УДК 582. 983. 615.015.32

• О.О. Цуркан, д. ф. н., проф., зав. лаб. з контролю якості ЛЗ.
Т.В. Ковальчук, к. ф. н., голов., наук., спів роб.
О.В. Бурмака, аспірант

• *Державна лабораторія з контролю якості лікарських засобів Державної установи "Інститут фармакології та токсикології" АМН України, м. Київ.*

ОТРИМАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ НАСТОЙКИ ТА СУХОГО ЕКСТРАКТУ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ

Повідомлення V

На основі вивчених факторів, які впливають на вихід біологічно активних речовин з сировини, метою нашої роботи стало розробка процесу одержання настоянки та сухого екстракту з квіток конюшини лучної. Також, відпрацьовано методики ідентифікації та кількісного вмісту суми ізофлавоноїдів, як основного класу біологічно-активних сполук [1-12].

Матеріали та методи дослідження

У дослідженнях використовувалась висушена сировина конюшини лучної, зібрана в Київській області восени 2009 р. Дослідження проводились із застосуванням різних методів екстракції з використанням спиртових розчинів різної концентрації, співвідношення сировини та екстрагенту, розміру подрібненої сировини та впливу температури. Для ідентифікації та кількісного вмісту біологічно активних речовин нами розроблені та використані нижченаведені методики.

Результати дослідження та їх обговорення

Процес отримання настоянки та сухого екстракту конюшини лучної полягає в тому, що висушені квітки з нижніми прилистками, зібрані в період цвітіння, підлягають подрібненню до часток, які проходять через сито 7 мм, що забезпечує максимальну поверхню екстракції.

Екстракцію проводили в один етап — водно-спиртова екстракція 70% спиртом при температурі 50°С.

1 кг подрібнених сухих квіток конюшини лучної заливали 70% (об/об) водно-спиртовим розчином у кількості 20 л. Проводили екстракцію протягом 24 годин при температурі 50°С та періодично струшуючи. Одержаний витяг зливали, шрот віджимали на центрифузі.

Отриману настоянку відстоювали при температурі 8-10°С протягом 2-3 діб, далі фільтрували через скляний фільтр діаметром ПОР 100.

Готова настоянка з сухих квіток з верхніми прилистками конюшини лучної являє собою прозору рідину зелено-буроватого кольору з трав'яним запахом, що має вміст спирту 65% (об/об) ±3%.

Вміст суми ізофлавоноїдів (формононетин, біоханін А, геністеїн, даїдзеїн) у перерахунку на біоханін А становив від 0,5 до 0,9%.

Для отримання сухого екстракту з сухих квіток з верхніми прилистками конюшини лучної спочатку отримували вищенаведеним способом витяг та піддавали його випаровуванню на вакумно-ротаційному випарювачу при температурі не вище 60°С до густої маси, далі зливали і піддавали вакуумній сушці при температурі не вище 60°С до повного висушування.

Вихід сухого екстракту приблизно становить 40%.

Вміст суми ізофлавоноїдів (формононетин, біоханін А, геністеїн, даїдзеїн) у сухому екстракті у перерахунку на біоханін А становить від 1,8 до 2,5%.

До отриманого екстракту додавали воду у співвідношенні 1:20 та перемішували магнітною мішалкою упродовж 30 хв і центрифугували при 3000 оборотів протягом 10 хв. Отриманий осад видаляли та піддавали вакуумній сушці при температурі не вище 60°С до повного висушування.

Вихід сухого екстракту від взятої сировини становить приблизно 6%.

Вміст суми ізофлавоноїдів (формононетин, біоханін А, геністеїн, даїдзеїн) у сухому екстракті у перерахунку на біоханін А становить від 8,5 до 12,0%.

Безумовною перевагою сухого екстракту є можливість його використання в тих випадках, коли спиртовмісні препарати протипоказані.

Запропонований сухий екстракт — це темно-коричнева пухка аморфна маса гіркуватого смаку, специфічного запаху. Основними діючими речовинами сухого екстракту квіток конюшини лучної є ізофлавоноїди (формононетин, біоханін А, геністеїн, даїдзеїн).

Вміст суми ізофлавоноїдів у настоянці та сухому екстракті квіток конюшини лучної наведений в табл. 1, 2.

Ідентифікація ізофлавоноїдів у сухому екстракті та настоянці трави конюшини лучної методом ТШХ.

Близько 0,1 г сухого екстракту конюшини вміщували у колбу місткістю 50 мл, додавали

© О.О. Цуркан, Т.В. Ковальчук, О.В. Бурмака, 2010

Таблиця 1

Кількісний вміст суми ізофлавоноїдів в настоянці квіток конюшини лучної

Серія препарату	Вміст ізофлавоноїдів в сухому екстракті конюшини лучної у %, х±Дх, n = б				
	Формононетин	БіоханінА	Геністеїн	Даідзеїн	Сума
001	0,36±0,05	0,25±0,06	0,04±0,03	0,03±0,3	0,6В
002	0,35±0,03	0,21±0,03	0,05±0,05	0,03±0,07	0,64
003	0,36±0,05	0,21±0,05	0,05±0,02	0,03±0,04	0,65
004	0,31±0,04	0,29±0,02	0,04±0,01	0,03±0,05	0,67
005	0,31±0,06	0,29±0,05	0,04±0,02	0,02±0,05	0,66

Середній сумарний вміст складає — 0,66%

Таблиця 2

Кількісний вміст суми ізофлавоноїдів в сухому екстракті квіток конюшини лучної

Серія препарату	Вміст ізофлавоноїдів в сухому екстракті конюшини лучної у%, х±Дх, n = б				
	Формононетин	БіоханінА	Геністеїн	Даідзеїн	Сума
001	5,26±0,05	2,65±0,06	0,41±0,03	0,34±0,03	В,66
002	5,15±0,03	2,21±0,03	0,52±0,05	0,32±0,07	В,20
003	5,46±0,05	2,61±0,05	0,55±0,02	0,36±0,04	В,9В
004	5,61±0,04	2,19±0,02	0,46±0,01	0,34±0,05	В,57
005	5,61±0,06	2,19±0,05	0,42±0,02	0,35±0,05	В,57

Середній сумарний вміст складає — 8,6%

10 мл розчину суміші метанол — вода (60:40), перемішували протягом 30 хв та фільтрували через паперовий фільтр "Синя стрічка".

Настоянку для дослідження використовували в чистому вигляді.

Окремо по 1 мг стандартних зразків геністеїну, формононетину, даідзеїну, біоханіну А розчиняли в 1 мл метанолу.

На пластинку Silica gel 60 F 254 (Merck) розміром 20х10 см наносили окремо по 5 мкл розчинів стандартних зразків геністеїну, формононетину, діадзеїну, біоханіну А та 20 мкл одержаного екстракту і окремо настоянку у вигляді смужок завдовжки В мм.

Пластинку поміщали у хроматографічну камеру з попередньо насиченою (20 хв з фільтрувальним папером) рухомою фазою: толуол — етилацетат — мурашина кислота (70:30:1).

Після того, як фронт розчинників проходив близько 12 см, пластинку виймали з камери, сушили на повітрі протягом 5 хв та переглядали в УФ — світлі при 254 та 366 нм.

На хроматограмі досліджуваного екстракту трави конюшини лучної та настоянки проявлялися зони, що збігаються за кольором та розміщенням з аналогічними зонами на хроматограмі розчинів стандартних зразків (рис. 1).

Методика кількісного визначення ізофлавоноїдів методом ВЕРХ

Досліджувані розчини

Близько 0,1 г сухого екстракту конюшини вміщували у колбу місткість 50 мл, додавали 10 мл розчину суміші метанол — вода (60:40), перемішували протягом 30 хв та фільтрували через паперовий фільтр "Синя стрічка".

Настоянку використовували в чистому вигляді.

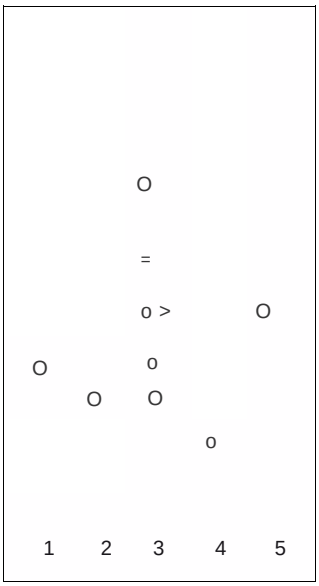

Рис. 1. Ідентифікація ізофлавоноїдів в екстракті трави конюшини лучної методом ТШХ: 1 — СЗ (стандартний зразок) геністеїну, 2 — СЗ формононетину, 3 — екстракт трави конюшини лучної, 4 — СЗ даїдзеїну, 5 — СЗ біоханіну А

Розчин для ідентифікації ізофлавоноїдів

По 1 мг стандартних зразків геністеїну, формононетину, даідзеїну, біоханіну А розчиняли в 1 мл метанолу.

Розчин порівняння

Близько 10 мг стандартного зразка біоханіну А розчиняли в 50 мл метанолу.

По 20 мкл розчину для ідентифікації ізофлавоноїдів, розчину порівняння та випро-

бовуваного розчину поперемінно хроматографували в градієнтному режимі на рідинному хроматографі Perkin Elmer з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного з розчинів в нижченаведених умовах:

- колонка розміром 250x4,6 мм "Symmetry Shild C 18" з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту "Перевірка придатності хроматографічної системи";
- рухома фаза: буферний розчин — метанол Р згідно з таблицею:

Час, хв	Буферний розчин, %	Метанол, %
0^45	80^25	20^75
45^55	25	75
5^56	25^80	75^20
56^66	80	20

- швидкість рухомої фази — 1 мл/хв;
- детектування при довжині хвилі 254 нм;
- температура колонки — 25°С.

Вміст суми ізофлавоноїдів в настоянці або сухому екстракті квіток конюшини лучної у відсотках визначали за формулою:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times P}{S_0 \times V} \qquad X = \frac{S_1 \times m_0 \times V_1 \times P}{S_0 \times m_1 \times V_0}$$

де: S_1 — середнє значення площі піків даїдзеїну, формононетину, геністеїну або біоханіну А, розраховане із хроматограм досліджуваного розчину; S_0 — середнє значення площ піку біоханіну А розраховане із хроматограм розчину порівняння; m_1 — маса наважки сухого екстракту конюшини, мг; m_0 — маса наважки СЗ біоханіну А, мг; V_1 — об'єм розведення випробовуваного розчину; V_0 — об'єм розведення розчину порівняння; P — вміст біоханіну А у СЗ біоханіну А, у %.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо виконуються вимоги тесту "Перевірка придатності хроматографічної системи".

Примітки: Перевірка придатності хроматографічної системи

Буферний розчин. Суміш води та спирту етилового у співвідношенні 20:80 (об/об).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком біоханіну А на хроматограмі розчину порівняння, повинна бути не менше 5000 теоретичних тарілок (ДФУ, с. 47);
- коефіцієнт розділення піків на хроматограмі розчину для ідентифікації повинен бути не менше 2,0;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для величини площі піку даїдзеїну, формононетину, геністеїну або біоханіну А з хроматограм розчину для ідентифікації, не повинно перевищувати 2%;
- коефіцієнт асиметрії піків даїдзеїну, формононетину, геністеїну або біоханіну А з хроматограм розчину для ідентифікації, повинен бути від 0,8 до 2,0;
- коефіцієнт асиметрії піка (Т) розраховують за формулою:

$$T = \frac{\omega_{0,05}}{2 \times f},$$

де $\omega_{0,05}$ — ширина піка на висоті 5% від базової лінії, в мм; f — відстань від початку піка на висоті 5% від базової лінії до перпендикуляра, проведеного з його вершини, мм.

Одержані хроматограми (рис. 2, 3) підтвердили наявність чотирьох наведених вище ізофлавоноїдів у досліджуваному сухому екстра-

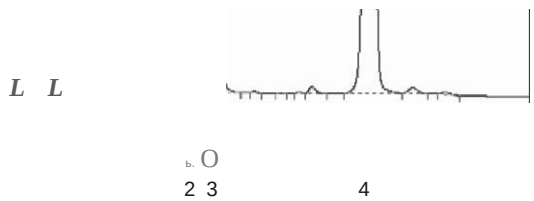

Рис. 2. Хрожатогража стандартних зразків: 1 — даїдзеїну, 2 — форжононетину, 3 — геністеїну, 4 біоханіну А

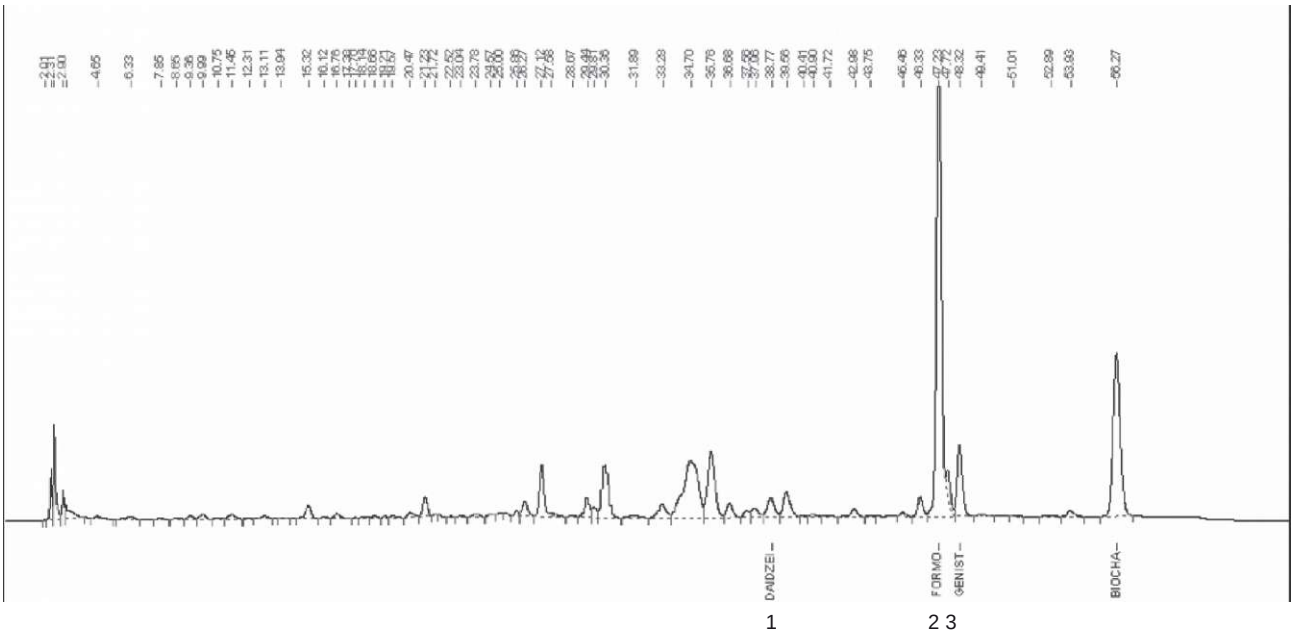

Рис. 3. Хроматограма біологічно активних речовин екстракту трави конюш-иНи лучноЇ: 1 — даїдзеїн, 2 — формононетин, 3 — геністеїн, 4 — біоханін А

кті квіток конюшини лучної та її настоянці, та можливості їх кількісного визначення.

Висновки

1. Розроблені оптимальні умови процесу отримання настоянки та сухого екстракту квіток конюшини лучної.

2. Розроблено методику ідентифікації ізофлавоноїдів у сировині конюшини лучної з використанням методу ТШХ. Ідентифіковано в сухому екстракті та настоянці квіток конюшини лучної геністеїн, формононетин, даїдзеїн, біоханін А.

3. З використанням методу ВЕРХ розроблені умови кількісного визначення суми ізофлавоноїдів (геністеїн, формононетин, даїдзеїн, біоханін А) в сухому екстракті та настоянці конюшини лучної. Кількісний вміст суми ізофлавоноїдів в перерахунку на біоханін А становить в сухому екстракті — 8,6% , настоянці — 0,66% .

Література

1. БабаскинВ.С., БарабановЕ.И.//Фармация. - 1992. - № 6. - С. 30.

2. Бабаскин В.С., Киселевский М.В., Добранский В.С.// Там же. - 1992. - № 3. - С. 65.

3. Гродзинський А.М. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. - Київ: Головна редакція Української радянської енциклопедії ім. Бажана, 1991. - С. 86.

4. Куркін В.А. // Фармація. - 2002. - № 2. - С. 8.

5. Лихацький П.Г., Фірі Л.С. // Мед. хімія. - 2002. - № 2. - С. 108-110.

6. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. - М.: Медицина, 1976. - С. 202.

7. Чекман І.С. // Фітотерапія в Україні. - 2000. - № 2.- С. 3.

8. Beck V., Unterrieder E., Krenn L. // J. Steroid Biochem Mol Biol. - 2003, Feb; Vol. 84, № 2-3. -P. 259-268.

9. De Rijke E., Zafra-GomezA., Ariese F. // J. Chromatogr. A. - 2001 Oct 12; Vol. 932, № 1-2. - P. 55-64.

10. Joanna E., Burdette., Jianghua Liu., Dan Lantvit. // J. Nutr. - 2002. - Vol. 132. - P. 27-30.

11. Krenn L., Unterrieder I., Ruprechter R. // J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci. - 2002 Sep 25; - Vol. 777 № 1-2. - P. 123-128.

12. Shin Yasuda., Po-Sheng Wu., Emi Hattori. // Biosci. Biotechnol, Biochem., - 2004. - Vol. 68, № 1. - P. 51-58.

Надійшла до редакції 01.10.2009.

УДК 582. 983. 615.015.32 "

О.О. Цуркан, Т.В. Ковальчук, О.В. Бурмака

ОТРИМАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ НАСТОЙКИ ТА СУХОГО ЕКСТРАКТУ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ

Ключові слова: конюшина лучна, ізофлавоноїди, ідентифікація, кількісне визначення, ТШХ, ВЕРХ

Розроблені оптимальні умови одержання настойки та сухого екстракту квіток конюшини лучної, методика ідентифікації ізофлавоноїдів у сировині конюшини лучної з використанням методу ^Х. Ідентифіковано у сухому екстракті та настойці квіток конюшини лучної геністеїн, формононетин, даїдзеїн, біоханін А.

З використанням методу ВЕРХ розроблені умови кількісного визначення суми ізофлавоноїдів (геністеїн, форманонетин, даїдзеїн, біоханін А) у сухому екстракті та настойці конюшини лучної. Кількісний вміст ізофлавоноїдів у перерахунку на біоханін А становить у сухому екстракті - 8 6%, у настойці - 0,66%.

А.А. Цуркан, Т.В. Ковальчук, А.В. Бурмака

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАСТОЙКИ И СУХОГО ЭКСТРАКТА КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

Ключевые слова: клевер луговой, изофлавоноиды, идентификация, количественное определение, ТСХ, ВЕЖХ

Разработаны оптимальные условия получения настойки и сухого экстракта цветков клевера красного, методика идентификации изофлавоноидов в сырье клевера лугового с использованием метода ТСХ. Идентифицированы в сухом экстракте и настойке цветков клевера лугового генистеин, формононетин, даидзеин, биоханин А.

С использованием метода ВЭЖХ разработаны условия количественного определения суммы изофлавоноидов (генистеин, формононетин, даидзеин, биоханин А) в сухом экстракте и настойке клевера лугового. Количественное содержание суммы изофлавоноидов в пересчете на биоханин А составляет в сухом экстракте - 8,6%, настойке - 0,66%.

O.O. Tsurkan, T.V. Kovalchuk, O.V. Burmaka

OBTAINING AND STANDARDISATION OF RED CLOVER TINCTURE AND DRY EXTRACT

Key words: Red clover, isoflavonoids, identification, assay, TLC, HPLC

The optimal conditions for production of tincture and dry extract of red clover flowers were determined, the method of identification of estrogenic isoflavonoids in red clover raw materials by TLC was worked out. Genistein, formononetin, daidzein, biochanin A were identified in dry extract and tincture of red clover flowers. The conditions for assay of sum of isoflavonoids (genistein, formononetin, daidzein, biochanin A) in dry extract and tincture of red clover by method HPLC were developed. The amount of sum of isoflavonoids converting on biochanin A is 8,6% in dry extract and 0,66% - in tincture.

УДК: 582.931.4:581.4:581.8

* В.В. Малий, к. фармац. н., доц. каф. ботаніки
Я.С. Кічимасова, к. фармац. н., ас. каф. ботаніки
О.П. Хворост, д. фармац. н., проф. каф. ботаніки

• *Національний фармацевтичний університет, м. Харків*

АНАТОМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛИСТЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ ЯСЕН ^РАХШив L.)

В останні часи фітотерапія, як метод лікування, набуває все більшу популярність. Актуальним є поповнення її арсеналу новими видами лікарських рослин, які широко застосовуються у народній медицині, та є перспективними для наукової медицини. В Україні є достатні сировинні ресурсН дикорослих рослин тя роспНН, rn;о культивуються, необхідний промисловий тя науковий потенціал для того, щоб зябезпечити подальший розвиток РО6^ по

© В.В. Малий, Я.С. Кічимасова, О.П. Хворост, 2010