

Розробка підходів до стандартизації фітосубстанцій листків бадану товстолистого

І.Л.Бензель

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра фармакогнозії і ботаніки
Львів, Україна

Об'єктами дослідження були ліофілізовані фітосубстанції з листків бадану товстолистого, що володіють вираженими інтерфероніндукуючими властивостями. За допомогою якісних реакцій, хроматографічних та спектральних методів дослідження виявлено 18 речовин фенольної природи. Встановлено кількісний вміст основних груп діючих речовин, а саме суми поліфенольних сполук, дубильних речовин, флавоноїдів, суми гідроксикоричних кислот, арбутину та полісахаридів. Отримані дані, а також опрацьовані методики досліджень можуть бути використані для стандартизації листків бадану товстолистого та їх фітосубстанцій.

Ключові слова: фітосубстанція, бадан товстолистий, біологічно активні речовини, стандартизація.

ВСТУП

Актуальність та широке використання рослинних засобів у всьому світі неспинно зростає. На сьогодні вони посідають важливе місце у профілактиці та лікуванні численних захворювань. Оптимальний терапевтичний ефект виявляють природні рослинні комплекси, які є одними з найбільш біологічно активних засобів. У сучасній технології розробки складних фітокомпозицій науковці намагаються так гармонізувати систему активних та допоміжних речовин, щоб їх фізіологічна дія призводила до підвищення терапевтичної ефективності та зменшення проявів побічної дії. На фармацевтичному ринку України до медичного використання дозволено біля 31 фітоекстракту, що є недостатнім через постійно зростаючий попит на них [4, 7, 10, 13].

З метою розширення асортименту фітозасобів нами отримано ряд комплексних фітосубстанцій

із листків бадану товстолистого, які володіють інтерфероніндукуючими, гепатопротекторними та протимікробними властивостями [2, 3, 12].

Метою дослідження було розробити методики якісного та кількісного аналізу фітосубстанцій листків бадану товстолистого, що є актуальним для створення стандартизованих фітозасобів [9, 11].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були ліофілізовані субстанції листків бадану товстолистого, зібраних у 2005-2008 рр. у Львівській області під час цвітіння (ботанічний сад ЛНМУ ім. Д.Галицького).

Хімічний скринінг водних, водно-спиртових та водно-ацетонових фітосубстанцій проводили за загальноприйнятими методиками (якісні реакції, порівняння хроматографічної поведінки з достовірними стандартними зразками та методів спектроскопії). Для цього 0,5 г ліофілізованих субстанцій листків бадану розчиняли в 10 мл 30% розчину етилового спирту при нагріванні на водяному огрівнику. Проводили якісні реакції на наявність флавоноїдів – ціанідинову пробу, з розчинами лугів, натрію карбонату, заліза (III) хлоридом і борно-лимонним реактивом; дубильних речовин – з розчинами желатину, алкалоїду, залізо-амонійного галуно та бромною водою; фенологікозидів – із заліза (II) сульфатом та розчином фосфорно-молібденової кислоти.

Для більш точної якісної характеристики 0,2 г ліофілізатів розчиняли у 4 мл 30% розчину етанолу, нагрівали на водяній бані протягом 15 хв., охолоджували та відфільтровували через паперовий фільтр. Одержані розчини наносили на хроматографічний папір марки Filtrak FN-1, FN-2, FN-8, FN-12, FN-15 поряд із достовірними зразками та вивчали методом хроматографії у системах розчинників (понад 20), серед яких найбільшою роздільною здатністю володіли: н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2); 15%, 30% та 60% оцтова

ТАБЛИЦЯ 1
Умови хроматографування
у градієнтному режимі

Стадія	Час, хв.	Рухома фаза А, % об./об.	Рухома фаза В, % об./об.
1	0-5	90	10
2	5-30	90 → 70	10 → 30
3	30-40	70 → 60	30 → 40
4	40-45	60	40
5	45-50	60 → 90	40 → 10

кислота, *n*-бутанол — мурашина кислота — вода (10:1:4); етилацетат — мурашина кислота — вода (3:1:1). Після проходження системи розчинників хроматограми висушували та оглядали у видимому та УФ-світлі до і після їх обробки парами аміаку, діазотованою сульфаниловою кислотою, розчинами заліза (III) хлориду, лугів, калію карбонату, алюмінію хлориду, бромтимолового синього чи бромкрезолового зеленого. Для виділення та ідентифікації біологічно активних речовин (БАР) у досліджуваних субстанціях використовували препаративну хроматографію на папері із подальшим спектральним аналізом за допомогою спектрофотометрів СФ-46, СФ-56, Cari 50 Scan в УФ- та видимій області спектра в порівнянні зі

стандартними зразками без додавання та з додаванням деяких реактивів.

Дослідження складу фенольних сполук субстанцій листків бадану товстолистого проводили за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі AGILENT 1200 3D LC System з фотодіодною матрицею, обладнаному УФ-детектором, за таких умов: колонка «XTerra C 18» (фірми «Waters», Ірландія) розміром 4,6*250 мм заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм; швидкість рухомої фази — 1,0 мл/хв.; детектування за довжини хвилі 330 нм, 260 нм, 210 нм; температура колонки — 25°C; час хроматографування — 45 хв.; об'єм проби, що вводиться, — 50 мкл. Рухома фаза А: 0,6 г натрію дигідрофосфату моногідрату розчиняють у 1000 мл води для хроматографії, доводять рН розчину кислотою фосфорною до 2,5 (потенціометрично, ДФУ, 2.2.3); рухома фаза В: ацетонітрил (табл. 1).

За тих самих умов були проаналізовані усі фітоекстракти. Ідентифікацію проводили шляхом порівняння часів утримування аналізованої речовини в досліджуваній пробі та розчинів порівняння. Кількісний вміст виявлених речовин розраховували за площею їх піків на хроматограмах (рис. 1, 2).

ТАБЛИЦЯ 2
Фізико-хімічні властивості фенольних сполук, що містяться у ліофілізованих фітосубстанціях
із листків бадану товстолистого

Назва речовини	Флуоресценція в УФ-світлі		λ max в 96% етанолі, нм	Хроматографічна рухливість (Rf)
	Без обробки	Після обробки NH ₃		
Галова кислота	темна	темна	535, 274	1-0,61; 2-0,51; 4-0,52; 5-0,62
Елагова кислота	фіолетова	жовта	255, 366	4-0,16; 5-0,10
Рутин	темно-жовта	жовто-оранжева	258, 362	1-0,45; 2-0,44
Кверцетин	жовто-коричнева	жовто-оранжева	255, 374	1-0,67; 2-0,04
Кемпферол	жовта	зеленувато-жовта	271, 368	1-0,87; 2-0,05
Апігенін	коричнева	жовта	336, 270	1-0,87; 2-0,07
Лютеолін	коричнева	жовто-коричнева	263, 351	1-0,82; 2-0,05; 4-0,90
Цинарозид	темна	жовто-коричнева	254, 350	1-0,38; 2-0,24
Гіперозид	темна	жовта	251, 352	4-0,31
Космосїн	коричнева	жовто-зелена	268, 336	1-0,40; 3-0,32
Нікотифлорин	темна	жовто-зелена	269, 350	1,048; 2-0,54; 3-0,77
Кемпферол-3-О-β-D- глюкопіранозид	жовта	жовто-оранжева	345, 265	1-0,36; 2-0,44; 3-0,45
Арбутин	-	-	220, 287	1-0,70; 2-0,41
Гідрохінон	світло-фіолетова	світло-фіолетова	285	4-0,83
Бергенін	-	-	221, 275	1-0,55; 2-0,43
Бергенова кислота	-	-	220, 275	1-0,82; 2-0,06; 4-0,90
Кофейна кислота	блакитна	ясно-блакитна	236, 299, 325	1-0,76; 2-0,38; 4-0,77; 5-0,82
Хлорогенова кислота	блакитна	зелено-блакитна	242, 298, 325	1-0,67; 2-0,59; 5-0,64

Примітки: системи розчинників: 1 — *n*-бутанол — оцтова кислота — вода (4:1:2); 2 — 15% оцтова кислота; 3 — 30% оцтова кислота; 4 — *n*-бутанол — мурашина кислота — вода (10:1:4); 5 — етилацетат — мурашина кислота — вода (3:1:1).

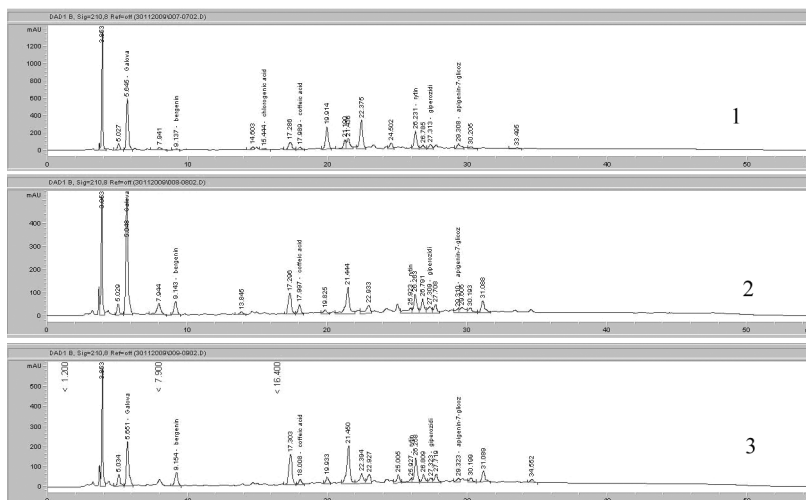


Рис. 1. Схеми хроматограм фенольних сполук ліофілізованих субстанцій сухих листків бадану товстолистого (при 210 нм), одержаних екстрагуванням: 1 – водою, 2 – водно-спиртовою сумішшю, 3 – водно-ацетоною сумішшю.

З метою більш повної характеристики ліофілізованих фітоекстрактів був встановлений кількісний вміст основних груп діючих речовин у них. Кількісне визначення дубильних речовин, арбутину та суми полісахаридів проводили фармакопейними методами [5, 6], а суму поліфенольних сполук і флавоноїдів – розробленими спектрофотометричними методами на основі реакцій із реактивом Фоліна-Чокальте та розчином алюмінію хлориду відповідно [1].

Кількісне визначення вмісту оксикоричних кислот проводили спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту при довжині хвилі 327 нм. Для цього 0,05 г ліофілізату вносили в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняли у 5 мл 50% розчину етилового спирту, доводили до мітки та фільтрували через паперовий фільтр. У мірну колбу місткістю 50 мл вно-

сили 5 мл розчину ліофілізату та доводили об'єм до мітки тим самим розчинником. Оптичну густину одержаного розчину визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 327 нм. Як розчин порівняння використовували 50% розчин спирту етилового.

Вміст суми гідроксикоричних кислот у відсотках у перерахунку на кислоту хлорогенову обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \cdot V_0 \cdot 50}{E_{1cm}^{1\%} \cdot m \cdot V_1}$$

де А – оптична густина досліджуваного розчину; m – наважка сировини (г); $E_{1cm}^{1\%}$ – питомий показник поглинання кислоти хлорогенової (531); V_0 – загальний об'єм досліджуваного розчину ліофілізату (мл); V_1 – об'єм проби розчину ліофілізату, що береться для дослідження (мл).

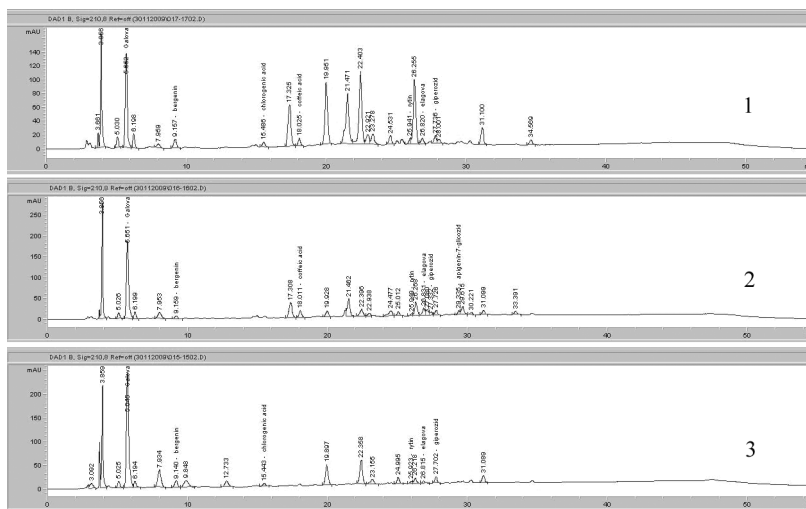


Рис. 2. Схеми хроматограм фенольних сполук ліофілізованих субстанцій свіжих листків бадану товстолистого (при 210 нм), одержаних екстрагуванням: 1 – водою, 2 – водно-спиртовою сумішшю, 3 – водно-ацетоною сумішшю.

ТАБЛИЦЯ 2

Вміст деяких сполук фенольної природи в субстанціях із сухих та свіжих листків бадану товстолистого, встановлений методом ВЕРХ

Назва речовини	Вміст фенольних сполук у фітосубстанціях (%), отриманих при екстракції		
	водою	розчином етанолу	розчином ацетону
Повітряно-суха сировина			
Галова кислота	2,97	2,72	1,31
Елагова кислота	5,36	14,18	9,46
Бергенін	0,16	0,78	0,91
Рутин	0,76	0,32	0,33
Гіперозид	0,40	0,46	0,33
Апігенін-7-глікозид	1,12	0,28	0,32
Кофейна кислота	0,46	0,45	0,40
Хлорогенова кислота	1,17	-	-
Свіжа сировина			
Галова кислота	1,95	2,83	3,95
Елагова кислота	2,84	11,59	4,29
Бергенін	0,49	0,25	0,53
Рутин	0,95	0,32	0,05
Гіперозид	0,37	0,38	0,45
Апігенін-7-глікозид	-	0,13	-
Кофейна кислота	0,39	0,63	-
Хлорогенова кислота	0,49	-	1,01

Визначення вмісту вищезгаданих речовин здійснювали в п'ятикратній повторності із наступною статистичною обробкою отриманих результатів [8].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті фітохімічного дослідження субстанцій листків бадану товстолистого за забарвленням, значенням R_f та спектральними характеристиками у порівнянні з достовірними зразками ідентифікували 18 речовин, 11 з яких наявні в усіх ліофілізатах. Кількісний вміст інших 7 сполук (кемпферол, апігенін, лютеолін, цинарозид, космосійн, нікотифлорин, 3-О- β -D-глюкопіранозид кемпферолу) є не завжди достатнім для їх ідентифікації описаними методами. Хроматографічні та спектральні характеристики виявлених речовин наведені в табл. 2.

Були виявлені 2 галолійні сполуки: галова та елагова кислоти; 2 С-глікозиди галової кислоти: бергенін (лактон С-глюкопіранозил-4-О-метилгалової кислоти) та бергенова кислота (С-глюкопіранозид-4-метоксигалової кислоти); 4 флавоноїдні аглікони: кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавоон), кемпферол (3,5,7,4'-тетра-

гідроксифлавоон), апігенін (5,7,4'-тригідроксифлавоон) та лютеолін (5,7,3',4'-тетрагідроксифлавоон); 4 флавоноїдні моноглікозиди: гіперозид (кверцетин-3-О- β -D-галактопіранозид), цинарозид (лютеолін-7-О- β -D-глюкопіранозид), космосійн (апигенін-7-О- β -D-глюкопіранозид) та кемпферол-3-О- β -D-глюкопіранозид; 2 біозиди: рутин (кверцетин-3-О- β -D-рутинозид) та нікотифлорин (кемпферол-3-О- β -D-рутинозид); 2 оксикоричні кислоти: кофейна (3,4-дигідроксикорична кислота) і хлорогенова (5-О-кофеїл-D-хінна кислота), а також гідрохінон (1,4-дигідроксibenзол) та фенольний глікозид арбутин (гідрохінон-О- β -D-глюкопіранозид).

Додатково на основі використання методу ВЕРХ була підтверджена наявність та встановлений кількісний вміст деяких БАР фенольної природи. Результати дослідження наведені в табл. 2 та на рис. 1 і 2.

Як видно з хроматограм (рис. 1, 2) та даних ВЕРХ аналізу, наведених у табл. 2, вміст окремих виявлених сполук може значно змінюватись залежно від умов екстракції та характеру сировини, що при цьому використовувалась. Варто відзначити значний вміст вільних елагової та галової кислот, а також постійну присутність рутину та цинарозиду в одержаних фітоекстрактах. Крім цього важливою є наявність у кількості 0,16-0,91%, характерної для бадану товстолистого, сполуки бергеніну.

З метою вивчення підходів до стандартизації ліофілізованих фітосубстанцій із листків бадану товстолистого був встановлений кількісний вміст основних груп діючих речовин у них, а саме: суми поліфенольних сполук, дубильних речовин, флавоноїдів, суми гідроксикоричних кислот, арбутину та полісахаридів (табл. 3).

Як видно з даних, наведених у табл. 3, кількісний вміст основних груп БАР у фітосубстанціях змінюється залежно від способу одержання та сировини, що при цьому використовувалась. Так, вміст поліфенольних сполук у ліофілізатах із сухої сировини є вищим і знаходиться в межах від 77,40% до 81,25%, у той же час у фітосубстанціях із свіжої сировини він становить 75,30-79,17%. За вмістом дубильних речовин та флавоноїдів також переважають фітоекстракти із сухої сировини (35,25-47,22% та 2,94-4,16% відповідно), при екстрагуванні із свіжої сировини їх вміст є дещо нижчим та перебуває в межах 39,87-45,91% та 3,04-3,80% відповідно. Кількість арбутину у фітосубстанціях залежить від виду сировини в незначній мірі. Значно відчутніший вплив на його вихід мали умови екстрагування. Так, при використанні розчину спирту в якості екстрагенту із сухої сировини одержано фітоекстракт із вміс-

ТАБЛИЦЯ 3

Кількісне визначення основних груп БАР у ліофілізованих субстанціях, отриманих із сухих та свіжих листків бадану товстолистого

Назва групи БАР	Вміст БАР у фітосубстанціях (% $\bar{X} \pm \bar{X}$), отриманих при екстракції		
	водою	розчином етанолу	розчином ацетону
Повітряно-суха сировина			
Поліфенольні сполуки	77,40 \pm 1,55	81,25 \pm 1,62	79,05 \pm 1,41
Дубильні речовини	35,25 \pm 0,58	47,22 \pm 0,85	45,41 \pm 0,41
Флавоноїди	2,94 \pm 0,19	4,16 \pm 0,13	3,91 \pm 0,17
Арбутин	15,87 \pm 0,25	18,54 \pm 0,32	16,31 \pm 0,27
Гідроксикоричні кислоти	3,70 \pm 0,21	5,18 \pm 0,19	6,09 \pm 0,23
Полісахариди	8,73 \pm 0,27	6,97 \pm 0,31	6,00 \pm 0,22
Свіжа сировина			
Поліфенольні сполуки	76,43 \pm 1,39	79,17 \pm 2,47	75,30 \pm 1,51
Дубильні речовини	43,93 \pm 0,72	45,91 \pm 0,89	39,87 \pm 0,56
Флавоноїди	3,04 \pm 0,09	3,80 \pm 0,17	3,77 \pm 0,19
Арбутин	15,01 \pm 0,23	17,06 \pm 0,31	15,33 \pm 0,29
Гідроксикоричні кислоти	2,95 \pm 0,08	3,33 \pm 0,11	3,75 \pm 0,07
Полісахариди	13,49 \pm 0,32	12,62 \pm 0,29	12,11 \pm 0,38

том арбутину 18,54%, свіжої сировини – 17,06%. У ліофілізатах із водних та водно-ацетонових екстрактів кількість арбутину знаходилась у межах 15,01-16,31%. Вміст гідроксикоричних кислот також був вищим у ліофілізованих фітосубстанціях із повітряно-сухої сировини (3,70-6,09%), в екстрактах із свіжої сировини він становив 2,95-3,75%. При цьому найкращим екстрагентом виявився розчин ацетону. Вміст полісахаридів є більшим у сухих екстрактах із свіжої сировини (12,11-13,49%) у порівнянні із сухою (6,00-8,73%), що може бути наслідком часткового їх руйнування при сушінні рослин. Найкраще полісахариди екстрагувалися водою.

Наведені дані свідчать, що ліофілізовані фітосубстанції, одержані із листків бадану товстолистого, містять широкий спектр БАР у значних кількостях та є перспективними для подальшого використання в медицині та фармацевтичній промисловості, а методи якісного та кількісного визначення – для їх стандартизації.

ВИСНОВКИ

1. Проведено якісний та кількісний аналіз ліофілізованих фітосубстанцій, одержаних із сухих та свіжих листків бадану товстолистого, які можна використовувати для стандартизації останніх у лікарських засобах.

2. За забарвленням, значенням Rf та спектральними характеристиками в порівнянні з достовірними зразками ідентифікували 18 речовин фенольної природи.

3. Методом ВЕРХ розроблено умови якісного та кількісного аналізу сполук фенольної природи субстанцій листків бадану. Встановлено, що за вмістом галової та елагової кислот можна стандартизувати фенольний комплекс досліджуваних фітосубстанцій.

4. Опрацьовані методики та визначено кількісний вміст суми поліфенольних сполук, дубильних речовин, флавоноїдів, суми гідроксикоричних кислот, арбутину та полісахаридів у досліджуваних фітоекстрактах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бензель І.Л. Стандартизація лікарської рослинної сировини бадану товстолистого / І.Л.Бензель // Acta Medica Leopoliensia. – 2007. – Т.ХІІІ, №3. – С. 76-80.
2. Одержання фітосубстанцій із бадану товстолистого та вивчення їх інтерфероніндукуючих властивостей / І.Л.Бензель, М.М.Козловський, Р.Є.Дармограй, Л.В.Бензель // Фармацевтичний журнал. – 2009. – №6. – С. 84-89.
3. Протимікробні властивості бадану товстолистого / І.Л.Бензель, С.І.Хім'як, Л.Б.Романюк, Л.В. Бензель / Актуальні проблеми профілактичної медицини: Збірник наукових праць. – Вип. 8. – Львів, 2008. – С. 7-9.
4. Гарник Т.П. Сучасні технології виробництва фітозасобів та перспективи фітотерапії / Т.П.Гарник // Фітотерапія. Часопис. – 2009. – №1. – С. 59-63.
5. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – Вып.1. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
6. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – Вып.2. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.

7. Гриценко О.М. Технологічні аспекти ефективності фітозасобів / О.М.Гриценко // Фітотерапія. Часопис. — 2008. — №2. — С. 53-57.
8. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РИРЕГ, 2001. — Доп. 1. — 2004. — 520 с.
9. Минина С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие / С.А.Минина, И.Е.Каухова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 560 с.
10. Михайлов И.В. Современные препараты из лекарственных растений: Справочник / И.В.Михайлов. — М.: Астрель, АСТ, 2003. — 319 с.
11. Сур С.В. Проблеми стандартизації і контролю якості лікарських засобів рослинного походження / С.В.Сур, О.М.Гриценко // Фітотерапія. Часопис. — 2003. — №4. — С. 23-28.
12. Патент 76000 Україна, МПК А61К 36/185; А61Р 37/04. Спосіб отримання рослинного екстракту, стимулюючого утворення інтерферону / М.М.Козловський, Л.В.Бензель, І.М.Лозинський [та ін.]; заявники і патентовласники Львівський НДІ епідеміології та гігієни, М.М.Козловський, Л.В.Бензель. — №20040604691; заявл. 15.06.2004; опубл. 15.06.2006; Бюл. №6.
13. Хохленкова Н.В. Аналіз сучасного ринку фітоекстрактів в Україні / Н.В.Хохленкова, Т.Г.Ярних, М.В.Буряк // Фітотерапія. Часопис. — 2009. — №2. — С. 68-72.

И.Л.Бензель. Разработка подходов к стандартизации фитосубстанций листьев бадана толстолистного. Львов, Украина.

Ключевые слова: фитосубстанция, бадан толстолистный, биологически активные вещества, стандартизация.

Объектами исследования были лиофилизированные фитосубстанции из листьев бадана толстолистного, которые обладают выраженными интерферониндуцирующими свойствами. С помощью качественных реакций, хроматографических и спектральных методов исследования обнаружено 18 веществ фенольной природы. Установлено количественное содержание основных групп действующих веществ, а именно суммы полифенольных соединений, дубильных веществ, флавоноидов, суммы гидроксикоричных кислот, арбутина и полисахаридов. Полученные данные, а также разработанные методики исследований могут быть использованы для стандартизации листьев бадана толстолистного и их фитосубстанций.

I.L.Benzel. Approaches to development of standardization of phytosubstances obtained from *Bergeia crassifolia* (L.) Fritsch. leaves. Lviv, Ukraine.

Key words: phytosubstance, *Bergeia crassifolia* (L.) Fritsch., biologically active substances, standardization.

Frozen-dried phytosubstances from *Bergeia crassifolia* (L.) Fritsch. leaves, which own the potent interferon-inducing action, were the object of our study. Using qualitative reactions, chromatographic and spectral methods of research 18 substances of phenolic nature have been found. Quantitative content of polyphenols totality, tannin, flavonoids, hydroxycinnamic acids, arbutin and polysaccharides has been determined. Finding results and methods of researches can be used for standardization of *Bergeia crassifolia* (L.) Fritsch. leaves and phytosubstances.

Надійшла до редакції 19.03.2010 р.