

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ПЛОДІВ ГЛОДУ

Ключові слова: плоди глоду, вітексин, вітексин-2-О-рамнозид, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), багатокомпонентні рослинні суміші, тонкошарова хроматографія (ТШХ)

Одним з найпоширеніших складових, що використовують для виготовлення багатокомпонентних лікарських засобів рослинного походження (БЛЗРП), є плоди глоду, що успішно застосовують у медичній практиці як монопрепарати, так і у вигляді складових частин БЛЗРП [1, 2]. Плоди глоду є офіційною сировиною практично в усіх Європейських країнах [3, 4, 5], зокрема в Україні фармакопейними є 12 видів зазначеної сировини [6]. Препарати на основі плодів глоду мають широкий спектр фармакологічної дії, зокрема їм притаманна кардіотонічна, спазмолітична, гіпотензивна, седативна, протизапальна дія тощо [3, 4, 7, 8].

Оскільки питання контролю якості складних багатокомпонентних рослинних сумішей залишається одним з найактуальніших у сучасній фармації, ми вирішили розробити підходи до стандартизації плодів глоду в БЛЗРП, зокрема виявити маркери, за допомогою яких можлива ідентифікація зазначеної сировини в рослинних сумішах.

Згідно з монографією ДФУ сировину плодів глоду стандартизують за кількісним визначенням вмісту суми флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид) та суми проціанідинів (у перерахунку на проціанідину хлорид), а також за наявністю таких речовин: кофейної і хлорогенової кислот та флавоноїдів гіперозиду та рутину [6].

Виходячи з того, що всі зазначені біологічно активні речовини (БАР) широко розповсюджені в рослинній лікарській сировині, проблематичним є їх використання в якості маркерів плодів глоду в рослинних сумішах [3, 4].

Згідно з даними літератури крім гіперозиду та рутину, мажоритарними компонентами флавоноїдної фракції плодів глоду є також флавонові С-глікозиди: вітексин та вітексин-2-О-рамнозид, наявність яких в іншій рослинній сировині вельми невелика [9, 10]. Виходячи з цього, ми вирішили вивчити можливість використання саме зазначених флавоноїдів в якості маркерів для визначення плодів глоду в рослинних сумішах.

Мета роботи: дослідження вмісту вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду в препаратах плодів глоду та визначення можливості проведення стандартизації зазначеної сировини в рослинних сумішах за наявністю цих флавоноїдів.

Матеріали та методи дослідження

З використанням методу (ВЕРХ) досліджувались такі об'єкти: плоди глоду в пачках по 140 г (виробник – ЗАТ «Ліктрави»; серії 10110, 30310), плоди глоду в пачках по 50 г (виробники – ЗАТ ФФ «Віола»; серії 020310 та 040710) та КП «Фармацевтична фабрика» (серія 11109)); плоди глоду в пачках по 100 г (ТЗОВ «Чиста флора», дата виробництва – 26.07.2010), плоди глоду в фільтр-пакетах по 4 г (виробники – ЗАТ «Ліктрави»; серія 51209).

В якості стандартних розчинів використовували розчини вітексину («Fluka», каталожний № 49513) та вітексин-2-О-рамнозиду («Fluka», каталожний № 55608) в етиловому спирті.

Екстракцію БАР в досліджуваних препаратах плодів глоду (ВЕРХ-визначення) проводили, як вказано в [11].

ВЕРХ-вивчення досліджуваних та стандартних зразків проводили на хроматографі «Shimadzu» ser. 20, обладнаному діодно-матричним детектором, за таких умов: колонка © Колектив авторів, 2011

C18 X-Terra, розміром 250 мм x 4,6 мм, розмір частинок – 5 мкм; температура колонки – 35 °С; довжина хвилі детектування – 338 нм; швидкість потоку рухомої фази – 1мл/хв; об'єм проби, що вводили, – 5 мкл; рухома фаза – 0–5 хв: ізократичне елюювання 100 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об); 5–10 хв: градієнтне елюювання від 100 % до 92 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та від 0 % до 8 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 10–20 хв: ізократичне елюювання 92 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та 8 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 20–25 хв: градієнтне елюювання від 92 % до 20 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та від 8 % до 80 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 25–30 хв: ізократичне елюювання 20 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та 80 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 30–45 хв: ізократичне елюювання 100 % суміші ацетонітрил – 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10 : 90) (об/об).

Приготування первинних екстрактів плодів глоду, листя меліси лікарської, трави звіробою звичайного, квіток ромашки лікарської, трави кропиви собачої, листя кропиви дводомної та квіток арніки гірської до досліджень із застосуванням методу ТШХ було проведено, як вказано в [12]. На основі зазначених первинних екстрактів були виготовлені такі багатокомпонентні суміші: суміш з глодом №1 (плоди глоду + трава кропиви собачої + листя кропиви дводомної); суміш з глодом №2 (плоди глоду + трава деревію звичайного + квітки арніки); суміш з глодом №3 (плоди глоду + трава звіробою + листя меліси); суміш без глоду №1 (трава кропиви собачої + листя кропиви дводомної); суміш без глоду №2 (трава деревію звичайного + квітки арніки); суміш без №3 (трава звіробою + листя меліси). Для отримання досліджуваних сумішей одержані екстракти змішували в рівних співвідношеннях. Після цього суміші наносили на лінію старту хроматографічної пластинки «ALUGRAM®SIL G/UV₂₅₄», виробництва «MACHEREY-NAGEL», Німеччина смугами по 50 мкл. Паралельно наносили стандартний розчин вітексину (0,1 мг/мл) та екстракт плодів глоду. Після висушування пластинку вміщували в хроматографічну камеру з сумішшю розчинників: вода – мурашина кислота – метилетилкетон – етилацетат (10:10:30:5) та хроматографували висхідним способом. Коли фронт розчинників проходив 15 см від лінії старту, пластинку виймали, просушували на повітрі та обприскували розчинами для візуалізації. Після цього пластинку вносили в сушильну шафу з температурою 105±3 °С та нагрівали протягом 3 хв. Переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. В якості розчинів для візуалізації хроматограм використовували 1 % розчин аміно етилового ефіру дифенілборної кислоти у метанолі та 5 % розчин макроголу 400 в метанолі [ДФУ].

При виконанні роботи використовували такі реактиви: ацетонітрил для градієнтного хроматографування (“FLUKA”, Німеччина); 85 % фосфорну кислоту (“FLUKA”, Німеччина); спирт етиловий ректифікований фармакопейної якості; воду бідистильовану.

Результати дослідження та їх обговорення

Як зазначалося, в сировині плодів глоду містяться біологічно активні речовини вітексин та вітексин-2-О-рамнозид [9, 10]. Виходячи з цього, із застосуванням методу ВЕРХ нами була розроблена хроматографічна методика визначення вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду в сировині плодів глоду. За розробленою методикою досліджено плоди глоду різних вітчизняних виробників.

В усіх пробах були ідентифіковані та кількісно визначені обидва досліджувані компоненти. Хроматограми стандартного розчину вітексину і вітексин-2-О-рамнозиду та екстракту плодів глоду представлені на рис. 1, 2. Отже, в умовах розробленої нами методики час утримування піків вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду становить приблизно 15,7 та 14,9 хв.

Вміст вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду в плодах глуду різних вітчизняних виробників представлено в таблиці.

Згідно з даними, представленими в таблиці, в усіх пробах були ідентифіковані та кількісно визначені флавоноїди вітексин та вітексин-2-О-рамнозид. Вміст зазначених флавоноїдів перебуває у межах від $0,00424 \pm 0,00015$ % до $0,00807 \pm 0,00038$ % та від $0,00296 \pm 0,00009$ % до $0,00623 \pm 0,00032$ % в перерахунку на висушену сировину відповідно.

Таблиця

Вміст вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду в досліджуваних препаратах плодів глуду

| № п/п | Препарат плодів глуду | Виробник, № серії | Вміст (%) в перерахунку на висушену сировину | |
|-------|-------------------------------------|--|--|-----------------------|
| | | | Вітексин | Вітексин-2-О-рамнозид |
| 1 | Плоди глуду в пачці по 140 г | ЗАТ «Ліктрави», серія 10110 | $0,00644 \pm 0,00030$ | $0,00496 \pm 0,00021$ |
| 2 | Плоди глуду в пачці по 140 г | ЗАТ «Ліктрави», серія 30310 | $0,00807 \pm 0,00038$ | $0,00459 \pm 0,00026$ |
| 3 | Плоди глуду в пачці по 50 г | ЗАТ ФФ «Віола», серія 020310 | $0,00424 \pm 0,00015$ | $0,00473 \pm 0,00027$ |
| 4 | Плоди глуду в пачці по 50 г | ЗАТ ФФ «Віола», серія 040710 | $0,00517 \pm 0,00028$ | $0,00296 \pm 0,00009$ |
| 5 | Плоди глуду в пачці по 50 г | КП «Фармацевтична фабрика», серія 11109 | $0,00645 \pm 0,00033$ | $0,00339 \pm 0,00017$ |
| 6 | Плоди глуду в пачці по 100 г | ТзОВ «Чиста флора» (дата виробництва 26.07.2010) | $0,00585 \pm 0,00027$ | $0,00623 \pm 0,00032$ |
| 7 | Плоди глуду в фільтр-пакетах по 4 г | ЗАТ «Ліктрави», серія 51209 | $0,00551 \pm 0,00023$ | $0,00622 \pm 0,00029$ |

Для визначення підходів до стандартизації компонентів плодів глуду в рослинних сумішах нами було розроблено ТШХ-методику визначення зазначених компонентів у багатокомпонентних сумішах плодів глуду.

За даною методикою проведено аналіз рослинної сировини, що найчастіше міститься у складі багатокомпонентних препаратів плодів глуду, а саме: листя меліси лікарської, трави звіробою звичайного, квіток ромашки лікарської, трави кропиви собачої, листя кропиви дводомної.

У результаті проведених досліджень ми дійшли висновку, що за наявності флавоноїду вітексину можна стандартизувати плоди глуду у сумішах з усією наведеною вище сировиною. При цьому слід зазначити, що за даними хроматографічних умов вітексин-2-О-рамнозид не розділяється з флавоновими компонентами інших рослин і тому за розробленою хроматографічною методикою його не можна використовувати в якості маркера плодів глуду.

Для підтвердження можливості стандартизації плодів глуду за вмістом вітексину за наявності зазначеної вище сировини були виготовлені багатокомпонентні модельні суміші з вмістом та без вмісту плодів глуду.

Зазначені суміші були проаналізовані за розробленою хроматографічною методикою. На рис. 3 представлена ТШХ-хроматограма, на старт якої були нанесені: стандарт вітексину (1); первинний екстракт глуду (2); рослинна суміш з глудом №1 (3) та рослинна суміш без глуду №1.

Отже, в зазначених умовах пляма зеленого кольору, що відповідає вітексину, має R_f близько 0,75 (рис.3 (1)). Ця пляма наявна на хроматограмах, що відповідають екстракту плодів

глоду (рис.3 (2)), та рослинній суміші з глодом №1 (рис.3 (3)). На хроматограмі без вмісту глоду (суміш без глоду №1 (рис.3 (4)) ця пляма відсутня. Таким чином, за наявності вітексину плоди глоду можна стандартизувати в сумішах з такою сировиною: травою кропиви собачої та листям кропиви дводомної.

Після проведення аналізу за розробленою методикою рослинних сумішей з плодами глоду №2, №3 та рослинних сумішей без вмісту глоду №2 та №3 ми дійшли висновку, що в усіх проаналізованих сумішах з глодом наявна пляма, що відповідає вітексину, в усіх сумішах без вмісту плодів глоду ця пляма відсутня.

Проведені дослідження дають змогу констатувати, що за наявності вітексину можлива стандартизація плодів глоду в сумішах з такою сировиною: травою кропиви собачої, листям кропиви дводомної, травою деревію звичайного, квітками арніки гірської, травою звіробою звичайного та листям меліси лікарської.

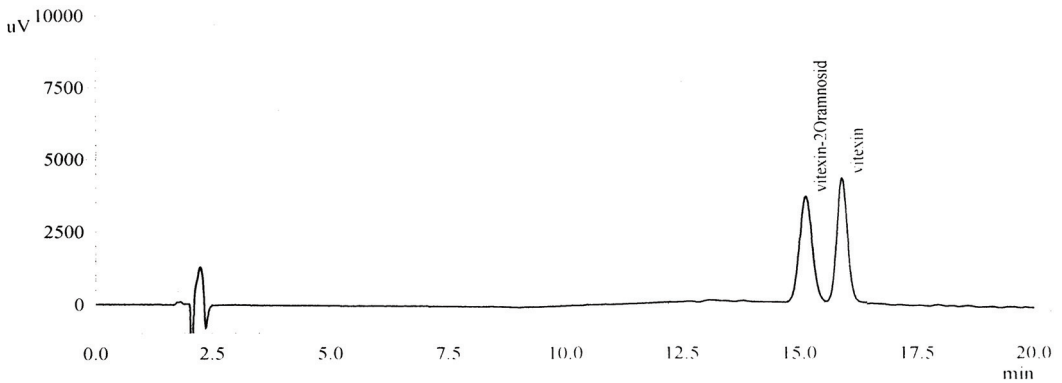


Рис.1 Хроматограма стандартного розчину вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду

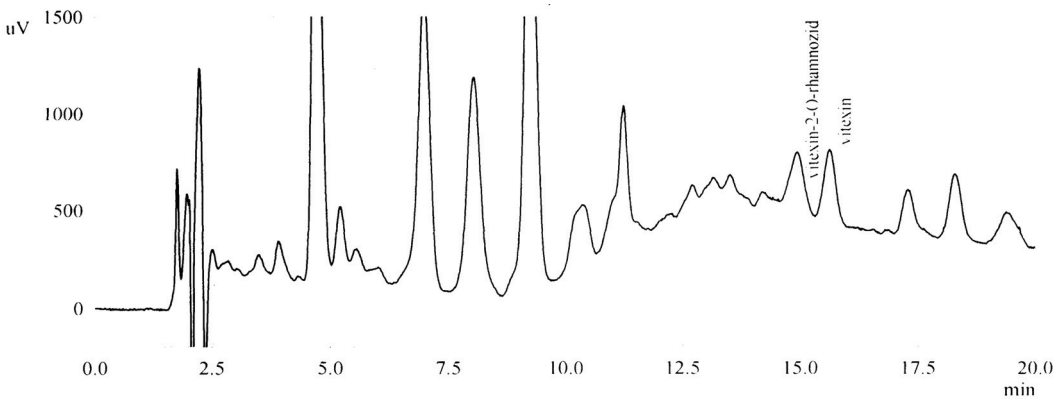


Рис.2 Хроматограма досліджуваного екстракту плодів глоду

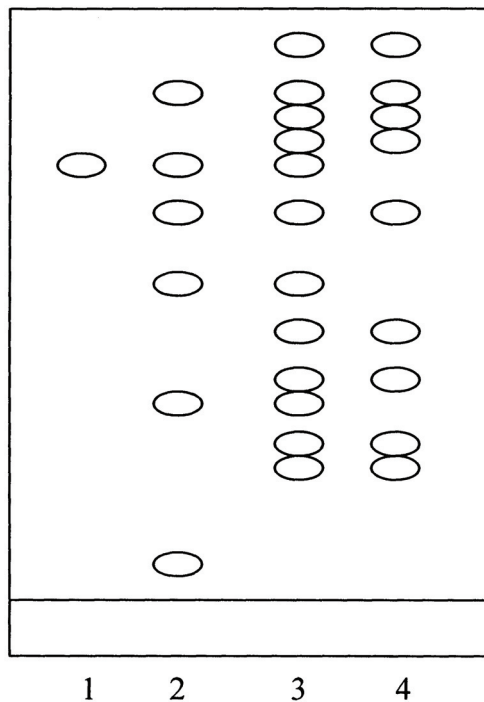


Рис.3 ТШХ-хроматограма досліджуваних розчинів:
 1 – стандартний розчин вітексину; 2 – екстракт плодів глоду;
 3 – рослинна суміш з глодом №1; 4 – рослинна суміш без глоду №1

В и с н о в к и

1. За допомогою методу ВЕРХ розроблено методику визначення вітексину та вітексин-2-О-рамнозиду в сировині плодів глоду.

2. Проаналізовано 7 серій лікарських засобів плодів глоду різних вітчизняних виробників. В усіх пробах були ідентифіковані та кількісно визначені вітексин та вітексин-2-О-рамнозид, вміст яких перебував у межах від $0,00424 \pm 0,00015$ % до $0,00807 \pm 0,00038$ % та від $0,00296 \pm 0,00009$ % до $0,00623 \pm 0,00032$ % у перерахунку на висушену сировину відповідно.

3. За допомогою методу ТШХ розроблено методику визначення вітексину як маркеру плодів глоду у багатокомпонентних рослинних сумішах. Встановлено, що за наявності та вмістом флавоноїду вітексину плоди глоду можна стандартизувати в сумішах з такою рослинною сировиною: травою кропиви собачої, листям кропиви дводомної, травою деревію звичайного, квітками арніки гірської, травою звіробою звичайного та листям меліси лікарської.

1. Компендиум. Лекарственные препараты 2007: т. 1. / Под ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. – К: Моріон, 2007. – 1128 с.

2. Компендиум. Лекарственные препараты 2007: т. 2. / Под ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. – К: Моріон, 2007. – 1126 с.

3. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. Гродзінський А. М. – К.: Головна ред. УРЕ, 1989. – 544с.

4. Универсальная энциклопедия лекарственных растений /Сост. Путьрский И., Прохоров В. – М.: «Дом». – 2000. – 656 с.

5. Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Товмасын Э.К., Хованская Н.П., Воловик В.Г., Георгиевский В.П. // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 27–35.

6. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Х.: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

7. Li C., Wang M. // Nutr. Res. Pract. – 2011. – Vol. 5(2). – P. 101–106.

8. Elango C., Devaraj S. // J Neuroinflammat. – 2010. – Vol. 7. – P. 97–109.

9. *Ying X., Wang R, Xu J, Zhang W, Li H, Zhang C, Li F.* // J. Chromatogr. Sci. – 2009. – Vol. 47(3). – P. 201–205.
10. *Cheng S., Qiu F., Huang J., He J.* // J. Sep. Sci. – 2007. – Vol. 30(5). – P.717–721.
11. *Гудзенко А.В., Цуркан О.О., Ковальчук Т.В.* // Фармацевтичний журнал. – 2010. – № 5. – С. 70–74.
12. *Ковальчук Т.В., Цуркан О.О., Гудзенко А.В., Колядич О.П., Бурмака О.В.* // Фармацевтичний журнал. – 2010. – №4. – С. 92–95.

Надійшла до редакції 30.05.2011.

А.В.Гудзенко, А.А.Цуркан, Т.В.Ковальчук

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПЛОДОВ БОЯРЫШНИКА

Ключевые слова: плоды боярышника, витексин, витексин-2-О-рамнозид, ВЭЖХ, многокомпонентные растительные смеси, ТСХ

С применением метода ВЭЖХ разработана методика определения витексина и витексин-2-О-рамнозида в плодах боярышника. С использованием разработанной методики проанализированы 7 серий плодов боярышника разных производителей. С применением метода ТСХ разработана методика стандартизации плодов боярышника в многокомпонентных растительных смесях.

А.В.Гудзенко, О.О.Тсуркан, Т.В.Ковальчук

THE STUDY OF DRUGS HAWTHORN BERRIES

Key words: Hawthorn berries, vitexin, vitexin2-O-rhamnoside, HPLC, multicomponent plant composition, TLC

S U M M A R Y

Using HPLC method developed method for determination of vitexin and vitexin2-O-rhamnoside in hawthorn berries. With the developed method are analyzed 7 series hawthorn berries from different manufacturers. Using the method of TLC developed a method of standardization of hawthorn berries in multicomponent plant compositions.