

А. В. Гудзенко

Розробка ВЕРХ методики визначення ізорамнетин-3-рутинозиду в лікарських засобах квіток нагідок лікарських (*Calendula officinalis L.*)

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

Ключові слова: квітки нагідок лікарських, ізорамнетин-3-рутинозид, багатокомпонентні рослинні суміші, стандартизація, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

Протягом останніх років у світовій фітотерапії спостерігається тенденція до поширеного використання багатокомпонентних лікарських засобів рослинного походження (БЛЗРП). Зокрема, на фармацевтичному ринку України зареєстровано та добре зарекомендували себе понад 200 полікомпонентних фітозасобів [1, 2]. Але існуючі сьогодні методики аналізу вищезазначених фітозасобів здебільшого не відповідають сучасним фармакопейним вимогам, вони не є специфічними та не дають можливості ідентифікації та визначення кількісного вмісту окремих компонентів суміші.

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

Одними з найпоширеніших складових, що застосовуються для виготовлення БЛЗРП, є квітки нагідок лікарських, що успішно використовуються в медичній практиці як у вигляді монопрепаратів, так і у вигляді складових частин БЛЗРП [1, 2, 5, 6].

Фармакологічна активність квіток нагідок лікарських обумовлена наявністю в їхньому складі комплексу біо-

логічно активних речовин, зокрема, флавоноїдів [5–9]. Основним представником цього класу сполук у квітках нагідок лікарських є ізорамнетин-3-рутинозид, який за даними літератури має широкий спектр біологічної активності [5–9]. Тому вважали за доцільне вивчити можливість використання ізорамнетин-3-рутинозиду як маркера нагідок лікарських при стандартизації рослинних сумішей.

Мета дослідження – розробка підходів до якісної та кількісної стандартизації квіток нагідок лікарських у рослинних сумішах за вмістом ізорамнетин-3-рутинозиду.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були квітки нагідок у пачках по 50 г (виробники ЗАТ «Ліктрави» (серії: 120508, 30310, 80310), КП «Фармацевтична фабрика» (серія 20709), квітки нагідок у пачках по 25 г (виробник ЗАТ ФФ «Віола», серія 020210), квітки нагідок, фільтр-пакети по 1,5 г (виробник ЗАТ «Ліктрави», серія 20210), суміш з вмістом квіток нагідок (квіток нагідок лікарських – 1,00 г, плодів шипшини – 1,00 г, плодів та квіток глоду колючого – 1,00 г, шишок хмелю – 1,00 г, листя м'яти перцевої – 1,00 г, листя подорожника великого – 1,00 г, квіток ромашки аптечної – 1,00 г) та аналогічна суміш без вмісту нагідок лікарських.

Екстракцію біологічно активних речовин у досліджуваних об'єктах проводили наступним чином:

1,00 г (точна наважка) подрібненої сировини квіток нагідок лікарських або 5,00 г (точна наважка) рослинної суміші або полікомпонентного фітопрепарату вносили в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додавали 50 мл 50 % етилового спирту та

витримували на киплячому водяному нагрівнику протягом 45 хв. Після цього екстракт охолоджували до кімнатної температури та фільтрували крізь фільтр «червона стрічка» у мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводили ще один раз та доводили об'єм витягів до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5,00 мл отриманого розчину додавали таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 10 %, та пропускали отриманий зразок крізь попередньо активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної екстракції «Superclean lc-18 SPE Tubes 2 ml» виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивали 10 мл 10 % етилового спирту. Пробу із патрона вимивали 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрували випаровуванням до об'єму 5,00 мл та фільтрували крізь фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Для визначення ізорамнетин-3-рутинозиду застосовували метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Хроматографічне вивчення досліджуваних екстрактів та розчинів стандартних зразків проводили на хроматографі Shimadzu ser. 20, обладнаному діодно-матричним детектором, за таких умов: колонка C18 Symmetry, розміром 250 мм × 4,6 мм, розмір частинок – 5 мкм; температура колонки – 35 °С; довжина хвилі детектування – 350 нм; об'єм проби, що вводиться – 5 мкл; швидкість потоку рухомої фази – 1 мл / хв; рухома фаза: 0–25 хв: градієнтне елюювання від 95,0 % до 92,5 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10 : 90) (об/об) та від 5,0 % до 7,5 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90 : 10) (об/об); 25–45 хв: градієнтне елюювання від 92,5 % до 85,0 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10 : 90) (об/об) та від 7,5 % до 15,0 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90 : 10) (об/об); 45–50 хв: градієнтне елюювання від 85 % до 0 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10 : 90) (об/об) та від 15 % до 100 % суміші ацетонітрил – 5 %

розчин ортофосфорної кислоти (90 : 10) (об/об); 50–55 хв: ізократичне елюювання 100 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90 : 10) (об/об); 55,01–70,00 хв: ізократичне елюювання від 95 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10 : 90) (об/об) та від 5 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90 : 10) (об/об).

Уміст ізорамнетин-3-рутинозиду в досліджуваній суміші (у %) обчислювали за наступною формулою:

$$X = \frac{S_{\text{пр}} \times C_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{пр}} \cdot (100 - W)} ;$$

де $S_{\text{пр}}$ – площа піка ізорамнетин-3-рутинозиду на хроматограмі багатокомпонентної суміші;

$S_{\text{ст}}$ – площа піка ізорамнетин-3-рутинозиду на хроматограмі розчину порівняння ізорамнетин-3-рутинозиду;

$C_{\text{ст}}$ – концентрація ізорамнетин-3-рутинозиду в розчині порівняння ізорамнетин-3-рутинозиду, г/мл;

$m_{\text{пр}}$ – наважка досліджуваної рослинної суміші, г;

W – втрата маси при висушуванні в досліджуваній рослинній суміші.

При виконанні роботи використовували реактиви: ацетонітрил для градієнтного хроматографування («FLUKA», Німеччина); ортофосфорну 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 ізорамнетин-3-рутинозиду в рослинній сировині квіток нагідок лікарських.

На рисунку представлені хроматограми розчину порівняння ізорамнетин-3-рутинозиду (рисунок, А) та екстракту квіток нагідок лікарських (рисунок, Б).

Як можна бачити, час виходу піка ізорамнетин-3-рутинозиду в зазначених вище умовах складає близько 32,2 хв. Даний пік присутній як на хроматограмі розчину порівняння ізорамнетин-3-

рутинозиду, так і на хроматограмі екстракту квіток нагідок лікарських.

За розробленою методикою були проаналізовані препарати «Квітки нагідок лікарських» різних вітчизняних виробників.

Уміст ізорамнетин-3-рутинозиду в квітках нагідок лікарських різних вітчизняних виробників надано в таблиці 1.

Згідно з наведеними даними (табл. 1), у всіх пробах був ідентифікований та кількісно визначений флавоноїд ізорамнетин-3-рутинозид. Уміст зазначеного флавоноїду в досліджуваній сировині складає від $(0,2385 \pm 0,0121) \%$ до $(0,3540 \pm 0,0167) \%$ у перерахунку на суху сировину.

За тих самих умов був проведений аналіз рослинної сировини, що найчас-

тіше входить до складу багатокомпонентних препаратів квіток нагідок лікарських, а саме: плодів шипшини, плодів та квіток глоду колючого, шишок хмелю, листя м'яти перцевої, листя подорожника великого та квіток ромашки аптечної.

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що за наявності та кількісним вмістом ізорамнетин-3-рутинозиду можна стандартизувати квітки нагідок у сумішах з усією наведеною вище сировиною.

Для підтвердження можливості стандартизації квіток нагідок лікарських за наявності та вмістом ізорамнетин-3-рутинозиду в присутності зазначеної вище сировини була виготовлена суміш наступного складу: квіток нагідок лікарських – 1 г, пло-

Таблиця 1

Уміст ізорамнетин-3-рутинозиду в досліджуваних препаратах квіток нагідок лікарських

Препарат квіток нагідок лікарських	Виробник, № серії	Уміст ізорамнетин-3-рутинозиду в перерахунку на висушену сировину, % (n = 6)
Квітки нагідок у пачках по 25 г	ЗАТ ФФ «Віола», серія 020210	$0,2688 \pm 0,0123$
Квітки нагідок у пачках по 50 г	КП «Фармфацевтична фабрика», серія 20709	$0,3540 \pm 0,0167$
Квітки нагідок у пачках по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 120508	$0,3089 \pm 0,0142$
Квітки нагідок у пачках по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 30310	$0,2385 \pm 0,0121$
Квітки нагідок у пачках по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 80310	$0,3061 \pm 0,0163$
Квітки нагідок у пачках по 50 г	ВАТ «Лубнифарм», серія 80410	$0,3003 \pm 0,0132$
Квітки нагідок, фільтр-пакети по 1,5 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 20210	$0,2951 \pm 0,0158$

Таблиця 2

Метрологічні характеристики кількісного визначення ізорамнетин-3-рутинозиду в рослинній суміші, що містить квітки нагідок лікарських

Знайдено ізорамнетин-3-рутинозиду, %	\bar{x}	S	P	t (P, f)	ΔX_{cp}	$\epsilon\%$
0,0410 0,0439 0,0434 0,0430 0,0419	0,04264	0,00117	0,95	2,78	0,00146	3,43

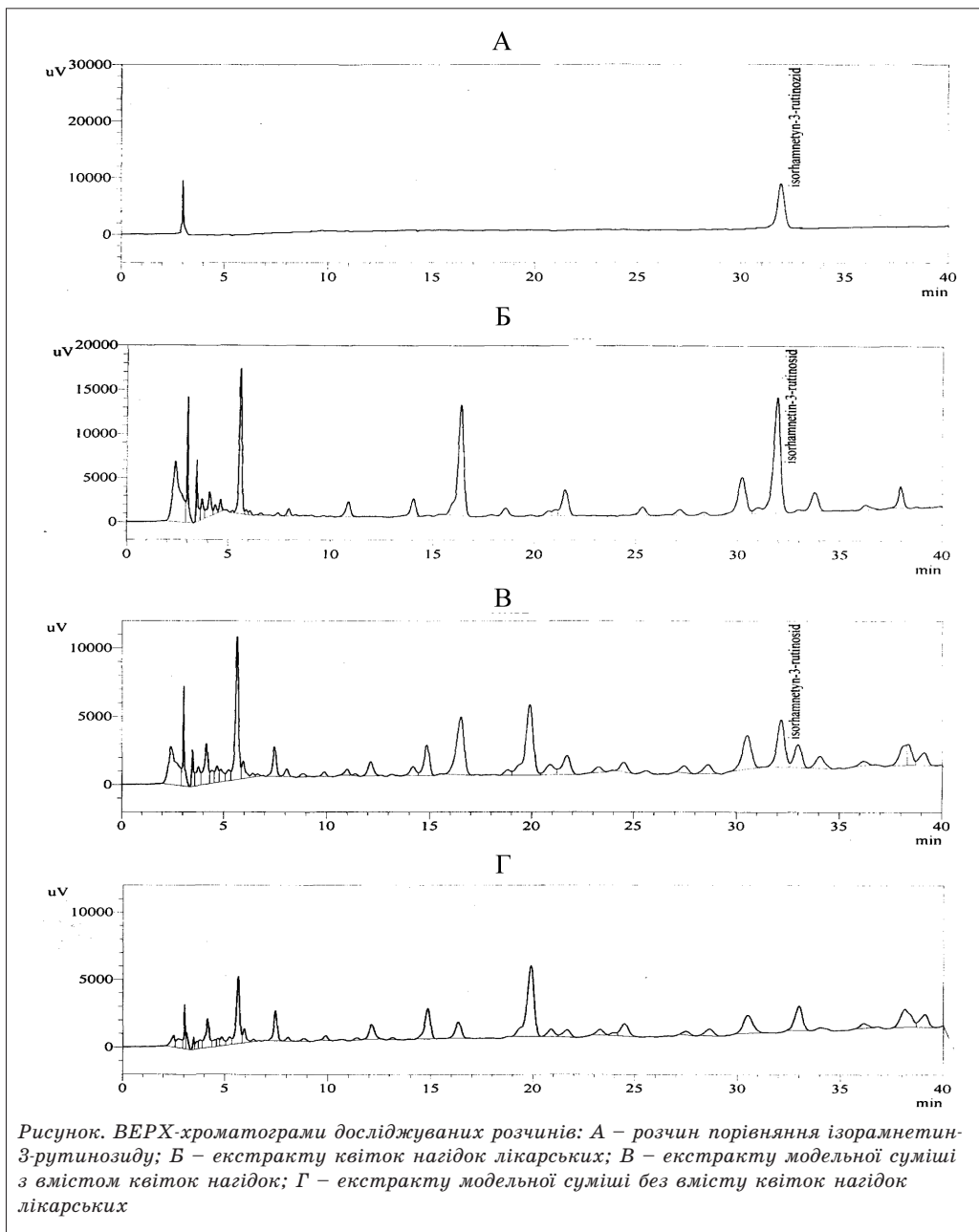


Рисунок. ВЕРХ-хроматограми досліджуваних розчинів: А – розчин порівняння ізорамнетин-3-рутинозиду; Б – екстракту квіток нагідок лікарських; В – екстракту модельної суміші з вмістом квіток нагідок; Г – екстракту модельної суміші без вмісту квіток нагідок лікарських

дів шишшини – 1 г, плодів та квіток глоду колючого – 1 г, шишок хмелю – 1 г, листя м'яти перцевої – 1 г, листя подорожника великого – 1 г, квіток ромашки аптечної – 1 г. Також була виготовлена суміш, аналогічна за складом попередній, але без додавання квіток нагідок.

Зазначені суміші були проаналізовані за розробленою хроматографічною методикою. Хроматограми розчину порівняння ізорамнетин-3-рутинозиду, екстрактів зазначених сумішей та ек-

тракту квіток нагідок лікарських надані на рисунку.

Як на хроматограмі екстракту квіток нагідок лікарських (рисунок, Б) так і на хроматограмі рослинної суміші з вмістом нагідок (рисунок, В) присутній пік ізорамнетин-3-рутинозиду, тоді саме як на хроматограмі рослинної суміші без вмісту нагідок лікарських (рисунок, Г) даний пік відсутній.

Таким чином, виходячи з отриманих даних, у рослинних сумішах, до складу

яких входять квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, плоди та квітки глоду колючого, шишки хмелю, листя м'яти перцевої, листя подорожника великого та квітки ромашки аптечної, квітки нагідок можна стандартизувати за наявністю та вмістом ізорамнетин-3-рутинозиду.

Метрологічні характеристики кількісного визначення ізорамнетин-3-рутинозиду в рослинній суміші з вмістом нагідок лікарських, наведено в таблиці 2. Відносна похибка методу, розрахована методом математичної статистики для 5 паралельних визначень ізорамнетин-3-рутинозиду в вищезазначеній суміші з надійністю $P = 0,95$, становить 3,43 %.

Висновки

1. З використанням методу ВЕРХ розроблена методика визначення

ізорамнетин-3-рутинозиду в моно- та багатокомпонентних фітопрепаратах квіток нагідок лікарських.

2. За розробленою методикою були проаналізовані препарати «Квітки нагідок лікарських» різних вітчизняних виробників. У всіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено флавоноїд ізорамнетин-3-рутинозид. Уміст зазначеного флавоноїду в досліджуваній сировині складає від $(0,2385 \pm 0,0121)$ % до $(0,3540 \pm 0,0167)$ % у перерахунку на суху сировину.

3. Встановлено, що за наявністю та вмістом ізорамнетин-3-рутинозиду квітки нагідок лікарських можна стандартизувати в сумішах з такою рослинною сировиною: плодами шипшини, плодами та квітками глоду колючого, шишками хмелю, листям м'яти перцевої, листям подорожника великого та квітками ромашки аптечної.

1. Довідник лікарських засобів, зареєстрованих в Україні станом на 01.01.2014 // www.Pharmaceutical.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. Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.). Аналитический обзор Ч. 1 / Б. М. Зузук, Р. В. Куцик, С. М. Калугина [и др.] // Провизор. – 2001. – № 4. – С. 29–31.
6. Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.). Аналитический обзор Ч. 2 / Б. М. Зузук, Р. В. Куцик, С. М. Калугина [и др.] // Провизор. – 2001. – № 5. – С. 29–31.
7. Куркин В. А. Флавоноиды из цветков календулы. / В. А. Куркин, О. В. Шарова // Химия природных соединений. – 2007. – № 2. – С. 179–180.
8. Antiinflammatory, anti-tumor-promoting and cytotoxic activities of constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) flowers / M. Ukiya, T. Akihisa, K. Yasukawa [et al.] // J. Nat. Prod. – 2006. – V. 69. – P. 1692–1696.
9. Vidal-Ollivier E. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers / E. Vidal-Ollivier // Planta Med. – 1989. – V. 55. – P. 73.
10. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. – К. : «Морион», 2000. – 320 с.

А. В. Гудзенко

Розробка ВЕРХ методики визначення ізорамнетин-3-рутинозиду в лікарських засобах квіток нагідок лікарських (*Calendula officinalis* L.)

Визначено маркер, з використанням якого можлива якісна та кількісна стандартизація квіток нагідок лікарських у рослинних сумішах. Як маркер нагідок лікарських може бути використано ізорамнетин-3-рутинозид. З використанням методу ВЕРХ розроблено методику аналізу ізорамнетин-3-рутинозиду в моно- і багатокомпонентних лікарських засобах рослинного походження, до складу яких входять квітки нагідок лікарських. Методика включає попереднє очищення проб від баластних речовин за допомогою твердофазної екстракції з подальшим хроматографуванням зразків на рідинному хроматографі з діодно-матричним детектором. Дослідження проводили з використанням хроматографічної колонки C18 Symmetry (250 × 4,6 мм, діаметр часток 5 мкм), детектування за довжини хвилі 350 нм.

З використанням розробленої методики проведено аналіз моно- і полікомпонентних фітопрепаратів, до складу яких входять квітки нагідок лікарських. У результаті проведеного аналізу

показано, що вміст ізорамнетин-3-рутинозиду в сировині рослини складає від $(0,2385 \pm 0,0121) \%$ до $(0,3540 \pm 0,0167) \%$ у перерахунок на суху сировину. Доведено, що за наявності та вмістом ізорамнетин-3-рутинозиду квітки нагідок лікарських можна стандартизувати в сумішах з наступною рослинною сировиною: плодами шипшини, плодами та квітками глоду, шишками хмелю, листям м'яти перцевої, листям подорожника великого та квітками ромашки аптечної.

Ключові слова: квітки нагідок лікарських, ізорамнетин-3-рутинозид, багатокомпонентні рослинні суміші, стандартизація, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

A. В. Гудзенко

Разработка ВЭЖХ методики определения изорамнетин-3-рутинозида в лекарственных средствах цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.)

Определен маркер, по наличию и количественному содержанию которого возможна качественная и количественная стандартизация цветков календулы лекарственной в растительных смесях. В качестве маркера календулы лекарственной может использоваться изорамнетин-3-рутинозид. С использованием ВЭЖХ разработана методика анализа изорамнетин-3-рутинозида в моно- и многокомпонентных лекарственных средствах растительного происхождения, в состав которых входят цветки календулы лекарственной. Методика включает предварительную очистку проб от балластных веществ с помощью твердофазной экстракции с последующим хроматографированием образцов на жидкостном хроматографе с диодно-матричным детектором. Исследования проводили с использованием хроматографической колонки C18 Symmetry (250 × 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм), детектирование при 350 нм.

С использованием разработанной методики произведен анализ моно- и поликомпонентных фитопрепаратов, в состав которых входят цветки календулы лекарственной. В результате проведенного анализа показано, что содержание изорамнетин-3-рутинозида в сырье растения составляет от $(0,2385 \pm 0,0121) \%$ до $(0,3540 \pm 0,0167) \%$ в пересчете на сухое сырье. Доказано, что по наличию и содержанию изорамнетин-3-рутинозида цветки календулы лекарственной можно стандартизировать в смесях со следующим растительным сырьем: плодами шиповника, плодами и цветками боярышника, шишками хмеля, листьями мяты перечной, листьями подорожника большого и цветками ромашки аптечной.

Ключевые слова: цветки календулы лекарственной, изорамнетин-3-рутинозид, многокомпонентные растительные смеси, стандартизация, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

A. V. Gudzenko

Development of HPLC method for determination of isorhamnetin-3-rutinoside in multicomponent herbal remedies of *Calendula officinalis* L. flowers

The marker for qualitative and quantitative standardization of *Calendula officinalis* L. flowers in the plant mixtures was established. Isorhamnetin-3-rutinoside can be used as a marker of *Calendula officinalis* L. flowers. The method for the analysis of isorhamnetin-3-rutinoside in monopreparations and multicomponent herbal remedies of *Calendula officinalis* L. flowers using high-performance liquid chromatography (HPLC), was developed. An analytical method based on an optimized solid-phase extraction procedure and followed by high-performance liquid chromatography separation with diode array detection was developed. The chromatographic determination of isorhamnetin-3-rutinoside was carried out with a Waters C18 Symmetry (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size), as stationary phase, with a flow rate of 1 ml/min and detection at a wavelength of 350 nm. This methodology we used to analyze for monopreparations and multicomponent herbal remedies of *Calendula officinalis* L. flowers. The data obtained indicate, that the content of isorhamnetin-3-rutinoside in raw plant was between $(0,2385 \pm 0,0121) \%$ and $(0,3540 \pm 0,0167) \%$ in terms of the dried materials. It has been shown, that the presence and content of isorhamnetin-3-rutinoside in *Calendula officinalis* L. flowers can be standardized in the mixtures with the following plant: fruits of *Rosa canina* L., leaves and fruits of genus *Crataegus* L., cones of *Humulus lupulus* L., leaves of *Mentha piperita* L., leaves of *Plantago major* L. and flowers of *Matricaria chamomilla* L.

Key words: *Calendula officinalis* L. Flowers, isorhamnetin-3-rutinoside, multicomponent plant composition, standardization, HPLC

Надійшла: 05.12.2014 р.

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