которое достигается при превышении критических значений давления и температуры; для CO_2 – 31°C и 7,4 МПа. В этой области экстрагент обладает одновременно растворяющей способностью жидкости и транспортными характеристиками газа: низкой вязкостью, легко варьируемой плотностью, высокими коэффициентами диффузии. При изменении температуры и давления сверхкритического флюида легко изменять его плотность и, соответственно, пропускную способность, что позволяет подобрать условия для конкретной задачи. Важным преимуществом является то, что при нормальных условиях CO_2 – газ, поэтому по окончании экстракции и сбросе температуры и давления он испаряется, и на выходе остается 100% чистый продукт, который может храниться долгое время [62,63,85,86]. Схема установки представлена на рисунке 14.

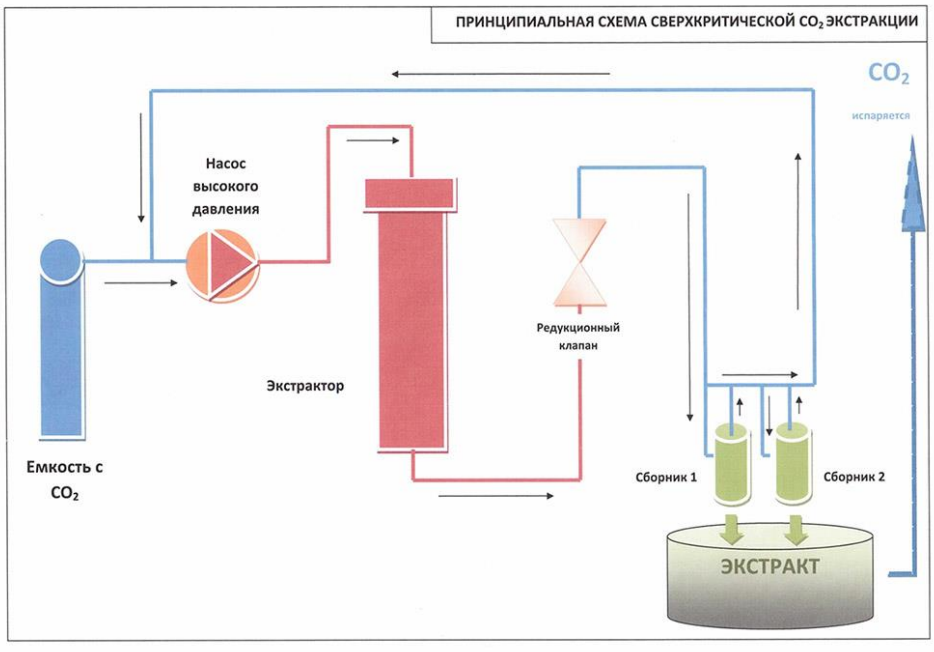


Рисунок 14 – Установка для сверхкритической флюидной экстракции

В работе [144] методом ГХ–МС в экстрактах, полученных CO_2-экстракцией из ромашки (при давлении 250 бар, температуре 50°C в течение 180

мин) определили β-фарнезен, спатуленол, оксид бисаболола Б, оксид бисаболола, герниарин, хамазулен, оксид бисаболола А, ен-ин-дициклоэфир, N-гексадекановую кислоту, 9,12-октадекадиеновую кислоту и матрикарин.

P. Kotnik и др. [145] сравнивали эффективность извлечения бисаболола, матрицина и хамазулена из головок цветков ромашки сверхкритической флюидной экстракцией (варьировали давление (100–250 бар) и температуру (30–40°C), гидродистилляцией, мацерацией и экстракцией в аппарате Сокслета. Самое высокое содержание активных компонентов получены в случае сверхкритической флюидной экстракции при давлении 250 бар и температуре 40°C.

Ghasemi и др. [146] проводили сравнительный анализ эфирных масел полыни Зибера (*Artemisia sieberi* Besser), полученных гидродистилляцией и сверхкритической флюидной экстракцией в условиях: давление 30,4 МПа, температура 45°C, продолжительность обработки 25 мин. Основными компонентами эфирного масла, полученного при гидродистилляции, были камфора (54.7%), камфен (11.8%), 1,8-циенол (9.9%), β-туйон (5.7%) и α-пинен (2.5%). В CO_2-экстракте обнаружено высокое содержание камфоры (около 80%), что характеризует сверхкритическую флюидную экстракцию как более селективный метод.

Основными преимуществами таких подходов являются сокращение объема растворителя и пробы и уменьшение времени процесса. Варьируя условия процесса (температуру, состав растворителя, давление), можно повышать селективность извлечения аналитов определенного класса, что расширяет возможности получения экстрактов с определенными свойствами.

Каждый из способов экстракции имеет свои достоинства и недостатки, и конкретный выбор зависит от задачи исследования.

1.3 Хроматографическое определение БАВ в ЛРС

Хроматографические методы являются самыми распространенными, экспрессными и наиболее чувствительными для определения БАВ в ЛРС [57,147].

1.3.1 ВЭЖХ определение

Высокоэффективная жидкостная хроматография – наиболее эффективный метод разделения и определения фенольных соединений в ЛРС. Для получения правильных результатов важно подбирать оптимальные условия хроматографирования: режим элюирования, состав подвижной фазы, температуру и длину колонки, размер и состав сорбента. Также на результаты анализа влияет способ детектирования, чистота образцов и наличие мешающих компонентов [147].

Для разделения фенольных соединений используют колонки длиной 10–30 см, диаметром 2.1–4.6 мм, с размером частиц сорбента 2.6–5 мкм. Обычно хроматографирование флавоноидов и фенольных кислот гидрофобной природы проводят в обращено-фазовом режиме на колонках с привитыми группами C_{18}. В качестве подвижной фазы используют смесь воды с метанолом [14,66,69,148] либо ацетонитрилом [64,67,72,73,125,141,149,150] с добавлением муравьиной, уксусной или фосфорной кислот в качестве модификаторов для подавления диссоциации фенольных соединений. В работе [115] при определении фенольных кислот ромашки в качестве подвижной фазы использовали водно-метанольную смесь с добавлением 0,1%-ной муравьиной кислоты, при определении флавоноидов – аналогичную смесь с ацетонитрилом. Можно использовать режим изократического [151] и градиентного элюирования [68,69,80]. X. Xie и др. [73] определяли флавоноиды ромашки с пошаговым режимом элюирования смесью уксусная кислота в воде – ацетонитрил для лучшего разделения аналитов. Таким образом были идентифицированы и

определены количественно апигенин-7-О-(4''-ацетил)-глюкозид, апигенин-7-О-(3''-ацетил)-глюкозид, апигенин-7-О-(6''-ацетил)-глюкозид, лютеолин, апигенин, эвпатолитин, хризоспленол D и хризосплентин.

Авторы работы [152] проводили ВЭЖХ-УФ-анализ метанольного экстракта полыни горькой (*A. absinthium* L.) при длине волны поглощения 280 нм с использованием колонки Hypersil ODS (C18, 250 × 4.6 мм, 4 мкм) при температре 30°C. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (элюент А) и воды с добавлением 0.2%-ой серной кислоты (элюент Б) в градиентном режие элюирования: 0–12 мин 15–40% А, 12–14 мин 40–60% А, 14–18 мин 60–80% А, 18–20 мин 80–90% А, 20–24 мин 90–100% А, 24–28 мин 100% А. В этих условиях было обнаружено 10 фенольных кислот, в том числе галловая, хлорогеновая, розмариновая, ванилиновая кислоты.

В качестве детекторов при определении фенольных соединений можно использовать УФ-, диодно-матричный детектор и масс-спектрометрический. Жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором позволяет регистрировать спектр поглощения соединения в широком диапазоне длин волн и определять максимумы поглощения. Так, в работе [153] исследовали содержание флавоноидов и фенольных кислот в экстрактах ромашки методом ВЭЖХ–УФ. Идентификацию компонентов проводили при длине волны 280 нм и определили 15 аналитов: хлорогеновую, неохлорогеновую, кофейную кислоты, кверцетин-7-О-глюкозид и др. Авторы [125] анализировали экстракт ромашки методом ВЭЖХ–ДМД в режиме градиентного элюирования с подвижной фазой 0,2%-ная муравьиная кислота: ацетонитрил. Для подтверждения идентификации проводили анализ в аналогичных условиях методом ВЭЖХ–ДМД–МС/МС. Таким образом было установлено содержание 22 соединений: апигенин-7-О-глюкозида, кверцетин-3-глюкозида, лютеолина, эпикатехина и др.. N. Mulinacci и др. [154] исследовали экстракт цветов ромашки аптечной методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. В качестве подвижной фазы использовали смесь воды с добавлением трифторуксусной кислоты при pH 2.5 и ацетонитрил в режиме градиентного элюирования. Идентификацию проводили в диапазоне

длин волн 200–400 нм. Для основных полифенольных соединений, присутствующих в различных частях цветов, сравнивали результаты с данными спектров, полученных методом ВЭЖХ-МС в аналогичных условиях. В работе [14] методом ВЭЖХ-МС анализировали метанольный экстракт стевии на колонке с силикагелем, модифицированным бифенилом, в качестве подвижной фазы использовали 0,005%-ный водный раствор муравьиной кислоты и метанол в градиентом режиме. Помимо 3-кофеилхиной (35.5 мкг/г), 5-кофеилхинной (44.3 мкг/г), 4-кофеилхинной (70.3 мкг/г), 3,5-дикофеилхинной (145.6 мкг/г), 3,4-дикофеилхинной (28.6 мкг/г) и 4,5-дикофеилхинной (37.2 мкг/г) кислот идентифицированы изомеры дикофеилхинных кислот, 5-*p*-кумароилхинную и кофеилферуилхинные кислоты, кофеилшикимовые и трикофеилхинные кислоты.

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием является наиболее чувствительным методом. Обычно ионизацию проводят электрораспылением. Масс-спектрометрическое детектирование можно проводить с разными анализаторами: квадрупольным [68,69], времяпролетным [155], с ионной ловушкой [125].

В методе ВЭЖХ–МС с ионизацией электроспреем можно работать в режиме «*positive*» или «*negative*», или сразу в обоих. В работе [151] проводили ВЭЖХ–УФ–МС/МС–анализ метанольного экстракта ромашки в изократическом режиме (ацетонитрил: вода, 30:70) с ионизацией электрораспылением в одновременном режиме «*positive*» и «*negative*».

Фенольный профиль полыни лечебной (*A. abrotanum* L.) изучен в работе [118] методом ВЭЖХ-УФ-МС. Для анализа использовали хроматографическую колонку Zorbax C18 (100 × 3.0 мм, 3.5 мкм) при температуре 48°C и подвижную фазу, состоящую из метанола и 0.1%-го водного раствора уксусной кислоты. УФ-детектирование проводили при 330 и 370 нм, масс-спектры при ионизации электрораспылением регистрировали в режиме отрицательной ионизации. Идентифицированы 16 фенольных БАВ, среди которых были синаповая,

феруловая, *п*-кумаровая кислоты, а также рутин, лютеолин, кверцитрин, кверцетол, апигенин.

В последнее время часто используют метод ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией. Это позволяет расширить круг идентифицируемых соединений и повысить надежность идентификации [74,84,115,156]. Так, в водно-метанольном экстракте стевии медовой S. Y. Lee и K. Shaari [148] при ВЭЖХ-МС/МС анализе на колонке С18 в градиентном режиме элюирования водой и метанолом, подкисленными муравьиной кислотой (0.1%), обнаружили более 50 метаболитов, включая фенольные кислоты, флавоноиды и терпеноиды. Сочетание детекторов ДМД и МС/МС [157] позволило изучить широкий полифенольный профиль 12 видов полыни, произрастающих в Сибири. ДМД-спектры получали в диапазоне 200-600 нм. Для масс-спектрометрического определения с ионизацией электрораспылением были установлены следующие параметры: температура капилляра 350°С, напряжение 3 кВ («*positive*») для кумаринов и -4.5 кВ («*negative*») для флавоноидов, диапазон сканирования *m/z* 100-1900. В ходе анализа удалось обнаружить более 100 соединений различных классов. Среди идентифицированных веществ было 8 кофеилхинных кислот, 24 производных лютеолина, представленных в виде моно- и дигликозидов, апигенин и его гликозиды, а также халконы и кумарины. Упоминается о присутствии в четырех видах полыни биомаркера эупатилина.

Таким образом, метод ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием позволяет получить полную информацию о качественном и количественном составе фенольных соединений в ЛРС. Это удобный, достаточно простой и универсальный метод для определения как агликонов, так и гликозидов, не требующий специальных дополнительных операций пробоподготовки.

1.3.2 Газохроматографическое определение

Метод газовой хроматографии применяется для качественного и количественного анализа эфирномасличных [144,153,158] и легколетучих компонентов [137] с использованием 30-ти или 60-ти метровых капиллярных неполярных колонок с неподвижной фазой состава: 95% диметилполисилоксана и 5% фенила или дифенила, например, HP-5MS и DB5. Анализ проводят при программированном нагреве колонки [144,158].

Авторы работы [159] методом ГХ-МС изучали состав эфирных масел трех различных видов полыни, произрастающих в Саудовской Аравии. Хроматографическое разделение компонентов проводили на капиллярной колонке с 95% полидиметилсилоксана и 5% полидифенилсилоксана в градиентном режиме: 60°C (1 мин), нагрев до 230°C со скоростью 3°C/мин, изотерма в течение 12.3 мин при 230°C. Температура инжектора – 230°C, ионного источника – 230°C, энергия ионизации – 70 эВ, диапазон сканирования *m/z* 40–500. В результате анализа удалось обнаружить около 50 соединений, входящих в состав эфирных масел полыни, основными среди которых были сесквитерпены – *цис*-даваноп, хамазулен, спирт линалоол, – а также камфора и ациклические кетоны – 2-нонанон и 2-ундеканон. В составе эфирного масла полыни горькой обнаружено около 75 компонентов, из которых большинство относилось к классу монотерпеновых соединений. Анализ экстракта проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в диапазоне сканирования *m/z* 40–400 а.е.м. Основными компонентами эфирного масла были камфора, терпинен-4-ол, линалоол, α-пинен, а также хамазулен, отвечающий за синюю окраску раствора [160].

Bahmani и др. [92] анализировали эфирное масло полыни эстрагон (*A. dracunculus* L.) методом ГХ-МС в диапазоне сканирования *m/z* 20–500 а.е.м. Около 76% эфирного масла составлял эстрагол, в меньших количествах были обнаружены сабинен, лимонен, оптические изомеры β-оцимена и β-пинен. В эфирном масле надземных частей полыни обыкновенной (*A. vulgaris* L.) при ГХ-

МС-анализе идентифицировали более 100 соединений, основными из которых были изомеры туйона, сабинен, 1,8-цинеол, камфора, α- и β-даванон [161]. Авторы работы [162] исследовали эфирные масла полыни однолетней, эстрагон, лечебной, сантоники и скопарии, выращенных в Никитинском ботаническом саду города Крым. Основными компонентами во всех случаях были α- и β-пинен, камфен, изомеры β-оцимена, α- и β-цитраль и β-мирцен. Полынь однолетняя в больших количествах содержала туйон и камфору, эстрагон – цинеол и эстрагол, сантоника и лечебная – *цис*-хризантенол, скопария – капиллен.

Оптимизация условий ГХ-МС анализа и наличие библиотек масс-спектров позволяют определять в ЛРС большое число соединений различных классов. Однако ограниченное число стандартных образцов и их недоступность существенно затрудняют сопоставление опубликованных данных.

Помимо ГХ-МС, анализ растительных экстрактов можно проводить методом ГХ–ПИД. Так, в работе [64] авторы использовали ГХ–ПИД для количественного анализа эфирного масла из цветов ромашки аптечной, а ГХ–МС – для качественного.

Известны случаи использования для этих целей полярных колонок с полиэтиленгликолем. Так, в работе [84] методом ГХ–ПИД на двух разных колонках анализировали эфирное масло ромашки аптечной, полученное при гидродистилляции в аппарате типа Клевенджера в течение 3 ч. Идентификацию проводили по индексам удерживания относительно эталонов, библиотек масс-спектров и литературных данных. Количественный состав эфирного масла ромашки аптечной рассчитывали методом нормировки по хроматограмме, полученной при анализе на неполярной колонке. Таким способом в масле было идентифицировано 15 соединений.

ГХ-МС определение фенольных соединений в составе экстрактов используют достаточно редко, что обусловлено трудностями при проведении анализа за счет их термолабильности и низкой летучести. Поэтому для реализации анализа необходима предварительная дериватизация аналитов, что не всегда возможно и значительно усложняет и удлиняет процесс

пробоподготовки образцов. В работе [137] проводили дериватизацию ФС этанольного экстракта ромашки аптечной BSTFA (N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид), извлекали производные хлороформом и анализировали методом ГХ-МС. Это позволило значительно расширить круг идентифицируемых соединений без использования стандартных образцов, но усложнило процесс пробоподготовки.

Кроме того, в этом случае возможно уменьшение летучести некоторых высокомолекулярных компонентов и необходим индивидуальный подбор дериватизирующего агента. Поэтому для определения фенольных кислот и флавоноидов в ЛРС чаще используют ВЭЖХ-системы.

1.4 Иные методы определения

Для определения растительных БАВ в ЛРС можно использовать планарную хроматографию (бумажную и тонкослойную хроматографию (ТСХ)). Преимуществом ТСХ является простота, возможность использования стандартных образцов, экспрессность и дешевизна, но его применение ограничено невысокой разрешающей способностью.

M. Bratty и др. [65] проводили ТСХ анализ этанольного экстракта из ромашки, полученного после экстракции в аппарате Сокслета, для идентификации апигенина и дальнейшего исследования его противоопухолевых свойств в зависимости от концентрации. В качестве подвижной фазы использовали смесь толуола, этилацетата и муравьиной кислоты в соотношении 4.5:3.5:0.2. Далее проводили количественный анализ спектрофотометрическим методом при длине волны 336 нм. S. Agatonovic-Kustrin и др. [163] разработали способ скрининга для определения антиоксидантной активности экстракта ромашки методом ВЭ-ТСХ. Определяли апигенин, бисаболол, хамазулен и партенолид с использованием в качестве подвижной фазы смесь гексан: этилацетат: уксусная кислота (20:10:1). В работе [164] исследовали влияние давлении на выход CO_2-экстракции по увеличению или уменьшению пятна на

пластинке. Далее экстракт, полученный в оптимальных условиях, анализировали методом ГХ-МС для идентификации компонентного состава.

Для определения флавоноидов в экстрактах из ЛРС используют спектроскопию в видимой области. Главным недостатком такого анализа является возможность оценки только их общего содержания, а реакции с образованием окрашенных комплексов с металлами имеют ограниченное применение. M. Bener и др. [165] определяли общее содержание флавоноидов по окрашенному комплексу с хлоридом алюминия при длине волны 450 нм. Для определения индивидуальных содержаний и подтверждения результатов проводили анализ методом ВЭЖХ–ДМД. Однако, несмотря на указанные недостатки, спектроскопия рекомендована Государственной Фармакопеей РФ для анализа ЛРС [59,60].

В таблице 2 приведены некоторые примеры определения суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов в выделенных различными способами экстрактах из листьев стевии медовой, собранных на территориях с разными климатическими зонами.

Таблица 2 – Суммарные содержания фенольных соединений и флавоноидов в выделенных различными способами экстрактах из листьев стевии медовой

Место сбора образца (средняя высота н.у.м.)	Условия экстракции	Метод анализа	Определяемые компоненты и их содержания	Ссылка
Испания (650 м)	МВЭ с 0–75%-ным этанолом при температуре 75–150°С в течение 5–20 мин	Метод Ф-Ч	∑ФС: 20±3–45±6 мг-экв ГК / г сырья	[141]
	СКЭ в 0–100%-ный этанол при температуре от 40 до 200°С		∑ФС: 28±2–79±9 мг-экв ГК / г сырья	
	Мацерация в 50% и 75%-ный этанол		∑ФС: 34±2–36±2 мг-экв ГК / г сырья	

Продолжение таблицы 2

Мексика, Юкатан (30 м)	Мацерация с водой	Метод Ф-Ч	∑ФС: 44,08±0,07 мг-экв ГК / г сырья	[72]
	УЗЭ в 0–50%-ный этанол в течение 5–15 мин		∑ФС: 26,29±0,03 – 98,99±0,03 мг-экв ГК / г сырья	
Тамилнаду, Индия (140 м)	Мацерация с водой	FRAP	АОА: 11,03±0,47 мг-экв ГК / г сырья	[166]
		Метод Ф-Ч	∑ФС: 25,18 мг-экв ГК / г сырья	
		СФМ	∑Ф: 21,73 мг-экв ГК / г сырья	
Бангладеш, Такургаон (60 м)	Мацерация с 0–100%-ным этанолом при температуре 30°С	Метод Ф-Ч	∑ФС: 8,76±0,35 – 21,63±0,89 мг-экв ГК / г сырья	[112]
	Экстракция в аппарате Сокслета с 0–100%-ным этанолом		∑ФС: 7,80±0,79 – 18,46±0,38 мг-экв ГК / г сырья	
	Мацерация с 0–100%-ным этанолом при температуре 30°С	СФМ	∑Ф: 34,14±1,24 – 70,41±4,71 мг-экв кверцетина / г сырья	
	Экстракция в аппарате Сокслета с 0–100%-ным этанолом		∑Ф: 31,37±0,97 – 68,21±2,67 мг-экв кверцетина / г сырья	
Сержипи, Бразилия (300 м)	УЗЭ с водой	СФМ	∑Ф: 71,79±0,00 мкг-экв кверцетина / г сырья	[167]
	УЗЭ с 12%-ным этанолом		∑Ф: 56,66±0,92 мкг-экв кверцетина / г сырья	
	УЗЭ с водой	Метод Ф-Ч	∑ФС: 110,36±5,33 мкг-экв ГК: кверцетина (2:1) / г сырья	
	УЗЭ с 12%-ным этанолом		∑ФС: 76 мкг-экв ГК : кверцетина (2:1) / г сырья	
	УЗЭ с водой	FRAP	АОА: 220 мкмоль-экв тролокса / г сырья	
	УЗЭ с 12%-ным этанолом		АОА: 240 мкмоль-экв тролокса / г сырья	
Эльки, Чили (2336 м)	Мацерация с водой	Метод Ф-Ч	∑ФС: 1,8–10 г-экв галловой кислоты / 100 г сырья	[168]
		СФМ	∑Ф: 1,7-10,5 г-экв кверцетина / 100 г сырья	
		FRAP	АОА: 6,42–28,2 г-экв тролокса / 100 г сырья	

н.у.м. – над уронем моря, метод Ф-Ч – метод Фолина-Чокалтеу, ∑ФС – суммарное содержание фенольных соединений, ∑Ф – суммарное содержание флавоноидов, СФМ – спектрометрия в видимой области по образованию комплекса с хлоридом алюминия, FRAP – ferric reducing antioxidant power – метод определения суммарного содержания антиоксидантов, ГК – галловая кислота, АОА – антиоксидантная активность

Однако для дальнейших исследований требуется более детализированная информация о качественном и количественном составе экстрактов.

1.5 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Фармакологические свойства экстрактов из ЛРС обусловлены наличием в составе фенольных соединений и эфирномасличных компонентов различной природы. Растения семейства Астровые проявляют гепатопротекторную, противовоспалительную, антибактериальную, антиоксидантную, противоопухолевую активность, а содержание БАВ определяет ценность и качество сырья [1,2].

Важным и малоизученным аспектом является зависимость содержания БАВ в экстрактах из ЛРС от условий их произрастания (влажность, освещенность, высота над уровнем моря) [144] и морфологической части растения, используемой для их извлечения [169]. На селективность и эффективность экстракции влияют условия процесса – растворитель, температура, продолжительность, воздействие различных физических факторов, – варьирование которых может обеспечить выделение целевых компонентов в соответствии с предполагаемым применением или повысить общее содержание БАВ [62,143,170,171].

Чтобы оценить качество растительного сырья, пригодного для фармакологического использования, требуются производительные и высокочувствительные методики определения БАВ. Высокоэффективная жидкостная [18,69,72,74] и газовая хроматография [84,86,87,172] с различными детекторами позволяют определять БАВ в растениях семейства Астровые в нативном виде, что важно для оценки их биологической активности. Однако большое количество лекарственных растений из данного семейства, перспективных для фармакологического использования, системно не изучены, а опубликованные данные о химическом составе экстрактов противоречивы, их сложно анализировать и сопоставлять из-за недостаточности информации об условиях и месте произрастания.

Проведенный обзор литературы по определению фенольных соединений и эфирномасличных компонентов в растениях семейства Астровые подтверждают перспективность дальнейших исследований в этой области и определяет актуальность выбранной темы.

Цель диссертационного исследования – идентификация, разработка методик хроматографического определения индивидуального и суммарного содержания фенольных соединений и эфирномасличных компонентов в экстрактах различными способами извлечения из ряда растений семейства Астровые (*Asteraceae*) – ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), стевии медовой (*Stevia rebaudiana Bertoni*) и полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.), Людовика (*Artemisia Ludoviciana* N.), лечебной (*Artemisia absinthium* L.), эстрагона (*Artemisia dracunculus* L.), однолетней (*Artemisia annua* L.) и кавказской (*Artemisia alpina* G.).

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

– изучение особенностей хроматографического определения ФС в экстрактах из ЛРС;

– идентификация и определение ФС в экстрактах из ЛРС;

– оценка эффективности различных способов извлечения ФС из ЛРС в водные и водно-спиртовые растворы для определения индивидуальных и суммарных их содержаний;

– ГХ-МС-определение ЭМК в экстракте из ромашки аптечной;

– влияние видовых особенностей, географических и морфологических факторов на формирование фенольного профиля исследуемых лекарственных растений;

– оценка влияния суммарного содержания определяемых аналитов в экстрактах разных видов полыни на их биологическую активность.

2 Экспериментальная часть

2.1 Исходные материалы, реактивы и вспомогательное оборудование

Для выполнения экспериментальных исследований использовали следующие ***средства измерений***:

– хроматограф Shimadzu LC 20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A и масс-спектрометрическим детектором LCMS2010EV, колонка Luna C18 100Å, 250x2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) с предколонкой C18 4x2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США);

– газовый хроматограф с масс-спектрометрическим детектором Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Япония) (газ-носитель – гелий), капиллярная колонка HP-Ultra 1 (50 м х 0.20 мм, толщина 0.33 мкм; Agilent, США), капиллярная колонка HP-Ultra 2 (50 м х 0.32 мм, толщина 0.52 мкм; Agilent, США);

– весы аналитические Adventurer AR2140 (OHAUS Europe, Швейцария);

– спектрофотометр LEKI SS 2107 (MEDIORA OY, Финляндия);

– спектрофотометр Agilent 8453 (Agilent Technologies Inc., США).

Вспомогательное оборудование:

– генератор азота LCMS30-1 (Domnick Hunter, США);

– УЗ-ванна УЗВ -4,0/1 ТТЦ, рабочая частота 35 кГц (Сапфир, Россия);

– электроплитка IR-8200, 1500 Вт (Irit home, Китай);

– микроволновая установка ETHOS EX (Milestone, Италия);

– установка для субкритической экстракции: термостат ЛХМ-80 (Хроматограф, СССР) с трубчатым нагревателем (мощность 500 Вт), электронный блок ТРМ-101, термопара ДТПL (Овен, Россия), насос жидкостного хроматографа LC20AD (Shimadzu, Япония), корпус хроматографической колонки размером 150 × 4.6 мм, ограничитель давления P-455 (Upchurch Scientific, США).

– центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия);

– одноканальные механические дозаторы «Biohit proline» с варьируемым объемом дозирования 5–50 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл;

– сита лабораторные по ГОСТ 51568-99;

− стаканы химические вместимостью 50 мл по ГОСТ 1770-74;

– воронки конические стеклянные по ГОСТ 25336-82;

– обратный холодильник, Россия;

– фильтр Nylon 0.45 мкм (Lab-Support, Китай);

– колбы мерные вместимостью 10, 25, 50, 100 мл по ГОСТ 1770-74;

– пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 25 мл по ГОСТ 20292-74, Россия;

– виалы на 1,5 мл Screw-cap, прозрачного стекла (Chromacol LTD, Великобритания);

− вата медицинская по ГОСТ 5556-75, Россия.

Реактивы и материалы:

– вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;

– деионизованная вода, полученная на установке Milli-Q-UV (Millipore, Франция);

– ацетонитрил, HPLC-S (Biosolve BV, Нидерланды);

− метанол, х.ч. (Вектон, Россия);

– спирт этиловый (ректификованный, высшей очистки, 95–96%);

– муравьиная кислота, 85% (ЛенРеактив, Россия);

– гексан, 97%, для ВЭЖХ (Merck (Millipore, Sigma-Aldrich, Supelco));

– ацетон, ос.ч. (Экос-1, Россия);

– безводный сульфат натрия, х. ч. (Вектон, Россия);

– стандартные вещества: 3-О-кофеилхинная (хлорогеновая) кислота, лютеолин-7-О-гликозид, транс-феруловая кислота, цикориевая кислота, апигенин, 3,4-дигидроксибензойная кислота, 5-О-кофеилхинная кислота, рутин, кверцетин, изокверцитрин, кверцитрин, 3,5-дикофеилхинная кислота, розмариновая кислота, кофейная кислота, α-туйон, галовая кислота (Sigma-Aldrich, США);

– сорбционные материалы: Strata C18-E – масса 100 мг, размер частиц 55 мкм, диаметр пор 7 нм (Phenomenex, США); Strata X – масса 100 мг, размер частиц 33 мкм, диаметр пор 85 нм (Phenomenex, США); Oasis HLB – масса 100 мг, размер частиц 32 мкм, диаметр пор 82 нм (Waters, США); пластинки с нетканым волокном на основе полиуретана (ПУ-10%) диаметром 25 мм (изготовлено коллегами из Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского).

2.2 Объекты исследования

Объектами исследования были:

– цвет ромашки аптечной «Родные травы», 2021–2024 гг. (Адыгея и Краснодарский край, 200–500 м н.у.м.);

– цветы ромашки аптечной «ФитоФарм» (Краснодарский край, г. Анапа, 15 м н.у.м.);

– ромашка аптечная в фильтр-пакетах (*Chamomillae flores*) «ФармаЦвет» (Московская обл., г. Красногорск, 190–220 м н.у.м.);

– фиточай ромашки аптечной «Грин Сайд» (Алтайский край, г. Барнаул, (130–250 м н.у.м.);

– цветы ромашки аптечной «Травы Кавказа» (Краснодарский край, г. Горячий Ключ, 70 м н.у.м.);

– цветы ромашки аптечной, 2022 г. (г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– цветки ромашки аптечной, 2022–2024 гг. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– цветки ромашки аптечной, 2024 г. (Лагонакское нагорье, хребет Азиштау, биологическая станция «Камышанова поляна им. В.Я. Нагалевского, Апшеронский район Краснодарский край, 1250 м н.у.м.);

– ромашка безъязычковая, 2024 г. (Лагонакское нагорье, хребет Азиштау, биологическая станция «Камышанова поляна им. В.Я. Нагалевского», Апшеронский район Краснодарский край, 1250 м н.у.м.);

– листья стевии медовой «Родные травы», 2024 г. (Адыгея, г. Майкоп, сбор – Крым, около 180 м н.у.м.);

– листья стевии медовой «Ларец Алтая», 2024 г. (Алтайский край, г. Барнаул, 130–250 м н.у.м.);

– листья стевии медовой «ФитоКонтинент», 2024 г. (Алтайский край, г. Барнаул, 130–250 м н.у.м.);

– полынь обыкновенная, 2023–2025 гг. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– полынь Людовика, 2023–2025 гг. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– полынь лечебная, 2023–2025 гг. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– полынь эстрагон, 2023–2025 гг. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– полынь однолетняя, 2025 г. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– полынь кавказская, 2023–2025 гг. (Ботанический сад КубГУ, г. Краснодар, 32 м н.у.м.);

– гидролат ромашки аптечной ТМ «Мариславна» (г. Майкоп);

− эфирное масло ромашки косметическое «Pellesana» (РИНО БИО ООО, г. Москва);

− масло ромашки косметическое «Натуральные масла» (Московская область, г. Солнечногорск);

– эфирное масло ромашки голубой «OLEOS» (Московская область, г. Подольск).

Собранное сырье высушивали воздушно-теневым способом. Каждый образец измельчали блендером и просеивали через систему сит. С учетом рекомендаций Государственной Фармакопеи РФ для извлечения ФС отбирали фракции с размером частиц 0.5–1.0 мм, для эфирномасличных – менее 2.0 мм [59,60].

2.3 Приготовление рабочих растворов

Приготовление основных растворов ФС с концентрацией 200 мкг/мл. Навеску 0.0100 г сухого вещества растворяли в 50 мл ацетонитрила в мерной колбе при перемешивании.

Приготовление основного раствора ФС с концентрацией 100 мкг/мл. Навеску 0.0050 г сухого вещества растворяли в 50 мл ацетонитрила в мерной колбе.

Приготовление градуировочных растворов ФС проводили в хроматографических виалах объемом 1 мл путем внесения аликвоты основного раствора вещества и доведения объема до метки 70%-ным этиловым спиртом.

Приготовление основного раствора α-туйона с концентрацией 400 мкг/мл. Навеску 40.2 мг чистого вещества растворяли в 100 мл ацетона в мерной колбе при перемешивании.

Рабочий раствор α-туйона с концентрацией 5 мкг/мл (внутренний стандарт) готовили разбавлением 125 мкл основного раствора ацетоном в мерной колбе на 10 мл.

2.4 Экстракция БАВ из ЛРС

Фенольные соединения и эфирномасличные компоненты извлекали из ЛРС для их идентификации, оценки эффективности различных способов извлечения ФС и ЭМК в водные и водно-спиртовые растворы для определения индивидуальных и суммарных их содержаний, изучения влияния видовых особенностей, географических и морфологических факторов на формирование фенольного профиля исследуемых лекарственных растений.

2.4.1 Экстракция ФС

Экстракция фенольных соединений из ЛРС по ГФ РФ [59,60]. Навеску измельченного сырья (1.0000 г) помещали в колбу со шлифом емкостью 250 мл, прибавляли 70%-ный этанол (100 мл). Колбу присоединяли к обратному холодильнику и, периодически встряхивая, нагревали на кипящей водяной бане. Колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, фильтровали раствор через вату в мерную колбу на 100 мл, доводили до метки 70%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Экстракция фенольных соединений из ЛРС мацерацией. Навеску измельченного сырья помещали в коническую колбу со шлифом емкостью 250 мл, добавляли 70%-ный этанол и оставляли отстаиваться при комнатной температуре. Полученный раствор фильтровали через вату в мерную колбу, аликвоту объемом 1 мл фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и хроматографировали.

Для построения кинетических кривых извлечения фенольных соединений из ромашки аптечной аликвоты экстракта объемом 1 мл отбирали через 5, 10, 15, 30, 60, 120, 210 и 300 мин; 24, 48, 72, 96 и 144 часа; а из стевии медовой – через 15, 30, 60, 120, 300 мин и 24, 48 и 72 часа.

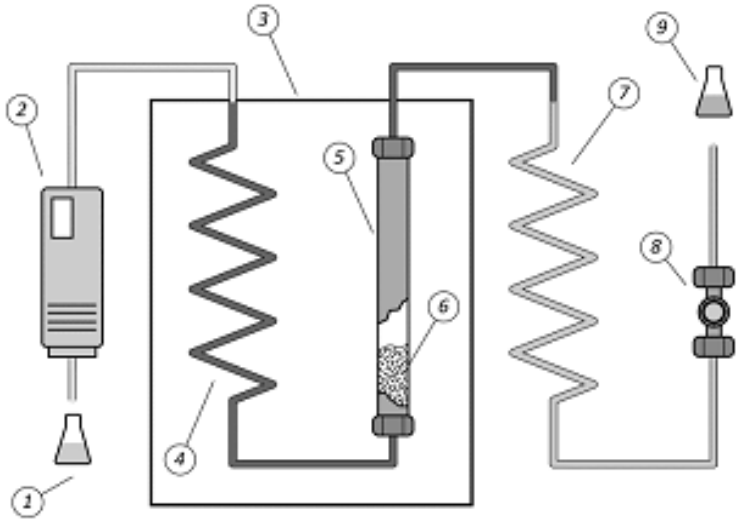
Экстракция фенольных соединений из ЛРС настаиванием. Навеску измельченного сырья помещали в коническую колбу со шлифом емкостью 100 мл и заливали деионизованной водой при ~95°С. Аликвоту объемом 1 мл фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и хроматографировали. Для построения кинетической кривой извлечения фенольных соединений из ромашки аптечной отбирали аликвоты экстракта объемом 1 мл через 5, 10, 15, 30 и 60 мин.

Ультразвуковая экстракция фенольных соединений из ЛРС. Навеску измельченного сырья помещали в коническую колбу со шлифом емкостью 100 мл и добавляли экстрагент. Экстракция проходила в ультразвуковой ванне с

частотой ультразвукового излучения 35 кГц. Аликвоту 1 мл фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и хроматографировали.

Микроволновая экстракция фенольных соединений из ЛРС. Навеску сухого измельченного сырья (0.5000 г) помещали в экстракционную ячейку. В качестве растворителя использовали 25 мл 70%-ного этанола. Температура экстракции составляла 75°С. Потом экстракт фильтровали через вату в мерную колбу объемом 25 мл, доводили до метки спиртом. Аликвоту фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм и хроматографировали.

Субкритическая экстракция фенольных соединений из ЛРС. Субкритическую экстракцию фенольных соединений из ЛРС в динамических условиях проводили при повышенных температуре и давлении на экспериментальной установке, описанной в [173], и представленной на рисунке 15. Высушенную и измельченную навеску пробы (0.2000 г) помещали в ячейку-экстрактор в печи термостата. Экстрагент предварительно продували азотом для удаления растворенного кислорода и с помощью насоса заполняли им систему. Затем останавливали поток экстрагента и включали нагрев термостата. По достижении термостатом заданной температуры систему выдерживали в течение 10 мин при постоянной температуре и остановленном потоке экстрагента, который затем подавали в систему со скоростью 1 мл/мин. Давление в системе по показаниям манометра насоса составляло 80–150 атм. На выходе собирали 10 мл экстракта в стеклянные емкости.



1 – емкость с экстрагентом; 2 – ВЭЖХ насос для подачи экстрагента; 3 – печь-термостат; 4 – капилляр для предварительного нагрева экстрагента; 5 – ячейка для экстрагирования; 6 – растительное сырье; 7 – капилляр для охлаждения экстракта; 8 – ограничитель давления; 9 – емкость для сбора

Рисунок 15 – Установка для субкритической экстракции ФС из ЛРС

Перед ВЭЖХ–ДМД–МС-анализом полученный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

2.4.2 Экстракция ЭМК и ЛОС из ромашки аптечной

Экстракция ЭМК из ромашки аптечной гидродистилляцией по Гинзбергу. Экстракцию компонентов эфирного масла способом гидродистилляции по Гинзбергу проводили по методике [60]. Навеску измельченного сырья (15.0 г) помещали в круглодонную колбу емкостью 1000 мл, добавляли 300 мл деионизованной воды. Колбу с образцом присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на электрической плитке в течение 2-х часов. Эфирное масло собирали в приемник Гинзберга и разделяли эфирное масло и ароматную воду. Перед проведением ГХ-МС-анализа эфирное масло разбавляли гексаном, остатки воды удаляли добавлением безводного сульфата натрия.

Содержание эфирного масла в абсолютно сухом сырье в массо-объемных процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V * 100 * 100}{a * (100 - W)},$$

где V – объем эфирного масла, мл; a – навеска лекарственного растительного сырья, г; W – влажность лекарственного сырья, %.

При ***жидкостно-жидкостной экстракции*** из ароматной воды ЭМК извлекали гексаном из расчета 0.5 мл гексана на 1 мл ароматной воды. Эппендорф с экстрактом помещали в УЗ-ванну на 30 мин, центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин, отделяли органический слой, остатки воды удаляли безводным сульфатом натрия и анализировали методом ГХ-МС.

Для извлечения ЭМК из ароматной воды ***дисперсионной жидкостно-жидкостной микро-экстракцией (ДЖЖМЭ)*** в качестве диспергирующего агента применяли этанол и гексан как экстрагент, обрабатывали в УЗ ванне, центрифугировали, отбирали органический слой, удаляли остатки воды безводным сульфатом натрия и анализировали ГХ-МС.

Из образца шрота после гидродистилляции по Гинзбергу извлекали фенольные компоненты 70%-ным метанолом при УЗ-воздействии, как описано выше.

Для ***твердофазной экстракции*** **ЭМК** ароматную воду пропускали через патроны с сорбентом Oasis HLB, Strata C18-E, Strata X, пластинки с нетканым волокном на основе полиуретана (ПУ). Далее сорбент высушивали, десорбировали ЭМК гексаном, остатки воды в элюате удаляли безводным сульфатом натрия и анализировали методом ГХ-МС.

Докритическая CO_2-экстракция ЭМК и ЛОС из ромашки аптечной. Докритическую CO_2-экстракцию ЭМК проводили в ООО “Компания Караван” (Краснодар, Россия) на экспериментальной установке, подробная схема которой описана в работе [174], под давлением 58 атм при 31°C из 200 г лекарственного сырья. По окончании экстракции сбрасывали давление в системе и после улетучивания CO_2 собирали экстракт. Перед ГХ–МС-анализом экстракт

разбавляли гексаном в 500 раз и обрабатывали ультразвуком. Из образца шрота после экстракции извлекали фенольные компоненты 70%-ным метанолом с УЗ-воздействием, как описано выше.

Ультразвуковая экстракция ЭМК и ЛОС из ромашки аптечной. Обработку проводили при частоте 35 кГц в течение 10, 20 и 30 мин в ультразвуковой ванне. Для этого сухую измельченную навеску цветов ромашки аптечной помещали в эппендорф объемом 1.5 мл, добавляли 1 мл ацетона и обрабатывали УЗ [175].

Субкритическая экстракция ЭМК и ЛОС из ромашки аптечной. Экстракцию летучих соединений из ромашки аптечной при повышенных температуре и давлении в динамических условиях проводили на экспериментальной установке, описанной в работе [176]. Высушенную и измельченную навеску пробы (0.2000 г) помещали в ячейку-экстрактор в печи термостата. Экстрагент (ацетон) предварительно продували азотом для удаления растворенного кислорода и заполняли им систему с помощью насоса. Затем останавливали поток экстрагента и включали нагрев термостата. По достижении 150°C систему выдерживали в течение 10 мин при постоянной температуре, после чего подавали экстрагент со скоростью 1 мл/мин. Давление в системе, по показаниям манометра насоса, составляло 80–150 атм. На выходе экстракт собирали в стеклянную емкость и анализировали ГХ-МС.

2.5 Определение БАВ в экстрактах ЛРС семейства Астровые

ВЭЖХ–ДМД–МС-определение ФС

Условия для определения фенольных соединений ВЭЖХ-ДМД-МС устанавливали с учетом эксперименатльных и литературных данных. Разделение фенольных соединений проводили на колонке Luna C18 100Å, 250×2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США). Работали в режиме градиентного элюирования, в качестве

подвижной фазы использовали смесь «ацетонитрил (А) – 0.1% муравьиная кислота (В)» в разных системах.

Система 1 (определение ФС в экстрактах ромашки аптечной): скорость потока элюента 0.4 мл/мин; температура термостатирования колонки – 40°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 10 мин от 90 до 80% В, 10 – 18 мин от 80 до 70% В, 18 – 28 мин от 70 до 10% В, 28 – 30 мин 10% В, 30 – 31 мин от 10 до 95% В.

Система 2 (определение ФС в экстрактах стевии медовой): скорость потока элюента 0.4 мл/мин; температура термостатирования колонки – 35°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 10 мин от 90 до 80% В, 10 – 18 мин от 80 до 70% В, 18 – 28 мин от 70 до 10% В, 28 – 30 мин 10% В, 30 – 31 мин от 10 до 95% В.

Система 3 (определение ФС в экстрактах полыни обыкновенной): скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 35°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 20 мин от 90 до 75% В, 20 – 24 мин 75%В, 24 – 42 мин от 75 до 10% В, 42 – 44 мин 10% В, 44 – 46 мин от 10 до 95% В.

Система 4 (определение ФС в экстрактах полыни Людовика): скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 35°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 17 мин от 90 до 75% В, 17 – 23 мин от 75 до 60% В, 23 – 35 мин от 60 до 10% В, 35 – 45 мин 10% В, 45 – 47 мин от 10 до 95% В.

Система 5 (определение ФС в экстрактах полыни лечебной): скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 35°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 15 мин от 90 до 75% В, 15 – 27 мин от 75 до 50% В, 27 – 30 мин от 50 до 10% В, 30 – 40 мин 10% В, 40 – 42 мин от 10 до 95% В.

Система 6 (определение ФС в экстрактах полыни эстрагон): скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 35°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 20 мин

от 90 до 75% В, 20 – 24 мин 75% В, 24 – 54 мин от 75 до 10% В, 54 – 64 мин 10% В, 64 – 66 мин от 10 до 95% В.

Система 7 (определение ФС в экстрактах полыни однолетней): скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 40°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 24 мин от 90 до 75% В, 24 – 52 мин от 75 до 10% В, 52 – 62 мин 10% В, 62 – 65 мин от 10 до 95% В.

Система 8 (определение ФС в экстрактах полыни кавказской): скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 45°С; программа градиентного элюирования: 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 26 мин от 90 до 55% В, 26 – 30 мин 55% В, 30 – 35 мин от 55 до 10% В, 35 – 37 мин 10% В, 37 – 39 мин от 10 до 95% В.

Определение фенольных соединений диодно-матричным детектором проводили в диапазоне 190–800 нм. При МС-детектировании веществ применяли ионизацию электрораспылением, регистрацию ионов осуществляли в режиме «negative», напряжение на интерфейсе – 3.5 кВ, напряжение на скиммере – 1.5 В, температура ионного источника – 180°С, скорость потока азота – 1.5 л/мин, скорость сканирования масс-спектра 2000 а.е.м./с, диапазон сканируемых масс 120 – 700 m/z. Сбор и последующую обработку первичных данных осуществляли с помощью программного обеспечения LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Идентификацию компонентов проводили, сопоставляя данные полученных масс-спектров и спектров поглощения с литературными данными и аналогичными спектрами стандартных веществ. Параметры идентификации ФС указаны в таблицах 3–4.

Таблица 3 – Параметры ВЭЖХ-ДМД-МС-определения ФС в экстрактах цветов ромашки аптечной и листьев стевии медовой

Соединение	t_R, мин	λ_{max}, нм	*m/z*
Система 1			
Хлорогеновая кислота	8.3	327	353
Гликозид феруловой кислоты I	9.3	300	355
Кверцетагенин-глюкопиранозид	11.9	350	479
Гликозид феруловой кислоты II	12.6	300	355
Рутин	13.6	350	609
Лютеолин-7-О-глюкозид	14.3	345	447
Дикофеилхинная кислота	15.9	327	515
Цикориевая кислота	16.2	327	473
Апигенин-7-глюкозид	16.4	268; 333	431
Апигенин	23.2	268; 327	269
Система 2			
Неохлорогеновая кислота	8.4	327	353
Хлорогеновая кислота	10.6	327	353
Рутин	15.8	350	609
Кверцетин-О-глюкозид	16.5	354	463
Кверцетин-гликозид I	17.5	356	433
Кверцетин-гликозид II	17.9	356	433
Дикофеилхинная кислота I	18.5	327	515
Дикофеилхинная кислота II	19.7	327	515
апигенин-7-глюкозид	20.8	333	431

t_R – время удерживания; λ_{max} – длина волны поглощения

Таблица 4 – Параметры ВЭЖХ-ДМД-определения ФС в экстрактах из полыни

Соединение	t_R, мин	λ_{max}, нм
Система 3		
Неохлорогеновая кислота	6.5	327
Хлорогеновая кислота	7.0	327
Рутин	17.5	350
Лютеолин-7-О-глюкозид	18.5	348
Изомер розмариновой кислоты	19.7	327
Изомер дикофеилхинной кислоты	20.3	327
Дикофеилхинная кислота	20.6	327
Розмариновая кислота	22.2	327
Бифлавоноид	42.2	275
Бифлавоноид	42.3	297
Система 4		
Неохлорогеновая кислота	6.5	327
Хлорогеновая кислота	9.2	327
Лютеолин-7-О-глюкозид	17.2	348
Изомер дикофеилхинной кислоты	18.2	327
Дикофеилхинная кислота	19.1	327
Розмариновая кислота	20.5	327
Изомер розмариновой кислоты	22.7	327
Система 5		
Неохлорогеновая кислота	6.1	327
Хлорогеновая кислота	9.1	327
Рутин	15.5	350
Лютеолин-7-О-глюкозид	16.4	348
Изомер дикофеилхинной кислоты	17.8	327
Дикофеилхинная кислота	18.0	327
Розмариновая кислота	19.2	327
Изомер розмариновой кислоты	20.5	327
I3,II8-биапигенин	26.7	266, 327
Система 6		
Неохлорогеновая кислота	6.5	327
Хлорогеновая кислота	9.3	327
Рутин	17.6	350
Гиперозид	18.1	295, 354
Лютеолин-7-О-глюкозид	18.6	348
Дикофеилхинная кислота	20.8	327
Розмариновая кислота	22.3	327
Изомер дикофеилхинной кислоты	22.6	327

Продолжение таблицы 4

Соединение	t_R, мин	λ_{max}, нм
Система 7		
Неохлорогеновая кислота	6.9	327
Хлорогеновая кислота	10.0	327
Изомер дикофеилхинной кислоты	17.8	327
Рутин	18.5	350
Дикофеилхинная кислота	22.0	327
Розмариновая кислота	23.8	327
Изомер розмариновой кислоты	24.2	327
Система 8		
Хлорогеновая кислота	8.8	327
Рутин	13.4	350
Дикофеилхинная кислота	15.4	327
Кверцитрин	15.9	260
Розмариновая кислота	16.5	327
I3,II8-биапигенин	24.2	266, 327

t_R – время удерживания; λ_{max} – длина волны максимума поглощения

Для всех ФС установили градуировочные зависимости, диапазоны линейности, пределы определения и обнаружения, полученные с использованием соответствующих стандартных образцов в 70%-ном этаноле (таблица 5). Для каждой концентрации проводили три параллельных измерения, градуировочные кривые строили в шести повторностях. Содержание гликозидов феруловой кислоты в сырье определяли по градуировочной зависимости, полученной для феруловой кислоты, умножая на отношение молекулярной массы аналита к молекулярной массе феруловой кислоты ввиду их структурного подобия и схожести их коэффициентов поглощения [177]. Аналогично рассчитывали концентрации апигенин-7-глюкозида по градуировочной зависимости апигенина, кверцетагенин-глюкопиранозида – по рутину, кверцетин-гликозидов – по кверцетину [177]. Содержания всех аналитов в экстрактах пересчитывали на массу навески сухого сырья.

Таблица 5 – Градуировочные зависимости для определения некоторых ФС в экстрактах ЛРС

Фенольные соединения	Уравнение регрессии	R^2	Диапазон линейности, мкг/мл	ПО, мкг/мл	ПКО, мкг/мл
Хлорогеновая кислота	y = (33100±100) x	0.9996	0.3–100	0.1	0.3
Неохлорогеновая кислота	y = (29700±500) x	0.9994	0.5–100	0.17	0.5
Лютеолин-7-О-глюкозид	y = (36200±200) x	0.9994	0.1–100	0.03	0.1
Цикориевая кислота	y = (30200±100) x	0.9995	0.3–200	0.1	0.3
Апигенин	y = (51900±600) x	0.9999	1–100	0.4	1.0
Феруловая кислота	y = (48300±700) x	0.9998	0.1–50	0.02	0.1
Изокверцитрин	y = (31000±800) x	0.9995	0.3–100	0.1	0.3
Кверцетин	y = (40100±700) x	0.9999	1–100	0.3	1.0
Дикоффеилхинная кислота	y=(60600±500) x	0.9999	0.1–100	0.03	0.1
Розмариновая кислота	y = (41200±500) x	0.9999	0.1–100	0.03	0.1
I3,II8-биапигенин	y = (98100±900) x	0.9999	0.1–100	0.03	0.1
Рутин	y = (25000±400) x	0.9996	0.1–150	0.03	0.1
Гиперозид	y = (38450±400) x	0.9999	0.7-100	0.1	0.7

ПО – предел обнаружения, ПКО – предел количественного определения

ГХ–МС-определение ЭМК и ЛОС в экстрактах ромашки аптечной

ГХ-МС-определение летучих компонентов проводили на хроматографе Shimadzu GC-2010 с масс-спектрометрическим детектором GCMS-QP2010 Plus на кварцевой капиллярной колонке HP-ULTRA 1 (50 м × 0.20 мм, 0.33 мкм) (Agilent Technologies, США) с использованием программируемого режима нагрева колонки: 70°С (0–3 мин), нагрев до 130°С (3–10.5 мин), 130°С (10.5–13.5 мин), нагрев до 238°С (13.5–27 мин), 238°С (27–32 мин), нагрев до 290°С (32–38.5

мин), 290°С (38.5–55.5 мин). Объем вводимой пробы – 1 мкл, режим ввода – с делением потока 1:25, температура термостата колонки составляла 70°С, температура инжектора – 260°С. В качестве газа-носителя использовали гелий при линейной скорости потока 25.1 см/мин.

Параметры работы масс-спектрометра: температура ионного источника 200°С, температура интерфейса 280°С, напряжение на детекторе 1.2 кВ, скорость сканирования масс-спектра 1250 а. е. м./с, диапазон сканируемых масс 34–600 m/z, ионизация электронным ударом. Летучие компоненты идентифицировали сопоставлением полученных масс-спектров со спектрами индивидуальных соединений и данными библиотек NIST07, WILEY8. Эксперименты проводили в трех повторностях, содержания аналитов в полученных экстрактах оценивали внутренней нормировкой по площадям пиков и методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали раствор туйона в ацетоне с концентрацией 5 мкг/мл.

Спектрофотометрическое определение суммарного содержания ФС в настоях полыней

Суммарное содержание фенольных соединений в водных экстрактах из полыней оценивали по ***методу Фолина-Чокальтеу***. В мерную колбу вместимостью 25 см^3 вносили фиксированный объем экстракта, предварительно разбавленного в 10 раз, 0.25 см^3 реактива Фолина-Чокальтеу (смесь $H_7[P(W_2O_7)]$ и $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$) и 2.5 см^3 20%-ного раствора Na_2CO_3 и доводили объем раствора до метки бидистиллированной водой. Раствор сравнения готовили так же, заменив аликвоту образца таким же количеством воды. Оптические плотности растворов измеряли через 30 мин после внесения в колбы всех реактивов на спектрофотометре LEKI SS 2107 при 670 нм в кювете с толщиной 10 мм. Суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах рассчитывали по градуировочному графику, построенному по веществу-стандарту (галловой

кислоте) в диапазоне 0.5–5.1 мг ГК/дм^3, полученные значения выражали в мг ГК / г сухого сырья.

2.6 Оценка корреляционной зависимости содержания ФС от антиоксидантной активности экстрактов ЛРС семейства Астровые

Антиоксидантную активность растительных экстрактов определяли двумя способами: по содержанию биологически активных веществ восстанавливающего характера и методом FRAP. Полученные значения сравнивали с суммарными и индивидуальными содержаниями ФС, полученными по результатам хроматографического анализа.

Антиоксидантную активность экстрактов определяли *по содержанию биологически активных веществ восстанавливающего характера* в пересчете на кверцетин по реакции с перманганатом калия в кислой среде [178].

Для оценки антиоксидантной активности (АОА) настоев полыней *методом FRAP* в мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносили фиксированный объем анализируемого раствора, преварительно разбавленного в 10 раз, 1.0 см^3 раствора комплексного реагента, содержащего железоаммонийные квасцы (6.0 мМ) и о-фенантролин (10 мМ), и доводили объем реакционной смеси до метки бидистиллированной водой. Измерения поглощения окрашенных растворов проводили через 30 мин на спетрофотометре LEKI SS 2107 при λ = 490 нм в кювете толщиной 20 мм. Раствором сравнения служил раствор, содержащий комплексный реагент, заменяя аликвоту образца таким же объемом бидистиллированной воды. Расчет проводили по градуировочному графику, построенному в диапазоне 0.17–3.4 мг ГК/дм^3. Полученные значения АОА экстрактов выражали в мг ГК / г сухого сырья.

3 Обсуждение результатов

3.1 Извлечение БАВ из ромашки аптечной

Извлечение ФС из ромашки аптечной. Оптимизацию условий извлечения ФС из ромашки аптечной проводили на образце «Родные травы» 2021 г. сбора. С учетом экспериментальных исследований и литературных данных [69,137] были выбраны условия хроматографирования, которые позволили обнаружить во всех экстрактах хлорогеновую, цикориевую и дикофеилхинную кислоту, лютеолин-7-О-глюкозид и апигенин сопоставлением идентификационных параметров компонентов с аналогичными характеристиками стандартных образцов. Пики на хроматограмме с *m/z* 355, имеющие максимумы поглощения при длине волны 300 нм, идентифицировали как гликозиды феруловой кислоты [84,154,179]. Максимумы поглощения при 268 и 333 нм и *m/z* 431 характерны для апигенин-7-глюкозида [69,84,154,179]. Пример ВЭЖХ-ДМД-МС-хроматограммы экстракта, полученного в рекомендованных ГФ РФ условиях, представлена на рисунке 16.

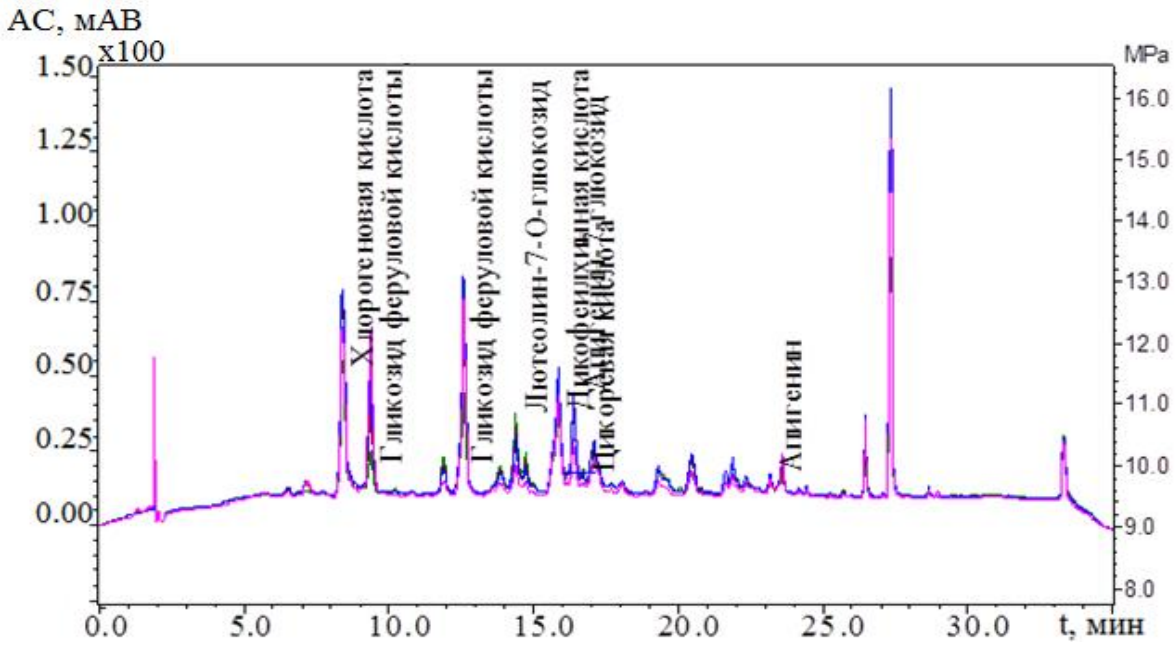


Рисунок 16 – ВЭЖХ–ДМД–МС хроматограмма этанольного экстракта (ГФ РФ) из цветов ромашки аптечной

Эффективность извлечения фенольных соединений из ромашки аптечной при их УЗЭ и МВЭ водно-этанольными и водно-метанольными смесями с различной объемной концентрацией спирта (30, 50, 70 и 100%) оценивали с использованием полученных нами экспериментальных [176,180] и литературных данных [114] по суммарному содержанию ФС: лютеолин-7-О-глюкозида, гликозидов феруловой кислоты, апигенин-7-глюкозида, апигенина, хлорогеновой, дикофеилхинной и цикориевой кислот (рисунок 17). Из полученных диаграмм видно, что эффективность 70% водно-метанольной и водно-этанольной смесей при суммарном извлечении ФС из растительного материала УЗЭ и МВЭ сопоставима. С другой стороны, 70%-ный этанол – более экологичный растворитель и перспективен для дальнейшего практического использования в медицинской практике, поэтому был выбран для дальнейших экспериментальных исследований.

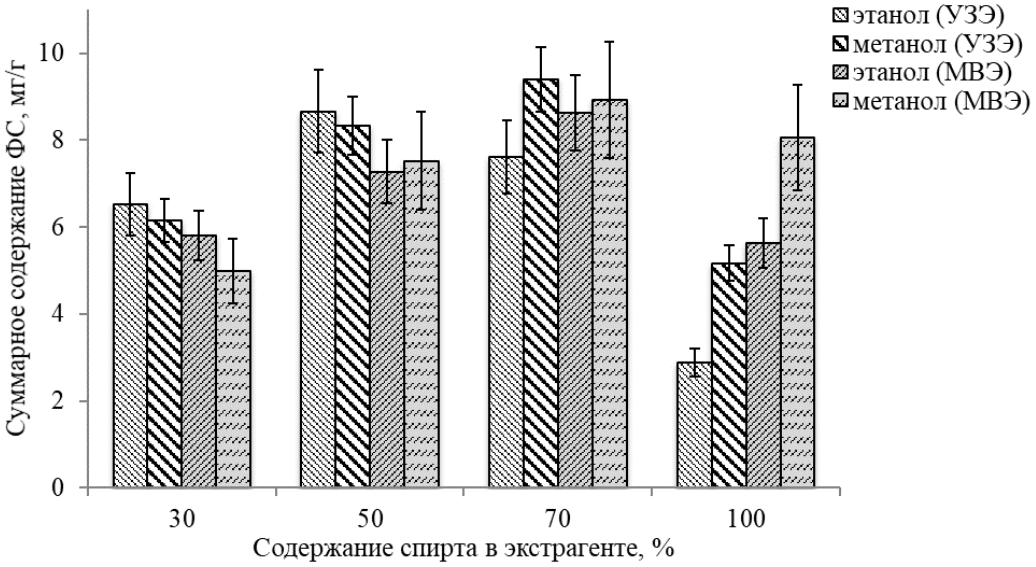
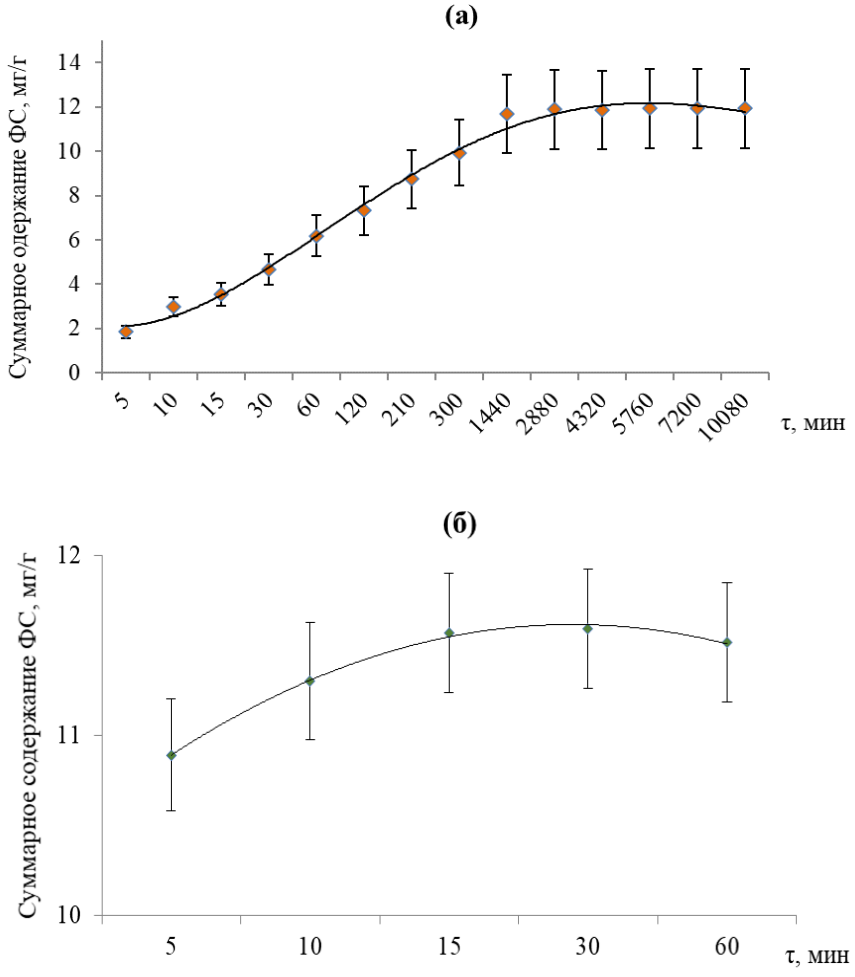


Рисунок 17 – Суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах ромашки аптечной, полученных после УЗЭ и МВЭ

Изучали и сравнивали различные способы экстракции компонентов – экстракцию по методике Государственной Фармакопеи РФ [60], мацерацию, настаивание, ультразвуковую, микроволновую и субкритическую экстракцию.

Оптимизацию параметров способов экстракции проводили по суммарному содержанию ФС в экстрактах ромашки.

Для определения оптимальных условий экстрагирования ФС изучили кинетические зависимости суммарного его содержания от времени проведения мацерации, настаивания и УЗЭ (рисунок 18). В качестве экстрагентов для мацерации и УЗЭ использовали 70%-ный этанол, а свежекипяченую деионизованную воду применяли для экстракции настаиванием. Для построения кинетической кривой извлечения ФС из ромашки различными способами отбирали аликвоты экстракта объемом 1 мл через заданный промежуток времени.



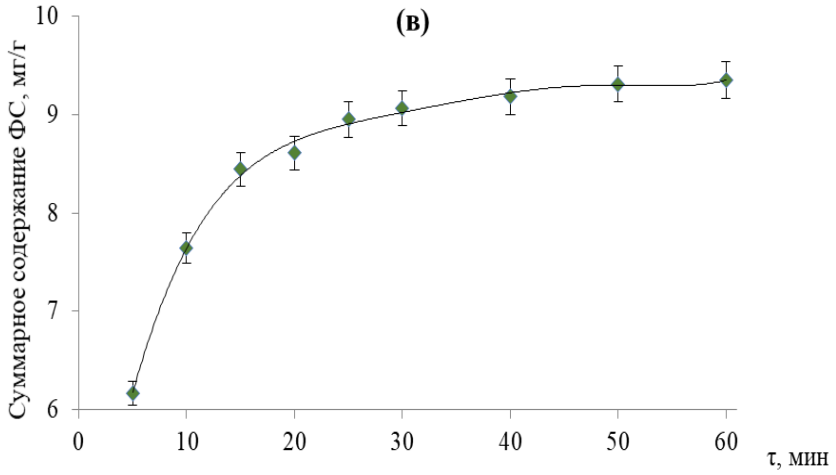


Рисунок 18 – Зависимость суммарного содержания ФС в экстракте ромашки аптечной от времени мацерации (а), настаивания (б) и УЗЭ (в)

Суммарная концентрация ФС в экстракте мацерацией достигала максимальных значений в течение 1440 мин (24 ч) и далее оставалась неизменной (рисунок 18а). В случае извлечения аналитов настаиванием (рисунок 18б), концентрации соединений при экстрагировании сырья выше 15 мин не менялись. Более продолжительное время экстракции данным способом способствовало деградации некоторых фенольных соединений, например, лютеолин-7-О-глюкозида и дикофеилхинной кислоты. В условиях настаивания апигенин практически не извлекается, т.к. агликоны флавоноидов в воде нерастворимы [3,58]. Кинетическая кривая УЗЭ аналитов из ромашки аптечной (рисунок 18в) позволила установить, что суммарное содержание ФС достигает максимальных значений (9.10±0.10 мг/г) при экстракции в течение 30 мин непрерывного воздействия ультразвуком.

Субкритическая экстракция широко используется для извлечения различных классов соединений, в том числе фенольных, из лекарственного растительного сырья. При этом на эффективность извлечения компонентов влияют температура и состав используемого экстрагента. Для установления оптимальных значений данных параметров проводили исследование зависимости суммарного содержания ФС в экстракте ромашки от температуры СКЭ с использованием различных экстрагентов (рисунок 19). В качестве

экстрагентов использовали деионизованную воду, 50 и 70% этиловый спирт [125,137]. Температуру извлечения варьировали в диапазоне 100 – 165°С с шагом 15°С. Эффективность субкритической экстракции ФС также оценивали по суммарному содержанию ФС в экстракте [181]. Как известно [125,137], применение воды и 70%-ной водно-этанольной смеси в качестве экстрагентов для СКЭ ФС различных классов из растительного материала достаточно эффективно. При 120°С эффективность суммарного извлечения аналитов водой и 70%-ным этанолом было максимальной (6.6±0.2 и 11.7±0.3 мг/г соответственно), но при дальнейшем повышении происходило снижение концентрации ФС, обусловленное их термической деградацией (рисунок 19). С учетом полученной зависимости можно заключить, что оптимальная температура СКЭ ФС из ромашки аптечной деионизованной водой и 70% этиловым спиртом составляет 120°С.

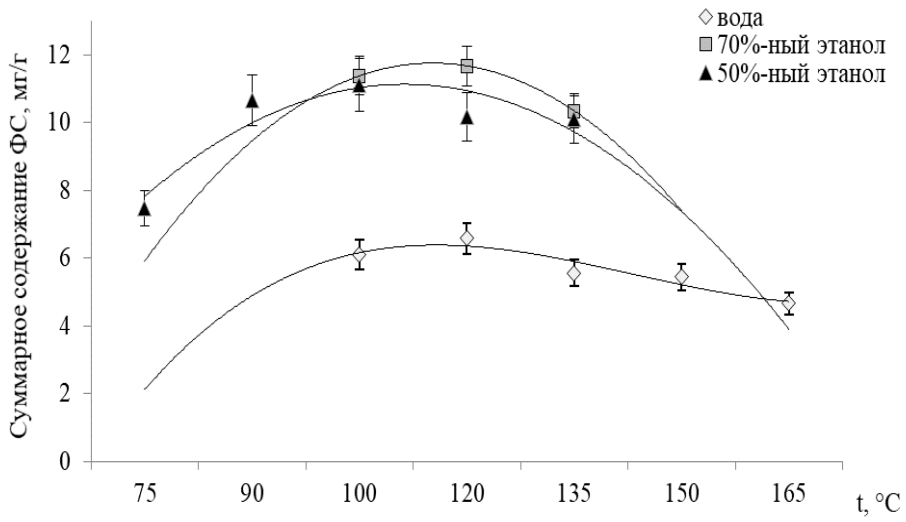


Рисунок 19 – Зависимость СКЭ различными экстрагентами суммарного содержания ФС из экстракта ромашки аптечной от температуры

Авторы статьи [137] полагают, что 50%-ный этанол в качестве экстрагента для СКЭ ФС из ромашки аптечной гнаиболее предпочтителен. Но полученные нами исследования показывают целесообразность проведения СКЭ при более низких температурах. Представленная на рисунке 19 зависимость выхода

суммарного содержания ФС от температуры в диапазоне от 75 до 135°С показывает, что наибольшая суммарная концентрация ФС (11.10±0.70 мг/г) в экстракте наблюдается при извлечении при 100°С. Также отметим, что степени извлечения ФС СКЭ 70%-ным этанолом при 120°С и 50%-ным этанолом при 100°С близки.

Содержания ФС в экстрактах ромашки аптечной, полученные в оптимальных условиях для различных способов экстракции, представлены в таблице 6. Отдельно отметим, что выбор способа и условия экстракции аналита во многом определяется поставленными задачами. Использование МВЭ для экстракции ФС малоэффективно, т.к. концентрации хлорогеновой кислоты и гликозидов феруловой кислоты весьма низки, что, вероятно, связано с их деградацией под действием температуры и микроволнового излучения.

Таблица 6 – Концентрации некоторых индивидуальных ФС и сумма их содержаний в экстрактах ромашки аптечной, полученных различными способами извлечения, мг/г (n = 3, P = 0.95)

Соединение	Способ экстракции					
	Фармакопея РФ	Мацерация	Настаивание	УЗЭ	МВЭ	СКЭ
Хлорогеновая кислота	2.40±0.10	2.40±0.10	2.5±0.2	2.00±0.10	1.8±0.4	2.3±0.3
Гликозид феруловой кислоты I	2.20±0.10	2.50±0.10	2.55±0.04	2.2±0.3	1.68±0.02	2.4±0.2
Гликозид феруловой кислоты II	2.70±0.10	3.00±0.10	2.94±0.03	2.5±0.2	2.2±0.4	2.90±0.10
Лютеолин-7-О-глюкозид	0.80±0.03	0.830±0.010	0.52±0.05	0.64±0.05	0.60±0.10	0.83±0.03
Дикофеилхинная кислота	1.70±0.10	1.80±0.10	1.60±0.10	1.2±0.3	1.3±0.2	1.50±0.10
Цикориевая кислота	0.140±0.003	0.14±0.02	0.18±0.02	0.120±0.010	0.11±0.02	0.102±0.005
Апигенин-7-глюкозид	1.00±0.10	1.00±0.10	0.80±0.04	0.80±0.10	0.8±0.2	1.10±0.10
Апигенин	0.070±0.010	0.080±0.010	0.013±0.003	0.020±0.010	0.05±0.02	0.051±0.004
Сумма содержаний ФС	11.0±0.5	11.7±0.7	11.1±0.3	9.4±0.9	8.60±0.10	11.1±0.9

Сравнительный анализ различными способами извлечения (ГФ, мацерацией, настаиванием и СКЭ) по сумме содержаний ФС показывает, что по степени извлечения аналитов они сопоставимы. Эффективность извлечения компонентов свежекипяченой деионизованной водой при настаивании оказалась сопоставима со способами, в которых в качестве экстрагентов использовали водно-спиртовые растворы. Однако, как уже было отмечено ранее, водные системы не извлекали агликоны флавоноидов - достаточно ценные соединения, что снижает перспективность практического использования этой процедуры для экстракции ФС из ромашки аптечной. Содержания ФС в экстрактах из ромашки аптечной, полученных мацерацией и настаиванием с использованием различных растворителей сопоставимы (таблица 6). Содержания суммы извлеченных УЗЭ ФС оказались несколько выше аналогичных данных при МВЭ и ниже по сравнению с другими способами экстракции (таблица 6). С другой стороны, УЗЭ протекает более быстро, применяя данный способ, можно более оперативно проводить предварительный скрининг и идентификацию ФС в экстрактах ромашки аптечной.

Данные о качественном и количественном составе растительного материала используют при установлении качества выпускаемой продукции. Однако содержание активных компонентов в ромашке аптечной значительно может зависеть от географических особенностей произрастания лекарственного растительного сырья, условий выращивания и хранения [84,179]. В таблице 7 приведены содержания ФС в полученных УЗЭ экстрактах образцов ромашки аптечной различных производителей, а также собранном самостоятельно на территории г. Краснодара образце.

Таблица 7 – Концентрации индивидуальных ФС и суммарные их содержания в водно-этанольных экстрактах из ромашки аптечной различных производителей, полученные после УЗ экстракции, мг/г (n = 3, P = 0.95)

Соединение	Самостоятельный сбор на территории г. Краснодар	ФармаЦвет	Грин Сайд	Фитофарм	Родные травы
Хлорогеновая кислота	1.50±0.05	1.00±0.20	0.50±0.03	0.370±0.020	2.00±0.10
Гликозид феруловой кислоты	0.017±0.001	2.791±0.008	1.804±0.003	1.8±0.3	2.2±0.3
Гликозид феруловой кислоты	0.017±0.002	3.09±0.07	1.83±0.03	1.80±0.20	2.5±0.2
Лютеолин-7-О-глюкозид	0.258±0.008	0.53±0.08	0.369±0.004	0.36±0.05	0.64±0.05
Дикофеилхинная кислота	12.0±0.4	0.800±0.100	0.488±0.007	0.46±0.04	1.2±0.3
Цикоревая кислота	0.38±0.04	0.051±0.007	0.057±0.004	0.077±0.005	0.120±0.010
Апигенин-7-глюкозид	0.210±0.020	1.70±0.10	0.610±0.020	0.60±0.10	0.80±0.10
Апигенин	0.46±0.04	0.05±0.03	0.040±0.002	0.050±0.007	0.020±0.010
Сумма содержаний ФС	14.9±0.5	10.1±0.4	5.70±0.10	5.6±0.6	9.4±0.9

Содержание ФС в образцах ромашки аптечной торговых марок «Грин Сайд» и «Фитофарм» близки между собой по концентрациям индивидуальных соединений и сумме содержаний аналитов. Такое сходство, вероятно, связано с использованием одного и того же растительного материала со схожими климатическими условиями его выращивания. Отметим высокое содержание хлорогеновой (2.00±0.10 мг/г), дикофеилхинной (1.2±0.3 мг/г) и цикориевой кислот (0.120±0.010 мг/г), а также лютеолин-7-О-глюкозида (0.64±0.05 мг/г) в экстракте из образца ромашки аптечной «Родные травы» по сравнению с их содержаниями в экстрактах образцов других компаний [182].

Содержания ФС в экстрактах ромашки аптечной из полученного при самостоятельном сборе растительного материала сильно разнятся от концентраций аналитов из других образцов. Показатель суммы ФС в данном образце (14.9±0.5 мг/г) определяла дикофеилхинная кислота (12.0±0.4 мг/г). В других образцах максимальное содержание ФС определялось концентрациями гликозидов феруловой кислоты (около 60%), что близко к литературным данным [84,179]. Кроме этого, содержание апигенина и цикориевой кислоты в собранном на территории г. Краснодара образце было на порядок выше, чем в других. Возможно, в данном образце содержится ромашка других видов, в которой содержпние дикофеилхинной кислоты выше [179], но это требует дальнейших исследований и подтверждения.

Влияние параметров МВЭ на эффективность извлечения ФС изучали на образце ромашки аптечной «Родные травы» сбора 2024 г., варьируя мощность (200, 300 и 400 Вт) и время воздействия (10, 30 и 50 мин) (рисунок 20). В оптимизированных условиях ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа [182] идентифицированы хлорогеновая, дикофеилхинная, цикориевая кислоты, гликозиды феруловой кислоты, кверцетагенин-глюкопиранозид, рутин, лютеолин-глюкозид, апигенин-глюкозид и апигенин.

Максимальное суммарное извлечение фенольных соединений из цветов ромашки аптечной 70%-ным этанолом достигается под воздействием микроволнового излучения мощностью 300 Вт в течение 50 мин.

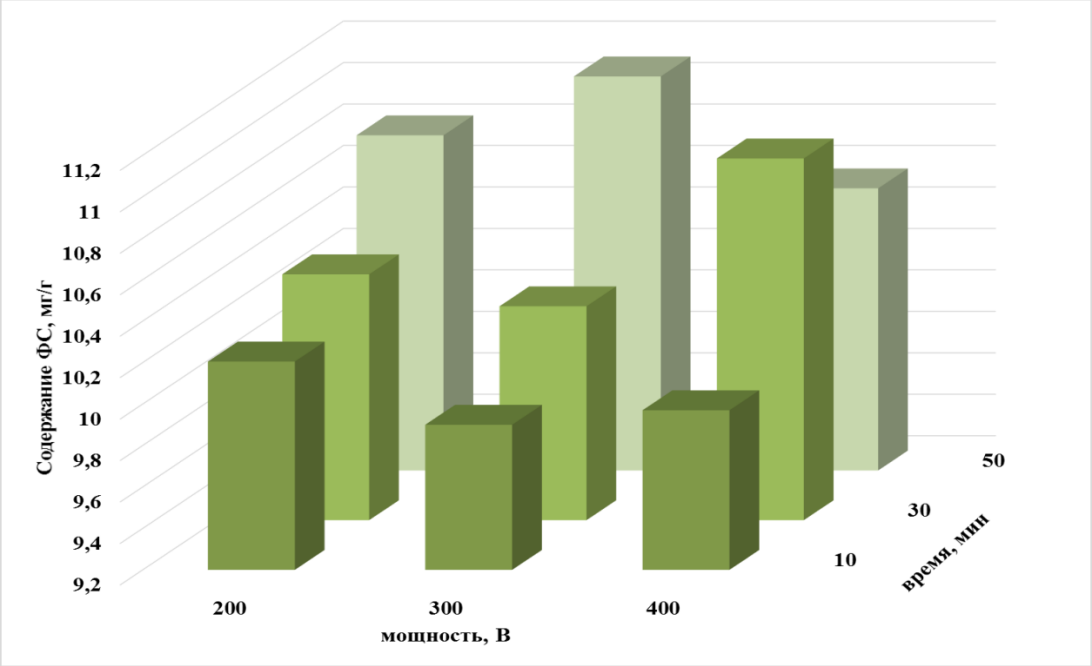


Рисунок 20 – Зависимость суммы содержания ФС в экстрактах из цветов ромашки аптечной при МВЭ от мощности и времени излучения

Отметим некоторые особенности извлечения ФС различных классов в зависимости от условий МВЭ. Концентрация рутина, содержащего два сахарных остатка, повышается с увеличением времени воздействия и не зависит от мощности микроволнового излучения (рисунок 21), а в случае отсутствия гликозидных связей содержание апигенина практически не меняется.

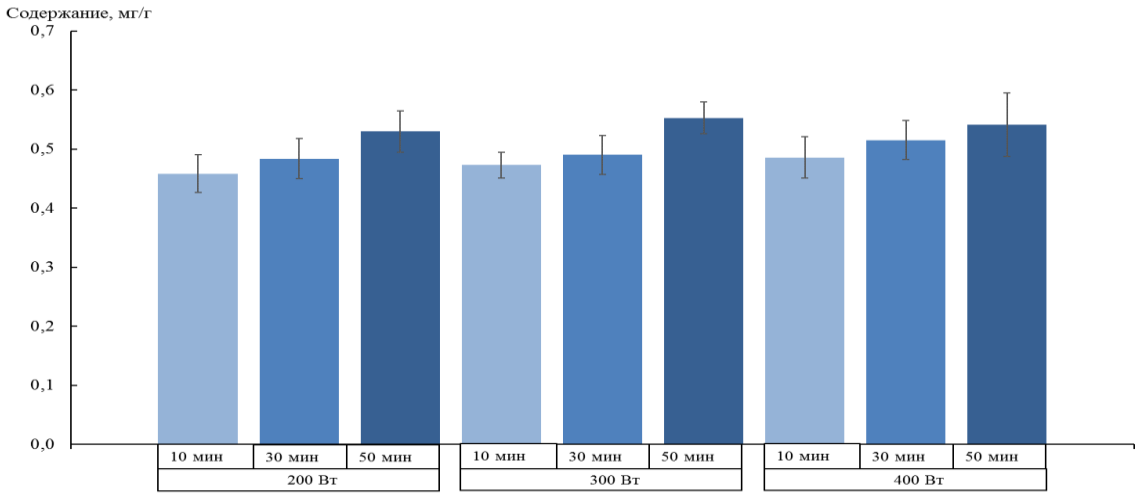


Рисунок 21 – Зависимость содержания рутина в экстрактах цветов ромашки аптечной от мощности и времени микроволнового излучения

Концентрации моногликозидов (глюкозиды феруловой кислоты, кверцетагенин-глюкопиранозид, лютеолин-7-О-глюкозид) возрастают с увеличением времени воздействия и достигают максимума при 200–300 Вт, а при 400 Вт происходит их деградация. Исключение составляет апигенин-7-глюкозид, содержание которого при этом практически не меняется. Аналогичную зависимость от времени и мощности демонстрирует хлорогеновая кислота (соединение со сложноэфирной связью), но концентрация дикофеилхинной остается постоянной. Содержание цикориевой кислоты с двумя сложноэфирными связями повышается под действием микроволнового излучения в течение 50 мин при мощности 200–300 Вт (рисунок 22).

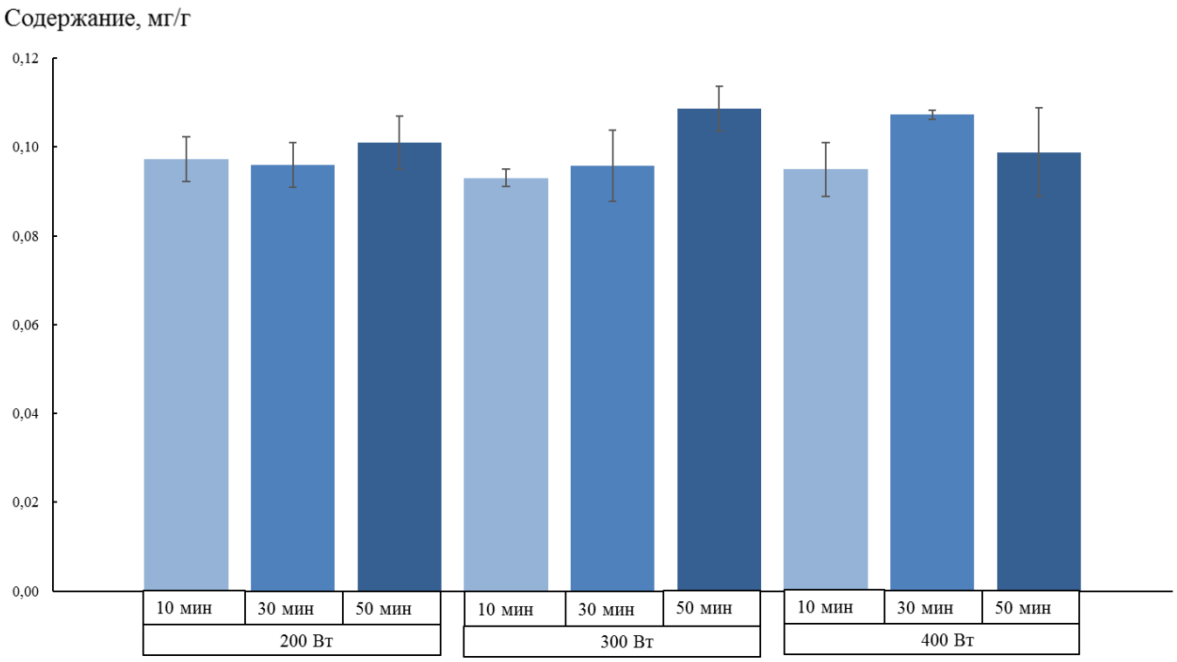


Рисунок 22 – Зависимость содержания цикориевой кислоты в экстрактах цветов ромашки аптечной от мощности и времени микроволнового излучения

Полученные результаты подтверждены значениями коэффициентов Спирмена, рассчитаннных на основе анализа экспериментальных данных по зависимости содержания ФС в экстракте от различных факторов (таблица 8), выполненных в программном пакете STATISTICA.

Таблица 8 – Ранговые корреляции Спирмена для разных параметров микроволновой экстракции (значимые корреляции на уровне p<0.0500)

Соединения	Коэффициенты корреляции Спирмена для разных параметров	
	время, мин	мощность, Вт
хлорогеновая кислота	0.738	0.0527 нз
глюкозид феруловой к-ты	0.685	-0.211 нз
кверцетагенин-глюкопиранозид	0.896	0.0527 нз
гликозид феруловой кислоты	0.791	-0.0527 нз
рутин	0.896	0.369 нз
лютеолин-глюкозид	0.896	-0.0527 нз
дикофеилхинная кислота	-0.580 нз	0.105 нз
цикориевая кислота	0.738	0.000 нз
апегенин-глюкозид	0.896	-0.211 нз
апигенин	-0.211 нз	-0.105 нз

нз – незначимы при p<0.0500

Коэффициенты корреляции Спирмена для фактора «мощность микроволнового излучения» по всем ФС оказались статистически незначимыми, что показывает на отсутствие его влияния на МВЭ фенольных соединений из цветов ромашки. Влияние временного фактора на содержание хлорогеновой, цикориевой кислот, гликозида феруловой кислоты, кверцетагенин-глюкопиранозида, рутина, лютеолин-глюкозида и апегенин-глюкозида статистически оказалось значимым; значения коэффициентов Спирмена больше 0,7 свидетельствуют о сильной зависимости извлечения указанных аналитов от продолжительности экстракции. Аналогичный результат получили и для глюкозида феруловой кислоты, а степени извлечения дикофеилхинной кислоты и апигенина не зависели от времени процесса.

С учетом полученных данных оптимальными условиями извлечения фенольных соединений из цветов ромашки аптечной в 70%-ный этанол определили микроволновое излучение 300 Вт в течение 50 мин. Результаты МВЭ в этих условиях сопоставимы с результатами экстракционного извлечения аналитов ГФ, мацерацией, настаиванием и СКЭ (таблица 6).

Извлечение ФС и возсможность сокращения времени анализа изучали совмещением предварительной ультразвуковой обработки и микроволнового воздействия на экстракцию ФС. УЗ обработка в течение 10 мин перед микроволновой экстракцией в течение 50 мин приводила к деградации всех аналитов, кроме апигенин-глюкозида и апигенина, их содержание в экстракте повышалось на 10 и 19% соответственно. Для моногликозидов и сложноэфирных соединений выявили одинаковые закономерности: предварительное УЗ воздействие в течение 10 мин при продолжительности МВЭ 10 мин повышало эффективность извлечения примерно на 10%.

Далее изучали влияние условий произрастания ромашки аптечной на содержание ФС, извлекаемых при настаивании. Основными компонентами в образцах производителя «Родные травы» (таблица 9) оказались хлорогеновая кислота и гликозиды феруловой кислоты. Суммарное содержание ФС в ромашке, собранной в 2022 и 2024 гг., было одинаковым, но концентрация рутина в сборе 2024 г. на два порядка оказалась выше, а кверцетагенин-глюкопиранозида, апигенин-глюкозида и лютеолин-глюкозида – вдвое выше, чем в сборе 2022 г., что может быть связано с более благоприятными условиями произрастания в этот период.

В растениях из Ботанического сада КубГУ сбора 2022 и 2023 гг. суммарные содержания ФС были близки, а в 2024 г. они были в три раза выше. Из таблицы 10 видно, что основными компонентами экстрактов являются гликозиды феруловой кислоты, содержание которых в образце №1 2024 г. было наибольшим. Увеличение концентраций лютеолин-гликозида и апигенин-гликозида в образцах сбора 2024 г. может обусловлено большим количеством влаги и тепла в период роста растений. Экстракты из образцов №1 и №2 сбора 2022 г. имели нетипичный хроматографический профиль: высокое содержание цикориевой в образце №1 и дикоффеилхинной кислоты образце № 2, возможно, связано с неодносзачностью определения видовой принадлежности. Для безъязычковой ромашки также характерны хлорогеновая кислота и гликозиды феруловой кислоты (таблица 11).

Таблица 9 – Содержания индивидуальных ФС в настоях цветов ромашки аптечной «Родные травы», мг/г

Место и год сбора / Соединения	республика Адыгея, 200–500 м н.у.м.			
	2021 г.	2022 г.	2023 г.	2024 г.
хлорогенновая кислота	1.40	1.49	1.98	1.46
глюкозид феруловой кислоты	2.72	3.61	2.46	3.54
кверцетагенин-глюкопиранозид	0.06	0.23	0.07	0.59
гликозид феруловой кислоты	2.2	5.1	2.9	3.35
рутин	0.79	0.003	0.035	0.39
лютеолин-глюкозид	0.16	0.086	0.57	1.30
дикофеилхинная кислота	0.20	0.7	2.5	0.96
цикориевая кислота	0.43	1.28	1.19	0.01
апегенин-глюкозид	н/о	0.60	н/о	1.75
апигенин	0.02	0.04	0.03	0.02
Сумма содержаний ФС	8.1	13.2	11.9	13.4

н/о – не обнаружено

Таблица 10 – Содержания индивидуальных ФС в настое цветов ромашки аптечной из Ботанического сада, мг/г

Место и год сбора / Соединения	г. Краснодар, 32 м н.у.м.					
	2022 г.		2023 г.	2024 г.		
	№1	№2		№1	№2	№3
хлорогенновая кислота	0.39	0.40	0.16	0.70	0.46	1.67
глюкозид феруловой кислоты	0.09	0.13	2.18	7.80	6.49	6.84
кверцетагенин-глюкопиранозид	0.03	0.01	0.03	0.06	0.26	0.28
гликозид феруловой кислоты	0.025	0.012	2.12	6.87	7.03	6.49
рутин	0.012	0.051	0.051	0.15	0.36	0.41
лютеолин-глюкозид	0.026	0.012	0.20	0.30	0.79	0.72
дикофеилхинная кислота	0.20	1.9	0.30	0.63	0.49	0.73
цикориевая кислота	2.91	0.06	0.01	0.03	0.01	0.03
апегенин-глюкозид	0.16	0.01	0.02	1.13	0.46	1.43
апигенин	0.003	0.001	0.002	0.11	0.01	0.02
Сумма содержаний ФС	3.8	2.6	5.1	17.8	16.4	18.6

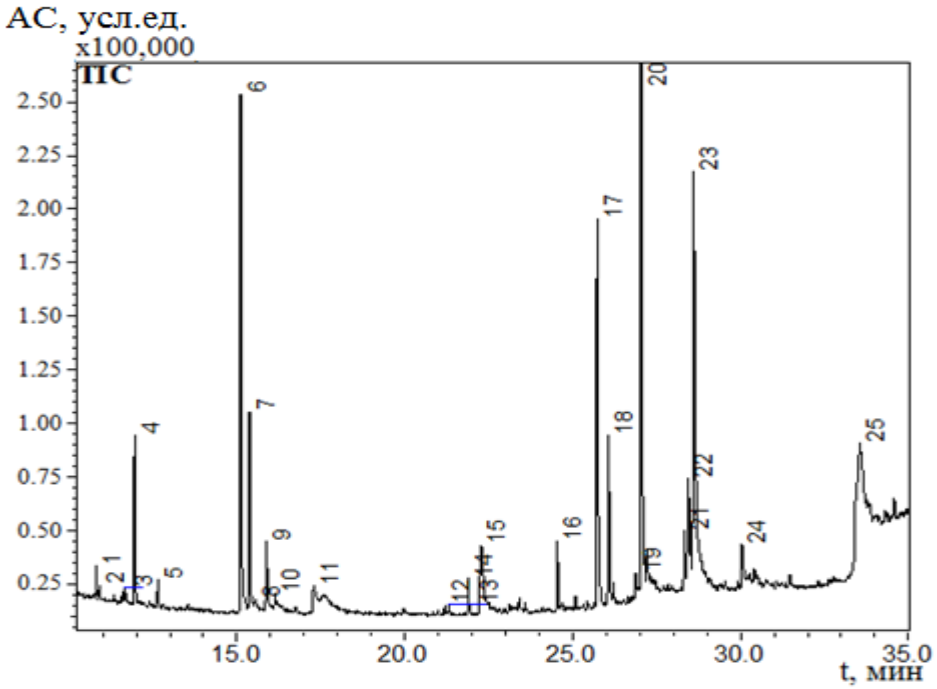
В отличие от образцов из Ботанического сада КубГУ в собранной в Камышановой поляне настоях цветов ромашки аптечной основными компонентами являются хлорогеновая, дикофеилхинная кислоты и рутин. (таблица 11). Такое изменение фенольного профиля растений ромашки аптечной может обусловлено особенностями географических зон их произрастания.

Таблица 11 – Содержания индивидуальных ФС в образцах, собранных на территории Камышановой поляны, мг/г

Место сбора и вид / Соединения	Апшеронский район, 1250 м н.у.м.	
	Ромашка аптечной	Ромашка безъязычковая
хлорогенновая кислота	3.47	2.08
глюкозид феруловой кислоты	0.06	5.52
кверцетагенин-глюкопиранозид	0.02	0.03
гликозид феруловой кислоты	0.04	6.72
рутин	3.42	0.01
лютеолин-глюкозид	0.13	0.58
дикофеилхинная кислота	6.63	0.77
цикориевая кислота	0.25	0.02
апегенин-глюкозид	н/о	н/о
апигенин	0.04	н/о
Сумма содержаний ФС	14.1	15.7

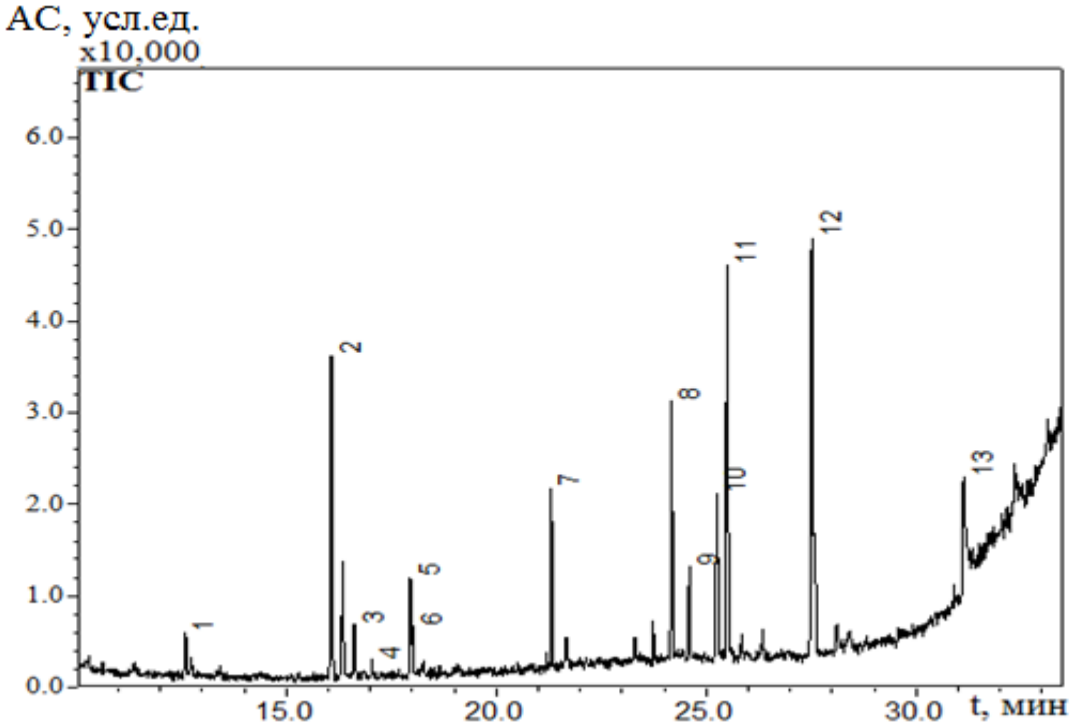
н/о – не обнаружено

Оптимизация условий ГХ–МС-анализа ЭМК и ЛОС в экстрактах ромашки аптечной. Для оптимизации условий ГХ-МС анализа использовали полученные на экспериментальной установке совместно с ООО «Караван» CO_2-экстракты ромашки аптечной, разбавленные в 500 раз гексаном. Изначально сравнивали разделение на колонках HP-ULTRA 1 и HP-ULTRA 2. Полученные хроматограммы приведены на рисунках 23 и 24 соответственно. Использование 100%-ного диметилполисилоксана (HP-ULTRA 1) в качестве неподвижной фазы позволяет идентифицировать 25 целевых компонентов, а 5%-фенил – 95%-диметилполисилоксана (HP-ULTRA 2) – 13 компонентов. Поэтому в дальнейшем разделение осуществляли на колонке HP-ULTRA 1.



1) β-пинен, 2) β-мирцен, 3) α-терпинен, 4) (+-)- α-лимонен, 5) γ-терпинен, 6) D-ментон, 7) L-ментон, 8) *цис*-3-метилциклогексанол, 9) (+-)-*p*-мент-1-ен-4-ол, 10) (6E)-2,6-диметил-1,6-октадиен, 11) (+)-(R)-пулегон, 12) α-кариофиллен, 13) 2-(5'-метил-2'-фурфурил)-фуран, 14) β-кариофиллен, 15) β-фарнезен, 16) спатуленол, 17) α-оксид бисаболола B, 18) оксид бисаболона, 19) хамазулен, 20) оксид бисаболола A, 21) тетрагидрогеранилацетон, 22) ен-ин-дициклоэфир, 23) ен-ин-дициклоэфир, 24) пальмитиновая кислота, 25) 9-*цис*-, 12-*цис*-линолевая кислота

Рисунок 23 – ГХ–МС-хроматограмма CO2-экстракта ромашки аптечной (колонка HP-ULTRA 1)



1) (-)-лимонен, 2) *транс*-3-ундецен, 3) (+-)-*р*-мент-1-ен-4-ол, 4) пропилацетилен, 5) (+)-(R)-пулегон, 6) δ-1-метил-4-изопропенил-6-циклогексен-2-он, 7) β-фарнезен, 8) α-оксид бисаболола B, 9) 1-[2-(1-метилэтиледен)-циклопропил]-этанол, 10) 7-метокси-кумарин-3-карбоновая кислота, 11) α-оксид бисаболола B, 12) ен-ин-дициклоэфир, 13) ундециловая кислота

Рисунок 24 – ГХ–МС-хроматограмма CO2-экстракта ромашки аптечной (колонка HP-ULTRA 2)

Далее осуществляли подбор температурного градиента. Варьируя температурный режим, нам удалось добиться более эффективного разделения компонентов. Например, с помощью библиотеки масс-спектров идентифицированы пики *цис*- и *транс*-изомера ментона (рисунок 25).

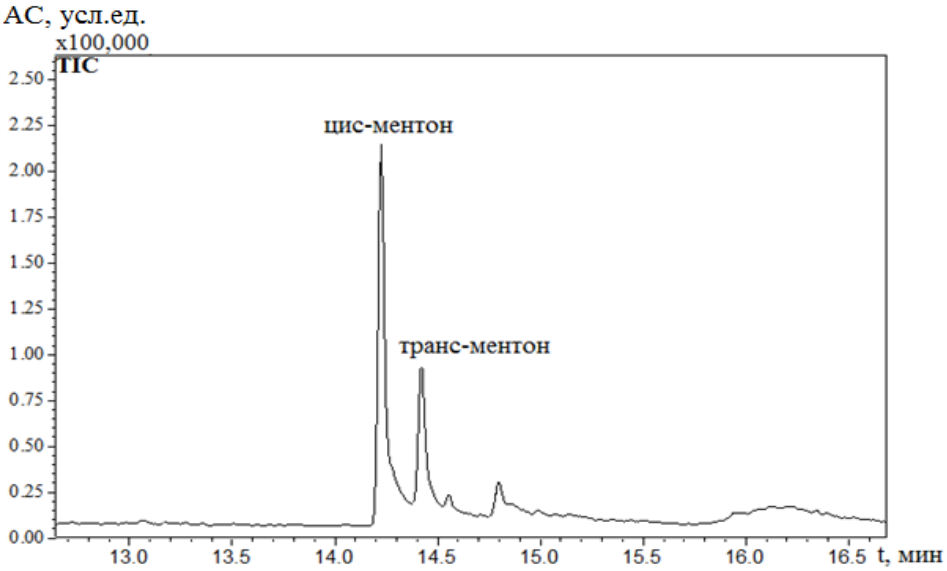


Рисунок 25 – Участок ГХ–МС-хроматограммы CO2-экстракта ромашки аптечной (разбавление гексаном 1:500, деление потока 1:25)

Основными компонентами CO_2-экстракта ромашки аптечной были оксид бисоболола А (16.81%), ен-ин-дициклоэфир (13.64%), α-оксид бисаболола В (10.61%) и D-ментон (12.34%) (таблица 12). Присутствие данных компонентов специфично для извлечений летучей фракции ромашки аптечной.

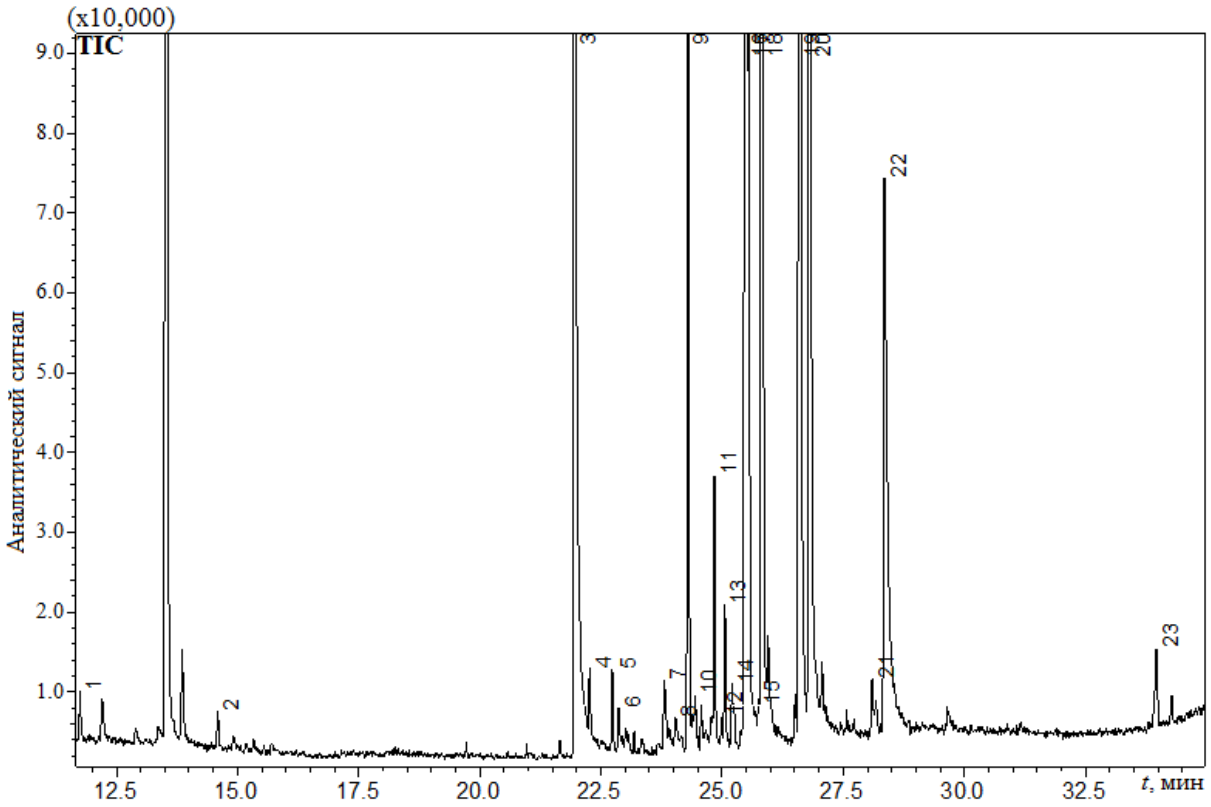
Таблица 12 – Содержание летучих соединений в CO2-экстракте ромашки аптечной, рассчитанное методом нормировки

№	Время, мин	Содержание, %	Соединение
1	10.804	0.59	β-пинен
2	10.902	0.29	β-мирцен
3	11.637	0.24	α-терпинен
4	11.953	3.77	(+-)- α-лимонен
5	12.643	0.54	γ-терпинен
6	15.107	12.34	D-ментон
7	15.372	4.7	L-ментон
8	15.547	0.23	цис-3-метилциклогексанол
9	15.883	1.95	(+-)-*p*-мент-1-ен-4-ол
10	16.139	0.32	(6E)-2,6-диметил-1,6-октадиен
11	17.306	1.19	(+)-(R)-пулегон
12	21.187	0.18	α-кариофиллен
13	21.306	0.14	2-(5'-метил-2'-фурфурил)-фуран
14	21.896	0.64	β-кариофиллен
15	22.271	4.14	β-фарнезен
16	24.542	1.58	спатуленол
17	25.724	10.61	α-оксид бисаболола B
18	26.067	3.9	оксид бисаболона
19	26.880	0.55	хамазулен
20	27.044	16.81	оксид бисаболола A
21	28.329	1.43	тетрагидрогеранилацетон
22	28.445	3.66	ен-ин-дициклоэфир
23	28.603	13.64	ен-ин-дициклоэфир
24	30.043	1.34	пальмитиновая кислота
25	33.557	15.22	9-цис-12-цис-линолевая кислота

Содержания ЭМК в эфирном масле из цветов ромашки аптечной. Из цветов ромашки аптечной «Родные травы» по рекомендации [60] получали эфирное масло гидродитилляцией по Гинзбергу, содержание которого в сухом сырье составило 0.7±0.1%. В растворе эфирного масла ромашки аптечной в гексане по результатам ГХ-МС анализа (рисунок 26) идентифицировали более 20 ЭМК (таблица 13). Большая часть идентифицированных соединений относилась к сесквитерпенам, что согласуется с литературными данными.

Макрокомпонентами были β-фарнезен (4.90 мкг/г), α-оксид бисаболола B (34.46 мкг/г) и оксид бисаболола A (37.63 мкг/г).

В аналогичных условиях проанализировали масло ромашки «OLEOS», разбавленное гексаном. Основными компонентами в нем были β-фарнезен, α-оксид бисаболола B, 3-туйянол и оксид бисаболола A (таблица 13). Стоит отметить, что содержание последнего в разы превышало остальные. Число идентифицированных компонентов здесь было меньше, и содержания микрокомпонентов отличались, что может быть связано с особенностями технологического процесса получения масла.



1 – 1,8-цинеол, 2 – камфора, 3 – (E)-β-фарнезен, 4 – артемизеол, 5 – (-)-гермакрен Д, 6 – β-кариофиллен, 7 – (2E,6E)-3,7,11-триметил-2,6,10-додекатриен-1-ол, 8 – циклопентилметанол, 9 – (-)-спатуленол, 10 – (-)-β-оксид кариофиллена, 11 – 3-туйянол, 12 – α-оксид бисаболола B, 13 – 2,3,4-триметилгексан, 14 – (+)-спатуленол, 15 – (-)-гермакрен Д, 16 – α-оксид бисаболола B, 17 – α-диэпоксид лимонена, 18 – 3-туйянол, 19 – хамазулен, 20 – оксид бисаболола A, 21 – 2-нонанон, 22 – ен-ин-дициклоэфир, 23 – (Z)-9-додецен-1-ол

Рисунок 26 – ГХ-МС-хроматограмма раствора эфирного масла ромашки аптечной в гексане

В обоих исследуемых растворах эфирных масел ромашки аптечной идентифицирован хамазулен, придающий раствору синюю окраску и подтверждающий натуральность извлечения.

Таблица 13 – Содержания* ЭМК в эфирном масле ромашки аптечной, полученом гидродистилляцией и масле «OLEOS» (n = 3, P = 0.95)

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	Эфирное масло		масло «OLEOS»	
		Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мг/мл
11.748	1,8-цинеол (91)	0.055	0.05	н/о**	н/о
14.595	камфора (91)	0.039	0.04	н/о	н/о
19.869	лимонен-10-ол (79)	н/о	н/о	0.033	1.03
21.698	β-мирцен (80)	н/о	н/о	0.020	0.63
21.956	(E)-β-фарнезен (93)	5.39	4.90	8.48	264.63
22.267	артемизеол (79)	0.081	0.07	н/о	н/о
22.305	2,6-фарнезол (*цис*-/*транс*-) (88)	н/о	н/о	0.179	5.57
22.466	2,6-фарнезол (*цис*-/*транс*-) (82)	н/о	н/о	0.054	1.68
22.736	(-)-гермакрен Д (84)	0.081	0.07	0.380	11.87
22.865	β-кариофиллен (75)	0.054	0.05	0.071	2.23
23.051	α-кариофиллен (78)	н/о	н/о	0.317	9.90
23.296	(-)-гермакрен Д (87)	н/о	н/о	0.062	1.94
23.388	δ-кадинен (85)	н/о	н/о	0.112	3.50
23.809	(2E,6E)-3,7,11-триметил-2,6,10-додекатриен-1-ол (84)	0.111	0.10	н/о	н/о
24.041	циклопентилметанол (79)	0.047	0.04	н/о	н/о
24.299	(-)-спатуленол (85)	1.23	1.12	0.320	9.98
24.444	(-)-β-оксид кариофиллена (77)	0.038	0.03	н/о	н/о
24.541	α-терпинолен (75)	н/о	н/о	0.018	0.55
24.841	3-туйянол (80)	0.23	0.21	н/о	н/о

Продолжение таблицы 13

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	Эфирное масло		масло «OLEOS»	
		Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мг/мл
24.997	α-оксид бисаболола B (71)	0.027	0.02	н/о	н/о
25.059	2,3,4-триметилгексан (76)	0.130	0.12	н/о	н/о
25.208	(+)-спатуленол (73)	0.060	0.05	н/о	н/о
25.240	(-)-гермакрен Д (73)	0.036	0.03	н/о	н/о
25.290	Ƭ-кадинол (81)	н/о	н/о	0.437	13.66
25.487	α-оксид бисаболола B (91)	37.84	34.46	4.94	154.10
25.547	α-диэпоксид лимонена (83)	0.75	0.68	0.436	13.62
25.822	3-туйянол (83)	6.56	5.97	5.46	170.48
26.591	хамазулен (93)	4.35	3.96	0.395	12.35
26.807	оксид бисаболола A (87)	41.33	37.63	77.39	2416.16
28.097	2-нонанон (80)	0.050	0.05	н/о	н/о
28.352	ен-ин-дициклоэфир (84)	1.37	1.25	0.904	28.21
33.964	(Z)-9-додецен-1-ол (88)	0.14	0.13	н/о	н/о

**рассчитаны методами нормировки (%) и внутреннего стандарта; **н/о – не обнаружено*

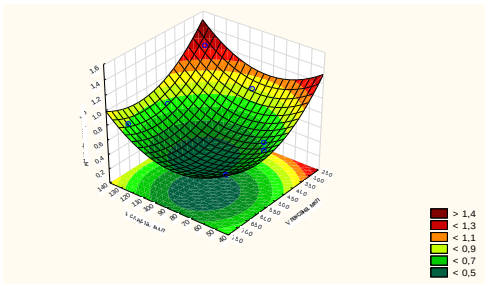
Извлечение эфирномасличных компонентов из гидролата ромашки аптечной для ГХ-МС-анализа. При гидродистилляции помимо эфирного масла получают ароматную воду. Для определения аналитов в ней мтодом ГХ-МС требуется предварительная экстракция ЭМК в органическую фазу. Оптимизацию условий извлечения эфирномасличных компонентов проводили на образце гидролата ромашки аптечной ТМ «Мариславна», г. Майкоп.

В сравнении с традиционной ЖЖЭ использование ДЖЖМЭ более эффективно за счет повышения массообмена между водной и органической фазами экстракционной системы путем введения полярных диспергаторов – ацетона, ацетонитрила или спиртов. В своих экспериментах мы использовали этанол как диспергатор. В качестве экстрагента, как правило, применяют гексан или хлороформ, но хлороформ хуже отделяется от воды вследствие частичной растворимости. Оптимизацию условий ДЖЖМЭ летучих компонентов из гидролата ромашки аптечной проводили с использованием трехфакторного анализа по плану Бокса-Бенкена по содержаниям аналитов. В качестве независимых факторов рассматривали объем этилового спирта (диспергента), мкл (X_1), объем гексана (экстрагента), мкл (X_2) и время обработки УЗ, мин (X_3) (таблица 14). Квадратичные коэффициенты рассчитывали методом наименьших квадратов, значимость факторов ($p<0.05$) оценивали с использованием дисперсионного анализа ANOVA, построение модели и интерпретацию данных проводили в программе STATISTICA, version 13.3.0.

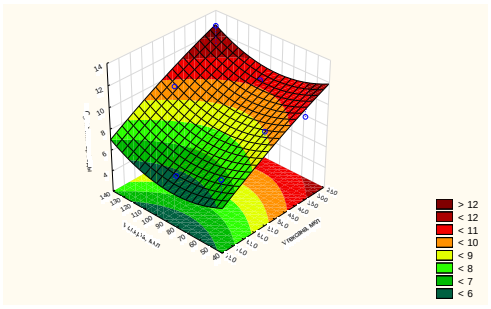
Таблица 14 – Условия планирования эксперимента для оптимизации условий извлечения ЭМК по технике ДЖЖМЭ из коммерческого гидролата ромашки аптечной

Условия эксперимента			
Уровни	X_1, мкл	X_2, мкл	X_3, мин
-1	50	300	10
0	90	500	20
+1	130	700	30

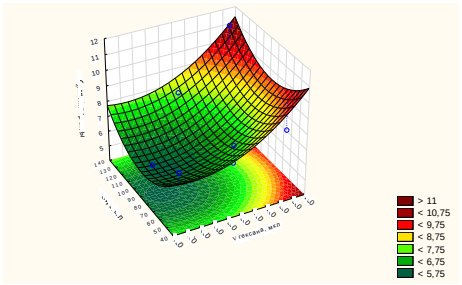
Экспериментальная модель показала, что для всех компонентов гидролата время обработки УЗ и объем добавляемого спирта оказались незначимыми ($p>0.05$). Для извлечения (-)-спатуленола, 3-туйянола и ен-ин-дициклоэфира значимым фактором является объем диспергента. Анализ поверхностей отклика показал, что наибольшая эффективность извлечения аналитов достигается при использовании 130 мкл диспергента и 300 мкл экстрагента (рисунок 27 (а–д)). Графики поверхности построены для УЗ обработки в течение 10 мин.



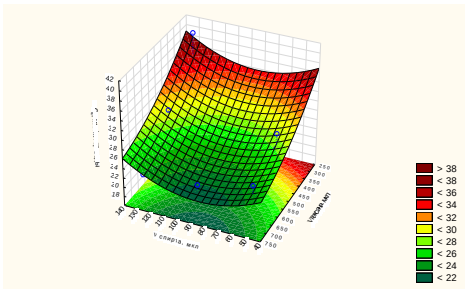
а)



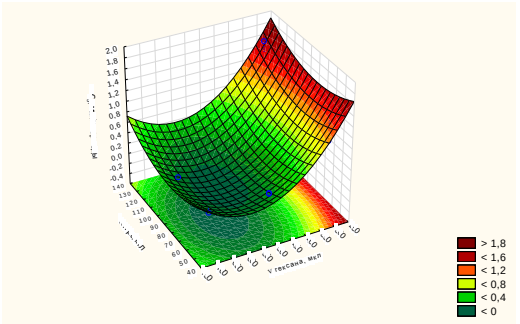
в)



б)



г)



д)

Рисунок 27 – Эффективность извлечения извлечения (-)-спатуленола (а), α-оксида бисаболола (б), 3-туйянола (в), α-диэпоксида лимонена (г) и ен-ин-дициклоэфира (д) из гидролата ромашки аптечной «Мариславна»

По полученным данным оценили эффективность ДЖЖМЭ ЭМК из 1 мл гидролата с 130 мкл диспергента в 300 мкл гексана без и с УЗ обработкой в течение 10 мин (таблица 15), значения которых оказались сопоставимыми. Поэтому ДЖЖМЭ ЭМК с УЗ обработкой в дальнейшем не применяли.

Таблица 15 – Содержания ЭМК в гидролате ромашки аптечной после концентрирования гексаном по технике ДЖЖМЭ, мкг/мл* (n = 3, P = 0.95)

Соединение	после УЗ обработки гидролата в течение 10 мин	без УЗ обработки гидролата
(-)-спатуленол	1.59	1.56
α-оксид бисаболола B	10.36	11.39
3-туйянол	11.05	11.40
α-диэпоксид лимонена	33.49	35.56
ен-ин-дициклоэфир	1.72	2.00

**рассчитаны методом внутреннего стандарта*

В выбранных условиях оценили влияние центрифугирования при скоростях вращения 6000, 8000, 10000 и 12000 об/мин в течение 2, 5 и 8 мин на извлечение ЭМК из гидролата. Степени извлечения аналитов при 8000 и 10000 об/мин были близки вне зависимости от времени центрифугирования, при 6000 и 12000 об/мин эти показатели оказались ниже. Поэтому в качестве оптимальной выбрали скорость вращения 8000 об/мин в течение 2 мин.

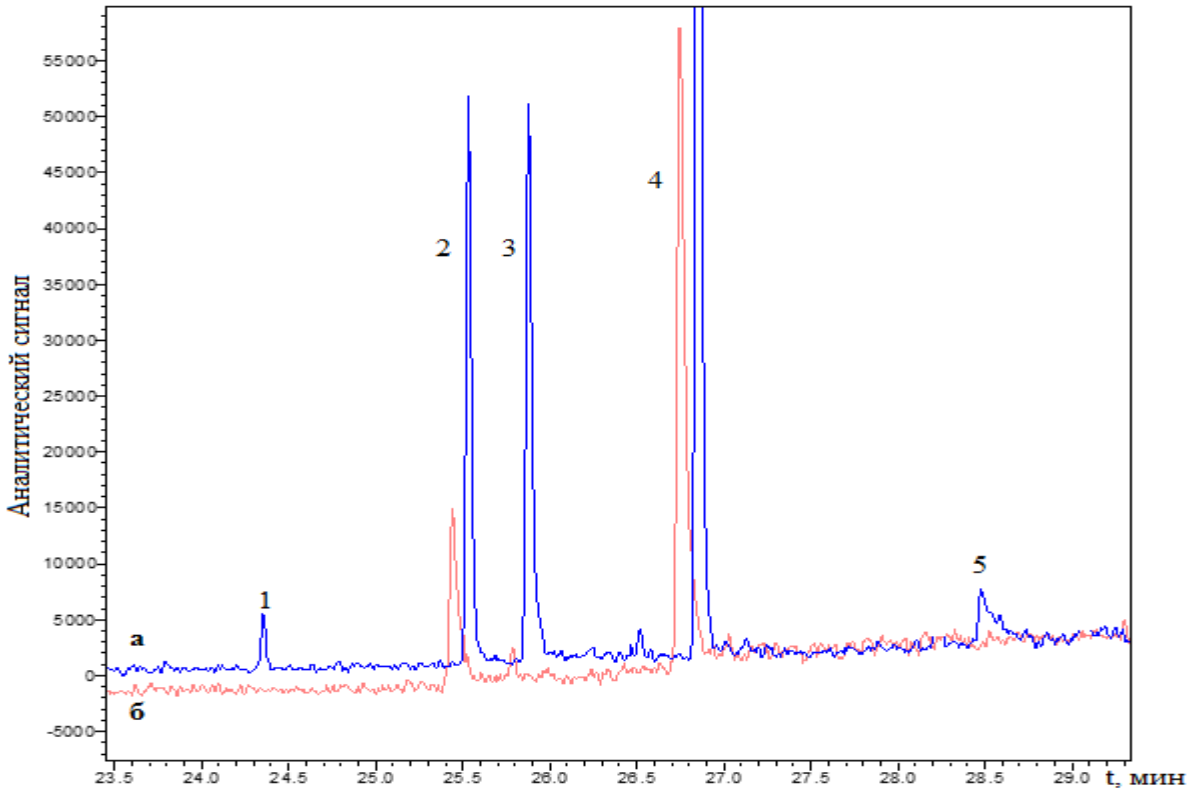
Сорбционные характеристики нетканого волокна на основе полиуретана для извлечения ЭМК из гидролата ромашки аптечной оценивали по степени сорбции аналитов, сравнивая содержание ЭМК в гидролате до и после его пропускания через ПУ (таблица 16). Для этого с помощью техники ДЖЖМЕ извлекали ЭМК из 1 мл исходного образца и 1 мл гидролата, прошедшего через слой сорбента.

Таблица 16 – Содержания ЭМК в гексановом экстракте из гидролата ромашки аптечной до и после пропускания через ПУ, мкг/мл* гидролата (n = 3, P = 0.95)

Соединение	до пропускания через ПУ	после пропускания через ПУ
(-)-спатуленол	1.56	0.02
α-оксид бисаболола В	11.39	1.62
3-туйянол	11.40	0.38
α-диэпоксид лимонена	35.56	1.85
ен-ин-дициклоэфир	2.00	0.1

**рассчитаны методом внутреннего стандарта*

Идентифицированные в гидролате компоненты являются основными в ароматной воде. Отсутствие пиков и уменьшение их интенсивности на хроматограмме гексанового экстракта из прошедшего через сорбент гидролата свидетельствует об эффективности сорбции аналитов (рисунок 28).



1 – (–)-спатуленол, 2 – α-оксид бисаболола В, 3 – 3–туйянол, 4 – α-диэпоксид лимонена, 5 – ен-ин-дициклоэфир

Рисунок 28 – Хроматограмма гексанового экстракта из гидролата ромашки до (а) и после пропускания через ПУ-волокно (б)

Для изучения десорбции аналитов с ПУ волокна пластинку высушивали, не извлекая из фильтродержателя для минимизации потерь, затем целевые компоненты смывали 1 мл гексана. Эффективность десорбции оценивали по содержанию ЭМК в элюате и гексановом экстракте из исходного гидролата ромашки аптечной (таблица 17). Для α-оксида бисаболола В степень реэкстракции составила около 79%, для остальных компонентов она оказалась выше 90%. Стоит отметить, что степень высушивания нетканого материала в наибольшей степени влияет на эффективность десорбции ЭМК.

Таблица 17 – Содержания ЭМК в элюате после десорбции с ПУ, мкг/мл*

Соединение	Содержания
(-)-спатуленол	1.83
α-оксид бисаболола В	10.48
3-туйянол	11.24
α-диэпоксид лимонена	28.20
ен-ин-дициклоэфир	1.6

**рассчитаны методом внутреннего стандарта*

Полученные результаты сравнили с данными, полученными с применением известных сорбентов, используемых для извлечения ЭМК из водных растворов (таблица 18).

Таблица 18 – Содержания ЭМК в гексановом элюате после сорбции из гидролата ромашки аптечной «Мариславна», мкг/мл*

Соединение	Содержания ЭМК в гексановом элюате, мкг/мл гидролата			
	Oasis HLB	Strata C18-E	Strata X	ПУ-10%
(-)-спатуленол	н/о	н/о	н/о	1.83
α-оксид бисаболола В	н/о	н/о	н/о	10.48
3-туйянол	н/о	0,85	н/о	11.24
α-диэпоксид лимонена	н/о	н/о	н/о	28.20
ен-ин-дициклоэфир	н/о	н/о	н/о	1.6

**рассчитаны методом внутреннего стандарта*

Из таблицы 18 видно, что аналиты в указанных условиях не десорбируются с сорбентов Oasis HLB, Strata C18-E и Strata X. Увеличение объема экстрагента до 5 мл путем смывания порциями по 1 мл не повлияло на десорбцию, равно как и использование в качестве элюента смеси гексан: ацетон (1:1 об.). Для извлечения ЭМК из растительных водных экстрактов ПУ-волокном для элюирования оказалось достаточно 1 мл гексана [183].

Для ароматной воды ромашки аптечной, полученной при гидродистилляции по [60], оценили содержания ЭМК в извлечениях по технике ДЖЖМЭ в оптимизированных условиях, и ЖЖЭ гексаном (таблица 19).

Из ароматной воды ЖЖЭ гексаном извлекли и идентифицировали 14 компонентов, относящихся к различным классам кислородсодержащих соединений. Основными компонентами полученного экстракта оказались α-оксид бисаболола B (1.14 мкг/г), α-диэпоксид лимонена (0.18 мкг/г), оксид бисаболола A (1.77 мкг/г). В отличие от состава эфирного масла в ароматной воде отсутствовали (E)-β-фарнезен, артемизеол, (-)-гермакрен Д, β-кариофиллен, (2E,6E)-3,7,11-триметил-2,6,10-додекатриен-1-ол, циклопентилметанол, (-)-β-оксид кариофиллена, α-оксид бисаболола B (изомер), (+)-спатуленол, (-)-гермакрен Д, хамазулен, 2-нонанон, ен-ин-дициклоэфир, (Z)-9-додецен-1-ол, но идентифицировали легколетучие компоненты – спирт йомоги, тетрагидропиран-2-карбинол, α-терпинолен, 2,3-диметил-1,4-гексадиен, (+-)-р-мент-1-ен-4-ол, отсутствующие в эфирном масле (таблица 19).

Техника ДЖЖМЭ позволила также идентифицировать кетон артемизии, 1-нонанол, (2E)-3,5-диметил-2-гексен, мирценол, 2,4,4-триметилгексан и ен-ин-дициклоэфир (таблица 19). Основными макрокомпонентами экстрактов в обоих случаях были α-оксид бисаболола B и оксид бисаболола A. В оптимизированных условиях ДЖЖМЭ степени извлечения ЭМК в органическую фазу из ароматной воды оказались выше по сравнению с ЖЖЭ. Суммарные содержания извлеченных гексаном из образца гидролата ромашки аптечной эфирномасличных компонентов составили 4.895 мкг/г по технике ДЖЖМЭ и 3.321 мкг/г ЖЖЭ. Эффективность извлечения α-терпинолена,

(+-)-р-мент-1-ен-4-ола, (-)-спатуленола, 2,3,4-триметилгексана, α-оксида бисаболола В, 3-туйянола, оксида бисаболола А с извлечением по технике ДЖЖМЭ повысилась на 30-35%; камфоры и изомера 3-туйянола – на 20%. Из полученных данных следует, что ароматная вода ромашки аптечной в большей степени содержит легколетучие компоненты в сравнении с эфирным маслом [184].

Таблица 19 – Содержания* ЭМК в гексановом экстракте из ароматной воды ромашки аптечной (n = 3, P = 0.95)

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	Ароматная вода			
		ЖЖЭ		ДЖЖМЭ	
		Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мкг/г
10.751	спирт йомоги (88)	1.66	0.055	1.30	0.064
11.748	1,8-цинеол (91)	0.83	0.028	0.62	0.031
12.206	кетон артемизии (90)	н/о**	н/о	0.20	0.010
12.894	тетрагидропиран-2-карбинол (90)	0.34	0.011	0.25	0.012
13.312	α-терпинолен (93)	0.71	0.024	0.79	0.039
14.595	камфора (91)	0.77	0.025	0.61	0.030
14.901	1-нонанол (89)	н/о	н/о	0.06	0.0029
15.160	(2E)-3,5-диметил-2-гексен (89)	н/о	н/о	0.04	0.002
15.338	2,3-диметил-1,4-гексадиен (88)	0.22	0.007	0.15	0.007
15.660	(+-)-р-мент-1-ен-4-ол (92)	0.43	0.014	0.39	0.019
15.957	мирценол (83)	н/о	н/о	0.15	0.007
16.460	2,4,4-триметилгексан (91)	н/о	н/о	0.06	0.003
24.299	(-)-спатуленол (85)	0.23	0.008	0.22	0.011
24.841	3-туйянол (80)	0.45	0.015	0.38	0.019
25.059	2,3,4-триметилгексан (76)	0.21	0.007	0.22	0.011
25.487	α-оксид бисаболола В (91)	34.29	1.14	35.57	1.74
25.547	α-диэпоксид лимонена (83)	5.45	0.18	3.84	0.19
25.822	3-туйянол (83)	1.12	0.037	1.02	0.050
26.807	оксид бисаболола А (87)	53.30	1.77	53.79	2.63
28.352	ен-ин-дициклоэфир (84)	н/о	н/о	0.34	0.017

**рассчитаны методами нормировки (%) и внутреннего стандарта (мкг/г); **н/о – не обнаружено*

Извлечение летучих компонентов из цветов ромашки аптечной в ацетон в субкритических условиях. В таблице 20 приведены содержания летучих компонентов в ацетоновом экстракте цветов ромашки аптечной, полученном в субкритических условиях, рассчитанные методами нормировки и внутреннего стандарта, установленные по результатам ГХ-МС анализа. Основными макрокомпонентами экстракта в субкритических условиях были ен-ин-дициклоэфир (190.2 мкг/г) и оксид бисаболола А (103.5 мкг/г), содержание которых значительно выше, чем в эфирном масле и ароматной воде. При этом концентрация α-оксида бисаболола В в три раза ниже, чем в эфирном масле. Отсутствие хамазулена в экстракте, по-видимому, можно объяснить неполнотой протекания реакции термического окисления матрикарина, продуктом которого он является. Кроме того, субкритический экстракт в отличие от полученного гидродистилляцией содержит предельные и непредельные углеводороды (додекан, тетрадекан, гексадекан и другие) при меньших концентрациях оксигенированных соединений, образующихся при длительном температурном воздействии.

Компонентный состав полученных экстрактов отличается от некоторых результатов исследований (таблица 20). Данный факт может быть обусловлен, по-видимому, различной природой воздействия использованных экстрагентов. Из результатов видно, что 50%-ный этанол извлекает из растительного сырья более полярные компоненты (фитол, стигмастерол, этилоктадекадиеноат и другие), чем менее полярный ацетон.

Таблица 20 – Содержания летучих компонентов в полученном в субкритических условиях ацетоновом экстракте из цветов ромашки аптечной* (n = 3, P = 0.95)

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	Содержание, %	Содержание, мкг/г	Данные авторов** [175]
11.225	3,5-диметилоктан (93)	2.01	10.4	-
13.478	β-линалоол (82)	0.50	2.6	-
16.589	додекан (96)	5.76	29.6	-
20.934	1-ундецен (86)	0.22	1.1	-
21.145	тетрадекан (98)	8.68	44.7	-
22.110	(E)-β-фарнезен (86)	0.60	3.1	+
	гермакрен Д	н/о	н/о	+
	гермакрен В	н/о	н/о	+
24.567	1-ундецен (90)	0.31	1.6	-
24.727	гексадекан (97)	6.39	32.9	-
25.635	α-оксид бисаболола В (82)	2.32	11.9	+
25.978	(+)-оксид лимонена (82)	1.36	7.0	-
	оксид бисоболола	н/о	н/о	+
26.274	7-метокси- кумарин (80)	4.36	22.4	+
	хамазулен	н/о	н/о	+
26.954	оксид бисаболола А (82)	20.10	103.5	+
27.728	гексадекан (96)	3.59	18.5	-
28.330	ен-ин-дициклоэфир (85)	3.91	20.1	+
28.478	ен-ин-дициклоэфир (86)	36.94	190.2	+
31.085	гексадекан (95)	1.62	8.3	-
34.995	додекан (91)	0.63	3.2	-
36.665	тридекан (89)	0.68	3.5	-
	гексадекандиеновая кислота	н/о	н/о	+
	этилгексадеканоат	н/о	н/о	+
	фитол	н/о	н/о	+
	9,12-октадекадиеновой кислоты	н/о	н/о	+
	этилоктадекадиеноат	н/о	н/о	+
	этилоктадеканоат	н/о	н/о	+
	2(1H)октагидро-4a-фенил-нафталин	н/о	н/о	+
	матрикарин	н/о	н/о	+
	стигмастерол	н/о	н/о	+
	β-ситостерол	н/о	н/о	+
	бетулин	н/о	н/о	+

***** *рассчитаны методами нормировки (%) и внутреннего стандарта (мкг/г)*

****** *представлены данные качественной идентификации*

Влияние УЗ-обработки на извлечение летучих органических соединений из цветов ромашки аптечной

УЗ-обработка в течение 10 мин и фракционный состав цветов ромашки аптечной оказывают влияние на извлечение ЛОС ацетоном. В таблицу 21 сведены наши экспериментальные данные по влиянию УЗ-обработки на извлечение ЛОС после УЗ-обработки из измельченных частиц сырья размерами 0.5–1 мм, менее 0.5 мм и навесками 0.040 г и 0.100 г. Как видно из таблицы 21, с увеличением навески до 100 мг расширился перечень идентифицированных летучих компонентов в составе ромашки аптечной. Были идентифицированы (-)-гермакрен Д, β-мирцен, 6-додеканон, метил-линолелаидат, этил-линолеат, (Z)-4-децен-1-ол, матрикарин и гептакозан. Отметим, что количество извлекаемых компонентов из сырья с меньшим размером частиц оказалось выше в 2–5 раз.

Эффективность УЗ-обработки во времени оценивали по извлечению летучих компонентов из цветов ромашки аптечной (таблица 22). Наибольшее количество аналитов извлекалось в течение 20 мин, за исключением 10-ундецин-1-ола, 6-додеканона, 1-октадецина, метил-линолелаидата и этил-линолеата, содержание которых возрастает после 30 мин обработки. (Z)-4-децен-1-ол, 2,3-дигидроксипропил-пальмитат и гексакозан не были идентифицированы в экстрактах после УЗ-обработки дольше 10 мин. Помимо ен-ин-дициклоэфира, α-оксида бисаболола В и β-фарнезена в ацетоновых экстрактах идентифицировали линолевую, стеариновую и пальмитиновую жирные кислоты и их эфиры [185].

Таблица 21 – Содержания летучих компонентов в ацетоновом экстракте цветов ромашки аптечной после 10 мин УЗ-обработки* (n = 3, P = 0.95)

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	Масса навески 0.040 г				Масса навески 0.100 г			
		Размер частиц менее 0.5 мм		Размер частиц 0.5–1 мм		Размер частиц менее 0.5 мм		Размер частиц 0.5–1 мм	
		%	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г
21.990	(E)-β-фарнезен (94)	4.59	1.73	1.94	0.37	6.00	3.69	2.65	1.17
22.752	(-)-гермакрен Д (80)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.07	0.05	н/о	н/о
22.877	β-мирцен (75)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.03	0.03	н/о	н/о
24.331	(-)-спатуленол (83)	0.94	0.35	0.84	0.16	0.93	0.98	0.74	0.32
25.512	α-оксид бисаболола B (83)	2.35	0.89	1.64	0.31	2.23	2.35	1.54	0.68
25.856	3-туйянол (80)	1.74	0.66	1.29	0.25	1.67	1.76	1.14	0.50
26.831	оксид бисаболола A (83)	6.05	2.28	4.81	0.92	6.43	6.77	4.23	1.86
28.073	6-додеканон (82)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.17	0.18	0.10	0.04
28.203	ен-ин-дициклоэфир (84)	1.77	0.67	0.76	0.15	2.89	3.04	2.18	0.96
28.339	ен-ин-дициклоэфир (91)	28.11	10.61	24.51	3.84	29.17	30.70	28.48	12.53
29.799	пальмитиновая кислота (83)	1.15	0.44	0.62	0.12	2.30	2.42	2.65	1.17
32.424	метил-линолелаидат (83)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.21	0.22	0.09	0.04
33.135	стеариновая кислота (86)	2.65	1.00	1.32	0.25	3.57	3.76	3.71	1.63
33.221	линолевая кислота (86)	2.94	1.11	н/о	н/о	7.16	7.54	5.94	2.61
33.753	этил-линолеат (76)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.63	0.66	0.46	0.20
33.960	(Z)-4-децен-1-ол (78)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.33	0.35	н/о	н/о
36.469	трикозан (88)	н/о	н/о	0.86	0.17	0.49	0.52	0.53	0.23
37.443	матрикарин (78)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.62	0.66	н/о	н/о
37.981	гептакозан (79)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.31	0.33	0.34	0.15
39.022	2,3-дигидроксипропил пальмитат (80)	н/о	н/о	7.98	1.53	2.68	2.82	3.33	1.46
39.423	пентакозан (87)	18.20	6.87	19.88	3.81	13.34	14.04	16.77	7.38
42.254	гексакозан (83)	н/о	н/о	1.72	0.33	0.90	0.95	1.14	0.50
42.586	гептакозан (84)	13.17	4.97	13.43	2.58	7.29	7.67	9.83	4.32
46.706	нонакозан (90)	16.34	6.17	17.84	3.42	8.23	8.66	11.00	4.84
52.452	гексакозан (85)	н/о	н/о	5.08	0.97	2.35	2.47	3.15	1.39

** рассчитаны методами нормировки (%) и внутреннего стандарта (мкг/г)*

Таблица 22 – Содержания ЛОС в ацетоновых экстрактах цветов ромашки аптечной, полученных после 10-, 20- и 30 мин УЗ-обработки* (n = 3, P = 0.95)

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	10 мин		20 мин		30 мин	
		Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мкг/г
21.964	(E)-β-фарнезен (92)	6.00	6.31	5.90	7.08	6.35	6.73
22.745	(-)-гермакрен Д (80)	0.07	0.07	0.08	0.09	0.08	0.09
22.877	β –мирцен (72)	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04
24.310	(-)-спатуленол (87)	0.93	0.98	0.83	1.00	0.92	0.97
25.492	α-оксид бисаболола B (83)	2.23	2.35	2.08	2.49	2.26	2.39
25.833	3-туйянол (82)	1.67	1.76	1.54	1.85	1.71	1.81
26.170	7-метокси-4H-хромен-4-он (79)	н/о	н/о	0.72	0.86	0.39	0.42
26.612	хамазулен (74)	н/о	н/о	0.10	0.12	0.07	0.07
26.810	оксид бисаболола A (83)	6.43	6.77	6.09	7.31	6.53	6.92
27.141	10-ундецин-1-ол (82)	н/о	н/о	0.09	0.11	0.15	0.16
28.073	6-додеканон (82)	0.17	0.18	0.15	0.18	0.29	0.31
28.170	ен-ин-дициклоэфир (85)	2.89	3.04	2.91	3.49	3.31	3.51
28.318	ен-ин-дициклоэфир (92)	29.17	30.70	28.05	33.68	30.82	32.65
28.821	1-октадецин (76)	н/о	н/о	н/о	н/о	0.13	0.14
29.265	14-метил-пентадеканоат (71)	н/о	н/о	0.12	0.15	0.10	0.10
29.613	7-изопропил-1,4-метил-2-азуленол (70)	н/о	н/о	0.42	0.51	0.40	0.42
29.788	пальмитиновая кислота (83)	2.30	2.42	2.63	3.15	2.08	2.21

Продолжение таблицы 22

t_R, мин	Соединение (вероятность совпадения масс-спектров, %)	10 мин		20 мин		30 мин	
		Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мкг/г	Содержание, %	Содержание, мкг/г
30.443	этиловый эфир пальмитиновой кислоты (70)	н/о	н/о	0.21	0.25	0.17	0.18
32.424	метил-линолелаидат (83)	0.21	0.22	0.21	0.25	0.27	0.29
32.517	метил-линоленат (72)	н/о	н/о	0.14	0.16	0.11	0.11
32.977	3,4-диметил-циклогексанол (82)	н/о	н/о	0.10	0.12	0.08	0.09
33.128	стеариновая кислота (86)	3.57	3.76	3.79	4.55	3.17	3.36
33.216	линолевая кислота (86)	7.16	7.54	7.40	8.89	6.15	6.51
33.741	этил-линолеат (76)	0.41	0.43	0.42	0.51	0.82	0.87
33.960	(Z)-4-децен-1-ол (78)	0.33	0.23	н/о	н/о	н/о	н/о
36.469	трикозан (88)	0.49	0.35	0.45	0.54	0.52	0.55
37.443	матрикарин (78)	0.62	0.52	0.73	0.88	0.59	0.62
37.981	гептакозан (79)	0.31	0.33	0.25	0.30	0.30	0.31
39.022	2,3-дигидроксипропил-пальмитат (80)	2.68	2.82	н/о	н/о	н/о	н/о
39.401	пентакозан (92)	13.34	14.04	13.80	16.57	14.32	15.16
42.254	гексакозан (83)	0.90	0.95	0.41	0.49	0.41	0.43
42.586	гептакозан (84)	7.29	7.67	7.93	9.52	8.19	8.68
46.706	нонакозан (90)	8.23	8.66	9.56	11.48	9.29	9.85
52.452	гексакозан (85)	2.35	2.47	2.87	3.44	н/о	н/о

**рассчитаны методами нормировки (%) и внутреннего стандарта (мкг/г)*

При использовании ацетона в качестве экстрагента из цветов ромашки аптечной, полученных в субкритических условиях, макрокомпонентом извлекается ен-ин-дициклоэфир (таблица 23). Разные условия субкритической экстракции и УЗ-обработки оказывают влияние на содержание в экстрактах летучих компонентов. При субкритической экстракции идентифицированы 19 компонентов с суммарным содержанием 515.60 мкг/г, после УЗ-обработки – 30 компонентов (119.07 мкг/г). Температурное воздействие при субкритической экстракции способствует преобладанию в экстракте ЭМК β-линалоола, (-)-спатуленола, α-оксида бисаболола В, оксида бисаболола А и других компонентов [170]. После УЗ-обработки при комнатной температуре в составе экстракта были идентифицированы жирные кислоты и их эфиры, ряд гидрофобных соединений (углеводородов), практически отсутствующие при других способах экстракции.

Таблица 23 – Компонентный состав ацетоновых экстрактов из цветов ромашки аптечной, полученных в субкритических условиях и при УЗ-обработке*, мкг/г

t_R, мин	Соединение	СКЭ	УЗ
11.225	3,5-диметилоктан	10.4	н/о
13.478	β-линалоол	2.6	н/о
16.589	додекан	29.6	н/о
20.934	1-ундецен	1.1	н/о
21.145	тетрадекан	44.7	н/о
22.110	(Е)-β-фарнезен	3.1	7.08
22.745	гермакрен Д	н/о	0.09
22.877	β –мирцен	н/о	0.05
24.310	(-)-спатуленол	1.00	н/о
24.567	1-ундецен	1.6	н/о
24.727	гексадекан	32.9	н/о
25.635	α-оксид бисаболола В	11.9	2.49
25.833	3-туйянол	н/о	1.85
25.978	(+)-оксид лимонена	7.0	н/о
26.274	7-метокси- кумарин	22.4	0.86
26.612	хамазулен	н/о	0.12
26.954	оксид бисаболола А	103.5	7.31

Продолжение таблицы 23

t_R, мин	Соединение	СКЭ	УЗ
27.141	10-ундецин-1-ол	н/о	0.11
27.728	гексадекан	18.5	н/о
28.073	6-додеканон	н/о	0.18
28.330	ен-ин-дициклоэфир	20.1	3.49
28.478	ен-ин-дициклоэфир	190.2	33.68
29.265	14-метил-пентадеканоат	н/о	0.15
29.613	7-изопропил-1,4-метил-2-азуленол	н/о	0.51
29.788	пальмитиновая кислота	н/о	3.15
30.443	этиловый эфир пальмитиновой кислоты	н/о	0.25
31.085	гексадекан	8.3	н/о
32.424	метил-линолелаидат	н/о	0.25
32.517	метил-линоленат	н/о	0.16
32.977	3,4-диметил-циклогексанол	н/о	0.12
33.128	стеариновая кислота	н/о	4.55
33.216	линолевая кислота	н/о	8.89
33.741	этил-линолеат	н/о	0.51
34.995	додекан	3.2	н/о
36.469	трикозан	н/о	0.54
36.665	тридекан	3.5	н/о
37.443	матрикарин	н/о	0.88
37.981	гептакозан	н/о	0.30
39.401	пентакозан	н/о	16.57
42.254	гексакозан	н/о	0.49
42.586	гептакозан	н/о	9.52
46.706	нонакозан	н/о	11.48
52.452	гексакозан	н/о	3.44

**рассчитаны методом внутреннего стандарта (мкг/г)*

3.2 Извлечение ФС из стевии медовой

Хроматографическое определение ФС в экстрактах из стевии медовой проводили в обращенно-фазовом режиме с колонкой с модифицированным октадецильными группами силикагелем с учетом данных [66,72,141,148].

Анализ ВЭЖХ-ДМД-хроматограмм водно-спиртового экстракта из листьев стевии медовой (рисунок 29), снятых с использованием подвижных фаз с метанолом (а) и ацетонитрилом (б) с 0,1%-ной муравьиная кислота – ацетонитрил показал, что эффективное разделение фенольных кислот с низкими значениями коэффициентов удерживания достигалось с уменьшением скорости изменения содержания органического компонента в подвижной фазе.

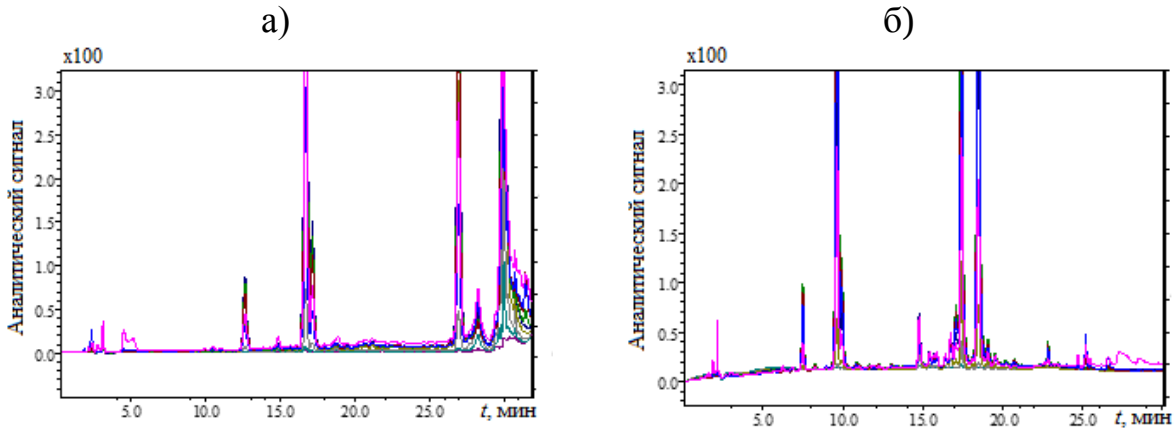
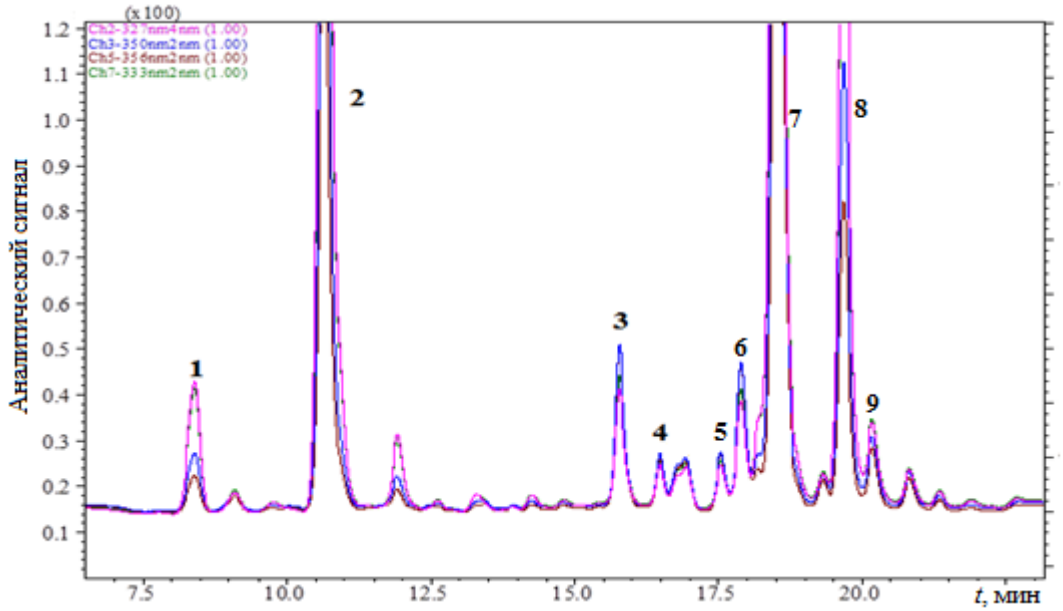


Рисунок 29 – Хроматограммы водно-спиртового экстракта из листьев стевии медовой при использовании подвижной фазы с метанолом (а) и ацетонитрилом (б) при ВЭЖХ-ДМД-анализе

Увеличение крутизны градиента ацетонитрила после 18-ой минуты разделения до 6%/мин позволило сократить время анализа до 31 мин, но некоторые пики оставались недостаточно разрешенными. Повышение температуры до 35°С улучшает разделение пиков кверцетин-О-глюкозида, кверцетин-гликозида I и кверцетин-гликозида II. Наилучшие результаты получили с использованием подвижной фазы ацетонитрил (А) – 0,1%-ная муравьиная кислота (В): 0.01 – 2 мин от 95 до 90% В, 2 – 10 мин от 90 до 80% В,

10 – 18 мин от 80 до 70% В, 18 – 28 мин от 70 до 10% В, 28 – 30 мин 10% В, 30 – 31 мин от 10 до 95% В; температуре термостата колонки 35°С; скорости потока подвижной фазы 0,40 мл/мин. Снятая в оптимизированных условиях хроматограмма экстракта стевии медовой представлена на рисунке 30.



1 – неохлорогеновая кислота, 2 – хлорогеновая кислота, 3 – рутин, 4 – кверцетин-О-глюкозид, 5 – кверцетин-гликозид I, 6 – кверцетин-гликозид II, 7 – дикофеилхинная кислота I, 8 – дикофеилхинная кислота II, 9 – апигенин-7-глюкозид

Рисунок 30 – Хроматограмма водно-спиртового экстракта из листьев стевии медовой в оптимизированных условиях анализа

Подобранные условия анализа позволили надежно идентифицировать 9 компонентов: неохлорогеновая и хлорогеновая кислоты, рутин, гликозиды кверцетина [141,148], два изомера дикофеилхинной кислоты I [112,141,149,186] и апигенин-7-глюкозид [112,179].

Предварительно для всех способов экстракции ФС из листьев стевии проводили исследования по выбору соотношения сырья и объема экстрагента, обеспечивающему полноту извлечения аналитов.

Варьируя состав экстрагента, можно добиться более селективного извлечения разных классов ФС ввиду их разной растворимости. Сравнивали

содержания аналитов в спиртовых и водно-спиртовых средах (30, 50, 70% спирта). Резкое уменьшение содержания ФС в спиртовых экстрактах связано с уменьшением растворимости фенольных кислот и высокой степенью извлечения матричных компонентов, препятствующих экстракции целевых аналитов (рисунок 31). Водно-метанольные и водно-этанольные смеси проявили себе схожим образом, но ввиду меньшей токсичности и большего содержания гликозидов флавоноидов в экстракте в дальнейшей работе использовали 70%-ный этанол.

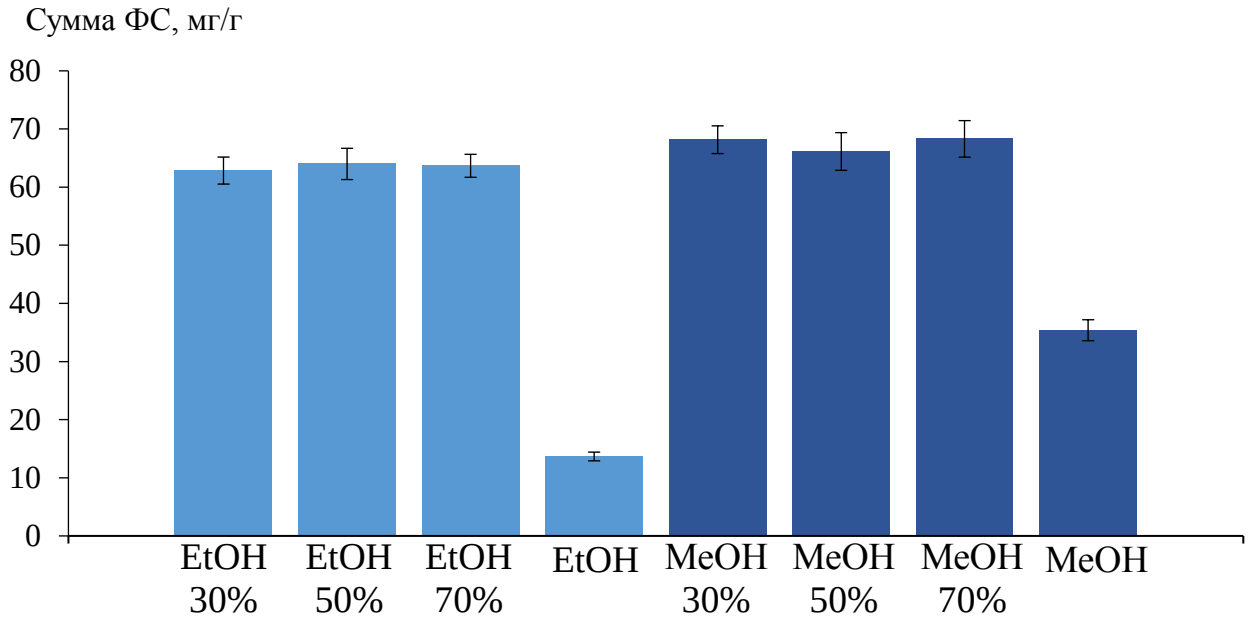


Рисунок 31 – Содержание фенольных соединений в экстрактах из листьев стевии медовой в зависимости от состава растворителя для УЗЭ

Сравнивая разные соотношения сырья и объема экстрагента, оптимальными условиями получения экстрактов были проведение экстракции из 0,5 г измельченных листьев стевии в 50 мл 70%-ного этанола.

В ГФ отсутствуют рекомендации по извлечению ФС из стевии медовой. Поэтому при разработке условий экстракции аналитов из стевии медовой использовали предложенный ГФ способ экстракции ФС из ромашки аптечной в 70%-ный этанол кипячением с обратным холодильником с учетом принадлежности обоих растительных материалов к семейству Астровые [60].

При этом установили, что увеличение продолжительности кипячения с 45 до 60 мин повышало эффективность извлечения кверцетин-гликозидов I и II, апигенин-глюкозида, кверцетин-О-глюкозида, рутина практически в два раза. Большая продолжительность кипячения с экстрагентом не повышала эффективность извлечения аналитов. Однако следует отметить, что с увеличением кипячения с 45 до 60 мин выход неохлорогеновой кислоты снижался с 3,5 до 2,8 мг/г, но суммарный выход ФС в зависимости от времени кипячения повышался с 117,7 мг/г при 30 мин до 119,5 мг/г (45 мин), 128,4 мг/г (60 мин) и 128,9 мг/г (90 мин). Динамика выхода извлеченных ФС кипячением на водяной бане в водно-спиртовые экстракты из листьев стевии медовой в зависимости от времени приведена на рисунке 32.

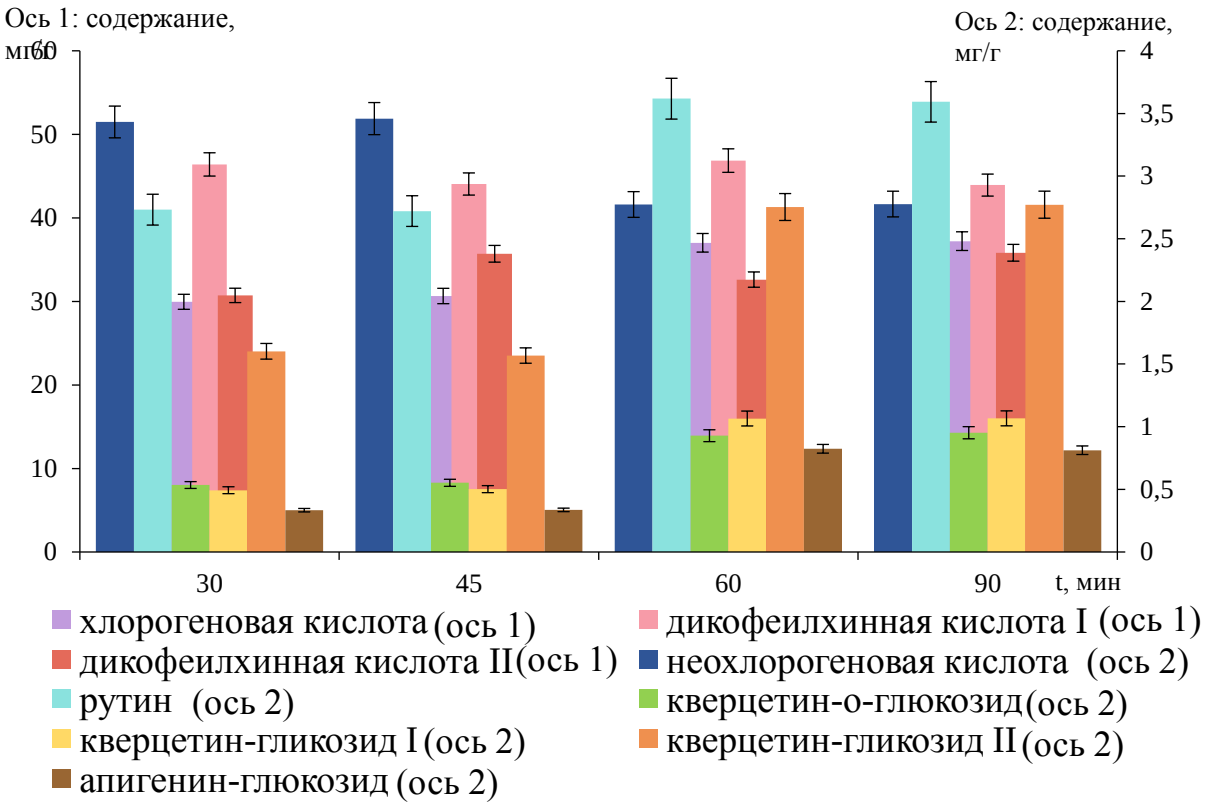
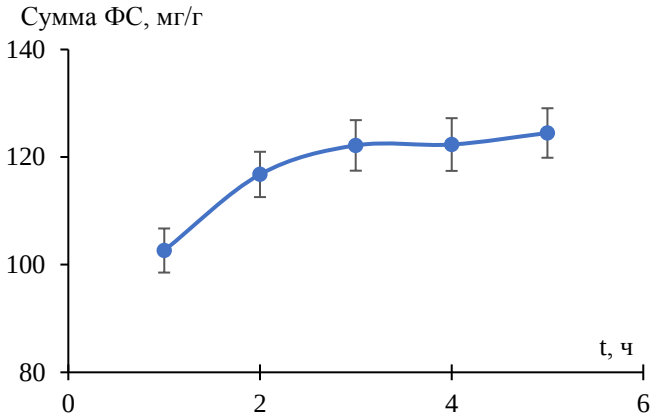


Рисунок 32 – Выход ФС в водно-спиртовые экстракты из листьев стевии медовой во времени после кипячения на водяной бане

Оптимальные условия мацерации и УЗЭ для извлечения ФС устанавливали по зависимости их выхода в экстрактах от времени. Суммарная концентрация

ФС в экстракте при мацерации была максимальной при продолжительности в 2 часа (116,8 мг/г), которая больше не менялась (рисунок 33а), а УЗЭ при комнатной температуре и мощности излучения 49.5 Вт стабилизировалась уже при 30 мин (рисунок 33б).

а)



б)

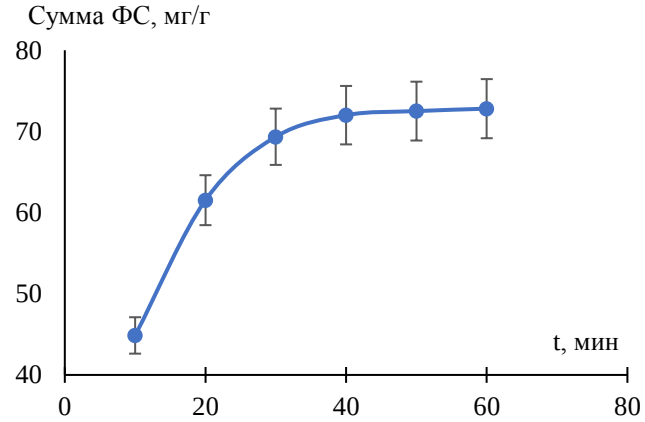


Рисунок 33 – Содержание фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах из листьев стевии медовой в зависимости от времени мацерации (а) и УЗЭ (б)

Далее каждый параметр варьировали при фиксированных значениях двух других параметров. С повышением температуры до 30°С сумма ФС в УЗЭ-экстракте из листьев стевии медовой увеличилась с 68,3 до 94,8 мг/г, также наблюдали повышение суммарного выхода ФС с 68,3 до 93,5 мг/г при различной мощности УЗ излучения с 49,5 до 82,5 Вт. В оптимизированных условиях УЗЭ

(30°С, 30 мин, УЗ-излучение 82,5 Вт) суммарный выход ФС в экстракт повышался практически вдвое по сравнению с исходными условиями (таблица 24).

Таблица 24 – Содержания фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах из листьев стевии медовой, полученных в различных условиях УЗЭ (n=3, P=0.95)

Соединение	Содержание ФС, мг/г						
	Температура, °С				Мощность, Вт		
	25	30	35	40	49.5	82.5	115.5
неохлорогеновая кислота	1.57± 0.13	2.1±0.4	2.23± 0.10	2.172± 0.017	1.57±0.10	2.14± 0.07	2.30±0.10
хлорогеновая кислота	19.5±2.2	26.4± 1.8	26.5± 0.8	26.4±0.5	19.5±2.2	25.7± 2.2	27.7±1.1
рутин	1.81± 0.11	2.6±0.7	2.69± 0.31	2.70±0.23	1.81±0.13	2.65± 0.20	2.77±0.10
кверцетин-О-глюкозид	0.465± 0.015	0.681± 0.021	0.698± 0.028	0.682± 0.007	0.468± 0.011	0.680± 0.015	0.703± 0.007
кверцетин-гликозид I	0.515± 0.011	0.709± 0.015	0.74± 0.07	0.744± 0.034	0.515± 0.012	0.701± 0.016	0.749± 0.012
кверцетин-гликозид II	1.49±0.18	2.06± 0.25	2.13± 0.09	2.06±0.20	1.49±0.19	2.05± 0.27	2.11±0.10
дикофеилхинная кислота I	32.0±1.2	44.4±1.3	44.1±1.9	43.7±0.8	32.0±1.2	43.7±2.3	45.4±3.3
дикофеилхинная кислота II	10.7±0.8	15.3±0.5	15.8±0.5	15.77±0.32	10.7±0.8	15.3±0.9	16.3±0.8
апигенин-глюкозид	0.273± 0.010	0.474± 0.010	0.49±0.05	0.452±0.010	0.273± 0.010	0.54± 0.10	0.557± 0.011
Сумма содержаний	68.3±2.0	94.8±2.7	95.3±3.6	94.7±1.7	68.3±2.0	93.5±3.7	98.5±3.1

Влияние условий МВЭ на извлечение ФС в водно-этанольные экстракты из листьев стевии медовой было разным (таблица 25). При меньших мощностях МВЭ деградация аналитов была минимальна, извлечение аналитов достигалась преимущественно за счет мягкого нагрева. МВЭ при 300 Вт в течение 10 мин оказалась неэффективной для извлечения аналитов, что, по-видимому, объясняется затрудненным массопереносом при недостаточной диффузии экстрагента в клетки растения при резком нагреве пробы. Увеличение МВЭ до 30 мин способствовало в большей степени разрушению матрицы и извлечению ФС. МВЭ при 200 Вт и обработка в течение 10 мин позволили получить

суммарный выход ФС 94.1±6.1 мг/г, а наименьший выход ФС наблюдали при 10 мин обработки и мощности 300 Вт. Время обработки и мощность МВЭ не влияли на количественные характеристики выхода неохлорогеновой и хлорогеновой кислот, рутина, кверцетин-О-глюкозида и гликозидов кверцетина, но при их больших значениях концентрации дикофеилхинной кислоты I и дикофеилхинной кислоты II снижались, что возможно связано с их деградацией в микроволновом поле.

Таблица 25 – Содержания фенольных соединений в водно-этанольных экстрактах из листьев стевии медовой, полученных при различных условиях МВЭ и СКЭ (n=3, P=0.95)

Соединение	Содержание, мг/г						
	Мощность и время МВЭ					Температура СКЭ, °С	
	200 Вт			300 Вт		80	100
	10 мин	30 мин	50 мин	10 мин	30 мин		
неохлорогеновая кислота	2.62±0.11	2.42±0.21	2.31±0.19	0.94±0.04	2.41±0.10	3.08±0.18	3.05±0.17
хлорогеновая кислота	24.0±3.0	23.3±1.6	20.9±1.9	8.31±0.31	22.2±3.0	40.0±2.4	40.4±3.2
рутин	2.21±0.12	1.81±0.21	2.02±0.18	0.78±0.03	2.01±0.21	3.9±0.7	3.77±0.33
кверцетин-О-глюкозид	0.460±0.011	0.432±0.011	0.421±0.028	0.161±0.011	0.421±0.022	0.907±0.031	0.907±0.021
кверцетин-гликозид I	0.410±0.031	0.351±0.032	0.373±0.018	0.140±0.012	0.360±0.012	1.08±0.31	1.1±0.4
кверцетин-гликозид II	0.61±0.13	1.02±0.21	1.12±0.09	0.453±0.010	0.991±0.020	2.9±0.4	2.9±0.4
дикофеилхинная кислота I	27.2±2.2	19.3±2.3	20.3±0.5	11.1±1.6	18.5±2.6	62.0±3.3	53.3±1.8
дикофеилхинная кислота II	36.3±1.0	28.4±3.3	35.7±1.5	11.1±0.9	33.9±2.5	25.0±2.8	0.92±0.04
апигенин-глюкозид	0.28±0.09	0.260±0.011	0.248±0.010	0.091±0.010	0.25±0.01	0.880±0.032	0.860±0.028
Сумма содержаний	94±6	77.3±3.6	83.4±2.3	33.1±1.2	81.0±3.1	140±13	107±14

СКЭ ФС из стевии медовой изучали при 80 и 100°С. Установили, что СКЭ ФС из листьев стевии медовой наиболее эффективна при 80°С с суммарным

выходом аналитов 139.6±13.0 мг/г (таблица 25). При 100°С данный показатель снижался до 107.2±14.0 мг/г. Как видно из табл. 5, повышение температуры приводило к практически полной деградации дикофеилхинной кислоты II, а суммарные концентрации дикофеилхинных кислот снижались почти на 40%.

Хроматографическое определение ФС в экстрактах в обращенно-фазовом режиме с использованием колонки с модифицированным октадецильными группами силикагелем существенно расширило возможность изучения трансформации компонентов в экстрактах стевии медовой в различных условиях их выделения, включая воздействие физических полей (УЗЭ, СВЧ, СКЭ). В оптимизированных условиях на ВЭЖХ-ДМД-хроматограммах экстрактов ФС из листьев стевии медовой зарегистрированы еще соединения с *m/z* 447 (t_R 16.8 мин) и *m/z* 593 (t_R 16.9 мин), которые можно отнести к классу гликозидов флавоноидов (рисунок 30). С учетом литературных данных первое соединение (16.8 мин, *m/z* 447) может быть отнесено к лютеолин-7-О-глюкозиду [10], каемпферол-7-О-гексозиду [28,29] или кверцетин-3-О-рамнозиду [13,29], а второе (16.9 мин, *m/z* 593) – каемпферол-3-О-рутинозиду или лютеолин-7-О-рутнозиду [21].

Содержания ФС, извлекаемые в водно-этанольные экстракты из листьев стевии медовой в оптимизированных условиях различными способами, сведены в таблице 26. СКЭ при 80°С дает наибольшие выходы суммы ФС (139.6±13.0 мг/г) по сравнению с другими способами. С другой стороны, данные по выделенным целевым аналитам в пересчете на сухое сырье в экстрактах кипячением на водяной бане с обратным холодильником, УЗЭ и мацерацией достаточно близки (128.3±3.4; 125.8±3.4 и 128.5±9.6 мг/г соответственно). Весьма различным также получается качественный и количественный составы по индивидуальным ФС. Содержание рутина в полученном при кипячении экстракте (1.9±0.6 мг/г) практически в два раза ниже, чем в условиях УЗЭ (3.42±0.11 мг/г) и мацерации (3.60±0.20 мг/г), но при этом концентрация дикофеилхинной кислоты II в экстракте после кипячения выше на 40% (32.6±0.5 мг/г). Отметим, что после МВЭ концентрации всех извлекаемых гликозидов (рутина, кверцетин-О-глюкозида, *m/z* 447, *m/z* 593, кверцетин-гликозидов I и II,

апигенин-глюкозида) в экстракте значительно ниже, чем в полученных другими способами экстрактах. Меньшие содержания гликозидов можно объяснить разрушением гликозидных связей в экстрактах вследствие воздействия микроволнового поля, но при этом в МВЭ экстрактах концентрация дикофеилхинной кислоты II наибольшая (36.3±1.0 мг/г). Поэтому МВЭ можно использовать для целевого извлечения дикофеилхинной кислоты II [173].

Таблица 26 – Содержания ФС в водно-этанольных экстрактах из листьев стевии медовой в оптимизированных условиях, полученных различными способами (n=3, P=0.95)

Соединение	Содержание ФС в пересчете на сухое сырье, мг/г				
	Кипячение на водяной бане	УЗЭ	Мацерация	МВЭ	СКЭ
Неохлорогеновая кислота	2.8±0.2	2.8±0.4	2.8±0.1	2.6±0.1	3.1±0.4
Хлорогеновая кислота	37.0±0.8	35.7±2.9	35.4±4.1	24.0±3.0	40.0±2.4
Рутин	1.9±0.6	3.4±0.1	3.6±0.2	2.2±0.1	3.9±0.1
Кверцетин-О-глюкозид	0.93±0.04	0.88±0.05	0.87±0.01	0.46±0.01	0.91±0.06
m/z 447	0.76±0.13	0.68±0.13	0.69±0.04	0.41±0.03	0.73±0.09
m/z 593	0.88±0.13	0.88±0.07	0.92±0.07	0.60±0.08	0.90±0.09
Кверцетин-гликозид I	1.1±0.1	1.0±0.1	0.97±0.02	0.41±0.03	1.1±0.1
Кверцетин-гликозид II	2.8±0.1	2.6±0.1	2.8±0.2	0.6±0.1	2.9±0.2
Дикофеилхинная кислота I	46.9±2.0	57.7±8.8	60.4±4.4	27.2±2.2	62.0±3.3
Дикофеилхинная кислота II	32.6±0.5	19.4±1.3	19.4±0.4	36.3±1.0	25.0±2.8
Апигенин-глюкозид	0.82±0.10	0.82±0.09	0.74±0.03	0.28±0.09	0.88±0.03
Сумма содержаний	128.3±3.4	125.8±3.4	128.5±9.6	94.1.±6.1	139.6±13.0

Изучение компонентного состава водного экстракта из растений представляет значительный интерес для потребителей и аптечных заготовителей этих экстрактов. Менее полярные гликозиды флавоноидов и дикофеилхинные кислоты извлекаются в воду хуже, а фенольные кислоты одинаково хорошо

растворяются в воде и 70%-ном этаноле. Аналогичные результаты получены авторами [71].

Содержания ФС в образцах листьев стевии медовой разных производителей оценивали по данным наиболее экспрессной и достаточно эффективной УЗЭ. Уровень содержания почти всех ФС в образцах стевии медовой «Ларец Алтая», собранной на территории Алтайского края (130-250 м над уровнем моря), и «Родные травы» (Республика Крым, 180 м над уровнем моря) оказался сопоставимым (таблица 27. Содержание хлорогеновой кислоты в образце стевии медовой, заготовленном в «Родных травах» (35.7±2.9 мг/г) оказалось выше, чем в заготовленном в «Ларец Алтая» (25.6±1.6 мг/г). Концентрация дикофеилхинной кислоты II в заготовленном в «Ларец Алтая» (28.6±3.4 мг/г) оказалась выше, чем в образце из «Родных трав» (19.4±1.3 мг/г). Полученные данные, по-видимому, можно объяснить разными климатическими условиями в зонах произрастания стевии медовой: для Барнаула характерна длинная холодная зима с температурой до -15°С и относительной влажностью 75–80%, короткое умеренно теплое (до +25°С) лето с относительной влажностью 50–70%, а на территории республики Крым преобладает мягкий климат с жарким сухим летом (до +32°С при относительной влажности 55–60%) и малоснежная зима с температурой +(3–9°С) и относительная влажность около 80%. Образец стевии «ФитоКонтинент» отличался от вышеперечисленных меньшими содержаниями (примерно в 1.5 раза) неохлорогеновой и дикофеилхинной кислоты I, хлорогеновой кислоты, кверцетин-О-глюкозида и гликозидов кверцетина I и II, а концентрации остальных ФС были сопоставимы. Образцы стевии медовой по данным заготовителей «ФитоКонтинент» и «Ларец Алтая» собирались на одной территории, но компонентный состав в них оказался разным. Однозначно утверждать природу разных содержаний ФС сложно, можно только предположить отличия в условиях заготовления, сушки и хранения [1, 31].

В экстрактах из образцов стевии, выращенных на территориях Юкатана (Мексика) и Сержипи (Бразилия) с тропическим климатом, где круглый год

жарко и высокая влажность в дождливый сезон, идентифицированы гидроксикоричные кислоты – феруловая, *p*-кумаровая и кофейная, но отсутствовали гликозиды флавоноидов [7, 26]. Отсутствие дикофеилхинных кислот в водно-этанольных экстрактах, полученных авторами [7, 26] в сравнении с данными [4] и изученных нами экстрактах из стевии медовой, по-видимому, можно объяснить климатическими и территориальными условиями их выращивания (таблица 27).

После УЗЭ в 70%-ный этанол и экстрактов, полученных настаиванием с водой в течение 15 мин, оценивали их антиоксидантную активность по содержанию БАВ восстанавливающего характера в пересчете на кверцетин по реакции с перманганатом калия в кислой среде [29] (таблица 27). Полученные значения АОА водно-спиртовых экстрактов, как и следовало ожидать, в сравнении с водными растворами оказались выше, но они были значительно ниже данных по методу FRAP [26], которую также называют показателем антиоксидантной активности (АОА), антиоксидантной емкости, железовосстанавливающей способности или полифенольным индексом [32]. Помимо хлорогеновой и неохлорогеновой кислот в спиртовых растворах содержания всех ФС были выше, но прямую зависимость между суммарным содержанием ФС и АОА не наблюдали, возможно это связано с различием компонентных составов экстрактов. Так, сумма ФС в водно-спиртовых экстрактах производителя «ФитоКонтинент» выше (139.9±4.1 мг/г), чем из образцов стевии медовой «Родные травы» (125.8±3.4 мг/г). С другой стороны, значения АОА этих образцов были достаточно близки и составляли 61.6 и 64.7 мг/г соответственно. Данный факт можно объяснить только большим вкладом концентрации гликозидов кверцетина в значение АОА экстракта из образца «Родные травы». Подтверждением различного вклада компонентов в формирование АОА образцов стевии медовой является географическое происхождение сырья с различными климатическими условиями. В собранном на территории провинции Эльки, Чили (2336 м над уровнем моря) образце стевии медовой авторы [25] установили высокое содержание суммы ФС (300 г-экв

тролокса/г сырья), а показатель АОА по методу FRAP оказался выше, чем данные [24] (220–240 мкмоль-экв тролокса/г сырья), что возможно объясняется существенным вкладом в данный показатель высоких содержаний хлорогеновой и феруловой кислот, обладающих повышенной противоокислительной способностью (таблица 27). Для оценки вклада в значение АОА экстрактов с различных территорий требуются также системные исследования с привлечением данных нескольких подходов для сопоставления результатов по оценке вкладов разных механизмов протекающих процессов [33].

Таблица 27 – Содержания фенольных соединений в различных экстрактах из собранных на разных территориях листьев стевии медовой

Образец стевии и его тер-рия произрастания (высота над уровнем моря), экстрагент / Соединение	Образец стевии и территория его произрастания (высота над уровнем моря), экстрагент											
	“Родные травы”		“ФитоКонтинент”		“Ларец Алтая”		[14]	[168]	[72]		[167]	
	Крым (около 180 м)		Алтайский край (130-250 м)		Алтайский край (130-250 м)		Бремен, Германия (12 м)	Эльки, Чили (2336 м)	Мексика, Юкатан (30 м)		Сержипи, Бразилия (300 м)	
	70%-ный этанол[5]	вода	70%-ный этанол	вода	70%-ный этанол	вода	метанол	вода	50%-ный этанол	вода	12%-ный этанол	вода
Протокатеховая кислота	н/о[1]	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д[2]	н/д	н/д	н/д	0.217±0.001	0.00311±000005
Неохлорогеновая кислота	2.8±0.4	3.0±0.3	4.5±0.3	4.6±0.3	2.2±0.6	2.7±0.4	0.0355	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Хлорогеновая кислота	36±3	38±3	20±1	21±2	26±2	29±1	0.0443	18.0±0.2	23.90±0.04	24.2±0.1	0.77±0.01	5.18±0.02
4-Кофеилхинная кислота	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0.0703	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Кофейная кислота	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	0.47±0.01	4.27±0.03	2.58±0.0	0.516±0.008	0.78±0.03
Эллаговая кислота	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	14.84±0.05	6.72±0.05	н/д	н/д
Рутин	3.4±0.1	3.1±0.2	3.33±0.09	3.1±0.2	2.8±0.2	2.9±0.4	н/д	1.19±0.02	6.12±0.04	3.05±0.07	0.002±0.001	н/о
p-Кумаровая кислота	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	0.0479±0.0002	5.18±0.02
Феруловая кислота	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	8.9±0.2	2.20±0.07	6.12±0.04	0.0321±0.0003	0.1443±0.0002
Ванильная кислота	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	0.046±0.001	0.2479±0.0001
Ванилин	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	0.046±0.001	0.449±0.001
Производное кофейной кислоты	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Кверцетин-О-глюкозид	0.88±0.05	0.78±0.08	0.31±0.02	0.25±0.02	0.56±0.05	0.53±0.03	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Диосмин	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	111.7±0.1	37±13	н/д	н/д
Эпикатехин	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	0.00997±0.00003	н/о
Кемпферол	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	0.01049±0.00002	0.0475±0.0004
Нарингенин	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д	1.8±0.4	3.27±0.07
m/z 447	0.7±0.1	0.51±0.04	0.73±0.01	0.56±0.03	0.68±0.05	0.61±0.09	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
m/z 593	0.88±0.07	0.79±0.06	0.92±0.06	0.82±0.04	0.633±0.009	0.67±0.02	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Кверцетин-гликозид I	1.1±0.1	0.77±0.02	0.284±0.009	0.24±0.01	0.80±0.06	0.88±0.09	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д

Продолжение таблицы 27

Соединение	70%-ный этанол[5]	вода	70%-ный этанол	вода	70%-ный этанол	вода	метанол	вода	50%-ный этанол	вода	12%-ный этанол	вода
Кверцетин-гликозид II	2.6±0.1	1.9±0.1	0.69±0.07	0.51±0.05	1.5±0.1	1.3±0.2	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Дикофеилхинная кислота I	58±9	46±1	89±3	75±3	49±4	45±3	0.1456	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Дикофеилхинная кислота II	19±1.3	16.0±0.2	18.6±0.5	14.5±0.4	29±3	28±3	0.0286	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
4,5-Дикофеилхинная кислота	н	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0.0372	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Апигенин-глюкозид	0.82±0.09	0.42±0.03	0.86±0.07	0.55±0.09	0.77±0.03	0.54±0.09	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Суммарное содержание	126±3[3]	112±2[3]	140±4[3]	120.8±3.5[3]	112.5±3.2[3]	113±6[3]	н/д	300[4]	78±8[5]	44.08±0.07[5]	76[6]	110±5[6]
АОА	64.7[7]	51.0[7]	61.6[7]	47.4[7]	52.2[7]	49.7[7]	н/д	300[8]	н/д	н/д	240[9]	220[9]

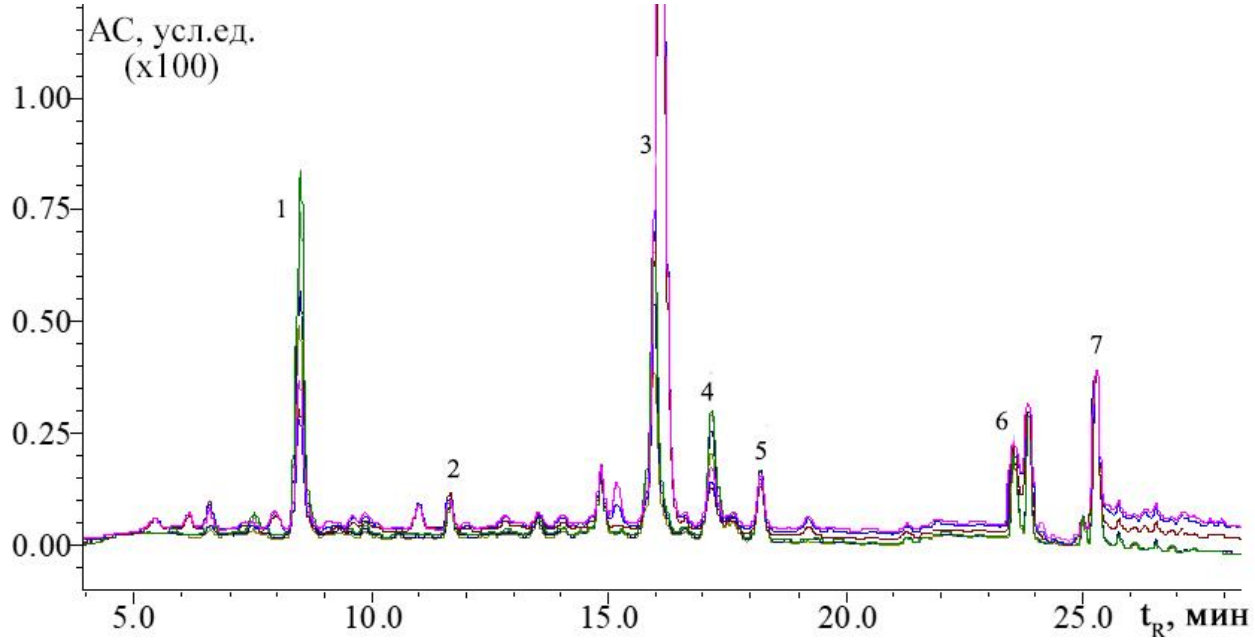
[1]Не обнаружено; [2]н/д – нет данных; [3]сумма содержаний; [4]рассчитано по методу Фолина – Чокалтеу, мг-экв галловой кислоты / г сырья; [5]рассчитано по методу Фолина – Чокалтеу, мг-экв галловой кислоты / г сырья; [6]рассчитано по методу Фолина – Чокалтеу, мкг-экв галловой кислоты : кверцетина (2 : 1) / г сырья; [7]рассчитано по реакции с перманганатом калия, мг/г в пересчете на кверцетин; [8]рассчитано методом FRAP, г-экв тролокса / г сырья; [9]рассчитано методом FRAP, мкмоль-экв тролокса / г сырья.

3.3 Извлечение ФС из полыни кавказской

Исследования по извлечению ФС проводили на образце полыни кавказской, собранной в Ботаническом саду КубГУ в 2024 г.

Для повышения селективности хроматографического анализа оптимизировали условия ВЭЖХ-разделения компонентов УЗ экстракта: программу градиентного элюирования, скорость потока подвижной фазы, температуру термостатирования колонки.

Предварительный ВЭЖХ-анализ экстракта проводили в обращенно-фазовом режиме на колонке с модифицированным группами С18 силикагелем с учетом данных [149,174–177]. Хроматограмма экстракта, полученного после ультразвуковой обработки образца полыни кавказской, представлена на рисунке 34.



1 – 3-О-кофеилхинная кислота, 2 – моногликозид феруловой кислоты, 3 – кверцитрин, 4 – розмариновая кислота, 5 – апигенин-7-О-глюкуронид, 6 – апигенин, 7 – эупатилин

Рисунок 34 – ВЭЖХ-ДМД-хроматограмма водно-спиртового экстракта полыни кавказской

Таким образом, в предложенных условиях в УЗ экстракте удалось обнаружить 7 фенольных соединений, 2 из которых идентифицированы с учетом литературных данных. В УФ-спектре соответствующего пику 7 соединения зарегистрировали три ярко выраженных максимума поглощения при 343, 273 и 244 нм, что, соответствует эупатилину [151,178,179], который также известен как маркер некоторых видов полыни [21,22]. Соединение 5 имеет максимумы поглощения при 267 и 345 нм и предположительно может быть отнесено к апигенин-7-О-глюкурониду [7]. Для подтверждения наличия остальных компонентов использовали метод добавок.

Далее варьировали по времени соотношения ацетонитрила и водного раствора муравьиной кислоты в подвижной фазе. Основной проблемой при оптимизации программы градиентного элюирования было перекрывание пиков соединений, обладающих умеренной полярностью: взаимные наложения пиков кверцитрина и апигенина с соседними пиками, а также их размывание (рисунок 35).

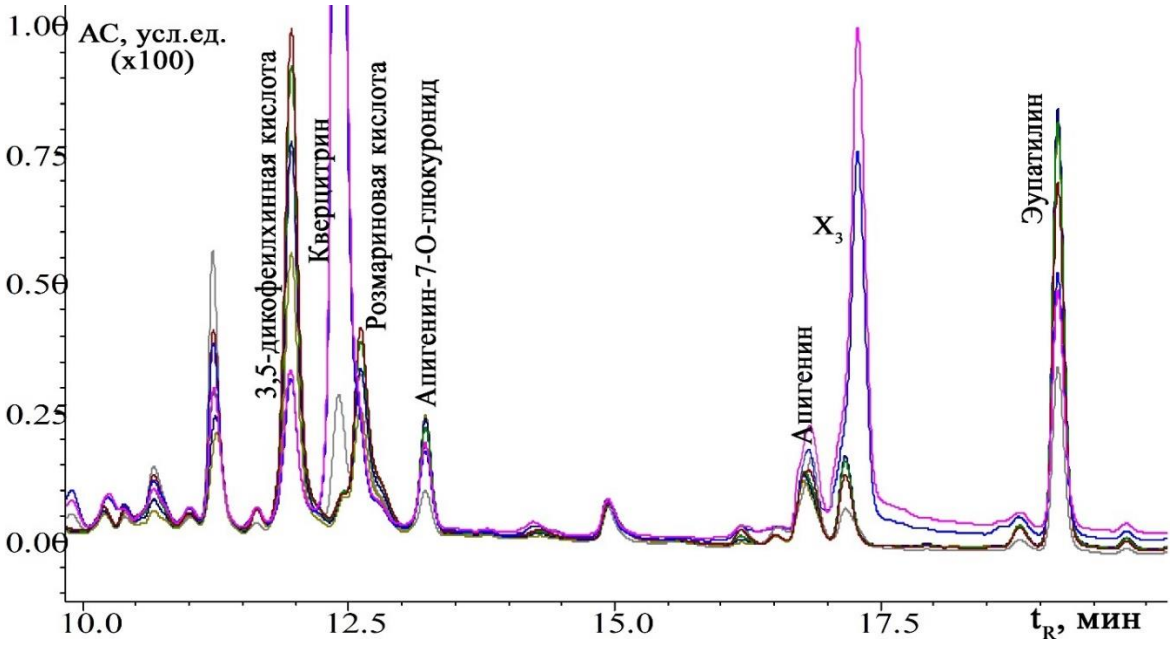


Рисунок 35 – ВЭЖХ-ДМД-хроматограмма водно-спиртового экстракта полыни кавказской в промежуточных условиях анализа

Снижение скорости потока и повышение температуры термостатирования колонки способствовали увеличению эффективности разделения и улучшению формы пиков.

После оптимизации условий анализа в экстракте идентифицировали 13 фенольных соединений: 3-О-кофеилхинную, 3,5-дикофеилхинную, феруловую (и ее моногликозид) и розмариновую кислоты, кверцитрин, апигенин (и его гликозид), а также апигенин и эупатилин (рисунок 36). Пик X_1 был отнесен к классу фенольных кислот с максимумом поглощения в УФ-спектре при 327 нм. Концентрацию этого вещества рассчитывали по градуировочной зависимости для кофейной кислоты как структурного аналога. Пики X_2 и X_3 с характерными максимумами поглощения при 350 и 260 нм отнесены к классам гликозидов флавоноидов и флавоноидов соответственно. Расчет их содержаний проводили по градуировочной зависимости лютеолина-7-О-глюкозида (для X_2) и апигенина (для X_3).

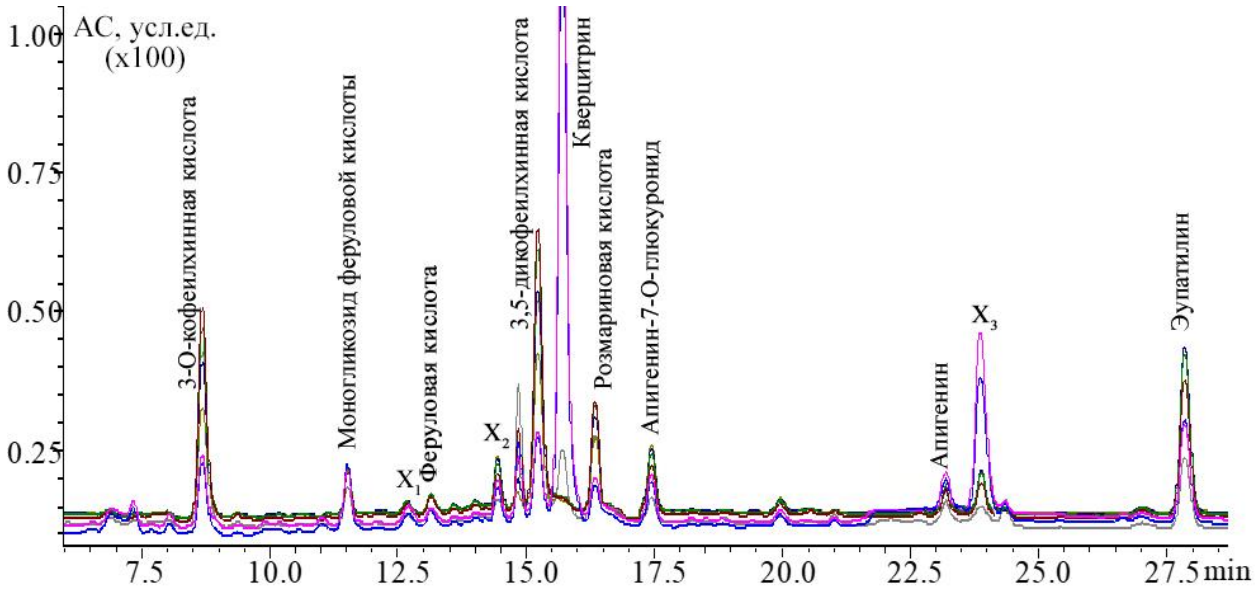
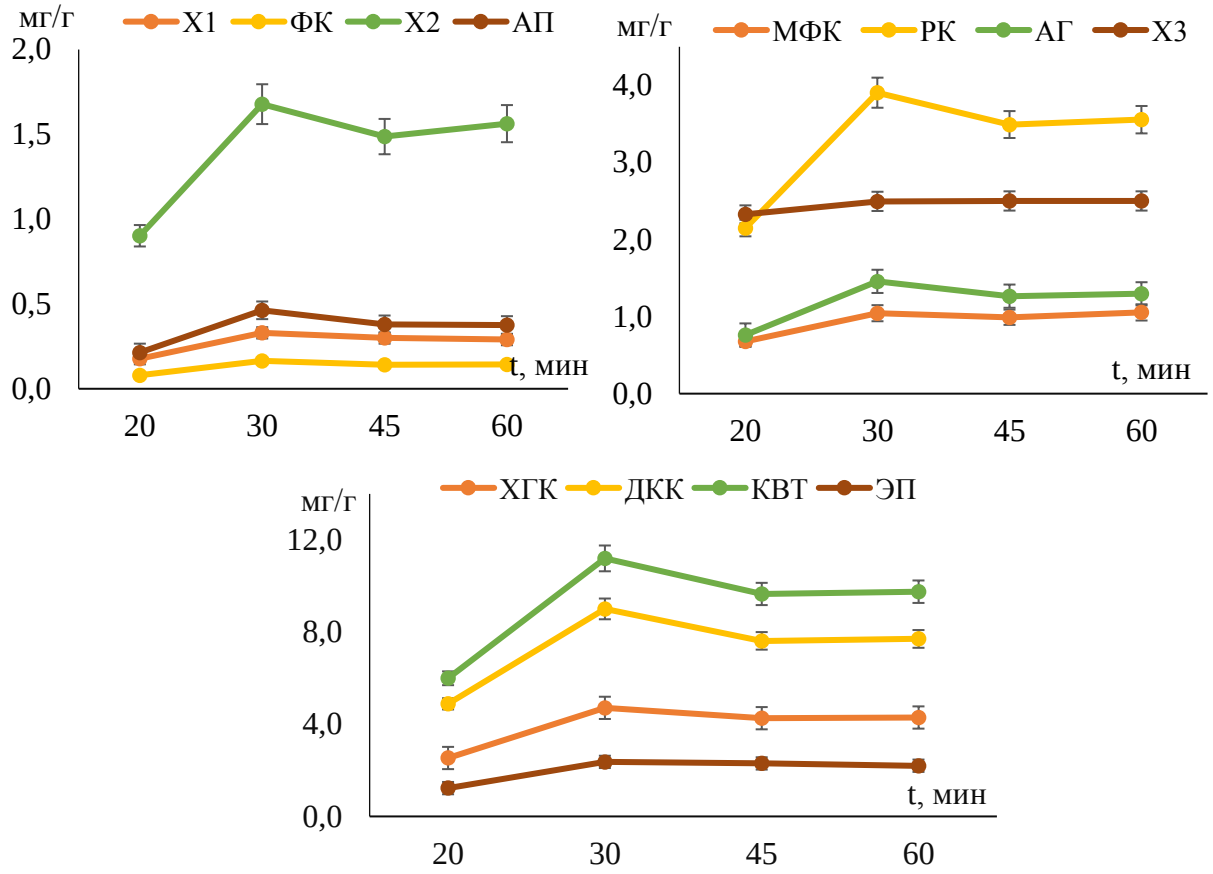


Рисунок 36 – ВЭЖХ-ДМД-хроматограмма водно-спиртового экстракта полыни кавказской в оптимизированных условиях анализа

Для извлечения флавоноидов из полыни горькой Государственная Фармакопея РФ рекомендует проводить кипячение с обратным холодильником

в течение 30 мин [180], который мы использовали для изучения зависимости степени экстракции фенольных БАВ из полыни кавказской от продолжительности нагревания (рисунок 37).



X1 – неидентифицированная фенольная кислота, ФК – феруловая кислота, X2 – флавоноид-гликозид, АП – апигенин, МФК – моногликозид феруловой кислоты, АГ – апигенин-7-О-глюкуронид, РК – розмариновая кислота, X3 – флавоноид, ЭП – эупатилин, ХГК – 3-О-кофеилхинная кислота, КВТ – кверцитрин, ДКК – 3,5-дикофеилхинная кислота

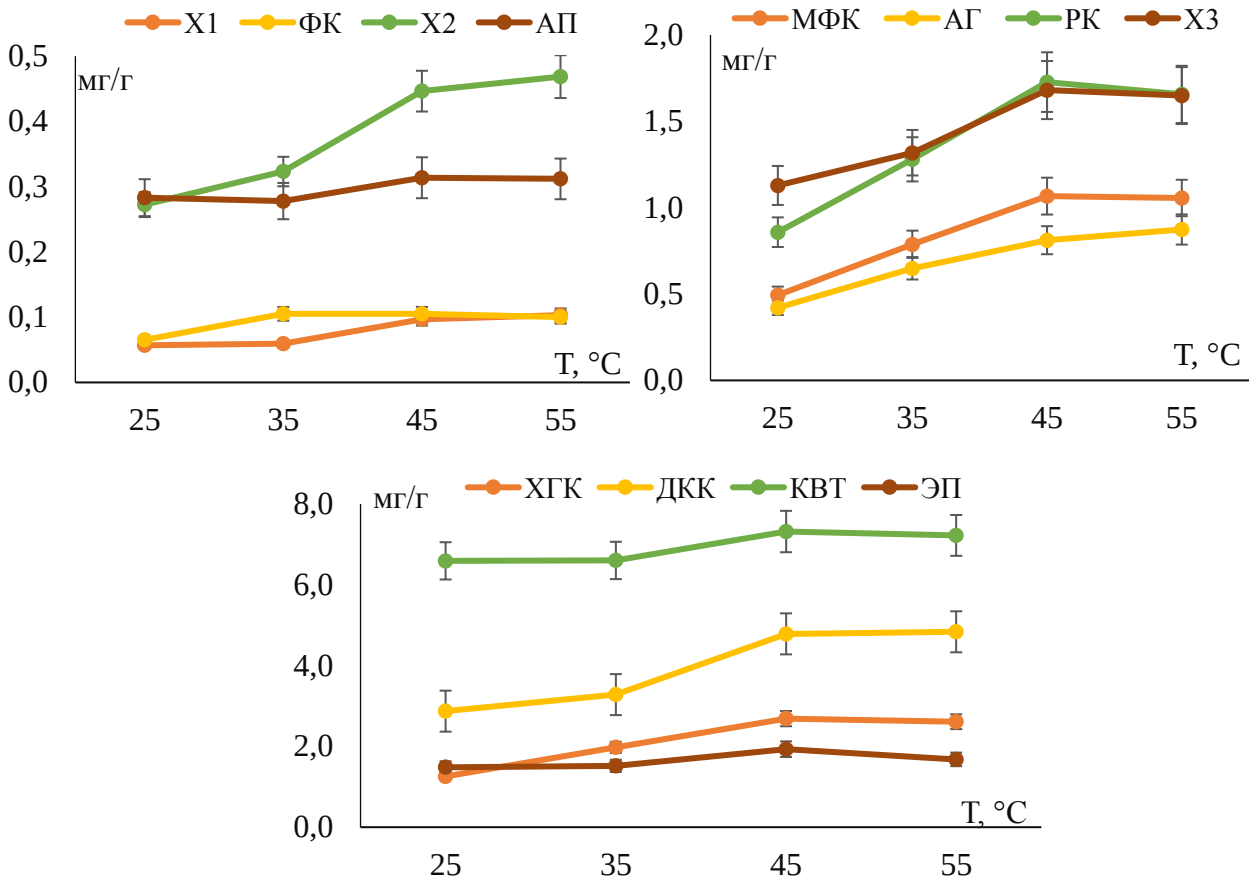
Рисунок 37 – Зависимость содержания ФС в экстрактах полыни кавказской от времени кипячения

Оптимальное время извлечения ФС составило 30 мин, с увеличением продолжительности нагревания выхода целевых компонентов уменьшается: на 45-ой минуте наблюдается снижение концентрации розмариновой, 3-О-кофеилхинной и 3,5-дикофеилхинной кислот и кверцитрина вследствие

деградации аналитов. Содержание компонентов X_1, X_3, МФК и эупатилина не меняется при длитеьном нагревании.

С целью увеличения выхода фенольных БАВ оптимизировали параметры УЗЭ. При этом оценивали влияние температуры, продолжительности УЗ-обработки, природы экстрагента и соотношения количества сырья и растворителя.

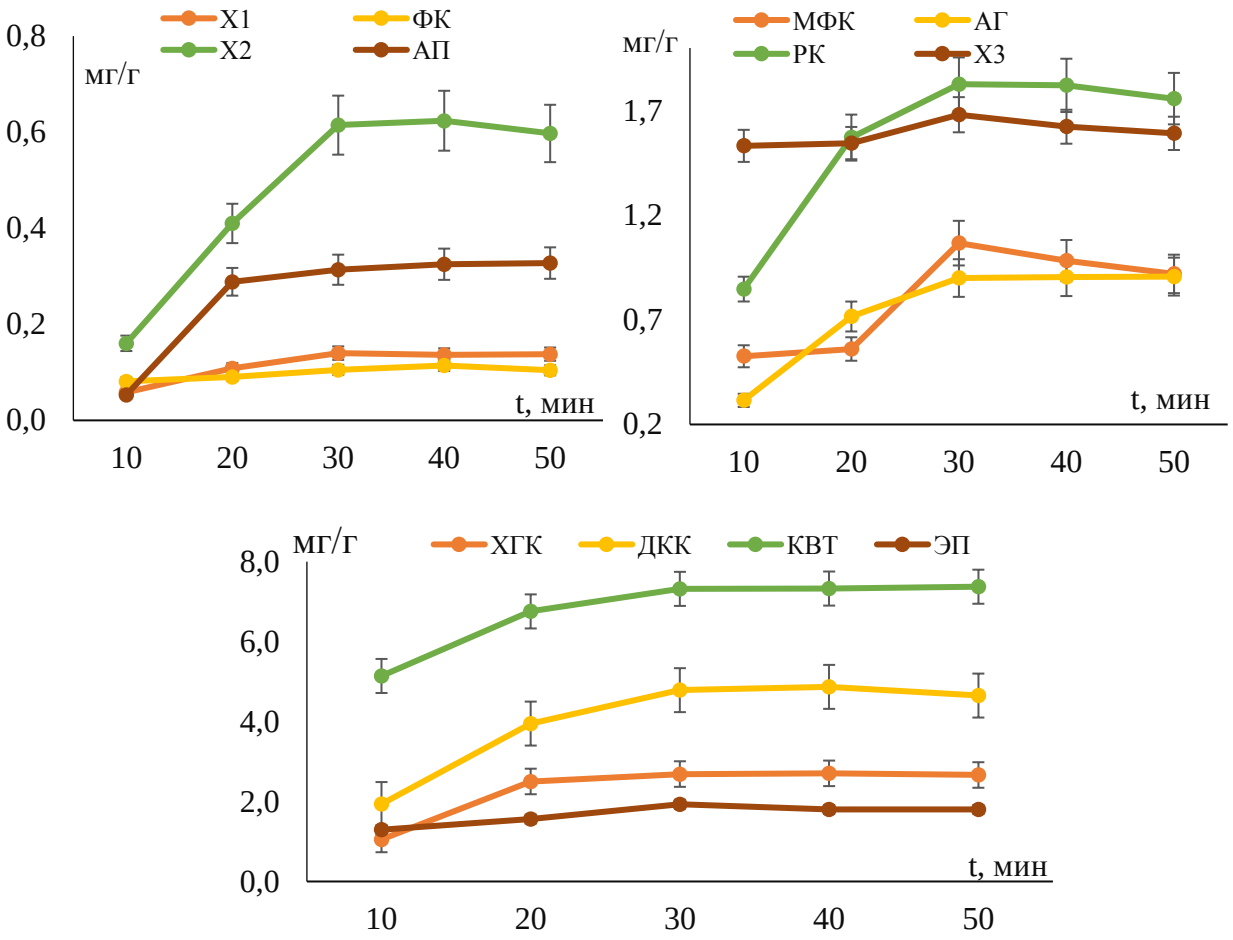
Как правило, температура оказывает наибольшее влияние на выход экстрактивных соединений при ультразвуковом воздействии. Нагревание способствует размягчению ЛРС, уменьшению вязкости растворителя и, как следствие, лучшей диффузии экстрагента в растительный материал [181,182]. Поэтому на первом этапе была изучена зависимость выхода фенольных компонентов от температуры в диапазоне 25-55°С с шагом 10°С, при этом время УЗ-обработки составляло 30 мин, а соотношение сырья и экстрагента – 1:50 (рисунок 38).



Х1 – неидентифицированная фенольная кислота, ФК – феруловая кислота, Х2 – флавоноид-гликозид, АП – апигенин, МФК – моногликозид феруловой кислоты, АГ – апигенин-7-О-глюкуронид, РК – розмариновая кислота, Х3 – флавоноид, ЭП – эупатилин, ХГК – 3-О-кофеилхинная кислота, КВТ – кверцитрин, ДКК – 3,5-дикофеилхинная кислота

Рисунок 38 – Зависимость содержания ФС в экстрактах полыни кавказской от температуры УЗ-извлечения

Согласно представленным данным, нагревание интенсифицировало УЗ извлечение фенольных БАВ, максимальный выход достигался при 45°С. Более высокие температуры в данном случае не рассматривались, поскольку при нагревании свыше 60°С, согласно [182], в условиях УЗЭ происходит деструкции экстрактивных соединений. Далее оптимизировали продолжительность процесса при температуре 45°С (рисунок 39).



Х1 – неидентифицированная фенольная кислота, ФК – феруловая кислота, Х2 – флавоноид-гликозид, АП – апигенин, МФК – моногликозид феруловой кислоты, АГ – апигенин-7-О-глюкуронид, РК – розмариновая кислота, Х3 – флавоноид, ЭП – эупатилин, ХГК – 3-О-кофеилхинная кислота, КВТ – кверцитрин, ДКК – 3,5-дикофеилхинная кислота

Рисунок 39 – Зависимость содержания ФС в экстрактах полыни кавказской от времени при УЗЭ

Полученные результаты свидетельствуют о повышении степени извлечения большинства ФС с увеличением продолжительности УЗЭ с 10 до 30 мин с выходом на плато при дальнейшей УЗ-обработке. Таким образом, оптимальное время ультразвукового извлечения фенольных компонентов для полыни кавказской при 45°С составляет 30 мин.

Для оценки полноты извлечения фенольных БАВ рассмотрели разные соотношения массы сырья и объема растворителя (1:50, 1:100 и 1:200), а также

вариант двукратной ультразвуковой экстракции при их постоянном соотношении (1:50*). Меньшее количество растворителя было недостаточным для смачивания навески сырья. Результаты, полученные в оптимальных условиях УЗЭ, представлены на рисунке 40.

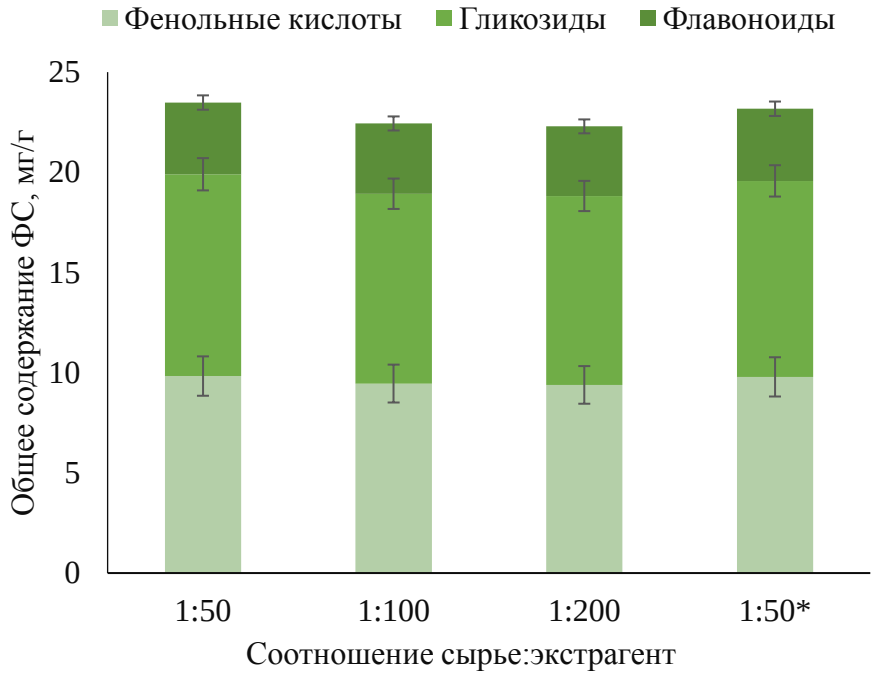


Рисунок 40 – Содержания ФС в экстрактах полыни кавказской при разных соотношениях сырье: экстрагент

Согласно полученным данным, увеличение объема экстрагента не влияло на выход фенольных БАВ, как и повторный цикл ультразвукового извлечения. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали минимальное соотношение – 1:50.

Природа экстрагента оказывает существенное влияние как на количественный, так и на качественный выход ФС, поэтому далее сравнивали составы водных и водно-спиртовых экстрактов (рисунок 41).

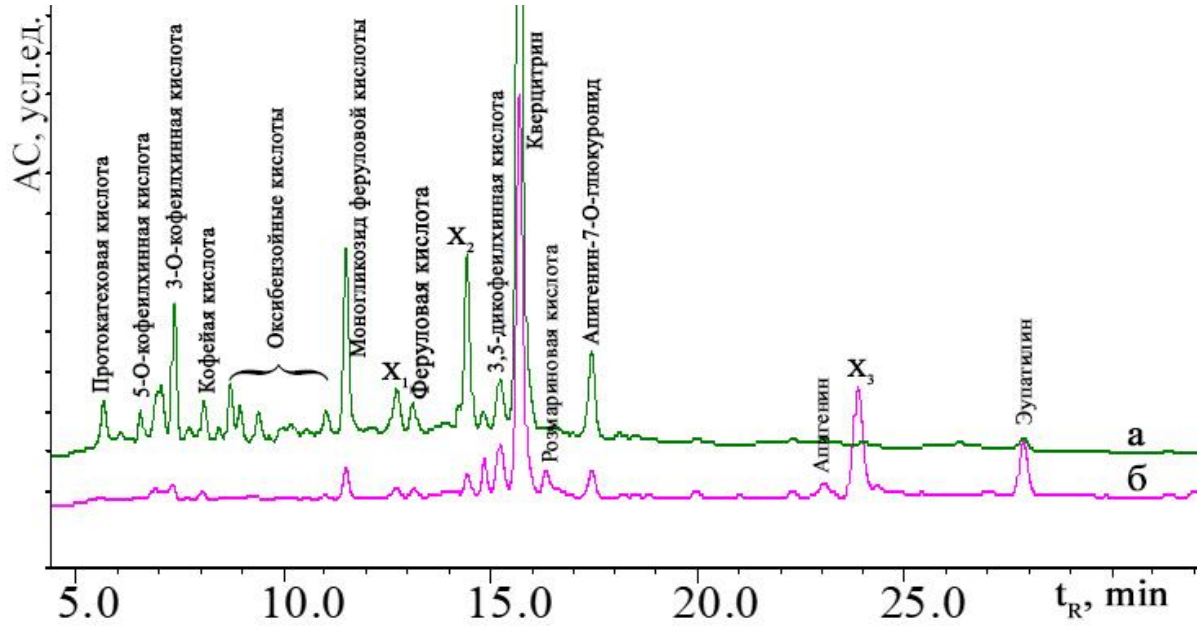


Рисунок 41 – ВЭЖХ-хроматограммы водного (а) и водно-спиртового (б) УЗ-экстрактов полыни кавказской, снятые при 260 нм

При использовании 70%-ного этанола извлекается широкий спектр фенольных БАВ, тогда как деионизованная вода показала себя более эффективным растворителем для фенольных кислот. В водных экстрактах удалось обнаружить такие компоненты, как протокатеховая, кофейная и 5-О-кофеилхинная кислоты, а также ряд оксибензойных кислот с максимумами поглощения при 260 нм, для идентификации которых требуются дальнейшие исследования. Этанольные экстракты характеризуются наличием флавонов – апигенина, X_3 и эупатилина. Общее количество фенольных кислот и флавоноидов в водных экстрактах составило 2.9 и 5.0 мг/г соответственно, а в водно-спиртовых – 9.5 и 13.7 мг/г. Полученные извлечения обладают разной терапевтической активностью и сроком годности. Водный экстракт будет мягче и быстрее воздействовать на организм и может употребляться на регулярной основе, но имеет небольшой срок годности вследствие нестабильности фенольных кислот. Водно-спиртовый экстракт, благодаря широкому спектру фенольных БАВ, будет не только дольше храниться, но и проявлять мощные

антиоксидантные, сосудоукрепляющие и противовоспалительные свойства, и что находит применение в современной медицине и фармакологии.

Для извлечения фенольных компонентов мацерацией изучена зависимость эффективности экстракции ФС полыни кавказской от продолжительности выдерживания ЛРС в 70%-ом этиловом спирте (рисунок 42).

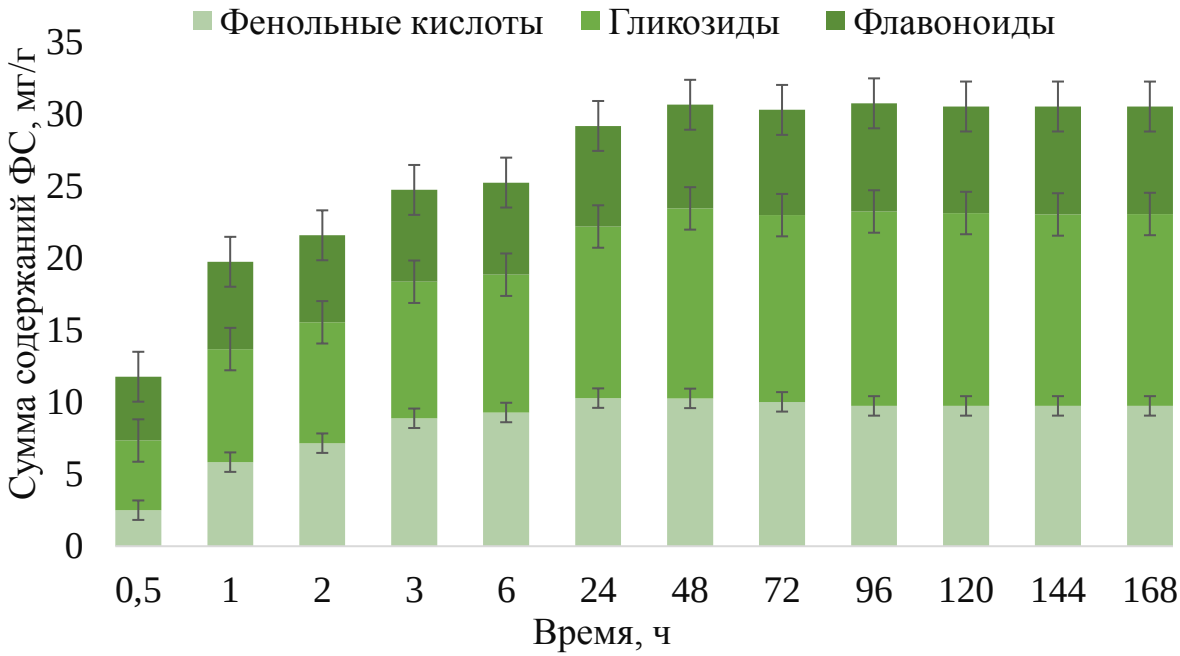


Рисунок 42 – Зависимость содержания ФС в экстрактах полыни кавказской от длительности мацерации

Согласно полученным результатам, для установления экстракционного равновесия в системе сырье–экстрагент при извлечении фенольных БАВ мацерацией достаточно 48 часов.

Основной проблемой при изучении растительных экстрактов является отсутствие универсальных методик, позволяющих извлекать фенольные БАВ из разных видов ЛРС с одинаковой эффективностью в идентичных условиях. Кроме того, применяемые для получения экстрактов методические подходы характеризуются разной селективностью.

В ходе данной работы были оптимизированы условия извлечения фенольных компонентов из полыни кавказской мацерацией, в субкритических

условиях, при ультразвуковом воздействии, а также апробирована методика кипячения с обратным холодильником, рекомендуемая ГФ РФ для полыни горькой. В таблице 28 представлены данные по качественному и количественному составу фенольного профиля экстрактов полыни кавказской, полученных разными способами.

Таблица 28 – Содержания фенольных соединений в водно-спиртовых экстрактах полыни кавказской, полученных разными способами (n=3, P=0.95)

Соединение	Содержание ФС, мг/г		
	УЗЭ	мацерация	Кипячение на водяной бане
Фенольные кислоты			
3-О-кофеилхинная кислота	2,8±0,1	2,3±0,2	4,9±0,4
X_1	0,13±0,01	0,12±0,01	0,33±0,03
Феруловая кислота	0,14±0,09	0,12±0,01	0,16±0,01
3,5-дикофеилхинная кислота	4,8±0,3	4,3±0,3	8,2±0,4
Розмариновая кислота	1,9±0,1	1,9±0,1	3,9±0,2
Гликозиды			
Моногликозид феруловой кислоты	0,99±0,07	1,20±0,08	1,10±0,05
X_2	0,61±0,04	1,30±0,13	1,8±0,2
Кверцитрин	7,3±0,4	11±1	10,3±0,8
Апигенин-7-О-глюкуронид	0,88±0,07	1,3±0,1	1,4±0,1
Флавоноиды			
Апигенин	0,30±0,03	0,53±0,05	0,40±0,04
X_3	1,6±0,2	2,6±0,2	2,2±0,2
Эупатилин	1,90±0,08	2,6±0,1	2,2±0,1
Сумма содержаний ФС	23±2	29±2	37±3

Исходя из суммарных оценок содержаний ФС, наиболее эффективным методом экстракции фенольных компонентов из полыни кавказской является кипячение с обратным холодильником по ГФ РФ. Однако для извлечения таких полифенолов, как моногликозид феруловой кислоты, кверцитрин, апигенин, X_3

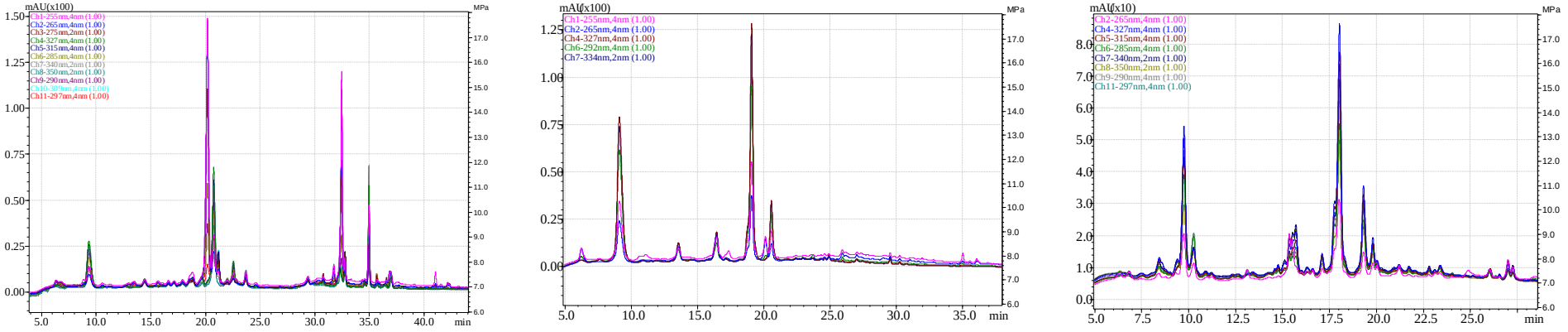
и эупатилин предпочтительна мацерация. Общее содержание гликозидов при ГФ и мацерации оказалось сопоставимым.

При ультразвуковой экстракции, несмотря на меньший суммарный показатель для всех компонентов, за 30 мин из полыни кавказской удается выделить большее количество фенольных кислот, чем при 48-часовой мацерации. Таким образом, для комплексного извлечения флавоноидов и их гликозидов подходит преимущественно мацерация, тогда как для фенольных кислот – экстракция кипячением [161–163].

3.4 Фенольные профили некоторых видов полыни по результатам ВЭЖХ-ДМД-анализа

На первом этапе работы оптимизировали условия ВЭЖХ-ДМД-анализа для определения компонентного состава экстрактов из разных морфологических частей исследуемых видов полыни. Идентификацию аналитов проводили по хроматограммам водно-спиртовых экстрактов путем сопоставления спектральных максимумов поглощения компонентов с литературными данными [18,26,113,183–187] и спектрами поглощения стандартных образцов фенольных соединений с учетом хроматографических параметров удерживания. Компоненты элюировались из колонки в соответствии с их полярностью: сначала наиболее полярные соединения – фенольные кислоты (гидроксибензойные и гидроксикоричные) и некоторые полярные флавоноиды, затем более гидрофобные флавоноидные гликозиды, а последними – агликоны флавоноидов и метоксилированные производные фенольных кислот и флавоноидов, обладающие повышенной липофильностью (рисунок 43).

а) б) в)



г) д) е)

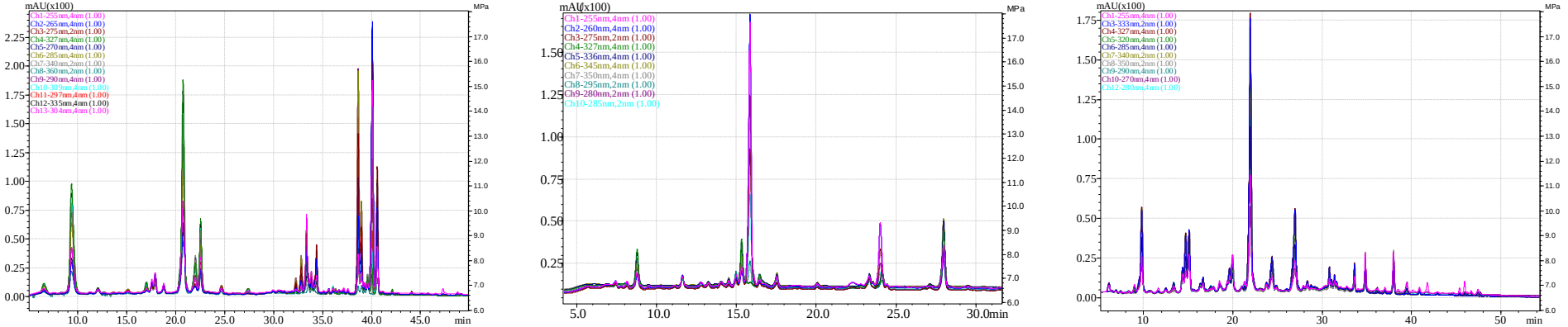


Рисунок 43 – ВЭЖХ-ДМД-хроматограммы водно-спиртовых экстрактов полыни обыкновенной (а), Людовика (б), лечебной (в), эстрагона (г), кавказской (д), однолетней (е)

Высокая полярность соединений обусловлена наличием карбоксильной группы и нескольких гидроксильных групп в структуре молекул фенольных кислот [48,49]. Гидрофобность гликозидов флавоноидов увеличивается с ростом их молекулярной массы и уменьшением числа сахарных остатков в молекуле. Сильнее всего удерживаются на колонке агликоны флавоноидов из-за наличия в них сопряженной ароматической системы и отсутствия полярных заместителей [48-50]. Содержания фенольных кислот оценивали в пересчете на хлорогеновую кислоту, флавоноидов – на рутин. Рассчитанные суммы содержаний фенольных кислот и флавоноидов в экстрактах разных частей полыни по результатам ВЭЖХ-ДМД-анализа представлены в таблице 29.

Для селективного извлечения определенного класса аналитов можно использовать разные части растений: для флавоноидов – цветы эстрагона и полыни кавказской, для фенольных кислот – листья (Людовика и лечебной) или цветы (обыкновенной). Во всех случаях стебли характеризовались меньшими содержаниями фенольных соединений по сравнению с листьями и цветами. В экстрактах из разных морфологических частей полыни однолетней содержание флавоноидов и фенольных кислот было схожим. Наибольшее содержание фенольных БАВ (фенольные кислоты и флавоноиды) обнаружено в экстрактах эстрагона.

Дальнейшие исследования выявили колебания компонентного состава экстрактов полыни в зависимости от года сбора ЛРС. В цветах эстрагона сбора 2024 и 2025 гг. концентрации флавоноидов оказались в 4 раза выше, чем фенольных кислот, 2023 г. – в 11 раз. Содержания аналитов в листьях и стеблях отличались незначительно, в экстрактах из образцов, собранных в 2024 г. преобладали флавоноиды. Стоит отметить, что все экстракты полыни эстрагон отличаются высокими содержаниями неполярных флавоноидов; полыни кавказской – гликозидов, класс фенольных кислот представлен только небольшим количеством гидроксикоричных. Экстракты полыни лечебной,

наоборот, содержат больше фенольных кислот и полярных флавоноидов. В листьях полыни обыкновенной сбора 2024 и 2025 гг. наблюдали резкое повышение содержания фенольных кислот по сравнению с 2023 г., что может быть ответом метаболизма растения на повышение влажности почвы из-за дополнительного полива. Аналогичная тенденция выявлена для экстрактов цветов полыни Людовика: 11,0 мг/г фенольных кислот в 2023 г., 11,7 мг/г – в 2024 г., 19,0 мг/г – в 2025 г.

Таблица 29 – Сумма содержаний фенольных кислот и флавоноидов в экстрактах разных частей полыни, мг/г*

Вид полыни	Год сбора	Часть растения	Фенольные кислоты			Флавоноиды		
			Гидроксибензойные кислоты	Гидроксикоричные кислоты	Производные фенольных кислот	Полярные флавоноиды	Гликозиды	Неполярные флавоноиды
обыкновенная	2023	листья	0.22	7.51	0.03	0.68	5.20	1.81
		стебли	0.20	9.37	н/о	0.97	4.40	0.44
		цветы	0.13	16.77	0.01	0.37	4.60	8.32
	2024	листья	н/о	37.22	н/о	н/о	5.96	0.73
		стебли	н/о	7.55	н/о	0.21	3.01	0.41
		цветы	0.25	24.20	н/о	н/о	3.49	6.26
	2025	листья	0.10	13.19	0.18	1.65	11.11	7.29
		стебли	0.83	4.39	н/о	1.61	3.67	1.02
		цветы	0.36	19.95	н/о	0.47	14.58	8.15
Людовика	2023	листья	4.40	27.98	2.54	0.55	3.46	2.26
		стебли	0.40	2.51	0.13	0.14	0.14	0.45
		цветы	1.36	8.57	1.02	0.04	0.87	2.31
	2024	листья	1.45	42.31	0.21	2.32	0.70	0.74
		стебли	0.11	1.46	н/о	0.16	0.05	0.07
		цветы	0.37	11.05	0.32	0.80	1.84	2.27
	2025	листья	1.32	29.99	0.22	3.68	0.71	0.54
		стебли	0.13	3.86	0.04	0.42	0.03	0.17
		цветы	0.60	18.07	0.28	1.21	2.47	1.43
лечебная	2023	листья	0.28	26.71	0.18	3.01	0.68	0.14
		стебли	0.47	18.90	0.10	5.36	1.29	0.42
		цветы	0.58	23.75	0.99	9.92	0.56	0.25
	2024	листья	0.11	10.82	0.27	3.64	0.56	1.02
		стебли	0.11	11.67	0.15	5.21	0.60	0.28
		цветы	0,19	15,30	0,74	4,74	0,82	3,19

Продолжение таблицы 29

Вид полыни	Год сбора	Часть растения	Фенольные кислоты			Флавоноиды		
			Гидроксибензойные кислоты	Гидроксикоричные кислоты	Производные фенольных кислот	Полярные флавоноиды	Гликозиды	Неполярные флавоноиды
эстрагон	2023	листья	0.21	85.05	0.01	0.03	20.47	58.16
		стебли	0.34	24.58	0.02	0.45	7.96	15.54
		цветы	0.83	14.22	1.62	8.75	73.93	93.94
	2024	листья	0.39	49.19	0.05	0.25	22.33	63.27
		стебли	0.41	29.08	0.07	0.44	12.54	28.34
		цветы	0.59	28.31	4.16	7.70	47.99	85.37
	2025	листья	0.15	71.38	0.25	2.11	19.55	66.74
		стебли	0.23	15.39	0.15	0.35	5.78	15.14
		цветы	0.83	40.92	1.43	9.47	55.97	105.97
кавказская	2023	листья	н/о	3.94	н/о	0.67	9.29	4.70
		стебли	н/о	6.39	н/о	0.90	21.83	5.03
		цветы	н/о	4.46	н/о	0.91	12.52	8.70
	2024	листья	н/о	1.65	н/о	0.52	9.94	5.70
		стебли	н/о	3.28	н/о	1.29	9.48	5.09
		цветы	н/о	3.22	н/о	1.05	17.25	13.46
	2025	листья	н/о	7.44	н/о	1.31	5.22	0.96
		стебли	н/о	1.83	н/о	0.54	9.39	6.83
		цветы	н/о	1.54	н/о	0.56	7.40	4.18
однолетняя	2025	листья	н/о	10.25	3.39	1.52	16.67	4.88
		стебли	н/о	3.11	1.10	2.26	8.62	1.15
		цветы	н/о	10.29	3.47	1.42	14.75	4.85

**содержание фенольных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, флавоноидов – на рутин*

На следующем этапе работы сравнивали содержания компонентов в экстрактах из растений полыни, собранных в 2023 – 2025 гг., без предварительного разделения на морфологические части. Основными компонентами эстрагона были хлорогеновая и дикофеилхинные кислоты, выполняющие роль фотопротекторов (рисунок 44). Содержание хлорогеновой кислоты снижалось с 29.9 мг/г в 2023 г. до 25.3 мг/г (2024 г.) и 12.4 мг/г (2025 г); концентрация дикофеилхинной кислоты в 2023 г. составляла 37.3 мг/г, в 2024 и 2025 гг. снижалась до 16.8 мг/г и 17.1 мг/г соответственно. В экстрактах полыни обыкновенной преобладают также хлорогеновая и дикофеилхинные кислоты, но их содержание ниже. Отдельно отметим, что концентрация одного из изомеров дикофеилхинной кислоты в экстракте полыни обыкновенной из образца 2024 г. (1.8 мг/г) превышала его содержание в образце 2023 г. (0.9 мг/г) и 2025 г. (0.1 мг/г). Экстракты полыни Людовика характеризовались высоким содержанием розмариновой, дикофеилхинной кислоты и ее изомера. Преобладание фенольных кислот в экстрактах может свидетельствовать о повышенной устойчивости данного вида к внешним воздействиям [7]. Нетипичный профиль фенольных соединений наблюдали в экстрактах полыни кавказской, в которых определены высокие содержания кверцитрина (6.0–7.7 мг/г) и биапигенина (3.2 и 3.8 мг/г в 2024 и 2025 гг.), к особенностям данного вида можно отнести преобладание флавоноидов [8]. Низкие содержания фенольных соединений в экстрактах полыни однолетней могут быть связаны со специфичным метаболизмом однолетнего растения и требуют дополнительных исследований [2].

Соединение	год сбора														
	2023	2024	2025	2023	2024	2025	2023	2024	2023	2024	2025	2023	2024	2025	2025
неохлорогеновая кислота	3,4	2,3	1,7	0,1	0,4	0,1	0,6	0,1	0,4	0,1	0,4	н/о	н/о	н/о	0,1
хлорогеновая кислота	29,9	25,3	12,4	2,1	2,7	1,7	5,9	0,1	5,1	3,0	10,1	н/о	0,9	0,7	2,0
рутин	3,8	2,6	1,3	0,2	0,7	0,1	0,1	0,8	н/о	н/о	н/о	0,1	0,1	0,1	0,4
гиперозид	3,9	3,2	1,7	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
дикофеилхинная кислота	37,3	16,8	17,1	4,0	12,7	2,9	9,2	5,0	8,4	6,1	10,7	1,3	1,3	1,3	4,7
розмариновая кислота	9,8	9,7	5,2	0,2	2,8	0,6	3,9	1,9	3,2	1,9	2,7	0,1	0,1	0,5	0,3
лютеолин-7-О-глюкозид	2,1	1,7	0,9	0,2	0,6	0,2	н/о	0,1	0,3	0,7	0,4	н/о	н/о	н/о	н/о
изомер дикофеилхинной кислоты	0,2	0,2	0,2	0,9	1,8	0,1	2,0	1,3	1,6	1,1	0,1	н/о	н/о	н/о	0,2
изомер розмариновой кислоты	н/о	н/о	н/о	н/о	0,4	0,2	0,1	0,1	1,0	0,1	0,2	н/о	н/о	н/о	2,1
кверцитрин	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	6,0	7,7	6,0	н/о
I3,II8-биапигенин	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0,5	н/о	н/о	н/о	0,3	3,2	3,8	н/о
бифлавоноид	н/о	н/о	н/о	0,09	0,22	0,09	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
бифлавоноид	н/о	н/о	н/о	0,08	0,13	0,07	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Вид полыни	A. Dracunculus L. (полынь эстрагон)			A. Vulgaris L. (полынь обыкновенная)			A. Absinthium L. (полынь лечебная)		A. Ludoviciana N. (полынь Людовика)			A. Alpina G. (полынь кавказская)			A. Annua L. (полынь однолетняя)

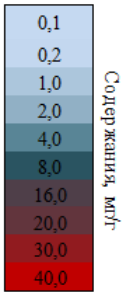


Рисунок 44 – Содержания основных компонентов экстрактов разных видов полыни

Несмотря на большую вариабельность содержаний аналитов в экстрактах каждого вида по годам, соотношения некоторых компонентов были постоянными. В случае, когда все образцы собраны на одной территории в фазе цветения, данную стабильность можно объяснить видовой или территориальной специфичностью. Например, для эстрагона наиболее устойчиво соотношение рутин/гиперозид – 0,8–1,0. В экстрактах полыни обыкновенной содержание дикофеилхинной кислоты преобладало над хлорогеновой во всех образцах и характеризовалось постоянным отношением двух бифлавоноидов – 1,1–1,7. Полынь лечебная и Людовика отличались соотношением концентраций розмариновой и дикофеилхинной кислот – 0,3–0,4, но в экстрактах Людовика преобладают другие фенольные кислоты и отсутствует рутин. Для полыни кавказской характерно отношение содержаний дикофеилхинной кислоты и кверцитрина, равное 0,2. Таким образом, фенольные профили экстрактов полыни и выявленные соотношения компонентов потенциально могут быть использованы для видовой идентификации растений полыни [164].

3.5 Оценка суммарного содержания фенольных соединений и антиоксидантной актвности водных экстрактов из разных видов полыни

Экстракты из растений разных видов полыни, собранных в 2023–2025 гг., полученные настаиванием, анализировали методами перманганатометрического титрования, ВЭЖХ–ДМД, Фолина-Чокалтеу, FRAP для оценки суммарного содержания фенольных соединений и антиоксидантной актвности. Полагали, что разные подходы по оценке биологической активности этих ЛРС расширят информацию об исследуемых экстрактах, что важно для оценки возможности их дальнейшего применения в медицинской практике [18,76,188–190].

Содержания фенольных соединений водных экстрактов различных образцов полыни, полученные по методу Фолина-Чокалтеу, АОА по методам

FRAP и перманганатометрического титрования, сведены в таблицу 30. Анализ данных таблицы 30 указывает на схожие тенденции к изменению суммарных содержаний ФС, определенных этими методами. Для экстрактов из собранных в 2023 и 2024 гг. образцов полыни обыкновенной и полыни эстрагона эти показатели были близки, а в обраце сбора 2025 г. они оказались ниже. В настоях полыни Людовика сбора 2023–2025 гг. эти показатели возрастали, а из полыни кавказской практически не менялись. Разнонаправленность динамики показателей суммарного содержания фенольных соединений и антиоксидантной актвности в зависимости от года сбора указывает на возможные различия компонентного состава экстрактов полыни и разном влиянии изменений условий произрастания на отдельные классы аналитов. Некоторые отличия значений АОА, найденных по методу FRAP, от общей тенденции, например, у экстрактов полыни Людовика или полыни однолетней, собранных в 2025 г., могут быть следствием влияния компонентов матрицы, что требует дополнительного изучения.

Таблица 30 – Содержание фенольных соединений и антиоксидантная активность водных экстрактов различных образцов полыни, мг/г

Год сбора	обыкновенная			Людовика			лечебная			эстрагон			кавказская			однолетняя		
	Ф–Ч	FRAP	АОА	Ф–Ч	FRAP	АОА	Ф–Ч	FRAP	АОА	Ф–Ч	FRAP	АОА	Ф–Ч	FRAP	АОА	Ф–Ч	FRAP	АОА
2023	32.3	37.5	30.8	13.6	17.3	12.1	49.9	64.8	26.2	91.1	95.6	46.2	9.5	12.6	13.7	н/д	н/д	н/д
2024	39.8	34.9	21.9	36.7	29.8	25.3	45.7	44.2	27.2	78.0	84.0	46.3	16.4	14.4	14.5	н/д	н/д	н/д
2025	9.5	25.0	14.8	28.4	57.5	28.9	н/д	н/д	н/д	48.6	84.9	33.8	6.8	15.3	12.2	18.4	55.4	19.3

Ф–Ч – рассчитано по методу Фолина-Чокалтеу, мг-экв галловой кислоты / г сырья; FRAP *– рассчитано методом FRAP, мг-экв галловой кислоты / г сырья; АОА – рассчитано по реакции с перманганатом калия, мг/г в пересчете на кверцетин; н/д – нет данных*

Наибольшие концентрации флавоноидов и фенольных кислот определены в экстрактах полыни эстрагон (таблица 31), что также согласуется с данными авторов [18]. Суммарные содержания ФС в экстрактах полыни обыкновенной, лечебной и Людовика близки. Для экстрактов полыни Людовика и эстрагона характерно высокое содержание гидроксибензойных кислот, а в полыни кавказской и однолетней данные соединения не были обнаружены. В экстрактах полыни обыкновенной наблюдали бóльшие содержания производных фенольных кислот. Высокие концентрации гликозидов и неполярных флавоноидов определены в экстрактах полыни кавказской, эстрагона и обыкновенной, полярных – лечебной и однолетней. Сравнивая содержания ФС в экстрактах полыни обыкновенной, Людовика и эстрагона, собранных в разные фазы цветения, можно отметить тенденцию к повышению концентрации гидроксикоричных кислот в процессе роста растений. Содержания всех групп флавоноидов в настоях полыней снижается, кроме гликозидов в полыни обыкновенной, концентрация которых достигает максимума в активной фазе цветения (8,19 мг/г).

Таблица 31 – Содержания фенольных соединений в экстрактах разных видов полыни сбора 2023–2025гг., мг/г

вид	Год сбора	Фаза цветения	Ф–Ч	Фенольные кислоты			Флавоноиды		
				Гидроксибензойные кислоты	Гидроксикоричные кислоты	Производные фенольных кислот	Полярные флавоноиды	Гликозиды	Неполярные флавоноиды
обыкновенная	2023	Активное	32.3	0.30	4.80	0.19	1.56	5.73	0.54
	2024	Активное	39.8	н/о	5.20	4.97	0.38	3.73	0.82
	2025	Начало	20.9	0.03	1.38	0.21	0.30	2.70	1.94
		Активное	9.5	0.61	5.58	0.74	1.10	8.19	1.59
		После	21.4	н/о	7.86	2.98	0.39	1.76	0.53
Людовика	2023	Активное	13.6	1.36	3.94	0.05	0.15	0.26	0.35
	2024	Активное	36.7	0.58	6.19	0.01	0.45	0.93	0.76
	2025	Начало	32.2	1.07	12.35	0.04	0.99	2.15	0.10
		Активное	28.4	0.86	15.78	0.01	0.75	1.30	0.08
лечебная	2023	Активное	49.9	0.64	19.16	0.03	2.97	0.19	0.02
	2024	Активное	45.7	0.11	4.10	0.07	3.28	0.37	0.12
	2025	Начало	24.8	0.08	3.46	0.16	2.12	0.22	0.11
эстрагон	2023	Активное	91.1	1.61	68.08	0.07	1.19	11.46	6.29
	2024	Активное	78.0	0.58	47.36	0.09	1.28	9.75	5.13
	2025	Начало	49.5	0.58	27.72	0.38	5.46	22.84	6.84
		Активное	48.6	0.78	43.67	0.10	1.55	10.79	6.91
кавказская	2023	Активное	9.5	н/о	1.46	н/о	1.52	6.35	2.68
	2024	Активное	16.4	н/о	1.19	н/о	1.66	6.06	1.63
	2025	Активное	6.8	н/о	1.66	н/о	1.89	6.51	1.59
однолетняя	2025	Активное	18.4	н/о	9.18	2.93	2.02	10.76	0.76

Ф–Ч – рассчитано по методу Фолина-Чокалтеу, мг-экв ГК / г сырья; фенольные кислоты – содержание в пересчете на ХГК по результатам ВЭЖХ-ДМД; флавоноиды – содержание в пересчете на рутин по результатам ВЭЖХ-ДМД; н/о – не обнаружено

Высокие значения показателей АОА, определенных по методу FRAP, суммарного содержания ФС по методам Фолина-Чокалтеу и ВЭЖХ-ДМД экстрактов полыни Людовика указывают на ее пригодность для фармакологического применения наряду с полынью обыкновенной и лечебной. Самые низкие значения полученных параметров характерны для полыни кавказской, но высокие содержания в ее водных экстрактах флавоноидов разных классов позволяют рассматривать возможность их препаративного выделения.

Полученные результаты подтверждают влияние видовых особенностей, фазы цветения и условий произрастания лекарственных растений на содержание БАВ в ЛРС и препаратах на их основе, и выбор оптимальных параметров их анализа должен определяться целями дальнейшего использования.

ВЫВОДЫ

1. Установлены условия ГХ-МС и ВЭЖХ–ДМД–МС-определения аналитов в экстрактах ромашки аптечной (Matricaria chamomilla L.), стевии медовой (Stevia rebaudiana Bertoni), полыни обыкновенной (Artemisia vulgaris L.), лечебной (Artemisia absinthium L.), однолетней (Artemisia annua L.) и кавказской (Artemisia alpina G.), полыни эстрагона (Artemisia dracunculus L.) и Людовика (Artemisia Ludoviciana N.). Идентификацию компонентов в водных и водно-спиртовых растительных экстрактах проводили с использованием спектров поглощения и масс-спектров соединений с учетом литературных данных и применением стандартных образцов индивидуальных соединений. Летучие соединения в экстрактах идентифицировали сопоставлением полученных масс-спектров компонентов с данными библиотек NIST07 и WILEY8.

2. Изучены содержания некоторых ФС в водных и водно-спиртовых экстрактах цветов ромашки аптечной, стевии медовой, различных видов полыни, полученных мацерацией, настаиванием, ультразвуковым, микроволновым, фармакопейным и субкритическим способами. Показано, что способы извлечения и составы экстрагентов существенно влияют на количественные и качественные характеристики извлекаемых компонентов. Определены суммарные содержания и концентрации индивидуальных фенольных соединений в экстрактах из образцов ЛРС различных производителей. В экстрактах ромашки аптечной идентифицировали хлорогеновую кислоту, гликозиды феруловой кислоты, лютеолин-7-О-глюкозид, дикофеилхинную и цикориевую кислоты, апигенин-7-глюкозид, апигенин, а стевии медовой – неохлорогеновую и хлорогеновую кислоты, рутин, содержащие остатки разных сахаров гликозиды кверцетина I и II, два изомера дикофеилхинной кислоты и апигенин-7-глюкозид.

3. Изучены особенности извлечения и ГХ-МС-определения эфирно-масличных компонентов из ромашки аптечной. Установлены содержания ЛОС в

эфирном масле и ароматной воде, полученных гидродистилляцией по Гинзбергу, в субкритических условиях и при УЗ-обработке ацетоновых экстрактов из цветов ромашки аптечной. В качестве макрокомпонентов эфирного масла идентифицированы β-фарнезен, α-оксид бисаболола В и оксид бисаболола А, гексанового экстракта из ароматной воды - α-оксид бисаболола В, α-диэпоксид лимонена и оксид бисаболола А. Основным компонентом ацетоновых экстрактов из цветов ромашки аптечной, полученных в субкритических условиях и при УЗ-обработке, является ен-ин-дициклоэфир. Показано, что в ароматной воде ромашки аптечной в сравнении с эфирным маслом выше содержание и шире перечень легколетучих ЛОС.

4. Изучено влияние географических (высота произрастания растения над уровнем моря, температура и влажность) и морфологических факторов на содержание ФС в водных и водно-спиртовых экстрактах лекарственных растений, особенности фенольных профилей экстрактов растений разных видов. Различия в составе экстрактов из растений могут быть также связаны с условиями сушки и хранения образца. Содержания извлекаемых индивидуальных ФС в водно-этанольные экстракты различными способами и с разных географических территорий сильно отличаются. Например, содержания хлорогеновой кислоты в стевии медовой из Крыма («Родные травы», 180 м н.у.м.) и с Алтая («Ларец Алтая», 130-250 м н.у.м) составили 35.7±2.9 и 25.6±1.6 мг/г. соответственно. Данные, по-видимому, объясняются климатическими условиями зон произрастания стевии медовой: для Алтая характерна длинная холодная зима с температурой до -15°С и влажность 75–80%, короткое умеренно теплое (до +25°С) лето с влажностью 50–70%, а в Крыму преобладает мягкий климат с жарким сухим летом (до +32°С при влажности 55–60%) и малоснежная зима с температурой +(3–9°С) и влажностью 80%.

5. Проведена оценка влияния суммарного содержания аналитов в экстрактах разных видов ЛРС на их биологическую активность. Выявлена схожая тенденция формирования значения суммарных показателей АОА и суммы фенольных соединений в экстрактах из растений разных периодов и мест

сбора. Например, значения АОА экстрактов из образцов полыни обыкновенной и эстрагона, собранных в 2023 и 2024 гг., близки, из полыни Людовика сбора 2023–2025 гг. они возрастают, а из полыни кавказской – практически не меняются. Оценка АОА водно-спиртовых и водных экстрактов из образцов ЛРС разных производителей позволила установить различный вклад индивидуальных ФС в величину АОА. По результатам определения суммарного содержания ФС и АОА полыни Людовика показана возможность ее фармакологического применения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. S.M.F. Bessada, J.C.M. Barreira, M.B.P.P. Oliveira Asteraceae Species with Most Prominent Bioactivity and Their Potential Applications: A Review // Industrial Crops and Products. — 2015. — Vol. 76. — P. 604–615.

2. H.N. Murthy, Y.-S. Kim, S.-Y. Park [et al.] Biotechnological Production of Caffeic Acid Derivatives from Cell and Organ Cultures of Echinacea Species // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2014. — Vol. 98. — P. 7707–7717.

3. В.В. Карпук Фармакогнозия : учеб. пособие. — Минск : БГУ, 2011. — ISBN 978-985-518-430-1.

4. Ромашка аптечная — Matricaria recutita — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. — URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/23776.html (дата обращения: 28.09.2026).

5. O. Singh, Z. Khanam, N. Misra [et al.] Chamomile (Matricaria chamomilla L.): An Overview // Pharmacognosy Reviews. — 2011. — Vol. 5. — P. 82–95.

6. G. Haghi, A. Hatami, A. Safaei [et al.] Analysis of Phenolic Compounds in Matricaria chamomilla and Its Extracts by UPLC-UV // Research in Pharmaceutical Sciences. — 2013. — Vol. 9. — P. 31–37.

7. J.K. Srivastava, E. Shankar, S. Gupta Chamomile: A Herbal Medicine of the Past with a Bright Future (Review) // Molecular Medicine Reports. — 2010. — Vol. 3. — P. 895–901.

8. Ромашка безъязычковая — Matricaria discoidea — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. — URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/23762.html (дата обращения: 28.09.2026).

9. Е.С. Васфилова, А.С. Третьякова, Е.Н. Подгаевская [et al.] Дикорастущие лекарственные растения Урала / под ред. В.А. Мухина. —

Екатеринбург : Издательство Уральского университета, 2014. — ISBN 978-5-7996-1087-6.

10. А.А. Кочетов, Н.Г. Синявина Стевия (Stevia rebaudiana Bertoni): биохимический состав, терапевтические свойства и использование в пищевой промышленности (обзор) // Химия растительного сырья. — 2021. — С. 5–27.

11. Стевия Ребо — Stevia rebaudiana — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. — URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/49904.html (дата обращения: 28.09.2026).

12. В.В. Платонов, А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих [et al.] Химический состав этанольного экстракта стевии (Stevia rebaudiana — медовая трава, семейство хризантемовых) // Вестник новых медицинских технологий. — 2020. — Т. 27. — С. 92–99.

13. K.Z. Myint, K. Wu, Y. Xia [et al.] Polyphenols from Stevia rebaudiana (Bertoni) Leaves and Their Functional Properties // Journal of Food Science. — 2020. — Vol. 85. — P. 240–248.

14. H. Karaköse, R. Jaiswal, N. Kuhnert Characterization and Quantification of Hydroxycinnamate Derivatives in Stevia rebaudiana Leaves by LC-MSn // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2011. — Vol. 59. — P. 10143–10150.

15. D.T. Raspe, C. da Silva, S. Cláudio da Costa Compounds from Stevia rebaudiana Bertoni Leaves: An Overview of Non-Conventional Extraction Methods and Challenges // Food Bioscience. — 2022. — Vol. 46. — Art. 101593.

16. J. Kamarauskaite, R. Baniene, L. Raudone [et al.] Antioxidant and Mitochondria-Targeted Activity of Caffeoylquinic-Acid-Rich Fractions of Wormwood (Artemisia absinthium L.) and Silver Wormwood (Artemisia ludoviciana Nutt.) // Antioxidants. — 2021. — Vol. 10. — P. 1405–1426.

17. Полынь обыкновенная — Artemisia vulgaris — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. —

URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/4117.html (дата обращения: 28.09.2026).

18. I. Carvalho, T. Cavaco, M. Brodelius Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Six Artemisia Species // Industrial Crops and Products. — 2011. — Vol. 33. — P. 382–388.

19. Полынь Людовика — Artemisia ludoviciana — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. —
URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/42393.html (дата обращения: 28.09.2026).

20. В.Н. Белоус, М.Ю. Кухарук Растительные сообщества обнажений коренной породы северо-западных пределов Ставропольской возвышенности // Науки о Земле. — 2016. — С. 109–126.

21. Полынь кавказская — Artemisia caucasica — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. —
URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/3842.html (дата обращения: 28.09.2026).

22. Полынь лечебная — Artemisia abrotanum — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. —
URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/3792.html (дата обращения: 28.09.2026).

23. H. Elansary, A. Szopa, P. Kubica [et al.] Polyphenol Content and Biological Activities of Ruta graveolens L. and Artemisia abrotanum L. in Northern Saudi Arabia // Processes. — 2020. — Vol. 8. — Art. 531.

24. M. Majdan, A.K. Kiss, R. Hałasa [et al.] Inhibition of Neutrophil Functions and Antibacterial Effects of Tarragon (Artemisia dracunculus L.) Infusion—Phytochemical Characterization // Frontiers in Pharmacology. — 2020. — Vol. 11. — Art. 947.

25. Полынь эстрагон — Artemisia dracunculus — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. —

URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/3866.html (дата обращения: 28.09.2026).

26. T. Carbonara, R. Pascale, M.P. Argentieri [et al.] Phytochemical Analysis of a Herbal Tea from Artemisia annua L. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2012. — Vol. 62. — P. 79–86.

27. Полынь однолетняя — Artemisia annua — Описание таксона // Плантариум : [сайт]. —
URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/3802.html (дата обращения: 28.09.2026).

28. M. Kowalcze, M. Jakubowska Voltammetric Determination of Thujone in Herbal Matrices in the Presence of Triton X-100 // Analytical Biochemistry. — 2018. — Vol. 543. — P. 12–20.

29. D. Lopes-Lutz, D.S. Alviano, C.S. Alviano [et al.] Screening of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Artemisia Essential Oils // Phytochemistry. — 2008. — Vol. 69. — P. 1732–1738.

30. M.J. Abad, L.M. Bedoya, L. Apaza [et al.] The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils // Molecules. — 2012. — Vol. 17. — P. 2542–2566.

31. H.Y. Aati, S. Perveen, R. Orfali [et al.] Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Artemisia absinthium, Artemisia scoparia, and Artemisia sieberi Grown in Saudi Arabia // Arabian Journal of Chemistry. — 2020. — Vol. 13. — P. 8209–8217.

32. H.A. Mohammed Phytochemical Analysis, Antioxidant Potential, and Cytotoxicity Evaluation of Traditionally Used Artemisia absinthium L. (Wormwood) Growing in the Central Region of Saudi Arabia // Plants. — 2022. — Vol. 11. — Art. 1028.

33. M.B.P. Zanousi, M. Nekoei, M. Mohammadhosseini Composition of the Essential Oils and Volatile Fractions of Artemisia absinthium by Three Different Extraction Methods: Hydrodistillation, Solvent-Free Microwave Extraction and

Headspace Solid-Phase Microextraction Combined with a Novel QSRR Evaluation // Journal of Essential Oil Bearing Plants. — 2016. — Vol. 19. — P. 1561–1581.

34. A. Benkhaled, A. Boudjelal, E. Napoli [et al.] Phytochemical Profile, Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Artemisia absinthium Essential Oil // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. — 2020. — Vol. 10, № 11. — P. 496–504.

35. H. Ekiert, E. Knut, J. Świątkowska [et al.] Artemisia abrotanum L. (Southern Wormwood)—History, Current Knowledge on the Chemistry, Biological Activity, Traditional Use and Possible New Pharmaceutical and Cosmetological Applications // Molecules. — 2021. — Vol. 26. — Art. 2503.

36. H. Ekiert, J. Pajor, P. Klin [et al.] Significance of Artemisia vulgaris L. (Common Mugwort) in the History of Medicine and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies // Molecules. — 2020. — Vol. 25. — Art. 4415.

37. E. Nikitin, I. Fitsev, A. Egorova [et al.] Five Different Artemisia L. Species Ethanol Extracts' Phytochemical Composition and Their Antimicrobial and Nematocide Activity // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24. — Art. 14372.

38. L. Bahmani, M. Aboonajmi, A. Arabhosseini [et al.] Effects of Ultrasound Pre-Treatment on Quantity and Quality of Essential Oil of Tarragon (Artemisia dracunculus L.) Leaves // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. — 2018. — Vol. 8. — P. 47–52.

39. A.R. Bilia, F. Santomauro, C. Sacco [et al.] Essential Oil of Artemisia annua L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. — 2014. — Vol. 2014. — Art. 159819.

40. M. Hong, M. Kim, H. Jang [et al.] Multivariate Analysis of Essential Oil Composition of Artemisia annua L. Collected from Different Locations in Korea // Molecules. — 2023. — Vol. 28. — Art. 1131.

41. F. Younsi, R. Trimech, A. Boulila [et al.] Essential Oil and Phenolic Compounds of Artemisia herba-alba (Asso.): Composition, Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, and Antibacterial Activities // International Journal of Food Properties. — 2016. — Vol. 19. — P. 1425–1438.

42. H. Mohsen, F. Ali Essential Oil Composition of Artemisia herba-alba from Southern Tunisia // Molecules. — 2009. — Vol. 14. — P. 1585–1594.

43. M.S. Abu-Darwish, C. Cabral, M.J. Gonçalves [et al.] Artemisia herba-alba Essential Oil from Buseirah (South Jordan): Chemical Characterization and Assessment of Safe Antifungal and Anti-Inflammatory Doses // Journal of Ethnopharmacology. — 2015. — Vol. 174. — P. 153–160.

44. K. Msaada, N. Salem, O. Bachrouch [et al.] Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (Artemisia absinthium L.) Essential Oils and Phenolics // Journal of Chemistry. — 2015. — Vol. 2015. — P. 1–12.

45. P. Janaćković, N. Rajčević, M. Gavrilović [et al.] Essential Oil Composition of Five Artemisia (Compositae) Species in Regards to Chemophenetics // Biochemical Systematics and Ecology. — 2019. — Vol. 87. — Art. 103960.

46. F. Sidaoui, S.B. Igueld, M. Yemmen [et al.] Chemical and Functional Characterization of Tunisian Artemisia absinthium Volatiles and Non-Volatile Extracts Obtained by Supercritical Fluid Procedure. — 2016. — 8 p.

47. A. Judzentiene, J. Budiene Chemical Polymorphism of Essential Oils of Artemisia vulgaris Growing Wild in Lithuania // Chemistry & Biodiversity. — 2018. — Vol. 15. — Art. e1700257.

48. S. Govindaraj, B.D.R. Kumari, P.L. Cioni [et al.] Mass Propagation and Essential Oil Analysis of Artemisia vulgaris // Journal of Bioscience and Bioengineering. — 2008. — Vol. 105. — P. 176–183.

49. S. Ćavar, M. Maksimović, D. Vidic [et al.] Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Artemisia annua L. from Bosnia // Industrial Crops and Products. — 2012. — Vol. 37. — P. 479–485.

50. R. Belhattab, L. Amor, J.G. Barroso [et al.] Essential Oil from Artemisia herba-alba Asso Grown Wild in Algeria: Variability Assessment and Comparison with an Updated Literature Survey // Arabian Journal of Chemistry. — 2014. — Vol. 7. — P. 243–251.

51. H. Ekiert, J. Świątkowska, E. Knut [et al.] Artemisia dracunculus (Tarragon): A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology // Frontiers in Pharmacology. — 2021. — Vol. 12. — Art. 653993.

52. L. Martín, L.F. Julio, J. Burillo [et al.] Comparative Chemistry and Insect Antifeedant Action of Traditional (Clevenger and Soxhlet) and Supercritical Extracts (CO2) of Two Cultivated Wormwood (Artemisia absinthium L.) Populations // Industrial Crops and Products. — 2011. — Vol. 34. — P. 1615–1621.

53. S. Malik, L.S.S. De Mesquita, C.R. Silva [et al.] Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from Artemisia vulgaris L. Cultivated in Brazil // Pharmaceuticals. — 2019. — Vol. 12. — Art. 49.

54. S. Chemat Extraction Mechanism of Ultrasound Assisted Extraction and Its Effect on Higher Yielding and Purity of Artemisinin Crystals from Artemisia annua L. Leaves.

55. M. Banožić, A.W. Wronska, M. Jakovljević Kovač [et al.] Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques for Separation of Artemisinin from Sweet Wormwood (Artemisia annua L.) // Horticulturae. — 2023. — Vol. 9. — Art. 629.

56. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants / S.S. Handa, S.P.S. Khanuja, G. Longo, D.D. Rakesh, eds. — Trieste : International Centre for Science and High Technology, 2008.

57. R. Robbins Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2003. — Vol. 51. — P. 2866–2887.

58. The Science of Flavonoids / E. Grotewold, ed. — New York : Springer, 2006. — ISBN 978-0-387-28821-5.

59. Государственная фармакопея XIV издания. — Т. 4. — Полынь. — С. 6343.

60. Государственная фармакопея XIV издания. — Т. 4. — Ромашка. — С. 6394. — URL: https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/ (дата обращения: 16.05.2022).

61. N.I. Kashchenko, D.N. Olennikov Quantitative Analysis of Flavonoids in Chamomile Flowers (Matricaria chamomilla L.) by Microcolumn HPLC-UV // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2017. — Vol. 43. — P. 783–789.

62. N.N. Azwanida A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation // Medicinal & Aromatic Plants. — 2015. — Vol. 4.

63. L. Wang, C.L. Weller Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants // Trends in Food Science & Technology. — 2006. — Vol. 17. — P. 300–312.

64. K.B. Bączek, M. Wiśniewska, J.L. Przybył [et al.] Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Chamomile (Matricaria recutita L.) Organic Cultivation // Industrial Crops and Products. — 2019. — Vol. 140. — Art. 111562.

65. M.A. Bratty, L.K. Govindaram, L.K. Govindaram [et al.] High Performance Thin-Layer Chromatography and in Vitro Cytotoxic Studies on Ethanol Extract of Matricaria chamomilla L (Asteraceae) Flowers // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. — 2021. — Vol. 18. — P. 1969–1976.

66. S. Najafian, M. Moradi, M. Sepehrimanesh Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of Two Medicinal Plant Species, Mentha piperita and Stevia rebaudiana, Cultivated in Iran // Comparative Clinical Pathology. — 2016. — Vol. 25. — P. 743–747.

67. F. Cacciola, P. Delmonte, K. Jaworska [et al.] Employing Ultra High Pressure Liquid Chromatography as the Second Dimension in a Comprehensive Two-Dimensional System for Analysis of Stevia rebaudiana Extracts // Journal of Chromatography A. — 2011. — Vol. 1218. — P. 2012–2018.

68. T.A. Thumann, E.-M. Pferschy-Wenzig, H. Aziz-Kalbhenn [et al.] Application of an in Vitro Digestion Model to Study the Metabolic Profile Changes of an Herbal Extract Combination by UHPLC–HRMS // Phytomedicine. — 2020. — Vol. 71. — Art. 153221.

69. F. Šibul, D. Orčić, S. Berežni [et al.] HPLC–MS/MS Profiling of Wild-Growing Scentless Chamomile // Acta Chromatographica. — 2020. — Vol. 32. — P. 86–94.

70. H. Al-Suod, I. Ratiu, A. Krakowska-Sieprawska [et al.] Supercritical Fluid Extraction in Isolation of Cyclitols and Sugars from Chamomile Flowers // Journal of Separation Science. — 2019. — Vol. 42. — P. 3243–3252.

71. J. Medina Medrano, J. Torres-Contreras, M. Mares-Quiñones [et al.] Effect of the Solid-Liquid Extraction Solvent on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Three Species of Stevia Leaves // Separation Science and Technology. — 2018. — Vol. 54.

72. A.G. Covarrubias-Cárdenas, J.I. Martínez-Castillo, N. Medina-Torres [et al.] Antioxidant Capacity and UPLC-PDA ESI-MS Phenolic Profile of Stevia rebaudiana Dry Powder Extracts Obtained by Ultrasound Assisted Extraction // Agronomy. — 2018. — Vol. 8. — Art. 170.

73. X.-Y. Xie, F.-F. Chen, Y.-P. Shi Simultaneous Determination of Eight Flavonoids in the Flowers of Matricaria chamomilla by High Performance Liquid Chromatography // Journal of AOAC International. — 2014. — Vol. 97. — P. 778–783.

74. L. Nováková, A. Vildová, J.P. Mateus [et al.] Development and Application of UHPLC–MS/MS Method for the Determination of Phenolic Compounds in Chamomile Flowers and Chamomile Tea Extracts // Talanta. — 2010. — Vol. 82. — P. 1271–1280.

75. M. Țicolea, R.M. Pop, M. Pârvu [et al.] Phytochemical Composition Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Artemisia dracunculus and Artemisia abrotanum // Antioxidants. — 2024. — Vol. 13. — Art. 1016.

76. Y. Song, K.T. Desta, G.-S. Kim [et al.] Polyphenolic Profile and Antioxidant Effects of Various Parts of Artemisia annua L. // Biomedical Chromatography. — 2016. — Vol. 30. — P. 588–595.

77. S.E. Laouini Free Radicals Scavenging Activity and Phytochemical Composition of Artemisia (Herba-Alba) Extract Growth in Algeria // Journal of Fundamental and Applied Sciences. — 2018.

78. A.T. Valduga, I.L. Gonçalves, E. Magri [et al.] Chemistry, Pharmacology and New Trends in Traditional Functional and Medicinal Beverages // Food Research International. — 2019. — Vol. 120. — P. 478–503.

79. A. Sentkowska, M. Biesaga, K. Pyrzynska Effects of Brewing Process on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Herbs // Food Science and Biotechnology. — 2016. — Vol. 25. — P. 965–970.

80. O. Maschi, E.D. Cero, G.V. Galli [et al.] Inhibition of Human cAMP-Phosphodiesterase as a Mechanism of the Spasmolytic Effect of Matricaria recutita L. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2008. — Vol. 56. — P. 5015–5020.

81. E. Kassi, Z. Papoutsi, N. Fokialakis [et al.] Greek Plant Extracts Exhibit Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM)-like Properties // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2004. — Vol. 52. — P. 6956–6961.

82. F. Macchioni, S. Perrucci, F. Cecchi [et al.] Acaricidal Activity of Aqueous Extracts of Camomile Flowers, Matricaria chamomilla, against the Mite Psoroptes cuniculi // Medical and Veterinary Entomology. — 2004. — Vol. 18. — P. 205–207.

83. A. Sentkowska, M. Biesaga, K. Pyrzynska Retention Study of Flavonoids Under Different Chromatographic Modes // Journal of Chromatographic Science. — 2016. — Vol. 54. — P. 516–522.

84. A. Raal, A. Orav, T. Püssa [et al.] Content of Essential Oil, Terpenoids and Polyphenols in Commercial Chamomile (Chamomilla recutita L. Rauschert) Teas from Different Countries // Food Chemistry. — 2012. — Vol. 131. — P. 632–638.

85. M. Vinatoru An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Herbs // Ultrasonics Sonochemistry. — 2001. — Vol. 8. — P. 303–313.

86. G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazny [et al.] Techniques of Preparing Plant Material for Chromatographic Separation and Analysis // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. — 2007. — Vol. 70. — P. 253–261.

87. M. Berechet, E. Manaila, M. Stelescu [et al.] The Composition of Essential Oils Obtained from Achillea millefolium and Matricaria chamomilla L., Originary from Romania // Revista de Chimie. — 2017. — Vol. 68. — P. 2787–2795.

88. H.A. Mohammed Phytochemical Analysis, Antioxidant Potential, and Cytotoxicity Evaluation of Traditionally Used Artemisia absinthium L. (Wormwood) Growing in the Central Region of Saudi Arabia // Plants. — 2022. — Vol. 11. — Art. 1028.

89. P. Janaćković, N. Rajčević, M. Gavrilović [et al.] Essential Oil Composition of Five Artemisia (Compositae) Species in Regards to Chemophenetics // Biochemical Systematics and Ecology. — 2019. — Vol. 87. — Art. 103960.

90. S. Ćavar, M. Maksimović, D. Vidic [et al.] Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Artemisia annua L. from Bosnia // Industrial Crops and Products. — 2012. — Vol. 37. — P. 479–485.

91. M. Hong, M. Kim, H. Jang [et al.] Multivariate Analysis of Essential Oil Composition of Artemisia annua L. Collected from Different Locations in Korea // Molecules. — 2023. — Vol. 28. — Art. 1131.

92. L. Bahmani, M. Aboonajmi, A. Arabhosseini [et al.] Effects of Ultrasound Pre-Treatment on Quantity and Quality of Essential Oil of Tarragon (Artemisia dracunculus L.) Leaves // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. — 2018. — Vol. 8. — P. 47–52.

93. M. Aćimović, V. Tešević, K.T. Smiljanić [et al.] Hydrolates: By-products of Essential Oil Distillation: Chemical Composition, Biological Activity and Potential Uses // Advanced Technologies. — 2020. — Vol. 9. — P. 54–70.

94. D. Šilha, K. Švarcová, T. Bajer [et al.] Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on Arcobacter-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms // Molecules. — 2020. — Vol. 25. — Art. 5654.

95. K. Smiljanić, I. Prodić, S. Trifunovic [et al.] Multistep Approach Points to Compounds Responsible for the Biological Activity and Safety of Hydrolates from Nine Lamiaceae Medicinal Plants on Human Skin Fibroblasts // Antioxidants. — 2023. — Vol. 12. — Art. 1988.

96. M.G. Aćimović Production and Use of Hydrolates from the Distillation Process of Aromatic Plants // Agricultural Waste: Environmental Impact, Useful Metabolites and Energy Production / K.G. Ramawat, J.-M. Mérillon, J. Arora, eds. — Singapore : Springer Nature, 2023. — P. 453–487. — ISBN 978-981-19-8774-8.

97. C.S. Tavares, J.A. Gameiro, L.B. Roseiro [et al.] Hydrolates: A Review on Their Volatiles Composition, Biological Properties and Potential Uses // Phytochemistry Reviews. — 2022. — Vol. 21. — P. 1661–1737.

98. S. D'Amato, A. Serio, C. Lòpez [et al.] Hydrosols: Biological Activity and Potential as Antimicrobials for Food Applications // Food Control. — 2017. — Vol. 86.

99. K. Jakubczyk, A. Tuchowska, K. Janda-Milczarek Plant Hydrolates – Antioxidant Properties, Chemical Composition and Potential Applications // Biomedicine & Pharmacotherapy. — 2021. — Vol. 142. — Art. 112033.

100. T.A. Tran, M.T. Ho, Y.W. Song [et al.] Camphor Induces Proliferative and Anti-Senescence Activities in Human Primary Dermal Fibroblasts and Inhibits UV-Induced Wrinkle Formation in Mouse Skin // Phytotherapy Research. — 2015. — Vol. 29. — P. 1917–1925.

101. C.L. Popa, A. Lupitu, M.D. Mot [et al.] Chemical and Biochemical Characterization of Essential Oils and Their Corresponding Hydrolats from Six Species of the Lamiaceae Family // Plants. — 2021. — Vol. 10. — Art. 2489.

102. J. Paolini, C. Leandri, J.-M. Desjobert [et al.] Comparison of Liquid–Liquid Extraction with Headspace Methods for the Characterization of Volatile

Fractions of Commercial Hydrolats from Typically Mediterranean Species // Journal of Chromatography A. — 2008. — Vol. 1193. — P. 37–49.

103. S. Inouye, M. Takahashi, S. Abe A Comparative Study on the Composition of Forty Four Hydrosols and Their Essential Oils // International Journal of Essential Oil Therapeutics. — 2008. — Vol. 3. — P. 89–104.

104. A. Hamedi, M. Afifi, H. Etemadfard Investigating Chemical Composition and Indications of Hydrosol Soft Drinks (Aromatic Waters) Used in Persian Folk Medicine for Women's Hormonal and Reproductive Health Conditions // Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine. — 2017. — Vol. 22. — P. 824–839.

105. H. Sereshti, M. Karimi, S. Samadi Application of Response Surface Method for Optimization of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Water-Soluble Components of Rosa damascena Mill. Essential Oil // Journal of Chromatography A. — 2009. — Vol. 1216. — P. 198–204.

106. H. Sereshti, Y. Izadmanesh, S. Samadi Optimized Ultrasonic Assisted Extraction–Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with Gas Chromatography for Determination of Essential Oil of Oliveria decumbens Vent. // Journal of Chromatography A. — 2011. — Vol. 1218. — P. 4593–4598.

107. M. Khajeh, Z.S. Moghaddam, M. Bohlooli [et al.] Modeling of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Determination of Essential Oil from Borago officinalis L. By Using Combination of Artificial Neural Network and Genetic Algorithm Method // Journal of Chromatographic Science. — 2015. — Vol. 53. — P. 1801–1807.

108. D.L. McKay, J.B. Blumberg A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (Matricaria recutita L.) // Phytotherapy Research. — 2006. — Vol. 20. — P. 519–530.

109. M. Luque de Castro, F. Priego-Capote Ultrasound Assistance to Liquid-Liquid Extraction: A Debatable Analytical Tool // Analytica Chimica Acta. — 2007. — Vol. 583. — P. 2–9.

110. U.H. Zaidan, N.I. Mohamad Zen, N.A. Amran [et al.] Biochemical Evaluation of Phenolic Compounds and Steviol Glycoside from Stevia rebaudiana Extracts Associated with in Vitro Antidiabetic Potential // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. — 2019. — Vol. 18. — Art. 101049.

111. R. Pandiyan, V. Rajesh Kannan, S. Chandrasekaran [et al.] Effect on Extracts of Stevia rebaudiana Bertoni in Ethanol Induced Gastric Ulcer by Using Wister Rats // Recent Research in Science and Technology. — 2009. — Vol. 1. — P. 127–130.

112. A. Chakma, F. Afrin, M.G. Rasul [et al.] Effects of Extraction Techniques on Antioxidant and Antibacterial Activity of Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) Leaf Extracts // Food Chemistry Advances. — 2023. — Vol. 3. — Art. 100494.

113. M.J. Álvarez-Robles, A. López-Orenes, M.A. Ferrer [et al.] Methanol Elicits the Accumulation of Bioactive Steviol Glycosides and Phenolics in Stevia rebaudiana Shoot Cultures // Industrial Crops and Products. — 2016. — Vol. 87. — P. 273–279.

114. M. Biesaga Influence of Extraction Methods on Stability of Flavonoids // Journal of Chromatography A. — 2011. — Vol. 1218. — P. 2505–2512.

115. A. Oniszczuk, M. Olech, T. Oniszczuk [et al.] Puffed Cereals with Added Chamomile – Quantitative Analysis of Polyphenols and Optimization of Their Extraction Method // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. — 2017. — Vol. 24. — P. 222–228.

116. Y. Kobayashi, Y. Nakano, K. Inayama [et al.] Dietary Intake of the Flower Extracts of German Chamomile (Matricaria recutita L.) Inhibited Compound 48/80-Induced Itch-Scratch Responses in Mice // Phytomedicine. — 2003. — Vol. 10. — P. 657–664.

117. C. Huang, Y. Wang, C. Zhou [et al.] Ultrasonic Vacuum Synergistic Assisted Ethanol Extraction of Steviol Glycosides and Kinetic Studies // Industrial Crops and Products. — 2024. — Vol. 221. — Art. 119385.

118. E. Baiceanu, L. Vlase, A. Baiceanu [et al.] New Polyphenols Identified in Artemisiae abrotani Herba Extract // Molecules. — 2015. — Vol. 20. — P. 11063–11075.

119. E. Neagu, G. Paun, C. Albu [et al.] Artemisia abrotanum and Symphytum officinale Polyphenolic Compounds-Rich Extracts with Potential Application in Diabetes Management // Metabolites. — 2023. — Vol. 13. — Art. 354.

120. F.-G.C. Ekezie, D.-W. Sun, J.-H. Cheng Acceleration of Microwave-Assisted Extraction Processes of Food Components by Integrating Technologies and Applying Emerging Solvents: A Review of Latest Developments // Trends in Food Science & Technology. — 2017. — Vol. 67. — P. 160–172.

121. V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research // Pharmacognosy Reviews. — 2006. — Vol. 1. — P. 7–18.

122. C. Proestos, M. Komaitis Application of Microwave-Assisted Extraction to the Fast Extraction of Plant Phenolic Compounds // LWT – Food Science and Technology. — 2008. — Vol. 41. — P. 652–659.

123. M. Biesaga Influence of Extraction Methods on Stability of Flavonoids // Journal of Chromatography A. — 2011. — Vol. 1218. — P. 2505–2512.

124. A. Liazid, M. Palma, J. Brigui [et al.] Investigation on Phenolic Compounds Stability during Microwave-Assisted Extraction // Journal of Chromatography A. — 2007. — Vol. 1140. — P. 29–34.

125. A. Cvetanović, J. Švarc-Gajić, P. Mašković [et al.] Antioxidant and Biological Activity of Chamomile Extracts Obtained by Different Techniques: Perspective of Using Superheated Water for Isolation of Biologically Active Compounds // Industrial Crops and Products. — 2015. — Vol. 65. — P. 582–591.

126. M.F.S. Ramos, E.P. Santos, C.H.B. Bizarri [et al.] Preliminary Studies towards Utilization of Various Plant Extracts as Antisolar Agents // International Journal of Cosmetic Science. — 2007. — Vol. 18. — P. 87–101.

127. T. Belwal, S.M. Ezzat, L. Rastrelli [et al.] A Critical Analysis of Extraction Techniques Used for Botanicals: Trends, Priorities, Industrial Uses and Optimization Strategies // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2018. — Vol. 100. — P. 82–102.

128. A.E. Asbahani, K. Miladi, W. Badri [et al.] Essential Oils: From Extraction to Encapsulation // International Journal of Pharmaceutics. — 2015. — Vol. 483. — P. 220–243.

129. Диссертация Милевская.pdf. — [Б. м., б. г.].

130. Z. Drinić, D. Pljevljakušić, J. Živković [et al.] Microwave-Assisted Extraction of O. vulgare L. Spp. hirtum Essential Oil: Comparison with Conventional Hydro-Distillation // Food and Bioproducts Processing. — 2020. — Vol. 120. — P. 158–165.

131. E. Herrera, C. Pacheco, L. Olivera-Montenegro Extraction and Characterization of Chamomile (Matricaria recutita L.) Essential Oil Using the Green Technology of Solvent-Free Microwave Extraction // Biology and Life Sciences Forum. — 2022. — Vol. 18. — Art. 12974.

132. З.А. Темердашев, Т.К. Чубукина, Е.А. Виницкая [et al.] Оценка содержаний изофлавоноидов в клевере луговом (Trifolium pratense L.) из семейства бобовые (Fabaceae) в условиях экстракции различными способами // Журнал аналитической химии. — 2021. — Т. 76. — С. 819–831.

133. J. Wang, J. Zhang, X. Wang [et al.] Сравнительное исследование микроволновой экстракции полисахаридов Artemisia sphaerocephala с традиционным методом: оценка структуры молекулы и антиоксидантной активности // International Journal of Biological Macromolecules. — 2009. — Vol. 45. — P. 483–492.

134. H. Misra, D. Mehta, B.K. Mehta [et al.] Microwave-Assisted Extraction Studies of Target Analyte Artemisinin from Dried Leaves of Artemisia annua L. // Organic Chemistry International. — 2013. — Vol. 2013. — Art. 163028.

135. L. Zhang, Z.-C. Tu, H. Wang [et al.] Antioxidant Activity and Phenolic Acids Profiles of Artemisia selengensis Turcz Extracted with Various Methods by HPLC-QTOF-MS/MS // Journal of Food Biochemistry. — 2016. — Vol. 40. — P. 603–612.

136. J. Kronholm, K. Hartonen, M.-L. Riekkola Analytical Extractions with Water at Elevated Temperatures and Pressures // Trends in Analytical Chemistry. — 2007. — Vol. 26. — P. 396–412.

137. L.V. Pavlova, I.A. Platonov, V.A. Kurkin [et al.] Evaluation of the Extraction Efficiency of Biologically Active Compounds from Chamomile Flowers (Chamomilla recutita R.) Grown in the Samara Region by Extractants in the Subcritical State // Russian Journal of Physical Chemistry B. — 2018. — Vol. 12. — P. 1212–1224.

138. K. Ameer, S.-W. Bae, Y. Jo [et al.] Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Total Extract, Stevioside and Rebaudioside-A from Stevia rebaudiana (Bertoni) Leaves, Using Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Network (ANN) Modelling // Food Chemistry. — 2017. — Vol. 229. — P. 198–207.

139. D. Bursać Kovačević, F.J. Barba, D. Granato [et al.] Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) for the Green Recovery of Bioactive Compounds and Steviol Glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni Leaves // Food Chemistry. — 2018. — Vol. 254. — P. 150–157.

140. D.T. Raspe, C. da Silva, S.C. da Costa Pressurized Liquid Extraction of Compounds from Stevia Leaf: Evaluation of Process Variables and Extract Characterization // Journal of Supercritical Fluids. — 2023. — Vol. 193. — Art. 105813.

141. M. Ciulu, R. Quirantes-Piné, N. Spano [et al.] Evaluation of New Extraction Approaches to Obtain Phenolic Compound-Rich Extracts from Stevia rebaudiana Bertoni Leaves // Industrial Crops and Products. — 2017. — Vol. 108. — P. 106–112.

142. В.Е. Тарасов, Е.Г. Ерофеева, О.Н. Пономарева Разработка современных машин и оборудования для переработки эфирномасличного и лекарственного сырья. — [Б. м.] : ООО «Издательство Типография «Ариал», 2019. — С. 213–219.

143. C.W. Huie A Review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2002. — Vol. 373. — P. 23–30.

144. N. Titova, S. Shamilova, A. Zhabayeva [et al.] Terpenoids of Matricaria chamomilla L. from Different Places of Growth // Series Chemistry and Technology. — 2019. — Vol. 3. — P. 44–48.

145. P. Kotnik, M. Škerget, Ž. Knez Supercritical Fluid Extraction of Chamomile Flower Heads: Comparison with Conventional Extraction, Kinetics and Scale-Up // Journal of Supercritical Fluids. — 2007. — Vol. 43. — P. 192–198.

146. E. Ghasemi, Y. Yamini, N. Bahramifar [et al.] Comparative Analysis of the Oil and Supercritical CO2 Extract of Artemisia sieberi // Journal of Food Engineering. — 2007. — Vol. 79. — P. 306–311.

147. A. Khoddami, M. Wilkes, T. Roberts Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds // Molecules. — 2013. — Vol. 18. — P. 2328–2375.

148. S.Y. Lee, K. Shaari LC-MS Metabolomics Analysis of Stevia rebaudiana Bertoni Leaves Cultivated in Malaysia in Relation to Different Developmental Stages // Phytochemical Analysis. — 2022. — Vol. 33. — P. 249–261.

149. S. Pacifico, S. Piccolella, P. Nocera [et al.] New Insights into Phenol and Polyphenol Composition of Stevia rebaudiana // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2019. — Vol. 163. — P. 45–57.

150. M. Barroso, L. Barros, M.Â. Rodrigues [et al.] Stevia rebaudiana Bertoni Cultivated in Portugal: A Prospective Study of Its Antioxidant Potential in Different Conservation Conditions // Industrial Crops and Products. — 2016. — Vol. 90. — P. 49–55.

151. J.K. Srivastava, S. Gupta Antiproliferative and Apoptotic Effects of Chamomile Extract in Various Human Cancer Cells // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2007. — Vol. 55. — P. 9470–9478.

152. K. Msaada, N. Salem, O. Bachrouch [et al.] Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (Artemisia absinthium L.) Essential Oils and Phenolics // Journal of Chemistry. — 2015. — Vol. 2015. — Art. 804658.

153. M.H.H. Roby, M.A. Sarhan, K.A.-H. Selim [et al.] Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil and Extracts of Fennel (Foeniculum vulgare L.) and Chamomile (Matricaria chamomilla L.) // Industrial Crops and Products. — 2013. — Vol. 44. — P. 437–445.

154. N. Mulinacci, A. Romani, P. Pinelli [et al.] Characterization of Matricaria recutita L. Flower Extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD Analysis // Chromatographia. — 2000. — Vol. 51. — P. 301–307.

155. B. Avula, Y.-H. Wang, G. Isaac [et al.] Metabolic Profiling of Hoodia, Chamomile, Terminalia Species and Evaluation of Commercial Preparations Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry // Planta Medica. — 2017. — Vol. 83. — P. 1297–1308.

156. B. Weber, M. Herrmann, B. Hartmann [et al.] HPLC/MS and HPLC/NMR as Hyphenated Techniques for Accelerated Characterization of the Main Constituents in Chamomile (Chamomilla recutita [L.] Rauschert) //

European Food Research and Technology. — 2008. — Vol. 226. — P. 755–760.

157. D.N. Olennikov, N.K. Chirikova, N.I. Kashchenko [et al.] Bioactive Phenolics of the Genus Artemisia (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS Profile of the Siberian Species and Their Inhibitory Potential Against α-Amylase and α-Glucosidase // Frontiers in Pharmacology. — 2018. — Vol. 9. — Art. 756.

158. H.H.M. Fadel, A.H. El-Ghorab, A.M.S. Hussein [et al.] Correlation between Chemical Composition and Radical Scavenging Activity of 10 Commercial Essential Oils: Impact of Microencapsulation on Functional Properties of Essential Oils // Arabian Journal of Chemistry. — 2020. — Vol. 13. — P. 6815–6827.

159. H.Y. Aati, S. Perveen, R. Orfali [et al.] Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Artemisia absinthium, Artemisia scoparia, and Artemisia sieberi Grown in Saudi Arabia // Arabian Journal of Chemistry. — 2020. — Vol. 13. — P. 8209–8217.

160. A. Benkhaled, A. Boudjelal, E. Napoli [et al.] Phytochemical Profile, Antioxidant Activity and Wound Healing Properties of Artemisia absinthium Essential Oil // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. — 2020. — Vol. 10. — P. 496–504.

161. A. Judzentiene, J. Budiene Chemical Polymorphism of Essential Oils of Artemisia vulgaris Growing Wild in Lithuania // Chemistry & Biodiversity. — 2018. — Vol. 15. — Art. e1700257.

162. E. Nikitin, I. Fitsev, A. Egorova [et al.] Five Different Artemisia L. Species Ethanol Extracts' Phytochemical Composition and Their Antimicrobial and Nematocide Activity // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24. — Art. 14372.

163. S. Agatonovic-Kustrin, D. Babazadeh Ortakand, D.W. Morton [et al.] Rapid Evaluation and Comparison of Natural Products and Antioxidant

Activity in Calendula, Feverfew, and German Chamomile Extracts // Journal of Chromatography A. — 2015. — Vol. 1385. — P. 103–110.

164. Z.P. Zekovic Chamomile Ligulate Flowers in Supercritical CO2-Extraction // Journal of Essential Oil Research. — 2000. — Vol. 12. — P. 85–93.

165. M. Bener, M. Özyürek, K. Güçlü [et al.] Polyphenolic Contents of Natural Dyes Produced from Industrial Plants Assayed by HPLC and Novel Spectrophotometric Methods // Industrial Crops and Products. — 2010. — Vol. 32. — P. 499–506.

166. M.B. Tadhani, V.H. Patel, R. Subhash In Vitro Antioxidant Activities of Stevia rebaudiana Leaves and Callus // Journal of Food Composition and Analysis. — 2007. — Vol. 20. — P. 323–329.

167. J.K.S. Andrade, R.G.C. Barros, Y.R.R.S. Rezende [et al.] Evaluation of Bioactive Compounds, Phytochemicals Profile and Antioxidant Potential of the Aqueous and Ethanolic Extracts of Some Traditional Fruit Tree Leaves Used in Brazilian Folk Medicine // Food Research International. — 2021. — Vol. 143. — Art. 110282.

168. R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Gálvez, P. Rojas [et al.] Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Inflammatory Potential of Stevia rebaudiana Leaves: Effect of Different Drying Methods // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. — 2018. — Vol. 11. — P. 37–46.

169. M. Țicolea, R.M. Pop, M. Pârvu [et al.] Flowers and Leaves of Artemisia absinthium and Artemisia annua Phytochemical Characterization, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Anti-Proliferative Activities Evaluation // Plants. — 2025. — Vol. 14. — Art. 1029.

170. A.K. Jha, N. Sit Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials Using Combination of Various Novel Methods: A Review // Trends in Food Science & Technology. — 2022. — Vol. 119. — P. 579–591.

171. Y. Marcus Extraction by Subcritical and Supercritical Water, Methanol, Ethanol and Their Mixtures // Separations. — 2018. — Vol. 5. — Art. 4.

172. A. Cvetanović, J. Švarc-Gajić, Z. Zeković [et al.] Subcritical Water Extraction as a Cutting Edge Technology for the Extraction of Bioactive Compounds from Chamomile: Influence of Pressure on Chemical Composition and Bioactivity of Extracts // Food Chemistry. — 2018. — Vol. 266. — P. 389–396.

173. В.В. Милевская Определение биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье антидепрессантного и противовоспалительного действия : дис. … канд. хим. наук : 02.00.02. — Краснодар, 2017.

174. О.Н. Стасьева, Н.Н. Латин, Г.И. Касьянов CO2-экстракты компании «Караван» — новый класс натуральных пищевых добавок. — [Б. м.] : Кубанский государственный технологический университет, [б. г.].

175. P. Chen, B. Liu, X. Liu [et al.] Ultrasound-Assisted Extraction and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Sensitive Determination of Essential Oil Components in Lavender // Analytical Methods. — 2019. — Vol. 11. — P. 1541–1550.

176. В.В. Милевская, М.А. Статкус, З.А. Темердашев [et al.] Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе // Журнал аналитической химии. — 2016. — Т. 71.

177. К.С. Сычев Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции. — Москва, 2006.

178. Т.В. Максимова, И.Н. Никулина, В.П. Пахомов [et al.] Способ определения антиокислительной активности. — 2001.

179. B. Avula, Y.-H. Wang, M. Wang [et al.] Quantitative Determination of Phenolic Compounds by UHPLC-UV–MS and Use of Partial Least-Square Discriminant Analysis to Differentiate Chemo-Types of Chamomile/Chrysanthemum Flower Heads // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2014. — Vol. 88. — P. 278–288.

180. Е.А. Виницкая (Шилько), Т.К. Чубукина, Д.В. Назарова Изучение некоторых особенностей извлечения биологически активных веществ из растительного сырья различными способами. — [Б. м.] : Бурятский научный центр Сибирского отделения РАН, 2022. — С. 597.

181. Т.К. Чубукина, З.А. Темердашев, Д.В. Назарова [et al.] ВЭЖХ-ДМД-МС-определение некоторых фенольных соединений в водном экстракте ромашки аптечной, полученном субкритическим способом. — Томск : Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2023. — С. 260–261.

182. З.А. Темердашев, Т.К. Чубукина, Е.А. Виницкая [et al.] Хроматографическая оценка содержания фенольных соединений в экстрактах ромашки аптечной (Matricaria chamomilla L.) в различных условиях извлечения // Журнал аналитической химии. — 2023. — Т. 78. — С. 365–375.

183. Т.К. Чубукина, Ю.А. Петренко (Дегтярева), Н.В. Киселева Возможности твердофазной экстракции и определения эфирно-масличных компонентов из гидролата ромашки аптечной (Matricaria chamomilla L.) // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1: Естественные науки. — 2024. — Т. 39. — С. 101–108.

184. З.А. Темердашев, Т.К. Чубукина, Н.В. Киселева Хромато-масс-спектрометрическое определение летучих компонентов в различных экстрактах из цветов ромашки аптечной (Matricaria chamomilla L.) // Журнал аналитической химии. — 2025. — Т. 80. — С. 279–292.

185. Т.К. Чубукина, Н.В. Киселева Извлечение летучих органических соединений из цветов ромашки аптечной под действием

УЗ-излучения // Сборник тезисов докладов : в 7 томах, посвящённый 190-летию Д.И. Менделеева и 300-летию основания Российской академии наук. — Сочи : ООО «Буки Веди», 2024. — Т. 6. — С. 364.

186. H. Karaköse, A. Müller, N. Kuhnert Profiling and Quantification of Phenolics in Stevia rebaudiana Leaves // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2015. — Vol. 63. — P. 9188–9198.