

2. Cancer imaging using surface-enhanced resonance Raman scattering nanoparticles / S. Harmsen, M.A. Wall, R. Huang, M.F. Kircher // Nat. Protoc. – 2017. – Vol. 12. – P. 1400-14.
3. Discrimination of breast cancer from normal tissue with Raman spectroscopy and chemometrics / Q.-B. Li, W. Wang, Ch.-H. Liu, G.-J. Zhanga // J. Applied Spectroscopy. – 2015. – Vol. 82. – P. 450-455.
4. Potential for Raman spectroscopy to provide cancer screening using a peripheral blood sample / A.T. Harris, A. Lungari, C.J. Needham [et al.] // Head Neck Oncol. – 2009. – Vol. 1, № 1. – Art. 34.
5. Rehman ur, I. Vibrational spectroscopy for tissue analysis / I. ur Rehman, Z. Movasaghi, Sh. Rehman. – CRC Press, 2012. – 356 p.
6. Stone, N. Advanced transmission Raman spectroscopy: a promising tool for breast disease diagnosis / N. Stone, P. Matousek // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68. – P. 4424-30.
7. Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells / J. Zhu, J. Zhou, J. Guo [et al.] // Chemistry Central Journal. – 2013. – P. 7-37.
8. Vibrational spectroscopy for medical diagnosis / ed. by M. Diem, P.R. Griffiths, J.M. Chalmers. – London: Wiley, 2008. – 358 p.
9. Wachsmann-Hogiu, S. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy: from single cells to humans / S. Wachsmann-Hogiu, T. Weeks, T. Huser // Curr. Opin. Biotechnol. – 2009. – Vol. 20. – P. 63-73.

REFERENCES

1. Jermyn M., Desroches J., Aubertin K. et al. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. Phys. Med. Biol., 2016, Vol. 61, № 23, P. 370-400. (in Eng)
2. Harmsen S., Wall M.A., Huang R., Kircher M.F. Cancer imaging using surface-enhanced resonance Raman scattering nanoparticles. Nat. Protoc. 2017. Vol. 12. P. 1400-14. (in Eng)
3. Li Q.-B., Wang W., Liu Ch.-H., Zhanga G.-J. Discrimination of breast cancer from normal tissue with Raman spectroscopy and chemometrics. J. Applied Spectroscopy. 2015, Vol. 82, P. 450-455. (in Eng)
4. Harris A.T., Lungari A., Needham C.J. et al. Potential for Raman spectroscopy to provide cancer screening using a peripheral blood sample. Head Neck Oncol. 2009. Vol. 1, № 1. Art. 34. (in Eng)
5. Rehman ur I., Movasaghi Z., Rehman Sh. Vibrational spectroscopy for tissue analysis. CRC Press, 2012. 356 p. (in Eng)
6. Stone N., Matousek P. Advanced transmission Raman spectroscopy: a promising tool for breast disease diagnosis. Cancer Res. 2008. Vol. 68. P. 4424-30. (in Eng)
7. Zhu J., Zhou J., Guo J. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells. Chemistry Central Journal. 2013. P. 7-37. (in Eng)
8. Diem M., Griffiths P.R., Chalmers J.M. Vibrational spectroscopy for medical diagnosis. London: Wiley, 2008, 358 p. (in Eng)
9. Wachsmann-Hogiu, S., Weeks T., Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy: from single cells to humans. Curr. Opin. Biotechnol., 2009, Vol. 20, P. 63-73. (in Eng)

УДК 615.22/322.074:581.

© И.Р. Баймухаметов, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, 2018

И.Р. Баймухаметов, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 ФЛАВОНОИДОВ В ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОМ СБОРЕ**
*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
 Минздрава России, г. Уфа*

В связи с неуклонным ростом числа заболеваний печени поиск новых фитопрепаратов, обладающих гепатопротекторным действием, является актуальным. Для внедрения в практику новых лекарственных растительных препаратов необходимо разработать нормативный документ, регламентирующий качество фитопрепарата. В данной статье рассматриваются вопросы разработки методики количественного определения флавоноидов в новом гепатопротекторном сборе. Для разработки методики использован спектрофотометрический метод. Исследованы различные параметры экстракции флавоноидов. Подобраны оптимальные условия извлечения флавоноидов (измельченность сырья, концентрация этилового спирта, время экстракции), количество комплексообразователя, время образования комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия. Согласно проведенным исследованиям разработана спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид. Содержание флавоноидов в гепатопротекторном сборе в среднем составило $1,53 \pm 0,03\%$. На основании полученных данных разработан числовой показатель для включения в проект фармакопейной статьи для гепатопротекторного сбора – содержание флавоноидов не менее 1,2%.

Ключевые слова: спектрофотометрия, флавоноиды, гиперозид, гепатопротекторный сбор, количественное определение.

I.R. Baimukhametov, S.R. Khasanova, N.V. Kudashkina
**DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION
 OF FLAVONOIDS IN HEPATOPROTECTIVE COLLECTION**

In connection with a steady increase in the number of liver diseases, the search for new herbal formulations that have a hepatoprotective effect is topical. To introduce new medicinal herbal preparations into practice, it is necessary to develop a regulatory document regulating the quality of herbal formulations. The article deals with the development of a methodology for the quantitative determination of flavonoids in a new hepatoprotective preparation. To develop the technique, a spectrophotometric method was used. Various parameters of extraction of flavonoids have been studied. Optimal conditions for the extraction of flavonoids (raw materials, ethyl alcohol concentration, extraction time), the amount of complexing agent, and the formation of a complex of flavonoids with aluminum chloride were detected. According to the research, a spectrophotometric method for quantifying the amount of flavonoids in terms of hyperoside was developed. The content of flavonoids in the hepatoprotective collection averaged $1.53 \pm 0.03\%$. Based on the data obtained, a numerical indicator was developed for the inclusion in the draft of a pharmacopoeial article for hepatoprotective collection - the content of flavonoids is not less than 1.2%.

Key words: spectrophotometry, flavonoids, hyperoside, hepatoprotective collection, quantitative content.

В настоящее время во всем мире наблюдается рост численности заболеваний печени. Сейчас более 2 млрд. человек страдают заболеваниями печени, что почти в 100 раз превышает распространенность ВИЧ-инфекции. Гепатиты являются наиболее распространённой патологией печени [1], поэтому актуален поиск новых лекарственных средств, обладающих гепатопротекторным действием. Использование фитопрепаратов позволило достигнуть хороших результатов в лечении патологии гепатобилиарной системы [2]. Для внедрения в практику новых лекарственных растительных препаратов необходимо разработать нормативный документ, регламентирующий качество фитопрепарата.

Цель исследований – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в гепатопротекторном сборе.

Материал и методы

Объектом исследования стал гепатопротекторный сбор. Состав и соотношение компонентов сбора разработали сотрудники кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Башкирского государственного медицинского университета. В состав сбора вошли 10 видов лекарственного растительного сырья, разрешенного для использования в медицинской практике на территории Российской Федерации.

Для количественного определения флавоноидов использован метод спектрофотометрии. Исследованы различные параметры экстракции для определения оптимальных условий извлечения флавоноидов, а также установлены необходимое количество комплексообразователя и время образования комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия [3]. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 (Япония). В качестве

комплексообразователя использовали алюминия хлорид (III). УФ-спектр гепатопротекторного сбора измеряли в диапазоне от 400 до 450 нм. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием критерия Стьюдента [4].

Результаты и обсуждение

При разработке методики количественного определения необходимо было выбрать вещество, на которое будет производиться пересчет, и определить оптимальные условия его извлечения из сырья. При проведении предварительных хроматоденситометрических исследований установлено, что превалирующим флавоноидом является гиперозид. При измерении УФ-спектра спиртового извлечения из сбора с добавлением комплексообразователя максимум поглощения наблюдался при длине волны 412 нм, что по литературным данным соответствует максимуму поглощения гиперозида (рис.1).

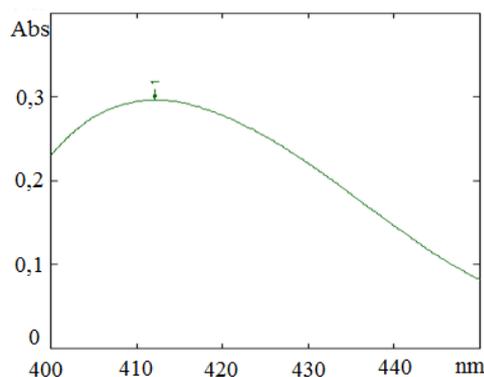


Рис. 1. УФ-спектр водно-спиртового извлечения сбора (70% этиловый спирт) с комплексообразующей добавкой

Для выбора оптимального экстрагента были получены извлечения из сбора с использованием 40, 50, 60, 70, 80, 95% этилового спирта. Наибольший выход флавоноидов наблюдался в извлечениях, полученных с помощью 70% этилового спирта (табл.1).

Таблица 1

Влияние условий экстрагирования на содержание флавоноидов в извлечении (n=5)

| Условия экстракции | Содержание флавоноидов, % | Условия экстракции | Содержание флавоноидов, % |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Концентрация спирта, % | | Время экстракции, мин | |
| 40 | 0,69±0,03 | 10 | 0,65±0,03 |
| 50 | 0,74±0,02 | 15 | 0,79±0,04 |
| 60 | 0,79±0,04 | 30 | 0,80±0,04 |
| 70 | 0,84±0,04 | 45 | 0,78±0,03 |
| 80 | 0,83±0,04 | 60 | 0,76±0,03 |
| 95 | 0,39±0,01 | 90 | 0,86±0,04 |
| Соотношение сырья и экстрагента | | Измельченность сырья, мм | |
| 1:10 | 0,78±0,03 | 1 | 1,19±0,05 |
| 1:50 | 1,01±0,04 | 2 | 0,89±0,04 |
| 1:100 | 0,99±0,04 | 3 | 1,01±0,03 |
| 1:150 | 0,97±0,04 | 4 | 0,77±0,02 |
| 1:200 | 0,83±0,03 | | |
| Кратность экстракции 1:50 | | Кратность экстракции 1:100 | |
| Однократная | 1,36±0,05 | Однократная | 1,49±0,06 |
| Двукратная | 1,44±0,06 | Двукратная | 1,31±0,05 |
| Трехкратная | 1,55±0,07 | Трехкратная | 1,10±0,04 |

Далее определяли оптимальную концентрацию и количество комплексообразователя. Установлено, что максимальная оптическая плотность наблюдалась при использовании в качестве комплексообразователя 2% и 4% спиртовые растворы алюминия хлорида (III) (рис.2). В связи с экономической целесообразностью далее нами была использована наименьшая концентрация комплексообразователя.

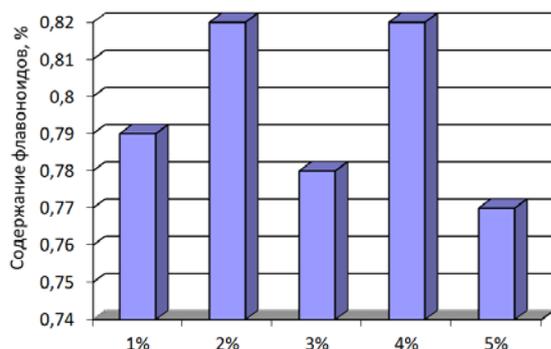


Рис. 2. Влияние концентрации комплексообразователя на результаты определения содержания флавоноидов

Изучалось также влияние количества комплексообразователя на результаты определения содержания флавоноидов. Оказалось, что наибольший показатель содержания флавоноидов наблюдался при добавлении 1 мл 2% раствора алюминия хлорида (рис. 3).

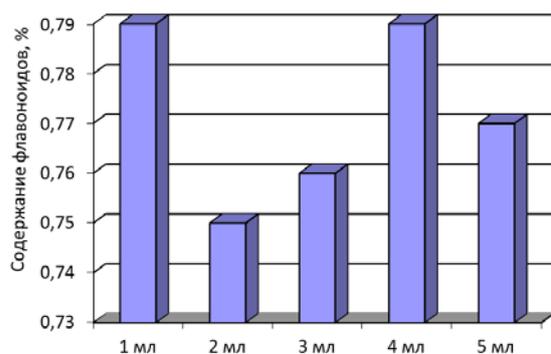


Рис. 3. Влияние количества комплексообразователя на результаты определения содержания флавоноидов

При определении временного промежутка протекания реакции комплексообразования установлено, что максимальная оптическая плотность наблюдается через 40 минут и комплекс остается стабильным не менее 1,5 часа (рис. 4)

Для определения оптимальной измельченности содержание флавоноидов определяли в сырье, измельченном до размеров частиц 1, 2, 3, 4 мм. Установлено, что оптимальной является измельченность сырья 1 мм. Результаты изучения влияния времени экстракции на результаты количественного определения

показали, что оптимальное время экстракции составляет 30 минут.

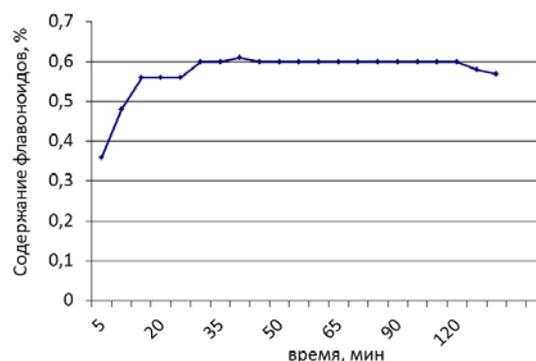


Рис. 4. Время образования и продолжительность устойчивости комплекса флавоноидов с комплексообразователем

Поскольку одним из параметров экстракции является соотношение сырья и экстрагента, нами исследовались различные соотношения – 1:10, 1:50, 1:100, 1:150 и 1:200. Оказалось, что при использовании соотношений 1:50 и 1:100 данные достоверно не различались между собой. Поэтому решено было проверить различную кратность экстракции при этих соотношениях. Установлено, что наибольшее содержание флавоноидов наблюдается при использовании 3-кратной экстракции при соотношении сырья и экстрагента 1:50. Результаты испытаний приведены в табл. 1.

На основании проведенных исследований разработана методика количественного определения флавоноидов в гепатопротекторном сборе: 0,5 г (точная навеска) сырья, измельченного до 1 мм, помещают в колбу на 250 мл, прибавляют 40 мл 70 % этилового спирта, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане 15 минут. Затем извлечение фильтруют в мерную колбу на 100 мл. Далее дважды повторяют экстракцию при тех же условиях, добавляя к сырью в колбе по 30 мл 70 % этилового спирта. Все три извлечения объединяют и доводят в мерной колбе до 100 мл (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 4 мл раствора А, прибавляют 4 мл 2% спиртового раствора хлорида алюминия, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят раствор до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). Оптическую плотность полученного раствора измеряют через 40 минут на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете толщиной слоя 1 см. Раствором сравнения служит следующий раствор: 4 мл раствора А, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доведенный 95% этиловым спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на гиперозид и абсолютно сухое сырье (в %) вычисляются по формуле:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{E \times m \times 4(100 - W)}$$

где

D – оптическая плотность исследуемого раствора (раствор В);

E – удельный показатель поглощения гиперозида с хлоридом алюминия, равный 380;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Полученные результаты содержания флавоноидов в гепатопротекторном сборе представлены в табл. 2.

Таблица 2

| Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид в гепатопротекторном сборе | | | | | | | |
|--|---|-----------------|------|---------|----------------|-----------------|------|
| № серии | N | X _{ср} | P | t (p,f) | S _x | E _{аб} | E% |
| 1 | 3 | 1,52 | 0,95 | 4,303 | 0,0061 | 0,026 | 1,71 |
| 2 | 3 | 1,53 | 0,95 | 4,303 | 0,0046 | 0,0198 | 1,29 |
| 3 | 3 | 1,55 | 0,95 | 4,303 | 0,008 | 0,034 | 2,22 |

Содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид в трех сериях опытов составило 1,53±0,03%. Ошибка опыта не превышает 2,2%, что говорит о достоверности полученных результатов.

Заключение. Таким образом, на основании проведенных исследований разработана методика спектрофотометрического опреде-

ления суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в гепатопротекторном сборе. Содержание флавоноидов в гепатопротекторном сборе находится в пределах от 1,49 до 1,57%. В качестве числового показателя для включения в проект фармакопейной статьи на гепатопротекторный сбор предложен показатель «содержание флавоноидов не менее 1,2%».

Сведения об авторах статьи:

Баймухаметов Ильнур Рамильевич – студент 5 курса фармацевтического факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел./факс: 8(347)271-22-85. Email: ilnurbaikumhametov@gmail.com.

Хасанова Светлана Рашитовна – д.фарм.н., доцент, профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: svet-khasanova@yandex.ru.

Кудашкина Наталья Владимировна – д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: phytoart@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баймухаметов, И.Р. Сравнение содержания флавоноидов при получении полиэкстракта различными методами из гепатопротекторного сбора // И.Р. Баймухаметов // Вестник Южно-Казахстанской государственной фармацевтической академии. – 2017. – № 3. – С. 45.
2. Шульпекова, Ю.О. Препараты растительного происхождения в лечении заболеваний печени / Ю.О. Шульпекова // Российский медицинский журнал. – 2006. – № 4. – С. 337.
3. Потанина, А.П. Разработка методики количественного определения флавоноидов в растительном сборе «Кардиофит» / А.П. Потанина, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20, № 3. – С. 60-62.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2015. – Ч. 1. – 1470 с. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/femb>

REFERENCES

1. Bajmukhametov I.R. Sravnenie soderzhanija flavonoidov pri poluchenii polijekstrakta razlichnymi metodami iz gepatoprotektornogo sbora (To compare the content of flavonoids in obtaining preextracted different methods of hepatoprotective collection) Vestnik Juzhno-Kazahstanskoj gosudarstvennoj farmacevticheskoj akademii, 2017, № 3, p.45.
2. Shul'pekova, Ju.O. Preparaty rastitel'nogo proishozhdenija v lechenii zaboolevanij pecheni (Preparations of plant origin in the treatment of liver diseases) Rossijskij medicinskij zhurnal, 2006, № 4, p.337.
3. Potanina A.P., Khasanova S.R., Kudashkina N.V. Development of the method of quantitative determination of flavonoids in the plant species "Cardiophytum". Bashkir Chemical journal, 2013, vol.20, № 3, p. 60-62.
4. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izdaniija (State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition). Moscow, Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija, 2015, vol. 1, 1470 p.

УДК 615.015.33

© Коллектив авторов, 2018

Л.А. Валеева, Г.Г. Давлятова, И.Л. Никитина, Г.Р. Гайсина
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АНТИДЕПРЕССАНТ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ КСАНТИНА
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа

В статье представлены результаты изучения острой токсичности и антидепрессивной активности гидразида 2-[1,3-диметил-7-(тиетанил-3)ксантинил-8-тио]уксусной кислоты при однократном и длительном введении в широком диапазоне доз. Опыты поставлены на белых беспородных мышах. Однократно исследуемое соединение испытано в дозах 35 мг/кг,