

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТЕ НЕОМИКОН СУХОМ

¹Олешко О.А., ¹Кондратьева Н.А.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России», Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: ya159@yandex.ru

Из данных литературы известно, что лекарственное растительное сырьё в сборе содержит различные группы биологически активных веществ (БАВ): флавоноиды, танины, фенолкарбоновые кислоты, сапонины, витамины, полисахариды, эфирные масла и др. [4]. Целью нашего исследования являлся качественный анализ сбора и экстракта, а также разработка методики количественного определения по основной группе БАВ. В результате исследования с использованием качественных реакций установлено, что экстракт содержит полисахариды, флавоноиды, алкалоиды, дубильные вещества. Методом восходящей бумажной хроматографии в сборе установлено наличие флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. С помощью метода тонкослойной хроматографии в экстракте из сбора определена основная группа БАВ – флавоноиды, представленная рутином, кверцетином, лютеолином и гиперозидом. В результате определения спектральной характеристики извлечения из сбора установлено, что максимум находится в области от 405 до 415 нм, что соответствует максимуму поглощения рутина. Для количественного определения использован метод спектрофотометрии в пересчете на рутин, разработана методика определения суммы флавоноидов в сборе, показана возможность ее использования для сухого экстракта. Содержание флавоноидов составило $4,84 \pm 0,11\%$.

Ключевые слова: экстракт сухой, флавоноиды, спектрофотометрический метод

DETERMINATION OF AUTHENTICITY AND THE QUANTITATIVE CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS IN NEOMIKON EXTRACT DRY

¹Oleshko O. A., ¹Kondratyeva N. A.

Perm state pharmaceutical academy Russian Ministry of Health ", Perm, Russia (614990, Perm, Poleyaya St., 2), e-mail: ya159@yandex.ru.

From data of literature it is known that the medicinal vegetable raw materials assembled contain various groups of biologically active agents (BAA): flavonoids, tannins, fenolkarbonovy acids, saponina, vitamins, polysaccharides, essential oils and so on [4]. The purpose of our research was the qualitative analysis of collecting and extract, and also development of a technique of quantitative definition on the main group BAA. As a result of research with use of quality reactions it is established that extract contains such groups of active ingredients as polysaccharides, flavonoids, alkaloids, tannins. The method of the ascending paper chromatography in collecting assembled established existence of flavonoids and the fenolkarbonovykh of acids. The BAA main group is defined by a method of a thin layer chromatography in extract from collecting – flavonoids, presented routine, kvvertsetine, lyuteoline and giperozide. As a result of definition of a spectral characteristic of extraction from collecting it is established that the maximum is in area from 405 to 415 nanometers that there corresponds to an absorption maximum the routine. For quantitative definition the spectrophotometry method in terms of routines is used, the technique of determination of the sum of flavonoids assembled is developed, possibility of its use for dry extract is shown. The maintenance of flavonoids made $4,84 \pm 0,11\%$.

Keywords: extract dry, flavonoids, spektrofotometrichesky method

В последнее время во многих странах отмечается всё возрастающий интерес к лекарственным препаратам природного происхождения. Это обусловлено, в первую очередь особенностями их химического состава: компоненты фитопрепаратов по структуре близки к метаболитам человеческого организма, они относительно безопасны в применении. Растительные препараты можно гораздо шире, чем синтетические, рекомендовать для симптоматического, профилактического, продолжительного лечения или безрецептурного применения [7]. БАВ лекарственных растений гармонично встраиваются в структурные

системы организма человека. Они легче, чем индивидуальные, синтетические лекарственные средства ассимилируются организмом, дают меньше побочных эффектов (или полностью их нивелируют) [1].

Для составления сбора и получения экстракта на его основе, нами использовалось сырье календулы, ромашки, чистотела, фиалки, манжетки обыкновенной [5, 6]. Как известно, в данных лекарственных растениях содержатся флавоноиды, полисахариды, алкалоиды, дубильные вещества, которые обеспечивают противовоспалительный, антимикробный, ранозаживляющий, иммуномодулирующий эффект экстракта [7].

Целью данного исследования является изучение качественного состава экстракта, выделение доминирующей группы БАВ, определение количественного содержания доминирующей группы с целью стандартизации экстракта Неомикон сухого.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили три серии экстракта Неомикон сухого 01. 03.07, 02. 06.09, 03. 09.12.

Для подтверждения подлинности сухого экстракта использовали спектральную характеристику, проведение качественных реакций, методы восходящей хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента.

Для проведения качественных реакций из экстракта готовили растворы водные, спиртовые, водноспиртовые и растворы на основе 15%-ной уксусной кислоты.

Определение основных групп БАВ (полисахариды, флавоноиды, дубильные вещества и алкалоиды) проводили по общепринятым методикам.

Хроматографирование методом восходящей хроматографии на бумаге проводили следующим образом: на хроматограммы наносили этанольные извлечения из каждого компонента сбора: травы чистотела, манжетки обыкновенной, фиалки, цветков ромашки, ноготков и раствора экстракта в количестве 0,4 мл, а также по 0,02 мл 2%-ных этанольных растворов ГСО рутин, кверцетин, гиперозид, циннаризин. Проводили разделение в течение 32-36 ч в системе растворителей БУВ (4:1:3), высушивали и обрабатывали 25%-ным раствором аммиака, просматривали при дневном и УФ – свете.

Для качественного анализа методом хроматографии в тонком слое использовали хроматографические пластинки «Силуфол УФ-254» серии 922443 размером 15x15, предварительно активированные в сушильном шкафу при $t = 110^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин.

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемом экстракте проводили спектрофотометрическим методом, основанным на реакции окрашивания действующего вещества с раствором алюминия хлорида в

уксуснокислой среде. Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым методикам ГФ XII издания и с помощью программы Microsoft Excel [3].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведения качественных реакций получены характерные результаты реакций во всех изучаемых образцах, подтверждающие присутствие полисахаридов, алкалоидов, флавоноидов, дубильных веществ (табл. 1).

Таблица 1

Результаты качественных реакций экстракта «Неомикон»

№ п/п	Реакция	Эффект реакции	Экстракт
Полисахариды			
1	Осаждение 95%-ным этанолом	Хлопьевидный осадок	+
2	С тимолом в присутствии концентрированной серной кислоты	На границе слоев розовое кольцо	+
Алкалоиды			
1	С пикриновой кислотой	Темно-желтое окрашивание с выпадением осадки	+
2	С реактивом Драгендорфа	Темно-желтый осадок	+
3	С реактивом Бертрана	Желтое окрашивание	+
4	С реактивом Вагнера	Появление мути, осадок	+
5	С реактивом Шейблера	Появление мути, бурый осадок	+
Флавоноиды			
1	С 2%-ным раствором алюминия хлорида	Желтое окрашивание с желто-зеленой флюоресценцией	+
2	Проба Синода	Красное окрашивание	+
3	Проба Брианта	Красное окрашивание обоих слоев	+
4	С 1 %-ным раствором натрия гидроксида	Желтое окрашивание	+
5	С 0,5 %-ным раствором железа (III) хлорида	Черно-зеленое окрашивание	+
Дубильные вещества			
1	С 1%-ным раствором желатина	Белый осадок	+
2	С 1%-ным раствором хинина гидрохлорид	Желтый осадок	+
3	С 1%-ным раствором квасцов железоаммониевых	Черно-синее окрашивание	+
4	С 10%-ным раствором среднего свинца ацетата (с добавлением 10%-ным раствора кислоты уксусной) После отделения осадка – с 1%-ным раствором квасцов железоаммониевых	Белый осадок Черно-синее окрашивание фильтрата	+

Примечание: «+» – положительный эффект реакции

В результате проведенной пробы Брианта установлено наличие в экстракте агликонов и гликозидов флавоноидов. Появление желтого окрашивания в результате реакции с натрия гидроксидом показывает, что флавоноиды в экстракте представлены флавонолами и флавонами. Черно-зелёное окрашивание с раствором железа (III) хлорида свидетельствует о присутствии о-диоксигруппировки в структуре флавоноидов.

Положительный результат реакций с 1%-ным раствором желатина и раствором хинина гидрохлорида, которые являются специфическими реагентами, свидетельствуют о наличии в экстракте дубильных веществ. О группе дубильных веществ можно судить по реакции с 1%-ным раствором квасцов железоммониевых. Черно-синее окрашивание свидетельствует о преобладании в экстракте гидролизуемых дубильных веществ.

Белый осадок, полученный в результате реакции с 10%-ным раствором свинца ацетата в присутствии кислоты уксусной, черно-синее окрашивание фильтрата после добавления раствора квасцов железоммониевых свидетельствует о присутствии в экстракте гидролизуемых дубильных веществ.

В ходе проведенных исследований установлено, что в экстракте присутствуют флавоноиды, алкалоиды, полисахариды и дубильные вещества.

Для хроматографического анализа флавоноидов использовали метод восходящей хроматографии на бумаге. Хроматографическому исследованию подвергали образцы из каждого компонента сбора: травы чистотела, манжетки обыкновенной, фиалки, цветков ромашки, ноготков и спиртового и водного растворов экстракта.

Характерная окраска пятен показывает, что они имеют флавоноидную природу. С помощью ГСО флавоноидов подтвердили наличие в экстракте рутина, кверцетина и гиперозида. Результат оценивали по значению R_f и окраске пятна после проявления 25%-ным раствором аммиака. Пятно, соответствующее гиперозиду, имело желтую окраску с R_f 0,72, аналогичные пятна проявились на хроматограммах растворов экстракта и извлечений из ромашки, ноготков, чистотела и фиалки. Пятно, соответствующее кверцетину, желтого цвета с R_f 0,84 проявились на хроматограмме растворов экстракта и извлечений из чистотела и фиалки. Пятно, соответствующее рутину, ярко-желтой окраски с R_f 0,58, проявилось на хроматограммах всех исследуемых образцах.

Одним из наиболее простых и экономичных методов для разделения и идентификации фенольных соединений являются распределительная хроматография в тонком слое сорбента.

Предварительный анализ показал, что экстракт Неомикон содержит фенольные соединения – флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты. В связи с этим нами в качестве подвижной фазы использованы следующие системы:

А) этилацетат – этанол – вода (100:27:13);

Б) этилацетат – гексан – хлороформ – н-бутанол (40:30:20:10);

В) этилацетат – уксусная кислота – вода (5:1:1);

Г) этилацетат – муравьиная кислота – вода (80:10:10);

Д) бензол – пиридин – муравьиная кислота (36:9:5);

Е) бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

В ходе исследования установлено, что наиболее полное разделение БАВ экстракта Неомикон осуществляется в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2), которая выбрана для проведения качественного анализа (табл. 3).

Таблица 2

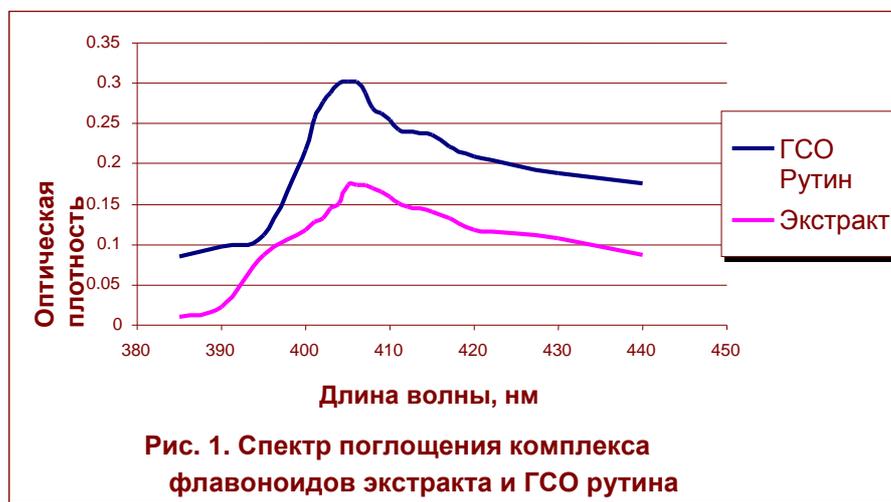
Люминесцентно-хроматографическая характеристика флавоноидов Неомикон методом ТСХ

Серия	Значение R_f в системе: бутанол-уксусная кислота- вода (4:1:2)	Окраска	
		УФ свет	3% р-р $AlCl_3$
01. 03.07	0,23	темно-синяя	ярко желто-зеленая
	0,44	голубая	коричнево-зеленая
	0,51	голубая	желто-зеленая
02. 06.09	0,21	темно-синяя	ярко желто-зеленая
	0,42	голубая	коричнево-зеленая
	0,55	голубая	желто-зеленая
03. 09.12	0,22	темно-синяя	ярко желто-зеленая
	0,40	голубая	коричнево-зеленая
	0,54	голубая	желто-зеленая
Стандартные образцы			
Кверцетин	0,21	темно-синяя	ярко желто-зеленая
Лютеолин	0,45	голубая	коричнево-зеленая
Рутин	0,54	голубая	желто-зеленая

Хроматографический анализ экстракта показал, что флавоноиды представлены рутином, лютеолином и кверцетином.

Для проведения количественного определения БАВ спектрофотометрическим методом предварительно определена длина волны (λ_{max}) с максимальным значением оптической плотности исследуемого раствора. Реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в слабокислой среде наиболее избирательна, специфична и дает стабильные результаты, в частности, при определении сложных растительных объектов, содержащих окрашенные сопутствующие вещества [2]. Эта реакция положена в основу разрабатываемой нами методики количественного определения суммы флавоноидов в

экстракте Неомикон сухом. Для установления аналитической длины волны получали комплекс водного раствора экстракта с 2%-ным раствором хлорида алюминия, максимум поглощения наблюдается при $\lambda_{\max} = 405$ нм. Близкий по значению максимум поглощения (λ_{\max}) комплекса рутин с 2%-ным раствором хлорида алюминия позволяет выбрать его в качестве стандартного образца. Спектры поглощения комплекса с алюминия хлоридом флавоноидов и рутин представлены на рисунке 1.



На основании изучения влияния различных факторов на результат количественного анализа предложена следующая методика: Для получения раствора А около 0,6 мг (точная навеска) экстракта сухого растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл. 1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл, добавляли 2 мл 2%-ного раствора хлорида алюминия на 95%-ном этиловом спирте и через 10 мин 1 мл 3%-ной уксусной кислоты. Объем доводили до метки 95%-ным этанолом (раствор Б) и оставляли на 45 мин.

Оптическую плотность раствора Б измеряли при длине волны 405 ± 2 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 1 мл 3%-ной уксусной кислоты, доведенный до метки 95%-ным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Приготовление раствора ГСО рутина (ГФ XI): около 0,05 г (точная навеска) рутин, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 ч, растворяли в 85 мл 95%-ного этанола в конической колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора 95 %-ным этанолом до метки и перемешивали.

Содержание суммы флавоноидов в сборе в пересчете на рутин в % (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D_{\text{иссл}} \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

Где: $D_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 – оптическая плотность раствора комплекса ГСО рутина с алюминием хлоридом;
 m_0 – навеска ГСО рутина, г;
 m – навеска экстракта, г;
 W – потеря в массе при высушивании экстракта, %.

Таблица 3

Результаты определения содержания суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, в экстракте «Неомикон» сухом

№ п/п	Номер образца	Метрологические показатели				
		\bar{X}	S^2	S_x	E, α	$E, \%$
1	4,93	4,84	0,008	0,04	0,11	2,22
2	4,71					
3	4,89					
4	4,87					
5	4,80					

Относительная ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 0,95 составляет 2,22%. Опыты с добавками ГСО рутина показали отсутствие систематической ошибки предлагаемой методики. Результаты проведенных исследований подтверждают ее воспроизводимость. С помощью этой методики проанализировано три серии экстракта. Исходя из полученных данных, для включения в проект ФСП рекомендуется содержание суммы флавоноидов в экстракт Неомикон сухом, в пересчете на рутин, не менее 4%.

Выводы

1. В ходе проведенных исследований установлено, что в экстракте присутствуют флавоноиды, алкалоиды, полисахариды и дубильные вещества. Доминирующей группой БАВ являются флавоноиды, т.к. они содержатся в каждом компоненте сбора. При детальном исследовании фенольного состава, обнаружены рутин, кверцетин, гиперозид, лютеолин. Причем рутин обнаружен в каждом исследуемом образце, в отличие от других представителей флавоноидов. Спектр поглощения сбора имеет максимум близкий к спектру рутина, поэтому он выбран в качестве доминирующего в сумме флавоноидов.

2. Для проведения количественного анализа разработана методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов. Количественное содержание флавоноидов, в пересчете на рутин, составляет $4,84 \pm 0,11\%$.

Список литературы

1. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 332с.
2. Государственная фармакопея СССР: В 2 т. Т. 2. – 11 изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1990. – 398с.

3. Государственная фармакопея Российской Федерации - XII изд. - Изд-во научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008.- 704 с.
4. Гринкевич, М.А. Информационный поиск перспективных лекарственных растений / М.А. Гринкевич. – Л.: Наука, 1990. – 140 с.
5. Разработка состава сбора для лечения вагинального кандидоза/ Н.А. Кондратьева, О.А. Блинова, М.М. Смирнова, [и др.] // Медицина и здоровье: Материалы II-я международной выставки «Фармация и здоровье», 9-12 ноября 2005г.- Пермь, 2005.-С.34-35.
6. Разработка технологии сухого экстракта из сбора противовоспалительного, ранозаживляющего и антимикробного действия/ Н.А. Кондратьева, О.А. Блинова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сборник научных статей вып 61. - Пятигорск, 2006. - С. 103-104.
7. Фитотерапия с основами клинической фармакологии. /Под ред. В.Г. Кукеса. – М.: Медицина. – 1999. – 192с.: илл.

Рецензенты:

Молохова Е.И., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой промышленная технология лекарств с курсом биотехнологии, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ», г. Пермь;

Белоногова В.Д., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ», г. Пермь.