

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Овчинникова С.Я.¹, Мезенова Т.Д.¹, Орловская Т.В.²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (353532, Ставропольский край, Пятигорск, Калинина, 11), e-mail: ovchinnikova@yandex.ru

²Северо-кавказский федеральный университет, Пятигорск, Россия, e-mail: tvorlovskaya@mail.ru

Разработана и валидирована методика идентификации и количественного определения хлорогеновой кислоты в корневищах и корнях любистка лекарственного (*Levisticum officinale* Koch.) методом ТСХ с видеоденситометрической регистрацией аналитического сигнала. Цифровую обработку хроматограмм осуществляли с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар). Извлечение получали методом реперколяции этиловым спиртом 70%. Для хроматографирования использовали пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-П-В-УФ (г.Краснодар), подвижная фаза: n-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (5:4:1). Детектирующий реагент – пары аммиака. Хлорогеновая кислота проявляется в виде пятен тёмно-коричневого цвета с R_f $0,54 \pm 0,02$. Предел обнаружения 0,5 мкг/мкл. Установлены параметры линейности, правильности и сходимости разработанной методики. Методика определения хлорогеновой кислоты специфична, имеет достаточно высокую чувствительность и эффективность.

Ключевые слова: хлорогеновая кислота, любисток лекарственный, корневища и корни, ТСХ, идентификация, количественное определение, валидация.

DETERMINATION METHOD CHLOROGENIC ACID PLANAR CHROMATOGRAPHY

Ovchinnikova S.Y.¹, Mezenova T.D.¹, Orlovskaya T.V.²

¹Pyatigorsk branch GBOU VPO «Volgograd State Medical University», Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia (353532, Stavropol, Pyatigorsk, Kalinina, 11), e-mail: ovchinnikova@yandex.ru

²The North Caucasus Federal University, Pyatigorsk, Russia, e-mail: tvorlovskaya@mail.ru

Developed and validated method of identification and quantitative determination of chlorogenic acid in the rhizomes and roots of Lovage (*Levisticum officinale* Koch.) TLC videodensitometric registration with the analytical signal. Digital processing of the chromatograms was performed using the computer program «video densitometry Sorbfil» (Krasnodar). Extract re-percolation yeild 70% ethyl alcohol. Chromatography was used for the stamp plate «Sorbfil» PTLC -P -V- UV (Krasnodar), mobile phase: n- butanol - glacial acetic acid - water (5:4:1). Detection reagent - ammonia vapors. Chlorogenic acid is manifested in the form of spots of dark brown color with R_f $0,54 \pm 0,02$. Detection limit of 0.5 μ g / ml. The parameters of linearity, accuracy and convergence of the developed technique. Methods of determining specific chlorogenic acid, has a high sensitivity and efficiency.

Keywords: chlorogenic acid, *Levisticum officinale*, rhizomes and roots, TLC, identification, quantification, validation.

Введение. Хлорогеновая кислота обладает широким спектром биологической активности. Доказано ее действие в качестве антибактериального, противовирусного, противовоспалительного, гепатопротекторного, антимуtagenного, гипотензивного биологически активного вещества. Установлены ее пребиотические свойства [4, 5]. Хлорогеновая кислота и ее производные, оказывают более сильный антиоксидантный эффект, чем аскорбиновая кислота, кофейная кислота и токоферол (витамин E), может эффективно удалить ДФПГ радикал, гидроксильный радикал и супероксид анион радикалы, подавлять липопротеины низкой плотности окисления [2].

В ходе фитохимического изучения методом ВЭЖХ было установлено наличие хлорогеновой кислоты в корневищах и корнях любистка лекарственного (*Levisticum officinale Koch.*) семейства сельдерейных (*Apiaceae*).

Согласно требованиям, предъявляемым к современным методам стандартизации ЛРС необходимо разрабатывать показатели норм качества в зависимости от пути его использования при производстве лекарственных средств [3]. Исходя из первичного аналитического скрининга, фенолкарбоновые кислоты являются доминирующими и на их долю приходится основной вклад ожидаемого фармакологического эффекта, поэтому и разрабатывали методики их качественного и количественного определения.

Цель работы. Разработка методики идентификации и количественного определения хлорогеновой кислоты в корнях и корневищах любистка лекарственного.

Материал и методика. Сырьём для анализа являлись высушенные корневища и корни, заготовленные от растений культивируемых в условиях Кавказских Минеральных Вод в период 2010-2011 гг. В качестве экстрагента использовали 70% спирт этиловый в соотношении 1:2. Извлечение получали методом реперколяции (повторная или многократная перколяция). Сущность метода заключалась в том, что сырье делили на части и каждую последующую его порцию экстрагировали вытяжкой, полученной из предыдущей.

Для приготовления стандартного образца (СО) 0,1 г хлорогеновой кислоты (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в этиловом спирте 95% и доводили спиртом раствор до метки. Концентрация СО хлорогеновой кислоты составила 1,0 мкг/мкл.

Для идентификации и количественного определения использовали метод ТСХ с последующей денситометрической обработкой хроматограмм. Хроматографирование проводили на пластинках марки «*Sorbfil*» (г. Краснодар) размером 10x15 см. В качестве подвижной фазы использовали систему n-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (5:4:1). Высота подъема растворителя 9 см. Детектирование проводили парами аммиака.

На линию старта хроматографической пластинки длиной 15 см наносили 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мкл раствора СО с содержанием хлорогеновой кислоты 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мкг соответственно. На этой же пластинке обозначали четыре линии контрольных треков, на которые наносили спиртовое извлечение объемом 20 мкл. Пробы наносили при помощи микрошприца МШ-10 (агат). Пластинки помещали в камеру для хроматографирования объемом 2000 см³, насыщенную парами растворителя. После подъема растворителя на необходимый уровень пластинки вынимали, высушивали в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления паров растворителя. Через 10-15 минут на воздухе появляются

пятна тёмно-коричневого цвета. Для усиления окраски пластинку держали над парами аммиака концентрированного.

Далее пластинки сканировали при помощи планшетного сканера «HP Scanjet 3670» (разрешение 100 dpi) и осуществляли их цифровую обработку с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр *Sorbfil v1.7*» (г. Краснодар). Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки (внешнего стандарта), по градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика» (линейная аппроксимация).

Результаты и их обсуждение. *Определение хроматографических характеристик.* Для выбора наиболее эффективных пластинок исследовали пластинки следующих марок: ПТСХ-П-В-УФ, ПТСХ-П-А-УФ и ПТСХ-АФ-В-УФ (г. Краснодар). Эффективность пластинок определяли по числу теоретических тарелок (NTR) и асимметрии (As) пятен стандартных образцов.

Таблица 1 – Показатели эффективности различных типов пластинок

Тип пластики	NTR	As
ПТСХ-П-В-УФ	1308±250	0,67±0,09
ПТСХ-П-А-УФ	694±185	0,48±0,03
ПТСХ-АФ-В-УФ	604±121	0,39±0,03

Наиболее эффективными являются пластинки марки ПТСХ-П-В-УФ, которые были выбраны нами для определения хлорогеновой кислоты в спиртовом извлечении (табл. 1).

Чувствительность детектирующего реагента устанавливали по величине предела обнаружения (ПО), нанося точно известное количество СО хлорогеновой кислоты на хроматографическую пластинку. Готовили растворы стандартного образца с концентрациями 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 и далее – до 3-х мкг/мкл. На пластинку наносили по 1 мкл приготовленных растворов и хроматографировали. ПО составляет 0,5 мкг/мкл.

Специфичность определяли по величине R_f пятна контрольного трека, которое должно соответствовать R_f пятен стандартного образца (0,56±0,02). На треках контрольного образца визуально обнаруживалось пятно тёмно-коричневого цвета с R_f 0,54, что соответствует окраске и R_f стандартных образцов (рис 1).

Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [1].

Валидация методики количественного анализа проведена по следующим критериям: линейность, правильность и сходимость результатов.

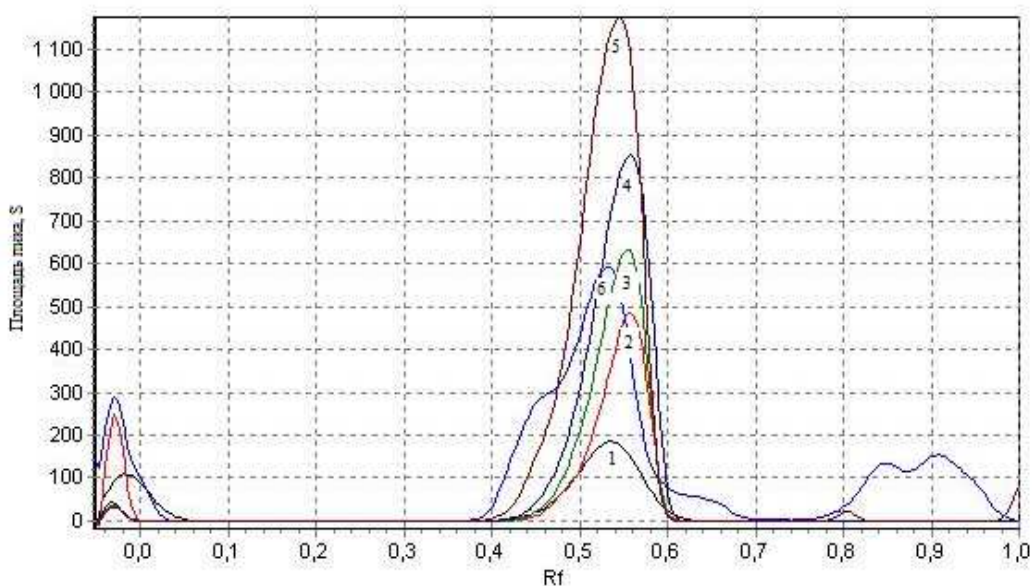


Рисунок 1 – Оцифрованная хроматограмма СО хлорогеновой кислоты и спиртового извлечения:

1 – 1 мкг/мкл; 2 – 1,5 мкг/мкл; 3 – 2 мкг/мкл; 4 – 2,5 мкг/мкл; 5 – 3 мкг/мкл;
6 – спиртовое извлечение

Линейность устанавливали по градуировочным графикам, полученным при компьютерной обработке хроматограмм в координатах площадь пика (S) – масса (m, мкг). Диапазон концентраций хлорогеновой кислоты 1,0-3,0 мкг/мкл. По данным градуировочных графиков рассчитывали статистические характеристики и коэффициент корреляции. Методом наименьших квадратов определяли значимость свободного члена линейной зависимости (a), углового коэффициента (b). Расчеты проводили с помощью программы *Microsoft Excel*. Градуировочный график по данным одной из пластин описывается уравнением $y = (10,7x - 7,3)10^3$, коэффициент корреляции $r = 0,984$ (рис. 2).

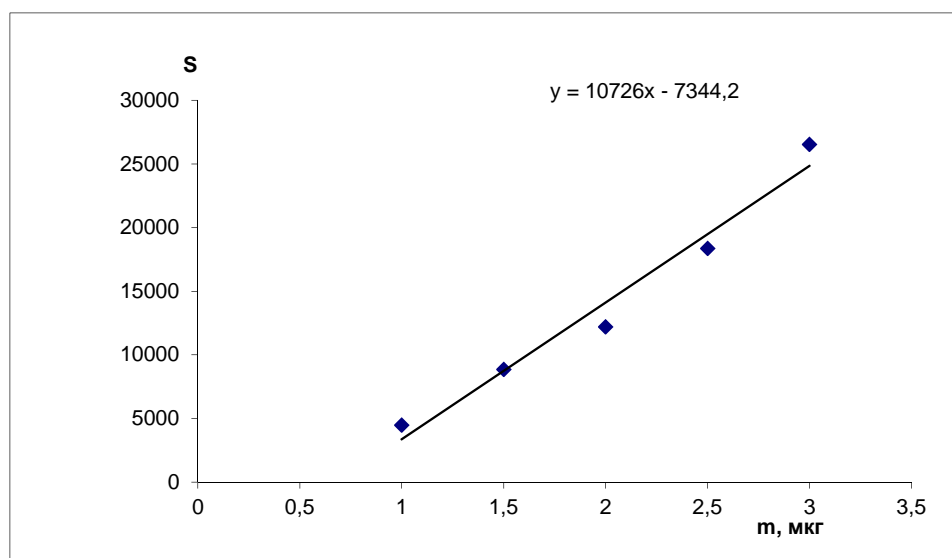


Рисунок 2 – Градуировочный график хлорогеновой кислоты

Правильность методики определяли методом «введено-найдено». По уравнению градуировочного графика рассчитывали содержание хлорогеновой кислоты на 5-и уровнях концентраций СО и рассчитывали метрологические характеристики (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты определения открываемости хроматографической методики

Уровень	Взято, мкг	Найдено, мкг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	1,0	1,06	106	$X_{cp} = 100,7$ $\Delta X = 6,13$ $SD = 8,57$ $RSD\% = 8,5\%$ $E\% = 6,1\%$
1	1,0	1,06	106	
2	1,5	1,37	91	
2	1,5	1,47	98	
3	2,0	2,14	107	
3	2,0	2,02	101	
4	2,5	2,22	89	
4	2,5	2,35	93	
5	3,0	3,5	117	
5	3,0	2,97	99	

Сходимость методики оценивали по результатам повторного определения содержания хлорогеновой кислоты в растительном сырье (табл. 3).

Таблица 3 – Экспериментальные данные определения хлорогеновой кислоты

Результат расчета концентрации			
Номер трека	Стандарт/Проба	Количество	Rf
1	Стандарт	1,08 мкг	0,56
2	Стандарт	1,62 мкг	0,58
3	Проба	3900 мг/кг	0,55
4	Стандарт	2,16 мкг	0,57
5	Проба	3400 мг/кг	0,56
6	Стандарт	2,7 мкг	0,58
7	Проба	3700 мг/кг	0,55
8	Стандарт	3,24 мкг	0,56
9	Проба	3900 мг/кг	0,53

Выводы. В результате проведённых исследований разработана методика идентификации и количественного определения хлорогеновой кислоты в растительном сырье методом планарной хроматографии на пластинках марки ПТСХ-П-В-УФ (г. Краснодар). Полученные данные свидетельствуют, что методика специфична, имеет достаточно высокую чувствительность и эффективность. Методика количественного определения отвечает необходимым требованиям по показателям линейность, правильность и сходимость.

Содержание хлорогеновой кислоты в корнях и корневищах любистка лекарственного, определённое данной методикой, составило 0,37% в пересчёте на воздушно сухое сырьё.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа. Лекарственное сырьё. 11-изд. доп. М.: Медицина, 1990. С. 400.
2. Левицкий А.П., Вертикова Е.К., Селиванская И.А. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология // Мікробіологія і біотехнологія. 2010. № 2. С. 6-20.
3. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация // Фармация. 2004. № 2. С. 39-41.
4. Тутельян В.А., Лашнева Н.В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты: распространённость, пищевые источники, биодоступность // Вопросы питания. 2008. Т. 77, №1. С. 4-19.
5. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids / Zhao Y. et al. // Hypertens Res. 2012. Vol. 35, № 4. P. 370-374.

Рецензенты:

Компанцев В.А., д.ф.н., профессор кафедры неорганической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г.Пятигорск.

Кодониди И.П., д.ф.н., доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г.Пятигорск.