ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL COMPOUNDS AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-4-30-38

УДК 615.32: 547.97 + 543.544

CC BY

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Новые подходы к стандартизации травы монарды дудчатой

В.А. Куркин@, А.С. Цибина

Самарский государственный медицинский университет, Самара, 443099 Россия
@Автор для переписки, e-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

Цели. *Среди эфиромасличных лекарственных растений, обладающих широким спектром фармакологической активности, особый интерес представляет трава монарды дудчатой (Monarda fistulosa) семейства Яснотковых. Однако информация о некоторых флавоноидах, содержащихся в ней наряду с эфирным маслом, носит противоречивый характер. Неточности, выявленные в отношении химического состава травы, становятся причиной появления различных подходов к стандартизации, что создает трудности. Для обеспечения единообразия классификации в данной работе представлено обоснование новых, ранее не применявшихся подходов к стандартизации травы монарды дудчатой.*
Методы. *Для экстракции флавоноидов использовали колоночную хроматографию на силикагеле. Идентификацию осуществляли на основании данных ультрафиолетовой спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии, а также результатов кислотного гидролиза. Оценку качества предложенной методики количественного определения суммы флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии при 394 нм в пересчете на изороифолин.*
Результаты. *Обоснованы подходы к стандартизации травы монарды дудчатой, заключающиеся в определении ее подлинности путем обнаружения монотерпеновых фенолов и флавоноидов, имеющих диагностическое значение. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов.*
Выводы. *Изучена возможность определения подлинности травы монарды дудчатой, исходя из диагностически значимых флавоноидов – изороифолина и линарина.*

Ключевые слова: *флавоноиды, монарда дудчатая, Monarda fistulosa, изороифолин, линарин, спектрофотомерия, тонкослойная хроматография, стандартизация.*

Для цитирования: Куркин В.А., Цибина А.С. Новые подходы к стандартизации травы монарды дудчатой. Тонкие химические технологии. 2020;15(4):30-38. https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-4-30-38

© В.А. Куркин, А.С. Цибина, 2020

RESEARCH ARTICLE

New approaches for the standardization of the *Monarda fistulosa* herb

Vladimir A. Kurkin@, Anastasiya S. Tsibina

Samara State Medical University, Samara, 443099 Russia
@Corresponding author, e-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

Objectives. *The Monarda fistulosa herb of the Lamiaceae family is particularly interesting among essential oils from medicinal plants that have a wide spectrum of pharmacological activities. However, information regarding some of its flavonoids, which are found in the essential oil, is controversial. Inaccuracies in identification of the chemical composition of the herb have led to several different standardization approaches, which are cumbersome. To establish a uniform classification, here, we present confirmation for new approaches for the standardization of the Monarda fistulosa herb.*
Methods. *Silica gel column chromatography was used to extract the flavonoids. Identification was based on ultraviolet spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry, and acidic hydrolysis. The quality of the proposed quantitation methodology for total flavonoids was assessed by differential spectrophotometry at 394 nm, in isorhoifolin equivalent.*
Results. *We have verified new approaches for the standardization of the Monarda fistulosa herb. The approaches can determine the authenticity of the herb by detecting monoterpene phenols and flavonoids that have diagnostic value. We also developed a technique for quantitation of the total flavonoids.*
Conclusions. *We investigated the possibility of establishing the authenticity of the Monarda fistulosa herb based on the diagnostically significant flavonoids, isorhoifolin and linarin.*

Keywords: *flavonoids, Monarda fistulosa, isorhoifolin, linarin, spectrophotometry, thin-layer chromatography, standardization.*

For citation: Kurkin V.A., Tsibina A.S. New approaches for the standardization of the *Monarda fistulosa* herb. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2020;15(4):30-38 (in Russ.). https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-4-30-38

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в медицине широко применяются эфиромасличные лекарственные растения, которые обладают широким спектром фармакологической активности за счет многообразия химической природы биологически активных соединений (терпеноиды, ароматические соединения и др.). Особый интерес представляют растения, содержащие монотерпеновые фенолы – например, тимол и карвакрол. В этом отношении наиболее известны тимьян ползучий (чабрец, *Thymus serpyllum L.*), тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris L.*) и душица обыкновенная (*Origanum vulgare L.*), которые относятся к семейству Яснотковых (*Lamiaceae*)[1].

Одним из перспективных для изучения растений является трава монарды дудчатой (*Monarda fistulosa L.*) семейства Яснотковые. Эта трава произрастает в Северной Америке [1]. Трава *Monarda fistulosa* содержит свыше 3% эфирного масла, компоненты которого (тимол, карвакрол и др.) обусловливают высокую бактерицидную, фунгицидную, противовоспалительную и антигельминтную активность [1–3]. Не менее интересным представляется и тот факт, что в эфирном масле травы *Monarda fistulosa* доминирующим компонентом является не тимол, как в случае тимьяна обыкновенного и чабреца, а карвакрол, для которого ранее была показана более ярко выраженная антимикробная активность [4].

С целью определения подлинности травы *Monarda fistulosa* ранее была предложена методика тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием стандартного образца тимола. При этом на хроматограмме анализируемого экстракта на уровне стандартного образца тимола должно находиться оранжевое пятно с коэффициентом R_f около 0.9 [4]. Принимая во внимание современные тенденции в фармакопейном анализе, предусматривающие определение подлинности и качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) не по одной, а, как правило,

[1] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: МЗ РФ; 2018. Т. 4. 1832 с. URL: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 09.09.2019) [The State Pharmacopeia of the Russian Federation. 14th edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.). Available from: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (Accessed September 09, 2019).]

по двум (или более) группам биологически активных веществ[2], изучение флавоноидного состава травы *Monarda fistulosa* представляется актуальным.

Наряду с эфирным маслом данное растение содержит и другие ценные биологически активные соединения, в частности флавоноиды (флавоны, флавонолы, флавононы, антоцианы), которые также вносят вклад в фармакологическую активность [5, 6]. В литературе имеется информация о содержании в траве *Monarda fistulosa* следующих флавоноидов: гесперидина, диосмина, кверцетина, лютеолина, рутина, нарингенина, цинарозида (лютеолин-7-О-глюкозида), гиперозида, катехина [6, 7], однако эти данные носят противоречивый характер. Это касается также методических и методологических подходов к стандартизации травы *Monarda fistulosa*. Так, существует методика количественного определения содержания суммы флавоноидов с помощью дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 390 нм в пересчете на рутин (0.48 ± 0.01%) [5, 6]. В этой методике извлечение из сырья осуществляли путем трехкратной экстракции 70%-ным этиловым спиртом.

По результатам ранее опубликованных работ содержание суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa* составляет 2.14% в пересчете на лютеолин [5, 6]. Авторами была использована двойная экстракция 70%-ным этиловым спиртом в соотношении сырье : экстрагент = 1 : 30, а также метод дифференциальной спектрофотомерии. Кроме того, предложена методика количественного определения флавоноидов в траве *Monarda fistulosa* путем двукратной (по 30 мин) экстракции сырья (1 : 30) 50%-ным этиловым спиртом (аналитическая длина волны 398 нм). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин составило в этом случае 1.57 ± 0.02% [5, 6].

Ранее нами были разработаны подходы к стандартизации травы *Monarda fistulosa*, заключающиеся в определении суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и содержания эфирного масла [7–9]. Выбор цинарозида в качестве стандартного образца обусловлен тем, что данный флавон, судя по литературным источникам, содержится в траве *Monarda fistulosa,* имеет фармакопейный статус и широко используется для стандартизации ЛРС[3]. Кроме того, максимум в спектре поглощения водно-спиртового экстракта травы *Monarda fistulosa* (394 нм) был близок к максимуму поглощения раствора цинарозида (около 400 нм). Однако в ходе дальнейших исследований нами не было подтверждено наличие цинарозида в растении.

Таким образом, несмотря на имеющиеся в литературе данные относительно химического состава *Monarda fistulosa*, выявлены некоторые противоречия, касающиеся флавоноидного состава. Это, в свою очередь, приводит к появлению различных подходов к стандартизации. В качестве экстрагента используют этиловый спирт различных концентраций; отсутствует единый стандарт продолжительности экстракции; нет единого мнения относительно аналитической длины волны и вещества, применяемого в качества стандартного образца. В этом свете следует предпринимать новые шаги для развития методических подходов к стандартизации травы *Monarda fistulosa*, что и стало целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была трава монарды дудчатой (*Monarda fistulosa*), собранная во время массового цветения в Ботаническом саду Самарского университета в июле 2016–2018 гг. и в Никитском ботаническом саду (Республика Крым) в июле 2018 г.

Флавоноидные соединения – изороифолин (**1**) и линарин (**2**) (рис. 1) – выделяли из травы *Monarda fistulosa* на хроматографической колонке с силикагелем L 40/100. Разделение веществ контролировали с помощью ТСХ-анализа на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (*ИМИД*, Россия). В качестве элюента выступали системы хлороформ–этанол–вода (26 : 16 : 3) и *н*-бутанол–ледяная уксусная кислота–вода (4 : 1 : 2). Детектирование экстрагируемых веществ осуществляли просвечиванием хроматограмм в ультрафиолете при 366 нм, в том числе после проявления раствором хлорида алюминия, а затем – щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК).

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировали следующим образом: ^{1}H-спектры на Bruker AM 300 (*Bruker*, Германия) при частоте 300 МГц; ^{13}C-спектры на Bruker DRX 500 (*Bruker*, Германия) при частоте 126.76 МГц. Масс-спектры регистрировали на приборе Kratos MS-30 (*Kratos*, Великобритания), а спектры поглощения в ультрафиолетовой (УФ) области на приборе Specord 40 (*Analytik Jena*, Германия).

[2] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: МЗ РФ; 2018. Т. 4. 1832 с. URL: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 09.09.2019) [The State Pharmacopeia of the Russian Federation. 14th edition. Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow; 2018. (In Russ.). Available from: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (Accessed September 09, 2019).]

[3] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: МЗ РФ; 2018. Т. 4. 1832 с. URL: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 09.09.2019) [The State Pharmacopeia of the Russian Federation. 14th edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.). Available from: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (Accessed September 09, 2019).]

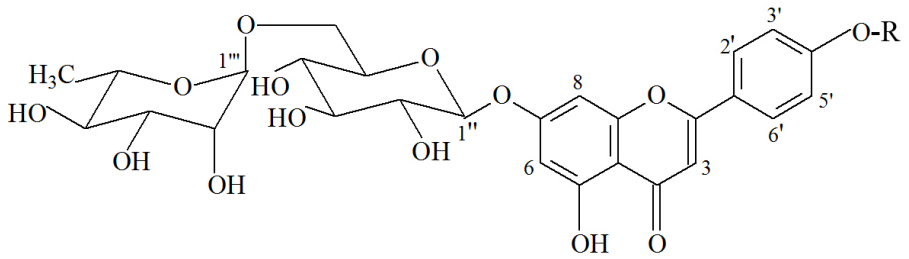

Рис. 1. Флавоноиды, выделенные из травы *Monarda fistulosa*: R = H: изороифолин; R = CH_3: линарин.
Fig. 1. Flavonoids isolated from *Monarda fistulosa* herb: R = H: isorhoifolin; R = CH_3: linarin.

Изороифолин (7-О-рутинозид апигенина) (**1**). Кристаллическое вещество светло-желтого цвета состава $C_{27}H_{30}O_{14}$; $T_{пл}$ 257–260 °С (водный спирт). λ_{max} EtOH 270, 340 нм; + NaOAc 270, 340 нм; + NaOAc + H_3BO_3 270, 405 нм; + $AlCl_3$ 278, 308, 345, 384 нм; + $AlCl_3$ + HCl 278, 308, 345, 384 нм; + NaOMe 254, 269, 400 нм.

^{1}H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d_6, δ, м.д., J/Гц): 1.07 (3H, д, J = 6, CH_3 рамнозы), 3.0–5.2 (10H рутинозы), 4.56 (1H, уш. с, H-1’’’ рамнопиранозы), 5.07 (1H, д, J = 7, H-1’’ глюкопиранозы), 6.46 (1H, д, J = 2, H-6), 6.77 (1H, д, J = 2, H-8), 6.87 (1H, с, H-3), 6.93 (2H, д, J = 8.5, H-3’ и H-5’), 7.94 (2H, д, J = 8.5, H-2’ и H-6’), 12.95 (1H, с, 5-OH группы).

^{13}C-ЯМР спектр (126.76 МГц, ДМСО-d_6, δ_C, м.д.): C-2 (162.87), C-3 (103.11), C-4 (181.97), C-5 (161.17), C-6 (99.54), C-7 (164.37), C-8 (94.79), C-9 (156.92), C-10 (105.38), C-1’ (121.03), C-2’ и C-6’ (128.62), C-3’ и C-5’ (116.06), C-4’ (161.32), C-1’’ глюкозы (99.91), C-2’’ (72.06), C-3’’ (75.62), C-4’’ (70.74), C-5’’ (76.27), C-6’’ (66.05), C-1’’’ рамнозы (100.52), C-2’’’ (70.32), C-3’’’ (69.57), C-4’’’ (73.08), C-5’’’ (68.31), C-6’’’ (CH_3 рамнозы) (17.79).

Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, *m/z*): *m/z* 579.1739 $[M+H]^+$, *m/z* 601.1554 $[M+Na]^+$, *m/z* 617.1285 $[M+K]^+$.

Линарин (7-О-рутинозид акацетина) (**2**). Кристаллическое вещество белого цвета состава $C_{28}H_{32}O_{14}$; $T_{пл}$ 260 °С (разл.) (водный спирт). λ_{max} EtOH 272, 330 нм; + NaOAc 272, 330 нм; + NaOAc + H_3BO_3 272, 330 нм; + $AlCl_3$ 280, 384 нм; + $AlCl_3$ + HCl 280, 384 нм; + NaOMe 287, 372 нм.

^{1}H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d_6, δ, м.д., J/Гц): 1.07 (3H, д, J = 6, CH_3 рамнозы), 3.0–5.3 (10H рутинозы), 3.83 (с, 3H, CH_3O), 4.54 (1H, уш. с, H-1’’’ рамнопиранозы), 5.07 (1H, д, J = 7, H-1’’ глюкопиранозы), 6.45 (1H, д, J = 2, H-6), 6.78 (1H, д, J = 2, H-8), 6.92 (1H, с, H-3), 7.14 (2H, д, J = 8.5, H-3’ и H-5’), 8.04 (2H, д, J = 8.5, H-2’ и H-6’), 12.90 (1H, с, 5-OH группы).

^{13}C-ЯМР спектр (126.76 МГц, ДМСО-d_6, δ_C, м.д.): C-2 (163.94), C-3 (103.80), C-4 (182.01), C-5 (161.13), C-6 (99.65), C-7 (165.11), C-8 (96.45), C-9 (156.96), C-10 (105.45), C-1’ (122.66), C-2’ и C-6’ (128.44), C-3’ и C-5’ (114.70), C-4’ (162.42), C-1’’ глюкозы (99.94), C-2’’ (73.06), C-3’’ (75.66), C-4’’ (70.34), C-5’’ (76.24), C-6’’ (68.31), C-1’’’ рамнозы (100.51), C-2’’’ (70.74), C-3’’’ (70.25), C-4’’’ (72.05), C-5’’’ (69.60), C-6’’’ (CH_3 рамнозы) (17.79), CH_3O (55.55).

Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, *m/z*): *m/z* 593.1888 $[M+H]^+$, *m/z* 615.1710 $[M+Na]^+$.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa*. Сырье измельчали так, чтобы его частицы проходили сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Точную навеску измельченного сырья (около 1 г) помещали в колбу объемом 100 мл и прибавляли 50 мл 60%-го этилового спирта. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на весах с точностью до 0.01 г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После кипячения колбу охлаждали в течение 30 мин, закрывали той же пробкой, снова взвешивали и добавляли экстрагент до первоначальной массы. Полученный водно-спиртовой экстракт фильтровали через бумажный фильтр (красная полоса).

Приготовление испытуемого раствора. Полученный экстракт (1 мл) переливали в мерную колбу объемом 50 мл, добавляли 2 мл 3%-го спиртового раствора хлорида алюминия, затем доводили объем раствора до метки 96%-ным этиловым спиртом (испытуемый раствор). Оптическую плотность испытуемого раствора определяли через 40 мин после приготовления на спектрофотометре при длине волны 394 нм (для расчета содержания суммы флавоноидов). Раствором сравнения служил раствор, содержащий 1 мл водно-спиртового экстракта (1 : 50) и 96%-ный этиловый спирт, которым доводили до метки в колбе объемом 50 мл.

Приготовление раствора выделенного вещества. Точную навеску (около 0.02 г) изороифолина помещали в колбу объемом 50 мл и растворяли в 30 мл 70%-го этилового спирта при нагревании. После охлаждения до комнатной температуры объем раствора доводили до метки 70%-ным этиловым спиртом (раствор А изороифолина). 1 мл раствора А изороифолина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 3%-го спиртового раствора хлорида алюминия и доводили объем

раствора до метки 96%-ным этиловым спиртом (раствор Б изороифолина). Оптическую плотность раствора Б определяли на спектрофотометре при длине волны 394 нм. Раствором сравнения служил раствор, содержащий 1 мл раствора А изороифолина и 96%-ный этиловый спирт, которым доводили до метки в колбе объемом 25 мл (раствор сравнения Б изороифолина).

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на изороифолин и абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 50 \times 50 \times 1 \times 50 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 50 \times 1 \times 25 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца изороифолина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса стандартного образца изороифолина, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия стандартного образца изороифолина в формуле для расчета целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения, равное 195:

$$X = \frac{D \times 50 \times 50 \times 100}{m \times 195 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

195 – удельный показатель поглощения ($E^{1\%}_{1\,см}$) изороифолина при 394 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью колоночной хроматографии на силикагеле L 40/100 из травы *Monarda fistulosa* впервые выделены флавоноиды **1** и **2**, идентифицированные как изороифолин (7-О-рутинозид апигенина) [10] и линарин (7-О-рутинозид акацетина) [11–13]. Идентификация была основана на данных УФ-спектров, ^{1}H-ЯМР и ^{13}C-ЯМР спектров, масс-спектров, а также кислотного гидролиза.

Поскольку выделенные вещества являются доминирующими флавоноидами данного растения, мы изучили возможность определения подлинности травы *Monarda fistulosa* по наличию не только тимола и карвакрола, но и диагностически значимых флавоноидов – изороифолина (**1**) и линарина (**2**). При этом, на наш взгляд, ТСХ-анализ целесообразно осуществлять с использованием не только тимола [6], но и стандартного образца рутина, наиболее широко применяемого в фармакопейном анализе ЛРС[4].

ТСХ-анализ водно-спиртового экстракта, полученного с использованием 60%-го этилового спирта, показал, что на хроматограмме испытуемого раствора при 366 нм обнаруживаются два близких по хроматографической подвижности флавоноида – изороифолин (1) и линарин (2). Величина R_{st} относительно рутина для них составляет примерно 1.15 и 1.30 соответственно (рис. 2 и 3). При последующем проявлении

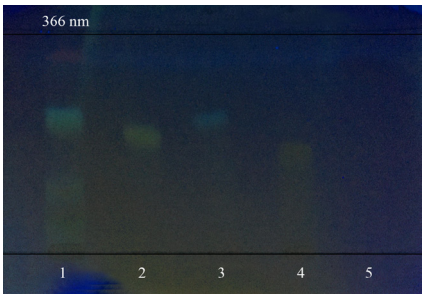

Рис. 2. Хроматограмма водно-спиртового экстракта из травы *Monarda fistulosa* в системе растворителей хлороформ–этанол–вода (26 : 16 : 3). Детекция при 366 нм. Обозначения: 1 – экстракт из травы *Monarda fistulosa*; 2 – изороифолин; 3 – линарин; 4 – рутин; 5 – тимол.

Fig. 2. Chromatogram of the water-alcohol extract from *Monarda fistulosa* in the chloroform–ethanol–water (26 : 16 : 3) system. Detection at 366 nm. Designations: 1 – extract from *Monarda fistulosa*; 2 – isorhoifolin; 3 – linarin; 4 – rutin; 5 – thymol.

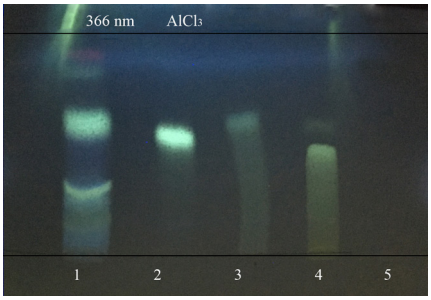

Рис. 3. Хроматограмма водно-спиртового экстракта из травы *Monarda fistulosa* в системе растворителей хлороформ–этанол–вода (26 : 16 : 3). Детекция при 366 нм после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$. Обозначения: 1 – экстракт из травы *Monarda fistulosa*; 2 – изороифолин; 3 – линарин; 4 – рутин; 5 – тимол.

Fig. 3. Chromatogram of the water-alcohol extract from *Monarda fistulosa* in the chloroform–ethanol–water (26 : 16 : 3) system. Detection at 366 nm after treatment with $AlCl_3$ alcohol solution. Designations: 1 – extract from *Monarda fistulosa*; 2 – isorhoifolin; 3 – linarin; 4 – rutin; 5 – thymol.

[4] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: МЗ РФ; 2018. Т. 4. 1832 с. URL: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 09.09.2019) [The State Pharmacopeia of the Russian Federation. 14th edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.). Available from: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (Accessed September 09, 2019).]

щелочным раствором ДСК (рис. 4) на хроматограмме обнаруживается пятно оранжево-красного цвета (тимол + карвакрол) на уровне пятна тимола.

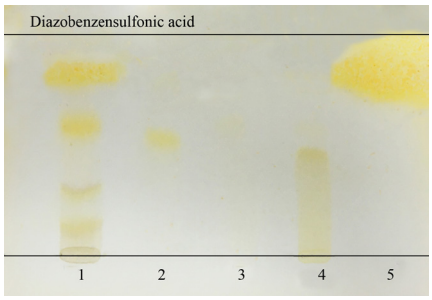

Рис. 4. Хроматограмма водно-спиртового экстракта из травы *Monarda fistulosa* в системе растворителей хлороформ–этанол–вода (26 : 16 : 3). Детекция в видимом свете после обработки щелочным раствором ДСК. Обозначения: 1 – экстракт из травы *Monarda fistulosa*; 2 – изороифолин; 3 – линарин; 4 – рутин; 5 – тимол.

Fig. 4. Chromatogram of the water-alcohol extract from *Monarda fistulosa* in the chloroform–ethanol–water (26 : 16 : 3) system. Detection in visible light after treatment with the alkaline solution of diazobenzenesulfonic acid. Designations: 1 – extract from *Monarda fistulosa*; 2 – isorhoifolin; 3 – linarin; 4 – rutin; 5 – thymol.

Для разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa* мы изучили спектры поглощения водно-спиртового экстракта, а также растворов выделенных веществ – изороифолина и линарина. Мы установили, что выделенные флавоноиды, в частности изороифолин (рис. 5 и 6), во многом определяют характер кривой поглощения водно-спиртового экстракта, особенно в условиях дифференциальной УФ-спектроскопии (рис. 7 и 8). В спектре наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения флавоноидов (рис. 7), как и в случае изороифолина (рис. 5). Изучение спектров поглощения изороифолина и испытуемого раствора показало, что в обоих случаях в присутствии хлорида алюминия (дифференциальная спектрофотометрия) имеется максимум поглощения при 394 нм (рис. 6 и 8).

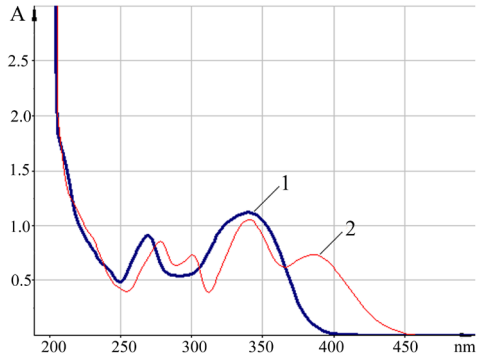

Рис. 5. Спектры поглощения спиртовых растворов изороифолина. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением хлорида алюминия.

Fig. 5. Absorption spectra of isorhoifolin alcohol solutions. Designations: 1 – initial solution; 2 – solution with added aluminum chloride.

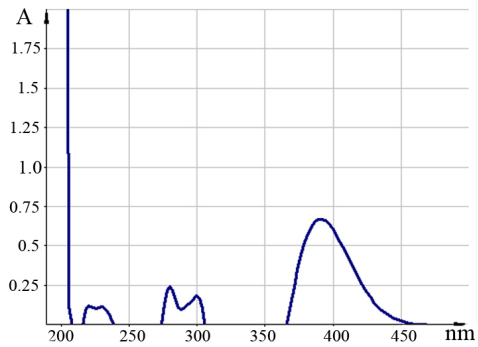

Рис. 6. Дифференциальный спектр поглощения раствора изороифолина.

Fig. 6. Differential absorption spectrum of the isorhoifolin solution.

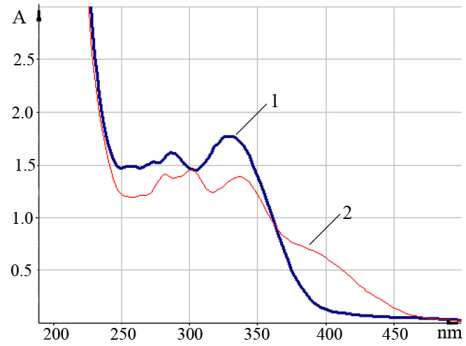

Рис. 7. Спектры поглощения растворов водно-спиртового экстракта из травы *Monarda fistulosa*. Обозначения: 1 – раствор экстракта; 2 – раствор экстракта с добавлением хлорида алюминия.

Fig. 7. Absorption spectra of water-alcohol extracts from *Monarda fistulosa*. Designations: 1 – extract solution; 2 – extract solution with added aluminum chloride.

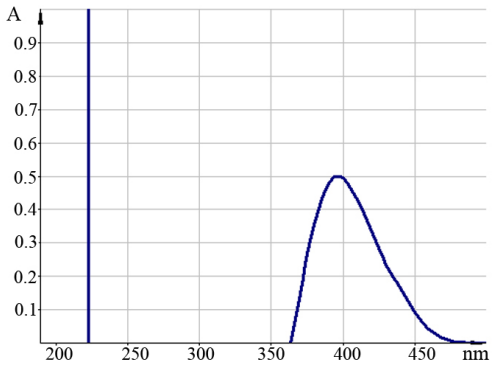

Рис. 8. Дифференциальный спектр поглощения раствора водно-спиртового экстракта из травы *Monarda fistulosa.*

Fig. 8. Differential absorption spectrum of the water-alcohol extract from *Monarda fistulosa.*

Принимая во внимание тот факт, что максимумы поглощения раствора выделенного флавоноида и водно-спиртового экстракта из травы *Monarda fistulosa* находятся в области 394 нм (дифференциальный вариант), целесообразным являлось определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на изороифолин при 394 нм. В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов мы использовали ранее определенные оптимальные параметры экстракции флавоноидов из травы *Monarda fistulosa*: экстрагент – 60%-ный этиловый спирт; соотношение сырье : экстрагент = 1 : 50; время экстракции – 60 мин; экстракцию осуществляли на кипящей водяной бане [7]. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa* представлены в табл. 1.

Результаты статистической обработки результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa* с доверительной вероятностью 95% составляет ±4.65%. Также определено, что содержание суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa* варьируется от 5.96 ± 0.08% до 7.68 ± 0.12% (табл. 2).

Валидацию разработанной методики проводили по показателям специфичности, линейности, правильности и воспроизводимости. Специфичность методики подтверждалась соответствием максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы *Monarda fistulosa* и изороифолина с раствором хлорида алюминия. Линейность методики определяли для серии растворов изороифолина в диапазоне концентраций от 0.01272 до 0.03816 мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0.99974. Правильность методики устанавливали методом добавок при помощи добавления раствора изороифолина с известной концентрацией – 25%, 50% и 75% – к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обоснована целесообразность определения подлинности травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa*) с использованием тонкослойной хроматографии за счет обнаружения монотерпеновых фенолов (тимола и карвакрола), а также флавоноидов изороифолина и линарина – доминирующих и диагностически значимых компонентов растения. Для оценки качества травы *Monarda fistulosa* предложена методика количественного определения суммы флавоноидов с помощью дифференциальной спектрофотометрии при 394 нм в пересчете на изороифолин.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

Таблица 1. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве *Monarda fistulosa*
Table 1. Metrological parameters of the quantitation technique for the total flavonoids in *Monarda fistulosa*

f (число степеней свободы / number of degrees of freedom)	$\overline{X}$ (среднее значение выборки / sample average)	*S* (стандартное отклонение / standard deviate)	*P*, % (доверительная вероятность / confidence figure)	*t* (*P*, *f*) (критерий Стьюдента / Student t-test)	±*X* (доверительный интервал / credible interval)	*E*, % (относительная ошибка единичного определения / relative error single determination)
10	6.51	0.1332	95	2.23	±0.11	±4.65

Таблица 2. Содержание суммы флавоноидов в образцах травы *Monarda fistulosa*
Table 2. Content of the total flavonoids in the *Monarda fistulosa* samples

№	Происхождение образца Sample origin	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на изороифолин, % Total flavonoid content in an absolutely dry sample in isorhoifolin equivalent, %
1	Ботанический сад Самарского университета (июль 2016 г.) Samara University Botanical Garden (July 2016)	5.97 ± 0.08
2	Ботанический сад Самарского университета (июль 2017 г.) Samara University Botanical Garden (July 2017)	7.68 ± 0.12
3	Ботанический сад Самарского университета (июль 2018 г.) Samara University Botanical Garden (July 2018)	6.61 ± 0.10
4	Никитский ботанический сад, Республика Крым (июль 2018 г.) Nikitsky Botanical Garden, Crimea (July 2018)	5.96 ± 0.10

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Логвиненко Л.А., Хлыпенко Л.А., Марко Н.В. Ароматические растения семейства *Lamiaceae* для фитотерапии. *Фармация и фармакология.* 2016;4(4):34-47. https://doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-4-34-47

2. Жилякова Е.Т., Новиков О.О., Науменко Е.Н., Кузьмичева О.А., Бочарова К.А., Титарева Л.В. Исследование антимикробной и противовоспалительной активности новой лекарственной формы с маслом монарды. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2013;168(25-1):198-201.

3. Николаевский В.В. Ароматерапия: Справочник. М.: Медицина, 2000. 336 с. ISBN 5-225-04541-3

4. Мащенко З.Е. Фитохимическое исследование и стандартизация тимолсодержащих растений семейства Яснотковых: дис. … канд. фарм. наук. Пермь, 2004. 146 с.

5. Красюк Е.В., Пупыкина К.А, Анищенко И.Е. Характеристика фенольных соединений видов монарды, интродуцированных в Республике Башкортостан. *Башкирский химический журнал.* 2015;22(3):79-83.

6. Красюк Е.В., Пупыкина К.А. Качественный анализ и разработка методики количественного определения флавоноидов в видах монарды, интродуцируемых в Республике Башкортостан. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2016;11(5(65):73-77.

7. Лапина А.С., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации травы монарды дудчатой. *Фармация*. 2019;68(4):11-16. https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-02

8. Лапина А.С., Варина Н.Р., Куркин В.А., Авдеева Е.В., Рязанова Т.К., Рыжов В.М., Рузаева И.В. Монарда дудчатая как перспективный источник получения лекарственных препаратов. *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. Биология растений и садоводство: теория, инновации.* 2018;146:175-178. https://doi.org/10.25684/NBG.scbook.146.2018.28

9. Лапина А.С., Куркин В.А. Исследование химического состава травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.), культивируемой в Самарской области. Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «Современные достижения фармацевтической науки и практики», Витебск, 31 октября 2019 г. С. 91-94.

10. Aksit H., Çelik S.M., Sen Ö, Erenler R., Demirtas I., Telci I., Elmastas M. Complete isolation and characterization of polar portion of *Mentha dumetorum* water extract. *Rec. Nat. Prod*. 2014;8(3):277-280.

11. Hörhammer L., Aurnhammer G., Wagner H. Linarin aus dem Kraut von *Monarda didyma*. *Phytochemistry*. 1970;9(4):899 (на нем. яз.). https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85202-4

12. Azimova S.S., Vinogradova V.I. Natural Compounds: Flavonoids. Tashkent: Springer, 2012. 661 p. ISBN 978-1-4614-0534-4

13. Hana B.-X., Chen J. Acacetin-7-rutinoside from *Buddleja lindleyana*, a new molluscicidal agent against *Oncomelania hupensis. Z. Naturforschung.* 2014;69C(5/6):186-190. https://doi.org/10.5560/znc.2013-0179

REFERENCES

1. Logvinenko L.A., Khlypenko L.A., Marko N.V. Aromatic plant of Lamiaceae family for use in phytotherapy. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacolog.* 2016;4(4):34-47 (in Russ.). https://doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-4-34-47

2. Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Naumenko E.N., Kuz'micheva O.A., Bocharova K.A., Titareva L.V. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of new formulation with Monarda oil. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya = Belgorod State University Scientific Bulletin. Ser.: Medicine. Pharmacy.* 2013; 168(25-1):198-201 (in Russ.).

3. Nikolaevskii V.V. *Aromaterapiya: Spravochnik* (Aromaterapiya). Moscow: Meditsina; 2000. 336 p. (in Russ.). ISBN 5-225-04541-3

4. Mashchenko Z.E. *Fitokhimicheskoe issledovanie i standartizatsiya timolsoderzhashchikh rastenii semeistva Yasnotkovykh* (Phytochemical study and standardization of thymol-containing plants of the *Lamiaceae* family): Ph.D. diss. Perm': 2004. 146 p. (in Russ.).

5. Krasyuk E.V., Pupykina K.A., Anischenko I.E. The characteristics of phenolic compounds of *Monarda* species introduced in the Republic Bashkortostan. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal = Bashkir Chemistry Journal.* 2015;22(3):79-83 (in Russ.).

6. Krasyuk E.V., Pupykina K.A. Qualitative analysis and development of methods of quantification of flavonoids in *Monarda* species introduced in the Republic of Bashkortostan. *Meditsinskii vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal.* 2016;11(5(65):73-77. (in Russ.).

7. Lapina A.S., Kurkin V.A. Development of approaches to standardization of *Monarda fistulosa* L. herbs. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2019;68(4):11-16 (in Russ.). https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-02

8. Lapina A.S., Varina N.R., Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Ryazanova T.K., Ryzhov V.M., Ruzaeva I.V. *Monarda fistulosa* L. as the perspective source of the obtaining of the remedies. *Sbornik nauchnykh trudov Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada. Biologiya rastenii i sadovodstvo: teoriya, innovatsii = Plant Biology and Horticulture: theory, innovation.* 2018;146:175-178 (in Russ.). https://doi.org/10.25684/NBG.scbook.146.2018.28

9. Lapina A.S., Kurkin V.A. The study of *Monarda fistulosa* L. herbs, cultivated in Samara oblast. In: *Materialy Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 60-letiyu farmatsevticheskogo fakul'teta uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskii gosudarstvennyi ordena Druzhby narodov meditsinskii universitet" "Sovremennye dostizheniya farmatsevticheskoi nauki i praktiki"* (Procc. of the International conference dedicated to the 60th anniversary of the pharmaceutical faculty of the educational institution "Vitebsk State Order of Friendship of Peoples Medical University" "Modern achievements of pharmaceutical science and practice." Vitebsk: October 31, 2019. P. 91-94. (in Russ.).

10. Aksit H., Çelik S.M., Sen Ö, Erenler R., Demirtas I., Telci I., Elmastas M. Complete isolation and characterization of polar portion of *Mentha dumetorum* water extract. *Rec. Nat. Prod.* 2014;8(3):277-280.

11. Hörhammer L., Aurnhammer G., Wagner H. Linarin aus dem Kraut von *Monarda didyma*. *Phytochemistry*. 1970;9(4):899 (in German). https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85202-4

12. Azimova S.S., Vinogradova V.I. Natural Compounds: Flavonoids. Tashkent: Springer, 2012. 661 p. ISBN 978-1-4614-0534-4

13. Hana B.-X., Chen J. Acacetin-7-rutinoside from *Buddleja lindleyana*, a new molluscicidal agent against *Oncomelania hupensis. Z. Naturforschung.* 2014;69C(5/6):186-190. https://doi.org/10.5560/znc.2013-0179

Об авторах:

Куркин Владимир Александрович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета (443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, д. 89). E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru. https://orcid.org/0000-0002-7513-9352

Цибина Анастасия Сергеевна, аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета (443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, д. 89). E-mail: nastylapochka@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-0384-5522

About the authors:

Vladimir A. Kurkin, Dr. of Sci. (Pharmaceuticals), Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Elements of Phytotherapy, Samara State Medical University (89, Chapaevskaya ul., Samara, 443099, Russia). E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru. https://orcid.org/0000-0002-7513-9352

Anastasiya S. Tsibina, Postgraduate Student, Department of Pharmacognosy with Botany and Elements of Phytotherapy, Samara State Medical University (89, Chapaevskaya ul., Samara, 443099, Russia). E-mail: nastylapochka@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-0384-5522

Поступила: 13.01.2020; получена после доработки: 29.06.2020; принята к опубликованию: 25.07.2020.
The article was submitted: January 13, 2020; approved after reviewing: June 29, 2020; accepted for publication: July 25, 2020.