

А. В. Гудзенко

Розробка ВЕРХ методики визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в лікарських засобах хвоща польового (*Equisetum arvense* L.)

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: трава хвоща польового, ди-Е-кофеїл-мезовинна кислота, багатокомпонентні рослинні суміші, стандартизація, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

Протягом останніх років у світовій фітотерапії спостерігається тенденція до широкого використання багатокомпонентних лікарських засобів рослинного походження (БЛЗРП). Зокрема, на фармацевтичному ринку України зареєстровано більше 200 полікомпонентних фітозасобів [1, 2]. Проте питання стандартизації зазначених лікарських засобів є одними з найактуальніших для сучасної фармацевтичної хімії.

Одним з перспективних напрямів удосконалення процедури стандартизації БЛЗРП є використання так званих маркерних сполук, або маркерів – речовин, присутність яких характерна лише для окремої лікарської сировини [3, 4]. Упровадження методик якісного та кількісного аналізу, заснованих на використанні маркерів, має не лише велике практичне значення, але й наукову доцільність.

Однією з найпоширеніших складових, що застосовуються для виготовлення БЛЗРП, є трава хвоща польового, що успішно використовується в медичній практиці як у вигляді монопрепаратів, так і у вигляді складової частини БЛЗРП [1, 2, 5].

Виходячи з того, що за даними літератури до складу трави хвоща польового входить ди-Е-кофеїл-мезовинна кислота – сполука, яка є мажоритарним представником гідроксикоричних кислот у рослині [6–9], з широким спектром біологічної дії та міститься в дуже обмеженій кількості лікарських рослин, було вирішено

розглянути можливість використання саме цієї біологічно активної речовини (БАР) як маркера хвоща польового при стандартизації рослинних сумішей.

Мета дослідження – розробка підходів до якісної та кількісної стандартизації трави хвоща польового в рослинних сумішах за вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були: трава хвоща польового в пачках по 50 г (виробник ЗАТ «Ліктрави»; серії: 40210, 81211, 10312, 20312); таблетки «Фітоліт» (виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків), порошок для зовнішнього застосування «Полігемостат» (виробник ТОВ «Технопарк-Центр» для ТОВ «Технобіофарм», Російська Федерація) та рослинний збір «Алвісан Нео» (виробник «ЛЕРОС с.р.о.», Чеська Республіка); модельні суміші, аналогічні за складом до вищезазначених лікарських засобів без додавання трави хвоща польового.

Екстракцію БАР з досліджуваних об'єктів проводили наступним чином:

1 г (точна наважка) подрібненої моносировини або 5 г (точна наважка) рослинної суміші або полікомпонентного фітопрепарату вносили в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додавали 50 мл 50 % етилового спирту та витримували на киплячій водяній бані протягом 45 хв. Після цього екстракт охолоджували до кімнатної температури та фільтрували через фільтр «червона стрічка» у мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводили ще раз та доводили об'єм витягів до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додавали таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 15 %, та пропускали отриманий зра-

зок кризь попередньо активований (метанол, 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердо-фазної екстракції «Superclean lc-18 SPE Tubes 2 ml» (виробник фірма Supelco, США). Патрон промивали 10 мл 15 % етилового спирту. Пробу з патрона вимивали 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрували випаровуванням до об'єму 5 мл та фільтрували через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Хроматографічне вивчення досліджуваних екстрактів та розчинів стандартних зразків проводили на хроматографі Shimadzu ser. 20, обладнаному діодно-матричним детектором, за таких умов:

колонка Phenomenex Luna C18(2) розміром 250 мм × 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм; температура колонки – 35 °С; довжина хвилі детектування – 330 нм; швидкість потоку рухомої фази – 1 мл/хв; об'єм проби, що вводили – 5 мкл;

рухома фаза: елюент А – 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в воді;

елюент Б – 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

На рисунку 1 представлено хроматограми розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти (А) та екстракту хвоща польового (Б). Як можна бачити, час виходу піка ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в зазначених вище умовах складає близько 26,3 хв. Даний пік присутній як на хроматограмі розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, так і на хроматограмі екстракту трави хвоща польового.

За розробленою методикою було проаналізовано траву хвоща польового (виробник ЗАТ «Ліктрави», м. Житомир) різних років випуску.

Уміст ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в різних серіях трави хвоща польового наведено в таблиці 1. З даних таблиці 1 видно, що в усіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено ди-Е-кофеїл-мезовинну кислоту, уміст якої в досліджуваній сировині становить від $0,1841 \pm 0,0091$ до $0,3301 \pm 0,0173$ % у перерахунку на висушену сировину.

Для визначення можливості стандартизації хвоща польового в багатокомпонентних рослинних сумішах було вико-

Час хроматографування, хв	Елюент А, %	Елюент Б, %
0–5	95	5
5–35	95 → 75	5 → 25
35–40	75	25
40–60	75 → 50	25 → 50
60–65	50 → 20	50 → 80
65–70	20	80
70–85	95	5

При виконанні роботи використовували реактиви: ацетонітрил для градієнтного хроматографування та трифтороцтову кислоту («FLUKA», Німеччина); спирт етиловий ректифікований фармакопейної якості; воду бідистильовану.

Статистичну обробку отриманих даних проводили, використовуючи t-критерій Стьюдента [10].

Результати та їх обговорення. З використанням методу ВЕРХ було розроблено методику визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в рослинній сировині трави хвоща польового.

ристано наступні рослинні багатокомпонентні засоби: таблетки «Фітоліт» (виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків), порошок для зовнішнього застосування «Полігемостат» (виробник ТОВ «Технопарк-Центр» для ТОВ «Технобіофарм», Російська Федерація) та рослинний збір «Алвісан Нео» (виробник «ЛЕРОС с.р.о.», Чеська Республіка).

До складу таблеток «Фітоліт», окрім витягу з трави хвоща польового, входять також витяги з трави споришу, трави звіробою звичайного та амі зубної. До складу «Полігемостату», окрім

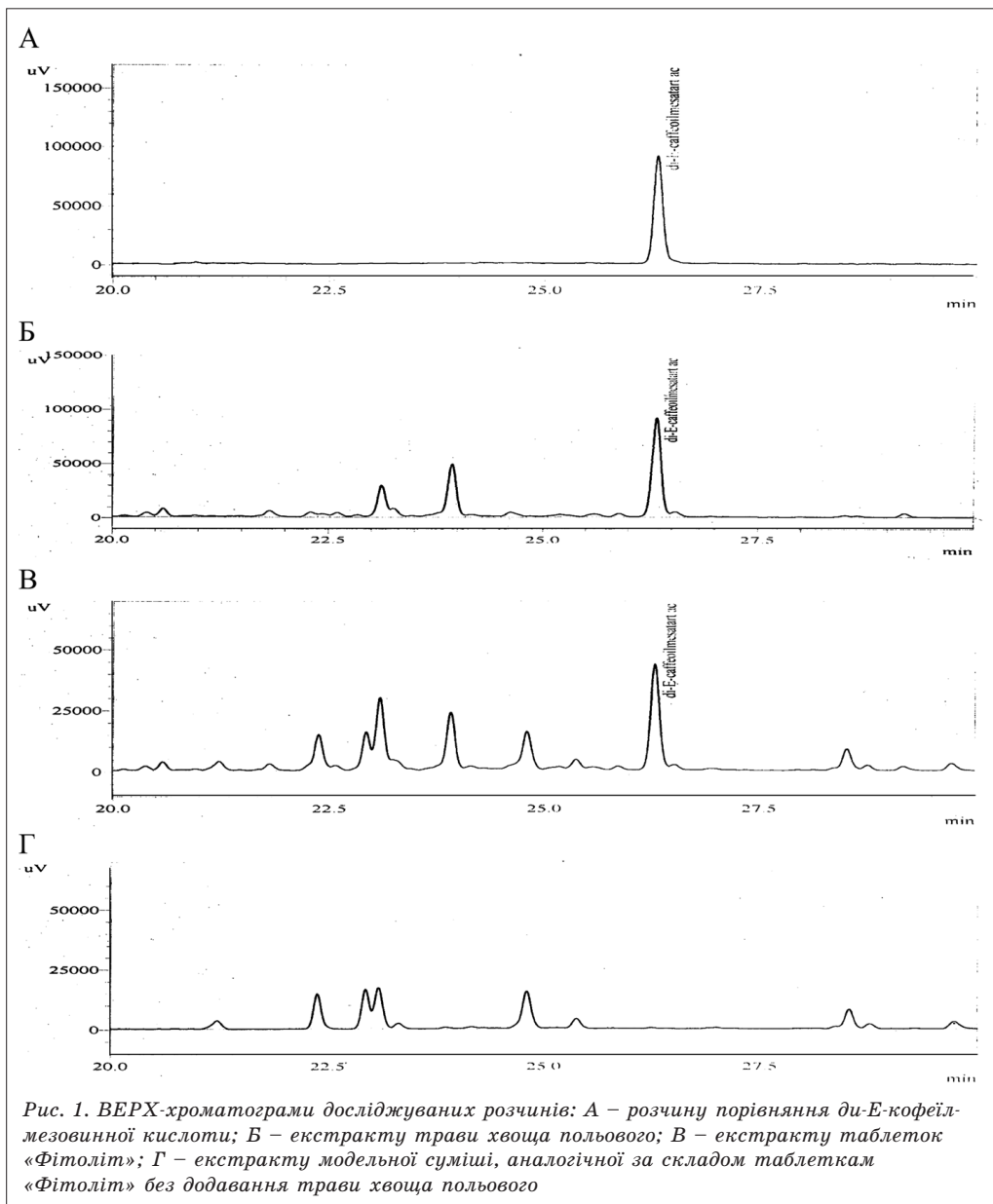


Рис. 1. ВЕРХ-хроматограми досліджуваних розчинів: А – розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти; Б – екстракту трави хвоща польового; В – екстракту таблеток «Фітолїт»; Г – екстракту модельної суміші, аналогічної за складом таблеткам «Фітолїт» без додавання трави хвоща польового

витагу з трави хвоща польового, входять витяги з трави звіробою звичайного, трави деревію звичайного, листя кропиви дводомної, кори дуба та синтетичні речовини – хлоргексидин та кислота амінокапронова. До складу збору «Алвісан Нео», крім трави хвоща польового, входять також трава омели білої, трава звіробою звичайного, квітки та листя глуду, плоди глуду, листя м'яти перцевої, трава меліси лікарської, квітки ромашки аптечної.

У джерелах літератури дані про наявність ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в

іншій сировині, що входить до складу досліджуваних лікарських засобів, крім хвоща польового, відсутні. З метою перевірки можливості стандартизації трави хвоща польового в досліджуваних лікарських засобах за наявністю та вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти було вивчено можливість стандартизації трави хвоща польового в присутності кожного з компонентів, які входять до складу цих препаратів.

Згідно з одержаними даними, БАР жодного рослинного компонента зі складу досліджуваних препаратів не

**Уміст ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в досліджуваних препаратах
трави хвоща польового**

Препарат хвоща польового	Виробник, № серії	Уміст ди-Е-кофеїл-ме-зовинної кислоти в перерахунку на абсолютно суху сировину, %
Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 40210	0,3301 ± 0,0173
Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 81211	0,1841 ± 0,0091
Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 10312	0,2027 ± 0,0105
Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 20312	0,1869 ± 0,0101

заважають ідентифікації та визначенню кількісного вмісту ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти за зазначеною раніше хроматографічною методикою.

Для підтвердження валідності розробленої методики було виготовлено модельну суміш, аналогічну за прописом таблеткам «Фітоліт», але без додавання трави хвоща польового.

На рисунку 1 представлено хроматограми екстракту трави хвоща польового (Б), таблеток «Фітоліт» (В) та рослинної суміші, аналогічної за складом таблеткам «Фітоліт» без додавання трави хвоща польового (Г). На хроматограмах Б і В присутній пік ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, на хроматограмі Г даний пік відсутній.

Таким чином, виходячи з отриманих даних, у таблетках «Фітоліт» є можливість визначити траву хвоща польового за наявністю та кількісним умістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

Також було виготовлено рослинні суміші, аналогічні за прописом порошку для зовнішнього застосування «Полігемостат» та збору «Алвісан Нео», але без додавання трави хвоща польового.

На рисунку 2 представлено хроматограми екстракту трави хвоща польового (А), порошку «Полігемостат» (Б) та рослинної суміші, до складу якої входять компоненти порошку «Полігемостат» без додавання хвоща польового (В). На хроматограмах А і Б присутній пік ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, на хроматограмі В даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що в порошку для зовніш-

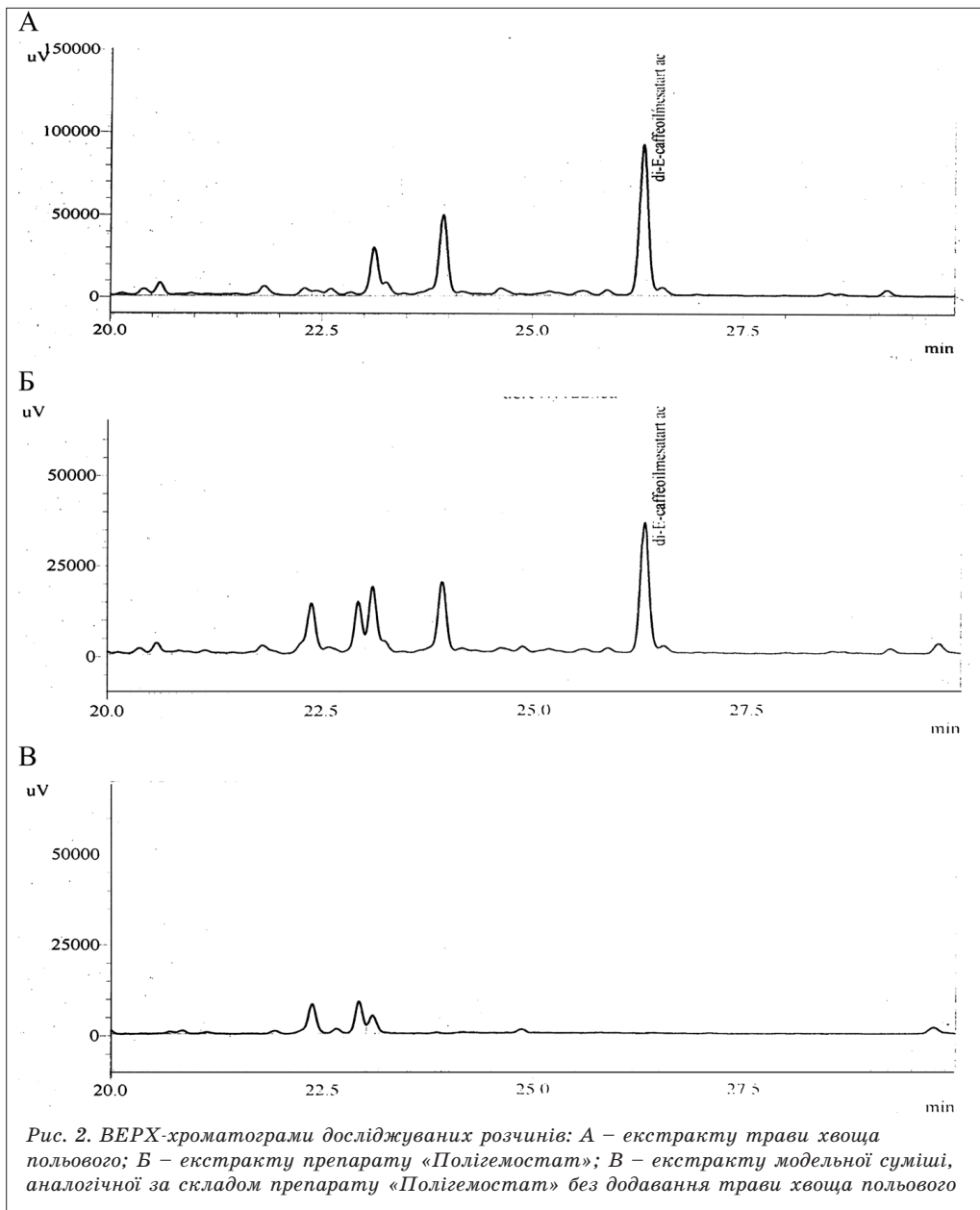
нього застосування «Полігемостат» траву хвоща польового можна визначити за наявністю та кількісним вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

У таблиці 2 представлено метрологічні характеристики методики кількісного визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в зборі «Полігемостат». Відносна похибка для 5 паралельних визначень, розрахована методом математичної статистики з надійністю $p = 0,95$, становить 4,53 %.

На рисунку 3 представлено хроматограми екстракту трави хвоща польового (А), збору «Алвісан Нео» (Б) та збору, до складу якого входять компоненти збору «Алвісан Нео» без додавання трави хвоща польового (В). На хроматограмах А і Б присутній пік ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, на хроматограмі В даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що в зборі «Алвісан Нео» траву хвоща польового можна визначити за наявністю та кількісним вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

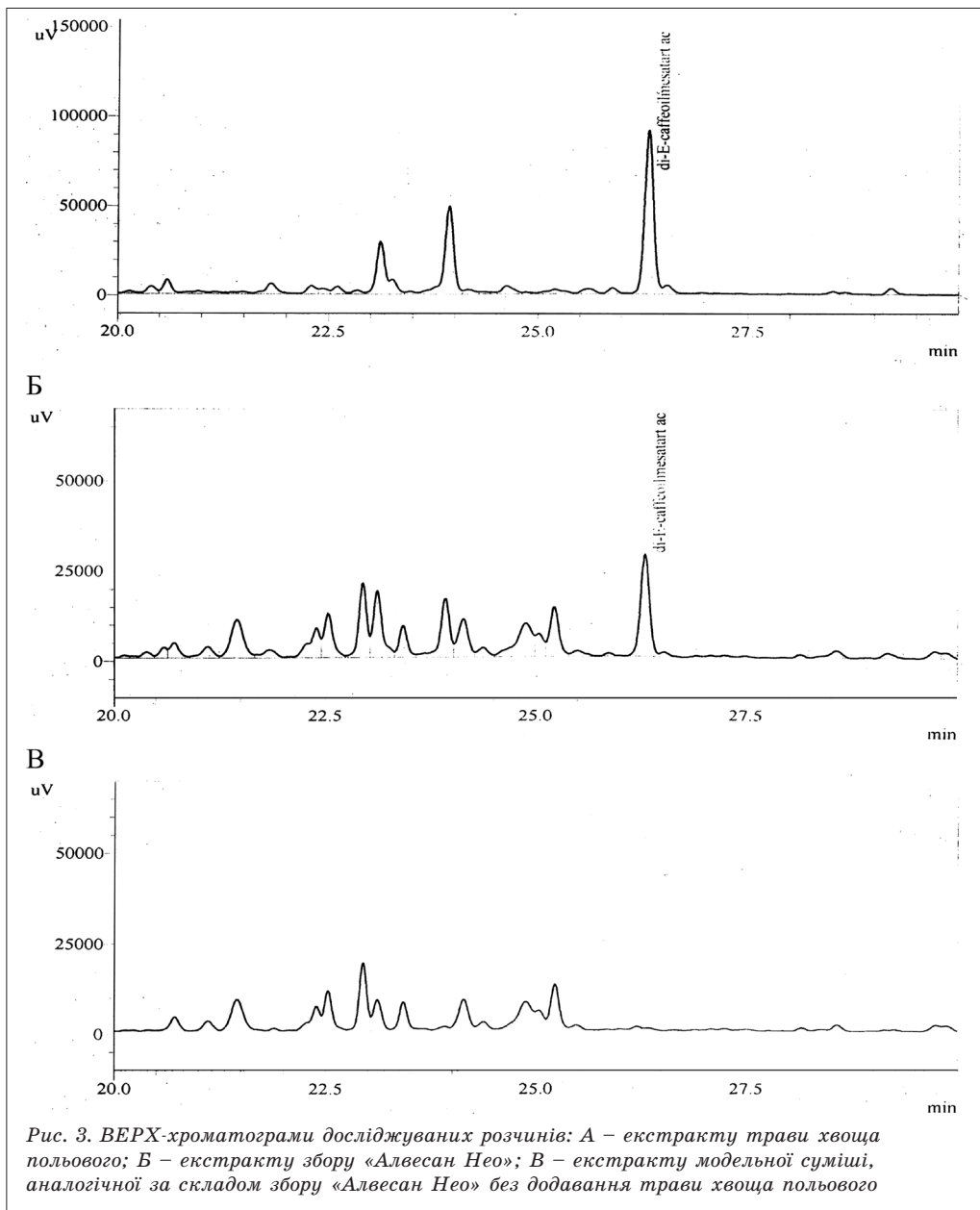
Підсумовуючи все вищезазначене, можна зробити висновок, що за наявністю та вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти траву хвоща польового можна стандартизувати в сумішах з такою рослинною сировиною: травою омели білої, травою звіробою звичайного, квіток та листя глоду, плодами глоду, травою м'яти перцевої, травою меліси лікарської, квітками ромашки аптечної, травою деревію звичайного, листями кропиви дводомної, корою дуба, травою споришу та плодами амі зубної.



Таблиця 2

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення
ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в рослинному зборі «Полігемостат»

Знайдено, %	\bar{x}	S	P	t (P, f)	ΔX_{cp}	ϵ , %
0,0145						
0,0139						
0,0149	0,01418	0,00052	0,95	2,78	0,000642	4,53
0,0136						
0,0140						



Висновки

1. Розроблено ВЕРХ методику визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в моно- та багатокомпонентних фітопрепаратах трави хвоща польового.

2. За розробленою методикою було проаналізовано різні серії препаратів трави хвоща польового виробництва ЗАТ «Ліктрави». У всіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено ди-Е-кофеїл-мезовинну кислоту, уміст якої в досліджуваній сировині коливається в межах від $0,1841 \pm 0,0091$ до

$0,3301 \pm 0,0173$ % у перерахунку на висушену сировину.

3. Як моделі для перевірки можливості стандартизації трави хвоща польового в рослинних сумішах було досліджено зареєстровані в Україні препарати: таблетки «Фітолїт, порошок для зовнішнього застосування «Полігемостат» та рослинний збір «Алвісан Нео». Встановлено, що за наявності та вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти можлива стандартизація хвоща польового в присутності БАР 10 рослинних компонентів.

1. Довідник лікарських засобів, зареєстрованих в Україні станом на 01.01.2014. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.Pharma-center.kiev.ua.
2. Справочник «Компендиум-2011 – лекарственные препараты» / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : Морион, 2011. – 2270 с.
3. Гудзенко А. В. Реалізація сучасних підходів до стандартизації полікомпонентних фітопрепаратів / А. В. Гудзенко, О. О. Цуркан, Т. В. Ковальчук // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 5 (30). – С. 99–106.
4. Гудзенко А. В. Використання речовин-маркерів – сучасний підхід до стандартизації багатокомпонентних лікарських засобів рослинного походження / А. В. Гудзенко, О. О. Цуркан, Т. В. Ковальчук // Фармацевтичний журнал. – 2011. – № 5. – С. 87–91.
5. Бузук Г. Н. Фармакогностическая характеристика хвоща полевого *Equisetum arvense* L. / Бузук Г. Н. // Вестник фармации. – 2010. – № 2. – С. 65–73.
6. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants / N. Mimica-Dukic, N. Simin, J. Cvejic [et al.] // Molecules. – 2008. – V. 13. – P. 1455–1464.
7. Di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid in the barren sprouts of *Equisetum arvense* / D. Strack, F. C. Czygan, V. Wray, L. Witte // Phytochemistry. – 1991. – V. 30. – P. 527–529.
8. Hohlfeld M. Hydroxycinnamoyltransferases Involved in the Accumulation of Caffeic Acid Esters in Gametophytes and Sporophytes of *Equisetum arvense* / M. Hohlfeld, M. Veit, D. Strack // Plant. Physiol. – 1996. – V. 111. – P. 1153–1159.
9. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum* / M. Veit, C. Beckert, C. Höhne [et al.] // Phytochemistry. – 1995. – V. 38. – P. 881–891.
10. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.

А. В. Гудзенко

Разработка ВЭЖХ методики определения ди-Е-кофеил-мезовинной кислоты в лекарственных средствах травы хвоща полевого (*Equisetum arvense* L)

Определен маркер по наличию и количественному содержанию которого возможна качественная и количественная стандартизация травы хвоща полевого в растительных смесях. В качестве маркера хвоща полевого может использоваться ди-Е-кофеил-мезовинная кислота. С использованием метода ВЭЖХ разработана методика анализа ди-Е-кофеил-мезовинной кислоты в моно- и поликомпонентных лекарственных средствах растительного происхождения, в состав которых входит трава хвоща полевого. С использованием разработанной методики произведен анализ моно- и поликомпонентных фитопрепаратов, в состав которых входит трава хвоща полевого.

В результате проведенного анализа показано, что содержание ди-Е-кофеил-мезовинной кислоты в траве хвоща полевого лежит в пределах от $0,1841 \pm 0,0091\%$ до $0,3301 \pm 0,0173\%$ в пересчете на сухое сырье. Доказано, что по наличию и содержанию ди-Е-кофеил-мезовинной кислоты траву хвоща полевого можно стандартизировать в смесях со следующим растительным сырьем: травой омелы белой, травой зверобоя продырявленного, цветками, листьями и плодами боярышника, травой мяты перечной, травой Melissa лекарственной и цветками ромашки лекарственной, плодами амми зубной, травой тысячелистника обыкновенного, листьями крапивы двудомной и корой дуба.

Ключевые слова: трава хвоща полевого; ди-Е-кофеил-мезовинная кислота, поликомпонентные растительные смеси, стандартизация, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

А. V. Gudzenko

Development HPLC method of di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid determination in multicomponent herbal remedies of *Equisetum arvense* L.

It was determined the marker for qualitative and quantitative standardization of *Equisetum arvense* L. herb in the plant mixtures. As a marker of *Equisetum arvense* L. herb can be used di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid. The HPLC method for the analysis of di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid in mono preparations and multicomponent herbal remedies of *Equisetum arvense* L. herb was developed and mono- and multicomponent herbal remedies of *Equisetum arvense* L. herb were analyzed. The analysis shows, that the content of di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid in raw plant is between $0,1841 \pm 0,0091$ to $0,3301 \pm 0,0173\%$ in terms of the dried materials. It is shown, that the presence and content of di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid *Equisetum arvense* L. herb can be standardized in the mixtures with the following plant: herb of *Viscum album* L., grass of *Hypericum perforatum* L., flowers, leaves and fruits of genus *Crataegus* L., herb of *Mentha piperita* L., herb of *Melissa officinalis* L., flowers *Matricaria chamomilla* L., fruits of *Ammi visnaga* (L.) Lam., herb of *Achillea millefolium* L., leaves of *Urtica dioica* L. and bark *Quercus robur* L.

Key words: *Equisetum arvense* L. herb, di-E-caffeoyl-meso-tartaric acid, multicomponent plant composition, standardization, HPLC

Надійшла: 03.06.2014 р.

Контактна особа: Гудзенко Андрій Вікторович, канд. фарм. наук, провідний науковий співробітник, Державна лабораторія з контролю якості лікарських засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03680. Тел.: +38 0 44 277 41 18. Електронна пошта: ganvi@yandex.ru