

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ ЭКСТРАКЦИОНА НА ВЫХОД БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ УСПОКОИТЕЛЬНОГО СБОРА № 3

Быстрова М. Н.

*ГБОУ ВПО Тверская государственная медицинская академия, Тверь
Тверь, Россия, (170100, Тверь, ул. Советская, 4)*

Проведено сравнительное исследование влияния режимов экстракции на выход действующих веществ в препаратах успокоительного сбора № 3. Результаты исследования показали, что наибольший выход из растительного сырья основных групп биологически активных веществ обеспечивается при получении экстракционных препаратов (экстракта сухого и водно-спиртового извлечения) успокоительного сбора № 3. Установлено, что содержание флавоноидов в водно-спиртовом извлечении из сбора было в среднем в 3,3 раза ($p < 0,05$) больше, чем в растворе экстракта сухого и в среднем в 7,5 раз ($p < 0,05$) больше, чем в настое, изготовленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Содержание дубильных веществ в водно-спиртовом извлечении было в среднем в 1,2 раза ($p < 0,05$) выше, чем в растворе экстракта сухого. Свободных органических кислот больше всего было в растворе экстракта сухого и составило $1,08 \pm 0,11$ %, что в среднем в 4,2 раза ($p < 0,05$) и в 5 раз ($p < 0,05$) выше, чем в настойке и настое соответственно.

Ключевые слова: экстракт успокоительного сбора № 3 сухой, водно-спиртовое извлечение, мацерация.

A COMPARATIVE STUDY OF THE INFLUENCE OF EXTRACTION MODES ON THE FINAL CONTENTS OF BIOLOGICALLY ACTIVE INGREDIENTS OF SEDATIVE COLLECTION № 3

Bystrova M. N.

*Tver state medical academy, Tver
Tver, Russia (170100, Tver, Sovetskaya Street, 4)*

Comparative study of the influence of extraction modes on the final contents of active ingredients in preparations of sedative collection № 3 was carried out. The results of the research showed that the greatest amount of final contents from vegetative raw materials of the main groups of biologically active substances is provided while preparing extraction preparations (the extract of dry and water-alcoholic extraction) of sedative collection № 3. It is established that the contents of flavonoids in water-alcoholic extraction from collecting was on the average 3,3 times ($p < 0,05$) more than in the solution of dry extract and on the average 7,5 times ($p < 0,05$) more than in the infusion made according to the instruction on medical application. The content of tannins in water-alcoholic extraction was on the average 1,2 times ($R p < 0,05$) higher, than in the solution of dry extract. The amount of free organic acids most of all was in the solution of dry extract and made up $1,08 \pm 0,11$ % that on the average was 4,2 times ($p < 0,05$) and 5 times ($p < 0,05$) higher, than in the tincture and infusion respectively.

Keywords: extract dry sedative collection №3, water-alcoholic extract, maceration.

Введение

В настоящее время во всем мире повышается потребность населения в седативных средствах. Эти препараты используют как в лечении пациентов с различными заболеваниями, так и у здоровых людей при стрессовых ситуациях. В нашей стране традиционно популярными являются фитотерапевтические средства, в том числе препараты валерианы лекарственной, пустырника пятилопастного, мяты перечной, синюхи голубой, ландыша майского и другие. Растительные препараты отличает низкая токсичность, возможность длительного применения без существенных побочных эффектов, широкий спектр фармакологической активности, относительно низкая стоимость и простота производства.

Среди растительных препаратов имеются многокомпонентные лекарственные сборы, в том числе, успокоительный сбор №3. Сбор используют в виде водных извлечений. Эта

лекарственная форма, наряду с рядом преимуществ, обладает и существенными недостатками, связанными с приготовлением водных извлечений в соответствующем режиме, невозможностью точного дозирования, достаточно быстрой микробной контаминацией и коротким сроком годности. Она не позволяет полностью использовать весь комплекс биологически активных веществ, содержащихся в исходном растительном сырье. Технология переработки растительного сырья должна позволять максимально полно использовать весь комплекс биологически активных веществ, содержащихся в исходном растительном сырье.

Нередко лечебное действие растений связано не с одним веществом, а с их комплексом, содержащимся в растении. Во многих случаях применение биологически активного вещества в чистом виде не дает такого эффекта, который возможно получить при использовании суммарной вытяжки из всего растения, то есть при использовании биологически активного вещества в комплексе с другими элементами [2].

Следует отметить, что некоторые биологически активные вещества, называемые обычно веществами вторичного происхождения, не накапливаются в растении в большом количестве и являются промежуточными продуктами обмена веществ, образуясь в растении, тотчас же используются клеткой для различных синтетических процессов, например, органические кислоты. Часто они играют весьма важную роль в обмене веществ у растений, но некоторые из них обладают специфическим действием на организм и имеют важное лечебное значение. [2].

Весьма актуальным является внедрение в медицинскую практику максимального количества стандартизированных фитофармацевтических средств (в том числе обладающих седативным эффектом) с подтвержденным действием и дозировкой [5]. Анализ данных литературы и опыт практического применения лекарственных форм из растительного сырья свидетельствуют о том, что весьма актуальным является перевод лекарственного растительного сырья, используемого для приготовления настоев и отваров, в сухие водорастворимые экстракты как наиболее перспективную и рациональную форму [1].

Цель настоящего исследования – оценить содержание основных групп биологически активных веществ в водных и водно-спиртовых извлечениях успокоительного сбора № 3.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся успокоительный сбор № 3 (ОАО Красногорсклексредства, Россия). В соответствии с инструкцией по медицинскому применению из сбора готовят водное извлечение (настой). Из этого сбора возможно получение и других лекарственных форм, в том числе водно-спиртовых извлечений (настоек) и экстрактов.

Из сбора получали исследуемые образцы:

Образец № 1. Настой, изготовленный в соответствии с инструкцией по медицинскому применению (1:40), – 1 столовую ложку сбора помещали в эмалированную посуду, заливали 200 мл (1 стакан) кипятка, нагревали на кипящей водяной бане 15 минут, охлаждали 45 минут при комнатной температуре, процеживали и доводили объем до 200 мл кипяченой водой.

Образец № 2. Настой, изготовленный в соответствии с требованиями ГФ XI(1:10), – 10,0 г сбора помещали в инфундирку, заливали водой очищенной 100 мл, и настаивали в инфундирном аппарате в течение 15 минут, охлаждали при комнатной температуре 45 минут, процеживали через 4 слоя марли, объем полученного настоя доводили кипяченой водой до 100 мл.

Образец № 3. Экстракт сухой водорастворимый, полученный в лабораторных условиях на базе ОАО «Биохиммаш», с использованием распылительной сушилки. Экстракт сухой успокоительного сбора № 3 перед исследованием растворяли в воде очищенной.

Образец № 4. Настойка, полученная в лабораторных условиях методом перколяции, с применением в качестве экстрагента 70 % спирта этилового.

При изучении качественного состава извлечений были проведены химические фармакопейные реакции на основные группы биологически активных веществ.

Содержание флавоноидов в исследуемых образцах устанавливали цветными реакциями с магниевой стружкой в присутствии кислоты хлористоводородной концентрированной (цианидиновая проба) и с раствором хлорида окисного железа, а также осадочными реакциями с 2 % раствором ацетата свинца и реактивом Фелинга [3].

Дубильные вещества определяли реакциями с раствором железоаммониевых квасцов, с 1 % раствором желатины; полисахариды доказывали реакцией с 95 % этиловым спиртом; наличие сапонинов определяли по реакции пенообразования: в одну пробирку приливали 5 мл 0,1 н. кислоты хлористоводородной, в другую – 5 мл 0,1 н. натрия гидроксида. Затем в обе пробирки добавляли 2–3 капли извлечения и сильно встряхивали. Результат оценивали по стойкости и объему образующейся пены.

Количественное определение биологически активных веществ в полученных извлечениях проводили химическими (титриметрическими, гравиметрическими) методами и спектрофотометрическим методом.

Содержание свободных органических кислот определяли согласно модифицированной методике ГФ XI: 10 мл извлечения (водного, спиртового) помещали в колбу на 500 мл, прибавляли 300 мл воды очищенной, 1 мл 1% спиртового раствора фенолфталеина, 2 мл 0,1 % метиленового синего и титровали 0,1 моль/л натрия гидроксидом до появления в пене лилово-красной окраски [3].

Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в процентах вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{V \cdot 0,0067 \cdot 100\% \cdot K}{10} \quad (1)$$

где, 0,0067 – количество свободных органических кислот в пересчете на яблочную, соответствующее 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), в граммах,

V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах,

K – поправка на титрант.

Для анализа сухого экстракта точную навеску массой 0,5 г растворяли в 50 мл горячей воды, после охлаждения проводили анализ по приведенной выше методике.

Дубильные вещества количественно определяли по методике ГФ XI в модификации: 25 мл извлечения (водного, спиртового) помещали в колбу вместимостью 1 литр, прибавляли 750 мл воды очищенной, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании 0,1 моль/л раствором калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания [3].

Содержание дубильных веществ, в пересчете на танин, вычисляли по формуле (2):

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,004157 \cdot 100\% \cdot K}{25} \quad (2)$$

где, 0,004157 – количество дубильных веществ, в пересчете на танин, соответствующее 1 мл раствора перманганата калия (0,1 моль/л), в граммах,

V₁ – объем раствора перманганата калия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах,

V₂ – объем раствора перманганата калия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах,

K – поправка на титрант.

Для анализа сухого экстракта точную навеску массой 0,5 г растворяли в 50 мл горячей воды, после охлаждения проводили анализ по приведенной выше методике.

Количественный анализ флавоноидов в водных, спиртовых извлечениях успокоительного сбора № 3 и сухом экстракте водорастворимом проводили методом, основанным на спектрофотометрировании комплексов флавоноидов с ионами металлов. Регистрацию УФ

спектров проводили с помощью спектрофотометра «СФ-56». Количественное содержание флавоноидов в исследуемых образцах определяли в пересчете на рутин [3].

При проведении исследования использовали методику, согласно которой 5 мл препарата помещали в мерную колбу емкостью 25 мл, доводили спиртом 70 % до метки и перемешивали (раствор А). 5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу емкостью 25 мл, прибавляли 5 мл 2 % раствора хлорида алюминия, 0,1 мл уксусной кислоты ледяной, доводили объем раствора спиртом 95 % до метки и перемешивали. Через 30 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 412 нм в кювете с толщиной оптического слоя 1 см.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 5 мл раствора А, 0,1 мл кислоты уксусной ледяной, доведенный спиртом 95 % до метки в мерной колбе емкостью 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора, состоящего из 1 мл 0,05 % раствора рутина, 5 мл раствора алюминия хлорида, 0,1 мл кислоты уксусной ледяной и доведенного спиртом 95 % до метки в мерной колбе емкостью 25 мл.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл 0,05 % раствора РСО рутина и 0,1 мл кислоты уксусной, доведенный до метки в мерной колбе емкостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычисляли по формуле (3):

$$X = \frac{D \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{D_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 5} = \frac{D \cdot a}{D_0} \quad (3)$$

где, D – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 412 нм,

D₀ – оптическая плотность раствора сравнения,

a – объем раствора, взятого на анализ, мл.

Для анализа сухого экстракта использовали аналогичную методику, образец предварительно растворяли в воде очищенной.

Результаты исследования были обработаны статистически с применением стандартного пакета программ «MsExcel' 2003».

Результаты и их обсуждение

Анализ результатов химического исследования показал, что во всех лекарственных формах успокоительного сбора № 3 присутствовали дубильные вещества, полисахариды, флавоноиды, сапонины. Так, было обнаружено, что как водные, так и водно-спиртовые извлечения из сбора давали положительную цианидиновую пробу, образующиеся оксониевые соединения имеют окраску от оранжевого до красно-фиолетового цвета; при взаимодействии флавоноидов с раствором хлорида окисного железа флавонолы (рутин, кверцетин) образуют комплексы, окрашенные в зеленый цвет. При испытании водных и водно-спиртовых извлечений из сбора получено зеленое окрашивание.

Появление черно-синего окрашивания в реакции с раствором железоаммониевых квасцов и помутнение раствора от добавления 1 % раствора желатины во всех извлечениях свидетельствует о наличии дубильных веществ. На содержание полисахаридов указывает появление белого студенистого осадка в реакции с 95 % этиловым спиртом. При проведении реакции пенообразования установлено, что в щелочной среде образуется пена по стойкости и объему в несколько раз больше, чем в кислой среде, что свидетельствует о присутствии стероидных сапонинов.

Следует отметить, что количественное содержание биологически активных веществ в лекарственных формах успокоительного сбора № 3 отличалось (таблица 1).

Таблица 1. Содержание биологически активных веществ в различных лекарственных формах успокоительного сбора № 3

	Лекарственная форма успокоительного сбора № 3	Содержание действующих веществ, %		
		Флавоноиды	Дубильные вещества	Полисахариды

				ОТЫ
	ой 1:40 (по рукции)	008±0,0001	±,01 ^{#*}	±0,02
	ой 1:10 (по ГФ XI)	018±0,0002	±0,02*	±0,02
	ный раствор экстракта го	018±0,0002	±0,03 [#]	±0,11 ^{*#}
	но-спиртовое ечение	0,06±0,002	±0,03 [#]	±0,03

Примечание: * – различия содержания действующих веществ в препаратах сбора с содержанием действующих веществ в настойке достоверны ($p < 0,05$);

[#] – различия содержания действующих веществ в препаратах сбора с содержанием действующих веществ в настое (изготовленном по ГФ) достоверны ($p < 0,05$).

Установлено, что в водно-спиртовом извлечении из сбора (настойке) содержание флавоноидов составило $0,06 \pm 0,002$, что в среднем в 3,3 раза ($p < 0,05$) больше, чем в водном растворе экстракта сухого и настое, изготовленном по требованиям ГФ. Однако в наименьшем количестве флавоноиды содержались в настое седативного сбора, а именно $0,008 \pm 0,0001$, что в среднем в 7,5 раз ($p < 0,05$) меньше, чем в настойке и в 2,3 раза ($p < 0,05$) меньше, чем в растворе экстракта сухого и настое сбора 1:10.

Максимальное содержание дубильных веществ отмечалось в водно-спиртовом извлечении и в водном растворе экстракта сухого исследуемого сбора, наименьшее – в настое, приготовленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Следует отметить, что содержание дубильных веществ в настое, изготовленном в соответствии с требованиями ГФ, было в среднем в 2,5 раза ($p < 0,05$) выше, чем в настое, изготовленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению.

Таким образом, на содержание флавоноидов дубильных веществ оказал влияние характер экстрагента и режим экстракции: наибольшее количество извлекается органическими растворителями и путем выщелачивания горячей водой по принципу противотока [4]. Наименьшая насыщенность флавоноидами настоя объясняется их физико-химическими свойствами, агликаны флавоноидов растворимы в спирте и практически не растворимы в воде.

Свободных органических кислот по результатам анализа больше всего было в водном растворе экстракта сухого. В водно-спиртовом извлечении из сбора содержание свободных органических кислот было в среднем в 4,2 раза ($p < 0,05$) меньше, чем в водном растворе экстракта сухого. В наименьшем количестве органические кислоты содержались в настое успокоительного сбора. Причем различий в содержании этих веществ в настое, изготовленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению, и в настое, изготовленном в соответствии с требованиями ГФ, обнаружено не было.

Установлено, что наибольший выход из растительного сырья свободных органических кислот обеспечивается при получении экстракта сухого: экстрагированием трехкратно методом мацерации водой очищенной при температуре $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Результаты проведенного экспериментального исследования показали, что наиболее полное извлечение биологически активных веществ из успокоительного сбора № 3 обеспечивается при получении экстракта сухого водорастворимого и водно-спиртового извлечения (настойки).

Основными факторами, влияющими на скорость и полноту экстракции биологически активных веществ из растительного сырья, являются тип экстрагента, температура, измельченность сырья и продолжительность экстракции.

Учитывая фармакологическую неиндифферентность спирта этилового как экстрагента при получении настоек, водорастворимая форма экстракта сухого имеет рядом преимуществ и в сравнении с настоем позволяет получить лекарственную форму, обеспечивающую точное дозирование БАВ.

Выводы

1. Качественными химическими реакциями установлено содержание основных биологически активных веществ в водных и водно-спиртовых вытяжках из успокоительного сбора № 3.
2. В водно-спиртовом извлечении сбора флавоноидов содержится в среднем в 3,3 раза ($p < 0,05$) больше чем в растворе экстракта сухого и в среднем в 7,5 раз ($p < 0,05$) больше, чем в настое, изготовленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению.
3. Содержание дубильных веществ в растворе экстракта сухого седативного сбора № 3 было в 1,6 раз ($p < 0,05$) выше, чем в настое, изготовленном в соответствии с требованиями ГФ и в 4 раза ($p < 0,05$) выше, чем в настое, изготовленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению.
4. Содержание свободных органических кислот в растворе экстракта сухого седативного сбора № 3 в среднем в 4,2 раза ($p < 0,05$) и в 5 раз ($p < 0,05$) выше, чем в настойке и настое соответственно.

Список литературы

1. Быстрова М. Н. Разработка технологии получения экстракта сухого седативного сбора № 3 / М. Н. Быстрова, М. А. Демидова, Г. А. Панина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр./ Пятигорская гос. фармацевт. акад. – Пятигорск. – 2010. – Вып. 65. – С. 221-223.
2. Вещества, содержащиеся в лечебных травах [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.lsosl.ru/lechebnye-travy.htm>.
3. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989.
4. Чуешов В. И. Промышленная технология лекарств / В. И. Чуешов. – Харьков: НФАУ, 2002. – Т. 2. – 295 с.
5. Bok H. E. Phitotherapeutische Welt. – Frankfurt am Main: Pmi-pharm. MedicalinformVerlags-GmbH 1981. – S. 6-22.

Рецензенты:

Демидова Марина Александровна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой управления и экономики фармации Тверской государственной медицинской академии, г. Тверь.

Зубарева Галина Мефодьевна, д.б.н., профессор, заведующая кафедрой химии и биохимии Тверской государственной медицинской академии, г. Тверь.