

Хромато-мас-спектрометричне дослідження вмісту ліпофільних речовин у розробленому оригінальному фітотерапевтичному засобі для лікування псоріазу

Ю.С.Прокопенко, В.А.Георгіянц, А.М.Ковальова

Національний фармацевтичний університет
Харків, Україна

Проведено визначення якісного складу та кількісного вмісту ліпофільних сполук у сумарному рідкому екстракті водно-спиртовому та м'якій лікарській формі методом хромато-мас-спектрометрії. У рідкому екстракті було ідентифіковано 64 сполуки, що відносяться до різних груп біологічно активних речовин, та визначений їх кількісний вміст (мг/1000 мл): алкалоїди — 57,3; фенольні сполуки — 6,8; терпеноїди — 159,6; жирні кислоти та їх ефіри — 865,5. В аналізованій пробі з м'якої лікарської форми ідентифіковано та встановлено кількісний вміст 112 сполук (мг/1000 мл): фенольні сполуки — 5419,1; жирні кислоти та їх ефіри — 1884,6; терпеноїди — 20,3; алкалоїди — 6,8.

Ключові слова: фітотерапевтичний засіб, ліпофільні речовини, хромато-мас-спектрометричне дослідження.

ВСТУП

Фітотерапевтичні засоби складають значну частину від усіх лікарських засобів, що застосовуються для лікування тих чи інших захворювань. Вже доведено, що препарати на основі рослин більш дбайливо діють на організм людини у порівнянні із синтетичними препаратами, надаючи при цьому не менш виражений фармакологічний ефект [1, 2, 5]. Крім того, у деяких випадках фітотерапевтичні засоби призначаються лікарем як засіб не допоміжної, а основної терапії [6, 7]. Одним з таких випадків є захворювання шкіри, зокрема псоріаз, етіо-

логія якого досі не є доведеною, а перебіг захворювання несе індивідуальний характер для кожного окремого хворого [3, 4, 7].

З метою покращення стану хворих на псоріаз нами було розроблено фітотерапевтичний засіб на основі сумарного рідкого екстракту з лікарської рослинної сировини, що містить алкалоїди, флавоноїди та терпеноїди, оскільки фармакологічними дослідженнями було визначено, що саме ці сполуки відповідають за специфічну активність екстракту. Виходячи з цього, доцільно було проаналізувати повноту екстракції даних біологічно активних сполук при приготуванні рідкого екстракту та мазі. Для вирішення поставленого завдання нами було обрано метод хромато-мас-спектрометрії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження стали сумарний рідкий екстракт водно-спиртовий та фітотерапевтичний засіб — мазь, до складу якої входив сумарний екстракт та дьоготь березовий.

Дослідження проводили на хроматографі Agilent Technology 6890N з мас-спектрометричним детектором 5973N. Використовували віали «Agilent» на 22 мл (part number 5183-4536) з відкритими кришками та силіконовим ущільненням, кварцову та капілярну хроматографічні колонки HP-5MS довжиною 30 метрів та внутрішнім діаметром 0,25 мм, пробу вводили з поділом потоку 1/50. Застосовували температурне програмування колонки: 4°/хв. до 220°, при цьому початкова температура складала 50°. Температура детектора та випарника складала 250°.

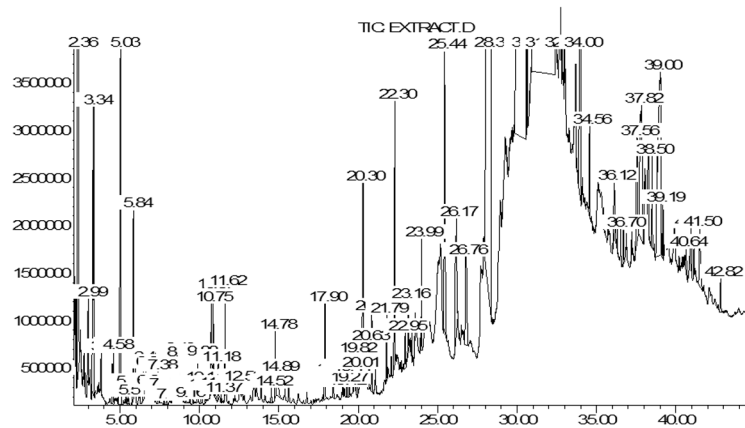


Рис. 1. Хроматограма ліпофільних сполук сумарного рідкого екстракту.

Враховуючи фізико-хімічні та технологічні особливості рідкого екстракту та мазі, нами було розроблено індивідуальні пробопідготовки для кожного з досліджуваних об'єктів.

Для приготування випробовуваного розчину з рідкого екстракту до 10 мл екстракту додали 50 мкг внутрішнього стандарту (аміловий спирт) та екстрагент – 2 мл хлористого метилену. Екстрагували на магнітній мішалці протягом 2 годин. Отриманий екстракт відібрали шприцом і перенесли до віали на 2 мл. Упарили до залишкового об'єму 0,05 мл струмом сухого чистого азоту, відібрали хроматографічним шприцом (2 мкл) і аналізували на хроматографі з мас-спектрометричним детектором.

Для приготування випробовуваного розчину з мазі в наважку препарату (1 г) внесли 50 мкг внутрішнього стандарту (аміловий спирт) і нанесли тонким шаром по стінці віали на 10 мл. Для екстракції використовували 2 мл безводного метанолу, який обережно додали у віалу

зі зразком мазі і закрили герметично кришкою. Щоб уникнути емульгування, процес екстракції вели повільно, обертаючи віалу в похилому положенні протягом однієї години. Екстракт обережно перелили у віалу на 2 мл і упарили до залишкового об'єму 0,05 мл струмом сухого чистого азоту. Після упарювання екстракт відібрали хроматографічним шприцом (2 мкл) і аналізували на хроматографі Agilent Technology 6890N з мас-спектрометричним детектором 5973N.

Компоненти екстрактів ідентифікували за результатами порівняння отриманих у процесі хроматографування мас-спектрів хімічних речовин, що входять у досліджувані суміші, з даними бібліотеки мас-спектрів NIST02 (понад 174000 речовин). Індеси утримування (ІУ) компонентів розраховували за результатами контрольних аналізів суміші стандартних речовин з добавкою суміші нормальних алканів (C₁₀-C₁₈).

ТАБЛИЦЯ 1

Кількісний вміст ліпофільних сполук у сумарному рідкому екстракті

№ піку	Назва сполуки	Індекс утримування	Кількісний вміст, мг/л
5	ізовалераль-диетилацеталь	5,03	39,2
9	етилкапроат	5,84	14,8
27	диетилсукцинат	10,74	8,3
32	етилкаприлат	11,62	6,7
46	дигідроактинідіолід	20,29	15,9
50	етилдодеканоат	22,30	18,8
57	етилпальмітат	28,34	221,1
58	етилінолеат	30,53	270,1
60	лінолева кислота	31,55	351,2
62	фталат	40,1	33,99
66	стилопін	37,56	13,2
67	пропопін	37,82	32,8

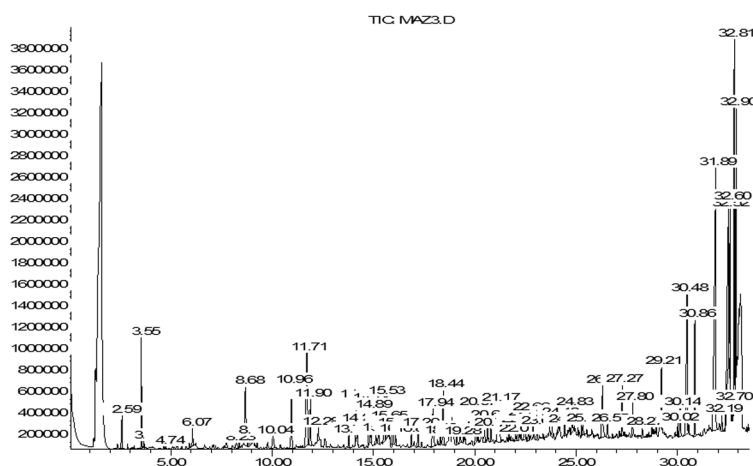


Рис. 2. Хроматограма ліпофільних сполук випробовуваного розчину з мазі.

Для орієнтовного підрахунку змісту кожної компоненти у зразку було проведено калібрування, яке встановило, що 0,5 мг речовини відповідає 2500000000 одиниць площі. Для кожного зразка сума всіх площ піків, вхідних компонентів вказана після списку речовин та змісту кожної речовини у % (під назвою Sum of corrected areas).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У сумарному рідкому екстракті водно-спиртовому хромато-мас-спектроскопічним методом було виявлено 75 ліпофільних сполук, з яких ідентифіковано і кількісно встановлено 64 (рис. 1).

Було визначено загальний вміст терпеноїдів, жирних кислот та алкалоїдів. Серед терпеноїдів визначені монотерпеноїди та їх похід-

ні: ациклічні — ліналоол, транс-ліналоолоксид, геранілацетон; моноциклічні — лімонен, терпін, ментол, ізоментон, ментилацетат, 1,8-цінеол, пара-цимен-8-ол; біциклічні — α - і β -пінени, вербенон, сабінен, туйон, камфора.

Сесквітерпеноїди представлені ациклічними, біциклічними і трициклічними терпеноїдами та їх похідними: ациклічний — гексагідроксифарнезилацетон; біциклічні групи кадинана — γ - і δ -кадинени, кадинол, епі- α -кадинол, групи евдесмана (селінана) — селінен, групи гумулана — гумулен і каріофілана — каріофілен, каріофіленоксид; трициклічні азуреного ряду — аромадендрен, гур'юнен.

Результати кількісного розрахунку вмісту ліпофільних сполук у сумарному рідкому екстракті наведені в табл. 1.

Визначено алкалоїди ізохінолінової групи (мг/1000мл): стилопін (13,2), протопін (32,8),

ТАБЛИЦЯ 2

Кількісний вміст ліпофільних сполук у фітотерапевтичному засобі

№ піку	Назва сполуки	Індекс утримування	Кількісний вміст, мг/л
1	оцтова кислота	2.58	42,8
14	2-метил-2-циклопентен-1-он	6.07	19,7
26	фенол	8.68	148,5
41	4-метилфенол	11.71	272,2
65	4-етил-2-метоксифенол	18.44	90,0
82	4-етилкатехол	21.17	118,5
90	додеканова кислота	24.83	45,4
96	2-оксиетил-додеканамід	27.27	59,7
101	пальмітинова кислота	30.47	291,7
102	етилпальмітат	30.85	120,3
105	олеїнова кислота	32.60	232,4
109	стилопін	37.56	1,6
110	протопін	37.82	3,9

гідрастиндіол (8,5) і дигідронітидін (2,8). Домінуючими сполуками серед ліпофільних речовин екстракту є жирні кислоти та їх ефіри (мг/1000 мл): етилпальмітат (221,1), етилінолеат (270,1), етилстеарат, лінолева кислота (351,2).

Враховуючи попередній досвід використання методу хромато-мас-спектрометрії при аналізі сумарного рідкого екстракту, доцільно було проаналізувати склад ліпофільної витяжки з мазі аналогічним методом. У результаті проведеного дослідження в аналізованій пробі було ідентифіковано та визначено 112 сполук (рис. 2).

Було визначено, що до складу мазі входять такі основні ліпофільні сполуки, як алкалоїди, похідні фенолу, терпеноїди, жирні кислоти. Домінуючими компонентами мазі є феноли та жирні кислоти (мг/1000 мл): фенол (148,5), 4-метилфенол (272,2), 2-метоксифенол (80,5), пальмітинова кислота (291,7), етилпальмітат (120,3) 2-гідроксиетил-гексадеканамід (738,2), лінолева кислота (385,3), олеїнова кислота (232,4), етилінолеат (558,9), етилолеат (256,4); серед алкалоїдів були визначені протопін (3,9), стилопін (1,6), гідрастиндіол (1,02), дигідронітидін (0,3) та ін. (таблиця 2).

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу хромато-мас-спектрометрії проведено дослідження ліпофільних сполук сумарного рідкого екстракту водно-спиртового та оригінального фітотерапевтичного засобу.

2. Ідентифіковано та визначено кількісний вміст біологічно активних речовин, що відповідають за фармакологічний ефект розробленого фітотерапевтичного засобу: алкалоїдів, терпеноїдів, фенольних сполук (алкілпохідні фенолу, пірокатехіни, гідрокінони), ефірів органічних кислот, ефірів жирних кислот.

3. Розроблена методика хромато-мас-спектрометричного дослідження в подальшому може бути використана при складанні реєстраційного досьє на готовий фітотерапевтичний засіб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Исследование активности мази «Псориаген» в комплексной терапии псориаза / Е.В.Жаворонкова, Л.Т.Тогоева, А.Б.Захарова, И.М.Корсунская // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2008. — №1. — С. 1-4.
2. Практическая фитотерапия / Т.А.Виноградова, Б.Н.Гажев, В.М.Виноградов, В.К.Мартынов. — М.: Практик, 2001. — 428 с.
3. Фицпатрик Т. Дерматология / Т.Фицпатрик, Р.Джонсон. — М.: Практика, 1999. — 1044 с.

4. Childhood psoriasis: a clinical review of 1262 cases / A.Morris, M.Rogers, G.Fischer, K.Williams // *Pediatric Dermatology*. — 2001. — Vol. 18. — №5. — P. 188-198.
5. Granstein R. New treatments for psoriasis / R.Granstein // *The New England Journal of Medicine*. — 2001. — Vol. 345. — №17. — P. 284-287.
6. Harborne J. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer / J.Harborne. — London: Chapman and Hall, 2004. — 619 p.
7. Ye X. Efficacy of treatment of psoriasis vulgaris / X.Ye, X.Li, J.Zhao // *The Chinese Journal of Dermatovenereology*. — 2006. — Vol. 20. — №15. — P. 128-128.

Ю.С.Прокопенко, А.М.Ковалева, В.А.Георгиянц. *Хромато-мас-спектрометрическое исследование содержания липофильных веществ в разработанном оригинальном фитотерапевтическом средстве. Харьков, Украина.*

Ключевые слова: фитотерапевтическое средство, липофильные вещества, хромато-мас-спектрометрическое исследование.

Проведено определение качественного состава и количественного содержания липофильных соединений в суммарном жидком экстракте водно-спиртового и мягкой лекарственной форме методом хромато-мас-спектрометрии. В жидком экстракте идентифицировано 64 соединения, относящихся к различным группам биологически активных веществ, и определено их количественное содержание (мг/1000 мл): алкалоиды — 57,3; фенольные соединения — 6,8; терпеноиды — 159,6; жирные кислоты и их эфиры — 865,5. В анализируемой пробе из мягкой лекарственной форме идентифицировано и установлено количественное содержание 112 соединений (мг/1000 мл): фенольные соединения — 5419,1; жирные кислоты и их эфиры — 1884,6; терпеноиды — 20,3; алкалоиды — 6,8.

Yu.S.Prokopenko, A.M.Kovalyova, V.A.Georgiyants. *Determination of the lipophylic compounds in the original phytotherapeutic remedy by the method of GS/MS. Kharkiv, Ukraine.*

Key words: phytotherapeutic remedy, lipophylic compounds, GS/MS.

Identification and assay of lipophylic compounds in the extract and in the soft medicinal form were carried out by the method of GS/MS. 64 compounds in the extract were determined (mg/1000 ml): alkaloids — 57,3; phenols — 6,8; terpenoids — 159,6; fat acids and ethers — 865,5. 112 lipophylic compounds were determined in the soft medicinal form (mg/1000 ml): phenols — 5419,1; fat acids and ethers — 1884,6; terpenoids — 20,3; alkaloids — 6,8.

Надійшла до редакції 16.10.2011 р.