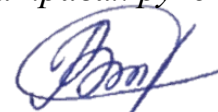


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кубанский государственный университет»

На правах рукописи



ВИНИЦКАЯ ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ФИТОКОМПОНЕНТОВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В ЭКСТРАКТАХ
НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВ ЗВЕРБОЙНЫЕ
(*HYPERICACEAE*), АСТРОВЫЕ (*ASTERACEAE*) И БОБОВЫЕ (*FABACEAE*)

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
2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 Аналитический обзор.....	11
1.1 Фенольные соединения в составе лекарственного растительного сырья... 11	11
1.2 Экстракция ФС из ЛРС	16
1.2.1 Твердофазная экстракция ФС из экстрактов ЛРС	18
1.2.1.1 Сорбционные характеристики материалов для твердофазной экстракции ФС	24
1.2.2 Экстракция ФС из зверобоя продырявленного.....	28
1.2.3 Экстракция ФС из эхинацеи пурпурной.....	30
1.2.4 Экстракция ФС из клевера лугового	32
1.3 Методы идентификации и определения ФС в экстрактах ЛРС.....	37
1.3.1 Идентификация и определение ФС в экстрактах зверобоя продырявленного	41
1.3.2 Идентификация и определение ФС в экстрактах эхинацеи пурпурной	45
1.3.3 Идентификация и определение ФС в экстрактах клевера лугового	47
1.4 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования.....	49
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	52
2.1 Исходные реактивы, материалы и используемая аппаратура.....	52
2.2 Объекты исследования.....	54
2.3 Приготовление рабочих растворов	55
2.4 Экстракция ФС из растительного материала	58
2.5 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах ЛРС	62
2.5.1 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах зверобоя продырявленного	62
2.5.2 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах эхинацеи пурпурной ...	66
2.5.3 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах клевера лугового	69

2.6	Метрологические характеристики методик определения ФС в экстрактах ЛРС	71
2.7	ГХ-МС определение ФС в экстрактах ЛРС	72
3	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	74
3.1	Оценка эффективности извлечения ФС из ЛРС различными способами экстракции.....	74
3.1.1	Эффективность извлечения ФС из эхинацеи пурпурной.....	74
3.1.2	Эффективность извлечения ФС из клевера лугового.....	78
3.1.3	Эффективность извлечения ФС из зверобоя продырявленного	82
3.2	Влияние географических и морфологических факторов на содержание ФС в экстрактах ЛРС.....	84
3.3	Оценка качества ЛРС и препаратов на его основе по содержанию ФС в их экстрактах	88
3.4	Твердофазная экстракция ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного	92
3.4.1	Концентрирование ФС сорбентом Strata C18-E из водных экстрактов зверобоя продырявленного	93
3.4.2	Концентрирование ФС сорбентами Strata X и Oasis HLB из водных экстрактов зверобоя продырявленного	98
3.4.2.1	Изучение процессов десорбции ФС зверобоя продырявленного с сорбентов на основе силикагеля и полимерных материалов	103
3.4.3	Концентрирование ФС последовательным пропусканием водного экстракта зверобоя продырявленного через сорбенты различной природы.....	105
3.4.4	Концентрирование ФС углеродными сорбентами из водных экстрактов зверобоя продырявленного	107
3.4.4.1	Возможность расширения круга идентифицируемых соединений при использовании углеродного сорбента для концентрирования ФС	116
3.4.5	Твердофазная экстракция флороглюцинолов и нафтодиантронов из водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного.....	119

3.4.6	Концентрирование кверцетина различными типами сорбентов	125
3.4.7	Твердофазная экстракция ФС из водных экстрактов ЛРС иных семейств	127
3.5	ГХ-МС определение ФС в водных экстрактах ЛРС с применением твердофазной аналитической дериватизации аналитов.....	130
3.5.1	Апробация методики ГХ-МС определения ФС на водных экстрактах эхинацеи пурпурной	143
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		145
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....		147
ПРИЛОЖЕНИЕ А		171
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....		173

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3,4-ДБК – 3,4-дигидроксибензойная кислота

БКА – биоканин А

БСТФА – N,O-Бис (триметилсилил) трифторацетамид

ВДКС – выходная динамическая кривая сорбции

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ГД – гиперозид

ГН – генистеин

ГХ-МС – газовая хроматомасс-спектрометрия

ДЗ – дайдзеин

ЖХ-ЭРИ-МС – жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием с электро-распылительной ионизацией

ИК – изокверцитрин

ИК – спектроскопия в инфракрасной области спектра

КФК – кофейная кислота

КФР – каftarовая кислота

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МАИ – смесь метанол : ацетонитрил : изопропиловый спирт (90:5:5, по объему)

МВИ – мощность микроволнового излучения

МИП – молекулярно-импринтированный полимер

МВЭ – микроволновая экстракция

НК – неохлорогеновая кислота

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии

ПГУ – пористый графитированный углерод

ПФ – подвижная фаза

РТ – рутин

СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция

ТМС – триметилсилильное производное

ТФЭ – твердофазная экстракция

УВЭЖХ – ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография

УФ – спектроскопия в ультрафиолетовой области спектра

ФН – формонетин

ФС – фенольные соединения / фитокомпонент фенольной природы

ХЛГ – хлорогеновая кислота

ЦК – цикориевая кислота

ЧТТ – число теоретических тарелок

ЭПК – эпикатехин

ЯМР – спектроскопия ядерно-магнитного резонанса

SIM – регистрация в режиме мониторинга выбранных ионов

TIC – регистрация ионов по полному ионному току

ВВЕДЕНИЕ

Контроль качества и стабильности лекарственного растительного материала (ЛРС) семейств Зверобойные (*Hypericaceae*), Астровые (*Asteraceae*) и Бобовые (*Fabaceae*), препаратов на их основе является важной аналитической задачей в химии растительных материалов и отраслях, использующих получаемые из растений химические вещества и материалы. В состав экстрактов этих растений и препаратов на их основе входят биологически активные вещества - фитокомпоненты фенольной природы (ФС), принадлежащие различным классам и обуславливающие фармакологическую активность лекарственного растительного сырья: фенольные кислоты, флавоноиды, нафтодиантроны, флороглюцинолы (Зверобойные), фенилпропаноиды (Астровые) и изофлавоноиды (Бобовые). Компонентный состав и концентрация ФС определяют ценность, качество лекарственных растений. Важным и малоизученным аспектом являются взаимосвязи содержания ФС в экстрактах ЛРС от места произрастания и морфологической части растения, используемой для их экстракции.

Для определения ФС согласно Фармакопее РФ в растениях семейств Зверобойные, Астровые и Бобовые применяют методы суммарного определения флавоноидов, фенольных кислот и фенилпропаноидов. С другой стороны, для объективной оценки фармакологической активности лекарственного растительного сырья, важно знать качественное и количественное содержание индивидуальных ФС, определяющих эти свойства.

Определение и идентификацию ФС в лекарственных растениях преимущественно осуществляют хроматографическими методами анализа (газовая и жидкостная хроматография) в совокупности с различными способами детектирования соединений (ИК, ЯМР, УФ и МС). Эти методы перспективны для определения фенольных соединений и идентификации ранее не установленных аналитов в составе лекарственных растений вышеперечисленных семейств. Лимитирующей стадией при хроматографическом определении ФС можно

считать экстракцию компонентов. В зависимости от способа экстракции ФС меняется качественный и количественный состав извлечений растений, что усложняет оценку компонентного состава экстрактов. В литературе встречаются разрозненные публикации, иллюстрирующие эффективность различных способов экстракции компонентов из лекарственного сырья, что показывает на целесообразность развития подобного рода исследований.

Цель диссертационной работы – идентификация и хроматографическое определение фитокомпонентов фенольной природы, обуславливающих биологическую активность некоторых лекарственных растений семейств Зверобойные (*Hypericaceae*), Астровые (*Asteraceae*) и Бобовые (*Fabaceae*) в водных и водно-спиртовых экстракционных системах.

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

- жидкостная экстракция обуславливающих биологическую активность ФС из лекарственных растений семейств Зверобойные (*Hypericaceae*), Астровые (*Asteraceae*) и Бобовые (*Fabaceae*);
- твердофазная экстракция ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов лекарственных растений сорбентами различной природы, расчет их основных характеристик по отношению к анализам;
- идентификация и определение ФС в исследуемых растительных материалах;
- разработка методик ГХ-МС определения ФС в водных экстрактах лекарственных растений;
- влияние географических и морфологических факторов на концентрацию ФС в экстрактах исследуемых лекарственных растений.

Научная новизна. Разработаны методики идентификации и хроматографического определения ФС в водных и водно-спиртовых экстрактах ЛРС семейств Зверобойные (зверобой продырявленный), Астровые (эхинацея пурпурная) и Бобовые (клевер луговой) в условиях различных способов их извлечения.

Получены основные сорбционные характеристики сорбентов различной природы для твердофазной экстракции ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов изученных лекарственных растений. Предложен показатель качества и подлинности растительного материала по составу экстрактов ЛРС семейства Астровые и препаратов на его основе.

Выявлена зависимость содержания ФС в ЛРС семейств Астровые и Бобовые от географических (высота их произрастания над уровнем морем) и морфологических (морфологическая часть растения) факторов.

Практическая значимость работы заключается в оптимизации условий извлечения ФС из ЛРС при их экстракции растворителем, ультразвуковой, микроволновой и субкритической экстракции, а также твердофазной экстракции с применением сорбентов различной природы. Установлены условия хроматографического определения и идентификации ФС в водных и водно-спиртовых экстрактах ЛРС и элюатах различного состава.

Положения, выносимые на защиту:

- условия извлечения ФС из эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L.), клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) и зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.);
- условия извлечения изофлавоноидов из различных морфологических частей *Trifolium pratense* L. и фенилпропаноидов из образцов *Echinacea purpurea* L. в зависимости от высоты их произрастания над уровнем моря;
- сорбционные характеристики материалов различной природы по отношению к ФС *Hypericum perforatum* L.;
- условия твердофазного извлечения и концентрирования ФС из экстрактов *Hypericum perforatum* L. с применением углеродных материалов;
- методика ГХ-МС определения ФС в водных экстрактах изученных лекарственных растений.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов исследований обусловлена значительным объемом экспериментальных данных,

научных положений и выводов, значимостью выборки анализируемого материала, использованием комплекса современных методов идентификации и определении ФС в экстрактах растений семейств *Hypericaceae*, *Asteraceae* и *Fabaceae* и статистической обработки полученных данных, согласованностью теоретически ожидаемых и экспериментально полученных данных.

Результаты диссертационной работы обсуждены на III – IV Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (Краснодар, 2017, 2020 гг.), V - VI Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2018, 2021 гг.), II – III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2015, 2019 гг.), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019 г.), IV Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (Улан-Удэ, 2020 г.), XXVII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020» (Москва, 2020), VI Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Ростов-на-Дону, 2021 г.), XII международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев 2021» (Санкт-Петербург, 2021 г.).

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-33-90045) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского госуниверситета.

1 Аналитический обзор

1.1 Фенольные соединения в составе лекарственного растительного сырья

Растительное сырье в своем составе содержит большое разнообразие фитокомпонентов, представленных различными фенольными соединениями. Фенольные соединения — химические вещества, обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях по отношению к определенным группам живых организмов (в первую очередь — по отношению к человеку, а также к растениям, животным, грибам и пр.) или отдельным группам их клеток. Биологическая активность данных веществ может рассматриваться как с точки зрения возможности их медицинского применения, так и с точки зрения поддержания нормальной жизнедеятельности человеческого организма, либо придания группе организмов особых свойств (таких, например, как повышенная устойчивость культурных растений к болезням) [1, 2].

В основу классификации фенольных соединений растительной природы положена химическая структура мономерных полиоксифенолов как основных составных частей и предшественников фенольных соединений [1]. Краткая классификация фитокомпонентов фенольной природы представлена на рисунке 1.

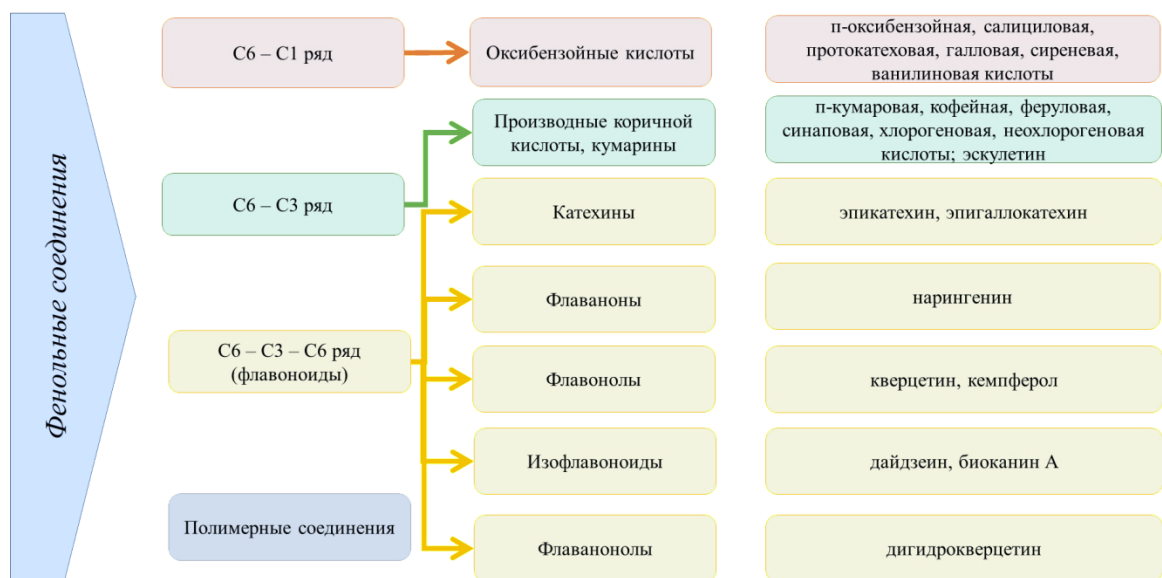


Рисунок 1 – Классификация фитокомпонентов фенольной природы

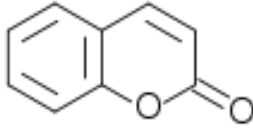
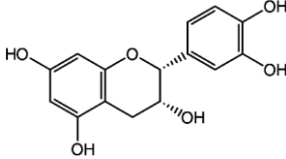
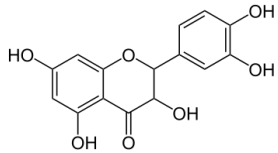
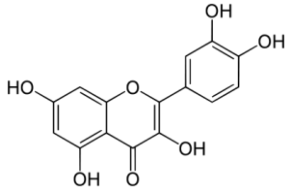
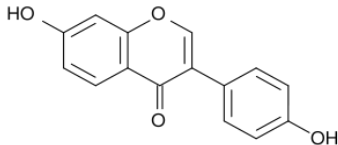
В общем случае фенольные соединения представлены двумя обширными группами – соединения мономерной и полимерной структуры. Соединения мономерной природы делятся на три подгруппы по структуре самих соединений. Простейшими фитокомпонентами принято считать соединения C_6-C_1 ряда, которые представлены различного рода оксибензойными кислотами. Далее, по мере увеличения биосинтетической последовательности идут соединения C_6-C_3 ряда, которые представлены производными коричной кислоты и кумаринами, включающие в себя ароматическое ядро и трехуглеродную боковую цепь. И более сложным путем образуются фенольные соединения $C_6-C_3-C_6$ – ряда (флавоноиды), состоящие из двух ароматических ядер, соединенных между собой трехуглеродным фрагментом. Почти все остальные фитокомпоненты фенольной природы (в том числе и полимерные) образуются из этих основных структур за счет протекающих вторичных реакций [1]. Наиболее распространенные соединения фенольной природы в растительном сырье приведены в таблице 1.

Препараты растительного происхождения представляют повышенный практический интерес, за счет мягкости терапевтического действия и низкой токсичности фенольных компонентов растений они могут применяться в течение длительного времени [3, 4]. Например, в состав зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) входят флавоноиды, производные антрахинона, оксикумарины, эфирные масла, жиры, аскорбиновая, никотиновая и оксикоричные кислоты, катехины, нафтодиантроны, флороглюцинолы и др. [5–7]. Перечисленные ценные фитокомпоненты обеспечивают его широкое применение в народной медицине при лечении гнойных ран, ожогов, заболеваниях печени, почек, пищеварительного тракта и т.д. Вяжущее и, в особенности, противовоспалительное действие травы зверобоя продырявленного прямо связано с наличием в его составе множества дубильных веществ. Они оказывают губительное действие на болезнетворные микробы, которые оказываются устойчивыми к традиционным антибиотикам.

Таблица 1 – Некоторые представители фитокомпонентов фенольной природы в ЛРС

Класс	Систематическое название	Номенклатура IUPAC	Строение	M _r , г/моль
Простейшие фенольные соединения	Пирокатехин	1,2-дигидроксибензол		110.1
	Гидрохинон	бензол-1,4-диол		110.0
Фенолкарбоновые кислоты	Протокатеховая кислота	3,4-дигидроксибензойная кислота		154.1
	Сиреневая кислота	4-гидрокси-3,5-диметоксибензойная кислота		198.2

Продолжение таблицы 1

Класс	Систематическое название	Номенклатура IUPAC	Строение	M _r , г/моль
Кумарины	Кумарин	2H-хромен-2он		146.1
Катехины	(-)-эпикатехин	(2R, 3S)-2-(3,4-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2H-хромен-3,5,7-триол		290.3
Флаванолы	Дигидрокверцетин	(2R,3R)-2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,4-тригидрокси-2,3-дигидрохромен-4-он		304.3
Флавонолы	Кверцетин	3,3',4',5,7 - пентагидроксифлавоон		302.2
Изофлавоноиды	Дайдзеин	7-гидрокси-3-(4-гидроксифенил)-хромен-4-он		254.2

Принадлежащие к семейству Астровые (*Asteraceae*) растения рода *Echinacea* характеризуются антибактериальными, антипролиферативными, противовирусными, ингибирующими и антиоксидантными свойствами [8–10]. Во многих случаях эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* L.) используется как травяная добавка для лечения многих заболеваний, включая облегчение боли при мигрени и беспокойствах, стимуляции заживления ран, укреплении иммунной системы и лечении симптомов инфекций дыхательных путей в капсулах, пилюлях, мазях, чаях и др. [8]. Основной формой применения эхинацеи пурпурной для фитотерапевтических целей являются водно-спиртовые экстракты, которые содержат фенилпропаноиды, проявляющие противовоспалительный, гипогликемический и умеренный антипролиферативный эффект [10–13]. В компонентный состав водно-спиртовых экстрактов эхинацеи пурпурной входят гидроксикоричные кислоты (кофейная и феруловая кислоты), их производные - хлорогеновая, кафтаровая и цикориевая кислоты, обуславливающие ее биологическую активность [14, 15]. Из числа фенилпропаноидов цикориевая кислота является доминирующим компонентом, которая, по мнению [16, 17], обуславливает иммуномодулирующую, фагоцитарную, противовирусную и противовоспалительную активность экстрактов и препаратов на основе эхинацеи пурпурной. Именно ее содержание используется в качестве маркера лекарственной активности препаратов на основе эхинацеи пурпурной [18]. Из производных кофейной кислоты по содержанию доминирует кафтаровая кислота [19], а из сопутствующих фенилпропаноидов - хлорогеновая кислота [16, 20]. Важную роль в формировании биологической активности эхинацеи пурпурной играют также входящие в ее компонентный состав фенольные соединения – флавоноиды [11]. Куркин и соавторы [21] отмечают наличие в эхинацее пурпурной рутина, никотифлорина, кверцетина и лютеолина.

Природные аналоги эстрогенов – изофлавоноиды, чаще всего накапливаются в лекарственных растениях семейства Бобовые (*Fabaceae*), яркими представителями которого являются клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) и донник лекарственный (*Melilotus officinalis* L.) [22–24]. Доказано, что

содержащиеся в клевере луговом формонетин и биоканин А проявляют противовоспалительное, антиоксидантное и нейропротекторное действие [25–28]. Появляется все больше доказательств того, что содержащиеся в клевере луговом фитоэстрогены играют большую роль в профилактике связанных с эстрогеном видов рака (рак молочной железы, рак предстательной железы и т. д.), а также в некоторых положительных эффектах в отношении симптомов постменопаузы, остеопороза и сердечно-сосудистых заболеваний [29]. Фитоэстрогены широко применяются в качестве альтернативной заместительной гормональной терапии и заместительной терапии эстрогенами из-за их нежелательных побочных эффектов [24, 30, 31].

1.2 Экстракция ФС из ЛРС

Лимитирующей стадией при изучении качественного и количественного состава фенольных соединений в растительном сырье является экстракция – одна из важнейших стадий анализа ЛРС [32–35]. Несмотря на то, что разработано огромное количество способов экстракции фенольных соединений из ЛРС, их поиск и оптимизация продолжается до сих пор.

Способы экстракции фенольных соединений условно разделяют на традиционные и нетрадиционные или, говоря иначе, современные [32, 33, 36]. Традиционные способы, как правило, требуют использования токсичных растворителей в большом количестве, длительного перемешивания (например, мацерация) и высокой температуры, что негативно сказывается на термолабильных соединениях.

Одним из классических способов экстракции фенольных соединений является экстракция в аппарате Сокслета. Данный подход заключается в многократном непрерывном экстрагировании растительного сырья, что обеспечивается постоянной подачей свежего растворителя (зачастую в роли экстрагента выступает вода или водно-спиртовые смеси различного состава).

Благодаря этому сохраняется наибольшая разница между концентрациями анализируемых веществ в клеточном растворе и в растворителе, что приводит к полному экстрагированию растительного материала. В качестве экстрагентов в данном способе используют растворители различной полярности в индивидуальном виде или последовательно [35, 37]. Тем не менее, основным недостатком данного способа является его трудоемкость и продолжительность [38–41].

В Государственной Фармакопее РФ в качестве основного способа извлечения фенольных соединений различных классов из растительных матриц используется кипячение на водяной бане с обратным холодильником [42]. В зависимости от изучаемого растения применяют разнообразные соотношения водно-спиртовых смесей. Так, для извлечения фенольных соединений из зверобоя продырявленного предполагается нагревание колбы с сырьем в течение 1,5 ч с 50%-ным раствором этилового спирта. При этом каждые 30 мин необходимо отбирать полученный экстракт и обновлять экстрагент [42]. Группа исследователей [43] экстрагировала растительное сырье для извлечения фенольных веществ этиловым спиртом различной концентрации (30, 50, 80 и 90%) при кратности экстракции, равной 3, в течение 60 минут и соотношении «сырье–экстрагент» 1:10 с дальнейшей отгонкой и объединением водных извлечений. Температура экстракции составила 60-65°C, а выход компонентов достиг 95%.

Способ экстракции фенольных соединений, прописанный в Фармакопее РФ, считается самым эффективным в отношении того или иного растительного материала за счет его многостадийности. Результаты, полученные согласно прописанным в Фармакопее методикам, сравнивают с экспериментальными данными, полученными иными способами. Тем не менее, данные методики также не лишены недостатков. Так, прописанные в Фармакопее РФ способы экстракции не учитывают особенностей извлечения индивидуальных аналитов, так как предполагается суммарное определение соединений, принадлежащих к одному классу, например, для травы зверобоя продырявленного – это суммарное

определение флавоноидов в пересчете на рутин, для эхинацеи пурпурной – определение суммарного содержания фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту [42].

Для интенсификации процесса экстракции компонентов, а также учета их индивидуальных особенностей, в последние десятилетия предложены и применяют такие альтернативные способы извлечения ФС, как экстракция при повышенном давлении, сверхкритическая флюидная, ультразвуковая, микроволновая экстракция и др. [32, 33, 35, 37, 44, 45]. Многие из этих способов разработаны для получения более точных и воспроизводимых результатов по установлению компонентного состава растительных материалов, особенно, в сочетании с гибридными методами анализа (например, газовая и / или жидкостная хроматомасс-спектрометрия).

1.2.1 Твердофазная экстракция ФС из экстрактов ЛРС

Экстракция активных компонентов из ЛРС является важной стадией химического анализа, лимитирующей аналитический цикл. На данном этапе возможны очистка экстрактов растительного материала от мешающих компонентов, концентрирование целевых соединений, а также перевод их в аналитическую форму [46]. С этими задачами достаточно успешно справляется твердофазная экстракция (ТФЭ), использование которой эффективно при извлечении биологически активных компонентов из сложной растительной матрицы. В настоящее время для ТФЭ фенольных веществ используются такие сорбционные материалы, как химически модифицированный силикагель [47–52], полимерные материалы [49, 53–58], молекулярно-импринтированные [59] и ионообменные сорбенты [60–62]. Примеры использования различных сорбентов для извлечения ФС из ЛРС представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Примеры ТФЭ фенольных соединений из ЛРС с использованием сорбентов различной природы

Аналиты	Тип сорбента	Элюирование	Метод определения	R, %	Ссылка
3,4-дигидроксibenзойная, кофейная и хлорогеновая кислоты	BakerBond C18	вода-метанол (70:30,v/v)	ОФ-ВЭЖХ	-	[48]
	BakerBond quaternary amine N+	0.2 М фосфорная кислота - метанол (1:1,v/v)	ОФ-ВЭЖХ	97-102	[47]
	Oasis HLB	метанол–вода, pH 2.5 (80:20;v/v)	ВЭЖХ	88-99	[55]
	МИП	метанол-уксусная кислота (9:1;v/v)	ВЭЖХ	77	[59]
	BakerBond quaternary amine N+	0.2 М фосфорная кислота - метанол (1:1;v/v)	ОФ-ВЭЖХ	98.5 ± 0.5	[50]
			ОФ-ВЭЖХ	-	[52]
	C18	10% метанол	ОФ-ВЭЖХ	87	[63]
Oasis HLB	метанол	ВЭЖХ	-	[58]	
(-)-эпикатехин	Waters C18	16%-ый ацетонитрил (pH 2), этилацетат	ВЭЖХ	-	[64]
	C18 LiChrolut	метанол-1% уксусная кислота (90:10, v/v)	ВЭЖХ	85 ± 5	[54]
	Oasis HLB			70 ± 2	
	Bond Elut Plexa	метанол	УВЭЖХ	55.8	[65]
рутин	Bond Elut Plexa	метанол	УВЭЖХ	92.4	[65]
	Strata-X	метанол	ВЭЖХ	-	[53]
	C18 LiChrolut	метанол-1% уксусная кислота (90:10, v/v)	ВЭЖХ	94 ± 5	[54]
	Oasis HLB			60 ± 6	
	Waters C18	16%-ый ацетонитрил (pH 2), этилацетат	ВЭЖХ	-	[64]
	кверцетин	Strata-X	метанол	ВЭЖХ	-
Oasis MAX		метанол + 2% муравьиная кислота	ВЭЖХ	86 ± 3	[61]
кверцитрин	Bond Elut Plexa	метанол	УВЭЖХ	95.7	[65]
изокверцитрин	Bakerbond C18	80% метанол	ВЭЖХ	102.9	[51]

Примечание. «-» – нет данных; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии; УВЭЖХ – ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография; R – степень извлечения

Химически модифицированный силикагель с привитыми октадецильными группами используют, в основном, для очистки полученных экстрактов без концентрирования целевых соединений [48, 63, 64, 66]. В отличие от сорбентов с привитыми октадецильными группами полимерные материалы чаще применяются для целей концентрирования фенолкарбоновых кислот и флавоноидов [56]. На сегодняшний день материалы на основе графитированного углерода практически не используются для сорбции фенольных компонентов растительного происхождения [53, 56]. Однако, учитывая структуру и свойства углеродного сорбента [65, 67], представляет несомненный интерес проведение исследований, направленных на установление возможности концентрирования аналитов фенольного происхождения с использованием данного материала.

Перспективными материалами для ТФЭ могут быть активные угли – пиролитические угли, обладающие высокой удельной поверхностью из-за их большого микропористого объема. Такая поверхность гетерогенна, богата окисленными функциональными группами (хиноны, лактоны). Данные характеристики материала могут быть полезны при проведении ТФЭ, но непригодны при использовании для ВЭЖХ в качестве стационарной фазы [68]. С другой стороны, загрязнение поверхности углеродных материалов кислородными комплексами, схожими по структуре с гидрохиноном, хинонами и хроменами, которые достаточно сильно могут взаимодействовать с другими соединениями, создает затруднения десорбции компонентов привычными для ТФЭ растворителями [67].

В качестве сорбента для ТФЭ также используют графитированную сажу (например, Supelclean ENVI-Carb), которую получают путем термической обработки [68, 69]. Интерес к данному материалу возрос после демонстрации его способности извлекать достаточно полярные соединения [67]. Данный тип материалов нашел широкое применение при извлечении более 200 пестицидов из различных матриц, включая почву, воду, фрукты и овощи [70–72], при

извлечении хлорсодержащих инсектицидов, а также умеренно полярных соединений, таких как триазины и феноксикислоты [67].

Пористый графитированный углерод (ПГУ) был получен Ноксом и Гилбертом в 1979 г. путем пропитки силикагеля смесью фенолформальдегида, которая полимеризуется в порах силикагеля и затем карбонизируется при 1000°C [67]. Затем диоксид кремния удаляют растворением в 5М растворе гидроксида натрия. Графитизацию проводят в температурном диапазоне 2000-2800°C для удаления микропор [67]. Полученный макропористый материал показал хорошую механическую прочность и хроматографическую эффективность [68]. Вследствие иммобилизации графита на кремниевую структуру, ПГУ является более стабильным по сравнению с графитированной сажей. Данный сорбционный материал крайне нереакционноспособен. Его химическая стабильность в широком диапазоне рН позволяет разделять соединения как с кислотными, так и с основными свойствами [73, 74]. Механизм удерживания на ПГУ отличается от механизмов, присущих силикагелю с привитыми на поверхности группами. Помимо гидрофобного взаимодействия также реализуется полярное взаимодействие аналит-фаза. Так, установлено, что удерживание на ПГУ тем выше, чем большее число полярных групп присутствует в структуре аналита [75–77].

Авторы [78, 79] использовали эти материалы в качестве сорбентов для извлечения полициклических ароматических углеводородов и пестицидов из объектов окружающей среды. Стеклоуглеродные электроды, модифицированные многослойными углеродными нанотрубками, применяли также для вольтамперометрического определения кверцетина в экстрактах ЛРС [80].

Углеродные материалы активно используются в качестве стационарной фазы для хроматографических колонок. Так, группой авторов [81] показана возможность применения хроматографической колонки, заполненной ПГУ – Hypercarb Porous Graphitic Carbon (Hypersil) для ВЭЖХ-разделения ванилина, протокатеховой, галловой, п-кумаровой, сиреневой и кофейной кислот при

комнатной температуре с использованием градиентного режима элюирования смесью метанол:ацетонитрил:0.2 М муравьиная кислота (40:40:20, v:v:v) – тетрагидрофуран. Применение тетрагидрофурана позволило получить воспроизводимые результаты определения соединений на углеродной колонке. При его отсутствии некоторые соединения необратимо сорбировались на материале колонки и элюировались не полностью, что приводило к дальнейшему искажению результата.

Углеродные сорбенты на данный момент используются в основном для извлечения летучих компонентов из воздуха, а также извлечения фенолов из природных вод [67, 82]. В то время как для ФС, содержащихся в растительных образцах, поведение углеродных материалов мало изучено или не изучалось вовсе [82].

Интересно проведение сопоставления различных сорбционных материалов в отношении одного класса соединения или типа растительного сырья. Так, например, в работе [83] продемонстрировано сравнение различных типов сорбентов для очистки экстракта клевера. Сопоставление сорбентов проводили на основе полученной степени извлечения изофлавоноидов (куместрола, дайдзеина, генистеина и биоканина А) и флавоноидов (кампферола, апигенина). Исследователи применили сорбенты на основе октадецилсиликагеля DSC-18LT, Zorbax SPE C18, SPEC-C18AR и SPE-ED C18, полимерные сорбенты Strata X и Oasis HLB, а также сорбент SPE-ED Amide. Авторами показано, что наиболее эффективными для извлечения изофлавоноидов являются полимерные сорбенты ($R \geq 90 \%$), что объясняется природой исследуемых веществ, в то время как сорбенты на основе октадецилсиликагеля показали низкие степени извлечения соединений ($R \leq 20 \%$).

Достаточно оригинален подход к ТФЭ фитоэстрогенов в работе Visnevschi-Necrasov с соавторами [84]. Для ТФЭ смешивали 0.5 г сырья клевера с 2 г сорбента HLB или C18, затем полученную смесь измельчали в стеклянной ступке и “набивали” колонку. Элюирование компонентов проводили двукратно 5 мл

смеси дихлорметана и метанола (25:75). В результате установлено, что сорбент С18, по мнению авторов статьи, является более предпочтительным сорбентом для ТФЭ фитоэстрогенов, так как обеспечил степень извлечения компонентов 45-121%.

Перед непосредственной десорбцией аналитов при твердофазной экстракции часто включают стадию промывки картриджей для очистки целевых компонентов от нежелательных компонентов их сорбцией на материал сорбента или, наоборот, для элиминации в раствор. Однако, во время данной стадии не исключена частичная или даже полная потеря некоторых классов фенольных соединений, например, фенольных кислот. Для определения дайдзеина, генистеина, формонетина и биоканина А в клевере и других травах как раз использовали данный способ [85]. Извлечение аналитов и очистку экстрактов проводили с помощью сорбентов С18, С8, Amide 2, RP 105, АВN, HLB. Сырье экстрагировали 80%-ным этанолом с добавлением воды и соляной кислоты. Сорбенты С18, С8, HLB и Amide 2 промывали 10%-ным метанолом, а RP 105, АВN и Oasis HLB – 5%-ным раствором метанола. Целевые аналиты элюировали 3 мл 80%-го метанола, после чего элюат упаривали и перерастворяли в ПФ перед хроматографическим анализом. Данный подход позволил увеличить чувствительность метода анализа и показал высокую эффективность извлечения аналитов АВN ($R \geq 98\%$).

Немаловажной задачей при проведении ТФЭ является десорбция фенольных кислот, изофлавоноидов, флавоноидов и их гликозидов с сорбента элюентами для обеспечения приемлемой степени их извлечения. Для этих целей используют спирты, чаще всего метанол [53, 86], а для смыва фенолкарбоновых и коричных кислот – водно-спиртовые смеси различного состава [48, 55, 63] и смесь 0.2 М фосфорной кислоты с метанолом [47, 50, 52, 66]. Авторами работ отмечена сложность элюирования определенных групп фенольных соединений и возможность необратимой адсорбции компонентов при использовании материалов данного типа [87].

Оценить возможность и целесообразность применения того или иного сорбционного материала для ТФЭ целевых групп соединений возможно путем получения и дальнейшего сравнения их сорбционных характеристик. Однако как видно из таблицы 2, для извлечения фенольных компонентов из экстрактов ЛРС без концентрирования соединений в подавляющем числе случаев используют только один тип сорбента.

Таким образом, анализ литературы показал перспективность исследований, направленных на получение и изучение сорбционных характеристик материалов по отношению к ФС, содержащимся в экстрактах одного типа растительного сырья.

1.2.1.1 Сорбционные характеристики материалов для твердофазной экстракции ФС

Главными характеристиками для оценки применимости того или иного типа сорбента для извлечения целевых соединений являются объемы «до проскока» и сорбционная емкость данного материала. График зависимости концентрации аналита в элюате от объема жидкого образца, пропускаемого через картридж, называется выходной динамической кривой сорбции, кривой сорбции или кривой «проскока» (ВДКС). Эта кривая имеет характерную S-образную, сигмообразную форму с более или менее резким подъемом концентрации аналита в области насыщения им сорбирующего картриджа (рисунок 2).

Объем «до проскока» является одним из важнейших параметров при ТФЭ, характеризующий максимальный объем пробы, который может быть предварительно сконцентрирован на сорбенте без потерь конкретного аналита. Объемом «до проскока» принято считать тот объем пропускаемого образца, при котором концентрация целевого аналита в элюате достигает 10% от его концентрации в исходном растворе [88].

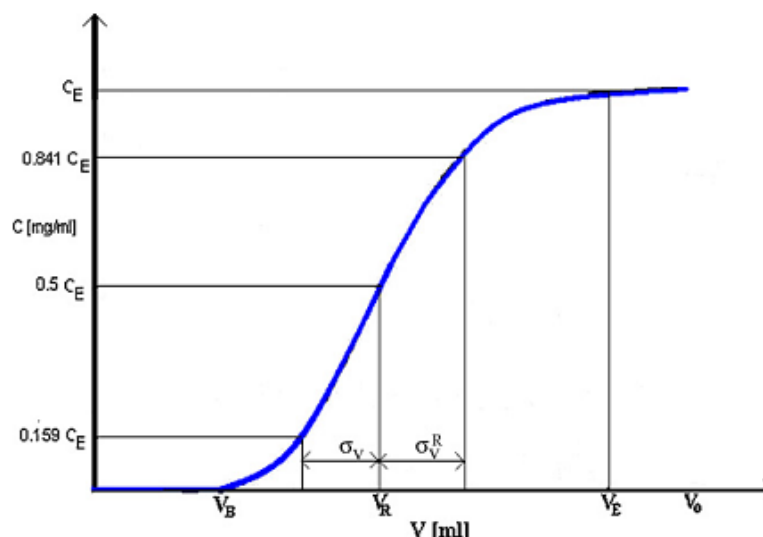


Рисунок 2 – Общий вид выходной динамической кривой сорбции

Сорбционная емкость концентрационных материалов тесно связана с объемом «до проскока» и фактически это суммарное количество компонентов матрицы образца (сырья), поглощенное к моменту проскока аналита. Количественно выразить сорбционную емкость, в соответствии с данным определением, достаточно трудно, так как образец содержит множество различных мешающих компонентов матрицы в различном диапазоне концентраций. Данный факт привел к тому, что понятие сорбционной емкости применяется редко и ее оценка носит исключительно качественный характер. Затруднения в количественном определении емкости можно избежать, оценивая емкость концентрирующих материалов в динамике (динамическая емкость сорбента), которая математически представляет собой площадь под динамической кривой сорбции каждого из компонентов. Динамическая емкость сорбентов служит критерием для сравнения эффективности различных концентрирующих материалов, так как позволяет учитывать разницу в массах сорбентов, что важно, например, при использовании коммерчески доступных концентрирующих патронов [88]. Зная концентрации главных компонентов растительной матрицы и емкость используемого сорбционного материала, можно оценить максимальный

объем жидкого образца, из которого возможно провести концентрирование аналитов без значительных потерь.

В ходе выполнения работ исследователи строят сорбционные зависимости изначально на модельных растворах, содержащих примерно равное количество аналитов в ЛРС (по концентрации). Однако когда дело доходит до реального образца, выясняется, что наблюдаемые значения объемов «до проскока» значительно отличаются от значений, полученных на модельных растворах, что обуславливается конкурирующей сорбцией соединений. Таким образом, расчеты всех сорбционных характеристик целесообразно проводить на реальном объекте, т.е. в присутствии растительной матрицы с целью учета конкурирующих сорбционных процессов [88].

Для упрощения расчета данных параметров авторы работы [89] предложили использовать математический подход, основанный на интерпретации полученной выходной динамической кривой сорбции. Формулы расчета позволяют рассчитывать такие показатели как объем «до проскока» (формула 1), объем удерживания (формула 2), объем равновесный (формула 3), число теоретических тарелок (формула 4) и динамическая емкость сорбента (формула 5). Формулы 6 и 7 используют в качестве вспомогательных при расчетах.

$$V_B = V_R - 2\sigma_V, \quad (1)$$

$$V_R = V_{0,5\text{CE}}, \quad (2)$$

$$V_E = V_R + 2\sigma_V^*, \quad (3)$$

$$N = \frac{V_R * (V_R - \sigma_V)}{\sigma_V^2}, \quad (4)$$

$$DE = \frac{C_0 * V_B}{m * 1000}, \quad (5)$$

$$\sigma_V = V_R - V_{0,159}, \quad (6)$$

$$\sigma V' = V_{0,841} - V_R, \quad (7)$$

где V_B - объем «до проскока», мл;
 V_R - объем удерживания, мл;
 V_E - объем равновесный, мл;
 $V_{0,5 \text{ сЕ}}$ - объем, соответствующий половине исходной концентрации соединения, мл;
 N - число теоретических тарелок;
 DE - динамическая емкость сорбента, моль/г;
 C_0 - концентрация аналита в исходном растворе (экстракте), моль/л;
 m - масса сухого сорбента, г.

В литературе практически отсутствуют подобного рода исследования, несмотря на то, что данные характеристики позволяют сравнивать сорбенты между собой относительно изучаемых классов соединений, что, перспективно и вызывает научный интерес.

Так, например, группа исследователей [90] показала возможность расчета сорбционных характеристик (объем удерживания, объем «до проскока», равновесный объем) материала по отношению к эллаговой кислоте (стандартный раствор 100 мг/мл). В качестве сорбента использовали модифицированный биоугль из лимонного сорго (*Cymbopogon flexuosus* L.). Установлено, что объем «до проскока» эллаговой кислоты на данном сорбенте составляет 6 мл, объем удерживания – 22 мл, а равновесный объем – 82 мл.

Из анализа литературных данных выявили, что в большинстве работ используют один тип сорбента для извлечения фенольных компонентов из экстрактов лекарственного растительного сырья [48, 53, 55, 58], а сравнение эффективности сорбентов различного состава по отношению к одному виду ЛРС практически не проводится. Данный пробел может быть устранен путем получения и сравнения основных сорбционных характеристик концентрирующих материалов относительно конкретных целевых веществ на фоне других компонентов комплексного состава образца.

1.2.2 Экстракция ФС из зверобоя продырявленного

Большое число работ посвящено различным способам экстракции фенольных соединений из зверобоя [5, 38, 91–98]. Однако в них практически отсутствует сравнение способов относительно друг друга по отношению к одному виду растительного сырья (зверобоя). Исследователями отмечается эффективность применения как традиционных способов извлечения компонентов (мацерация, кипячение на водяной бане, экстракция в аппарате Сокслета), так и современных способов (ультразвуковая, микроволновая, сверхкритическая, субкритическая экстракция).

Традиционным способом извлечения считается подход, представленный в Фармакопее РФ [42]. Согласно нему, навеску зверобоя продырявленного помещают в колбу со шлифом и доливают 50% раствор этилового спирта. Затем подсоединяют к обратному холодильнику и кипятят на водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая содержимое колбы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр и обновляют экстрагент. Экстракцию повторяют еще дважды, после чего раствор используют для спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин. Данный способ считается общепринятым и обеспечивает высокий выход компонентов, но в то же время, достаточно длителен по времени и не обеспечивает селективного извлечения фитокомпонентов.

Мирзорахимовым К.К. [99] предложены оптимальные условия извлечения ФС (флавоноидов, производных катехинов) из сырья травы зверобоя этиловым спиртом, водно-спиртовым раствором, а также водой. Получены наглядные таблицы и графики, из которых видно, что увеличение соотношения сырьё:растворитель влечет к повышению эффективности экстракции, но начиная с соотношения (1:3), она остается практически постоянной. Качественный анализ фенольных веществ в составе полученных экстрактов осуществляли на основе качественных реакций и данных ИК- и УФ-спектров.

Распространенным способом экстракции ФС является микроволновая экстракция. Данный способ позволяет значительно уменьшить расход органических растворителей по сравнению с традиционными способами извлечения, при этом обеспечивая быстрый нагрев растворителя за счет непосредственного воздействия на него микроволновой энергии. Среди параметров, изучаемых при оптимизации программы извлечения фитокомпонентов, выделяют состав экстрагирующего растворителя, его объем и температуру процесса извлечения [100].

В качестве экстрагента для МВЭ также возможно использование смеси воды с соляной кислотой. Так, в работе авторов [101] показана эффективность применения кислотного гидролиза в сочетании с микроволновой экстракцией для извлечения фенольных кислот из зверобоя продырявленного. Выявлено, что оптимальными условиями извлечения является проведение экстракции при мощности микроволнового излучения (МВИ) 500 Вт, температуре 70°C в течение 20 минут, используя в качестве экстрагента воду с добавлением 2 М HCl.

Милевской В.В. с соавторами [102] проведена оптимизация микроволнового извлечения фитокомпонентов фенольной природы из зверобоя продырявленного. Установлено, что наилучшего извлечения аналитов удастся достичь при осуществлении процесса в течение 30 минут при температуре 75°C и МВИ 300 Вт с использованием в качестве экстрагента 70%-го этилового спирта. Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными традиционной Фармакопейной методикой.

Как известно, одними из ценнейших ФС зверобоя продырявленного являются нафтодиантроны и флороглюцинолы [5, 38, 103, 104]. Их извлечение может вызывать некоторые трудности, так как они извлекаются только в водно-спиртовую среду и достаточно быстро деградируют на свету. Отмечаются работы, в которых данные представители извлекают водой в условиях повышенных температур и давлении [98, 105], но при этом не исключена деградация указанных компонентов.

Пунеговым В. и др. [106] изучены условия микроволнового извлечения нафтодиантронов (гиперицина и псевдогиперицина) из зверобоя продырявленного. Установлено, что их максимальное извлечение достигается при применении в качестве экстрагентов 55%-го этанола или пропанола-2 при удельной МВИ 0.0205 Вт/См^3 , частоте 2450 МГц и продолжительности воздействия МВИ 60 с. В качестве источника микроволнового излучения была использована бытовая микроволновая печь.

Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) углекислым газом считается наиболее подходящим методом извлечения фитокомпонентов благодаря простоте автоматизации процесса, безопасности, не токсичности и не канцерогенности экстрагента и так далее [107]. Не исключается возможность применения СФЭ для извлечения гиперфорина и адгиперфорина. Группой ученых [108] отмечено, что жидкий CO_2 является для этих веществ селективным растворителем, а добавление в экстракционную систему этанола хоть и увеличивало выход компонентов, но при этом разбавлял концентрацию гиперфоринов.

1.2.3 Экстракция ФС из эхинацеи пурпурной

Основной формой применения эхинацеи пурпурной для фитотерапевтических целей являются водно-спиртовые экстракты, содержащие фенилпропаноиды [10–13], традиционно получаемые мацерацией [109, 110] или кипячением в аппарате Сокслета [13]. Данные способы регламентированы нормативной документацией [42, 111], но являются достаточно времязатратными, что требует разработки более экспрессных альтернативных способов экстракции.

Регламентируемый в Фармакопее РФ способ относительно эхинацеи пурпурной достаточно специфичен [42]. Аналитическую навеску сырья помещают в коническую колбу, добавляя щавелевую кислоту, остеклованный магнитный стержень и 95% этиловый спирт. Затем данную смесь присоединяют к

обратному холодильнику и кипятят на магнитной мешалке в течение 45 минут. Полученный экстракт используют для тонкослойной хроматографии. Отмеченные участки на хроматограммах вырезают и растворяют в 0.1 М HCl. Полученный раствор используют для спектрофотометрического определения суммарного содержания фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту.

В качестве альтернативных способов получения экстрактов эхинацеи пурпурной в литературе представлены микроволновая [112, 113], ультразвуковая [114] и сверхкритическая флюидная экстракция [115, 116], экстракция в условиях повышенной температуры и давления [18, 116], которые интенсифицируют подготовку образца.

Так, например, использование для извлечения фитокомпонентов из эхинацеи пурпурной микроволновой экстракции позволило авторам работы [113] суммарно извлечь 24.1 мг/г фенолов в пересчете на галловую кислоту и 7.4 мг/г флавоноидов в пересчете на кверцетин. Но, как отмечают авторы данной статьи, суммарное содержание фенолов оказалось ниже результата, полученного с помощью настаивания. В качестве экстрагента в обоих случаях использовали воду.

Наиболее перспективно использование в качестве экстрагента водно-спиртовых смесей различного состава [18, 112–118]. Авторы работы [117] показали зависимость содержания основных фитокомпонентов эхинацеи от процентного содержания метанола в экстрагирующей смеси. Показано, что использование водно-спиртовых смесей с объемным содержанием спирта 70 – 90% является предпочтительным и обеспечивает наибольший выход компонентов. Подобное исследование проводили авторы работы [114], которые показали, что эффективность извлечения цикориевой кислоты 50%-ным этанолом сопоставима с 75%-ным метанолом. При этом оптимальными условиями извлечения цикориевой кислоты является использование УЗЭ водно-этанольной смесью с объемной долей этилового спирта 50% в течение 10 минут, результат

которой превосходит более чем в два раза данные, полученные классической мацерацией.

Перспективность использования для извлечения из различных растительных матриц фенольных соединений субкритических (*докритических*) систем подтверждается увеличивающимся количеством подобных работ. Например, в работе [18] удачно сравнены различные способы извлечения, в том числе субкритическая экстракция водой и водно-спиртовыми смесями. Авторами показано, что применение экологичной субкритической экстракции водой не уступает по эффективности извлечения традиционным способам, а в некоторых случаях даже превосходит их. При этом значительно сокращается время экстракции и расход растительного материала и растворителей. Так, оптимальными условиями извлечения являются: температура - 180°C, растворитель - 10%-ный этанол, скорость потока экстрагента – 0.5 мл/мин, масса сырья – 0.1 г, время экстракции - 30 мин, давление в системе - 80–100 атм.

Несмотря на многообразие различных способов экстракции фитокомпонентов из эхинацеи пурпурной, сравнение их эффективности в отношении одного вида сырья встречается крайне редко или представлено сравнением суммарного содержания компонентов. Так, в работе [116] экстракцию фенольных веществ проводили сверхкритическим углекислым газом, субкритической экстракцией водой, микроволновой экстракцией и экстракцией в аппарате Сокслета. Установлено, что максимальное суммарное содержание фенольных веществ (62.58 мг/г) достигалось при экстракции в аппарате Сокслета с использованием метанола в качестве растворителя.

1.2.4 Экстракция ФС из клевера лугового

Распространенным способом извлечения фитокомпонентов фенольной природы (изофлавоноидов) из ЛРС является кипячение с обратным

холодильником при использовании в качестве экстрагента водно-спиртовых смесей различного состава [119, 120]. Для извлечения ФС отмечается преимущество использования экстракции в аппарате Соклетта с использованием метанола в качестве экстрагента [83]. При необходимости перевода гликозидных форм в агликоны, проводят кислотный гидролиз, добавляя в экстрагирующую смесь трифторуксусную [121–123] или соляную кислоты [124–126].

Чаще извлечение изофлавоноидов из клевера лугового проводят жидкостной экстракцией с различными видами физического воздействия (таблица 3). При этом в качестве растворителей обычно используют водно-спиртовые смеси различного состава [127–129]. Наличие полярных групп в составе изофлавоноидов позволяет эффективно использовать микроволновое излучение для их экстракции. Так, воздействие микроволнового излучения мощностью 500 Вт в течение 20 секунд позволило максимально извлечь изофлавоноид мангиферин (41.1 мкг/мл) [130]. Исходя из этого можно сделать вывод, что микроволновая экстракция позволяет извлекать соединения с высокой эффективностью при этом значительно сократив время экстрагирования.

Ультразвуковая экстракция изофлавоноидов является модификацией экстракции растворителем. Экстракция в данном случае связана с явлением кавитации, возникающей в растворителе при прохождении ультразвуковых волн. При этом образуются и сжимаются кавитационные пузырьки. Повышение давления и температуры, вызванное сжатием, приводит к схлопыванию пузырьков и образованию высокоскоростных струй. Данные струи растворителя «просверливают» растительную стенку и позволяют увеличить массоперенос из матрицы сырья в растворитель.

Таблица 3 – Способы извлечения и данные по месту, времени сбора образцов и содержанию изофлавоноидов из различных частей клевера лугового

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	Содержание, мг/г				Ссылка
				ДЗ	ГН	ФН	БКА	
Листья	УЗЭ, MeOH:вода:ацетон 40:32:28 + 0.05% ТФУ	УВЭЖХ- МС	декабрь 2015 (Лето в Южном полушарии); Порту-Алегри, Бразилия	н.о.	н.о.	12.689	1.832	[121]
			май 2015 (Осень в Южном полушарии); Порту-Алегри, Бразилия	0.368	0.198	15.407	0.763	
	ЖЭ, 50% EtOH+2н. HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.786	0.452	1.51	-	[126]
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	0.490	0.276	2.930	6.958	[127]
			стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	0.639	0.110	1.934	1.372	
	ЖЭ, 80% MeOH + ТФУ, перерастворение в ДМСО, 80°C, рефлюксная система	ВЭЖХ-ДМД	образцы от компании Мелброзин, Вена, Австрия	0.11	0.10	2.04	2.89	[122]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	ранняя стадия бутонизации; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.42	0.54	10.58	6.81	[128]
			поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.08	0.07	12.72	11.63	
	УЗ+ЖЭ, 80% MeOH+2М HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.11	0.64	5.77	5.76	[124]
MSPD, C18, дихлорметан:метанол (25:75)	ВЭЖХ-ДМД	февраль - июнь; опытный участок Аграрной станции Вайрао в Университете Порту, Португалия	0.0017	0.0095	0.2912	0.3248	[84]	

Продолжение таблицы 3

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	Содержание, мг/г				Ссылка
				ДЗ	ГН	ФН	БКА	
Стебли	УЗ+ЖЭ, 80% MeOH+2M HCl, на бане 80–85°C	УВЭЖХ-ДМД	стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.13	0.48	1.76	0.56	[124]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	ранняя стадия бутонизации; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.29	0.36	15.49	3.79	[128]
			поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	0.62	0.24	8.64	1.81	
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	1.291	0.104	н.о.	н.о.	[127]
			стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	2.630	0.199	0.319	0.158	
	ЖЭ, выдерживание последовательно в деион. воде, 100% и 70% EtOH	ВЭЖХ-ДМД	июнь-октябрь; полевая станция Фармакогнозии Университета Иллинойса, Даунерс-Гроув, Иллинойс, США	0.13–0.33	0.14–0.68	2.1–5.9	0.7–3.3	[129]
ЖЭ, 50% EtOH+2н. HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.947	0.181	2.19	-	[126]	
Цветы	УЗ+ЖЭ, 80% MeOH+2M HCl, на бане 80-85°C	УВЭЖХ-ДМД	стадия цветения; Институт сельского хозяйства Литовского исследовательского центра сельского и лесного хозяйства, Центральная низменность Литвы	0.001	0.11	0.52	0.78	[124]
	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	н.о.	0.025	0.893	0.192	[127]
	ЖЭ, 70% MeOH	ВЭЖХ-ДМД-МС	поздняя стадия цветения; Исследовательский центр (Шарлоттаун, ПЕЙ, Канада)	н.о.	0.11	0.88	0.98	[128]
	ЖЭ, выдерживание последовательно в деион. воде, 100% и 70% EtOH	ВЭЖХ-ДМД	июнь-октябрь; полевая станция Фармакогнозии Университета Иллинойса, Даунерс-Гроув, Иллинойс, США	0.025–0.079	0.18–0.19	0.47–1.2	0.70–1.4	[129]
	ЖЭ, 50% EtOH+2н. HCl, 40°C	ВЭЖХ-УФ	стадия цветения; опытное поле Института сельского хозяйства, Кедайняйский район, Литва	0.324	0.231	1.66	-	[126]

Продолжение таблицы 3

Объект	Условия извлечения	Метод анализа	Место и время сбора	Содержание, мг/г				Ссылка
				ДЗ	ГН	ФН	БКА	
Цветы	ЖЭ+УЗ, 80% MeOH + 2M HCl, 80°C	ВЭЖХ-ДМД	стадия цветения; экспериментальные сады Университета Анкары, биологического факультета и факультета естественных наук	н.о.	0.020	0.249	0.072	[125]
Корни	ЖЭ, 80% MeOH, встряхивание, 180 об/мин	ВЭЖХ-УФ-Vis-МС	стадия цветения; сад факультета биологии Университета Анкары	2.681	0.116	0.054	н.о.	[127]
			стадия роста растения; сад факультета биологии Университета Анкары	1.656	0.040	0.075	0.011	
Наземные части	УЗЭ, 75% MeOH, 35–38% HCl, 75 °С, ТФЭ на С ₆ H ₁₁	ВЭЖХ-ДМД-ФЛД	стадия цветения; различные регионы Польши	0.113	0.239	0.877	1.060	[124]
	80% MeOH+ТФУ, 75 °С, перерастворение в ДМСО	ВЭЖХ-УФ	лето; Анатолия, Турция	0.0147	0.3742	0.1125	0.0711	[125]

Примечание. ДЗ – дайдзеин; ГН – генистеин; ФН – формонетин; БКА – биоканин А; н.о. – не обнаружено; «-» – не исследовано; УЗЭ – ультразвуковая экстракция; MeOH – метанол; ТФУ – трифторуксусная кислота; ЖЭ – жидкостная экстракция; EtOH – этанол; МС – масс-спектрометрический детектор; УФ – спектрофотометрическое детектирование в ультрафиолетовой области; Vis – спектрофотометрическое детектирование в видимой области; HCl – соляная кислота; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМД – диодно-матричный детектор; MSPD – матричная твердофазная дисперсия; С18 – сорбент для твердофазной экстракции с привитыми октадецильными группами; деион. вода – деионизованная вода; ТФЭ – твердофазная экстракция; С₆H₁₁ – сорбент для твердофазной экстракции с привитыми циклогексильными группами; ФЛД – флуориметрический детектор; наземные части – листья, стебли, цветы.

Авторами работы [131] проведено исследование химического профиля надземных частей клевера, выращенных на территории Польши. Извлечение основных изофлавоноидов (генистеина, дайдзеина, формонетина и биоканина А) проводили последовательно твердофазной и ультразвуковой экстракциями с дальнейшим кислотным гидролизом анализов и их хроматографическим определением. В результате установлена концентрация изофлавоноидов в извлечениях – она варьировалась от 3 до 3300 мкг/г сухого сырья. В работах [37, 131, 132] авторами отмечается экспрессность данного способа экстракции, вариативность применения растворителей, а также проста и недорогое оборудование.

Более сложным в аппаратурном обеспечении, но не уступающей, а иногда превосходящей по эффективности традиционные способы извлечения изофлавоноидов, считают субкритическую экстракцию водой, водно-спиртовыми растворами или углекислым газом [45, 132, 133]. Однако в отношении изофлавоноидов клевера лугового подобных исследований на данный момент не проводилось, что показывает перспективность подобного рода исследований.

Вызывает интерес определение содержания ФС в различных частях лекарственного растительного материала. Подобных исследований не мало, однако интерпретировать их достаточно проблематично, так как образцы экстрагированы различными способами с использованием отличающихся экстрагентов [121, 122, 126–128]. Некоторые примеры способов извлечения, а также содержания основных изофлавоноидов в различных частях клевера лугового сведены в таблице 3.

1.3 Методы идентификации и определения ФС в экстрактах ЛРС

Определение фитокомпонентов фенольной природы в экстрактах лекарственных растений согласно Фармакопее РФ [42] заключается в суммарном определении спектрофотометрическими методами, однако развитие

аналитической химии позволило определять и индивидуальное содержание интересующих аналитов [5, 32, 34, 35, 134].

Для определения индивидуальных соединений обосновано применение УФ-, ИК- и ЯМР спектроскопии, однако наибольшая эффективность достигается совокупностью методов анализа, например спектроскопическое определение компонентов с предварительным хроматографическим разделением аналитов. Для фенольных соединений широкое распространение получили газовая и жидкостная хроматография, преимущественно высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Отмечается ограниченность использования газохроматографических методов анализа для определения и идентификации фенольных соединений в составе экстрактов лекарственного растительного сырья [35]. Однако, газовая хроматография зачастую позволяет решать задачи идентификации соединений в отсутствии стандартных образцов за счет использования библиотек баз данных [32]. Низкая применимость данного метода также связана с ограниченной летучестью ФС, а также возможной деградации соединений при повышенных температурах [135], что влечет за собой введение дополнительной стадии дериватизации ацилирующими, алкилирующими, чаще силилирующими агентами [136, 137].

Дериватизация фенольных соединений для ГХ определения.

Механизм силилирования фенольных соединений включает замену активного водорода (в группах -ОН, -СООН, -NH, -NH₂) на триметилсилильную группу -Si(CH₃)₃ [138, 139]. В соответствии с механизмом нуклеофильного замещения SN₂, силилирование протекает тем успешнее, чем легче отщепляется уходящая группа. Общая схема образования триметилсилильных производных представлена на схеме 1 [139].

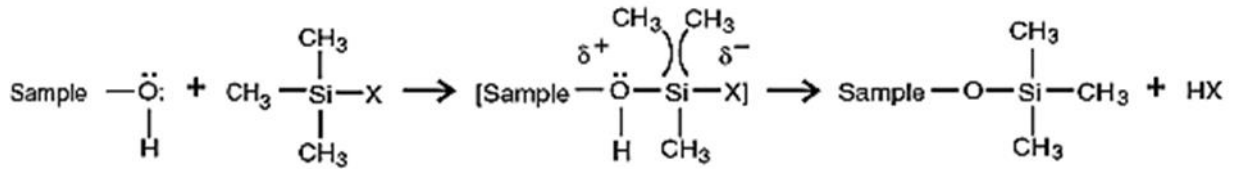


Схема 1 - Общая схема образования триметилсилильных производных

Для силилирования фенольных веществ чаще всего применяют N,O-Бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА) или N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (МСТФА) [140, 141], обладающие легко отщепляемой трифторацетамидной уходящей группой и взаимодействующий с большим количеством функциональных групп с высокими выходами продуктов [139]. Так, протекание процесса силилирования фенольных соединений на примере кофейной кислоты представлено на схеме 2.

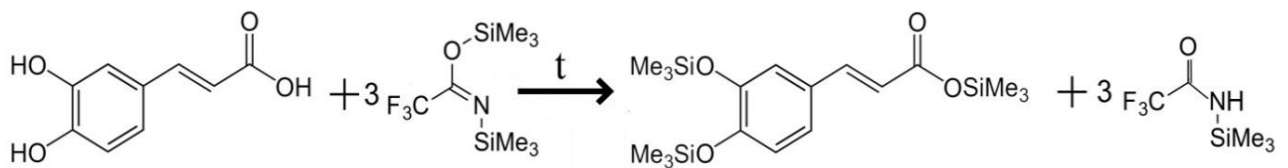


Схема 2 – Силилирование кофейной кислоты дериватирующим агентом БСТФА

Дериватизацию компонентов чаще всего осуществляют в растворе, реже в сухом остатке [136]. Аналитическая дериватизация в растворе зарекомендовала себя в качестве эффективного способа перевода фенольных соединений в необходимую аналитическую форму, но требует для этого больших объемов экстракта ЛРС и дериватирующего агента, а также времени. Например, для определения фенольных кислот (галловой, ванилиновой, хлорогеновой, кофейной, сиреневой, п-кумаровой, феруловой и розмариновой) в экстрактах различных лекарственных растений авторы работы [142] использовали газовую хроматографию (ГХ-МС) с предварительной стадией дериватизации смесью БСТФА – пиридин в течение 1 ч при комнатной температуре. При этом, полученные результаты превосходили результаты, полученные с использованием жидкостной хроматографии с УФ и МС детектированием, что авторы работы

соотнесли с подавлением растительной матрицы. Несмотря на это, перспективно уменьшение объема образца и времени пробоподготовки, используемого для проведения анализа. Это может быть достигнуто применением гибридных техник подготовки проб, таких, как твердофазная аналитическая дериватизация [143, 144].

Как известно, твердофазная экстракция способствует экспрессному извлечению аналитов при значительном снижении объема экстракта, а также легко поддается автоматизации [145], а аналитическая дериватизация обеспечивает селективность, повышение чувствительности определения и хроматографическое разделение аналитов [33, 146]. При твердофазной аналитической дериватизации процессы экстракции и дериватизации протекают на твердой фазе или на границе раздела твердой и жидкой фаз [143]. Данный подход широко применяется для обнаружения жирных кислот, фенолов, аминов и др. [144]. Подход, представленный в работах [143, 144] позволяет ожидать эффективность применения твердофазной аналитической дериватизации в отношении фенольных соединений, находящихся в составе растительных материалов.

Общая схема осуществления твердофазной аналитической дериватизации фенольных соединений для их ГХ-МС определения в экстрактах ЛРС представлена на рисунке 3.

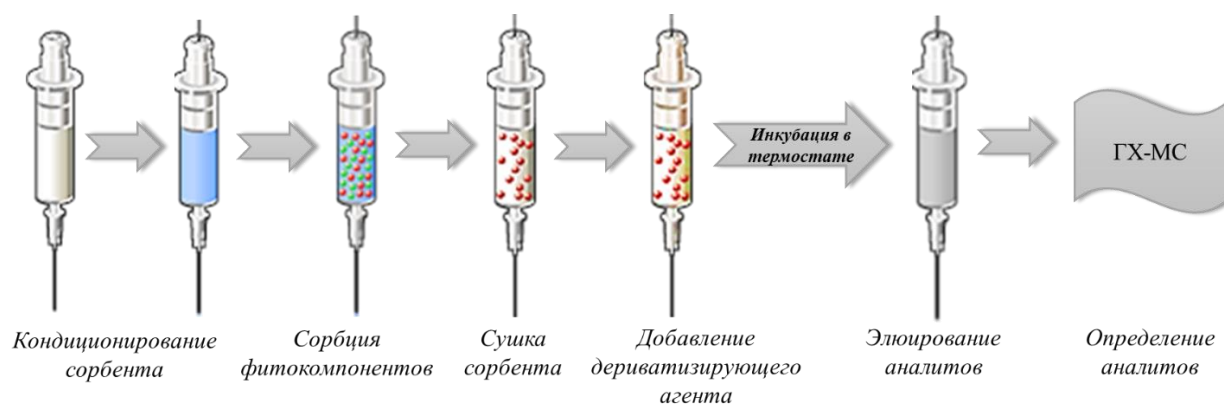


Рисунок 3 – Общая схема осуществления твердофазной аналитической дериватизации фитокомпонентов фенольной природы для ГХ-МС определения

1.3.1 Идентификация и определение ФС в экстрактах зверобоя продырявленного

Достаточное количество работ посвящено хроматографическому исследованию фитокомпонентов фенольной природы, входящих в состав зверобоя продырявленного. Тем не менее, актуальность исследований, посвященных идентификации и определению фенольных соединений остается до сих пор. Для фенольных соединений, входящих в состав зверобоя предпочтительным считается применение ВЭЖХ-систем с использованием для разделения хроматографических колонок, заполненных октадецилсиликагелем. В качестве подвижной фазы (ПФ), как правило, используют бинарные системы растворителей: смеси ацетонитрил – вода или метанол – вода с различным содержанием органического компонента и добавлением муравьиной, уксусной или фосфорной кислот для подавления диссоциации фенольных соединений. В качестве детектора чаще всего используют фотометрический УФ-детектор. Но возникают ситуации, когда сложно судить об идентификации конкретного анализа только лишь по УФ-спектру. В таких случаях незаменимо использование и других видов детекторов, таких как рефрактометрический и масс-спектрометрический, а также их сочетания [147, 148].

Для определения основных составляющих сырья зверобоя Chandrasekera D. и др. [149] применили ВЭЖХ-систему, которая включала в себя две составляющие: «Протокол 1» (флавоноиды и их гликозиды) и «Протокол 2» (нафтодиантроны и флороглюцинолы). В обоих случаях использована обращенно-фазовая колонка Luna C18 (150 x 4.6 мм, зернение сорбента 5 мкм). Система «Протокол 1» имела вид: ПФ - А (ацетонитрил) – В (вода) с 0.5%-ным раствором муравьиной кислоты: 0-27 мин, 16% А; 27-30 мин, линейное изменение от 16 до 32% А; 30-35 мин, 32% А; 35-40 мин, линейное изменение от 32 до 16% А. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Система «Протокол 2»: изократическое элюирование с использованием ПФ состава ацетонитрил – вода – муравьиная

кислота – метанол (70:4.95:0.05:25). Скорость потока была увеличена и составила 1.2 мл/мин. В результате были разделены и идентифицированы гиперфорин, гиперипин, псевдогиперипин, рутин, гиперозид, изокверцитрин и хлорогеновые кислоты. Разделение флавоноидов и их гликозидов было достигнуто в течение 35 минут, а разделение гиперфоринов и гиперипинов – 9 минут. Идентификацию соединений осуществляли с привлечением масс-спектрометрического детектора. Для системы «Протокол 1» были выставлены параметры напряжения в капилляре 3.5 кВ, конусное напряжение 30 В, скиммер–смещение 5 В; температура - 180°C, скорость потока азота - 430 л/ч. Сканирование проводили в отрицательном режиме. Скорость потока на выходе из ВЭЖХ-колонки составляла 0.2 мл/мин. Система «Протокол 2» характеризовалась коническим напряжением в 40 В, температурой - 150°C и скоростью потока азота - 400 л/ч. Диапазон сканирования масс для обеих систем - 100-1000 а.е.м. Использование двух различных систем элюирования фитокомпонентов фенольной природы позволило достигнуть эффективного разделения гиперфоринов и гиперипинов в достаточно короткий промежуток времени.

Жидкостная хроматография с УФ и МС детектированием позволила авторам работы [150] охарактеризовать компоненты зверобоя продырявленного, выращенного в Греции. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке, заполненной октадецилсиликагелем; в качестве ПФ использовали воду и ацетонитрил с добавлением в оба растворителя 0.1% муравьиной кислоты. Регистрацию ионов осуществляли в режиме отрицательной ионизации, напряжение интерфейса – 4.5 кВ, газ-осушитель – азот, температура линии десольватации – 180 °С. При сканировании использовали два события: первое – полное сканирование в диапазоне 200-800 m/z , а второе – полное МС/МС сканирование по наиболее интенсивному иону. В итоге, удалось идентифицировать нафтодиантроны [гиперипин (503.5), псевдогиперипин (519.5), протогиперипин (505.6), протопсевдогиперипин (521.5)], флороглюцинолы [гиперфорин (535.4), адгиперфорин (549.4)], флавоноиды [кверцетин (301.3),

кверцитрин (447.2), изокверцитрин (463.2), гиперозид (463.2), астильбин (449.2), микелианин (477.1), I3, П8-биапигенин (537.2)] и фенольные кислоты [хлорогеновая (353.1) и 3-О-кумароилхинная (337.1)]. Структуру соединений дополнительно подтвердили результатами ЯМР анализа.

Для получения исчерпывающей информации о качественном составе экстрактов зверобоя применяют масс-спектрометрические исследования с предварительным хроматографическим разделением компонентов. При регистрации масс-спектров чаще используют отрицательный режим регистрации ионов, однако для флороглюцинолов предпочтительнее использовать положительный режим ионизации. Например, в рамках своего исследования Alali F. и др. [151] для изучения видов зверобоя из Иордании провели анализ основных метаболитов нафтодиантронов и флороглюцинолов в метанольных экстрактах зверобоя: *H. empetrifolium Willd* и *H. Sinaicum*, используя ЖХ-(+,-)-ЭРИ-МС (TIC и SIM), а также ЖХ-УФ методы. Хроматографическое разделение было выполнено на колонке Hypersil ODS (125 мм × 4 мм; 5 мкм) при градиентном элюировании с использованием ПФ - 20 ммоль ацетата аммония - ацетонитрил; ЭРИ-сканирование в положительном и отрицательном режиме в диапазоне m/z 50-1000 (температура - 325°C, напряжение - 4000 В, скорость потока газа – 5 л/мин). На основании полученных спектральных данных и времен удерживания идентифицированы гиперичин, протогиперичин и псевдогиперичин в обоих исследуемых образцах. Однако адгиперфорин был обнаружен только в *H. empetrifolium*, а гиперфорин и протопсевдогиперичин – только в *H. sinaicum*. При проведении анализа в отрицательном режиме сканирования ионов идентифицированы гиперичин (m/z 503), псевдогиперичин (m/z 519), протогиперичин (m/z 505), протопсевдогиперичин (m/z 521). С другой стороны, при положительном режиме сканирования ионов идентифицированы гиперфорин (m/z 537), адгиперфорин (m/z 551), гиперфорин (m/z 469) и адгиперфорин (m/z 483).

В работе Р. Mauri [152] проведен анализ нафтодиантронов и флороглюцинолов в экстрактах зверобоя продырявленного с помощью ВЭЖХ в сочетании с диодно-матричным детектированием и масс-спектрометрией с электрораспылением (ЭРИ-МС). Анализ проводили в положительном и отрицательном режимах сканирования m/z 100 - 700; для количественного анализа использовали мониторинг выбранных ионов (SIM). Исследователями приготовлен экстракт в 50%-ом метаноле, который впоследствии центрифугировали и вводили в масс-спектрометр. Обнаружено обилие ионов с m/z 535 и 609, соответствующие гиперфорину и рутину. Депротонированные молекулы ($[M-H]^-$) гиперидина (m/z 503), псевдогиперидина (m/z 519) и адгиперидина (m/z 549) были обнаружены в меньших количествах. Ионы с m/z 383 и 466 получаются путем фрагментации $[M-H]^-$ ионов гиперидина предположительно в скиммер области. Аналогичным образом обнаружены ионы изокверцитрина и гиперозида (m/z 463), кверцитрина (m/z 447) и кверцетина (m/z 301). Таким образом, отрицательный режим сканирования позволил определить 9 различных представителей трех различных классов, а положительный режим сканирования – гиперфорин (m/z 559) и псевдогиперфорин (m/z 573).

М. Brolis с соавторами [40] провели идентификацию 16 компонентов зверобоя продырявленного при помощи ВЭЖХ-МС. МС – сканирование было проведено в диапазоне m/z 200 - 700 в положительном и отрицательном режимах со скоростью сканирования в 1 секунду. Получены МС спектры с ионизацией в термоспрее, содержащие ионы $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$ для всех соединений; в спектрах были идентифицированы ионы с m/z 465, 487 и 503 и фрагмент иона с m/z 303, полученного в результате потери единицы гексозы. Данный спектр был идентифицирован как гиперозид путем введения схожего по структуре образца. Аналогичным образом получены спектры для других аналитов.

Таким образом, хроматомасс-спектрометрические исследования экстрактов зверобоя постоянно расширяют качественный состав данного ЛРС, что

показывает перспективность разработки как способов извлечения аналитов, так и хроматографических систем их определения и идентификации.

1.3.2 Идентификация и определение ФС в экстрактах эхинацеи пурпурной

В компонентный состав водно-спиртовых экстрактов эхинацеи пурпурной входят гидроксикоричные кислоты (кофейная и феруловая кислоты), их производные - хлорогеновая, кафтаровая и цикориевая кислоты [14, 15], последняя из которых, по мнению авторов [16, 17], считается доминирующим (мажорным) компонентом. Содержание цикориевой кислоты используется в качестве маркера лекарственной активности препаратов на основе эхинацеи пурпурной [18, 42]. Из производных кофейной кислоты по содержанию доминирует кафтаровая кислота [19], а из сопутствующих компонентов - хлорогеновая кислота [16, 20]. Исследователи отмечают наличие в эхинацее пурпурной некоторых флавоноидов (например, рутин, никотифлорин, кверцетин и лютеолин) [21].

Содержание фитоконпонентов фенольной природы в эхинацее пурпурной аналогично большинству растительных материалов, определяют методами газовой и жидкостной хроматографии [110, 153, 154]. Флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и их производные определяют высокоэффективной жидкостной хроматографией в обращено-фазовом режиме с использованием колонок, заполненных силикагелевыми сорбентами с привитыми октадецильными группами [110, 153], обеспечивающими их наиболее эффективное разделение. Разделение аналитов осуществляют в градиентном режиме элюирования с использованием ПФ, состоящей из смеси ацетонитрила и воды с добавкой муравьиной или о-фосфорной кислот [13, 110, 115, 153, 155]. Например, группой авторов [156] исследованы образцы эхинацеи пурпурной, культивируемые в Иране. С помощью ВЭЖХ-УФ идентифицированы кофейная, кафтаровая и

цикориевая кислоты, с преобладающим содержанием в образцах последней из перечисленных. Разделение данных кислот проводили на колонке RP-18 с использованием в качестве подвижной фазы смесь ацетонитрил - вода с добавлением 0.1% фосфорной кислоты (70:30).

С помощью хроматомасс-спектрометрических исследований (ВЭЖХ-МС/МС) доказано наличие в составе экстрактов эхинацеи пурпурной фенолпропаноидов [115]. Их разделение осуществляли в обращено-фазовом режиме на колонке Inertsil ODS4 C18 в градиентном режиме элюирования с применением ПФ состава вода – ацетонитрил:метанол (60:40) в течение 14 минут. Регистрацию масс-спектрометрических данных проводили в режиме SIM в режиме “negative”. В результате установлены молекулярные и фрагментарные ионы (а.е.м.) для кафтаровой кислоты – 3111.162 (148.9, 183, 179.1, 134.9); цикориевой кислоты – 473.168 (148.8, 311, 179.1, 135.1); хлорогеновой кислоты – 353.027 (191.2, 85, 93, 59); цинарина – 515.204 (190.9, 178.9, 353.2, 135) и эхинакозида – 785.318 (161.1, 132.8, 59, 135).

В исследовании [157] подробно представлена фитохимическая характеристика экстрактов эхинацеи на основе данных, полученных высокоэффективной жидкостной хроматографией с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием. Разделение компонентов проводили на колонке Ascentis C18 при градиентном элюировании ПФ ацетонитрил – вода с добавкой 0.1% муравьиной кислоты в оба растворителя. Полученные данные позволили идентифицировать 14 соединений, включающих производные кофейной кислоты, полиацетилены и полиены. Авторами работы также подробно обсуждены данные масс-спектрометрического анализа и предложены модели фрагментации каждого класса вторичных метаболитов. Установлено, что наиболее распространенным соединений среди производных кофейной кислоты является эхинакозид.

Можно заключить, что массив данных масс-спектрометрического анализа экстрактов эхинацеи позволяет создать «фингерпринт» метаболитов растения и может быть использован для контроля качества растительного материала.

1.3.3 Идентификация и определение ФС в экстрактах клевера лугового

Для определения фенольных соединений (изофлавоноидов) в экстрактах клевера лугового наибольшее распространение получили хроматографические методы анализа [158]. Для разделения и качественного определения изофлавоноидов используют планарную хроматографию (бумажную и тонкослойную). Несмотря на ряд преимуществ данного метода (простота, возможность сравнения со стандартными образцами, экспрессность и дешевизна) его редко используют из-за ограниченного круга выделяемых компонентов [159]. Метод газовой хроматографии при определении изофлавоноидов применяется крайне редко в силу трудностей, связанных с применением высоких температур при проведении анализа, что может привести к разложению аналитов и необходимостью их дериватизации [100, 160].

Наиболее эффективным методом разделения и определения изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового также является ВЭЖХ с различными вариантами детектирования [34]. ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием позволяет получить более полную информацию о качественном и количественном содержании изофлавоноидов в исследуемых экстрактах клевера и позволяет определять как агликоны, так и гликозиды соединений, без применения дополнительных операций пробоподготовки. Для получения правильных результатов важно оптимизировать условия хроматографирования: режим элюирования, состав ПФ, температуру и длину колонки, состав и размер частиц сорбента. ВЭЖХ определение изофлавоноидов, как правило, проводят в обращено-фазовом режиме [161, 162] с

использованием хроматографических колонок, заполненных химически модифицированным силикагелем с привитыми октадецильными группами [125, 128, 159], где в качестве ПФ выступает смесь воды с метанолом или ацетонитрилом [163, 164].

Для детектирования ФС в этих случаях используют диодно-матричный, флуоресцентный и масс-спектрометрический детекторы [29, 30, 37, 85, 165]. При этом масс-спектрометрический детектор позволяет не только детектировать соединения, но и проводить их идентификацию. Однако чаще применяют комбинацию из различных детекторов. Например, авторы работы [131] для определения изофлавоноидов в клевере использовали диодно-матричный и флуоресцентный детекторы. Разделение аналитов осуществляли в обращено-фазовом режиме на колонке Hypersil ODS в режиме градиентного элюирования с помощью ПФ, состоящей из ацетонитрила и 1 мМ раствора фосфорной кислоты. Идентифицированы основные изофлавоноиды клевера: дайдзеин, формонетин, генистеин и биоканин А. Авторами установлено, что использование флуоресцентного детектора позволяет значительно снизить пределы определения и обнаружения в экстрактах клевера для формонетина по сравнению с диодно-матричным детектированием данного соединения.

В работе [166] для идентификации изофлавоноидов, содержащихся в экстрактах клевера использовали ВЭЖХ-МС-МС в режиме MRM и регистрации положительных ионов. Фрагментацию ионов индуцировали диссоциацией, индуцированной столкновением, а детектирование – с помощью канального электронного умножителя. Установлены m/z и энергии соударений для каждого соединения: генистеин (m/z 270.99), генистин (m/z 433.08), дайдзеин (m/z 254.96), дайдзин (m/z 417.01), глицетеин (m/z 285.02), глицетин (m/z 446.99), биоканин А (m/z 285.01), формонетин (m/z 269.09) и прунетин (m/z 285.01). Хроматографическое разделение соединений проводили с использованием колонки Luna 3u C18 (150 мм × 2 мм) в изократическом режиме ПФ, состоящей из 70% метанола, и со скоростью потока 0.2 мл/мин.

Несмотря на большую перспективность использования клевера в качестве источника изофлавоноидов, в составе клевера лугового обозначают присутствие и других классов ФС. С помощью ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций удалось разделить и идентифицировать в течение 15 минут 43 фенольных соединения [165]. В их числе 15 фенольных кислот (хинная, галловая, протокатеховая, хлорогеновая, 2,5-дигидроксibenзойная, пара-гидроксibenзойная, кофейная, ванилиновая, сиринговая, пара-кумаровая, орто-кумаровая феруловая, синаповая, 3,4-диметоксикоричная и коричная), 23 флавоноида (апигенин, апигенин-7-О-глюкозид, апигеин, винексин, аментофлавоин, байкалеин, байкалин, дайдзеин, генистеин, изорамнетин, кампферол, кампферол-3-О-глюкозид, хризоеринол, лютеолин, лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцитрин, гиперозид, рутин, мирцитин, нарингенин, эпикатехин, катехин, эпигаллокатехин галлат), 3 кумарина (умбеллиферон, эскулетин, скополетин) и 2 лигнана (матаиресинол и секоизоларициресинол).

Как видно из литературных данных, определение и идентификацию фенольных соединений в растительных объектах различных семейств проводят в достаточно схожих друг с другом условиях, но с некоторыми модификациями. Ввиду этого разработка и оптимизация методик идентификации и определения фенольных соединений различных классов остается актуальной.

1.4 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Контроль качества и стабильности ЛРС семейств Зверобойные, Астровые и Бобовые, препаратов на их основе является важной аналитической задачей в химии растительных материалов и отраслях, использующих получаемые из растений химические вещества и материалы. В состав экстрактов этих растений и препаратов на их основе входят биологически активные вещества – фитоконпоненты фенольной природы, принадлежащие различным классам и

обуславливающие фармакологическую активность ЛРС: фенольные кислоты, флавоноиды, нафтодиантроны, флороглюцинолы (Зверобойные), фенилпропаноиды (Астровые) и изофлавоноиды (Бобовые). Состав и концентрация указанных ФС повышают ценность лекарственных растений и являются показателем его качества. Важным и малоизученным аспектом является изучение взаимосвязи содержания ФС в экстрактах ЛРС от географии произрастания и морфологической части растения, используемой для экстракции.

Для определения содержания ФС согласно Фармакопее РФ в растениях семейств Зверобойные, Астровые и Бобовые используют методы суммарного определения флавоноидов, фенольных кислот и фенилпропаноидов. С другой стороны, для объективной оценки фармакологической активности лекарственного растительного сырья важно качественное и количественное содержание индивидуальных ФС, определяющих эти свойства.

Определение и идентификацию индивидуальных ФС в лекарственных растениях преимущественно осуществляют хроматографическими методами анализа (газовой и жидкостной хроматографией) в совокупности с различными способами детектирования соединений (ИК, ЯМР, УФ и МС). Такие исследования перспективны с точки зрения определения содержания известных ФС и идентификации ранее не установленных аналитов в составе лекарственных растений вышеперечисленных семейств. Лимитирующей стадией хроматографического определения ФС принято считать экстракцию компонентов. В зависимости от способа экстракции ФС состав извлечений растений различается, что усложняет их сопоставительный качественный анализ. В литературе встречается ограниченное количество работ, иллюстрирующих эффективность применения различных способов экстракции в отношении одного вида ЛРС, что показывает перспективность подобного рода исследований.

Проведенный анализ литературных данных позволил сформировать **цель диссертационного исследования** - идентификация и хроматографическое определение фитокомпонентов фенольной природы, обуславливающих

биологическую активность некоторых лекарственных растений семейств Зверобойные (*Hypericaceae*), Астровые (*Asteraceae*) и Бобовые (*Fabaceae*) в водных и водно-спиртовых экстракционных системах.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1 жидкостная экстракция обуславливающих биологическую активность ФС из лекарственных растений семейств Зверобойные (*Hypericaceae*), Астровые (*Asteraceae*) и Бобовые (*Fabaceae*);

2 твердофазная экстракция ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов лекарственных растений сорбентами различной природы, расчет их основных характеристик по отношению к анализам;

3 идентификация и определение ФС в исследуемых растительных материалах;

4 разработка методик ГХ-МС определения ФС в водных экстрактах исследуемых лекарственных растений;

5 влияние географических и морфологических факторов на содержание ФС в экстрактах исследуемых лекарственных растений.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Исходные реактивы, материалы и используемая аппаратура

Для выполнения экспериментальных исследований использовали следующие средства измерений, устройства, реактивы и материалы:

– жидкостный хроматограф LC 20 Prominence (Shimadzu, Япония);
дегазатор - DGU-20A5, насос - LC20AD, автосамплер - SIL-20A, термостат колонок - CTO-20AC, спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы - SPD-M20A, квадрупольный масс-спектрометр - LCMS 2010 EV;

– хроматографические колонки: Luna C18 100Å, 250 × 2.0 мм, 5 мкм; Oпух Monolithic C18, 50 × 2.0 мм (Phenomenex, США);

– хроматографические предколонки 4 × 2.0 мм C18 (5 мкм); 4 × 2.0 мм Oпух C18 (Phenomenex, США);

– газовый хроматограф GC-2010 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором GCMS-QP 2010 Plus (Shimadzu Япония);

– капиллярная хроматографическая колонка HP-Ultra 1 (25 м × 0.32 мм × 0.52 мкм) (Agilent, США);

– гелий марки А (НИИ КМ, Россия);

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

– весы аналитические по ГОСТ 16474-74 (Adventurer, Швейцария);

– микроволновая установка «ETNOS One» (Milestone, Италия);

– УЗ-ванна УЗВ -4.0/1 ТТЦ, рабочая частота 35 кГц (Сапфир, Россия);

– рН-метр-иономер «Эксперт-001» (Эконикс-Эксперт, Россия);

– магнитная мешалка (Leki, Финляндия);

– электрическая плитка (Искорка, Вятка);

– сушильный шкаф (Memmert, Германия);

– установка для субкритической экстракции и десорбции ФС: термостат ЛХМ-80 (Хроматограф, СССР) с трубчатым нагревателем (мощность 500 Вт),

электронный блок ТРМ-101, термopаpa ДТПЛ (Oвeн, Россия), насос жидкостного хроматографа LC20AD (Shimadzu, Япония), корпус хроматографической колонки размером 150 × 4.6 мм, ограничитель давления P-455 (Upchurch Scientific, США).

- колбы мерные вместимостью 5, 25, 50, 100 мл по ГОСТ 1770-74;
- сита лабораторные по ГОСТ 51568-99;
- стаканы химические вместимостью 50 мл по ГОСТ 1770-74;
- воронки конические стеклянные по ГОСТ 25336-82;
- хроматографические вials объемом 1.5 мл Screw-cap, (Chromacol LTD, Великобритания);
- пластиковые фильтродержатели Swinnex (диаметр фильтра 25 мм, полипропилен, разъем Луер) (Millipore, Франция);
- фильтр Nylon Membrane, 0.45 мкм, 25 мм, VE = 100 (Millipore, Франция);
- одноканальные механические дозаторы «Biohitproline» с варьируемым объемом дозирования 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл (Biohit proline, Финляндия);
- вата медицинская по ГОСТ 5556-75;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
- деионизованная вода с удельным сопротивлением 18.2 Мом*см (25°C), полученная на установке Milli-Q-UV (Millipore, Франция);
- ацетонитрил, сорт 0 (Криохром, Россия);
- муравьиная кислота, 85% (ЛенРеактив, Россия);
- спирт этиловый очищенный 95% (Ферейн, Россия);
- соляная кислота, ч, по ГОСТ 3118-77 (Реахим, Россия);
- спирт метиловый, хч (Вектон, Россия);
- N, O - Бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА) (Sigma-Aldrich, Германия);

– стандартные вещества: 3,4-дигидроксibenзойная кислота, хлорогеновая кислота, неохлорогеновая кислота, (-)-эпикатехин, рутин, гиперозид, изокверцитрин, кверцетин, кверцитрин, гиперицин, гиперфорин, цикориевая кислота, кофейная кислота, дайдзеин, формонетин, генистеин, биоканин А (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany);

– 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); Supelclean Envi-Carb - масса 500 мг, размер частиц 37-125 мкм (Supelco, США); HyperSep Hypercarb - масса 500 мг, размер частиц 30 мкм (Thermo, США).

2.2 Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали:

– траву зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) торговой марки «Травы Кавказа» (Краснодарский край, г. Горячий Ключ);

– траву эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L.) торговых марок: «Травы Кавказа» (Краснодарский край, г. Горячий Ключ), «Фитофарм» (Краснодарский край, г. Анапа), «Родные травы» (республика Адыгея, ст. Севастопольская).

– цвет клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) торговой марки «Травы Кавказа» (Краснодарский край, г. Горячий Ключ);

– траву чабреца ползучего (*Thymus serpyllum* L.) торговой марки «Травы Кавказа» (Краснодарский край, г. Горячий Ключ);

– траву шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) торговой марки «Травы Кавказа» (Краснодарский край, г. Горячий Ключ);

– лекарственные материалы и препараты на основе эхинацеи пурпурной: чай «Эхинацея пурпурная» («Травы Горного Крыма», Крым, высокогорье Демерджи); чайный напиток «Эхинацея» («Емельяновская биофабрика», Хвойнинский р-н, Новгородская область); настойка эхинацеи (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», г. Тула); сироп эхинацеи (ООО «Грин Сайд», Алтайский край, г. Барнаул); таблетки «Эхинацея VitaScience» (ООО «ВТФ», Владимирская обл., пос. Вольгинский); биологически активная добавка к пище «Эхинацея П» (ООО «Парафарм», г. Пенза). Все препараты имели актуальный срок годности.

Подготовка растительного сырья. При исследовании растительных материалов сырье подготавливали в два этапа: 1 - предварительно измельчали сырье блендером; 2 - отбирали фракции с размером частиц 0.5–1.0 мм при помощи системы сит и с учетом рекомендации Фармакопейных статей [42].

2.3 Приготовление рабочих растворов

Приготовление подвижной фазы В для ВЭЖХ-ДМД-МС. Для приготовления подвижной фазы В, представляющей собой 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, смешивали 500 мкл концентрированной муравьиной кислоты с деионизованной водой в колбе на 500 мл.

Приготовление основного раствора 3,4-дигидроксибензойной кислоты с концентрацией 200 мкг/мл: навеску 3,4-дигидроксибензойной кислоты массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Полученный раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора неохлорогеновой кислоты с концентрацией 200 мкг/мл: навеску неохлорогеновой кислоты массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве

ацетонитрила, затем прибавляли 2 мл этилового спирта и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Полученный раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора хлорогеновой кислоты с концентрацией 200 мкг/мл: навеску хлорогеновой кислоты массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Полученный раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора (-)-эпикатехина с концентрацией 200 мкг/мл: навеску (-)-эпикатехина массой 2 мг помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора рутина с концентрацией 200 мкг/мл: навеску рутина тригидрата массой 10.9 мг помещали в мерную колбу объемом 50 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила, добавляли 1 мл этилового спирта и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора изокверцитрина с концентрацией 200 мкг/мл: навеску изокверцитрина массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора гиперозида с концентрацией 200 мкг/мл: навеску гиперозида массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила, добавляли 0.5 мл этилового спирта и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора кверцитрина с концентрацией 200 мкг/мл: навеску кверцитрина массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора кверцетина с концентрацией 200 мкг/мл: навеску кверцетина массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора гиперина с концентрацией 20 мкг/мл: навеску гиперина массой 2 мг помещали в мерную колбу объемом 100 мл, растворяли в небольшом количестве смеси метанол:этанол (1:3) и доводили объем раствора до метки смесью метанол:этанол (1:3). Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Стандартный образец гиперфорина с концентрацией 250 мкг/мл выступал в качестве основного раствора.

Приготовление основного раствора цикориевой кислоты с концентрацией 200 мкг/мл: навеску цикориевой кислоты массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора дайдзеина с концентрацией 20 мкг/мл: навеску дайдзеина массой 2 мг помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора генистеина с концентрацией 20 мкг/мл: навеску генистеина массой 2 мг помещали в мерную колбу объемом 10 мл,

растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора формонетина с концентрацией 20 мкг/мл: навеску формонетина массой 2 мг помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление основного раствора кофейной кислоты с концентрацией 200 мкг/мл: навеску кофейной кислоты массой 5 мг помещали в мерную колбу объемом 25 мл, растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Затем раствор помещали в емкость для хранения из темного стекла.

Приготовление градуировочных растворов фенольных веществ проводили в хроматографических виалах объемом 1 мл: вносили аликвоты основного раствора вещества и доводили объем до метки 70%-ным этиловым спиртом.

2.4 Экстракция ФС из растительного материала

Экстракцию растворителем ФС из ЛРС проводили при нагревании согласно Фармакопее РФ [42]:

1. Экстракция ФС из эхинацеи пурпурной. Измельченное сырье массой 1.000 г помещали в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл, приливали 10 мл экстрагента. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали до слабого кипения растворителя в течение 45 мин. Затем содержимое колбы переносят в колбу на 25 мл, фильтруя при этом извлечение через вату. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

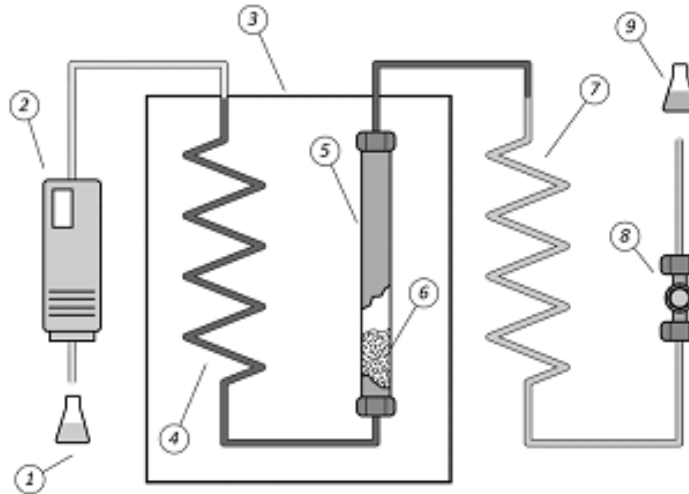
2. *Экстракция ФС из клевера лугового.* Измельченное сырье массой 1.0000 г помещали в круглодонную колбу, добавляли 30 мл 96%-го этанола и 2 мл 10%-ной соляной кислоты, подключали к обратному холодильнику и проводили экстракцию на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Далее экстракт фильтровали через вату в мерную колбу на 100 мл и доводили объем до метки 96%-ным этанолом. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Ультразвуковая экстракция ФС из растительного сырья. Измельченное сырье массой 0.5000 г смешивали с 25 мл воды / 70%-го этилового спирта в конической колбе и помещали на 30 минут в ультразвуковую ванну. Затем полученный экстракт фильтровали через вату в мерную колбу на 25 мл, промывая остаток несколько раз экстрагентом. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Микроволновая экстракция ФС из растительного сырья. Измельченное сырье массой 0.5 г смешивали с 25 мл воды / 70 %-го этилового спирта, помещали в микроволновую систему, для которой устанавливали мощность на уровне в 300W и время 30 минут. После предварительного нагрева в течение 10 мин до 75°C воздействием излучения в 400W проводили извлечение фенольных компонентов из сырья. Затем полученный экстракт переносили в мерную колбу на 25 мл, фильтруя извлечение через вату. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Субкритическая экстракция ФС из растительного сырья. Экстракцию компонентов проводили с помощью специально собранной экспериментальной установки [102], представленной на рисунке 4. Измельченное сырье массой 0.2000 г помещали в ячейку-экстрактор в печи термостата. Используемый экстрагент предварительно продували азотом и заполняли им экстракционную систему с помощью насоса. После этого останавливали поток и включали нагрев термостата. По достижении термостатом заданной температуры подавали

экстрагент со скоростью 1 мл/мин. На выходе собирали 10 мл экстракта в мерные колбы. Перед хроматографическим анализом экстракт пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.



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 4 – Установка для субкритической экстракции ФС из ЛРС

Экстракция ФС из лекарственных препаратов и тонизирующих напитков эхинацеи пурпурной. Экстракцию ФС из лекарственных препаратов и тонизирующих напитков на основе эхинацеи пурпурной проводили 70%-ным этиловым спиртом в ультразвуковом поле. Таблетированные лекарственные препараты измельчали и растворяли в экстрагенте в соотношении 1:10 с последующей обработкой ультразвуком в течение 30 мин. Не растворившиеся в экстрагенте частицы отделяли центрифугированием при 10000 об/мин, а перед хроматографированием экстракты пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм. Жидкие формы препаратов растворяли в 70%-ном этиловом спирте в соотношении препарат:спирт 1:5. Для этого 1 мл препарата помещали в мерную колбу емкостью 5 мл, доводили до метки экстрагентом и подвергали обработке

ультразвуком в течение 30 мин. Перед хроматографированием полученные экстракты пропускали через фильтр с диаметром пор 45 мкм.

Твердофазная экстракция ФС из экстрактов растительного сырья

Активация сорбционных материалов. Активацию сорбентов Strata C18-E и Strata X проводили путем последовательного промывания 1 мл деионизованной воды, 1 мл ацетонитрила / метанола и 5 мл деионизированной воды. Для сорбента Oasis HLB - 2 мл деионизованной воды, 2 мл ацетонитрила / метанола и 10 мл деионизированной воды. Активацию патронов Supelclean ENVI-Carb и HyperSep Hypercarb проводили путем последовательного промывания 5 мл деионизованной воды (70%-го этилового спирта для нафтодиантронов и флороглюцинолов), 5 мл десорбирующего растворителя и 10 мл деионизированной воды (70%-го этилового спирта для нафтодиантронов и флороглюцинолов).

Установление основных сорбционных характеристик исследуемых материалов. Выходные динамические кривые сорбции (ВДКС) получали пропуская водных экстрактов растительного сырья через патроны с сорбентами со скоростью 1 мл/мин, контролируя содержание аналитов в каждой порции элюата методом ВЭЖХ-ДМД. Затем сорбент сушили в токе азота и осуществляли десорбцию аналитов с поверхности сорбентов подходящим растворителем. Содержание определяемых компонентов в экстрактах и элюатах устанавливали методом ВЭЖХ-ДМД. Основные характеристики рассчитывали по формулам 1-7 [88, 89].

Расчет степени извлечения и коэффициента концентрирования ФС из экстрактов ЛРС. Для расчета степени извлечения ФС пропускали экстракт ЛРС через патрон с сорбентом, принимая во внимание рассчитанные объемы «до проскока» аналитов, затем сушили сорбент в токе азота и проводили десорбцию подходящим растворителем. Степень извлечения и коэффициент концентрирования аналитов рассчитывали по формулам 8 и 9 соответственно.

$$R = \frac{m_1}{m_2} * 100, \quad (8)$$

$$K = \frac{C_1}{C_2}, \quad (9)$$

где R – степень извлечения аналита, %;

m_1 – масса аналита в элюате, мкг;

m_2 – масса аналита в исходном экстракте, мкг;

K – коэффициент концентрирования аналита;

C_1 – концентрация аналита в экстракте, мкг/мл;

C_2 – концентрация аналита в элюате, мкг/мл.

Десорбция ФС с углеродного сорбента в условиях повышенных температур и давления. Для проведения десорбции компонентов с поверхности углеродных сорбентов использовали установку для субкритической экстракции (рисунок 4), помещая в ячейку-экстрактор навеску 0.5 г предварительно просушенного сорбента с нанесенными аналитами. Элюирование соединений проводили при фиксированной температуре и скорости потока элюента в 1 мл/мин. В качестве экстрагента выступали метанол, ацетонитрил, изопропиловый спирт, а также их смесь различного состава. Элюаты динамически собирали в хроматографические вials и подвергали хроматографированию.

2.5 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах ЛРС

2.5.1 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах зверобоя продырявленного

Анализ экстрактов зверобоя продырявленного проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием диодно-матричного и масс-спектрометрического детекторов (ВЭЖХ-ДМД-МС) в условиях, предложенных [102; 168]. Для этого в среде программы LCMS Solution (Shimadzu, Япония) устанавливали параметры инструмента для градиентного

элюирования: подвижная фаза А – ацетонитрил, подвижная фаза В – 0.1% муравьиная кислота в воде (по объему).

Система для определения фенольных кислот и флавоноидов (Система 1) имела вид, представленный в таблице 4.

Таблица 4 – ВЭЖХ-программа для фенольных кислот и флавоноидов

Время	Модуль	Действие	Значение
0.01	Насос	В.Сonc	95
0.01	Контроллер	Старт	
0.02	Автосамплер	Вкол	
2.00	Pumps	В.Сonc	90
2.01	Насос	В.Сonc	90
10.00	Насос	В.Сonc	80
18.00	Насос	В.Сonc	70
25.00	Насос	В.Сonc	10
25.05	Насос	В.Сonc	95
30.00	Контроллер	Стоп	

Условия хроматографирования: скорость потока элюента 0.4 мл/мин; температура термостатирования колонки – 40°C; диапазон длин волн ДМД – 190-800 нм.

МС детектор: режим SCAN, отрицательная ионизация, напряжение на детекторе 2 кВ, диапазон сканирования – 120 до 650 m/z , скорость сканирования – 2000 amu/sec, скорость газа-распылителя – 1.5 мл/мин, напряжение на интерфейсе – 4.5 кВ.

Система для определения нафтодиантронов и флороглюцинолов (Система 2) имела иной вид, представленный в таблице 5.

Таблица 5 – ВЭЖХ-программа для нафтодиантронов и флороглюцинолов

Время	Модуль	Действие	Значение
0.01	Насос	В.Сonc	20
0.01	Контроллер	Старт	
0.02	Автосамплер	Вкол	
10.00	Насос	В.Сonc	0
20.00	Насос	В.Сonc	0
21.00	Насос	В.Сonc	20
25.00	Насос	В.Сonc	20
25.00	Контроллер	Стоп	

Условия хроматографирования: скорость потока элюента 0.6 мл/мин; температура термостатирования колонки - 40°C; диапазон длин волн ДМД – 190-800 нм.

МС детектор: режим SCAN, отрицательная ионизация, напряжение на детекторе 2 кВ, диапазон сканирования – 120 до 650 m/z , скорость сканирования – 1000 amu/sec, скорость газа-распылителя – 1,5 мл/мин, напряжение на интерфейсе – 4.5 кВ. Положительная ионизация: напряжение на детекторе 2 кВ, диапазон сканирования – 120 до 650 m/z , скорость сканирования – 1000 amu/sec, скорость газа-распылителя – 1.5 мл/мин, напряжение на интерфейсе – 3.5 кВ.

Режим сканирования МС детектором для Системы 2 представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Режим сканирования МС детектора для Системы 2

Время	Режим
0.00-1.00	Scan (-)
1.00-2.00	Scan (-), Scan (+)
2.00-25.00	Scan (-)

Обработку первичных данных и расчеты проводили в среде программы LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Хроматограммы экстракта зверобоя продырявленного, полученные в данных условиях представлены на рисунках 5 и 6.

Идентификация аналитов подтверждалась сопоставлением времен удерживания (таблица 7), УФ-спектров (приложение А) и МС-спектров определяемых соединений (приложение Б) с аналогичными характеристиками, полученными для стандартных веществ.

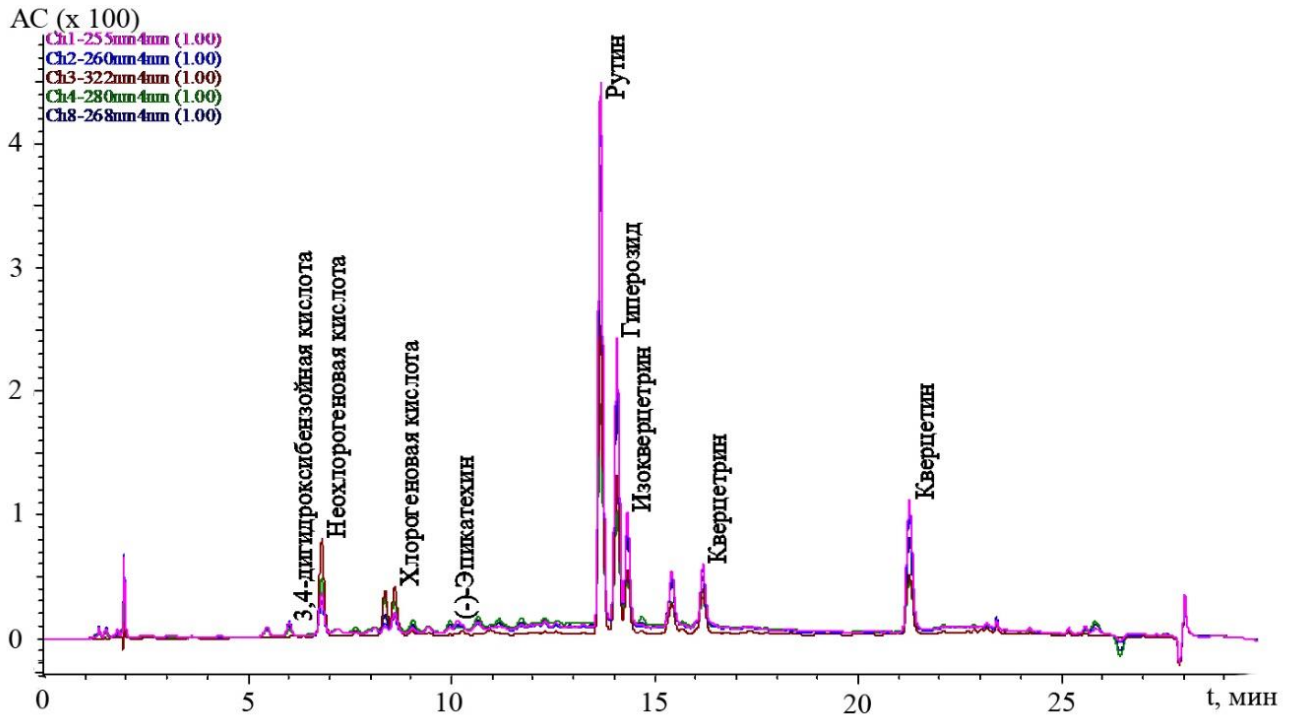


Рисунок 5 – Хроматограмма водно-этанольного экстракта зверобоя продырявленного (Система 1)

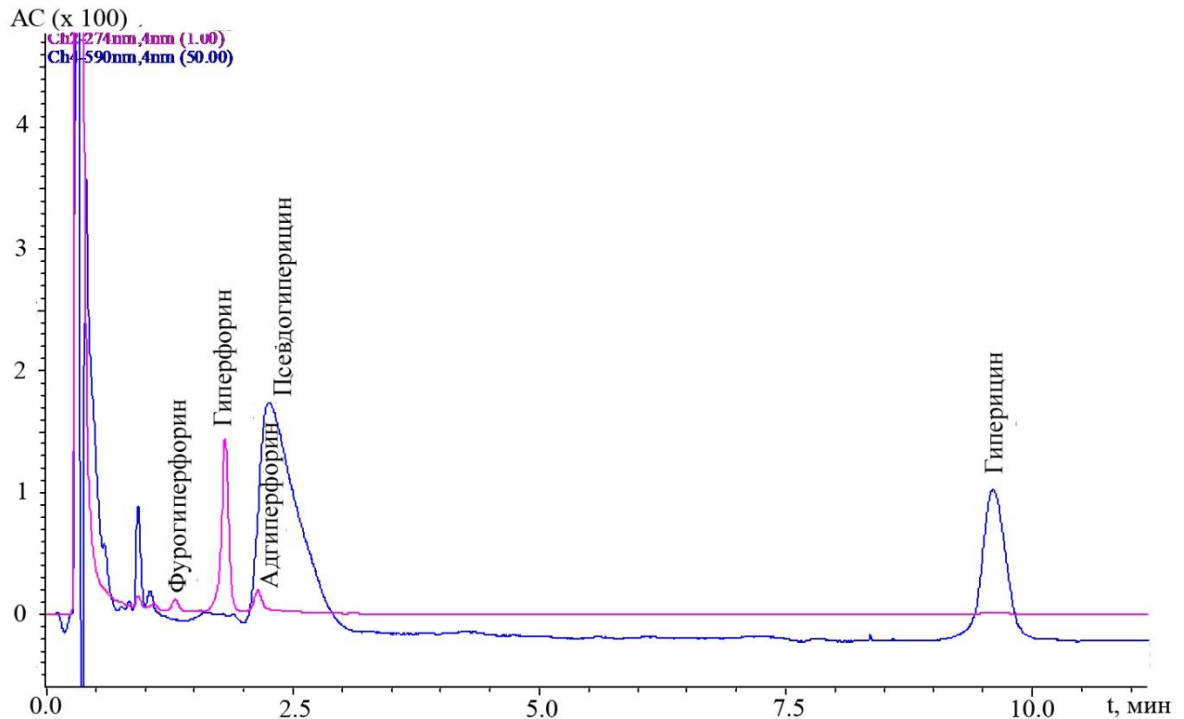


Рисунок 6 – Хроматограмма водно-этанольного экстракта зверобоя продырявленного (Система 2)

Таблица 7 – Параметры идентификации ФС в экстрактах зверобоя продырявленного в системе ВЭЖХ-ДМД-МС

Соединение	t_R , МИН	m/z	λ_{max} , НМ
Система 1			
3,4 – дигидроксибензойная кислота	5.9	152.9	259
Неохлорогеновая кислота	6.8	352.9	320
Хлорогеновая кислота	8.6	352.9	320
(-) – эпикатехин	9.9	288.9	278
Рутин	13.7	609.4	256, 354
Гиперозид	14.0	462.9	256, 354
Изокверцитрин	14.3	463.0	255, 353
Кверцитрин	16.2	446.9	253, 341
Кверцетин	21.3	300.9	255, 363
Система 2			
Фурогиперфорин	1.3	553.0	274
Гиперфорин	1.8	535.4	272
Адгиперфорин	2.1	549.3	272
Псевдогиперицин	2.2	519.0	548, 591
Гиперицин	9.6	502.9	548, 593

2.5.2 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах эхинацеи пурпурной

Анализ экстрактов эхинацеи пурпурной проводили методом ВЭЖХ-ДМД-МС. Для этого в среде программы LCMS Solution (Shimadzu, Япония) устанавливали параметры инструмента для градиентного элюирования: подвижная фаза А – ацетонитрил, подвижная фаза В – 0.1% муравьиная кислота в воде (по объему).

Система для определения фенилпропаноидов эхинацеи пурпурной имела вид, представленный в таблице 8.

Условия хроматографирования: скорость потока элюента 0.4 мл/мин; температура термостатирования колонки - 40°C; диапазон длин волн ДМД - 190-800 нм.

МС детектор: режим SCAN, отрицательная ионизация, напряжение на детекторе – 2.2 кВ, температура ионного источника – 250°C, диапазон сканирования – 120 до 700 m/z , скорость сканирования – 2000 аму/сек, скорость газа-распылителя – 1.5 мл/мин, напряжение на интерфейсе – 4.5 кВ.

Таблица 8 - ВЭЖХ-программа для фенилпропаноидов эхинацеи пурпурной

Время	Модуль	Действие	Значение
0.01	Насос	В.Сопс	95
0.01	Контроллер	Старт	
0.02	Автосамплер	Вкол	
2.00	Насос	В.Сопс	90
2.01	Насос	В.Сопс	90
10.00	Насос	В.Сопс	80
18.00	Насос	В.Сопс	70
28.00	Насос	В.Сопс	10
30.00	Насос	В.Сопс	10
31.00	Насос	В.Сопс	95
35.00	Контроллер	Стоп	

Обработку первичных данных и расчеты проводили в среде программы LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Хроматограммы водно-спиртовых экстрактов эхинацеи пурпурной, полученные в данных условиях представлены на рисунках 8 и 9.

Идентификацию аналитов подтверждали сопоставлением времен удерживания (таблица 9), УФ-спектров (приложение А) и МС-спектров определяемых соединений (приложение Б) с аналогичными характеристиками, полученными для стандартных веществ.

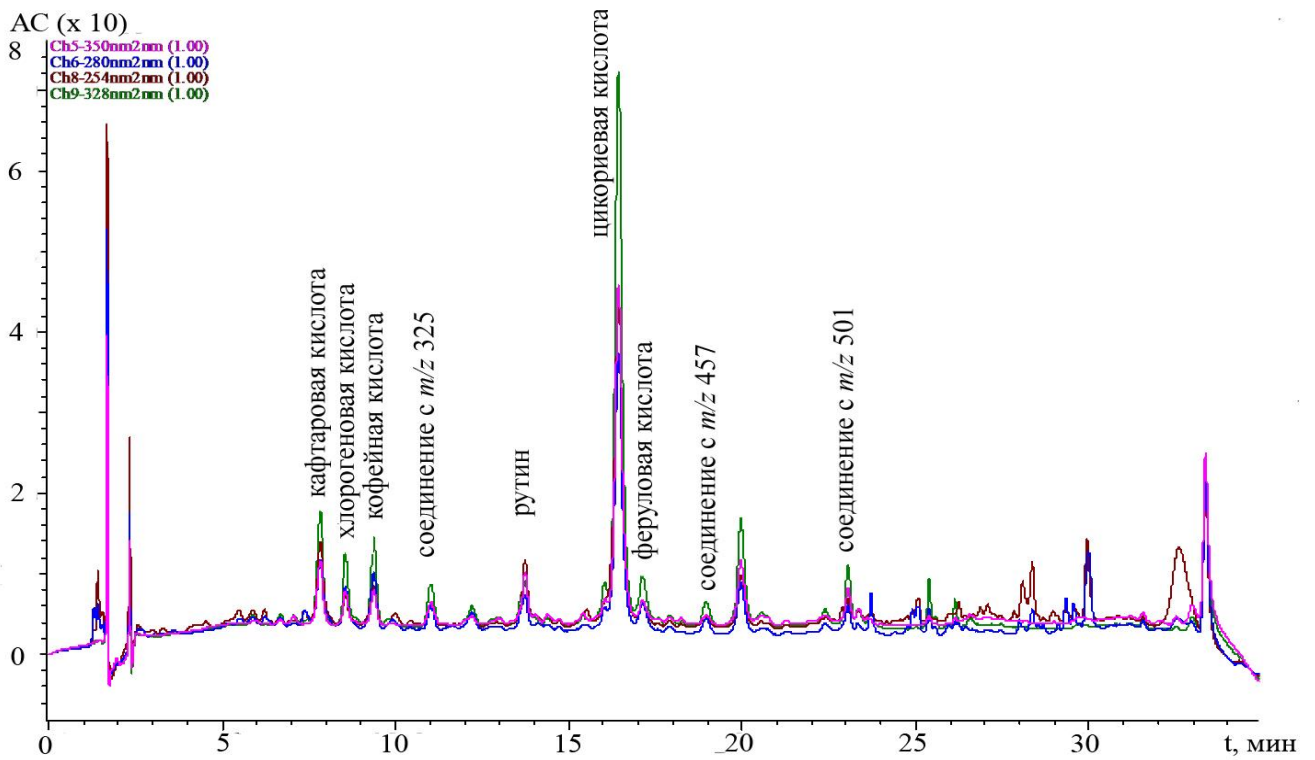


Рисунок 8 - Хроматограмма водно-метанольного экстракта эхинацеи пурпурной, полученного микроволновой экстракцией

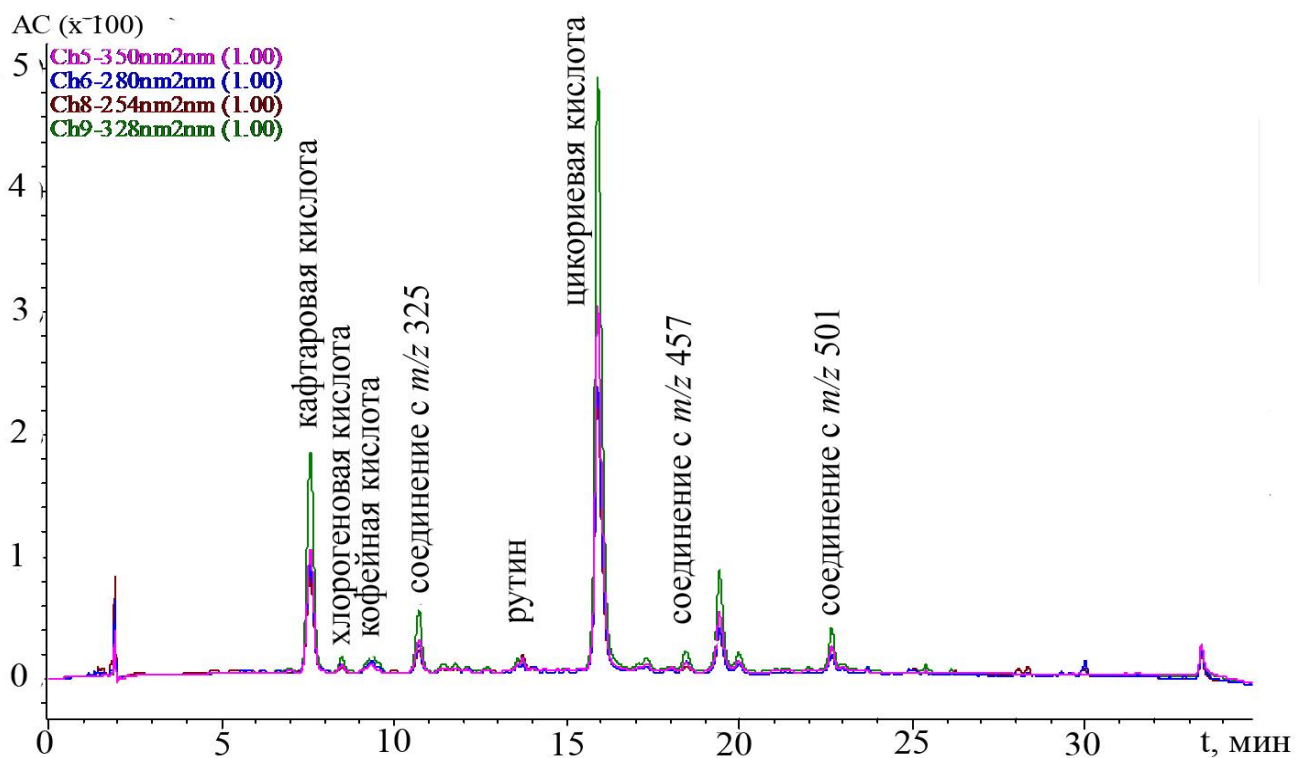


Рисунок 9 - Хроматограмма водно-этанольного экстракта эхинацеи пурпурной, полученного микроволновой экстракцией

Таблица 9 – Параметры идентификации фенилпропаноидов в экстрактах эхинацеи пурпурной в системе ВЭЖХ-ДМД-МС

Соединение	t_R , МИН	m/z	λ_{max} , НМ
Кафтаровая кислота	7.8	310.9	327
Хлорогеновая кислота	8.6	352.9	320
Кофейная кислота	9.3	178.8	326
Рутин	13.7	609.4	256, 354
Цикориевая кислота	16.2	472.9	327
Феруловая кислота	17.1	193.1	328

2.5.3 ВЭЖХ-ДМД-МС определение ФС в экстрактах клевера лугового

Анализ экстрактов клевера лугового проводили методом ВЭЖХ-ДМД-МС. Для этого в среде программы LCMS Solution (Shimadzu, Япония) устанавливали параметры инструмента для градиентного элюирования: подвижная фаза А – ацетонитрил, подвижная фаза В – 0.1% муравьиная кислота в воде (по объему). Система для определения изофлавоноидов имела вид, представленный в таблице 10.

Таблица 10 - ВЭЖХ-программа для изофлавоноидов клевера лугового

Время	Модуль	Действие	Значение
0.01	Насос	В.Сonc	70
0.01	Контроллер	Старт	
0.02	Автосамплер	Вкол	
7.00	Насос	В.Сonc	65
7.01	Насос	В.Сonc	65
15.00	Насос	В.Сonc	50
20.00	Насос	В.Сonc	40
22.00	Насос	В.Сonc	5
23.00	Насос	В.Сonc	5
28.00	Насос	В.Сonc	70
28.00	Контроллер	Стоп	

Условия хроматографирования: скорость потока элюента 0.35 мл/мин; температура термостатирования колонки – 30°C; диапазон длин волн ДМД – 190-800 нм.

МС детектор: режим SCAN, отрицательная ионизация, напряжение на детекторе 2 кВ, температура ионного источника – 250°C диапазон сканирования – 120 до 700 m/z , скорость сканирования – 2000 amu/sec, скорость газа-распылителя – 1.5 мл/мин, напряжение на интерфейсе – 3.5 кВ.

Обработка первичных данных и расчеты проводились в среде программы LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Хроматограмма водно-спиртового экстракта клевера лугового, полученная в данных условиях представлена на рисунке 10.

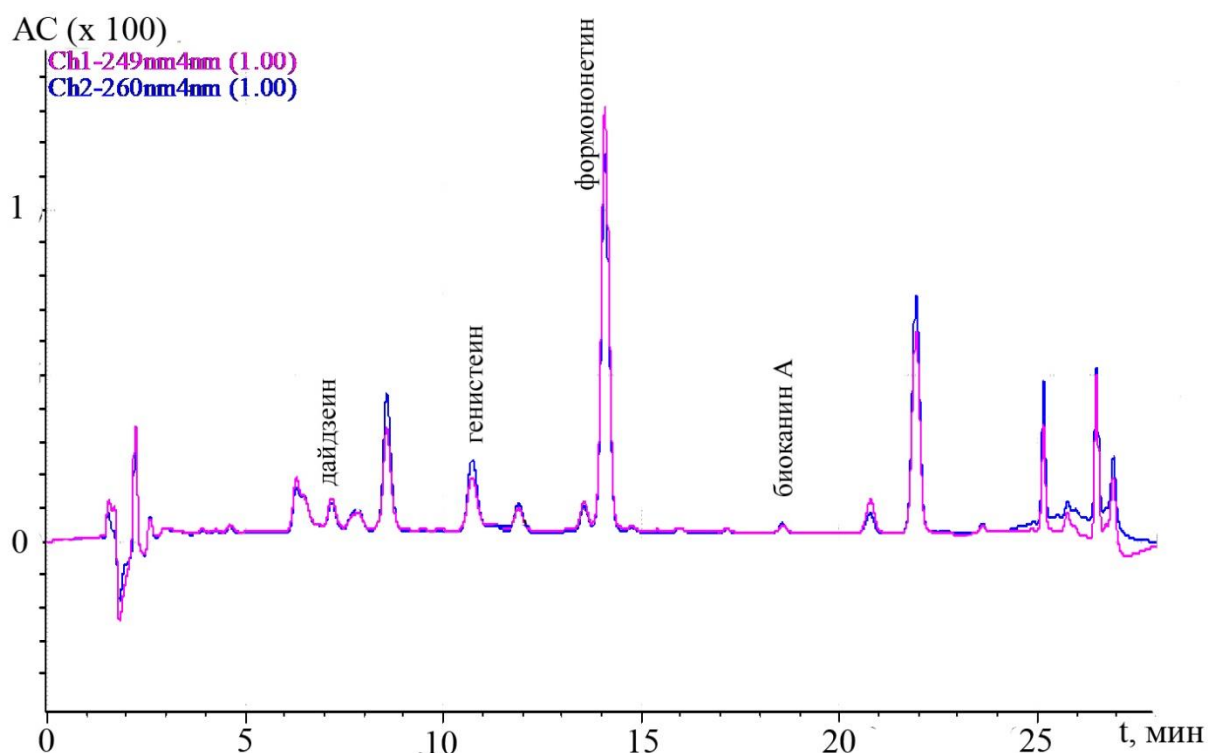


Рисунок 10 – Хроматограмма водно-этанольного экстракта соцветий клевера лугового

Идентификация аналитов подтверждалась сопоставлением времен удерживания (таблица 11), УФ-спектров (приложение А) и МС-спектров определяемых соединений (приложение Б) с аналогичными характеристиками, полученными для стандартных веществ.

Таблица 11 – Параметры идентификации изофлавоноидов в экстрактах клевера лугового в системе ВЭЖХ-ДМД-МС

Соединение	t_R , мин	m/z	λ_{max} , нм
Дайдзеин	6.1	253.2	249
Генистеин	11.0	269.2	260
Формонonetин	14.0	267.3	249
Биоканин А	18.6	283.3	260

2.6 Метрологические характеристики методик определения ФС в экстрактах ЛРС

Для количественной оценки содержания ФС в анализируемых экстрактах использовали рассчитанные метрологические характеристики (таблица 12). Для всех соединений установили градуировочные зависимости, диапазоны линейности, пределы обнаружения и определения.

Таблица 12 – Метрологические характеристики градуировочных растворов определяемых ФС в экстрактах ЛРС

Соединение	Диапазон линейности, мкг/мл	Градуировочная зависимость	S_H , мкг/мл	$S_{мин}$, мкг/мл
3,4-дигидроксibenзойная кислота	0.8-100	$y = (52270 \pm 520) x$	0.78	0.13
Неохлорогеновая кислота	0.5-100	$y = (29660 \pm 480) x$	0.49	0.10
Хлорогеновая кислота	0.6-100	$y = (33700 \pm 710) x$	0.60	0.10
(-)-эпикатехин	0.5-100	$y = (12510 \pm 150) x$	0.49	0.07
Рутин	0.4-200	$y = (26820 \pm 220) x$	0.43	0.10
Гиперозид	0.7-100	$y = (38450 \pm 380) x$	0.73	0.10
Изокверцитрин	0.3-100	$y = (45010 \pm 510) x$	0.34	0.07
Кверцитрин	0.3-100	$y = (41650 \pm 1170) x$	0.32	0.10
Кверцетин	1.2-100	$y = (55600 \pm 680) x$	1.24	0.20
Гиперфорин	0.2-125	$y = (6970 \pm 100) x$	0.24	0.16
Гиперицин	0.3-20	$y = (19000 \pm 490) x$	0.30	0.10
Кофейная кислота	0.2-200	$y = (60420 \pm 230) x$	0.24	0.12
Цикориевая кислота	0.3-200	$y = (30230 \pm 110) x$	0.30	0.10
Дайдзеин	0.1-10	$y = (106700 \pm 1100) x$	0.10	0.03
Генистеин	0.1-10	$y = (112000 \pm 2600) x$	0.07	0.02
Формонonetин	0.1-10	$y = (100400 \pm 2400) x$	0.10	0.03

Примечание. S_H – предел определения; $S_{мин}$ – предел обнаружения

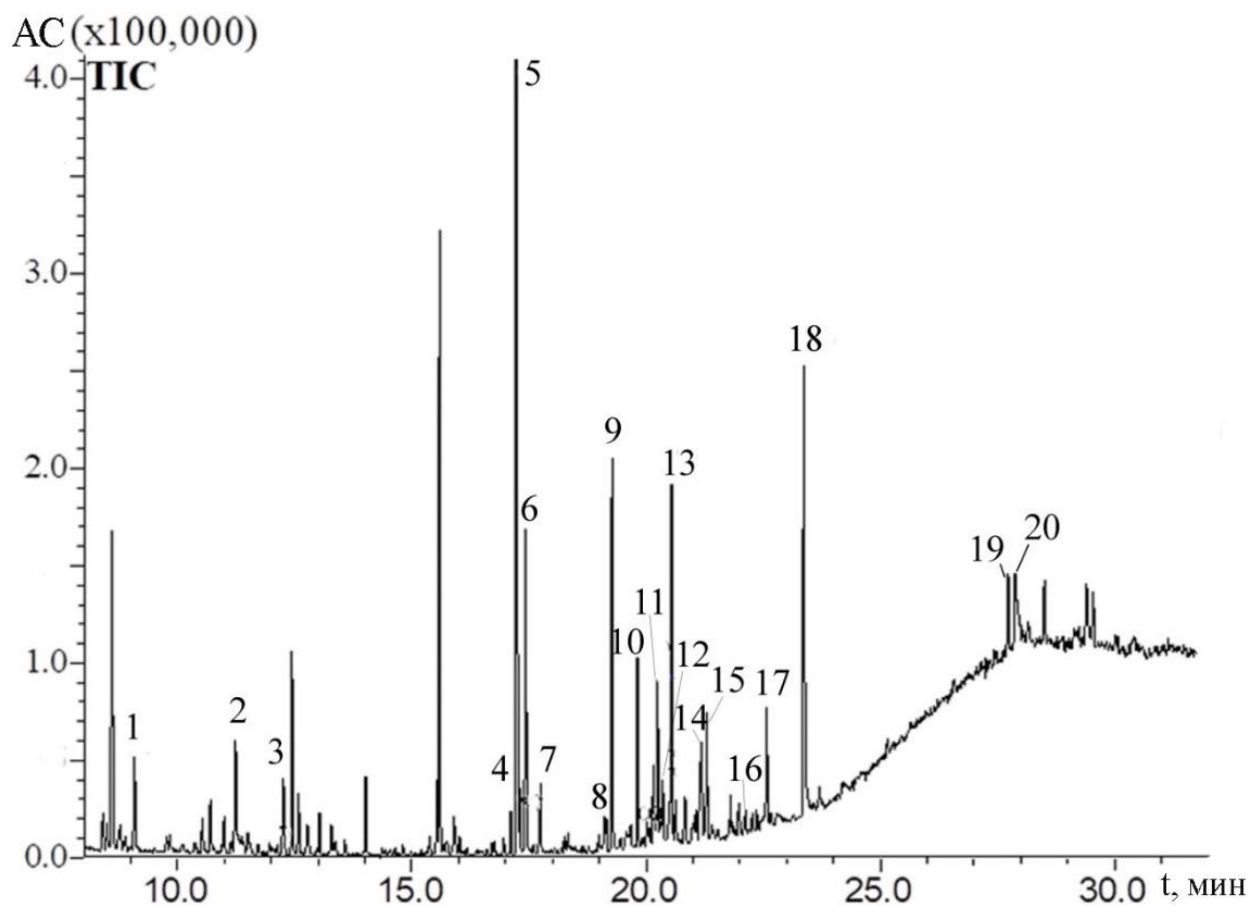
2.7 ГХ-МС определение ФС в экстрактах ЛРС

Газохроматографический анализ извлечений проводили с использованием программируемого режима нагрева колонки: 100°C (0–3 мин), линейный подъем температуры до 300°C со скоростью 9 град/мин (3–26 мин) и выдерживание данной температуры в течение 25 мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. Режим ввода – с делением потока 1:5. Температура термостата колонки составляла 100°C, инжектора – 280°C. В качестве газа-носителя использовали гелий, линейная скорость потока 25.1 см/мин.

Оптимизированные параметры работы масс-спектрометра: температура ионного источника 200°C, температура интерфейса 280°C, напряжение на детекторе 1.3 кВ, режим сканирования SCAN, скорость сканирования масс-спектра 2000 а.е.м./с, диапазон сканируемых масс 34–900 m/z . Полученные дериваты фенольных соединений идентифицировали сопоставлением полученных масс-спектров со спектрами, имеющимися в базах данных NIST05 и WILEY8.

Обработка первичных данных и расчеты проводились в среде программы GCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Пример хроматограммы ацетонитрильного элюата дериватов фенольных соединений эхинацеи пурпурной, полученного в данных условиях, представлен на рисунке 11.



1 – акриловая кислота, 2 ТМС; 2 – 3-гидроксиизомасляная кислота, 2ТМС;
 3 – бензойная кислота, ТМС; 4 – винная кислота, 4 ТМС; 5 - 2-С-метилрибоновая кислота, 5 ТМС; 6 – *para*-гидроксibenзойная кислота, ТМС; 7 – винная кислота, ТМС; 8 - γ -резорциловая кислота, 3 ТМС; 9 - арабинофураноза, 4 ТМС; 10 - протокатеховая кислота, ТМС; 11 - D-фруктоза, 5 ТМС; 12 - D-глюкопираноза, 5 ТМС; 13 - β -D-галактофураноза, 5 ТМС; 14 - D-рибофураноза, 4 ТМС; 15 – *meta*-кумаровая кислота, 2 ТМС; 16 - гомованилиновая кислота, 2 ТМС; 17 - феруловая кислота, 2 ТМС; 18 - кофейная кислота, ТМС; 19 - сахароза, 8 ТМС; 20 - 1-монопальмитин, 2ТМС

Рисунок 11 – ГХ-МС хроматограмма ацетонитрильного элюата водного экстракта эхинацеи пурпурной, прошедшего через сорбент Strata C18-E

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В аналитический обзор сведены данные различных авторов [91–98, 112–118, 128, 129] по экстракции ФС из растительных материалов. Однозначную оценку эффективности способов извлечения ФС сложно провести в силу неидентичных условий анализа, неполной информации об условиях экстракции, что усложняет систематизацию данных исследователей.

В диссертационном исследовании оценена эффективность различных способов экстракции ФС, обуславливающих биологическую активность ЛРС различных семейств в условиях одинаковых соотношений растительного сырья с экстрагентом, за исключением способа, прописанного в Государственной Фармакопее РФ [42]. Суммарное и индивидуальное содержание ФС в экстрактах определяли хроматографически в оптимальных условиях для каждого вида ЛРС.

3.1 Оценка эффективности извлечения ФС из ЛРС различными способами экстракции

3.1.1 Эффективность извлечения ФС из эхинацеи пурпурной

Для оценки эффективности извлечения ФС из эхинацеи пурпурной различными экстрагентами изучили суммарное содержание фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту и концентрации индивидуальных ФС. Для получения этих данных оценку концентраций индивидуальных и суммарного содержаний аналитов проводили в полученных различными способами экстрактах эхинацеи пурпурной.

Экстракт эхинацеи пурпурной, полученный по методике фармакопейной статьи [42], содержал 0.29 мг/г хлорогеновой кислоты (ХЛГ), 0.23 мг/г кофейной кислоты (КФК), 0.34 мг/г рутин (РТ), 15 мг/г цикориевой кислоты (ЦК) и 4.9 мг/г кафтаровой кислоты (КФР) [169]. Суммарное содержание ФС в пересчете на ЦК

составило 26 мг/г. Недостатком данного способа является его продолжительность (нагревание более 1.5 часов) и нерегулируемая температура нагрева растительного образца.

Микроволновое извлечение ФС из эхинацеи пурпурной проводили водно-спиртовой смесью, содержащей 50, 70 и 100% объемных долей этилового и метилового спирта (рисунок 12). Наибольшее извлечение фенольных соединений наблюдали при использовании 70%-го метилового спирта (рисунок 12, а), которое по степени извлечения аналитов этиловым спиртом в аналогичных условиях имеет схожие характеристики (рисунок 12, б).

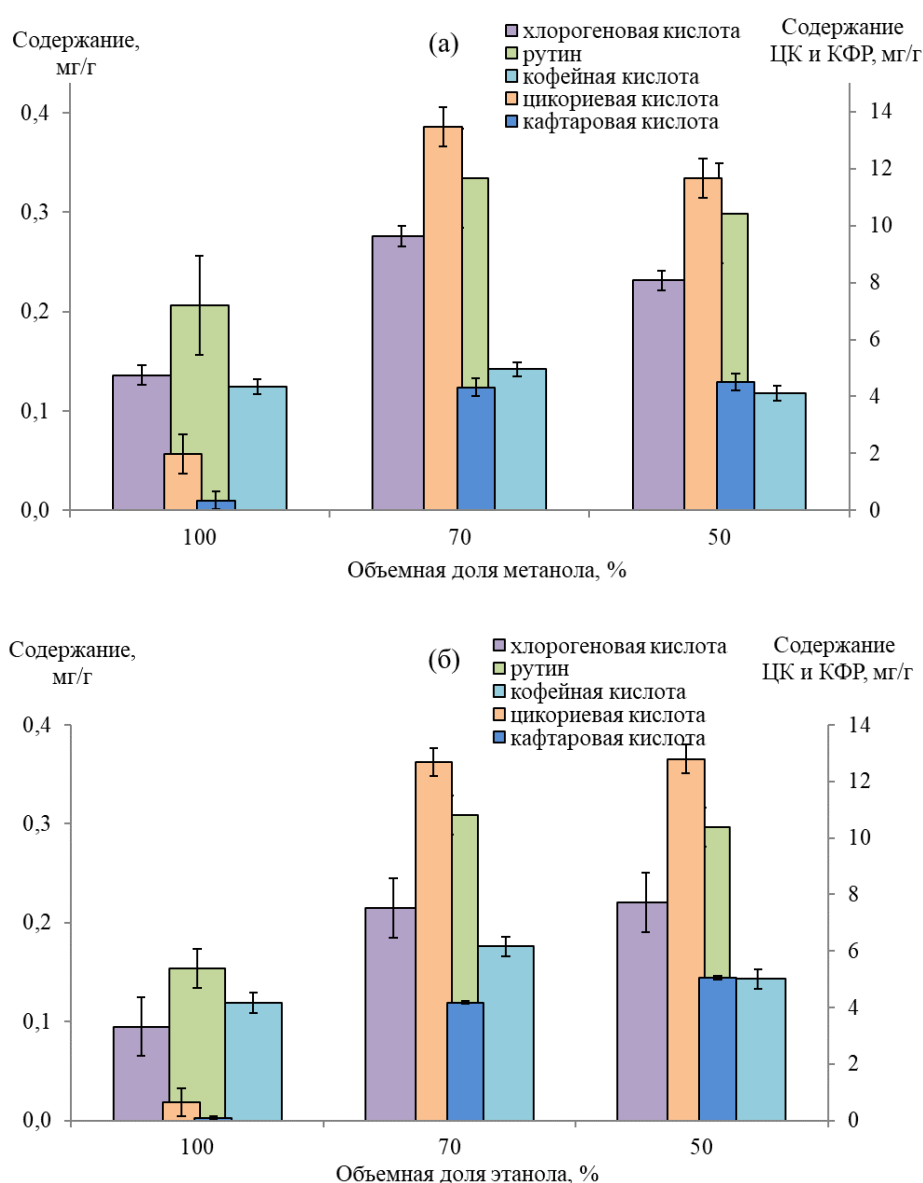
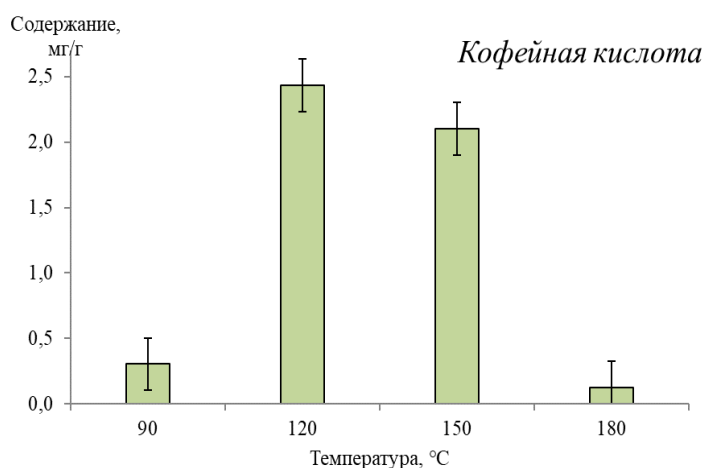
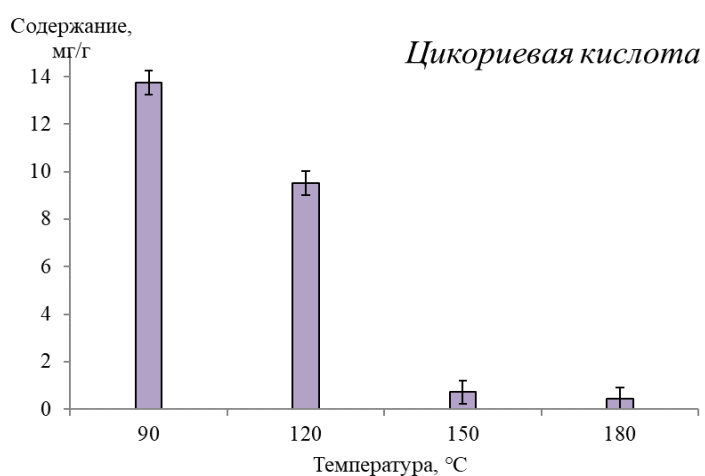


Рисунок 12 – Содержание ФС в водно-метанольных (а) и водно-этанольных (б) экстрактах эхинацеи пурпурной

При микроволновой экстракции 70%-ым этиловым спиртом извлекли 12.7 мг/г ЦК, 0.21 мг/г ХЛГ, 0.18 мг/г КФК и 0.31 мг/г РТ [169]. Суммарное содержание присутствующих в экстракте ФС составило 22 мг/г в пересчете на ЦК. 70%-ый метанол в этих же условиях извлекает 24 мг/г суммарно ФС в пересчете на ЦК. Обе экстракционные системы в идентичных условиях извлекали сопоставимые количества ФС, поэтому дальнейшие экспериментальные исследования проводили 70%-ой водно-этанольной смесью.

В *субкритических условиях* извлечение ФС из растительного материала 70%-ым этанолом проводили в диапазоне 90 – 180°C с шагом в 30°C. Время экстракции составляло 20-25 мин., из которых около 10-15 мин. уходило на достижение необходимой температуры. Давление в системе в момент экстракции составляло 7.1 МПа. Оптимальными условиями извлечения индивидуальных компонентов 70%-ым этанолом оказалась температура 120°C, за исключением ЦК (рисунок 13).



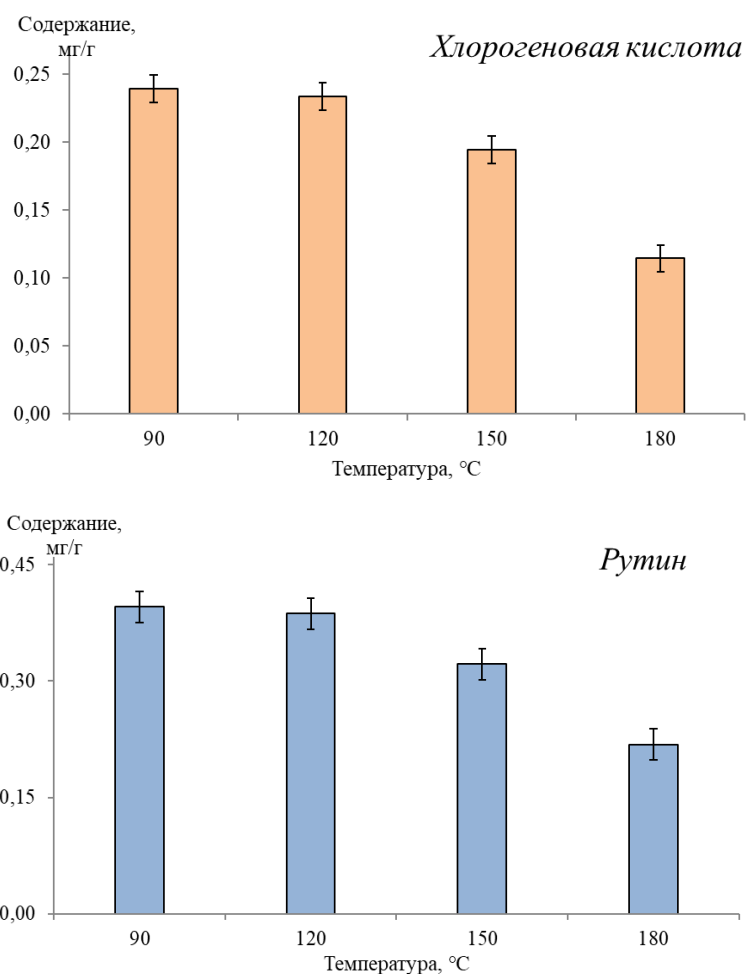


Рисунок 13 – Содержание ФС в 70%-ом водно-этанольном экстракте эхинацеи пурпурной в условиях субкритической экстракции

При 120°C из сырья извлекли 0.23 мг/г ХЛГ, 2.4 мг/г КФК, 0.39 мг/г РТ, 9.5 мг/г ЦК и 5.2 мг/г КФР [169]. Цикориевая кислота максимально извлекалась при 90°C (13.8 мг/г), при дальнейшем повышении температуры, по-видимому, протекает ее деструкция [167, 170, 171]. Извлечение ХЛГ и РТ из эхинацеи пурпурной при 90 и 120°C оказалось соизмеримым и составило 0.24 и 0.40 мг/г соответственно (рисунок 13). Суммарный баланс извлекаемых ФС при 90 и 120°C в пересчете на ЦК оказался равным и составил в обоих случаях 23 мг/г. Разница заключалась в соотношениях извлекаемых конкретных соединений. Суммарное извлечение ФС из эхинацеи 70%-ым этанолом в пересчете на ЦК сопоставимо с данными, полученными микроволновой экстракцией и по методике фармакопейной статьи.

Ультразвуковая экстракция ФС 70%-ым этанолом оказалась менее эффективной среди всех способов извлечения (таблица 13), суммарное извлечение ФС этим способом составило 13 мг/г в пересчете на ЦК, из которых 8.3 мг/г – ЦК.

Таблица 13 – Содержание ФС в водно-спиртовых экстрактах эхинацеи пурпурной, полученных различными способами, мг/г (n=3, P=0.95)

Соединение	Способ извлечения			
	Государственная Фармакопея РФ	Микроволновая экстракция	Ультразвуковая экстракция	Субкритическая экстракция
Хлорогеновая кислота	0.29 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.23 ± 0.03
Кофейная кислота	0.23 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.092 ± 0.008	2.4 ± 0.2
Рутин	0.34 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.24 ± 0.08	0.39 ± 0.02
Цикориевая кислота	15.0 ± 0.6	12.7 ± 1.3	8.3 ± 0.7	9.5 ± 0.7
Кафтаровая кислота	4.9 ± 0.2	4.2 ± 0.4	2.2 ± 0.2	5.2 ± 0.4
Суммарное содержание ФС*	26 ± 1	22 ± 2	13 ± 1	23 ± 2

Примечание. * - в пересчете на цикориевую кислоту

3.1.2 Эффективность извлечения ФС из клевера лугового

Подбор оптимального состава растворителя для экстракции изофлавоноидов из клевера лугового. Оценку эффективности извлечения изофлавоноидов [172] изучали по концентрациям дайдзеина, генистеина, формонетина и биоканина А в водно-спиртовых системах при УЗЭ из соцветий клевера лугового с различным объемным содержанием этилового и метилового спирта (30, 50, 70 и 100 %) (рисунок 14).

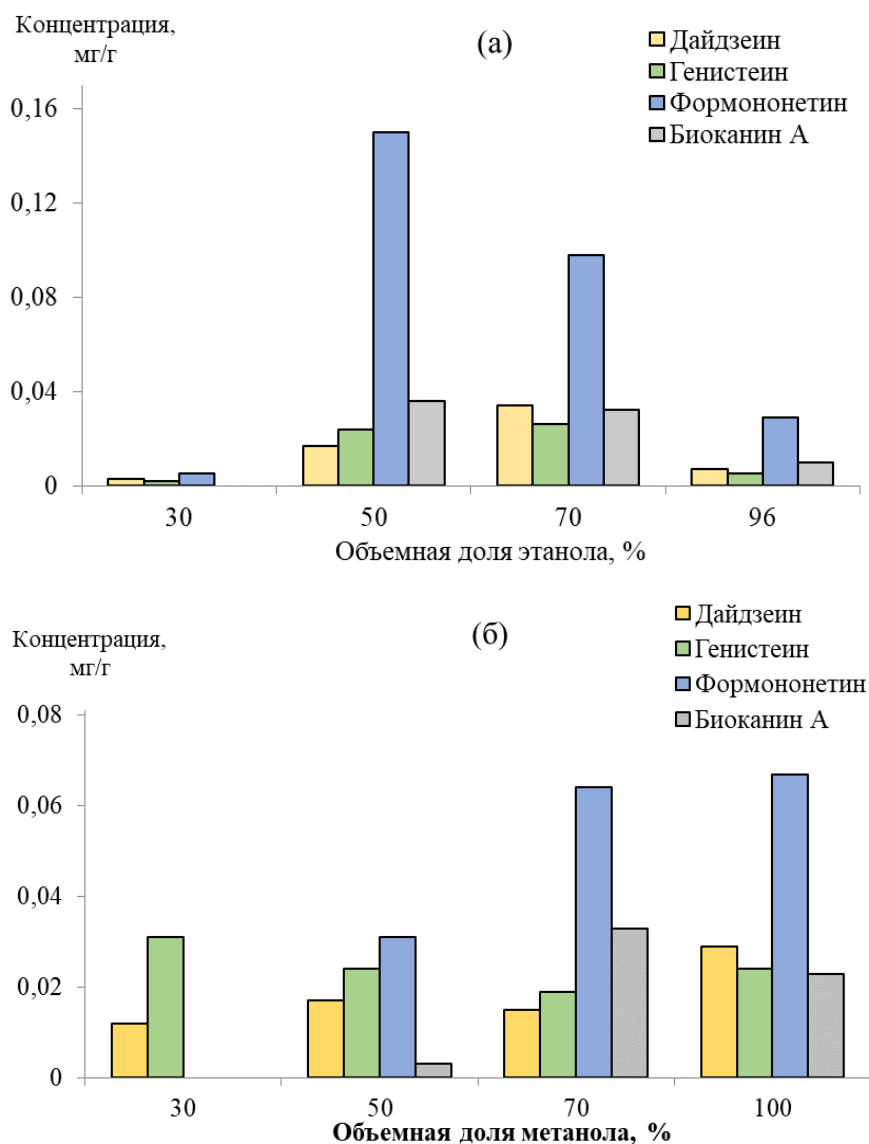


Рисунок 14 - Концентрации дайдзеина, генистеина, формононетина и биоканина А в этанольных (а) и метанольных (б) экстрактах соцветий клевера лугового, полученных с помощью УЗЭ

Из полученных диаграмм (рисунок 14) видно, что качественный и количественный выход изофлавоноидов с использованием водно-спиртовых смесей различного состава в качестве экстрагента разные. Максимальное суммарное извлечение изофлавоноидов метанолом достигается при его 100%-ном содержании и составляет 0.143 мг/г, включая 0.029 мг/г дайдзеина (ДЗ), 0.024 мг/г генистеина (ГН), 0.067 мг/г формононетина (ФН) и 0.023 мг/г биоканина А (БКА). С использованием в качестве экстрагента этилового спирта наблюдается иной характер выхода изофлавоноидов. Максимальное суммарное извлечение

изофлавоноидов наблюдалось при использовании водно-этанольной системы с 50% этилового спирта – 0.227 мг/г, из которых большую часть составляет формонетин – 0.150 мг/г. Более сбалансированный выход изофлавоноидов достигается 70%-ой водно-этанольной экстракционной системой, суммарно извлекающей 0.190 мг/г, включая 0.034 мг/г ДЗ; 0.026 мг/г ГН; 0.098 мг/г ФН и 0.032 мг/г БКА. Также можно заметить, что наибольшее извлечение дайдзеина достигается 70%-ым этанолом (0.034 мг/г), а генистеина – 30% метанолом (0.031 мг/г). С учетом полученных результатов 70%-ая водно-этанольная система в дальнейших исследованиях была выбрана в качестве оптимального растворителя.

Эффективность экстракции изофлавоноидов из соцветий клевера лугового различными способами. Для этих целей изучали и сравнивали способы экстракции - субкритическую, ультразвуковую, микроволновую и твердофазную экстракции, а также экстракцию по Государственной Фармакопее РФ. Полученные результаты сведены в таблицу 14.

Таблица 14 – Содержание изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах клевера лугового, полученных различными способами извлечения, мг/г (n=3, P=0.95)

Соединение	Ультразвуковая экстракция	Микроволновая экстракция	Субкритическая экстракция	Фармакопея РФ *
Дайдзеин	0.034 ± 0.005	0.014 ± 0.003	0.015 ± 0.002	0.007 ± 0.001
Генистеин	0.026 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.003	0.009 ± 0.002
Формонетин	0.098 ± 0.007	0.129 ± 0.003	0.210 ± 0.020	0.043 ± 0.009
Биоканин А	0.032 ± 0.006	0.051 ± 0.005	0.340 ± 0.050	0.041 ± 0.008
Суммарное содержание изофлавоноидов	0.190 ± 0.010	0.225 ± 0.009	0.598 ± 0.030	0.100 ± 0.009

Примечание. * в качестве экстрагента – 96%-ный этанол

В Государственной Фармакопее РФ отсутствует способ экстракции ФС флавоноидного ряда из клевера лугового, но описан способ экстракции 96%-ным этанолом кипячением с обратным холодильником фенольных соединений флавоноидного ряда из высушенной и измельченной травы Донника (*Melilotus L.*), относящейся к семейству Бобовые. Исходя из их принадлежности к одному семейству, этот способ экстракции применили по отношению к клеверу луговому. Согласно Фармакопее РФ, в экстракционную систему добавляется соляная кислота, разрушающая гликозидные связи, что не отражает определение нативных форм изофлавоноидов. В данных условиях из клевера лугового извлекли 0.007 мг/г ДЗ, 0.009 мг/г ГН, 0.043 мг/г ФН и 0.041 мг/г БКА (таблица 14). Сравнивая эти данные с результатами, приведенными в таблице 3, можно отметить, что суммарное содержание изофлавоноидов в исследуемом водно-этанольном экстракте ниже, что связано, по-видимому, с большим сродством ГН, ФН и БКА к метанолу. Степень экстракции ДЗ из исследуемого водно-этанольного экстракта оказалась выше, чем 80%-ым метанолом. Недостатком данного способа является продолжительность и трудоемкость, а также извлечение в экстракт большого количества других компонентов.

Наличие в изофлавоноидах полярных групп позволяет применить микроволновое излучение для их извлечения. Экстракцию целевых соединений проводили при 300 – 450 Вт, т.к. при более высоких значениях возможен разрыв клеточной стенки и извлечение в растворитель матричных компонентов. Выход целевых компонентов повышается с увеличением продолжительности микроволновой экстракции, но при этом возрастает и риск их деструкции. При микроволновой экстракции концентрации дайдзеина, генистеина, формонетина и биоканина А оказались выше по сравнению с данными, полученными Фармакопеей РФ. Суммарное содержание изофлавоноидов в полученных при МВЭ и Фармакопейном способе извлечения составило 0.225 и 0.100 мг/г соответственно. С другой стороны, МВЭ по эффективности уступает субкритической экстракции (таблица 14).

Субкритическую экстракцию изофлавоноидов проводили 70%-ным этанолом. Результаты по суммарному извлечению изофлавоноидов (0.598 мг/г) показали, что такой способ является наиболее эффективным. По количеству извлеченного дайдзеина субкритическая экстракция сопоставима с МВЭ (0.015 мг/г и 0.014 мг/г соответственно), но почти в два раза менее эффективна, чем УЗЭ (таблица 14). Низкие содержания дайдзеина при использовании МВЭ и СЭ возможны из-за его вероятной деструкции под воздействием микроволнового излучения, нагревания или повышенного давления.

Одним из распространенных способов извлечения изофлавоноидов из растительного сырья считается ультразвуковая экстракция, которая более экспрессна и позволяет использовать большую выборку растворителей. Дайдзеин и биоканин А в условиях УЗЭ извлекались в количествах, сопоставимых с данными их экстракции мацерацией. Содержание генистеина в извлечении (0.026 мг/г) сопоставимо с МВЭ (0.031 мг/г) и субкритической экстракцией (0.033 мг/г), а также с полученными другими авторами и приведенными в таблице 3 данными при проведении ЖЭ 80%-ным метанолом, но меньше, чем мацерацией (0.051 мг/г).

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что наиболее эффективным способом извлечения изофлавоноидов является субкритическая экстракция. С другой стороны, учитывая тот факт, что в различных условиях выходы индивидуальных компонентов разные, считаем, что способ экстракции необходимо выбирать исходя из поставленных аналитических и / или технологических задач.

3.1.3 Эффективность извлечения ФС из зверобоя продырявленного

Для извлечения ФС из зверобоя продырявленного также использовали способ, указанный в Фармакопее РФ, микроволновую, ультразвуковую и

субкритическую экстракции. Более подробно процессы оптимизации данных способов экстракции описаны в [102, 173].

Полученные при экстракции аналитов различными методами данные представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Содержание ФС в водно-спиртовых экстрактах зверобоя продырявленного, мг/г (n=3, P=0.95) [102, 173]

Соединение	Способ извлечения			
	Фармакопея РФ	Микроволновая экстракция	Ультразвуковая экстракция	Субкритическая экстракция
3,4-дигидроксibenзойная кислота	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.133 ± 0.008	0.208 ± 0.004
Неохлорогеновая кислота	2.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.63 ± 0.08	2.2 ± 0.1
Хлорогеновая кислота	1.15 ± 0.07	0.97 ± 0.06	0.85 ± 0.03	1.1 ± 0.1
(-)-эпикатехин	0.71 ± 0.07	0.7 ± 0.1	0.50 ± 0.06	0.88 ± 0.08
Рутин	13.9 ± 0.5	12.5 ± 0.6	9.9 ± 0.3	13 ± 1
Гиперозид	7.3 ± 0.4	6.8 ± 0.4	5.4 ± 0.1	7.3 ± 0.5
Изокверцитрин	2.6 ± 0.1	2.38 ± 0.04	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Кверцитрин	1.48 ± 0.08	1.4 ± 0.2	1.15 ± 0.04	1.4 ± 0.1
Кверцетин	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.3	1.2 ± 0.1	3.3 ± 0.3
Фурогиперфорин	0.64 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.48 ± 0.03	0.7 ± 0.1
Гиперфорин	11.6 ± 0.9	10.9 ± 0.9	8 ± 2	13 ± 1
Адгиперфорин	1.9 ± 0.8	1.50 ± 0.03	1.3 ± 0.3	1.97 ± 0.04
Псевдогиперицин	0.51 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.26 ± 0.02	0.50 ± 0.03
Гиперицин	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.25 ± 0.03
Суммарное содержание ФС	47 ± 3	44 ± 3	33 ± 4	48 ± 5

Как видно, показатели прописанного в Фармакопее РФ способа экстракции по извлечению ФС (суммарное содержание ФС) зверобоя продырявленного сопоставимы по эффективности с микроволновой и субкритической экстракцией. Но, в условиях субкритической экстракции количество извлекаемого гиперфорина, (-)-эпикатехина и кверцетина выше. Микроволновая экстракция в отношении некоторых индивидуальных соединений, например, фурогиперфорина, обеспечила максимальные степени их извлечения по

сравнению с альтернативными способами экстракции. Данный факт, по-видимому, можно объяснить трансформацией гиперфорина в процессе микроволнового воздействия. Также, как и в случае с образцами ЛРС эхинацеи пурпурной (таблица 13) и клевера лугового (таблица 14), ультразвуковая экстракция оказалась менее эффективной, по сравнению с вышеперечисленными.

Учитывая перспективность применения твердофазной экстракции для концентрирования и идентификации ФС, нами рассмотрены аспекты, связанные с твердофазной экстракцией ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного (раздел 3.4).

3.2 Влияние географических и морфологических факторов на содержание ФС в экстрактах ЛРС

Географические условия произрастания ЛРС играют немаловажную роль в их компонентном составе [14], а именно они оказывают непосредственное влияние на накопление ФС в растении. Немаловажным также является прослеживание закономерностей накопления ценных компонентов в различных морфологических частях растений, используемых в дальнейшем в различного вида производствах. С учетом этих посылов нами проведены исследования, направленные на сопоставление данных о содержании ФС в экстрактах образцов одного вида ЛРС, собранных / полученных с различных географических мест произрастания и с учетом морфологии растений [169].

Влияние географического фактора на содержание ФС в экстрактах ЛРС оценивали на примере водно-спиртовых экстрактов эхинацеи пурпурной, полученных при микроволновой экстракции из произрастающих на различных территориях растений (таблица 16).

Таблица 16 – Содержание ФС в водно-спиртовых экстрактах эхинацеи пурпурной, произрастающей на различных территориях и полученных микроволновой экстракцией, мг/г (n=3, P=0.95)

Тип образца	Образец	Место произрастания	Высота над уровнем моря, м	Соединение					Суммарное содержание ФС *	ЦК/КФР
				Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота	Рутин	Цикориевая кислота	Кафтаровая кислота		
чай	Травы Горного Крыма	респ. Крым, высокогорье Демерджи	325-1200	0.034 ± 0.002	0.119 ± 0.012	0.513 ± 0.042	6.60 ± 0.24	2.24 ± 0.11	11.6 ± 0.4	2.9
	Емельяновская биофабрика	Новгородская область, Хвойнинский р-н, деревня Емельяновское	164	0.046 ± 0.002	0.4 ± 0.2	0.25 ± 0.07	16.5 ± 0.6	4.93 ± 0.02	24.5 ± 0.8	3.3
трава растения	Фитофарм	Краснодарский край, г. Анапа	32	0.033 ± 0.001	0.26 ± 0.17	0.236 ± 0.002	9.2 ± 0.8	3.10 ± 0.13	16 ± 1	3
	Родные травы	Адыгея, ст. Севастопольская	420	0.075 ± 0.002	0.5 ± 0.3	0.33 ± 0.02	20.7 ± 0.2	7.57 ± 0.2	34.7 ± 0.7	2.7
	Травы Кавказа	Краснодарский край, г. Горячий Ключ	58	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.31 ± 0.02	12.7 ± 1.3	4.2 ± 0.4	22 ± 2	3
	[115] ¹	Elmakuzu, Бозязы/Мерсин, Турция	1550	0.0013 ± 0.0006	n.d	n.d	0.131 ± 0.017	0.260 ± 0.009	0.39 ± 0.01	0.5
	[115] ²		1550	n.d.	n.d	n.d	0.0033 ± 0.0002	0.024 ± 0.001	0.027 ± 0.002	0.14

Примечание. * - в пересчете на цикориевую кислоту; ¹данные [115], полученные ультразвуковой экстракцией; ²данные [115], полученные сверхкритической флюидной экстракцией; n.d – нет данных

При проведении этих исследований принимали во внимание отсутствие информации об условиях сбора эхинацеи пурпурной на упаковках производителей. Предположительно, производители сырья соблюдали рекомендации, описанные в [174] и предполагающие определенные условия выращивания и сбора растительного материала эхинацеи пурпурной.

Исходя из того, что содержание ФС в растениях может меняться в зависимости от географического места его произрастания [175], изучали извлечения, полученные микроволновой водно-спиртовой экстракцией с объемной долей спирта 70% из образцов эхинацеи, выращенных на различных территориях России и полученных от разных производителей (таблица 16). Данный показатель по суммарным содержаниям фенольных соединений был минимальным для образцов «Травы Горного Крыма» (11.6 мг/г) и максимальным – для производителя «Родные Травы» (34.7 мг/г).

Наивысшее значение суммарного содержания ФС в пересчете на ЦК соответствовало выращенному на высоте 420 м над уровнем моря образцу «Родные Травы». По полученным данным прослеживалась закономерность – суммарное содержание ФС в растении повышалось с увеличением высоты над уровнем моря, т.е. места его произрастания. Однако данные по суммарному содержанию ФС в образцах компании «Травы Горного Крыма» выпадали из данной закономерности, несмотря на предполагаемый диапазон высот произрастания растения 325 – 1200 м над уровнем моря и наибольшее содержание рутина (0.5 мг/г) в экстрактах. Предположительно, заниженные данные по суммарному содержанию ФС в образце «Травы Горного Крыма» можно объяснить тем, что при производстве чая в его состав, для улучшения потребительских свойств, возможно добавляли другие травы.

Выявленная взаимосвязь не соблюдалась для образцов, собранных, по данным [115], на высоте 1550 м над уровнем моря (таблица 16). Эти данные, полученные в условиях ультразвуковой и сверхкритической флюидной экстракций, сравнили с результатами по образцам, выращенным на высоте 420 м

над уровнем моря. Суммарное содержание ФС в образцах [115] значительно ниже по сравнению с полученными нами результатами, что вероятно связано с влиянием на накопление фенольных соединений не только высоты произрастания над уровнем моря, но и других климатических условий в целом. Тем не менее, данное предположение носит предварительный характер, и требует дополнительного изучения с расширением выборки растительных образцов.

Влияние морфологического фактора на содержание ФС в водно-спиртовых экстрактах клевера лугового устанавливали сравнением концентрации изофлавоноидов, выделенных ультразвуковой экстракцией из различных морфологических частей растения – листьев, стеблей и соцветий (таблица 17), в оптимизированных условиях извлечения. Максимальное содержание изофлавоноидов (0.190 мг/г) наблюдали в водно-этанольном экстракте соцветий.

Таблица 17 – Содержание изофлавоноидов в водно-этанольных экстрактах разных морфологических частей клевера лугового, мг/г (n=3, P=0.95)

Часть растения	Соединение				Суммарное содержание изофлавоноидов
	Дайдзеин	Генистеин	Формонетин	Биоканин А	
Соцветия	0.034 ± 0.005	0.026 ± 0.003	0.098 ± 0.007	0.032 ± 0.006	0.190 ± 0.010
Листья	0.003 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.021 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.070 ± 0.006
Стебли	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.022 ± 0.004

Концентрации изофлавоноидов в морфологических частях клевера лугового отличны от данных авторов [121, 122, 124, 126–129], приведенных в таблице 3. Объективно прокомментировать данные отличия не представляется возможным, т.к. полную идентичность условий произрастания, времени сбора, получения экстрактов клевера лугового из публикаций установить не удалось.

3.3 Оценка качества ЛРС и препаратов на его основе по содержанию ФС в их экстрактах

Различные нормативные документы оценивают качество эхинацеи пурпурной по суммарному содержанию производных гидроксикоричных кислот в пересчете на ЦК [42]; суммарному содержанию ФС от суммы КФР и ЦК [111] и по концентрации ЦК в пересчете на сухое вещество [176]. Установлено, что соотношения характеристичных компонентов в экстрактах лекарственных растений могут служить альтернативой традиционным способам определения качества растительных материалов и препаратов на его основе [177, 168].

Концентрации индивидуальных ФС в водно-спиртовых экстрактах образцов эхинацеи пурпурной, отобранных на различных территориях, разнятся (таблицы 13 и 16). С другой стороны, соотношение концентраций цикориевой кислоты к кафтаровой кислоте (ЦК / КФР) в этих экстрактах остается постоянным и близко к 3 (таблица 16). Данное соотношение постоянно в отобранных на различных территориях образцах сырья эхинацеи пурпурной, поэтому посчитали возможным его использование в качестве *показателя качества и подлинности растительного сырья* эхинацеи. В образцах травы эхинацеи пурпурной производителей «Фитофарм» и «Травы Кавказа» данное соотношение равно 3, а образцах чая производителей «Травы Горного Крыма» и «Емельяновская биофабрика» - 2.9 и 3.3 соответственно. Несмотря на наибольшее содержание цикориевой и кафтаровой кислот в водно-спиртовых экстрактах образца «Родные Травы», данное соотношение оказалось равным 2.7 (таблица 16).

Предложенный показатель качества применили к экспериментальным данным по растительному материалу, представленным в работе [115] (таблица 16). К сожалению, данные оказались не совсем полными, а соотношение ЦК / КФР в полученных ультразвуковой и сверхкритической флюидной экстракцией извлечениях, составило 0.5 и 0.14. Судя по концентрациям индивидуальных фенольных соединений в экстрактах, возможно, авторы [115] анализировали

травяные сборы на основе эхинацеи пурпурной или условия извлечения компонентов из образцов оказались неоптимальными. Исходя из этого, сложно согласиться с мнением авторов статьи [115] о низком качестве выращенной в Турции исходной эхинацеи пурпурной, т.к. ряд изученных в данной работе образцов аналогичного сырья собирали территориально недалеко от этих мест («Родные травы») на схожей высоте над уровнем моря.

Установленное соотношение цикориевой и кафтаровой кислот относится к водно-спиртовым экстрактам с объемной долей спирта 70%. Анализируя полученные данные по содержанию ФС в водно-метанольных и водно-этанольных экстрактах эхинацеи пурпурной можно прийти к заключению, что данный показатель будет зависеть от полноты извлечения указанных соединений из растительной матрицы и варьируется от 2.5 до 7.5 (таблица 18). Экстракция с изменением температуры процесса (субкритическая экстракция) оказывает значительное влияние на значение соотношения извлекаемых кислот (рисунок 12).

Таблица 18 – Соотношение цикориевой и кафтаровой кислот в полученных различными способами извлечениях эхинацеи пурпурной (n=3, P=0.95; сырье:экстрагент - 1:50)

Микроволновая экстракция						
Используемый растворитель для экстракции	96% EtOH	70% EtOH	50% EtOH	100% MeOH	70% MeOH	50% MeOH
ЦК/КФР	7.5 ± 1.3	3.00 ± 0.02	2.5±0.5	5.6±1.2	3.1±0.2	2.6±0.5
Субкритическая экстракция						
Температура процесса	90°C	120°C	150°C	180°C		
ЦК/КФР	3.09±0.08	1.8±0.4	0.90±0.04	2.2±0.3		

У полученных при 90°C водно-спиртовых экстрактов эхинацеи наблюдали соответствие предложенному показателю качества. В этих условиях экстрагируется наибольшее количество цикориевой кислоты, что вносит весомый вклад в установленное соотношение. При дальнейшем повышении температуры

экстракции эффективность извлечения цикориевой кислоты снижается и, соответственно, уменьшается соотношение ЦК / КФР при 120°C и 150°C до 1.8 и 0.9 соответственно. При 180°C повышается соотношение ЦК / КФР до 2.2 на фоне заметного снижения концентраций обеих кислот. Подобные отклонения от предлагаемого показателя являются возможными объяснениями различий в фармацевтической активности экстрактов эхинацеи пурпурной, полученных в различных условиях.

Оценка качества промышленно изготавливаемых препаратов на основе эхинацеи пурпурной по содержанию ФС. Представлял интерес также характер изменения содержания ФС в промышленно изготавливаемых препаратах на основе эхинацеи пурпурной. Определение аналитов в составе препаратов и БАД-ов проводили хроматографически. Изучили содержания ФС в ряде коммерчески доступных лекарственных препаратах в таблетированной и жидкой формах. Хроматограммы извлечений лекарственных препаратов представлены на рисунке 15.

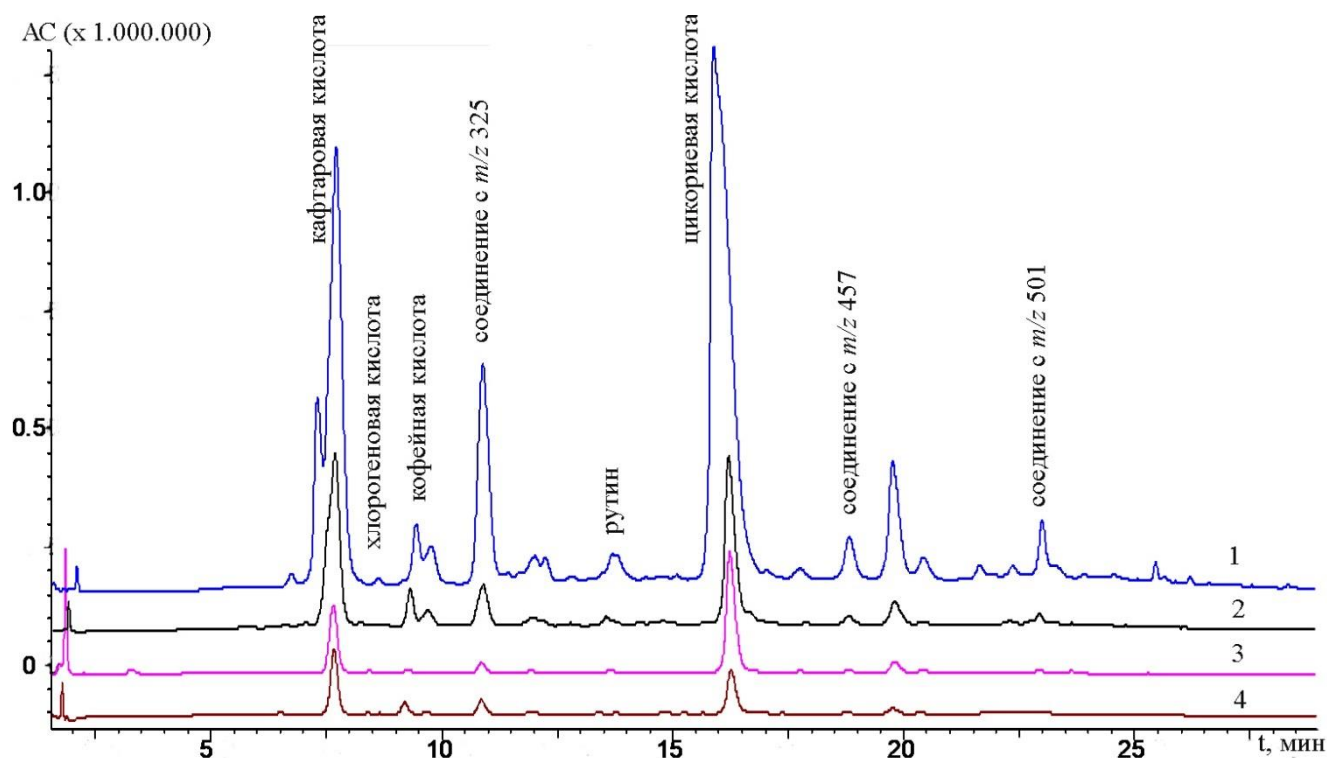


Рисунок 15 - Хроматограммы водно-спиртовых извлечений настойки эхинацеи (1), таблеток «Эхинацея Vita Science» (2), БАД «Эхинацея П» (3) и сиропа (4)

К сожалению, производители препаратов не всегда заявляют истинное содержание в них ФС. Из четырех проанализированных препаратов информация о содержании активных компонентов присутствовала лишь в одном – «Эхинацея VitaScience». Но, в 4 таблетках данного препарата содержалось 6,8 мг оксикоричных кислот в пересчете на ЦК, при заявленных в сопроводительных документах 12 мг.

С учетом того, что в большинстве препаратов отсутствовали данные по содержанию целевых и вспомогательных веществ, провели сопоставление концентраций активных компонентов в пересчете на массу таблетки или раствор (таблица 19).

Таблица 19 – Содержание ФС в водно-спиртовых извлечениях лекарственных препаратов и БАД-ов на основе эхинацеи пурпурной, мг/г (n=3, P=0.95)

Соединение	Лекарственный препарат			
	БАД "Эхинацея П"	Настойка Эхинацеи	Сироп Эхинацеи	Таблетки VitaScience
хлорогеновая кислота	0.057 ± 0.009	0.0037 ± 0.0002	0.0020 ± 0.0003	0.020 ± 0.012
кофейная кислота	0.044 ± 0.016	0.023 ± 0.003	0.010 ± 0.002	0.30 ± 0.04
рутин	0.160 ± 0.014	0.0510 ± 0.0003	0.0016 ± 0.0002	0.063 ± 0.018
цикориевая кислота	4.304 ± 0.6	1.139 ± 0.011	0.094 ± 0.026	4.0 ± 1.0
кафтаровая кислота	1.837 ± 0.7	0.70 ± 0.04	0.115 ± 0.024	4.2 ± 1.5
суммарное содержание ФС *	7.5 ± 1.4	2.47 ± 0.05	0.28 ± 0.07	11 ± 3
суммарное содержание оксикоричных кислот *	6.3 ± 1.3	1.89 ± 0.05	0.27 ± 0.01	9 ± 2.5
ЦК/КФР	2.8	1.5	0.8	1.1

Примечание. * - в пересчете на ЦК

Наибольшие содержания оксикоричных кислот в пересчете на ЦК содержали препарат «Эхинацея VitaScience» – 9 мг/г и БАД «Эхинацея П» - 6.3 мг/г. Низкие концентрации оксикоричных кислот наблюдали в жидких формах препаратов: сиропе Эхинацеи - 0.27 мг/г и настойке Эхинацеи - 1.89 мг/г.

Заметное снижение суммарного содержания ФС при пересчете на ЦК наблюдается при переходе от водно-этанольных экстрактах и извлечениях

лекарственных препаратов на основе эхинацеи пурпурной. Содержание ФС при переходе от водно-этанольных экстрактов эхинацеи пурпурной (22 мг/г) к препаратам «Эхинацея VitaScience» и «Эхинацея П» снижается в 2 и 3 раза соответственно. В настойке эхинацеи («Тульская фармацевтическая фабрика») и сиропе эхинацеи («Грин Сайд») данный показатель ниже в 9 и 80 раз соответственно. Суммарное содержание оксикоричных кислот в этих препаратах в пересчете на ЦК также снижается в такой же последовательности.

Данные таблицы 19 промышленно выпускаемых препаратов и БАДов на основе эхинацеи пурпурной проанализировали с учетом предложенного показателя. Установили, что показателю качества растительного сырья эхинацеи пурпурной и препаратов на её основе соответствовал только БАД «Эхинацея П». По-видимому, это связано с технологическими особенностями получения и / или хранения вышеперечисленных препаратов.

3.4 Твердофазная экстракция ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного

Твердофазная экстракция ФС из экстрактов лекарственного сырья, во многом, позволяет решить проблему их обнаружения в условиях недостаточной чувствительности детектора [145]. Как уже было сказано, наиболее распространенными типами сорбентов для фенольных веществ являются химически модифицированный силикагель, полимерные материалы, а также углеродные сорбенты [47–58]. Химически модифицированный силикагель обычно используют для извлечения неполярных или слабо полярных соединений [178]. Но данный тип сорбентов исследователями чаще всего применяется лишь для очистки полученных экстрактов от коэкстрактивных веществ без концентрирования целевых аналитов [48, 178, 179].

На процесс концентрирования ФС сорбентами различной природы влияет множество факторов: материал сорбента, рН среды, физико-химические свойства

сорбируемых веществ, природа растительной матрицы и другие [88]. Наличие матричного эффекта затрудняет процедуру твердофазного извлечения соединений из экстрактов ЛРС, поэтому установление сорбционных характеристик концентрирующих материалов целесообразнее проводить на реальном образце [88], так как создать искусственные смеси, приближенные по составу к реальным, весьма проблематично.

В связи с вышесказанным, в качестве объекта исследования для оптимизации твердофазной экстракции и расчета сорбционных характеристик материалов выбрали зверобой продырявленный, т.к. данный вид ЛРС содержит в своем составе одновременно такие группы веществ, как фенолкарбоновые кислоты, производные коричных кислот, флавоноиды и их гликозиды и др.

Возможность концентрирования ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов зверобоя устанавливали на сорбентах Strata C18-E (химически модифицированный октадецилсиликагель), Strata X (сополимер стирола и дивинилбензола, поверхностно-модифицированный N-винилпирролидоном), Oasis HLB (макропористый продукт полимеризации липофильного дивинилбензола и гидрофильного N-винилпирролидона) и Supelclean ENVI-Carb (непористый графитированный материал) [180–183].

3.4.1 Концентрирование ФС сорбентом Strata C18-E из водных экстрактов зверобоя продырявленного

С учетом возможной преждевременной десорбции фенолкарбоновых кислот с твердофазных сорбентов при применении водно-спиртовых извлечений [184] в работе использовали водные экстракты зверобоя продырявленного. Возможность концентрирования ФС на данном типе сорбента оценивали с использованием объемов «до проскока» (V_b) аналитов и динамических емкостей сорбента по отношению к ним (таблица 20). Установили, что удерживание фенольных кислот при pH=5 (pH водного экстракта зверобоя) на сорбенте Strata C18-E недостаточно

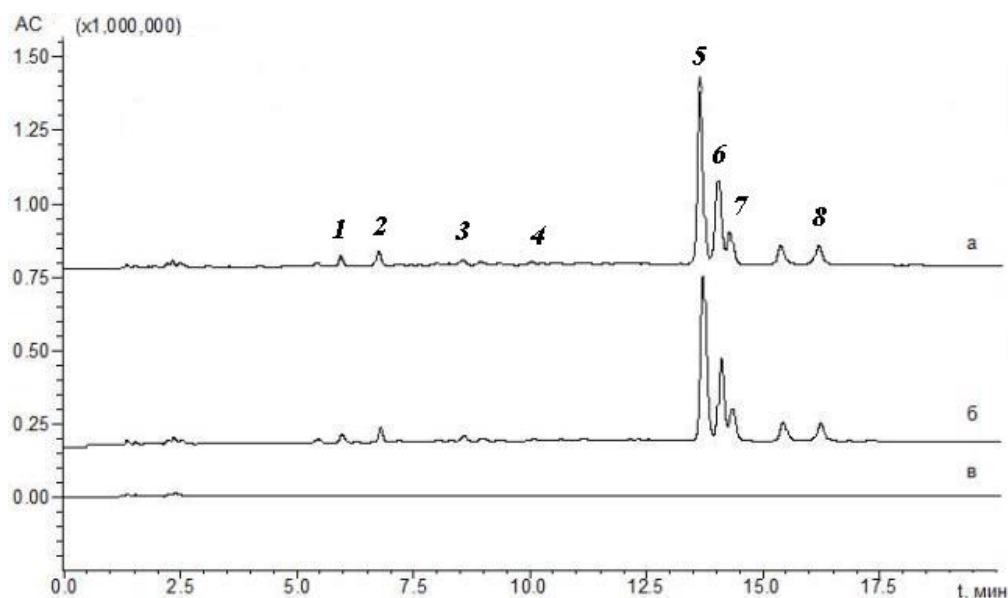
для их концентрирования, а для флавоноидов объемы «до проскока» меньше 1 мл (таблица 20).

Таблица 20 – Сорбционные характеристики Strata C18-E по отношению к некоторым ФС зверобоя продырявленного (pH=5, n = 5)

Соединение Параметр	3,4-ДБК	НК	ХК	ЭПК	РТ	ГД	ИК
V_b , мл	-	-	-	0.2	0.3	0.4	0.8
ДЕ, *10 ⁻⁷ моль/г	-	-	-	0.70 ± 0.07	9 ± 1	7 ± 0.7	5 ± 0.3

Примечание. «-» – нет данных; V_b – объем «до проскока»; ДЕ – динамическая емкость

С другой стороны, увеличить объемы «до проскока» возможно при более низких значениях pH экстрактов для перевода молекул фенольных соединений в их молекулярную форму, что способствует их сродству к функциональным группам C18. Как видно из рисунка 16, после сорбции 0.5 мл водных извлечений зверобоя на Strata C18-E уже наблюдается «проскок» аналитов, а при низких значениях (pH=2) происходит их удерживание, что подтверждается отсутствием регистрации пиков фенольных веществ.



1 – 3,4-дигидроксибензойная кислота; 2 – неохлорогеновая кислота; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – (-)-эпикатехин; 5 – рутин; 6 – гиперозид; 7 – изокверцитрин; 8 – кверцитрин

Рисунок 16 - Хроматограммы экстрактов зверобоя (а) после пропускания 0.5 мл с pH=5 (б), 0.5 мл с pH=2 (в) через сорбент Strata C18-E

Исходя из этого, в условиях отличных рН с помощью сорбента Strata C18-E были получены выходные динамические кривые сорбции (ВДКС) фенольных соединений сигмоидальной формы (рисунок 17). Однако концентрирование фенольных соединений на октадецилсилане затруднено, о чем свидетельствует резкий скачок на начальном участке динамической кривой сорбции фенолкарбоновых кислот (рисунок 17).

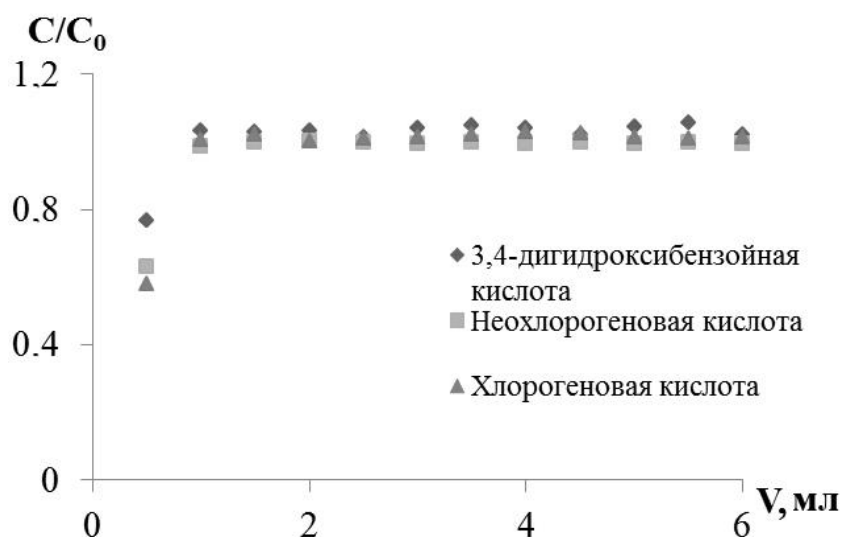


Рисунок 17 - ВДКС фенолкарбоновых кислот на сорбенте Strata C18-E

Данный факт подтверждается также рассчитанными объемами «до проскока», которые составили 0.1, 0.3 и 0.4 мл для 3,4-дигидроксибензойной, неохлорогеновой и хлорогеновой кислот соответственно (таблица 21). Рассчитанные объемы «до проскока» (не более 1 мл) и сигмоидальные формы ВДКС флавоноидов и их гликозидов также свидетельствуют о невысоких коэффициентах их концентрирования (таблица 21). Из представленных данных следует, что Strata C18-E не является универсальным эффективным сорбентом для извлечения всех фенольных кислот из водных экстрактов зверобоя.

Таблица 21 – Основные сорбционные характеристики сорбента Strata C18-E по отношению к некоторым компонентам зверобоя ($pH = 2$, $n = 5$, $S_r \leq 0.6$)

Соединение	Параметр									
	V_R , мл	V_B , мл	σ_V , мл	$\sigma_{V'}$, мл	V_E , мл	N	S_r	K	R, %	$DE \times 10^{-6}$, моль/г
3,4-дигидроксibenзойная кислота	0.9	0.1	0.4	0.5	2	3	≤ 0.5	5	27 ± 2	0.033 ± 0.001
Неохлорогеновая кислота	1.3	0.3	0.5	0.8	3	4	≤ 0.5	5	40 ± 5	0.27 ± 0.03
Хлорогеновая кислота	2.2	0.4	0.9	1.4	5	3.5	≤ 0.3	5	30 ± 4	0.18 ± 0.03
(-)-эпикатехин	2.5	0.4	1	1	5	4	≤ 0.2	5	90 ± 1	0.22 ± 0.02
Рутин	4	0.7	0.6	0.3	11	38	≤ 0.2	5	99 ± 12	1.9 ± 0.2
Гиперозид	5	0.6	0.6	0.5	13	61	≤ 0.3	5	98 ± 14	0.9 ± 0.1
Изокверцитрин	5	0.6	0.6	0.5	13	61	≤ 0.2	5	105 ± 9	0.31 ± 0.05
Кверцитрин	5	0.6	0.6	0.5	13	61	≤ 0.3	5	79 ± 14	0.20 ± 0.04

Примечание. V_R – объем удерживания; V_B – объем «до проскока»; V_E – равновесный объем; σ_V и $\sigma_{V'}$ – стандартные отклонения на ВДКС, N – число теоретических тарелок; K – коэффициент концентрирования; R – степень извлечения; DE – динамическая емкость сорбента

Внутри каждой группы изучаемых соединений формы ВДКС близки (рисунки 17 и 18), что можно объяснить схожестью физико-химических свойств компонентов, и обусловлены, по-видимому, наличием родственных функциональных групп.

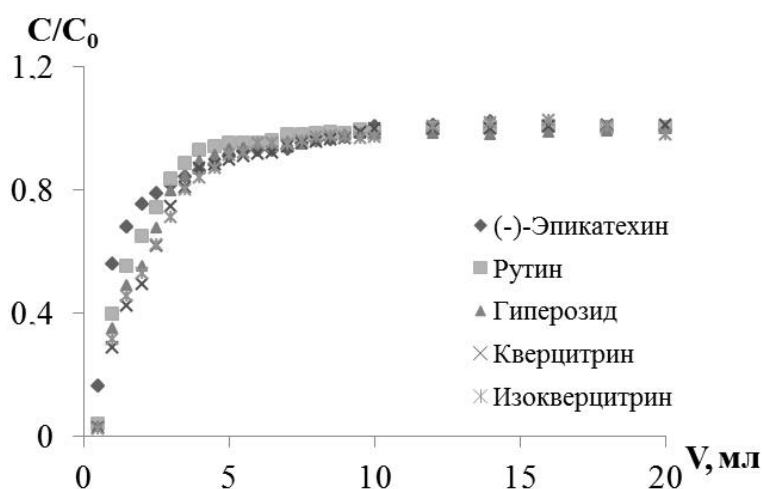


Рисунок 18 – ВДКС флавоноидов и их гликозидов на сорбенте Strata C18-E

Как следует из данных таблицы 21, насыщение сорбента с привитыми октадецильными группами фенолкарбоновыми кислотами достигается после пропускания 5 мл водного экстракта ЛР, а флавоноидами и их гликозидами – 13 мл. Полученные значения свидетельствуют о малой емкости данного типа сорбента по отношению к фенолкарбоновым кислотам, а для группы флавоноидов возможно получение невысоких коэффициентов концентрирования. По полученным сорбционным характеристикам рассчитывали число теоретических тарелок (ЧТТ) для октадецилсиликагеля по отношению к каждому анализируемому соединению. Высокие значения ЧТТ можно соотнести с большей эффективностью применения данного типа сорбента для концентрирования только флавоноидов. В отношении флавоноидов данный материал обладает низкими значениями динамической емкости по сравнению с другими типами сорбентов – $(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-6}$, $(0.9 \pm 0.1) \times 10^{-6}$, $(0.31 \pm 0.05) \times 10^{-6}$, $(0.20 \pm 0.04) \times 10^{-6}$ моль/г для рутина, изокверцитрина, гиперозида и кверцетина соответственно (таблица 21).

Провели оценку эффективности десорбции ФС с поверхности сорбента Strata C18-E ацетонитрилом и метанолом. При концентрировании ФС в пять раз степени извлечения (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина, кверцитрина и кверцетина составили 90%, 99%, 98%, 105%, 79% и 118% соответственно. Полученные результаты удовлетворительно согласуются с аналогичными характеристиками, полученными на сорбентах Waters C18, C18 Li Chrolut и Bakerbond C18 [51, 54, 64]. Концентрирование фенольных кислот на данном типе сорбента проблематично ввиду малых значений объемов «до проскока», для этих целей требуется подбор иных сорбционных материалов.

3.4.2 Концентрирование ФС сорбентами Strata X и Oasis HLB из водных экстрактов зверобоя продырявленного

На характер удерживания ФС сорбентами также, по-видимому, влияет различный механизм полимеризации сорбционного материала. Сорбент Oasis HLB, с химической точки зрения, представляет собой макропористый продукт полимеризации липофильного дивинилбензола и гидрофильного N-винилпирролидона. При этом гидрофильная природа N-винилпирролидона увеличивает смачиваемость сополимера экстрактом ЛРС, а липофильный характер дивинилбензола увеличивает удерживание фазой, необходимой для более полярных соединений [83]. Сорбент Strata X также представляет собой сополимер стирола и дивинилбензола, но поверхностно модифицированный N-винилпирролидоном [185]. Исходя из этого и анализируя данные по сорбции некоторых ФС можно предположить, что сорбция компонентов на представленных полимерных сорбентах протекает по различным механизмам.

Для флавоноидов и фенолкарбоновых кислот наблюдали сигмоидальную форму выходных динамических кривых сорбции на сорбентах Strata X и Oasis HLB (рисунки 19 - 22). Практически для всех исследуемых соединений на выходных динамических кривых сорбции регистрируется подъем кривой выше $C/C_0=1$, обусловленный одновременными процессами сорбции и концентрирования при пропускании водного экстракта растительного образца через сорбент.

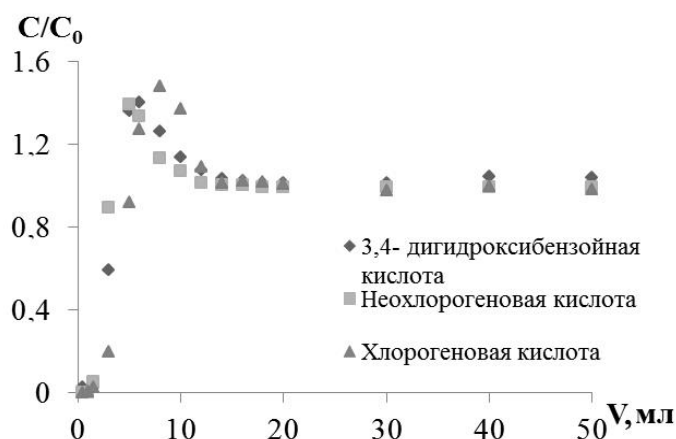


Рисунок 19 – ВДКС фенолкарбоновых кислот на сорбенте Strata X

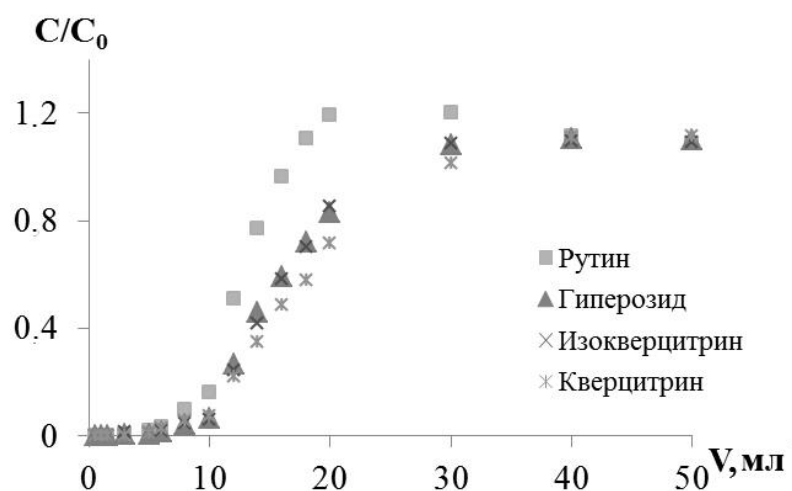


Рисунок 20 – ВДКС флавоноидов и их гликозидов на сорбенте Strata X

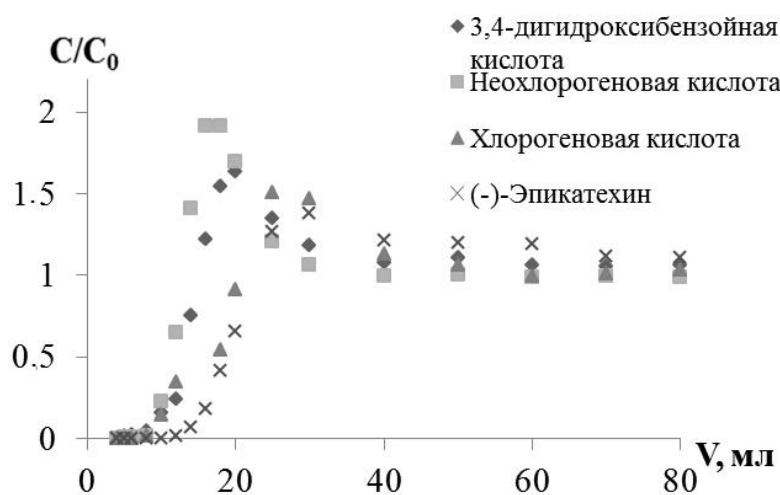


Рисунок 21 – ВДКС фенолкарбоновых кислот на сорбенте Oasis HLB

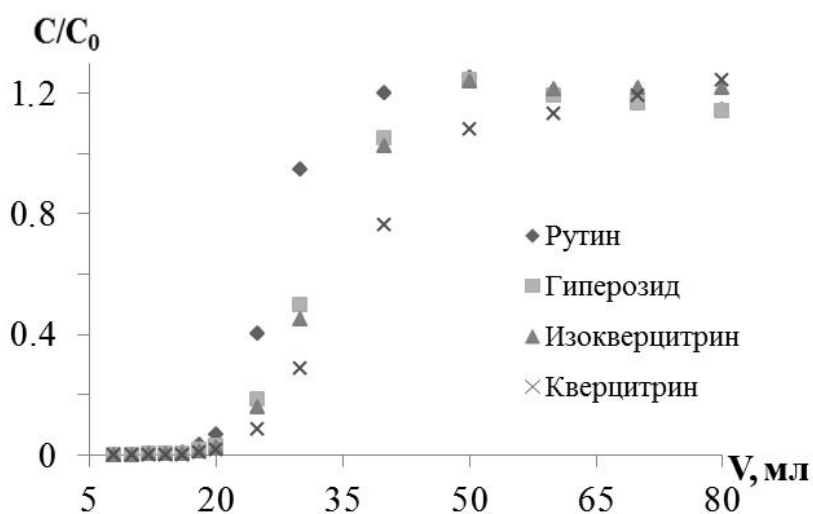
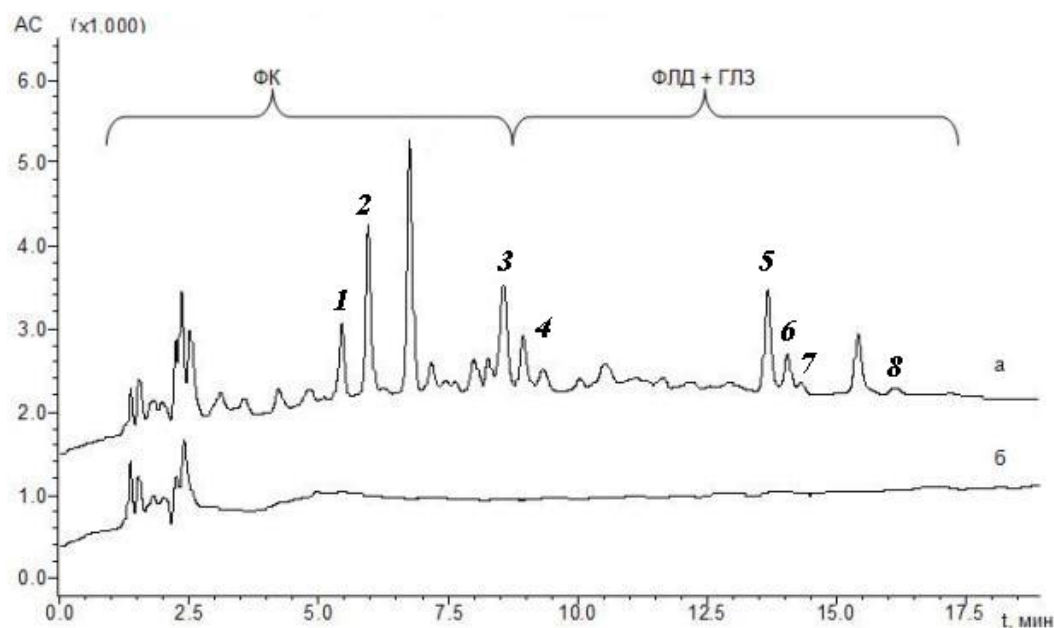


Рисунок 22 – ВДКС флавоноидов и их гликозидов на сорбенте Oasis HLB

Рассчитанные объемы «до проскока» для фенолкарбоновых кислот на сорбенте Strata X составили 5 мл, что позволяет концентрировать данные группы соединений в отличие от применения для этих целей сорбента Strata C18-E. При использовании Oasis HLB объем «до проскока» фенолкарбоновых кислот увеличивается до 9 мл, что свидетельствует о повышении коэффициента концентрирования изучаемых соединений ($K=20$). При проведении твердофазного извлечения флавоноидов на полимерных материалах объем «до проскока» для данной группы соединений увеличивается в несколько раз по сравнению с сорбентом Strata C18 и достигает 6 и 19 мл для Strata X и Oasis HLB соответственно, что также обеспечивает увеличение коэффициента концентрирования целевых соединений.

Как видно из хроматограмм (рисунок 23), фенолкарбоновые кислоты и флавоноиды сильнее удерживаются на полимерном материале, чем на Strata C18, что в результате приводит к увеличению объемов «до проскока» этих соединений.



ФК – фенолкарбоновые кислоты; ФЛД + ГЛЗ – флавоноиды и их гликозиды; 1 – 3,4-дигидроксibenзойная кислота; 2 – неохлорогеновая кислота; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – (-)-эпикатехин; 5 – рутин; 6 – гиперозид; 7 – изокверцитрин; 8 – кверцитрин

Рисунок 23 – Хроматограммы водных извлечений зверобоя после пропускания 1 мл экстракта через Strata C18-E (а) и Strata X (б)

Значения основных сорбционных характеристик, полученных из ВДКС ФС на полимерных сорбентах Strata X и Oasis HLB, представлены в таблице 22. Рассчитанные значения ЧТТ полимерных сорбентов по отношению к фенолкарбонным кислотам позволяют говорить об их большей целесообразности применения для концентрирования данной группы соединений. Примечательно, что значения ЧТТ полимерных сорбентов по отношению к группе флавоноидов и их гликозидам значительно меньше данной характеристики, полученной для октадецилсиликагелевого сорбента, что говорит о меньшем сорбционном средстве данных материалов и аналитов. Разница в ЧТТ для Oasis HLB и Strata X по отношению к группе флавоноидов обусловлена, по-видимому, гидрофильно-липофильной природой первого сорбента. Как видно из данных таблиц 21 и 22, для флавоноидов объемы «до проскока» составили от 3 до 6 мл, что на порядок превышает данный показатель для Strata C18-E.

В условиях низких значений pH экстракта степень извлечения 3,4-дигидроксibenзойной, неохлорогеновой и хлорогеновой кислот составила 105 - 107%, а (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина, кверцитрина и кверцетина – от 90 до 112% при концентрировании в 5 раз. Полученные значения превышают данные авторов [53, 86], в которых концентрирование флавоноидов на сорбентах Strata X и Bond Elut Plexa не достигалось. Сорбент Strata X обладает наивысшим значением динамической емкости по отношению к хлорогеновой кислоте – $(2.6 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ моль/г (таблица 22). Как видно из данных таблицы 22, по отношению к определяемым соединениям, за исключением рутина и хлорогеновой кислоты, динамическая емкость Oasis HLB наивысшая среди всех используемых материалов.

Полученные результаты позволяют считать полимерные сорбенты перспективными для концентрирования ФС из экстрактов ЛРС, что позволит снизить пределы детектирования аналитов, особенно в случае «минорных» компонентов, а также их выделения из растительной матрицы для фармакологических целей.

Таблица 22 – Основные сорбционные характеристики сорбентов Strata X и Oasis HLB по отношению к некоторым ФС зверобоя прордырявленного (рН = 2, n = 5, S_r ≤ 0.6)

Соединение	Параметр	V _R , мл	V _B , мл	σ _V , мл	σ _V [*] , мл	V _E , мл	N	K	R, %	ДЕ × 10 ⁻⁶ , моль/г	
		Strata X									
3,4-дигидроксибензойная кислота		6	5	1	1	8	30	5	106 ± 5	1.7 ± 0.4	
Неохлорогеновая кислота		6	4	1	1	7	30	5	106 ± 6	3.7 ± 0.4	
Хлорогеновая кислота		8	5	1	1	10	56	5	107 ± 7	2.6 ± 0.5	
(-)-эпикатехин		9	6	2	1	11	16	5	99 ± 3	2.2 ± 0.2	
Рутин		13	3	5	3	18	4	5	105 ± 3	9.5 ± 1.1	
Гиперозид		14	6	4	2	23	9	5	106 ± 5	12.1 ± 1.0	
Изокверцитрин		14	6	4	3	23	9	5	107 ± 8	4.3 ± 0.6	
Кверцитрин		16	6	5	7	30	7	5	112 ± 13	2.6 ± 0.5	
		Oasis HLB									
3,4-дигидроксибензойная кислота		13	9	2	2	17	36	20	74 ± 5	2.3 ± 0.7	
Неохлорогеновая кислота		11	9	1.3	2.3	16	63	20	96 ± 6	8 ± 3	
Хлорогеновая кислота		15	7	4	5	25	10	20	77 ± 2	2.03 ± 0.07	
(-)-эпикатехин		18.5	12.5	3	3.8	26	32	20	68 ± 2	4.1 ± 0.4	
Рутин		26	17	4.8	2	30	24	32	56 ± 7	19 ± 3	
Гиперозид		30	18	6.3	4.8	40	18	32	64 ± 14	26 ± 3	
Изокверцитрин		31	19	5.8	5	41	23	32	91 ± 10	11.7 ± 1.3	
Кверцитрин		35	19	8.3	6.8	49	14	32	59 ± 6	4.56 ± 0.01	

Примечание. V_R – объем удерживания; V_B – объем «до проскока»; V_E – равновесный объем; σ_V и σ_V^{*} – стандартные отклонения на выходной динамической кривой сорбции, N – число теоретических тарелок; K – коэффициент концентрирования; R – степень извлечения; ДЕ – динамическая емкость сорбента.

3.4.2.1 Изучение процессов десорбции ФС зверобоя продырявленного с сорбентов на основе силикагеля и полимерных материалов

Кривые десорбции компонентов с изучаемых сорбентов позволяют сделать вывод о возможной степени концентрирования соединений, предоставляя информацию о достаточном объеме растворителя для элюирования компонентов с сорбента. Анализируя вид полученных кривых десорбции целевых компонентов с сорбентов различной природы (рисунки 24 - 26) можно предположить, что десорбция соединений протекает по-разному.

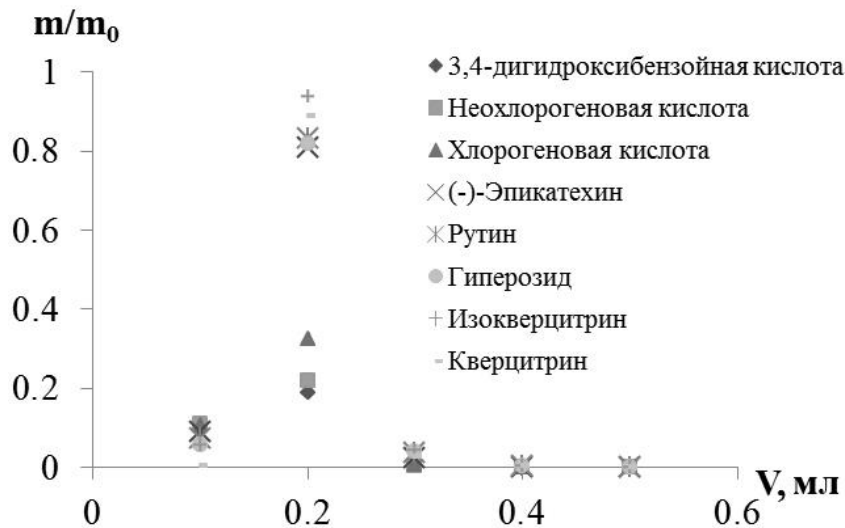


Рисунок 24 – Кривая десорбции ФС зверобоя метанолом с сорбента Strata C18-E

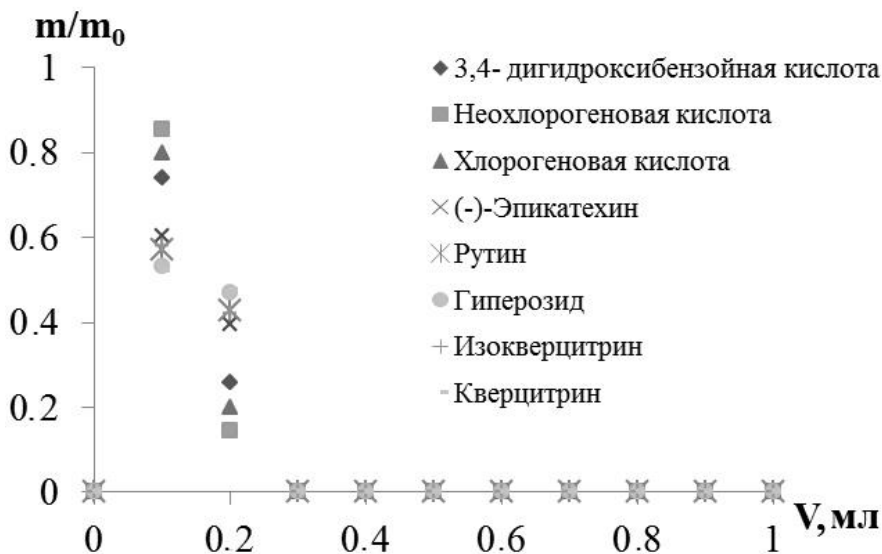


Рисунок 25 – Кривая десорбции ФС зверобоя метанолом с сорбента Strata X



Рисунок 26 – Кривая десорбции ФС зверобоя метанолом с сорбента Oasis HLB

Исходя из кривой десорбции фенольных соединений метанолом, полученной на сорбенте Strata C18-E (рисунок 24), отметим, что подавляющая часть аналитов десорбируется 0.2 мл метанола. При извлечении флавоноидов метанолом с поверхности Strata C18-E добились степени извлечения ФС 79 - 105% при их концентрировании в 5 раз. Высоких степеней извлечения фенолкарбоновых кислот, превышающих 40%, на данном типе сорбента при концентрировании в 5 раз добиться не удалось вследствие быстрого достижения «проскока» данных соединений.

В отличие от сорбента с привитыми октадецильными группами, подавляющая часть фенольных соединений десорбируется с полимерного Strata X 0.1 - 0.2 мл метанола (рисунок 25). При концентрировании в 5 раз степень извлечения фенолкарбоновых кислот из экстракта зверобоя составила 106 - 107% и 99 - 112% для группы флавоноидов и их гликозидов. При использовании альтернативного полимерного материала (Oasis HLB) объемы растворителя для десорбции веществ составили 0.2 - 0.3 мл (рисунок 26). С помощью данного сорбента удалось повысить коэффициент концентрирования фенольных кислот и флавоноидов до 20 и 32, соответственно, благодаря увеличению объемов «до проскока» всех исследуемых соединений на данном материале. Однако при этом

степень извлечения фенолкарбоновых кислот варьировалась от 74% до 96%, а флавоноидов – от 56% до 91% (таблица 22). Разброс степени извлечения соединений на сорбенте Oasis HLB, вероятно, может говорить о частично-необратимой адсорбции некоторых компонентов.

Таким образом, на полимерном сорбенте Strata X достигали высокие степени извлечения (более 99%) обеих групп соединений при их концентрировании в 5 раз. Напротив, коэффициенты концентрирования фенольных кислот и флавоноидов на сорбенте Oasis HLB в 5 и 6 раз превышали их для Strata X, однако степени извлечения для некоторых индивидуальных соединений неудовлетворительны при использовании сорбента с липофильно-гидрофильным балансом. Сорбент Strata C18-E обеспечивал пятикратное концентрирование флавоноидов при степени извлечения выше 79%.

3.4.3 Концентрирование ФС последовательным пропуском водного экстракта зверобоя продырявленного через сорбенты различной природы

Рассматривали возможность повышения эффекта концентрирования ФС различных классов пропуском водного экстракта зверобоя через последовательно совмещенные сорбенты - Strata C18-E и Strata X. Обусловлено это тем, что октадецильный сорбент Strata C18-E показал удовлетворительные сорбционные характеристики по отношению к флавоноидам, а полимерный Strata X – фенолкарбоновым кислотам. В верхней части концентрирующего патрона помещали октадецильный Strata C18-E, сорбирующий, преимущественно, флавоноиды, в нижней – полимерный Strata X, сорбирующий больше фенолкарбоновые кислоты, «проскакивающие» через октадецилсилан.

Полученные данные сравнили с аналогичными характеристиками, полученными для сорбента Oasis HLB (таблица 23).

Таблица 23 – Степени извлечения ФС зверобоя комбинированным (Strata C18-E+Strata X) и полимерным сорбентами при $K=16$, % ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Сорбент	
	Strata C18-E+Strata X	Oasis HLB
3,4 – дигидроксибензойная кислота	69 ± 8	80 ± 9
Хлорогеновая кислота	60 ± 12	92 ± 18
Неохлорогеновая кислота	72 ± 11	100 ± 15
(-)-эпикатехин	41 ± 4	71 ± 7
Рутин	38 ± 9	81 ± 9
Гиперозид	32 ± 7	83 ± 10
Изокверцитрин	48 ± 10	109 ± 23
Кверцитрин	55 ± 7	87 ± 11

Как видно из полученных результатов (таблица 23), комбинированный сорбент достаточно близок по характеристикам к материалу с гидрофильно-липофильным балансом (Oasis HLB) в отношении фенолкарбоновых кислот, а также позволяет количественно извлекать целевые соединения при их шестнадцатикратном концентрировании. Используя комбинированный сорбент, достигли 69, 60 и 72% извлечения для 3,4-дигидроксибензойной, хлорогеновой и неохлорогеновой кислот соответственно. Для (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина и кверцитрина совмещенный материал показал более низкие степени извлечения - 41, 38, 32, 48 и 55% соответственно, что значительно уступало параметрам, полученным для этих соединений с помощью Oasis HLB (таблица 23).

Следует отметить, что на хроматограмме элюата (рисунок 27), прошедшего через совмещенный сорбент Strata C18-E + Strata X, визуализируются пики ранее нерегистрируемых веществ в диапазоне $t_R = 3 - 4.6$ мин ($\lambda=268$ нм), однако их идентификация затруднительна.

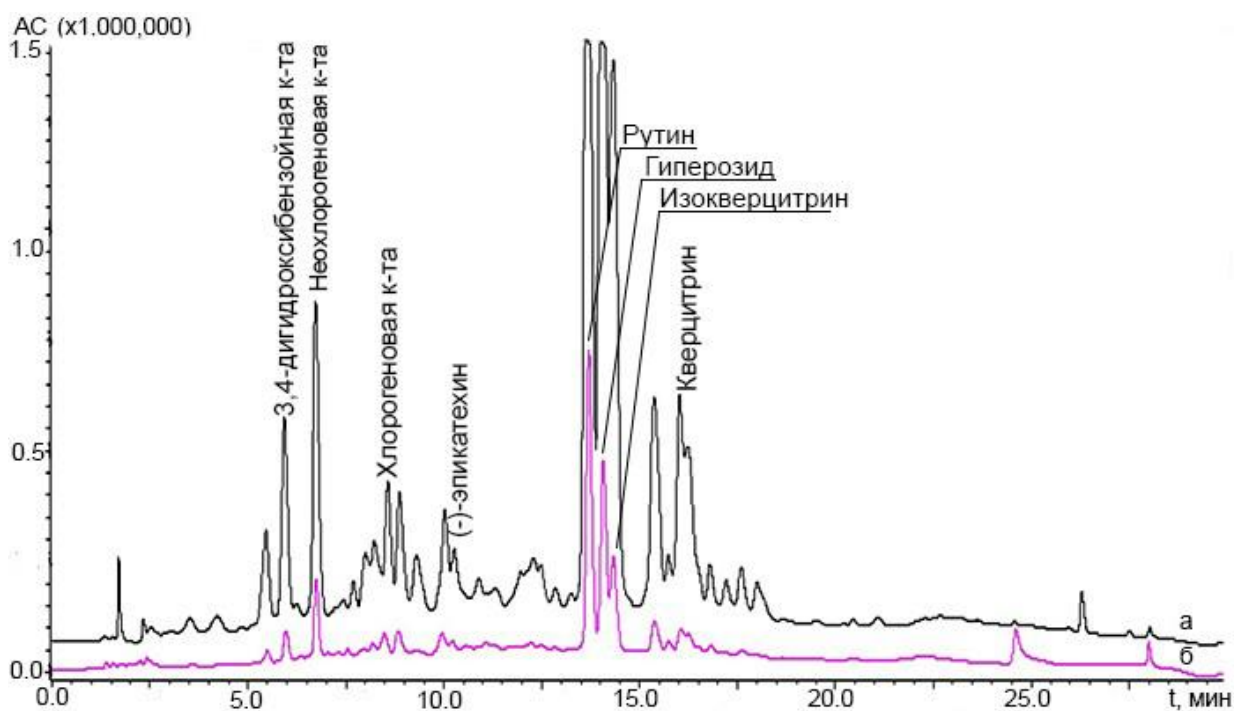


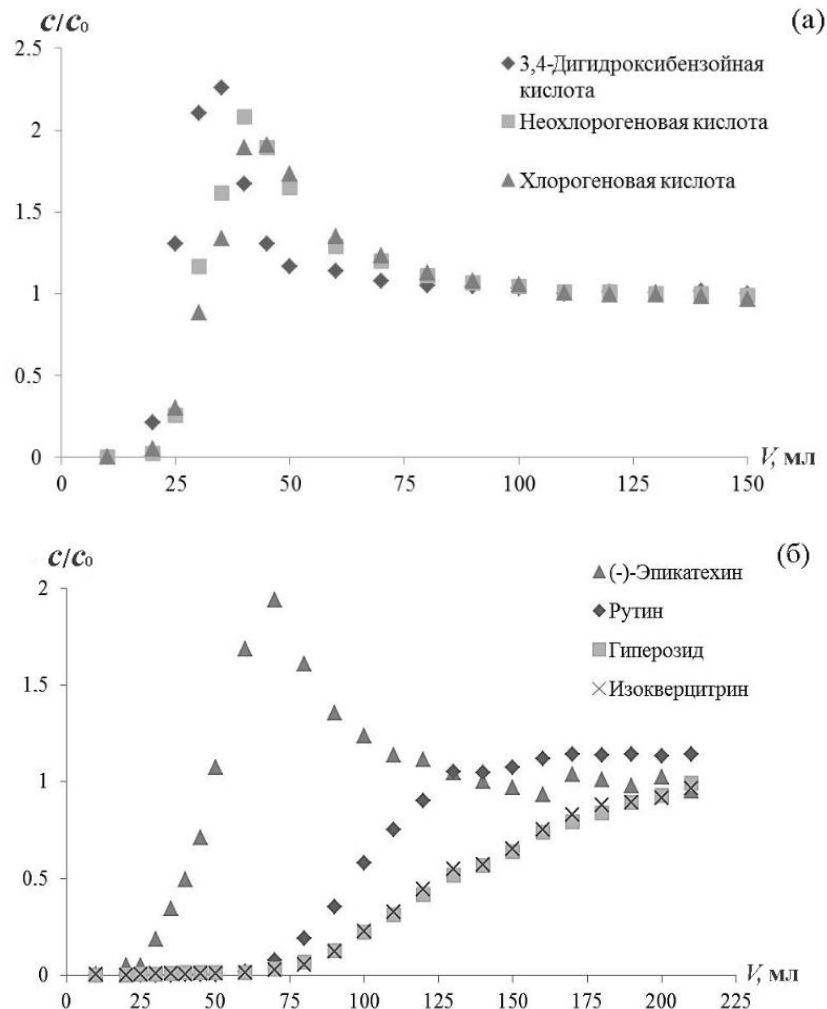
Рисунок 27 – Хроматограммы водных экстрактов зверобоя, прошедших через сорбенты Strata C18-E+Strata X (а) и Oasis HLB (б)

Полученные результаты показывают возможность повышения коэффициента концентрирования известных, а также расширения компонентного состава извлечений, что, несомненно, представляет научный интерес.

3.4.4 Концентрирование ФС углеродными сорбентами из водных экстрактов зверобоя прорыявленного

Применение углеродных материалов в аналитической химии достаточно распространено. Данные сорбенты проявляют высокую эффективность в отношении обширного класса соединений, в том числе и фенольных. За счет своих уникальных физико-химических свойств исследователям удалось найти применение углероду в хроматографических колонках для разделения слабо и средне-полярных веществ [186]. Нами проведена оценка возможности применения углеродных сорбентов для извлечения и концентрирования ФС из водных и водно-спиртовых экстрактов лекарственных растений.

Аналогично схемам изучения характеристик вышеупомянутых сорбционных материалов нами построены ВДКС ФС для сорбентов Supelclean ENVI-Carb и HyperSep Hypercarb [183]. ВДКС флавоноидов имели S-образную форму, а для фенолкарбоновых кислот и (-)-эпикатехина на кривых наблюдали "подъем" выше значения $c/c_0 = 1$, что, по-видимому, связан с вытеснением более сильно удерживаемыми компонентами слабоудерживаемых аналитов (рисунок 28). ВДКС ФС на обоих углеродных сорбентах схожи между собой и поэтому можно предположить одинаковый механизм сорбции аналитов. Исходя из этого, условия десорбции ФС в данной работе оптимизировали на основе данных, полученных с использованием сорбента Supelclean ENVI-Carb.



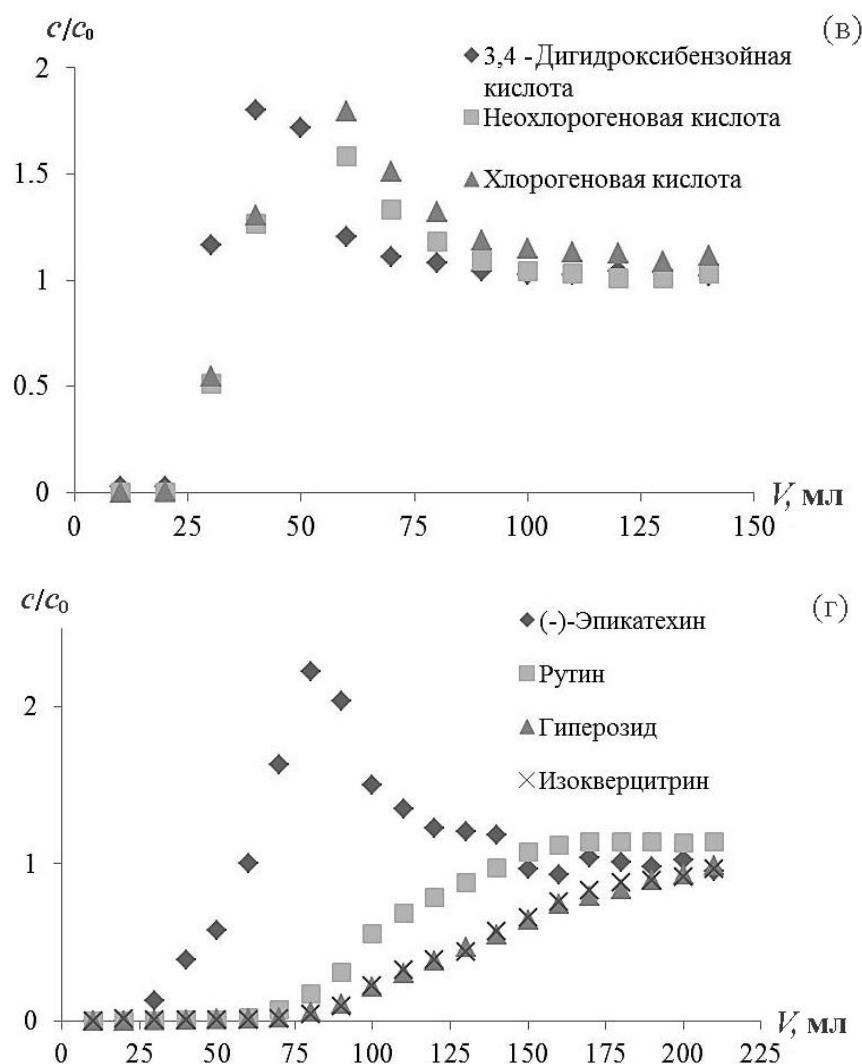


Рисунок 28 – ВДКС фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и их гликозидов из водных экстрактов зверобоя продырявленного на сорбентах Supelclean ENVI-Carb (а), (б) и HyperSep Hypercarb (в), (г)

S-образная форма ВДКС компонентов водного экстракта зверобоя позволила рассчитать некоторые характеристики сорбции (объем удерживания, объем «до проскока», равновесный объем) для углеродных сорбентов Supelclean ENVI-Carb и HyperSep Hypercarb по отношению к ФС, а также динамическую емкость данных материалов. Результаты расчетов сорбционных характеристик представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Основные сорбционные характеристики углеродных сорбентов по отношению к ФС водного экстракта зверобоя ($pH = 5$, $n = 3$, $S_r \leq 0.3$)

Соединение	Параметр					
	V_R , мл	V_B , мл	σ_V , мл	$\sigma_{V'}$, мл	V_E , мл	ДЕ $\times 10^{-6}$ моль/г
	Supelclean ENVI-Carb					
3,4-Дигидроксибензойная кислота	25	15	5	5	26	1.0 ± 0.2
Неохлорогеновая кислота	29	20	4	5	31	4.1 ± 0.4
Хлорогеновая кислота	28	21	3	4	32	1.8 ± 0.3
(-)-Эпикатехин	39	18	10	7	49	1.6 ± 0.2
Рутин	95	60	18	19	121	35 ± 4
Гиперозид	95	64	32	41	215	23 ± 2
Изокверцитрин	124	70	27	49	218	9.0 ± 1.3
	HyperSep Hypercarb					
3,4-Дигидроксибензойная кислота	22	14	4	2	26	0.9 ± 0.1
Неохлорогеновая кислота	30	20	5	4	38	4.0 ± 0.7
Хлорогеновая кислота	28	18	5	6	40	1.8 ± 0.4
(-)-Эпикатехин	47	17	15	11	69	1.3 ± 0.1
Рутин	98	62	18	30	158	39 ± 6
Гиперозид	136	58	39	36	208	24 ± 4
Изокверцитрин	138	58	40	32	202	7.7 ± 1.7

Примечание. V_R – объем удерживания; V_B – объем «до проскока»; V_E – равновесный объем; σ_V и $\sigma_{V'}$ – стандартные отклонения на ВДКС; ДЕ – динамическая емкость сорбента

«Проскок» фенольных кислот и флавоноидов на уровне 10% наблюдается после пропускания через сорбент 15–21 и 18–70 мл водного экстракта зверобоя соответственно (таблица 24). Динамические емкости обоих сорбентов по отношению к ФС водного экстракта зверобоя, рассчитанные по формуле (5), коррелировали между собой. Расчетные данные для сорбента Supelclean ENVI-Carb составили, моль/г: $(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ для 3,4-дигидроксибензойной кислоты, $(4.1 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ для неохлорогеновой кислоты, $(1.8 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ для хлорогеновой кислоты, $(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ для (-)-эпикатехина, $(35 \pm 4) \times 10^{-6}$; для рутина, $(23 \pm 2) \times 10^{-6}$ для гиперозида и $(9.0 \pm 1.3) \times 10^{-6}$ для изокверцитрина.

Основываясь на данных таблицы 24, при изучении десорбции с непористого графитированного сорбента Supelclean ENVI-Carb ФС разбили на две группы: 1 - фенолкарбоновые кислоты и (-)-эпикатехин; 2 - флавоноиды. Такое разделение позволило минимизировать и / или исключить пропуск аналитов каждой группы при пропускании водных экстрактов зверобоя через сорбент. С учетом разделения ФС на группы установили оптимальные пропускаемые объемы водных экстрактов зверобоя для исследования процесса десорбции, которые составили: для фенолкарбоновых кислот и (-)-эпикатехина – 15 мл, для флавоноидов – 60 мл.

Кривые десорбции ацетонитрилом аналитов (рисунок 29) после установления сорбционного равновесия на стадии сорбции свидетельствуют о возможности десорбции подавляющей части соединений с сорбента, что, в свою очередь, подтверждает возможность разработки процедуры концентрирования аналитов с высоким коэффициентом концентрирования.

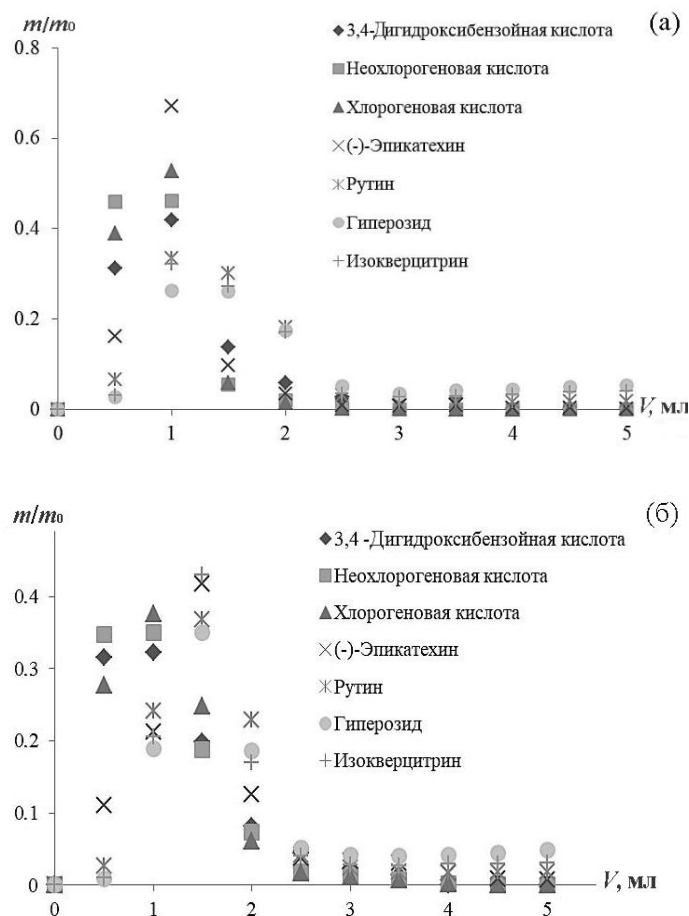


Рисунок 29 – Кривые десорбции ФС зверобоя ацетонитрилом с углеродных сорбентов Supelclean ENVI-Carb (а) и HyperSep Hypercarb (б)

Для десорбции аналитов применяли метанол, ацетонитрил, а также их смесь с добавлением изопропилового спирта (90 : 5 : 5, по объему) (МАИ). При десорбции ацетонитрилом и метанолом степень извлечения флавоноидов оказалась невысокой, а при использовании смеси МАИ данный показатель незначительно увеличивается. Для фенолкарбоновых кислот при десорбции компонентов с сорбента смесью МАИ извлекали 7 и 22% неохлорогеновой и хлорогеновой кислот соответственно.

В случае 3,4-дигидроксibenзойной кислоты ($m/z = 153$) на хроматограмме наблюдается соэлюирование с, возможно, близким по природе, но не установленным соединением с $m/z = 315$, что, вероятно, приводит к завышению степени десорбции этого аналита (рисунок 30). Степени извлечения фенолкарбоновых кислот и флавоноидов различными растворителями с сорбента Supelclean ENVI-Carb приведены в таблице 25.

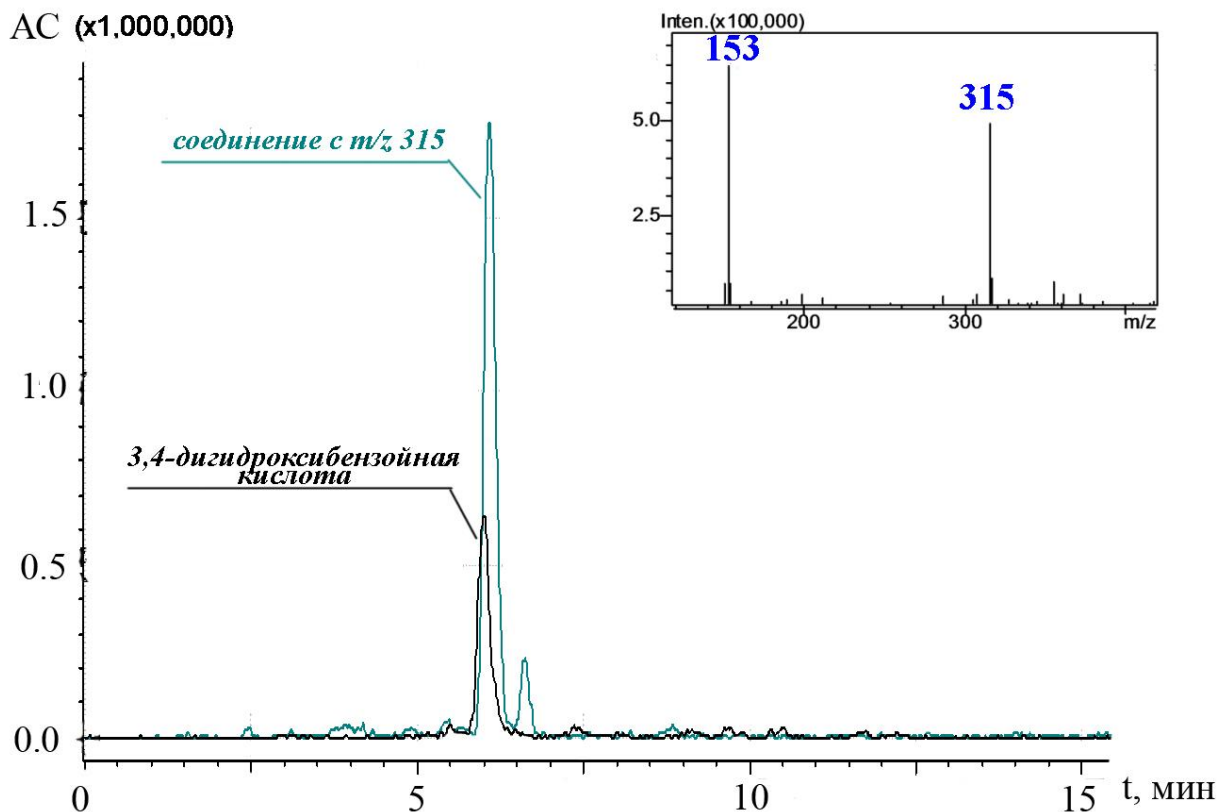


Рисунок 30 – Масс-хроматограмма полученного с сорбента Supelclean ENVI-Carb элюата смесью МАИ

Таблица 25 – Степени извлечения фенолкарбоновых кислот и флавоноидов различными растворителями с сорбента Supelclean ENVI-Carb, % (n = 3, Sr ≤ 0.3)

Соединение	Растворитель		
	Ацетонитрил	Метанол	МАИ
3,4-Дигидроксибензойная кислота	22.1 ± 1.2	62 ± 3	86 ± 4
Неохлорогеновая кислота	0.56 ± 0.03	3.3 ± 0.2	7.2 ± 1.0
Хлорогеновая кислота	5.3 ± 0.3	15.7 ± 0.8	22.4 ± 1.3
(-)-Эпикатехин	6.4 ± 0.3	9.7 ± 0.5	10.8 ± 0.5
Рутин	0.67 ± 0.03	1.13 ± 0.06	2.42 ± 0.12
Гиперозид	0.39 ± 0.02	0.264 ± 0.013	2.41 ± 0.12
Изокверцитрин	0.239 ± 0.012	0.53 ± 0.03	2.60 ± 0.13
Кверцитрин	7.4 ± 0.4	7.7 ± 0.4	25 ± 6

По данным [76, 77, 81] выявлено, что при использовании углеродных материалов в качестве сорбентов в хроматографических колонках на эффективность процесса элюирования компонентов заметно влияет повышение температуры и давления в экстракционной системе. В таких условиях возможно ослабление ван-дер-ваальсовых и диполь-дипольных взаимодействий, а также водородных связей между анализом и материалом сорбента [187], происходит снижение вязкости элюента, которое улучшает массоперенос компонентов в системе сорбент – растворитель; все это может приводить к повышению степеней извлечения целевых соединений.

Исходя из этого, провели изучение и оптимизацию условий десорбции фенольных компонентов с использованием экспериментальной установки для субкритической экстракции ФС из ЛРС (рисунок 4).

Влияние давления на десорбцию ФС (на примере флавоноидов) изучили в стальной колонке. Повышение давления в системе (9.4–9.5 МПа) не повышало эффективность десорбции компонентов с сорбентов. Степени извлечения рутина, гиперозида, изокверцитрина и кверцетина не превысили 6%, а кверцитрина – 17%. Исходя из этого можно предположить, что оказывающим наибольшее влияние на десорбцию соединений параметром, является температура.

С учетом ранее полученных данных [102], иллюстрирующих влияние температуры на процесс экстракции ФС, изучили десорбцию анализов с углеродного сорбента при 120°C метанолом, ацетонитрилом и смесью МАИ. Полученные результаты представлены в виде диаграммы на рисунке 31.

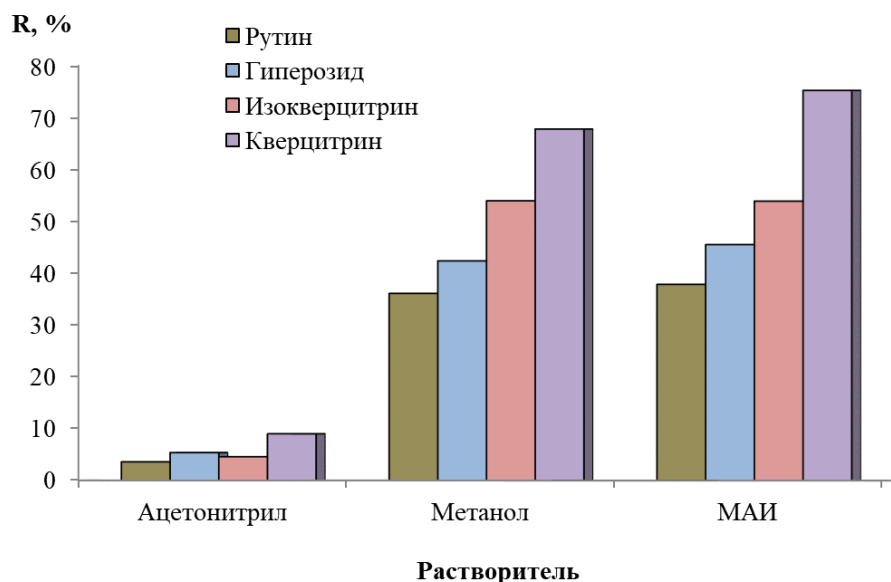


Рисунок 31 – Зависимость степени извлечения флавоноидов с сорбента Supelclean ENVI-Carb от состава растворителя при 120°C

Как видно, степени извлечения целевых соединений метанолом и смесью МАИ с материала сорбента близки, эти элюенты обеспечили десорбцию 35–72% анализов. Однако, при десорбции смесью МАИ в условиях повышенных температур и давления степени извлечения фенольных компонентов из водных экстрактов ЛРС несколько увеличиваются, а также расширяется список идентифицируемых компонентов. Ввиду этого, дальнейшую оптимизацию проводили с использованием данного экстрагента.

Температурный режим десорбции компонентов оптимизировали в диапазоне 90–180°C для флавоноидов и 90–150°C для фенолкарбоновых кислот с шагом в 30°C. По полученным данным строили зависимости степени извлечения ФС, содержащихся в экстракте зверобоя, от температуры десорбции для флавоноидов (рисунок 32, а), фенолкарбоновых кислот и (-)-эпикатехина (рисунок 32, б) при концентрировании данных групп соединений в шесть раз.

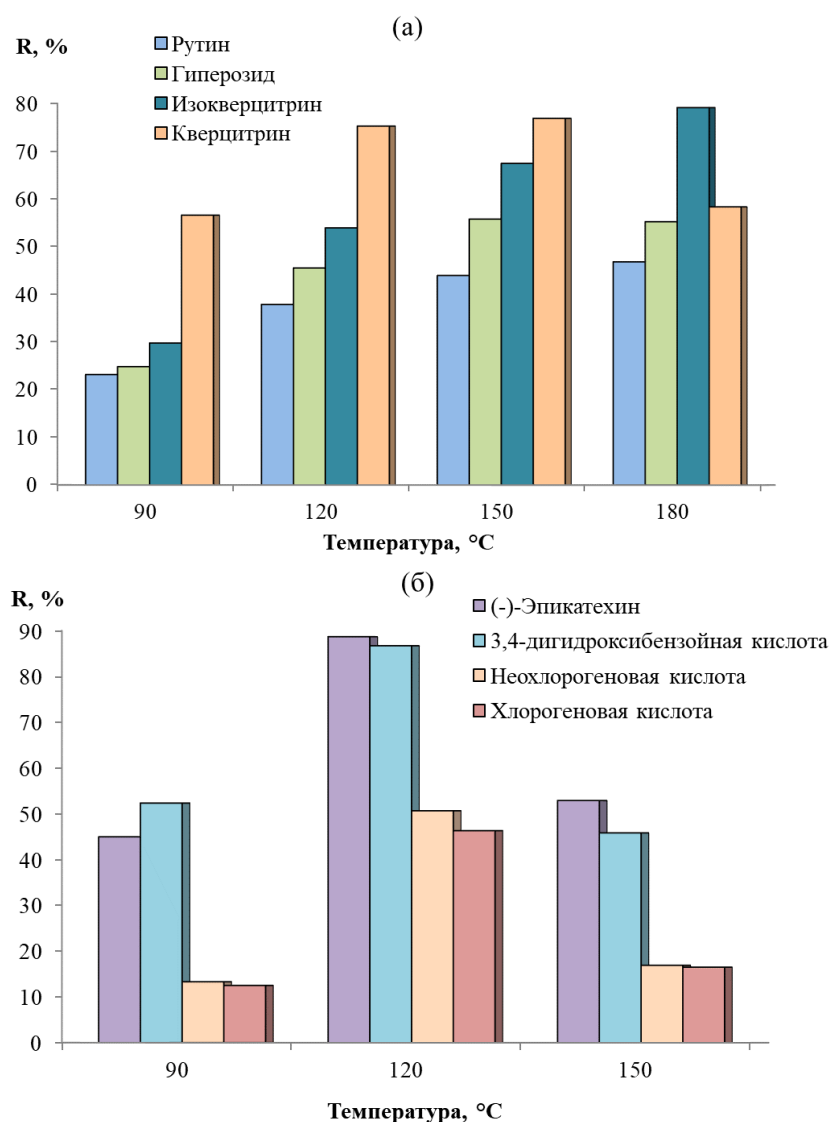


Рисунок 32 – Зависимость степени извлечения флавоноидов (а), (-)-эпикатехина и фенолкарбоновых кислот (б) с сорбента Supelclean ENVI-Carb от температуры десорбции

При повышении температуры десорбции с 90 до 120°C увеличиваются степени извлечения флавоноидов (рисунок 32, а). Дальнейшее увеличение температуры десорбции не влияет на эффективность извлечения данной группы соединений. Напротив, для (-)-эпикатехина и представителей фенолкарбоновых кислот при температурах десорбции выше 120°C эффективность извлечения компонентов с материала сорбента снижается (рисунок 32, б), что обусловлено протекающими процессами деструкции данных соединений.

Из полученных результатов следует, что извлечение фенолкарбоновых кислот и флавоноидов с углеродного сорбента Supelclean ENVI-Carb оптимально

десорбцией смесью МАИ при повышенном давлении и температуре 120°C.

3.4.4.1 Возможность расширения круга идентифицируемых соединений при использовании углеродного сорбента для концентрирования ФС

Структура и свойства углеродных сорбентов Supelclean ENVI-Carb [65, 67] позволяют предположить, что круг идентифицируемых соединений может быть расширен за счет концентрирования аналитов. При изучении полученных при десорбции компонентов зверобоя смесью МАИ в условиях повышенных температур и давления хроматограмм элюатов, регистрировали в них новые пики (рисунок 33). В большей степени, обнаруженные соединения, согласно литературным данным, относятся к фенольным кислотам и флавоноидам (таблица 26). Тем не менее, данное соотнесение соединений основано на предположении и требует дальнейшего подтверждения с привлечением дополнительных стадий пробоподготовки и иных методов определения. Соединения, идентифицированные в элюатах, полученных иными растворителями также представлены в таблице 26.

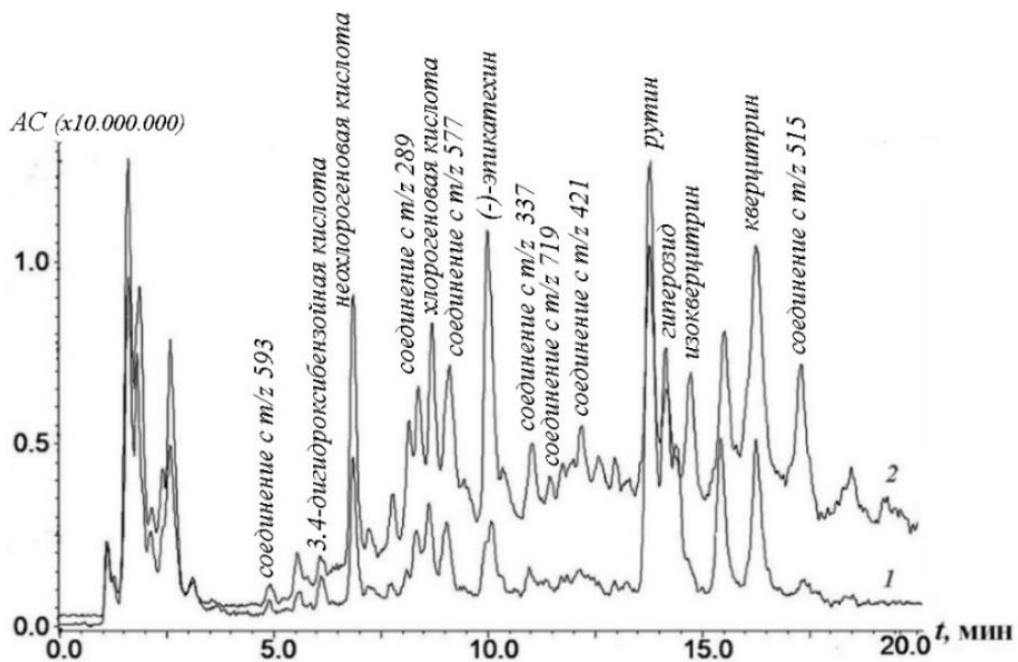


Рисунок 33 – Масс-хроматограммы исходного водного экстракта зверобоя продырявленного (1) и элюата смесью МАИ с сорбента Supelclean ENVI-Carb (2)

Таблица 26 – Идентификация ионов, обнаруженных в элюатах, полученных с сорбента Supelclean ENVI-Carb

m/z	t_R , мин	$\lambda_{\text{экс}}$, нм	Экстрагент	Предполагаемое соединение	Ссылка
593	4.825	277	метанол-ацетонитрил (50:50, v/v)	6,8-ди-С-гликозил апигенин, кампферол-3-О-рутинозид	[149, 188, 189]
	4.88	277	ацетонитрил		
	4.77	277	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)		
577	7.25	276	метанол-ацетонитрил (50:50, v/v)	сфаяробиозид, ланцеоларин, Tri FA1, Tri FA 2, Tri FA 3, Tri FA 4, процианидин димер В1, процианидин димер В2, 6-С- гликозил-8-С-рамнозил апигенин	[149, 190]
	7.74	281			
	7.245	275	ацетонитрил		
	7.695	282			
	7.14	278	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)		
	8.96	279			
	7.165	278	метанол - изопропиловый спирт (20:80, v/v)		
9.015	279				
289	8.13	280	метанол-ацетонитрил (50:50, v/v)	(-)-эпикатехин, (+)-катехин	[190, 191]
	8.05	279	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)		
	8.045	279	метанол - изопропиловый спирт (20:80, v/v)		
337	10.64	279	метанол-ацетонитрил (50:50, v/v)	5-О-п-кумароилхинная кислота, 3-О-п-кумароилхинная кислота	[40, 150, 188, 192]
	10.59	279	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)		
	8.485	282	метанол - изопропиловый спирт (20:80, v/v)		

Продолжение таблицы 26

m/z	t_R , мин	$\lambda_{ЭК}$, нм	Экстрагент	Предполагаемое соединение	Ссылка
421	12.59	279	метанол-ацетонитрил (50:50, v/v)	кверцетин 6-С-гликозид, мангиферин	[188]
	10.28	277	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)		
	12.49	279			
	12.54	279	метанол - изопропиловый спирт (20:80, v/v)		
515	5.48	279	метанол-ацетонитрил (50:50, v/v)	1,3-О-дикофеилхинная кислота, 3,4-О-дикофеилхинная кислота, 1,5-О-дикофеилхинная кислота, 3,5-О-дикофеилхинная кислота, 4,5-О-дикофеилхинная кислота, 1,4-О-дикофеилхинная кислота	[149, 192]
	17.24	282	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)		
	17.29	283	метанол - изопропиловый спирт (20:80, v/v)		
719	11.65	279	метанол - ацетонитрил - изопропиловый спирт (1:1:1, v/v)	сагериновая кислота	[193]

3.4.5 Твердофазная экстракция флороглюцинолов и нафтодиантронов из водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного

Наличие в зверобое продырявленном нафтодиантронов и флороглюцинолов обуславливает его антидепрессантное действие [7, 103, 148, 152, 194, 195]. Данные соединения плохо экстрагируются в водную среду, а извлекаются в полной мере в водно-спиртовые растворы [103]. Для изучения сорбции данных соединений на полимерных и углеродном сорбентах получены водно-спиртовые экстракты зверобоя микроволновой экстракцией с использованием 70%-ного этилового спирта в качестве экстрагента [102].

Твердофазную экстракцию флороглюцинолов и нафтодиантронов из водно-спиртового экстракта зверобоя полимерными сорбентами оптимизировали с использованием сорбента Strata X (рисунок 34).

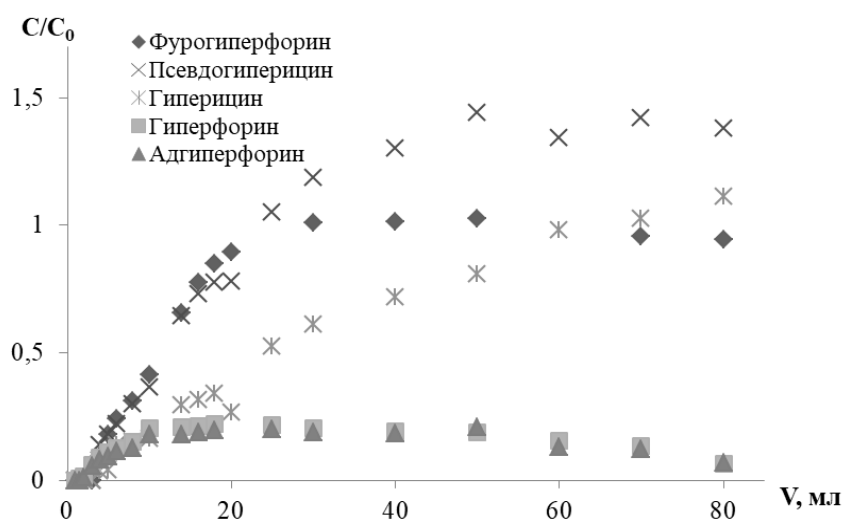


Рисунок 34 – ВДКС флороглюцинолов и нафтодиантронов на сорбенте Strata X

Из рисунка 34 видно, что полученные ВДКС гиперфорина и адгиперфорина не характеризуются S-образной формой, типичной для других ФС, вследствие чего сорбционные характеристики аналитов рассчитать не удалось (таблица 27). Несмотря на не сигмообразность ВДКС гиперицина, ее начальный участок позволил рассчитать сорбционные характеристики для нахождения оптимального объема водно-спиртового экстракта для сорбции (таблица 27).

Таблица 27 – Сорбционные характеристики сорбента Strata X по отношению к флороглюцинолам и нафтодиантронам зверобоя ($n=3$, $P=0.95$, $S_r \leq 0.5$)

Соединение	Параметр								
	V_R , мл	V_B , мл	σ_V , мл	$\sigma_{V'}$, мл	V_E , мл	N	K	R, %	$DE \times 10^{-7}$, моль/г
Фурогиперфорин	9	1	5	7	23	1.4	2	100 ± 5	3.1 ± 0.5
Псевдогиперицин	11	3	7	8	27	0.9	-	- *	3.7 ± 0.5
Гиперицин	23	3	13	29	81	1.4	-	-	1.8 ± 0.3

Примечание. V_R – объем удерживания; V_B – объем «до проскока»; V_E – равновесный объем; σ_V и $\sigma_{V'}$ – стандартные отклонения на ВДКС; N – ЧТТ; R – степень извлечения; K – коэффициент концентрирования; DE – динамическая емкость сорбента; * - количественного извлечения компонента не наблюдалось

Как видно из данных ВДКС, представленных на рисунке 34 и таблице 27, объемы «до проскока» для фурогиперфорина, псевдогиперицина и гиперицина на сорбенте Strata X составили 1 мл, 3 мл и 3 мл соответственно.

Для десорбции анализов использовали ацетонитрил в качестве наиболее распространенного элюента для данного класса соединений. В отличие от флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, кривые десорбции для нафтодиантронов и флороглюцинолов (рисунок 35) не описываются нормальным распределением. Форма кривых десорбции нафтодиантронов (рисунок 35, а) позволила объяснить отсутствие в элюатах указанных соединений. Предполагается, что данный класс веществ необратимо сорбируется на материал сорбента Strata X ввиду своей физико-химической природы. Тем не менее, в отношении фурогиперфорина удалось добиться количественного извлечения компонента с материала сорбента. Так, на основании полученных данных (рисунок 35, б) удалось достичь 100%-го извлечения фурогиперфорина при концентрировании его в 2 раза на полимерном сорбенте (таблица 27).

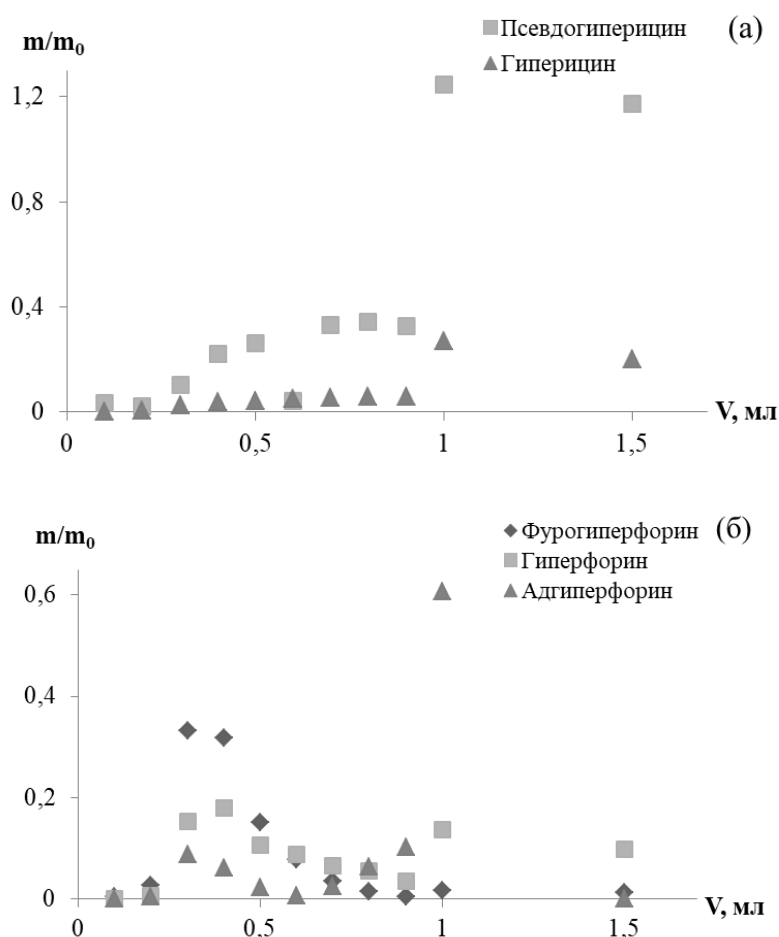


Рисунок 35 – Кривые десорбции флороглюцинолов (а) и нафтодиантронов (б) с сорбента Strata X

Учитывая результаты успешного применения сорбента с гидрофильно - липофильной двойственностью Oasis HLB для извлечения ФС из водных экстрактов зверобоя [181], провели серию экспериментов по десорбции флороглюцинолов и нафтодиантронов ацетонитрилом. На основе полученных зависимостей рассчитали степень извлечения компонентов при различном коэффициенте концентрирования (таблица 28). В отношении флороглюцинолов сорбент Oasis HLB достаточно перспективен как с целью очистки экстракта и извлечения компонентов, так и концентрирования соединений данного класса. При концентрировании в 2,5 раза удалось извлечь 81, 95 и 105% фуругиперфорина, гиперфорина и адгиперфорина соответственно. Однако, по отношению к нафтодиантронам, он аналогично Strata X оказался неэффективным,

показав степени извлечения 4 и 25% для гиперидина и псевдогиперидина соответственно.

Таблица 28 – Степень извлечения нафтодиантронов и флороглюцинолов с сорбента Oasis HLB в зависимости от коэффициента концентрирования аналита, % ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Коэффициент концентрирования						
	10	5	3	2.5	2	1.5	1
Фуругиперфорин	40 ± 1	79 ± 5	81 ± 6	81 ± 6	81 ± 6	81 ± 6	82 ± 6
Гиперфорин	51 ± 5	92 ± 6	95 ± 7	95 ± 7	96 ± 7	96 ± 7	100 ± 6
Адгиперфорин	51 ± 5	102 ± 2	105 ± 4	105 ± 5	105 ± 5	105 ± 5	105 ± 5
Псевдогиперидин	- *	-	-	-	0.52 ± 0.11	2 ± 1	25 ± 2
Гиперидин	-	-	-	-	-	-	4 ± 2

Примечание. * - количественное извлечение не наблюдалось

Учитывая полученные данные в отношении углеродного сорбента для ФС [183], интересным представлялось установление их сорбционных характеристик в отношении нафтодиантронов и флороглюцинолов. Ожидается, что в связи с физико-химическими особенностями гиперидина [103], его десорбция с углеродного материала будет затруднительной, вероятнее, полностью невозможной, за счет необратимой сорбции данного компонента на материал сорбента.

Форма ВДКС S-образная и позволила рассчитать основные сорбционные характеристики материала по отношению к данному классу веществ (таблица 29).

Таблица 29 – Сорбционные характеристики сорбента Supelclean ENVI-Carb по отношению к флороглюцинолам ($n=3$, $S_r \leq 0.5$)

Соединение	Параметр								
	V_R , мл	V_B , мл	σ_V , мл	$\sigma_{V'}$, мл	V_E , мл	N	K	R, %	ДЕ × 10 ⁻⁷ , моль/г
Фуругиперфорин	13	12	1	2	16	182	3	91 ± 2	8.7 ± 1.7
Гиперфорин	12	10	2	2	16	42	3	83 ± 27	50 ± 10
Адгиперфорин	12.5	11	1.5	2	16	78	3	87 ± 16	5.4 ± 1.1

Примечание. V_R – объем удерживания; V_B – объем «до проскока»; V_E – равновесный объем; σ_V и $\sigma_{V'}$ – стандартные отклонения на ВДКС; N – ЧТТ; R – степень извлечения; K – коэффициент концентрирования; ДЕ – динамическая емкость сорбента

На основе ВДКС флороглюцинолов из водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного (рисунок 36) установили, что объем «до проскока» на уровне 10% находится в пределах 12 мл, что позволяет сконцентрировать данные соединения без значительных потерь. Форма ВДКС флороглюцинолов на углеродном материале схожа с аналогичной динамической кривой, полученной для фенолкарбоновых кислот (рисунок 28, а).

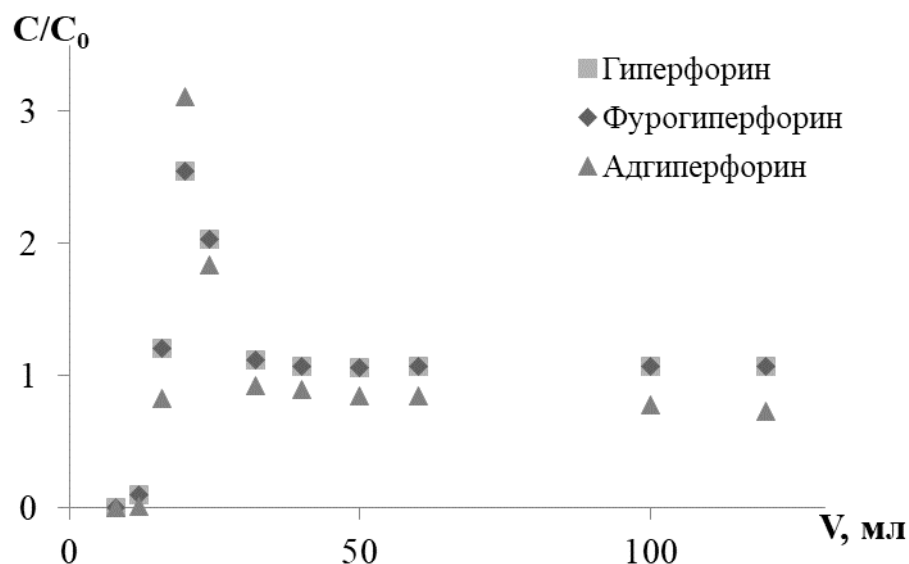


Рисунок 36 – ВДКС флороглюцинолов на сорбенте Supelclean ENVI-Carb

Учитывая возможность десорбции аналитов с поверхности углеродного сорбента при повышенной температуре, что было показано ранее на примере фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и их гликозидов (рисунок 29), десорбцию гиперфоринов и гиперфицинов проводили в подобранных условиях (температура – 120°C, элюент – МАИ, скорость потока элюента – 1 мл/мин) (рисунок 37).

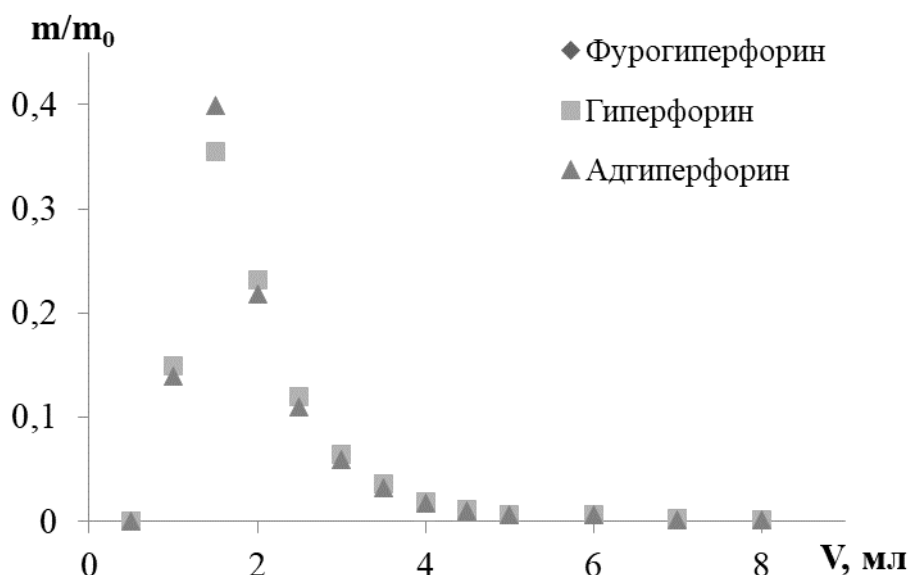


Рисунок 37 – Кривые десорбции флороглюцинолов с сорбента Supelclean ENVI-Carb в субкритических условиях

Важно отметить, что в данных экспериментальных условиях имеет место необратимая сорбция нафтодиантронов (гиперицина и псевдогиперицина) на поверхности сорбента Supelclean ENVI-Carb, что связано со схожестью структур аналитов и самого сорбента (наличие π – π сопряжений в структурах соединений и сорбента).

Степень извлечения гиперфорина, фурогиперфорина и адгиперфорина рассчитывали при различных коэффициентах концентрирования (таблица 30).

Таблица 30 – Степень извлечения флороглюцинолов из водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного на сорбенте Supelclean ENVI-Carb при различных коэффициентах концентрирования, % (n=3, P=0.95)

Соединение	Коэффициент концентрирования				
	8	6	4	3	2
Фурогиперфорин	55 ± 14	73 ± 9	86 ± 1	90 ± 1.5	91 ± 3
Гиперфорин	50 ± 2	67 ± 9	80 ± 22	83 ± 27	85 ± 29
Адгиперфорин	56 ± 7	72 ± 2	84 ± 12	87 ± 16	88 ± 18

Как видно из полученных результатов (таблица 30), степень извлечения флороглюцинолов достигает 90%. Замечено, что при увеличении времени десорбции возрастает погрешность определения гиперфорина, что, вероятно,

связано с процессами деградации данного соединения с образованием его производных форм.

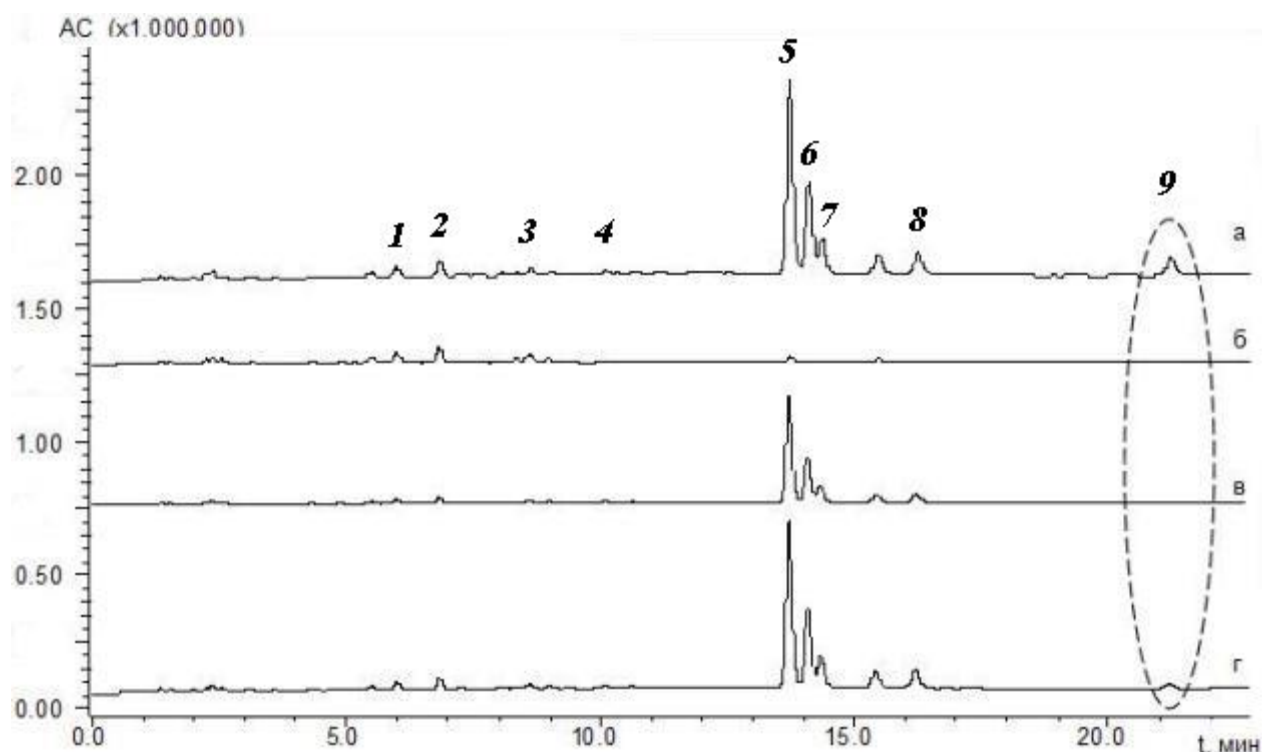
Таким образом, анализ полученных данных показал, что непористый графитированный сорбент Supelclean ENVI-Carb перспективен как для извлечения фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и их гликозидов из водных экстрактов растительного сырья, так и для извлечения флороглюцинолов из водно-спиртовых сред.

Твердофазная экстракция эффективна в отношении ФС, содержащихся в водных и водно-спиртовых экстрактах растительных объектов и позволяет извлекать их с высокими степенями их извлечения. Использование различных типов сорбентов показало, что минорные компоненты, которые не детектируются в обычных условиях хроматографического определения, могут быть сконцентрированы с помощью ТФЭ для дальнейшей их идентификации. Предложенная методика ТФЭ фенольных компонентов может быть в дальнейшем использована для анализа растительных материалов - представителей других семейств.

3.4.6 Концентрирование кверцетина различными типами сорбентов

Кверцетин – основной компонент многих лекарственных растений, поэтому находится в центре внимания большинства исследований на стыке аналитической химии и фармакогнозии [196].

При изучении сорбции кверцетина [182] отмечено большое сродство к сорбентам Strata C18-E, Strata X и Supelclean ENVI-Carb, выражающееся в медленной скорости насыщения им сорбентов на фоне уже достигнутого перенасыщения другими ФС зверобоя (рисунок 38).



1 – 3,4-дигидроксибензойная кислота; 2 – неохлорогеновая кислота; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – (-)-эпикатехин; 5 – рутин; 6 – гиперозид; 7 – изокверцитрин; 8 – кверцитрин; 9 – кверцетин

Рисунок 38 – Хроматограммы водных экстрактов зверобоя (а) после пропускания через сорбент: 6 мл (б), 30 мл (в); 60 мл (г) раствора

Данные рисунка 38 свидетельствуют о том, что при сорбции 30 мл экстракта зверобоя на хроматограмме наблюдаются пики всех изучаемых ФС, кроме кверцетина, что говорит о его сравнительно большем удерживании на материале сорбента. «Проскок» для кверцетина достигается только после сорбции 60 мл экстракта, в то время, как концентрации остальных компонентов в элюатах уже достигли первоначального уровня. Данная зависимость исключила возможность одновременного определения кверцетина наряду с другими представителями флавоноидов. Учитывая данный факт, в настоящем исследовании получены только степени извлечения кверцетина на изучаемых сорбентах, исключая остальные сорбционные характеристики (объемы «до проскока», динамическая емкость) (таблица 31).

Таблица 31 – Сорбционные характеристики различных концентрационных материалов по отношению к кверцетину

	Сорбент									
	Strata C18-E				Strata X			Supelclean ENVI-Carb		
Параметр	R ₁ , %	K ¹ _{C18}	R ₂ , %	K ² _{C18}	R ₁ , %	R ₂ , %	K _{SX}	R ₁ , %	R ₂ , %	K _{EC}
	110 ± 12	2	118 ± 16	5	39 ± 5	90 ± 3	5	<1	<1	30

Примечание. R₁ – степень извлечения при десорбции ацетонитрилом; R₂ – степень извлечения при десорбции метанолом; K¹_{C18} – коэффициент концентрирования кверцетина на сорбенте Strata C18-E при десорбции ацетонитрилом; K²_{C18} – коэффициент концентрирования кверцетина на сорбенте Strata C18-E при десорбции метанолом; K_{SX} – коэффициент концентрирования кверцетина на сорбенте Strata X; K_{EC} – коэффициент концентрирования кверцетина на сорбенте Supelclean ENVI-Carb

3.4.7 Твердофазная экстракция ФС из водных экстрактов ЛРС иных семейств

Разработанная методика твердофазной экстракции ФС апробирована на образцах лекарственного растительного сырья семейств Яснотковые [чабрец ползучий (*Thymus serpyllum* L.) и шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.)] и Бобовые [клевер луговой (*Trifolium pratense* L.)].

Получены водные экстракты данных лекарственных растений, из которых затем на сорбенты Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB и Supelclean ENVI-Carb сорбировали ФС. Десорбцию аналитов проводили в оптимизированных для каждого из приведенных сорбентов условиях. Содержание аналитов в водных экстрактах и элюатах контролировали хроматографически. Полученные значения степеней извлечения целевых соединений, содержащихся в водных экстрактах растительных материалов семейства Яснотковые, представлены в таблице 32. Коэффициенты концентрирования аналитов сорбентами при этом составили для: Strata C18-E - 2, Strata X и Supelclean ENVI-Carb – 5, Oasis HLB – 8.

Таблица 32 – Степени извлечения ФС из водных экстрактов ЛРС семейства Яснотковые, % (n = 3, P = 0,95)

Образец Соединение	Чабрец ползучий (<i>Thymus serpyllum</i> L.)				Шалфей лекарственный (<i>Salvia officinalis</i> L.)			
	Strata C18-E	Strata X	Envi-Carb	Oasis HLB	Strata C18-E	Strata X	Envi-Carb	Oasis HLB
Кофейная кислота	23 ± 1	98 ± 3	61 ± 6	86 ± 4	26 ± 1	96 ± 5	50 ± 2	108 ± 21
Розмариновая кислота	71 ± 4	93 ± 5	21 ± 2	78 ± 3	69 ± 4	95 ± 3	21 ± 1	99 ± 10
Хлорогеновая кислота	13 ± 1	100 ± 1	39 ± 3	82 ± 2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Неохлорогеновая кислота	12 ± 2	94 ± 1	51 ± 2	77 ± 2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Рутин	23 ± 1	112 ± 13	13 ± 2	94 ± 5	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Лютеолин-7-О-бета-D-глюкуронид	28 ± 2	95 ± 5	≤ 1	80 ± 3	23 ± 2	90 ± 8	≤ 1	97 ± 9
Лютеолин 7-О-бета-D-глюкозид	84 ± 6	110 ± 23	4 ± 2	87 ± 7	81 ± 6	87 ± 17	≤ 1.5	100 ± 12

Примечание. н.о. – соединение не обнаружено.

Данные таблицы 32 позволяют заключить, что, несмотря на различную растительную матрицу анализируемых объектов, характер сорбции и десорбции ФС на сорбентах такой же, как и в случае ТФЭ ФС из экстрактов зверобоя. Однако сорбент Strata C18-E позволяет извлекать не более 13% хлорогеновых кислот. Напротив, сорбент Strata X показывает их 100%-ное извлечение при пятикратном концентрировании.

Низкие значения степеней извлечения лютеолина-7-О-β-D-глюкуронида (≤ 1%) и лютеолина-7-О-β-D-глюкозида (4% для чабреца ползучего и ≤ 1,5% для шалфея лекарственного) сорбентом Supelclean ENVI-Carb могут быть объяснены недостаточным объемом экстракта для полной сорбции компонентов материалом сорбента, что требует дальнейшей оптимизации. Эффективными по отношению к данным компонентам оказались полимерные сорбенты, показавшие 100%-ную степень извлечения аналитов из водных экстрактов чабреца и шалфея.

Степени извлечения ФС шалфея лекарственного и чабреца ползучего из водных экстрактов достаточно близки друг к другу несмотря на различную растительную матрицу образцов (таблица 32).

В случае ТФЭ изофлавоноидов (дайдзеин, генистеин, формонетин и биоканин А) десорбцию аналитов с учетом физико-химических особенностей данных соединений 100%-ным метанолом. Установили протекание необратимой сорбции аналитов на сорбенты Strata C18-E и Oasis HLB, в связи с чем отмечали низкие степени реэкстракции целевых соединений (таблица 33).

Таблица 33 – Степень извлечения изофлавоноидов из водно-этанольного экстракта соцветий клевера лугового различными сорбентами, % (n=3, P=0.95)

Соединение	Сорбент		
	Strata X	Strata C18-E	Oasis HLB
Дайдзеин	92 ± 6	н.о.	17.3 ± 0.5
Генистеин	56 ± 4	н.о.	1.1 ± 0.3
Формонетин	40 ± 6	1.7 ± 0.6	3.3 ± 0.6
Биоканин А	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	н.о.

Примечание. н.о. – не обнаружено

Исключением является сорбент Strata X, который количественно извлекает дайдзеин (R = 92%), генистеин (R = 56%) и формонетин (R = 40%) при незначительном их концентрировании. Из представленных на рисунке 39 хроматограмм видно, что данный сорбент обеспечивает очистку экстракта от мешающих компонентов.

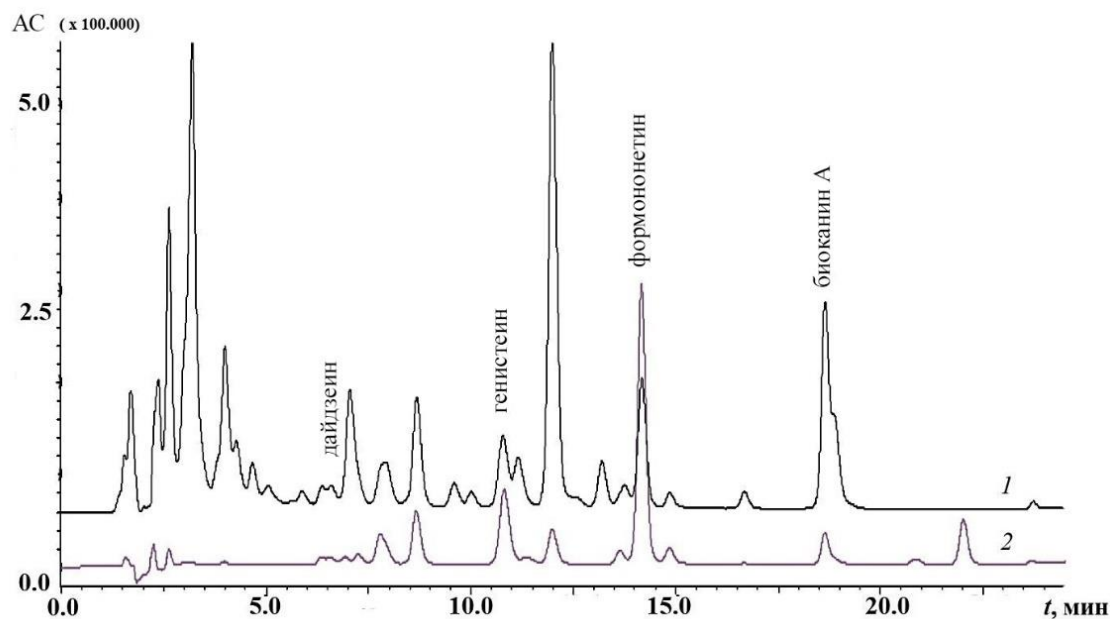


Рисунок 39 – Хроматограмма водно-этанольного экстракта клевера лугового до (1) и после (2) ТФЭ в условиях ВЭЖХ–ДМД–МС анализа

Тем не менее, полученные на данный момент данные по ТФЭ изофлавоноидов из водно-этанольных экстрактов клевера лугового не позволяют рекомендовать данный подход для концентрирования данных соединений.

3.5 ГХ-МС определение ФС в водных экстрактах ЛРС с применением твердофазной аналитической дериватизации аналитов

Как уже было отмечено, для определения ФС в экстрактах ЛРС применяют хроматографические методы анализа, а именно ВЭЖХ с различными вариантами детектирования и ГХ-МС [5, 32, 34, 35, 134]. С другой стороны, ВЭЖХ не всегда достоверно позволяет проводить идентификацию и определение компонентов. Газовая хроматомасс-спектрометрия позволяет, во многом, решать такого рода задачи, появляется возможность расширить спектр идентифицируемых и определяемых компонентов не только благодаря стандартным образцам, но и возможностью применения библиотек масс-спектров в сочетании с параметрами удерживания [184]. Ряд ФС, входящих в состав экстрактов растительного сырья являются нелетучими, а фенольные кислоты, в частности, деградируют при температурах выше 200°C [135], в связи с чем для их определения требуется предварительная дериватизация, усложняющая подготовку проб к анализу. Поскольку ФС являются полярными соединениями, их ГХ-МС определение возможно после экстракции с последующей дериватизацией ацилирующими, алкилирующими или силилирующими агентами.

На основе совокупности данных по твердофазному извлечению фенольных соединений из экстрактов лекарственных растений и литературных данных по твердофазной аналитической дериватизации ФС [143, 197, 198], разработали методику газохроматомасс-спектрометрического определения ФС в водных экстрактах ЛРС.

Для оптимизации условий ГХ-МС определения ФС использовали водный экстракт зверобоя продырявленного, полученный микроволновой экстракцией и

сорбент Strata C18-E. Было установлено, что оптимальный объем водного экстракта зверобоя, обеспечивающий концентрирование и извлечение компонентов сорбентом Strata C18-E, составляет 0.1 мл (таблица 21). Контроль содержания фенольных соединений в элюате проводили с помощью ВЭЖХ-ДМД системы (рисунок 40).

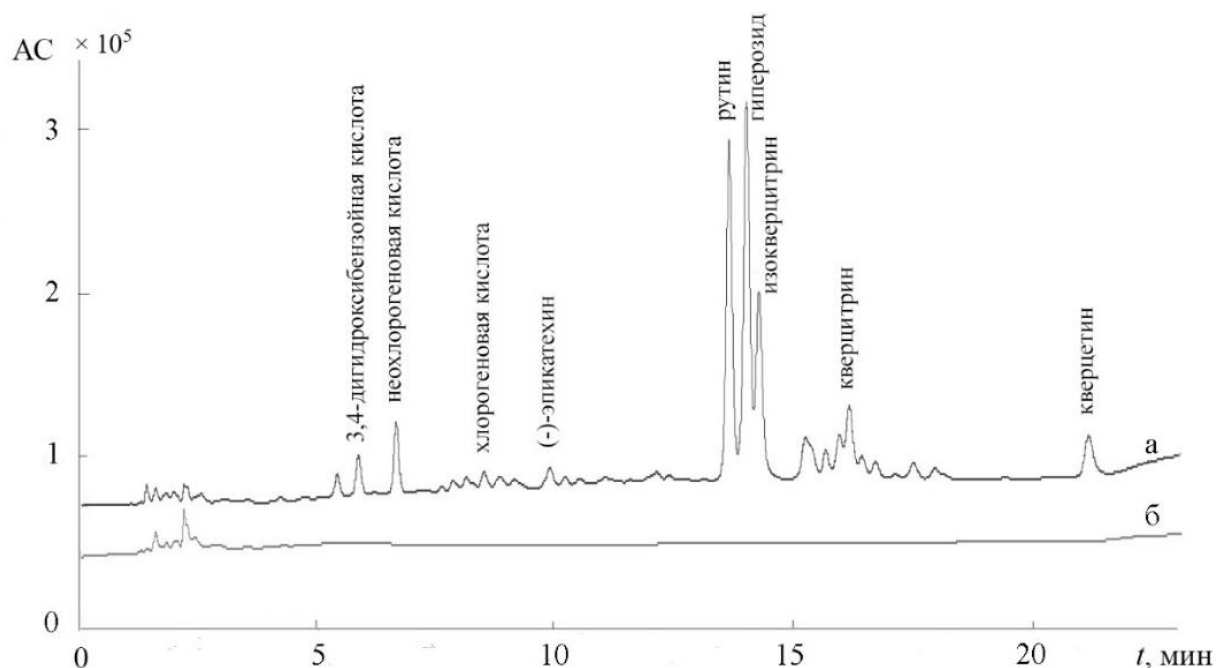


Рисунок 40 – Хроматограммы исходного (а) и пропущенного через сорбент Strata C18-E (б) водного экстракта зверобоя продырявленного

Представленные на рисунке 40 хроматограммы подтвердили отсутствие «проскока» целевых соединений в элюатах.

Оптимизация времени и температуры инкубации сорбента Strata C18-E.

Авторами работ [136, 143, 144] показана возможность силилирования различных классов соединений в экстрактах различных объектов с использованием техники твердофазной аналитической дериватизации. При этом в качестве основополагающих факторов отмечены отсутствие влаги во время реакции, температура и продолжительность инкубации сорбента. Отсутствие влаги на сорбенте Strata C18-E после сорбции водного экстракта зверобоя продырявленного обеспечивали путем пропускания через него потока азота в течение фиксированного времени.

Влияние температуры на дериватизацию ФС изучали в диапазоне 40–70°C с шагом в 10°C (рисунок 41).

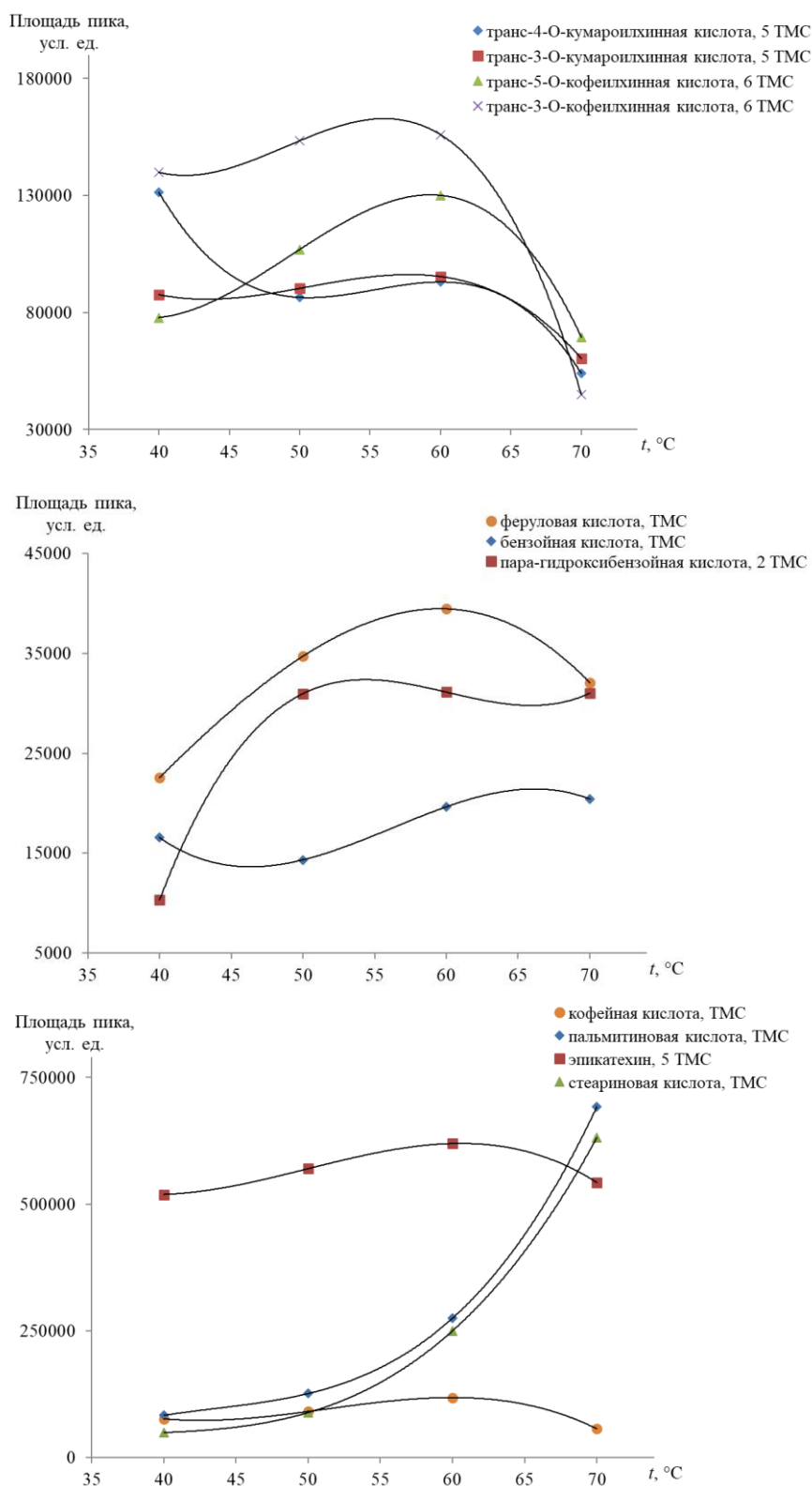


Рисунок 41 – Зависимость площади пиков компонентов водного экстракта зверобоя продырявленного от температуры инкубации сорбента

Для фенольных и коричневых кислот дериватизация протекала успешно при 40°C. Тем не менее, данные рисунка 41 показали, что для подавляющего числа триметилсилильных (ТМС) производных ФС, в том числе кумароилхинных (3-О-, 4-О- и 5-О-кумароилхинная) и кофеилхинных (3-О- и 5-О-кофеилхинная) кислот, оптимальными условиями проведения реакции является температурный диапазон 50–60°C. В этих условиях наблюдали стабильность интенсивности сигналов вышеперечисленных компонентов. Для *пара*-гидроксибензойной и феруловой кислот, а также флавоноидов инкубация сорбента при 60°C оказалась оптимальной. Для представителей жирных кислот (производные пальмитиновой и стеариновой кислот) приемлемой оказалась более высокая температура (70°C), при которой наблюдали резкое возрастание интенсивности сигнала их ТМС производных (рисунок 41). Дальнейшее повышение температуры дериватизации ограничивал материал корпуса патронов для ТФЭ.

Дериватизация компонентов в растворе позволяет работать и при более высоких температурах, но с дальнейшим ее повышением не исключена деградация аналитов. Аналитическую дериватизацию компонентов водного экстракта зверобоя продырявленного проводили с учетом данных работы [199] по дериватизации ФС тысячелистника обыкновенного, содержащего в своем составе ряд гликозидов флавоноидов, фенольных и коричневых кислот.

Дериватизацию ацетонитрильного элюата, полученного после пропускания экстракта зверобоя продырявленного через сорбент Диапак С18, проводили при 70°C согласно [199]. По степени извлечения фенольных соединений из экстрактов лекарственных растений сорбенты Диапак С18 и Strata С18-Е сопоставимы, о чем свидетельствует анализ экспериментальных и литературных данных [181, 200, 201]. Степени извлечения ряда фенольных кислот (протокатеховая и хлорогеновые кислоты) сорбентами Диапак С18 и Strata С18-Е составили 25-30% и 35-40 %, а флавоноидов (рутина, гиперозида, (-)-эпикатехина и др.) – 90-100% и 80-100% соответственно [181]. Дериватизация в растворе позволила идентифицировать ТМС производные β-резорциловой, ванилиновой и сиринговой кислот, не регистрируемые ВЭЖХ-ДМД, а также соединения, отнесенные по

данным библиотек к спиртам – трейтолу, рибитолу и ксилитолу. По-видимому, это связано с присутствием в Диапак С18 по сравнению с Strata C18-E свободных силанольных групп, оказывающих влияние на концентрирование этих соединений из раствора. Перечень присутствующих в составе элюатов производных вышеперечисленных соединений представлен в таблице 34. В элюатах не обнаружили производные кумароилхинных и кофеилхинных кислот, за исключением 6 ТМС 3-О-кофеилхинной кислоты. Вероятнее всего, это связано с неподходящими условиями сорбции данных компонентов на Диапак С18.

Таблица 34 – Компонентный состав извлечений после дериватизации в растворе и твердофазной аналитической дериватизации водного экстракта зверобоя продырявленного

Соединение	Дериватизация в растворе	Твердофазная аналитическая дериватизация	
		экстракт с pH 5	экстракт с pH 2
Галловая кислота, 3 ТМС	-	+	+
β -L-арабинопираноза, 4 ТМС	-	-	+
Рамноза, 4 ТМС	-	-	+
D-рибофураноза, 4 ТМС	-	-	+
γ -резорциловая кислота, 3 ТМС	-	-	+
Флороглюцинол, 3 ТМС	-	-	+
Салициловая кислота, 2 ТМС	-	-	+
Бензойная кислота, ТМС	-	-	+
Трейтол, 4 ТМС	+	-	-
<i>para</i> -гидроксibenзойная кислота, 2 ТМС	+	+	+
β -резорциловая кислота, 3 ТМС	+	-	-
Рибитол, 5 ТМС	+	-	-
Ксилитол, 5 ТМС	+	-	-
Ванилиновая кислота, 2 ТМС	+	-	-
Глюконовая кислота, 6 ТМС	-	+	-
Протокатеховая кислота, ТМС	+	+	+
D-фруктоза, 5 ТМС	+	+	+
D-ксилофураноза, 4 ТМС	+	+	+
Метил- α -D-глюкофуранозид, 4 ТМС	+	-	-

Продолжение таблицы 34

Соединение	Дериватизация в растворе	Твердофазная аналитическая дериватизация	
		экстракт с рН 5	экстракт с рН 2
Сиринговая кислота, 2 ТМС	+	-	-
D-глюкопираноза, 5 ТМС	+	+	-
D-маннитол, 6 ТМС	+	-	-
Пальмитиновая кислота, ТМС	+	+	+
Кофейная кислота, ТМС	+	+	+
Стеариновая кислота, ТМС	+	+	-
Эпикатехин, 5 ТМС	+	+	+
<i>транс</i> -3-О-кофеилхинная кислота, 6 ТМС	+	-	+
<i>транс</i> -5-О-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	-	+	-
<i>транс</i> -4-О-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	-	+	+
Арабинофураноза, 4 ТМС	-	+	-
β -D-галактофураноза, 5 ТМС	-	+	-
Кверцетин, 5 ТМС	-	-	+
<i>транс</i> -5-О-кофеилхинная кислота, 6 ТМС	-	-	+
<i>транс</i> -3-О-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	-	-	+
Феруловая кислота, 2 ТМС	-	-	+
D-галактоза, 5 ТМС	-	-	+
Пирогаллолкарбоновая кислота, 4 ТМС	-	-	+
α -рамноза, 4 ТМС	-	-	+

За исключением производных кумароилхинных и кофеихинных кислот инкубация целевых соединений при 70°C показала сопоставимый с полученным при оптимальной температуре для того или иного анализа результат, поэтому дальнейшие исследования проводили при этой температуре.

Оптимальное *время* инкубации сорбента Strata C18-E с БСТФА при твердофазной аналитической дериватизации компонентов устанавливали в диапазоне 5–40 мин. Полученная зависимость концентрации производных соединений от времени инкубации сорбента оказалась различной (рисунок 42).

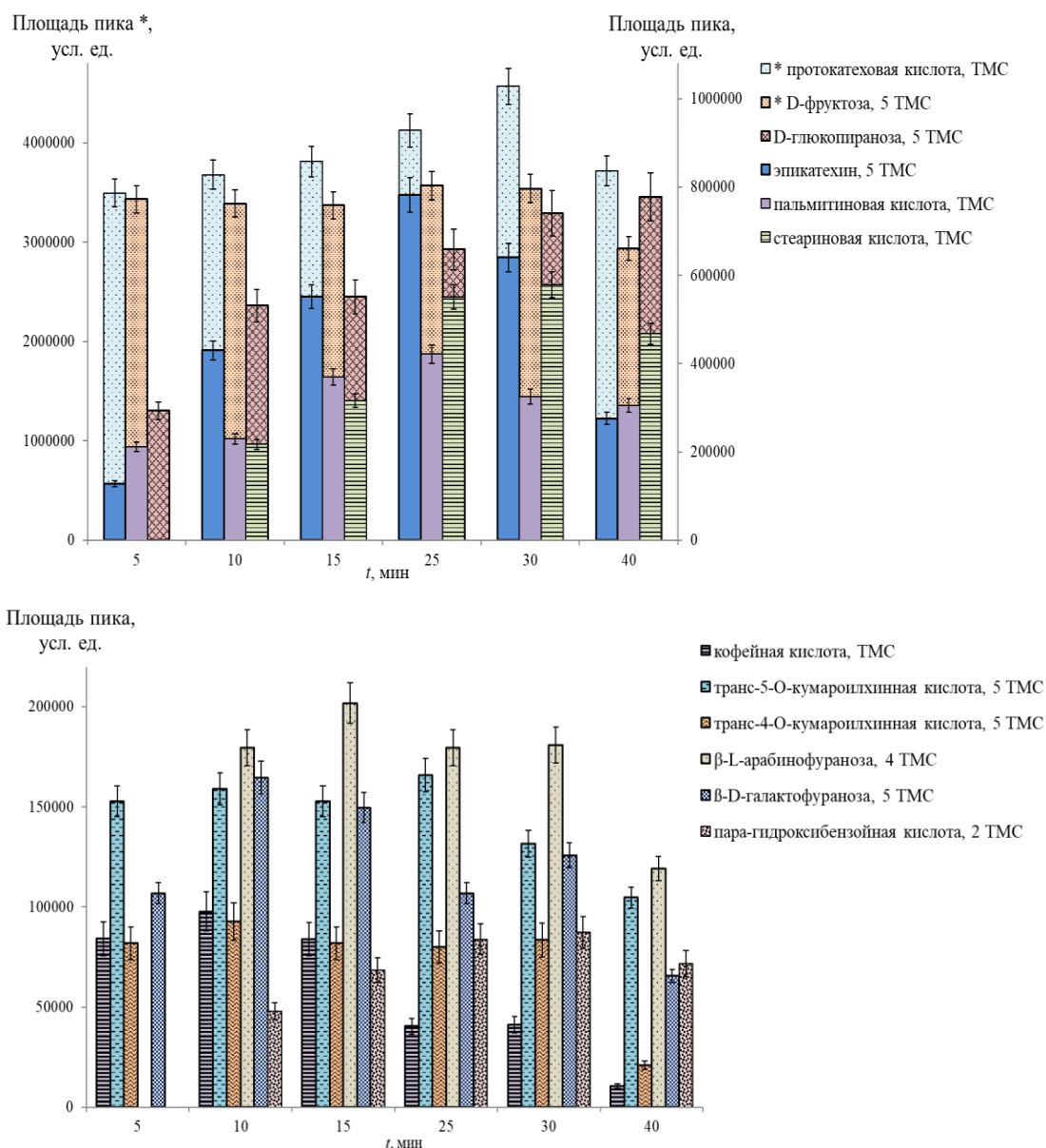


Рисунок 42 – Зависимость площади пиков компонентов водного экстракта зверобоя прордырявленного от времени инкубации сорбента

Для производных 5-О- и 4-О-кумароилхинных кислот время инкубации сорбента не оказало воздействия на интенсивность сигнала. Соединения максимально образовывались при инкубации сорбента в течение 5 мин. Выходы ТМС производных β -D-галактофуранозы и β -L-арабинофуранозы оптимальны при 10 и 15 мин. инкубирования соответственно (таблица 35). Наибольшую концентрацию ТМС производного кофейной кислоты в элюате наблюдали при инкубации сорбента в течение 10 мин., затем происходило постепенное снижение его содержания. Данная зависимость, возможно, обусловлена протекающими под

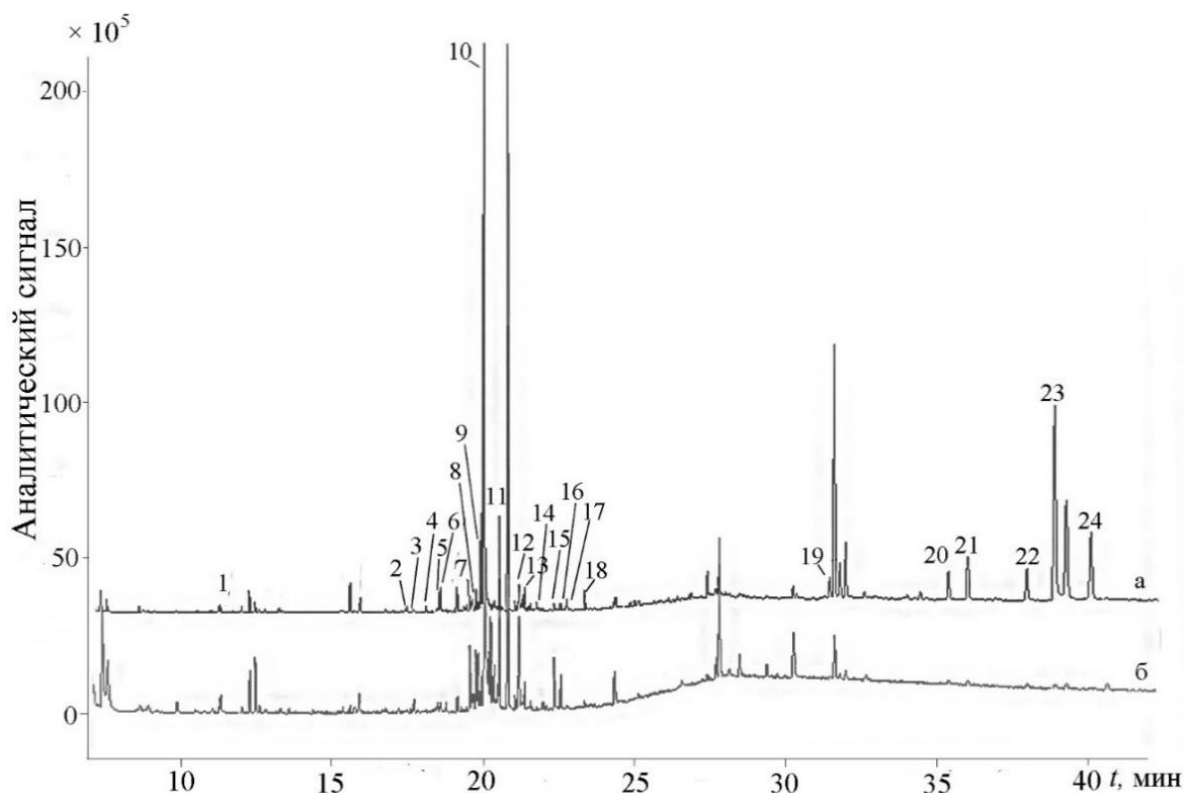
действием температуры процессами деструкции этого соединения и его производных во времени. Для соединений, принадлежащих к классам жирных кислот и флавоноидов, эффективнее оказалась более продолжительная инкубация сорбента. Так, концентрации производных пальмитиновой и стеариновой кислот, а также эпикатехина возрастали до 25 мин. инкубации, после чего наблюдали незначительное их уменьшение. Концентрации ТМС протокатеховой и 2 ТМС пара-гидроксибензойной кислот максимальны при инкубации сорбента Strata C18-E в термостате в течение 30 мин.

Таблица 35 – Влияние времени инкубации сорбента Strata C18-E на качественный состав ТМС-производных соединений водного экстракта зверобоя

Соединение	Время инкубации сорбента, мин					
	5	10	15	25	30	40
<i>пара</i> -гидроксибензойная кислота, 2 ТМС	-	+	+	+	+	+
Протокатеховая кислота, ТМС	+	+	+	+	+	+
D-фруктоза, 5 ТМС	+	+	+	+	+	+
D-глюкопираноза, 5 ТМС	+	+	+	+	+	+
Пальмитиновая кислота, ТМС	+	+	+	+	+	+
Кофейная кислота, ТМС	+	+	+	+	+	+
Стеариновая кислота, ТМС	-	+	+	+	+	+
Эпикатехин, 5 ТМС	+	+	+	+	+	+
<i>транс</i> -5-о-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	+	+	+	+	+	+
<i>транс</i> -4-о-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	+	+	+	+	+	+
β -L-арабинопираноза, 4 ТМС	-	+	+	+	+	+
β -D- галактофураноза, 5 ТМС	+	+	+	+	+	+

Полученные данные (таблица 35, рисунок 42) позволили заключить, что для качественной оценки компонентного состава водных экстрактов зверобоя продырявленного достаточно инкубирования сорбента в течение 15 мин. При более продолжительной инкубации сорбента качественный состав элюатов оставался неизменным.

Особенности дериватизации водного экстракта зверобоя при различных значениях pH . Снижение pH водного экстракта зверобоя продырявленного изменяет значение ёмкости сорбента Strata C18-E по отношению к ФС за счет перехода аналитов в их молекулярную форму [181]. Сравнение компонентного состава элюатов с сорбента Strata C18-E проводили путем нанесения на него 0.1 мл водного экстракта зверобоя при pH 2 и 5 (таблица 34, рисунок 43).



1 – бензойная кислота, ТМС; 2 – салициловая кислота, 2 ТМС; 3 – *para*-гидроксибензойная кислота, ТМС; 4 – флороглюцинол, 3 ТМС; 5 – γ -резорциловая кислота, 3 ТМС; 6 – β -L-арабинопираноза, 4 ТМС; 7 – рамноза, 4 ТМС; 8 – D-рибофураноза, 4 ТМС; 9 – протокатеховая кислота, ТМС; 10 – D-фруктоза, 5 ТМС; 11 – D-ксилофураноза, 4 ТМС; 12 – галловая кислота, 3 ТМС; 13 – пирогаллолкарбоновая кислота, 4 ТМС; 14 – α -рамноза, 4 ТМС; 15 – пальмитиновая кислота, ТМС; 16 – глюконовая кислота, 6 ТМС; 17 – феруловая кислота, 2 ТМС; 18 – кофейная кислота, ТМС; 19 – эпикатехин, 5 ТМС; 20 – *транс*-4-O-кумароилхинная кислота, 5 ТМС; 21 – *транс*-3-O-кумароилхинная кислота, 5 ТМС; 22 – *транс*-5-O-кофеилхинная кислота, 6 ТМС; 23 – кверцетин, 5 ТМС; 24 – *транс*-3-O-кофеилхинная кислота, 6 ТМС

Рисунок 43 – Хроматограмма элюата, полученного после пропускания 0.1 мл водного экстракта зверобоя продырявленного с pH 2 (а) и pH 5 (б) через сорбент Strata C18-E

В полученном при помощи водного экстракта зверобоя продырявленного с рН 2 элюате обнаружили 3 ТМС флороглюцинол, 2 ТМС салициловую и ТМС феруловую кислоты, которые не были идентифицированы в элюатах водного экстракта зверобоя с рН 5. По данным ВЭЖХ-ДМД анализа флороглюцинол и его производные не регистрировались в водных экстрактах зверобоя. Полученный в данном случае результат, вероятно, связан с эффектом концентрирования данного соединения на сорбенте Strata C18-E.

При рН 2 идентифицировали 5 ТМС 3-О- и 4-О-кумароилхинные и 6 ТМС 3-О- и 5-О-кофеилхинные кислоты с более выраженными хроматографическими пиками в отличие от экстрактов с рН 5. Данный факт, по-видимому, связан с большей устойчивостью данных соединений в кислой среде.

По данным ВЭЖХ-ДМД анализа водного экстракта зверобоя продырявленного выявили значительное количество флавонолгликозидов, преимущественно являющихся гликозидами кверцетина [5, 102]. В условиях ГХ-МС анализа должен регистрироваться 5 ТМС кверцетин, который не был обнаружен после дериватизации компонентов экстракта в растворе, а также при твердофазной аналитической дериватизации экстракта с рН 5. Но, как видно на рисунке 43, данный компонент был идентифицирован в элюате экстракта зверобоя с рН 2. Полученный результат связан с изменением сорбционных свойств кверцетина и его гликозидов при переходе к их молекулярным формам. Вероятно, под воздействием высоких температур протекала деградация гликозидов (рутина, гиперозида и изокверцитрина) с образованием свободного кверцетина и сахарного остатка, которые, в дальнейшем, подверглись силилированию. Тем не менее, данное предположение носит предварительный характер и требует дальнейшего изучения.

Исходя из вышесказанного, заключили, что изменение рН экстракта с 5 до 2 расширяет композиционный профиль водных экстрактов зверобоя продырявленного за счет перевода ФС в их молекулярную форму.

Идентификацию анализируемых соединений в элюатах проводили сопоставлением их времен удерживания, линейных индексов удерживания и масс-спектральных характеристик с данными литературы [140] и библиотек NIST05 и WILEY8. В таблице 36 представлены данные о линейном индексе удерживания (ИУ) целевых соединений, рассчитанные относительно стандартной смеси *n*-алканов.

Таблица 36 – Хроматомасс-спектрометрические параметры ФС, обнаруженных в водном экстракте зверобоя продырявленного (*n* = 3)

Соединение	t_R , МИН	ИУ*	ИУ**	[M] ⁺	<i>m/z</i> (интенсивность)
<i>пара</i> -гидроксибензойная кислота, 2 ТМС	17.425	1467	1503 ± 2	282	193 (20), 207 (7), 223 (98), 267 (100), 282 (25)
Флороглюцинол, 3 ТМС	17.629	1574	1618 ± 2	342	73 (100), 342 (67), 327 (61), 253 (13)
γ -резорциловая кислота, 2 ТМС	18.985	-	1621 ± 2	370	73 (100), 193 (18), 249 (23), 355 (66)
Протокатеховая кислота, ТМС	19.885	1765	1795 ± 3	370	370 (52), 355 (34), 281 (11), 266 (8), 223 (15), 193 (100)
Галловая кислота, 3 ТМС	21.466	2063	2064 ± 3	458	281 (100), 458 (66), 443 (32)
Феруловая кислота, 2 ТМС	22.726	1863	1915 ± 3	338	73 (100), 219 (27), 249 (58), 279 (17), 308 (54), 323 (53), 338 (63)
Кофейная кислота, ТМС	23.315	1972	1936 ± 3	396	396 (41), 381 (15), 307 (6), 249 (11), 219 (100)
Эпикатехин, 5 ТМС	31.568	2228	2372 ± 5	650	368 (100), 650 (13), 561 (3)
<i>транс</i> -4-О-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	35.352	-	2510 ± 4	698	219 (100), 255 (47), 401 (21), 698 (15)
<i>транс</i> -3-О-кумароилхинная кислота, 5 ТМС	35.983	-	2528 ± 4	698	219 (100), 255 (44), 345 (81)
<i>транс</i> -5-О-кофеилхинная кислота, 6 ТМС	37.940	-	2583 ± 4	786	219 (30), 307 (42), 345 (100), 397 (11), 786 (10)
Кверцетин, 5 ТМС	38.859	-	2609 ± 4	662	73 (43), 575 (100), 487 (17), 207 (12), 662 (10)
<i>транс</i> -3-О-кофеилхинная кислота, 6 ТМС	40.061	-	2654 ± 4	786	255 (28), 307 (100), 345 (95), 447 (38), 396 (14), 786 (10)

Примечание. * - согласно данным библиотеки NIST05; ** - расчетное значение относительно стандартной смеси *n*-алканов

Как видно из данных таблицы 36, ИУ компонентов, присутствующих в библиотеках данных, не согласуются с нашими экспериментальными данными, что, по-видимому, связано с иными условиями их определения.

Для уточнения сопоставленных соединений рассмотрели полученные МС-спектры производных соединений (рисунок 44).

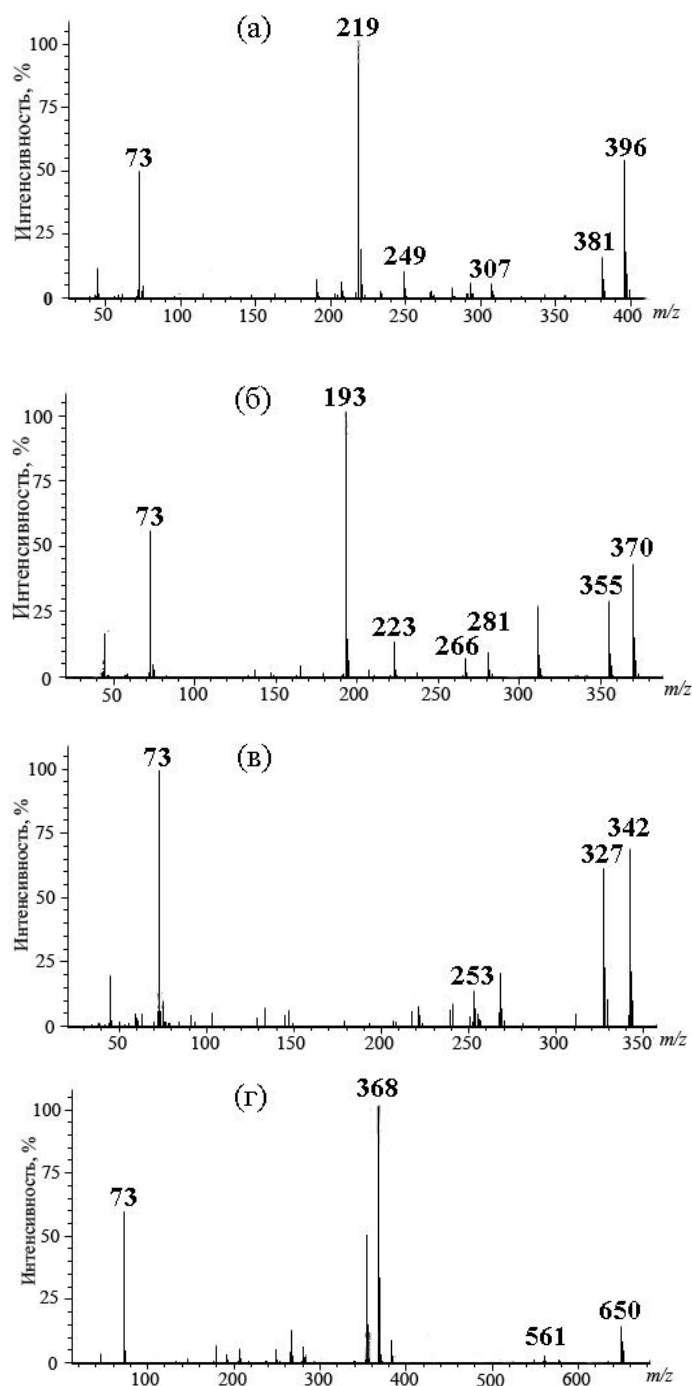


Рисунок 44 – МС-спектры ТМС кофейной кислоты (а), ТМС протокатеховой кислоты (б), ТМС флороглюцинола (в) и 5 ТМС эпикатехина (г), идентифицированных в водных экстрактах зверобоя продырявленного

На МС-спектрах (рисунок 44) отмечены ионы $[M]^+$, $[M-104]^+$, $[M-89]^+$ и $[M-15]^+$, соответствующие молекулярному иону, иону триметилсилилового эфира и одной метильной группы $[(OSi(CH_3)_3) + CH_3]$, расщеплению фрагмента триметилсилилового эфира $(OSi(CH_3)_3)$ и отщеплению метильной группы [202]. На спектрах всех изучаемых соединений обнаружены m/z 73 $[Si(CH_3)_3]$ и триплет в области молекулярного иона, вероятно, обусловленный наличием у кремния изотопов ^{29}Si и ^{30}Si . Для производных кофейной и протокатеховой кислот наблюдали фрагменты $[M-147]^+$ и $[M-177]^+$. Исходя из этого, для искомым соединений обозначили характеристичные m/z , позволяющие использовать их не только для качественной характеристики, но и количественной оценки (таблица 36). Например, для кофейной кислоты это m/z 396, 381, 307, 292, 249 и 219; протокатеховой кислоты – m/z 370, 355, 281, 266, 223 и 193; флороглюцинола – m/z 342, 327, 253, а эпикатехина – m/z 650, 561 и 368 (рисунок 44).

Таким образом, методика твердофазной аналитической дериватизации ФС сопоставима с методикой дериватизации ФС в растворе, при этом имеет свои недостатки и преимущества. Данная методика позволила сократить пробоподготовку образцов перед ГХ-МС детектированием, значительно уменьшила расход экстракта ЛРС, а также обеспечила концентрирование анализируемых соединений. Предложенный подход применим для идентификации фенольных и иных соединений в водных экстрактах зверобоя продырявленного. Сочетание классической аналитической дериватизации и твердофазной экстракции с ГХ-МС детектированием позволило расширить спектр идентифицированных компонентов в водных экстрактах зверобоя продырявленного.

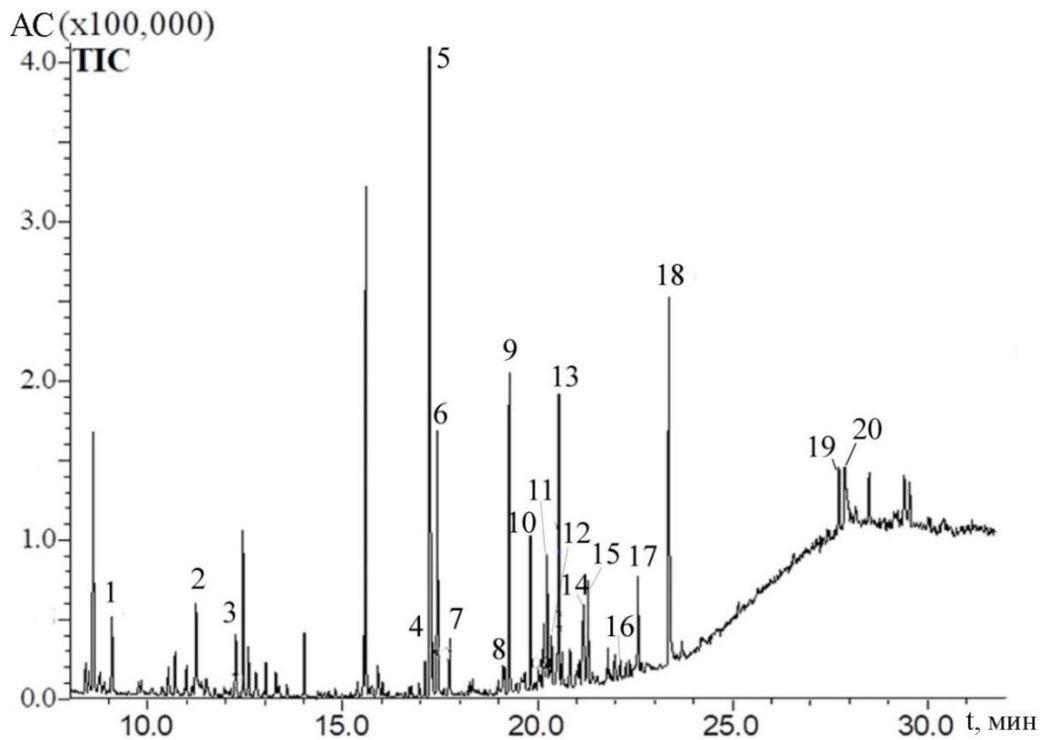
Оптимальными условиями твердофазной аналитической дериватизации фенольных соединений с помощью БСТФА оказалась инкубация сорбента Strata C18-E при $70^\circ C$ в течение 30 мин. Полученные с помощью данной методики результаты удовлетворительно согласуются с данными о соединениях, содержащихся в водном экстракте зверобоя продырявленного, полученных

методом ВЭЖХ-ДМД и идентифицированных с применением стандартных веществ.

3.5.1 Апробация методики ГХ-МС определения ФС на водных экстрактах эхинацеи пурпурной

Апробацию разработанной методики проводили на образцах эхинацеи пурпурной семейства Астровые в оптимизированных условиях ТФЭ с помощью сорбента Strata C18-E.

Методика ГХ-МС определения ФС позволила не только подтвердить нахождение аналитов, идентифицированных с помощью ВЭЖХ-ДМД, но и расширить компонентный состав экстрактов эхинацеи. Так, в составе элюатов идентифицировали ТМС производные кофейной и феруловой кислот, а также кислот, не обнаруженных при ВЭЖХ-анализе: винной, бензойной, протокатеховой, *пара*-гидроксibenзойной, *мета*-гидроксibenзойной, 2,5-дигидроксibenзойной, резорциловой и *мета*-кумаровой. Тем не менее, данные компоненты ранее уже были идентифицированы в исследованиях авторов [118, 153]. Отмечено наличие в элюатах моносахаридов - рибофуранозы, арабинофуранозы, фруктозы и β -D-галактофуранозы (рисунок 45), не упомянутые в более ранних исследованиях.



1 – акриловая кислота, 2 ТМС; 2 - 3-гидроксиизомаляновая кислота, 2 ТМС; 3 – бензойная кислота, ТМС; 4 – винная кислота, 4 ТМС; 5 - 2-С-метилрибониксовая кислота, 5 ТМС; 6 – *para*-гидроксибензойная кислота, ТМС; 7 – винная кислота, ТМС; 8 - γ -резорциловая кислота, 3 ТМС; 9 - Арабинофураноза, 4 ТМС; 10 - протокатеховая кислота, ТМС; 11 - D-фруктоза, 5 ТМС; 12 - D-глюкопираноза, 5 ТМС; 13 - β -D-галактофураноза, 5 ТМС; 14 - D-рибофураноза, 4 ТМС; 15 – *meta*-кумаровая кислота, 2 ТМС; 16 - Гомованилиновая кислота, 2 ТМС; 17 - Феруловая кислота, 2 ТМС; 18 - Кофейная кислота, ТМС; 19 - Сахароза, 8 ТМС; 20 - 1-монопальмитин, 2 ТМС

Рисунок 45 – Хроматограмма ацетонитрильного элюата, полученного после пропускания 0.1 мл водного экстракта эхинацеи пурпурной через сорбент Strata C18-E

Полученные данные подтвердили присутствие некоторых фенольных веществ (кофейная и феруловая кислоты) в водных экстрактах эхинацеи, а также расширили список определяемых ФС. Тем не менее, ВЭЖХ-определение этих компонентов в экстрактах может быть затруднено в связи с их низкими содержаниями и / или недостаточной чувствительностью детектора. Несмотря на это, благодаря дериватизации компонентов в технике твердофазной аналитической дериватизации с последующим ГХ-МС определением, значительно расширился спектр веществ, входящий в состав водных экстрактов эхинацеи пурпурной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучена экстракция фитокомпонентов фенольной природы растительных материалов семейств Зверобойные (*Hypericaceae*), Астровые (*Asteraceae*) и Бобовые (*Fabaceae*) различными экстракционными системами (Фармакопея РФ, микроволновая экстракция, ультразвуковая экстракция, субкритическая экстракция, твердофазная экстракция). Субкритическая экстракция и Фармакопейный способ оказались наиболее эффективными при извлечении ФС - для эхинацеи пурпурной (23 и 26 мг/г), клевера лугового (0.6 и 0.1 мг/г) и зверобоя продырявленного (48 и 47 мг/г), соответственно. По суммарному содержанию аналитов в экстрактах микроволновая экстракция ФС сопоставима с субкритической, а в отношении ряда индивидуальных соединений она показала максимальные степени их извлечения.

2. Изучено влияние географических (высота произрастания растения над уровнем моря) и морфологических (морфологическая часть растения) факторов на содержание ФС в водно-спиртовых экстрактах лекарственных растений. С увеличением высоты произрастания ЛРС над уровнем моря повышается концентрация ФС в водно-спиртовых экстрактах. Суммарное содержание фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту в эхинацеи пурпурной минимально в образцах производителя «Травы Горного Крыма» (325-1200 м над уровнем моря) (11.6 мг/г), максимально – образце «Родные Травы» (420 м над уровнем моря) (34.7 мг/г). Наибольшее накопление изофлавоноидов в водно-спиртовом экстракте клевера лугового наблюдали в соцветиях растений (0.190 мг/г).

3. Предложен показатель качества и подлинности ЛРС семейства Астровые и препаратов на его основе, как соотношение цикориевой и кафтаровой кислот, который, вне зависимости от места произрастания ЛРС, близок к 3. Оценка содержания ФС в водно-спиртовых экстрактах промышленно изготавливаемых

препаратах на основе эхинацеи пурпурной показала, что предложенному показателю соответствовала только БАД «Эхинацея П».

4. Рассчитаны сорбционные характеристики (объемы «до проскока», удерживания и насыщения, динамические емкости сорбентов и степени извлечения аналитов) сорбентов различной природы (Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB, Supelclean ENVI-Carb) по отношению к ФС, содержащимся в водном экстракте зверобоя продырявленного. Сорбент на основе октадецилсиликагеля Strata C18-E показал наибольшую эффективность извлечения группы флавоноидов и их гликозидов ($R=79-105\%$), а флавоноиды и фенольные кислоты лучше извлекались полимерными материалами Strata X ($R=99-112\%$) и Oasis HLB ($R=56-96\%$).

5. Оценена возможность применения углеродных сорбентов для извлечения и концентрирования фенолкарбоновых кислот, флавоноидов и флороглюцинолов из водных и водно-спиртовых экстрактов зверобоя продырявленного. Наибольшую степень извлечения аналитов достигали десорбцией в субкритических условиях смесью метанол:ацетонитрил:изопропиловый спирт (90:5:5). В условиях концентрирования аналитов на углеродных сорбентах и их десорбции в субкритических условиях идентифицированы новые ФС (о,п-кумароилхинные кислоты, мангиферин, изомеры дикофеилхинных кислот и сагериновая кислота), расширившие качественный состав элюатов.

6. Разработана методика ГХ-МС определения ФС с использованием твердофазной аналитической дериватизации в водных экстрактах лекарственных растений. Оптимизированы условия проведения твердофазной аналитической дериватизации ФС: сорбент – Strata C18-E, дериватирующий агент – БСТФА, температура инкубации сорбента – $50-60^{\circ}\text{C}$, время инкубации сорбента – 30 мин. С использованием разработанной методики в водных экстрактах зверобоя продырявленного идентифицированы 24 соединения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый; Перевод со словац. канд. хим. наук А.П. Сергеева. – Москва: Мир, 1977. – 241 с.
2. Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview / M.F. Montenegro-Landívar, P. Tapia-Quirós, X. Vecino [et al.] // Science of The Total Environment. – 2021. – Vol. 801. – art. 149719.
3. Филиппова Е.И. Противовирусные свойства препарата на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в отношении вируса гриппа / Е.И. Филиппова, Т.А. Кукушкина // Биологические науки. Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2. – С. 5139-5144.
4. Herbal extracts as potential antioxidant, anti-aging, anti-inflammatory, and whitening cosmeceutical ingredients // W. Chaiyana, W. Charoensup, S. Sriyab [et al.] // Chemistry & Biodiversity. – 2021. – Vol. 18, №. 7. – art. e2100245.
5. Caccia S. Main active components of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts: Current analytical procedures for pharmacokinetics and concentration-response studies / S. Caccia // Current Pharmaceutical Analysis. – 2006. – Vol. 2, № 1. – P. 59-68.
6. Nahrstedt A. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. / A. Nahrstedt // Pharmacopsychiatry. – 1997. – Vol. 30, № 2. – P. 129-134.
7. Biological activity of *Hypericum perforatum* L. (*Hypericaceae*): a review / A.L. Budantsev, V.A. Prikhodko, I.V. Varganova [et al.] // Pharmacy & Pharmacology. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. 17-31.
8. Anticancer and biological properties of leaf and flower extracts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench / K.O. Mohamed Sharif, E.F. Tufekci, B. Ustaoglu [et al.] // Food Bioscience. – 2021. – Vol. 41. – art. 101005.

9. Diversity of antioxidant ingredients among Echinacea species / R. Fu, P. Zhang, Z. Deng [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 170. – art. 113699.
10. *Echinacea purpurea* aerial parts contain multiple antiviral compounds / S. Vimalanathan, L. Kang, V.T. Amiguet [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 2005. – Vol. 43, № 9. – P. 740-745.
11. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts / R.C. Aarland, A.E. Bañuelos-Hernández, M. Fragoso-Serrano [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 2017. – Vol. 55, № 1. – P. 649-656.
12. Barrett B. Medicinal properties of Echinacea: A critical review / B. Barrett // *Phytomedicine*. – 2003. – Vol. 10, № 1. – P. 66-86.
13. Endogenous Levels of Echinacea Alkylamides and Ketones Are Important Contributors to the Inhibition of Prostaglandin E2 and Nitric Oxide Production in Cultured Macrophages / C.A. LaLone, L. Rizshsky, K.D.P. Hammer [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2009. – Vol. 57, № 19. – P. 8820-8830.
14. Quantitative and qualitative profile of biologically active substances extracted from purple echinacea (*Echinacea purpurea* L.) growing in the Kemerovo region: functional foods application // A. Zaushintsena, I. Milentyeva, O. Babich [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 84-92.
15. Influence of several postharvest processing methods on polyphenol oxidase activity and cichoric acid content of *Echinacea purpurea* roots / Y. Zhang, T. Tang, H. He [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2011. – Vol. 34, № 1. – P. 873-881.
16. Lee J., Chicoric acid: chemistry, distribution, and production / J. Lee, C.F. Scagel // *Frontiers in Chemistry*. – 2013. – Vol. 1. – art. 40.
17. Chicoric Acid Analogues as HIV-1 Integrase Inhibitors / Z. Lin, N. Neamati, H. Zhao [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 42, № 8. – P. 1401-1414.

18. Extraction of caftaric and cichoric acids from *Echinacea purpurea* L. in subcritical water / A.V. Lekar', S.N. Borisenko, O.V. Filonova [et al.] // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – Vol. 7, № 8. – P. 968-975.
19. Perry N.B. Echinacea standardization: Analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species / N.B. Perry, E.J. Burgess, V. leAnne Glennie // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – Vol. 49, №. 4. – P. 1702-1706.
20. Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of Echinacea species / H.N. Murthy, Y.-S. Kim, S.-Y. Park [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98, № 18. – P. 7707-7717.
21. Flavonoids from *Echinacea purpurea* / V.A. Kurkin, A.S. Akushskaya, E.V. Avdeeva [et al.] // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2011. – Vol. 37, № 7. – P. 905-906.
22. Карпук В.В. Фармакогнозия : учеб. пособие / В.В. Карпук. – Минск: БГУ, 2011. – 340 с.
23. Муравьева Д.А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических вузов / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – Москва : Медицина, 2007. – 652 с. : ил., цв. ил.; 24 см. – (Учебная литература для фармацевтических вузов).; ISBN 5-225-04714-9 (В пер.)
24. Ososki A.L. Phytoestrogens: a review of the present state of research / A.L. Ososki, E.J. Kennelly // Phytotherapy Research. – 2003. – Vol. 17, № 8. – P. 845-869.
25. Formononetin: a review of its anticancer potentials and mechanisms / K.-C. Tay, L.T.-H. Tan, C.K. Chan [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – art. 820.
26. Yu C. Perspectives regarding the role of biochanin a in humans / C. Yu, P. Zhang, L. Lou [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – art. 793.
27. Rietjens I.M.C.M. The potential health effects of dietary phytoestrogens: Potential health effects of dietary phytoestrogens / I.M.C.M. Rietjens, J. Lousse, K. Beekmann // British Journal of Pharmacology. – 2017. – Vol. 174, № 11. – P. 1263-1280.

28. The effect of traditional and cyclodextrin-assisted extraction methods on *Trifolium pratense* L. (Red Clover) extracts antioxidant potential / J.A. Kazlauskaite, L. Ivanauskas, M. Marksa [et al.] // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11, № 2. – art. 435.
29. Ultra-performance liquid chromatography method for the quantification of some phytoestrogens in plant material / B. Kiss, D.-S. Popa, D. Hanganu [et al.] // *Revue Roumaine de Chimie*. – 2010. – Vol. 55, № 8. – P. 459-465.
30. Validation of an optimized HPLC–UV method for the quantification of formononetin and biochanin A in *Trifolium pratense* extract / J.S. Lee, L.A. Paje, M.J. Kim [et al.] // *Applied Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 64, № 1. – art. 57.
31. Effects of phytoestrogens on bone mineral density during the menopause transition: a systematic review of randomized, controlled trials / F. Abdi, Z. Alimoradi, P. Haqi [et al.] // *Climacteric*. – 2016. – Vol. 19, № 6. – P. 535-545.
32. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends / C.M. Ajila, S.K. Brar, M. Verma [et al.] // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2011. – Vol. 31, № 3. – P. 227-249.
33. Smith R.M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques / R.M. Smith // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – Vol. 1000, № 1-2. – P. 3-27.
34. Khoddami A. Techniques for analysis of plant phenolic compounds / A. Khoddami, M. Wilkes, T. Roberts // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, № 2. – P. 2328-2375.
35. Arceusz A. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review / A. Arceusz, M. Wesolowski, P. Konieczynski // *Natural Product Communications*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. 1821-1829.
36. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal Plants based on the principles of Green Analytical Chemistry: A review / R.F. da Silva, C.N. Carneiro, M. Espino [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2022. – Vol. 175, № 5. – art. 107184.
37. Michel T. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources / T. Michel,

M. Halabalaki, A.-L. Skaltsounis // *Planta Medica*. – 2013. – Vol. 79, № 7. – P. 514-532.

38. Extraction of hyperforin and hypericin from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) with different solvents / D. Cossuta, T. Vatai, M. Báthori [et al.] // *Journal of Food Process Engineering*. – 2012. – Vol. 35, № 2. – P. 222-235.

39. Development and evaluation of methods for determination of naphthodianthrones and flavonoids in St. John's wort / F.B. Williams, L.C. Sander, S.A. Wise [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – Vol. 1115, № 1-2. – P. 93-102.

40. Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum* / M. Brolis, B. Gabetta, N. Fuzzati [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1998. – Vol. 825, № 1. – P. 9-16.

41. Preparative high-performance liquid chromatographic separation of naphthodianthrones from St. John's Wort / S. Puri, G. Handa, A.K. Kalsotra [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2006. – Vol. 44, № 4. – P. 177-180.

42. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т. 4 / научные редакторы: С.В. Емшанова, О.Г. Потанина, Е.В. Буданова [и др.]. – Москва, 2018. – 6074 с. – URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/> (дата обращения 01.06.2022).

43. Гужва Н.Н. Биологически активные вещества астрагала эспарцетного, произрастающего в Предкавказье / Н.Н. Гужва // *Химия растительного сырья*. – 2009. – № 3. – С. 123-132.

44. Junior M.R.M. Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources – Review (Supercritical extraction and stabilization of phenolic compounds) / M.R.M. Junior, A.V. Leite, N.R.V. Dragano // *The Open Chemical Engineering Journal*. – 2010. – № 4. – P. 51-60.

45. Kronholm J. Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures / J. Kronholm, K. Hartonen, M.-L. Riekkola // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 396-412.

46. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis / Y. Wen, L. Chen, J. Li [et al.] // Trends in Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 59. – P. 26-41.
47. Zgórką G. The application of solid-phase extraction and reversed phase high-performance liquid chromatography for simultaneous isolation and determination of plant flavonoids and phenolic acids / G. Zgórką, A. Hajnos // Chromatographia. – 2003. – Vol. 57, № S1. – P. S77-S80.
48. Kozyra M. Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland / M. Kozyra, K. Główniak // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2013. – Vol. 82, № 4. – P. 325-329.
49. Preparation and quantification of the total phenolic products in Citrus fruit using solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography with diode array and UV detection: Sample Preparation / H. Zeng, Z. Liu, S. Zhao [et al.] // Journal of Separation Science. – 2016. – Vol. 39, № 19. – P. 3806-3817.
50. Główniak K. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some *Echinacea* species / K. Główniak, G. Zgórką, M. Kozyra // Journal of Chromatography A. – 1996. – Vol. 730, № 1-2. – P. 25-29.
51. Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb / A. Oniszczyk, R. Podgórski, T. Oniszczyk [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2014. – Vol. 61. – P. 377-381.
52. Skrzypczak-Pietraszek E. Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., *Lamiaceae*) / E. Skrzypczak-Pietraszek, J. Pietraszek // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2012. – Vol. 66. – P. 154-161.
53. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI–MS / B.S. Inbaraj, H. Lu, T.H. Kao [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2010. – Vol. 51, № 3. – P. 549-556.

54. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection: liquid chromatography / M.N. Irakli, V.F. Samanidou, C.G. Biliaderis [et al.] // *Journal of Separation Science*. – 2012. – Vol. 35, № 13. – P. 1603-1611.

55. Ziaková A. Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis / A. Ziaková, E. Brandsťeterová // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2002. – Vol. 25, № 19. – P. 3017-3032.

56. Dvorackova E. Content of phenolic compounds in herbs used in the Czech Republic / E. Dvorackova, M. Snoblova, P. Hrdlicka // *International Food Research Journal*. – 2014. – Vol. 21, № 4. – P. 1495-1500.

57. Yilmaz P.K., Kolak U. Determination of phenolic acids in *Atriplex hortensis* L. by novel solid-phase extraction and High-Performance Liquid Chromatography / P.K. Yilmaz, U. Kolak // *Analytical Letters*. – 2016. – Vol. 49, № 14. – P. 2157-2164.

58. Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry / Y. Zhang, P. Shi, H. Qu [et al.] // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2007. – Vol. 21, № 18. – P. 2971-2984.

59. Comparison of several extraction methods for the isolation of benzoic acid derivatives from *Melissa officinalis* / G. Karasová, J. Lehotay, E. Kłodzinska [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2006. – Vol. 29, № 11. – P. 1633-1644.

60. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques / L. Onofrejová, J. Vašíčková, B. Klejdus [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. 464-470.

61. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay / A. Vallverdú-Queralt, J. Regueiro, M. Martínez-Huélamo [et al.] // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 154. – P. 299-307.

62. Extraction and identification procedures of polyphenolic compounds and carbohydrates in phillyrea (*Phillyrea angustifolia* L.) leaves / A. Romani, A. Baldi, N. Mulinacci [et al.] // *Chromatographia*. – 1996. – Vol. 42, № 9-10. – P. 571-577.

63. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ / K. Schütz, D. Kammerer, R. Carle [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 52, № 13. – P. 4090-4096.

64. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives / T. Mezadri, D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2008. – Vol. 21, № 4. – P. 282-290.

65. Pereira L. Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: Theory and Applications / L. Pereira // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2008. – Vol. 31, № 11-12. – P. 1687-1731.

66. Zgórk G. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations / G. Zgórk, S. Kawka // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2001. – Vol. 24, № 5-6. – P. 1065-1072.

67. Hennion M.-C. Graphitized carbons for solid-phase extraction / M.-C. Hennion // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – Vol. 885, № 1-2. – P. 73-95.

68. West C. Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography / C. West, C. Elfakir, M. Lafosse // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217, № 19. – P. 3201-3216.

69. Poole S.K. Retention of neutral organic compounds from solution on carbon adsorbents / S.K. Poole, C.F. Poole // *Analytical Communications*. – 1997. – Vol. 34, №9. – P. 247-251.

70. Determination of pesticide residues in Golden Berry (*Physalis peruviana* L.) by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry / N.C. Muñoz, L. Floriano,

M.P. de Souza [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2017. – Vol. 10, № 2. – P. 320-329.

71. Development and validation of a quantitative UHPLC-MS/MS method for selected brominated flame retardants in food / S.V. Malysheva, S. Gosciny, G. Malarvannan [et al.] // *Food Additives & Contaminants: Part A*. – 2018. – Vol. 35, № 2. – P. 292-304.

72. A new carbon-based magnetic material for the dispersive solid-phase extraction of UV filters from water samples before liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis / S. Piovesana, A.L. Capriotti, C. Cavaliere [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 409, № 17. – P. 4181-4194.

73. Chromatographic behaviour of positional isomers on porous graphitic carbon / Q.H. Wan, P.N. Shaw, M.C. Davies [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1995. – Vol. 697, № 1-2. – P. 219-227.

74. Retention Behavior of Ionizable Isomers in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Comparative Study of Porous Graphitic Carbon and Octadecyl Bonded Silica / Q.-H. Wan, M.C. Davies, P.N. Shaw [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 1996. – Vol. 68, № 3. – P. 437-446.

75. Selectivity of carbon packing materials in comparison with octadecylsilyl- and pyrenylethylsilylsilica gels in reversed-phase liquid chromatography / N. Tanaka, T. Tanigawa, K. Kimata [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1991. – Vol. 549. – P. 29-41.

76. Retention behaviour of polar compounds using porous graphitic carbon with water-rich mobile phases / M.-C. Hennion, V. Coquart, S. Guenu [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1995. – Vol. 712, № 2. – P. 287-301.

77. Comparison of the retention of homologous series and other test solutes on an ODS column and a Hypercarb carbon column / H.J. Möckel, A. Braedikow, H. Melzer [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography*. – 1991. – Vol. 14, № 13. – P. 2477-2498.

78. Fontanals N. Materials for solid-phase extraction of organic compounds / N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull // *Separations*. – 2019. – Vol. 6, № 4. – art. 56.

79. ALOthman Z.A. Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review / Z.A. ALOthman, S.M. Wabaidur // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2019. – V. 12, № 5. – P. 633-651.

80. Ziyatdinova G. Poly (gallic acid) / MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs / G. Ziyatdinova, E. Kozlova, H. Budnikov // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 821. – P. 73-81.

81. Use of porous graphitic carbon coupled with mass detection for the analysis of polar phenolic compounds by liquid chromatography / J. Vial, M.-C. Hennion, A. Fernandez-Alba [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 937, № 1-2. – P. 21-29.

82. Michel M. Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications / M. Michel, B. Buszewski // *Adsorption*. – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 193-202.

83. Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants / T. Bajer, M. Adam, L. Galla [et al.] // *Journal of Separation Science*. – 2007. – Vol. 30, № 1. – P. 122-127.

84. Isoflavone synthase (IFS) gene phylogeny in *Trifolium* species associated with plant isoflavone contents / T. Visnevschi-Necrasov, M.A. Faria, S.C. Cunha [et al.] // *Plant Systematics and Evolution*. – 2013. – Vol. 299, № 2. – P. 357-367.

85. Klejdus B. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction / B. Klejdus, D. Vitamvásová, V. Kubáň // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – Vol. 839, № 1-2. – P. 261-263.

86. Magiera S. Chromatographic determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity / S. Magiera, M. Zaręba // *Food Analytical Methods*. – 2015. – Vol. 8, № 10. – P. 2665-2674.

87. Palma M. In-line pressurized-fluid extraction–solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes / M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso // *Journal of Chromatography A*. – 2002. – Vol. 968, № 1-2. – P. 1-6.

88. Сычев К.С. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка / К.С. Сычев, В.А. Даванков // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2004. – Т. 4, № 1. – С. 5-28.
89. Bielicka-Daszekiewicz K. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents / K. Bielicka-Daszekiewicz, A. Voelkel // Talanta. – 2009. – Vol. 80, № 2. – P. 614-621.
90. Evaluation of solid phase extraction efficiency of functionalized biochar for polyphenols from *Punica granatum* / V. Yadav, P. Shrivastava, Y. Deshmukh [et al.] // Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 200-208.
91. Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide / S. Glisic, A. Smelcerovic, S. Zuehlke [et al.] // Journal of Supercritical Fluids. – 2008. – Vol. 45, № 3. – P. 332-337.
92. Smelcerovic A. Comparison of methods for the exhaustive extraction of hypericins, flavonoids, and hyperforin from *Hypericum perforatum* L. / A. Smelcerovic, M. Spiteller, S. Zuehlke // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 54, № 7. – P. 2750-2753.
93. Ong E.S. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials / E.S. Ong, J.S.H. Cheong, D. Goh // Journal of Chromatography A. – 2006. – Vol. 1112, № 1-2. – P. 92-102.
94. Ultrasound-assisted packed-bed extraction of hypericin from *Hypericum perforatum* L. and optimization by response surface methodology / R. Tahmasebi-Boldaji, M.-S. Hatamipour, M. Khanahmadi [et al.] // Ultrasonics Sonochemistry. – 2019. – Vol. 57. – P. 89-97.
95. Comparison of extraction techniques for extraction of bioactive molecules from *Hypericum perforatum* L. plant / R. Anand, N. Verma, D.K. Gupta [et al.] // Journal of Chromatographic Science. – 2005. – Vol. 43, № 10. – P. 530-531.

96. Avato P. Determination of major constituents in St. John's Wort under different extraction conditions / P. Avato, C. Guglielmi // *Pharmaceutical Biology*. – 2004. – Vol. 42, № 1. – P. 83-89.
97. Dimitrieska-Stojković E. Supercritical fluid extraction of quercetin and rutin from *Hyperici herba* / E. Dimitrieska-Stojković, Z. Zdravkovski // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. – 2003. – Vol. 26, № 15. – P. 2517-2533.
98. Liu F.F. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology / F.F. Liu, C.Y.W. Ang, D. Springer // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48, № 8. – P. 3364-3371.
99. Мирзорахимов К. Фенольные соединения травы зверобоя и их применение / К. Мирзорахимов // *Доклады академии наук республики Таджикистан*. – 2012. – Т. 55, № 8. – С. 659-663.
100. Huie C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants / C.W. Huie // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2002. – Vol. 373, № 1-2. – P. 23-30.
101. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials / D. Štěrbová, D. Matějček, J. Vlček [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2004. – Vol. 513, № 2. – P. 435-444.
102. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе / В.В. Милевская, М.А. Статкус, З.А. Темердашев [и др.] // *Журнал аналитической химии*. – 2016. – Т. 71, № 7. – С. 768-774.
103. Hypericin: source, determination, separation, and properties / J. Zhang, L. Gao, J. Hu [et al.] // *Separation & Purification Reviews*. – 2022. – Vol. 51, № 1. – P. 1-10.
104. Naït-Si Y. Chemical and chromatographic behavior of pseudohypericin and isopseudohypericin, and the occurrence of isopseudohypericin in Saint John's Wort

(*Hypericum perforatum*) extracts / Y. Naït-Si, J.-D. Fourneron // Monatshefte für Chemie. – 2005. – Vol. 136, № 2. – P. 159-168.

105 Improved procedure for the quality control of *Hypericum perforatum* L. / A. Poutaraud, A. Lobstein, P. Girardin [et al.] // Phytochemical Analysis. – 2001. – Vol. 12, № 6. – P. 355-362.

106. Экстрагирование гиперического и псевдогиперического из зверобоя продырявленного в условиях микроволновой активации процесса / В.В. Пунегов, В.И. Костромин, М.Г. Фомина [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – № 1. – С. 125-130.

107. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected *Lamiaceae* herbs and their antioxidant capacity / N. Babovic, S. Djilas, M. Jadranin [et al.] // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 98-107.

108. Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmetto, St John's Wort, Kava root, and Echinacea / O.J. Catchpole, N.B. Perry, B.M.T. da Silva [et al.] // Journal of Supercritical Fluids. – 2002. – Vol. 22, № 2. – P. 129-138.

109. Lienert D. Gas chromatography-mass spectral analysis of roots of Echinacea species and classification by multivariate data analysis / D. Lienert, E. Anklam, U. Panne // Phytochemical Analysis. – 1998. – Vol. 9, № 2. – P. 88-98.

110. Chromatographic Methods for metabolite profiling of virus- and phytoplasma-infected plants of *Echinacea purpurea* / F. Pellati, F. Epifano, N. Contaldo [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – Vol. 59, № 19. – P. 10425-10434.

111. European Pharmacopoeia (8th Edition). – Council of Europe. – Strasbourg, 2014. – 2133 p.

112. Tsao R. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals / R. Tsao, Z. Deng // Journal of Chromatography B. – 2004. – Vol. 812, № 1-2. – P. 85-99.

113. Antioxidants and carbohydrate content in infusions and microwave extracts from eight medicinal plants / N. Petkova, L. Ivanova, G. Filova [et al.] // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2017. – Vol. 7, № 10. – P. 55-61.

114. Rezaei E. Efficient ultrasound-assisted extraction of cichoric acid from *Echinacea purpurea* root / E. Rezaei, M. Abedi // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2017. – Vol. 51, № 6. – P. 471-475.

115. The determination of the caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea* aerial parts under various extraction conditions by supercritical fluid extraction (SFE) / N. Konar, S. Dalabasmaz, E.S. Poyrazoglu [et al.] // The Journal of Supercritical Fluids. – 2014. – Vol. 89. – P. 128-136.

116. Yildiz E. A bioactivity based comparison of *Echinacea purpurea* extracts obtained by various processes / E. Yildiz, D. Karabulut, O. Yesil-Celiktas // The Journal of Supercritical Fluids. – 2014. – Vol. 89. – P. 8-15.

117. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. / F. Pellati, S. Benvenuti, L. Magro [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – Vol. 35, № 2. – P. 289-301.

118. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used *Echinacea* species / R. Bruni, V. Brighenti, L.K. Caesar [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 160. – P. 443-477.

119. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry / G. Dinelli, A. Segura-Carretero, R. Di Silvestro [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2011. – Vol. 1218, № 42. – P. 7670-7681.

120. Isolation and identification of phytoestrogens and flavonoids in an Ayurvedic proprietary medicine using chromatographic and Mass Spectroscopic analysis / C. Sulaiman, A. Arun, E. Anandan [et al.] // Asian Pacific Journal of Reproduction. – 2015. – Vol. 4, № 2. – P. 153-156.

121. Reis A. *Trifolium pratense*: Friable calli, cell culture protocol and isoflavones content in wild plants, in vitro and cell cultures analyzed by UPLC / A.

Reis, M. Scopel, J.A.S. Zuanazzi // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2018. – Vol. 28, № 5. – P. 542-550.

122. Krenn L. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography / L. Krenn, I. Unterrieder, R. Ruprechter // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – Vol. 777, № 1-2. – P. 123-128.

123. Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium* L. extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients / G. Renda, F.N. Yalçın, E. Nemutlu [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2013. – Vol. 148, № 2. – P. 423-432.

124. The concentration of isoflavones in red clover (*Trifolium pratense* L.) at flowering stage / N. Lemežienė, A. Padarauskas, B. Butkutė [et al.] // *Zemdirbyste-Agriculture*. – 2015. – Vol. 102, № 4. – P. 443-448.

125. In vitro isoflavonoid production and analysis in natural tetraploid *Trifolium pratense* (red clover) calluses / T. Ercetin, G. Toker, M. Kartal [et al.] // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2012. – Vol. 22, № 5. – P. 964-970.

126. Distribution of formononetin, daidzein and genistein in *Trifolium* species and their aerial plant parts / G. Dabkevičienė, B. Butkutė, N. Lemežienė [et al.] // *CHEMIJA*. – 2012. – Vol. 23, № 4. – P. 306-311.

127. Comprehensive evaluation of phytoestrogen accumulation in plants and in vitro cultures of *Medicago sativa* L. ‘Elçi’ and natural tetraploid *Trifolium pratense* L. / H. Çölgeçen, U.K. Çalışkan, M. Kartal [et al.] // *Turkish Journal of Biology*. – 2014. – Vol. 38. – P. 619-627.

128. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages / R. Tsao, Y. Papadopoulos, R. Yang [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 16. – P. 5797-5805.

129. Seasonal variation of Red Clover (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) isoflavones and estrogenic activity / N.L. Booth, C.R. Overk, P. Yao [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 4. – P. 1277-1282.

130. Microwave assisted extraction of mangiferin from *Curcuma amada* / K. Padmapriya, A. Dutta, S. Chaudhuri [et al.] // 3 Biotech. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 27-30.
131. Zgóřka G. Ultrasound-assisted solid-phase extraction coupled with photodiode-array and fluorescence detection for chemotaxonomy of isoflavone phytoestrogens in *Trifolium* L. (Clover) species / G. Zgóřka // Journal of Separation Science. – 2009. – Vol. 32, № 7. – P. 965-972.
132. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples / P. Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero [et al.] // Molecules. – 2010. – Vol. 15, № 12. – P. 8813-8826.
133. Ergin M. Altuner. High hydrostatic pressure extraction of phenolic compounds from *Maclura pomifera* fruits / M. Altuner Ergin // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 11, № 4. – P. 930-937.
134. Sharma M. Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques / M. Sharma, P. Kaushik // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2021. – Vol. 36. – art. 102149.
135. Analytical procedure for the in-vial derivatization - Extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection / Y.C. Fiamegos, C.G. Nanos, J. Vervoort [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2004. – V. 1041, № 1-2. – P. 11-18.
136. Farajzadeh M.A. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography / M.A. Farajzadeh, N. Nouri, P. Khorram // Trends in Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 55. – P. 14-23.
137. Analysis of scopoletin and caffeic acid in tobacco by GC–MS after a rapid derivatization procedure / F. Li, Q. Liu, W. Cai [et al.] // Chromatographia. – 2009. – Vol. 69, № 7-8. – P. 743-748.
138. Pan L. Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes / L. Pan, J. Pawliszyn // Analytical Chemistry. – 1997. – Vol. 69, № 2. – P. 196-205.

139. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis // *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*: ed. M. Ali Mohd. – InTech. – 2012. – P. 83-108.

140. Rohloff J. Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling / J. Rohloff // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. № 2. – P. 3431-3462.

141. Parkinson D.R. *Analytical Derivatization Techniques* / Parkinson D.R. // Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. – Elsevier, 2014. – 38 p.

142. Kivilompolo M. Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs / M. Kivilompolo, V. Oburka, T. Hyötyläinen // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 388, № 4. – P. 881-887.

143. Atapattu S.N. Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method / S.N. Atapattu, J.M. Rosenfeld // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – Vol. 1296. – P. 204-213.

144. Atapattu S.N. Solid phase analytical derivatization of anthropogenic and natural phenolic estrogen mimics with pentafluoropyridine for gas chromatography-mass spectrometry / S.N. Atapattu, J.M. Rosenfeld // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – Vol. 1218, № 51. – P. 9135-9141.

145. Poole C.F. *Principles and Practice of Solid-Phase Extraction* / C.F. Poole, S.K. Poole // *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. – 2012. – Vol. 2. – P. 273-297.

146. Sutherland K. Gas chromatography/mass spectrometry techniques for the characterisation of organic materials in works of art / K. Sutherland // *Physical Sciences Reviews*. – 2019. – Vol. 4, № 6. – P. 1-16.

147. Дмитриенко С.Г. Методы выделения, концентрирования и определения кверцетина / С.Г. Дмитриенко, В.А. Кудринская, В.В. Аляри // *Журнал аналитической химии*. – 2012. – Т. 67, № 4. – С. 340-353.

148. Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC-MS and GC-MS / C. Seger, H. Römpf, S. Sturm [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2004. – Vol. 21, № 4. – P. 453-463.

149. Quantitative analysis of the major constituents of St John's wort with HPLC-ESI-MS / A. Chandrasekara, M. Heinrich, D. Ashton // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2005. – Vol. 57, № 12. – P. 1645-1652.

150. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS / E.C. Tatsis, S. Boeren, V. Exarchou // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 68, № 3. – P. 383-393.

151. Alali F.Q. LC-MS and LC-PDA Analysis of *Hypericum empetrifolium* and *Hypericum sinaicum* / F.Q. Alali, K. Tawaha, M. Gharaibeh // Zeitschrift für Naturforschung C. – 2009. – Vol. 64, № 7-8. – P. 476-482.

152. Mauri P. High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts / P. Mauri, P. Pietta // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2000. – Vol. 14, № 2. – P. 95-99.

153. *Echinacea purpurea* (L.) Moench: Chemical characterization and bioactivity of its extracts and fractions / J. Coelho, L. Barros, M.I. Dias // Pharmaceuticals. – 2020. – Vol. 13, № 6. – art. 125.

154. Significance of changed climatic factors on essential oil composition of *Echinacea purpurea* under subtropical conditions / R.K. Thappa, S.K. Bakshi, P.L. Dhar [et al.] // Flavour and Fragrance Journal. – 2004. – Vol. 19, № 5. – P. 452-454.

155. Analysis of caffeic acid derivatives in echinacea extracts by liquid chromatography particle beam mass spectrometry (LC-PB/MS) employing electron impact and glow discharge ionization sources / J. Castro, M.V.B. Krishna, J.R. Choiniere [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2010. – Vol. 397, № 3. – P. 1259-1271.

156. Iranshahi M. Rapid isocratic HPLC analysis of caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* cultivated in Iran / M. Iranshahi, Y. Amanzadeh // Chemistry of Natural Compounds. – 2008. – Vol. 44, № 2. – P. 190-193.

157. Pellati F. Simultaneous metabolite fingerprinting of hydrophilic and lipophilic compounds in *Echinacea pallida* by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection / F. Pellati, G. Orlandini, S. Benvenuti // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – Vol. 1242. – P. 43-58.
158. Wu Q. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds / Q. Wu, M. Wang, J. Simon // *Journal of Chromatography B*. – 2004. – Vol. 812, № 1-2. – P. 325-355.
159. Isolation, chemical and free radical scavenging characterization of phenolics from *Trifolium scabrum* L. aerial parts / I. Kowalska, D. Jedrejek, L. Ciesla [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, № 18. – P. 4417-4423.
160. Fast derivatization procedure for the analysis of phytoestrogens in soy milk by gas chromatography tandem mass spectrometry / B. Benedetti, M. Di Carro, C. Mirasole [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2018. – Vol. 137. – P. 62-70.
161. Estrogenic effects of phytoestrogens derived from *Flemingia strobilifera* in MCF-7 cells and immature rats / S.-Y. Jeong, M. Chang, S. Choi [et al.] // *Archives of Pharmacal Research*. – 2018. – Vol. 41, № 5. – P. 519-529.
162. Isoflavone content and estrogenic activity of different batches of red clover (*Trifolium pratense* L.) extracts: An in vitro study in MCF-7 cells / P. Spagnuolo, E. Rasini, A. Luini [et al.] // *Fitoterapia*. – 2014. – Vol. 94. – P. 62-69.
163. Zarena A.S. Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp: analysis of phenolic acid by HPLC-ESI-MS / A.S. Zarena, K.U. Sankar // *Journal of Food Biochemistry*. – 2012. – Vol. 36, № 5. – P. 627-633.
164. Determination of the marker diarylheptanoid phytoestrogens in *Curcuma comosa* rhizomes and selected herbal medicinal products by HPLC-DAD / B. Yingngam, A. Brantner, D. Jinarat [et al.] // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. – 2018. – Vol. 66, № 1. – P. 65-70.

165. Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities / S. Vlasisavljević, B. Kaurinović, M. Popović [et al.] // International Journal of Food Properties. – 2017. – Vol. 20, № 12. – P. 3090-3101.

166. Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover / S. Andres, U. Hansen, B. Niemann [et al.] // Food & Function. – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 2017-2025.

167. Techniques for analysis of plant phenolic compounds / A. Khoddami, M. Wilkes, T. Roberts // Molecules. – 2013. – Vol. 18, № 2. – P. 2328-2375.

168. Temerdashev Z. The method of establishing the authenticity and quality of *Hypericum perforatum* L. and *Salvia officinalis* L. / Z. Temerdashev, V. Milevskaya, E. Vinitzkaya // MethodsX. – 2021. – Vol. 8. – art. 101487.

169. Chromatographic analysis of water and water-alcohol extracts of *Echinacea purpurea* L. obtained by various methods / Z. Temerdashev, E. Vinitzkaya, E. Meshcheryakova [et al.] // Microchemical Journal. – 2022. – Vol. 179. – art. 107507.

170. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts / Y.-L. Tsai, S.-Y. Chiou, K.-C. Chan [et al.] // LWT - Food Science and Technology. – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 169-176.

171. Stuart D.L. Effect of drying temperature on alkylamide and cichoric acid concentrations of *Echinacea purpurea* / D.L. Stuart, R.B.H. Wills // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 51, № 6. – P. 1608-1610.

172. Оценка содержания изофлавоноидов в клевере луговом (*Trifolium pratense* L.) из семейства Бобовые (*Fabaceae*) в условиях экстракции различными способами / З.А. Темердашев, Т.К. Чубукина, Е.А. Виницкая [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2021. – Т. 76, № 9. – С. 819-831.

173. Милевская В.В. Определение биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье антидепрессантного и противовоспалительного действия : специальность 02.00.02 «Аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата наук / Милевская

Виктория Васильевна ; Кубанский государственный университет. – Краснодар, 2017. – 159 с. – Библиогр.: с. 131-148.

174. Chevallier A. The Encyclopedia of Medicinal Plants / Chevallier A. – New York : DK Pub. ; Boston : Distributed by Houghton Mifflin, 1996. – 336 p.

175. Factors affecting *Echinacea* quality/ W. Letchamo, L.V. Polydeonny, N.O. Gladisheva [et al.] // Trends in New Crops and New Uses. – 2002. – P. 514-521.

176. *Echinacea purpurea* Aerial Parts. *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Standards of analysis, quality control and therapeutics / R. Upton, A. Graff. – American Herbal Pharmacopoeia. – 2007. – P. 1-61. – ISBN 1-929425-19-8.

177. Stability of some biologically active substances in extracts and preparations based on St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.) / Z. Temerdashev, V. Milevskaya, E. Vinitckaya [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2020. – Vol. 156. – art. 112879.

178. Cobzac S.C. Sample preparation for high performance liquid chromatography: recent progress / S.C. Cobzac, S. Gocan // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 2011. – Vol. 34, № 13. – P. 1157-1267.

179. Zgóřka G. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family / G. Zgóřka, K. Główniak // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2001. – Vol. 26, № 1. – P. 79-87.

180. Сорбционные характеристики сорбентов для твердофазной экстракции фенольных соединений из экстрактов лекарственных растений / Е.А. Шилько, З.А. Темердашев, В.В. Милевская [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 157-167.

181. Твердофазное концентрирование фенольных соединений из водных экстрактов лекарственных растений семейств Зверобойные и Яснотковые на сорбентах различной природы / З.А. Темердашев, Е.А. Виницкая, В.В. Милевская [и др.] // Аналитика и контроль. – 2020. – Т. 24, № 2. – С. 86-95.

182. Твердофазное концентрирование фенольных веществ из водных экстрактов лекарственного растительного сырья на примере зверобоя (*Hypericum*

perforatum L.) / Е.А. Шилько, В.В. Милевская, З.А. Темердашев [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22, № 3. – С. 303-314.

183. Концентрирование углеродными сорбентами фенольных соединений и их хроматографическое определение в водных экстрактах лекарственных растений / З.А. Темердашев, Е.А. Виноцкая, В.В. Милевская [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2021. – Т. 76, № 3. – С. 208-217.

184. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends / С.М. Ajila, S.K. Brar, M. Verma [et al.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2011. – Vol. 31, № 3. – P. 227-249.

185. Preparation of polymer based sorbents for solid phase extraction of polyphenolic compounds / M. Qureshi, G. Stecher, C. Huck [et al.] // Open Chemistry. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 206-212.

186. Пористый графитированный углерод для разделения и концентрирования гидрофильных веществ / Е.Н. Гончарова, М.А. Статкус, Г.И. Цизин [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2020. – Т. 75, № 4. – С. 291-315.

187. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation / В.Е. Richter, В.А. Jones, J.L. Ezzell [et al.] // Analytical Chemistry. – 1996. – Vol. 68, № 6. – P. 1033-1039.

188. Identification and quantification of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. transgenic shoots / O. Tusevski, J. Petreska Stanoeva, M. Stefova [et al.] // Acta Physiologiae Plantarum. – 2014. – Vol. 36, № 10. – P. 2555-2569.

189. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts / В.А. Silva, F. Ferreres, J.O. Malva [et al.] // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 90, № 1-2. – P. 157-167.

190. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ / M. Ye, W.-Z. Yang, K.-D. Liu [et al.] // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 35-42.

191. Bioactive compounds and scavenging capacity of extracts from different parts of *Vismia cauliflora* against reactive oxygen and nitrogen species / A.B. Ribeiro,

A. Berto, R.C. Chisté [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 2015. – Vol. 53, № 9. – P. 1267-1276.

192. Gouveia S. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–(–)-ESI-MSⁿ method / S. Gouveia, P.C. Castilho // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 129, № 2. – P. 333-344.

193. Characterization of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC–ESI-MS/MS coupled to DPPH assay / N. Nuengchamnon, K. Krittasilp, K. Ingkaninan // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 127, № 3. – P. 1287-1293.

194. Горьков В.А. Фитотерапия умеренных депрессий препаратами зверобоя (аналитический обзор) / В.А. Горьков // *Психиатрия и психофармакотерапия*. – 2000. – Т. 2, № 6. – С. 184-187.

195. Chemical characterization, neuroprotective, antimicrobial and enzyme inhibitory activities of *Hypericum* volatile oils / Y. Ji, J. Yang, R. Zhang [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 172. – art. 113991.

196. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants / E. Corradini, P. Foglia, P. Giansanti [et al.] // *Natural Product Research*. – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 469-495.

197. Atapattu S.N. Solid Phase Analytical Derivatization / S.N. Atapattu, J.M. Rosenfeld // *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. – 2018. – P. 1-7.

198. Atapattu S.N. Micro scale analytical derivatizations on solid phase / S.N. Atapattu, J.M. Rosenfeld // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 113. – P. 351-356.

199. Верниковская Н.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н.А. Верниковская, З.А. Темердашев // *Аналитика и контроль*. – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 188-195.

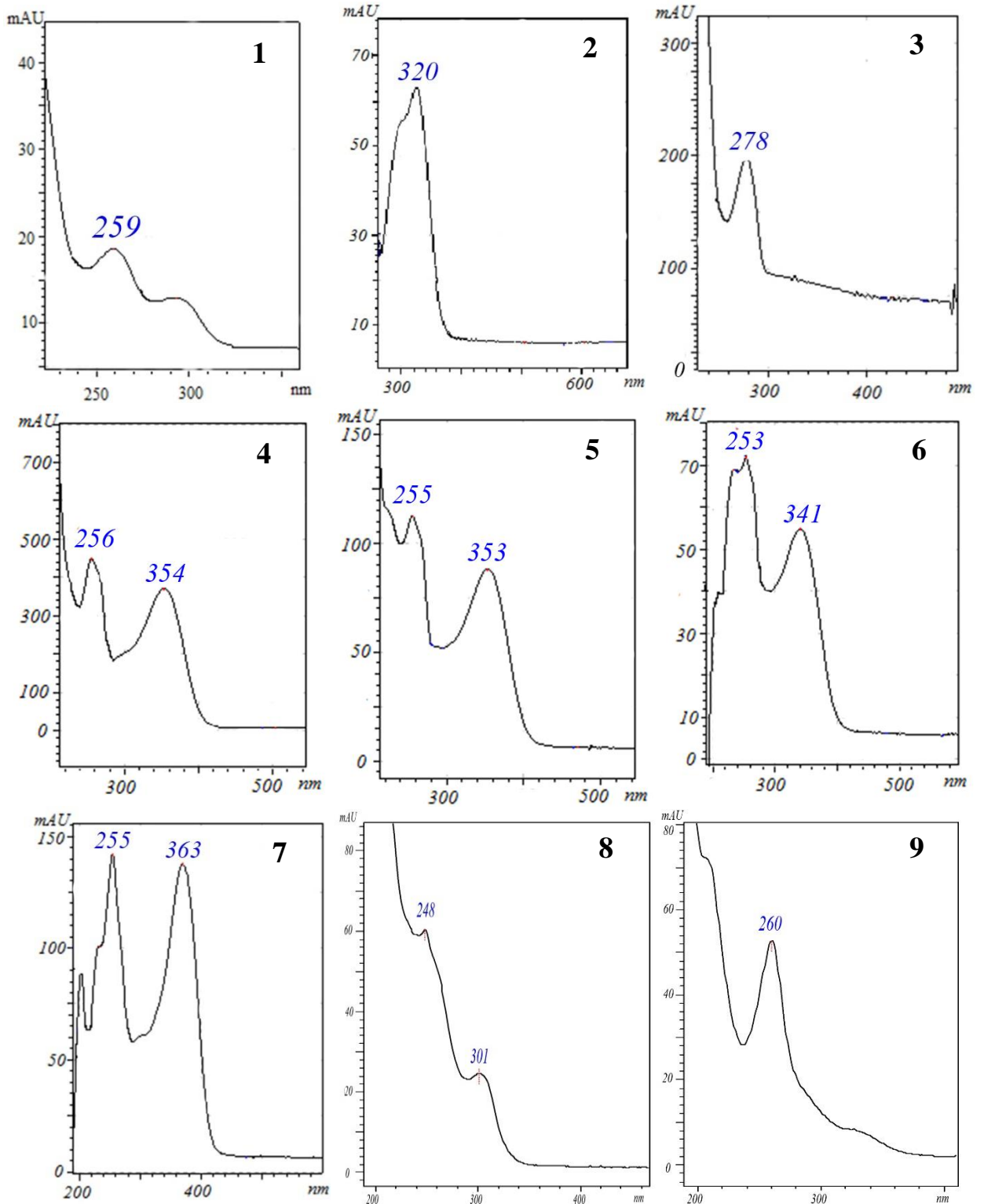
200. Сорбционно-хроматографическое определение галловой, кофейной кислот, рутина и эпикатехина в лекарственных растениях / З.А. Темердашев, В.В. Милевская, Н.В. Киселева [и др.] // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 211-218.

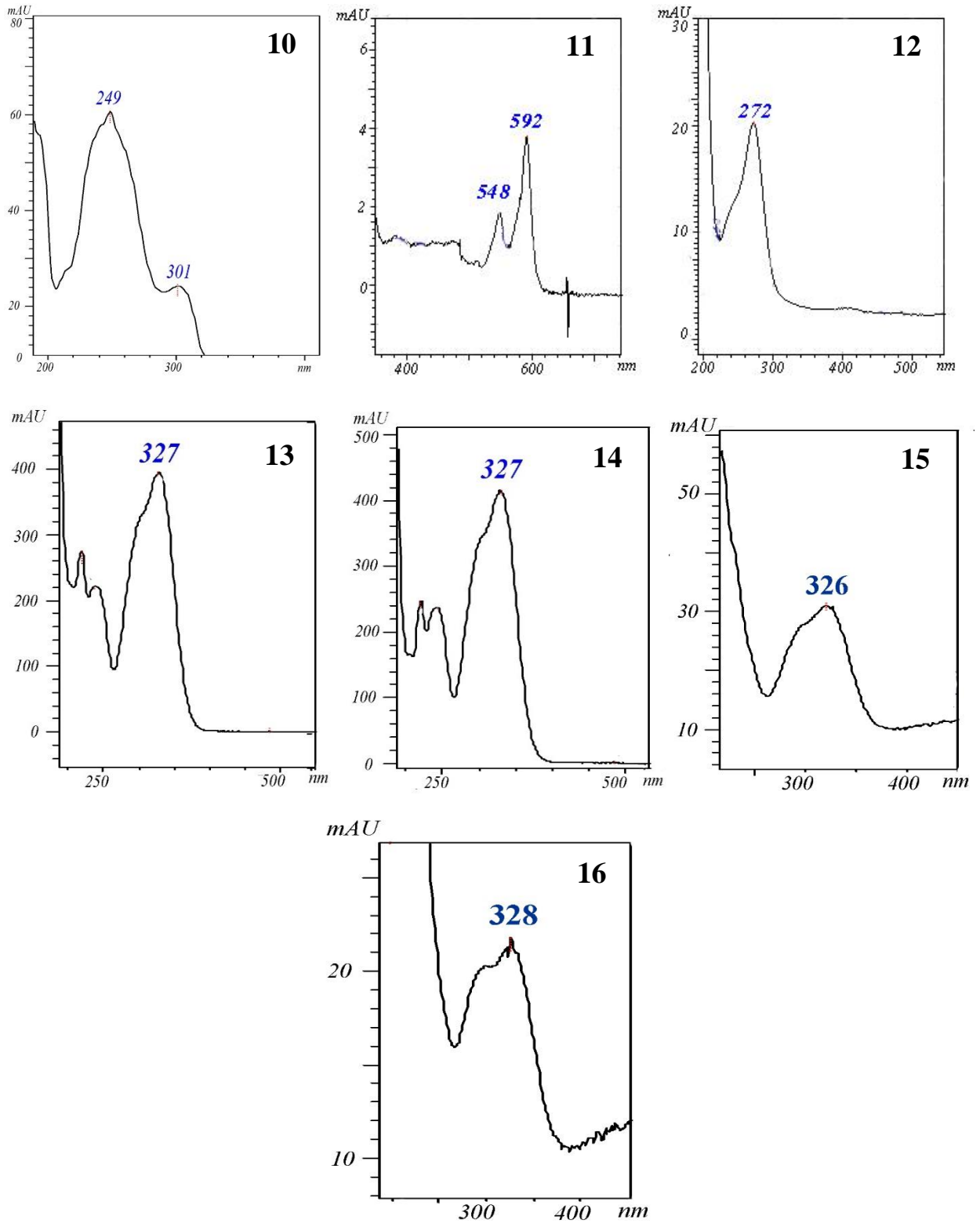
201. Очистка хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции / В.И. Дейнека, А.Ю. Михеев, Е.Ю. Олейниц [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18, № 4. – С. 488-494.

202. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis / C. Schummer, O. Delhomme, B. Appenzeller [et al.] // Talanta. – 2009. – Vol. 77, № 4. – P. 1473-1482.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

УФ-спектры фенольных соединений

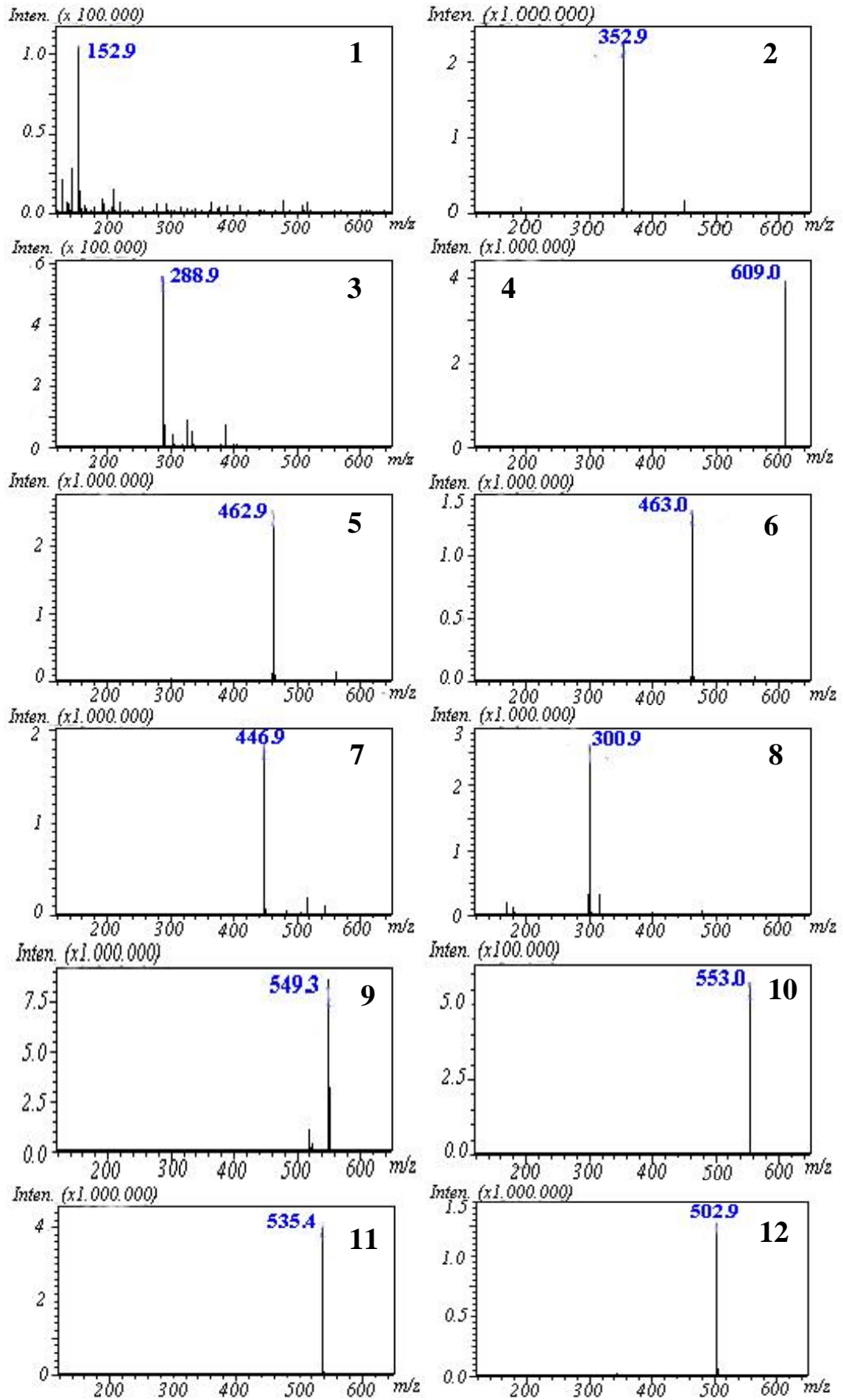


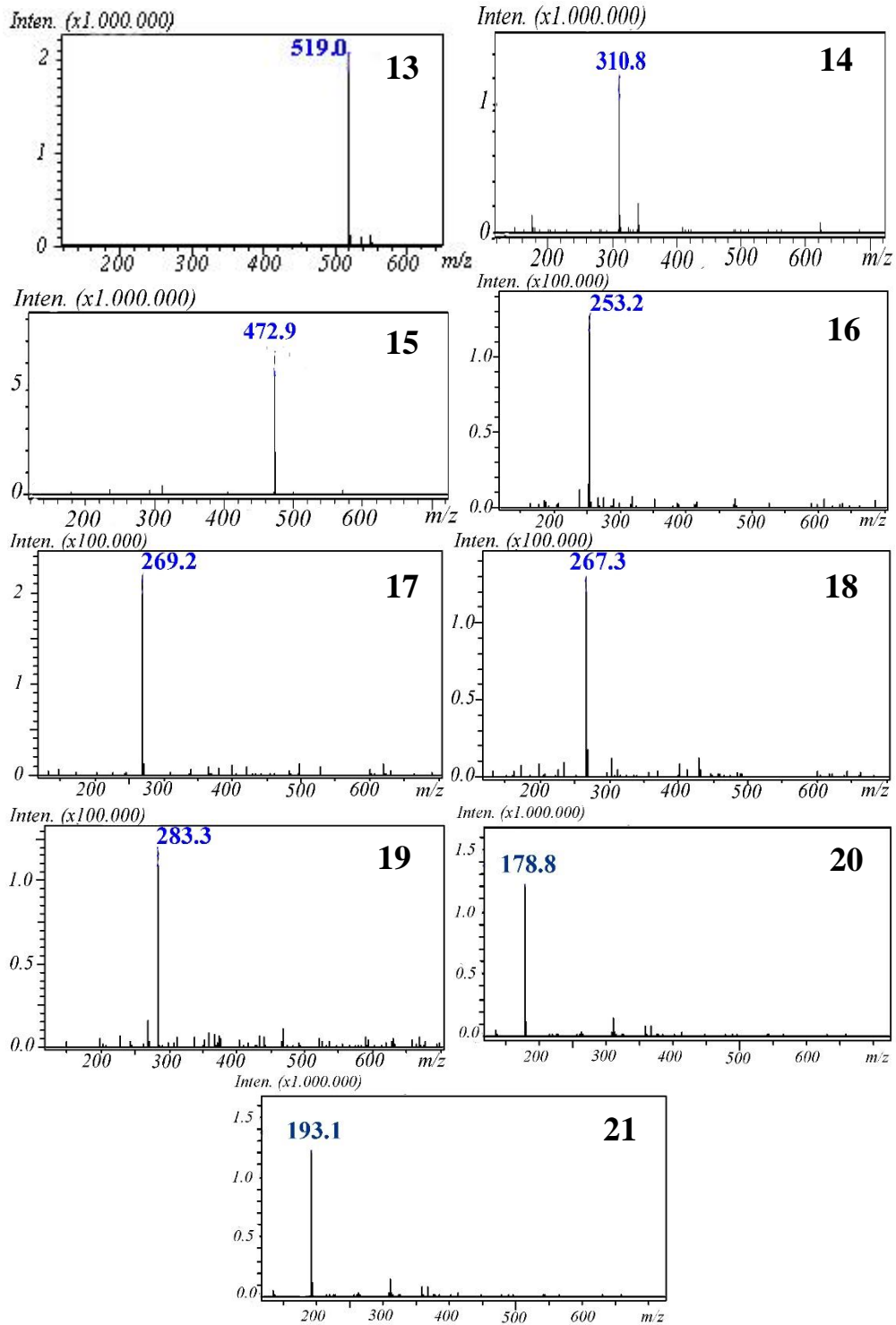


- 1 – 3,4-дигидроксибензойная кислота; 2 – хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты; 3 – (-)-эпикатехин; 4 – рутин и гиперозид; 5 – изокверцитрин; 6 – кверцитрин; 7- кверцетин; 8 – дайдзеин; 9 – генистеин; 10 – формонетин; 11 – гиперичин и псевдогиперичин; 12 – гиперфорин, адгиперфорин и фуругиперфорин; 13 – кафтаровая кислота; 14 – цикориевая кислота; 15 – кофейная кислота; 16 – феруловая кислота

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

МС-спектры фенольных соединений





- 1 – 3,4-дигидроксибензойная кислота; 2 – хлорогеновая и неохлорогеновая кислоты; 3 – (-)-эпикатехин; 4 – рутин; 5 – гиперозид; 6 – изокверцитрин; 7 – кверцитрин; 8- кверцетин; 8 – дайдзеин; 9 – адгиперфорин; 10 – фуругиперфорин; 11 – гиперфорин; 12 – гиперидин; 13 – псевдогиперидин; 14 – кафтаровая кислота; 15 – цикориевая кислота; 16 – дайдзеин; 17 – генистеин; 18 – формонетин; 19 – биоканин А; 20 – кофейная кислота; 21 – феруловая кислота