

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ВЭЖХ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЦВЕТКОВ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*TANACETUM VULGARE* L.)

Куркина А.В.¹, Калабухова Е.А.², Власова Г.И.², Демидова Г.А.², Авдеева Е.В.¹

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия (443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89), e-mail: kurkina-av@yandex.ru

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», Самара, Россия (443070, г. Самара, ул. Партизанская, 33), e-mail: sert@obp.ru

В настоящей работе обсуждаются результаты исследований цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.; семейство Астровые - *Astraceae*) по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья данного растения. Разработаны новые подходы к стандартизации цветков пижмы обыкновенной, заключающиеся в комплексном использовании спектрофотометрии, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определено, что доминирующим флавоноидом цветков пижмы обыкновенной является тилианин. С учетом специфичности тилианина для цветков пижмы обыкновенной является целесообразным использование методов ТСХ и ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение. Метод ВЭЖХ целесообразно использовать как для качественного анализа цветков пижмы обыкновенной, так и для количественного определения тилианина в сырье и препаратах данного растения.

Ключевые слова: пижма обыкновенная, *Tanacetum vulgare* L., цветки, флавоноиды, тилианин, стандартизация, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, высокоэффективная хроматография.

THE NEW APPROACHES TO THE STANDARDIZATION OF TANSY FLOWERS (*TANACETUM VULGARE* L.)

¹Kurkina A.V., ²Kalabukhova E.A., ²Vlasova G.I., ²Demidova G.A., ¹Avdeeva E.V.

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: kurkina-av@yandex.ru

²Samara Centre of Certification of Pharmaceuticals, Samara, e-mail: sert@obp.ru

In the present paper are discussed the results of the investigations of tansy flowers (*Tanacetum vulgare* L., family *Asteraceae*) on the substantiation of pathways to the standardization of this plant. There were substantiated the pathways to the standardization of *Tanacetum vulgare* L. flowers, which are caused in the combined using of spectrophotometry, thin layer chromatography (TLC) and high liquid performance chromatography (HPLC). It was shown, that the predominant flavonoid for *Tanacetum vulgare* L. flowers is tilianin. Taking into account the specificity of tilianin for the *Tanacetum vulgare* flowers, is it appropriate to use the methods of TLC and HPLC for determining the authenticity of raw materials and phytopharmaceuticals by means of detection of the this flavonoid, which has diagnostic value. It is appropriate HPLC to use for qualitative analysis of *Tanacetum vulgare* flowers, and for the quantitative determination of tilianin in raw materials and phytopharmaceuticals of this plant.

Keywords: Tansy, *Tanacetum vulgare* L., flowers, flavonoids, tilianin, standardization, spectrophotometry, thin layer chromatography, high liquid performance chromatography.

Введение

Одной из актуальных задач современной фармации является проведение исследований по совершенствованию стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) [2-6]. Это объясняется, с одной стороны, сложным химическим составом ЛРС, а с другой - в некоторых случаях недостаточной степенью изученности его химического состава. Одним из представителей видов ЛРС, в случае которых вопросы стандартизации решены не в полной мере, являются цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.).

В соответствии с Государственной Фармакопеей СССР XI издания (ст. 11) количественное определение суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот осуществляют методом прямой спектрофотометрии буферного раствора упаренного спиртового извлечения цветков пижмы обыкновенной при длине волны 310 нм [1]. Обсуждаемая методика количественного определения достаточно длительна, трудоемка и требует работы с токсичным растворителем (дихлорэтан), а выбранная аналитическая длина волны не соответствует спектральным характеристикам анализируемых веществ. Кроме того, в данной фармакопейной статье отсутствует раздел «Качественные реакции», что не соответствует современным тенденциям в области фармацевтического анализа лекарственного растительного сырья.

На наш взгляд, несмотря на сложный химический состав цветков пижмы обыкновенной, представленный такими группами биологически активных соединений (БАС), как эфирное масло, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, стандартизацию сырья данного растения целесообразно осуществлять по флавоноидам. Именно флавоноиды в первую очередь обуславливают желчегонные и гепатопротекторные свойства препаратов пижмы обыкновенной [3; 7]. По разным литературным источникам [5; 7], флавоноиды цветков пижмы обыкновенной в основном представлены апигенином (5,7,4¹-тригидроксифлавоноид), лютеолином (5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавоноид), цинарозидом (7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавонона), эупатилином (5,7-дигидрокси-6,3¹,4¹-триметоксифлавоноид), яцеидином (5,7,4¹-тригидрокси-3,6,3¹-триметоксифлавоноид), яцеозидином (5,7,4¹-тригидрокси-6,3¹-диметоксифлавоноид).

С целью обоснования методик качественного и количественного анализа сырья и препаратов пижмы обыкновенной из цветков данного растения с использованием колоночной хроматографии ранее нами были выделены апигенин (5,7,4¹-тригидроксифлавоноид) (1), акацетин (5,7-дигидрокси-4¹-метоксифлавоноид) (2), 7-О-β-D-глюкопиранозид апигенина (космосин) (3) и тилианин (7-О-β-D-глюкопиранозид акацетина) (4) [4].

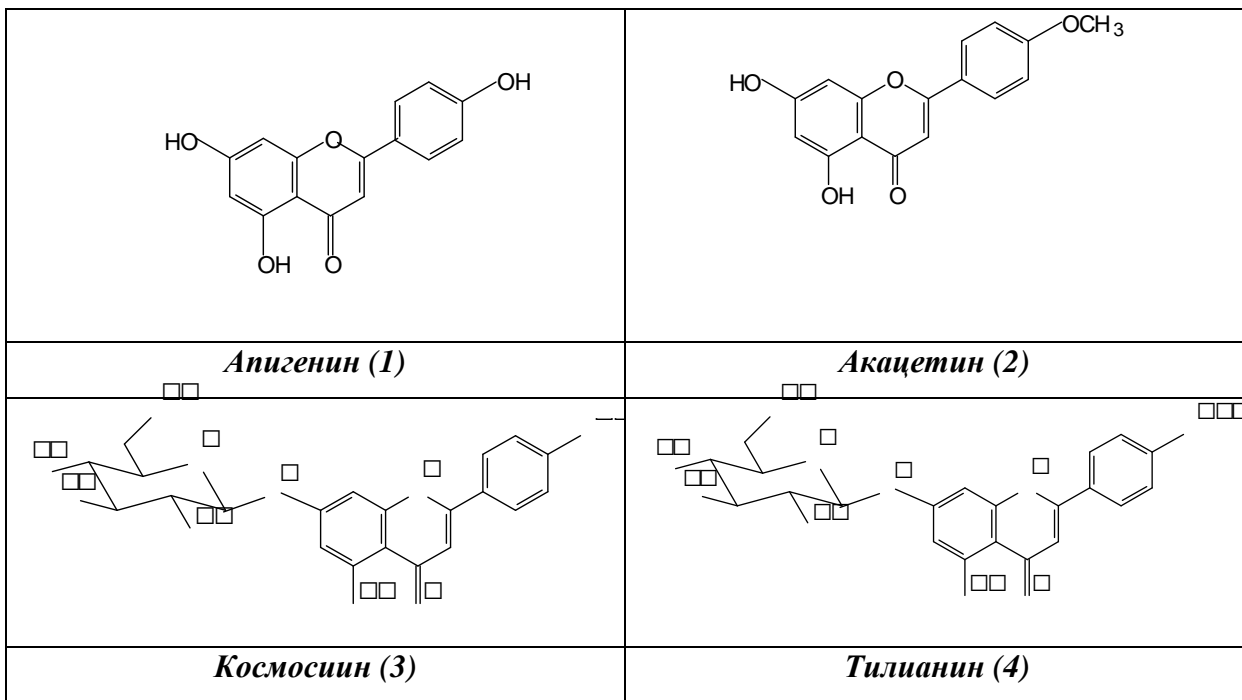


Рис. 1. Химические структуры важнейших флавоноидов цветков пижмы обыкновенной.

На основе результатов изучения компонентного состава флавоноидов цветков пижмы обыкновенной разработана методика количественного определения суммы флавоноидов с использованием дифференциальной спектрофотометрии и Государственного стандартного образца цинарозида [3]. В плане дальнейшего совершенствования методов стандартизации ЛРС, в том числе цветков пижмы обыкновенной, особый интерес представляют такие методы, как тонкослойная хроматография (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [2; 5; 8; 9].

Цель исследования – научное обоснование новых подходов к стандартизации цветков пижмы обыкновенной.

Материал и методы исследования

В качестве объектов исследования взяты образцы цветков пижмы обыкновенной, собранные в Самарской области (июль 2011 и 2012 гг.), а также промышленные образцы сырья ОАО «Красногорсклексредства» – сырье измельченное (пачки, 50 г).

В работе использованы тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и спектрофотометрия. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра Specord 40 (Analytik Jena). Воздушно-сухое растительное сырье подвергали исчерпывающему экстрагированию 70%-ным этиловым спиртом в соотношении «сырье – экстрагент» - 1:50. Анализ полученных водно-спиртовых извлечений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе хлороформ-этанол-

вода (26:16:3). При этом в качестве стандартных веществ использовали апигенин (1), акацетин (2), космосиин (3) и тилианин (4).

Исследование водно-спиртовых извлечений из цветков пижмы обыкновенной с помощью ВЭЖХ осуществляли с использованием хроматографа «Стайер» (ООО «НПО Аквилон», г. Подольск) и колонки размером 4,6 x 250 мм (стационарная фаза - октадецил силан С-18), объем вводимой пробы – 25 мкл. В качестве подвижной фазы использовали смеси «ацетонитрил-вода» в соотношении (40:60). Скорость подачи элюента составила 2 мл/мин. Детектирование веществ осуществляли УФ-детектором при длине волны 270 нм. В качестве подвижной фазы использовали смеси «ацетонитрил-вода» в соотношении 40:60. Скорость подачи элюента составила 2 мл/мин. Детектирование веществ осуществляли УФ-детектором при длине волны 270 нм. Качественный анализ проводили посредством регистрации времен удерживания веществ и сравнения спектральных отношений, причем как в условиях метода внутреннего стандарта, так и путем введения растворов индивидуальных веществ в хроматографическую колонку. Количественный анализ осуществляли с использованием стандартного образца тилианина (4), выделенного нами ранее из цветков пижмы обыкновенной методом колоночной хроматографии [4]. Приготовление раствора стандартного образца тилианина осуществляли следующим образом: около 0,02 г (точная навеска) тилианина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15-20 мл 96%-ного этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 95%-ным этиловым спиртом до метки.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты ТСХ-анализа свидетельствуют о том, что доминирующим флавоноидом цветков пижмы обыкновенной является тилианин (3) (рис. 2). Кроме того, обнаруживаются такие флавоноиды, как апигенин (1), акацетин (2) и космосиин (3). Наряду с флавоноидами на хроматограмме извлечения обнаруживаются еще два компонента (рис. 2) – соединение с величиной R_f около 0,8, соединение с величиной R_f около 0,15, полученные методом препаративной ТСХ и, по предварительным данным, отнесенные нами к фенилпропаноидам по характеру флуоресценции и характерным максимумам поглощения в УФ-спектре. При этом следует отметить, что соединение с величиной R_f около 0,15, являясь по характеру кривой поглощения производным кофейной кислоты, в значительной мере определяет кривую поглощения раствора водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной (рис. 3). Что касается доминирующего флавоноида – тилианина, то и это соединение, имея максимумы поглощения при 270 и 327 нм, также вносит вклад в оптическую плотность, особенно с точки зрения определения суммы флавоноидов с

использованием разработанной нами методики количественного определения суммы флавоноидов [6].

Учитывая то обстоятельство, что доминирующий флавоноид тилианин (4) имеет диагностическое значение, на наш взгляд, ТСХ-анализ может быть использован для целей идентификации сырья и препаратов данного растения. Кроме того, для определения подлинности цветков пижмы обыкновенной могут также быть использованы спектральные характеристики водно-спиртового извлечения из сырья данного растения.

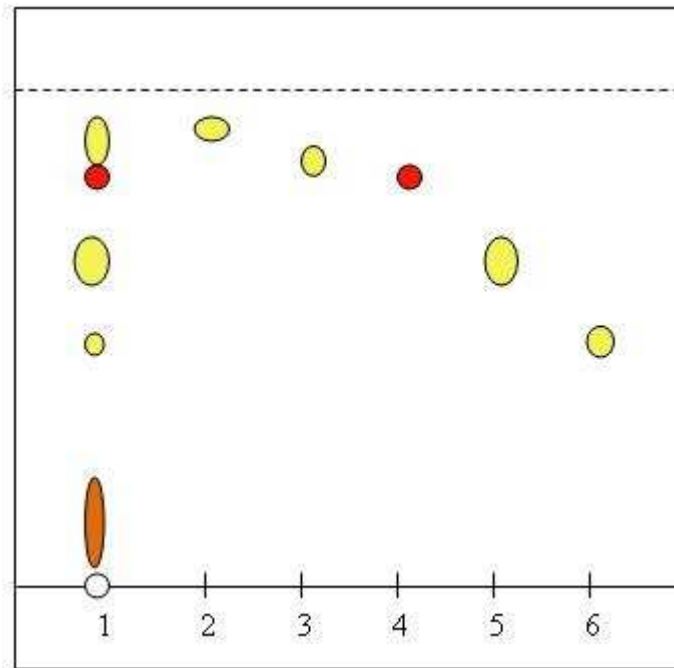


Рис. 2. Схема тонкослойной хроматограммы веществ и водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной (система растворителей: хлороформ – этанол – вода, 26:16:3).

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из сырья;

2 – акацетин (2);

3 – апигенин (1);

4 – соединение фенилпропаноидной природы;

5 – тилианин (4);

6 – космосин (3).

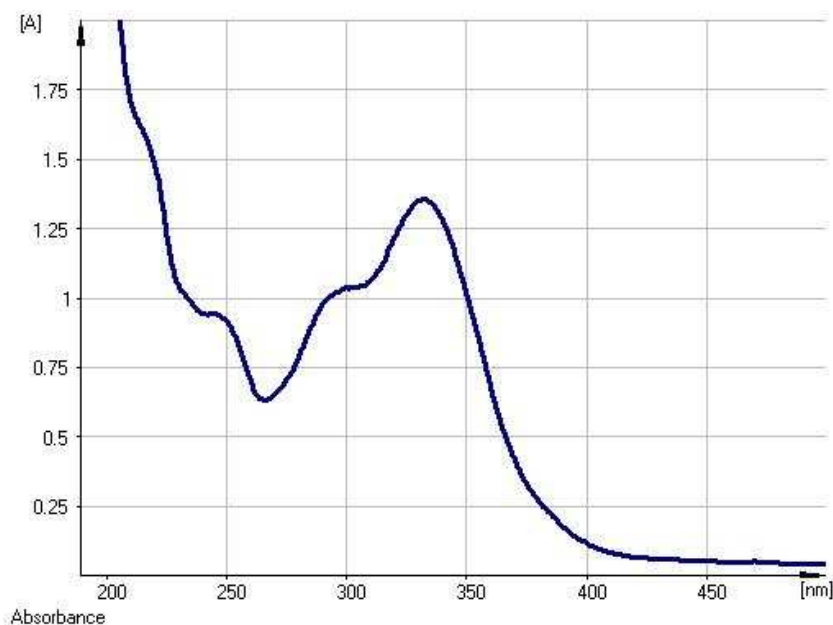


Рис. 3. Электронный спектр водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной.

В последнее время для целей стандартизации активно внедряется метод ВЭЖХ, позволяющий одновременно осуществлять качественный и количественный анализ ЛРС. На наш взгляд, в условиях ВЭЖХ в качестве маркера может выступать доминирующий флавоноид тилианин (4). ВЭЖХ-анализ показал, что тилианин, имея время удерживания на хроматограммах около 5 мин (рис. 4 и 5), четко отделяется от других компонентов, что позволяет данный метод рекомендовать как для целей идентификации цветков пижмы обыкновенной, так и для количественной оценки содержания данного диагностического компонента.

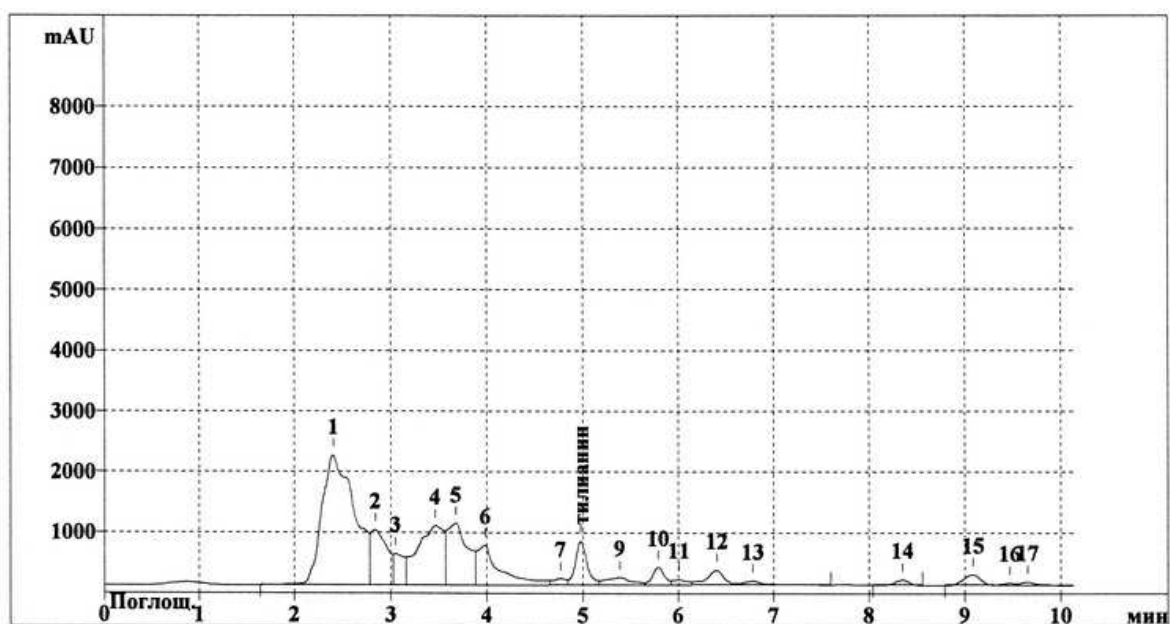


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной.

Результаты ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что в исследуемых условиях хроматографирования тилианин (4) с величиной времени удерживания около 5 мин хорошо отделяется от других компонентов цветков пижмы обыкновенной (рис. 4 и 5).

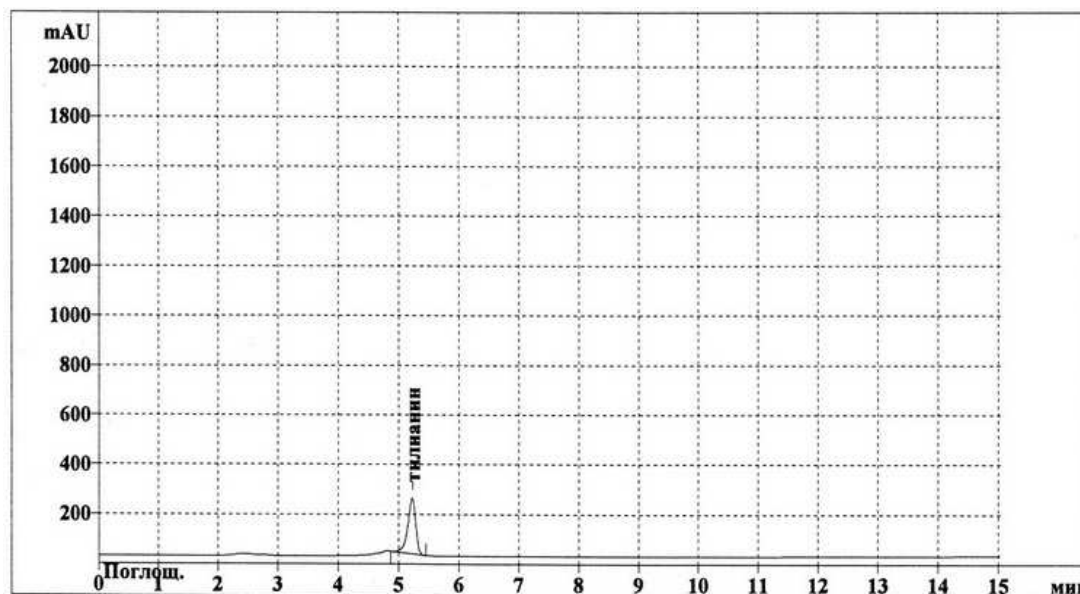


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограмма спиртового раствора тилианина.

Содержание тилианина в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_0 \times V \times V_1 \times 100 \times 100}{S_0 \times m \times V_0 \times V_2 \times (100-W)},$$

где S – среднее значение высоты пика тилианина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца, mAU*сек;

S_0 - среднее значение высоты пика раствора СО тилианина, вычисленное из хроматограмм раствора СО тилианина, mAU*сек;

V - объем испытуемого раствора, мл;

V_1 - объем вводимой пробы испытуемого раствора, мкл;

V_0 – объем раствора СО тилианина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора СО тилианина, мкл;

m - масса навески сырья, г;

m_0 - масса СО тилианина, г;

С применением разработанной методики проанализирован ряд образцов сырья и показано, что содержание тилианина в цветках пижмы обыкновенной варьирует в пределах от 1,08 до 4,41%.

На наш взгляд, разработанный подход к стандартизации с использованием ВЭЖХ перспективен для анализа лекарственного препарата «Танацехол» на основе флавоноидов цветков пижмы.

Выводы

1. Разработаны новые подходы к стандартизации цветков пижмы обыкновенной, заключающиеся в комплексном использовании спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.
2. С учетом специфичности тилианина для цветков пижмы обыкновенной является целесообразным использование методов ТСХ и ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение.
2. Метод ВЭЖХ целесообразно использовать как для качественного анализа цветков пижмы обыкновенной, так и для количественного определения тилианина в сырье и препаратах данного растения.

Список литературы

1. Государственная Фармакопея СССР. - Одиннадцатое издание. Вып. 2. - М. : Медицина, 1990. - 400 с.
2. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. – Новосибирск : Гео, 2007. – 232 с.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). - 2-е изд., перераб. и доп. - Самара : ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. - 1239 с.
4. Куркина А.В. Исследование флавоноидного состава цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) // Химия растительного сырья. – 2011. - № 4. – С. 209-212.
5. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений : монография. – Самара : ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. - 290 с.
6. Куркина А.В., Хусаинова А.И. Методика определения суммы флавоноидов в цветках пижмы // Фармация. - 2010. - Т. 58, № 3. - С. 21-24.
7. Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство *Asteraceae* (*Compositae*). - СПб. : Наука, 1993. - 352 с.
8. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications / Edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. - Boca Raton; London; New York : CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. – 1197 p.

9. Wagner H., Bladt S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin-Heidelberg-New York : Springer Verlag, 1996. – 348 p.

Рецензенты:

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Правдивцева Ольга Евгеньевна, доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.