

В.К. Яковенко

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ПРЕПАРАТУ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ КЛІМАСЕД

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: аналіз, хроматографія, трава пасифлори, трава материнки, трава меліси, листя шавлії, квітки липи, Клімасед.**Ключевые слова:** анализ, хроматография, трава пассифлоры, трава душицы, трава Melissa, листья шалфея, цветки липы, Климасед.**Key words:** analysis, chromatography, passionflower herb, oregano herb, Melissa herb, sage leaves, linden flowers, Climased.

Наведено результати хроматографічного (ТШХ, ПХ) і якісного вивчення хімічного складу мононастоюнок трави пасифлори, трави материнки, трави меліси, листя шавлії, квіток липи, а також крапель складних Клімасед. Доведено вміст полісахаридів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, кумаринів, терпеноїдів та алкалоїдів у мононастоюнках і Клімаседі.

Приведены результаты хроматографического (ТШХ, БХ) и качественного изучения химического состава мононастооек травы пассифлоры, травы душицы, травы Melissa, листьев шалфея, цветков липы, а также капель сложных Климасед. Доказано содержание полисахаридов, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, кумаринов, терпеноидов и алкалоидов в мононастоюнках и Климаседе.

This work contains results of chromatographic and qualitative study of the chemical composition of mono tinctures of passionflower herb, oregano herb, Melissa herb, sage leaves, linden flowers as well as complex drops Climased. We proved the presence of polysaccharides, hydroxycoric acids, flavonoids, coumarins, terpenoids and alkaloids in mono tinctures and Climased.

Комплексні фітопрепарати характеризуються потенціалом природності, наближеності до організму людини, що зумовлює особливості, урахування яких є необхідним у процесі експериментального й клінічного дослідження. Нині виділено, вивчено й синтезовано багато речовин з рослинної лікарської сировини, проте з численної групи рослин окремих діючих елементів, які б повністю відповідали за ефект комплексного препарату, виділити не вдається. Дослідження такого роду дозволяють визначати об'єкти стандартизації фітопрепарату, як необхідного компонента нормативно-технічної документації. Цю роль і виконує речовина (або група речовин), найбільш близька за ефективністю до комплексного фітопрепарату. Важливо враховувати, що його активність не завжди корелює з концентрацією біологічно активних речовин. Тобто, при розробці нормативно-технічної документації потрібно передбачити досить широкий (але обґрунтований) інтервал концентрацій речовин, що складають об'єкт стандартизації. Крім того, все більш очевидною стає необхідність біологічного контролю за ефективністю комплексних фітопрепаратів, що випускаються. Першим кроком при стандартизації нового фітопрепарату є вивчення його якісного складу і визначення речовин, що забезпечують терапевтичну дію.

МЕТА РОБОТИ

Вивчення якісного складу настойки Клімасед і розробка методів контролю для проведення ідентифікації препарату.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження стали складна настойка Клімасед і рослинна сировина, що входить до її складу – трава пасифлори, материнки, меліси, листя шавлії та квітки липи, з яких 40% етанолом отримано настойки у співвідношенні 1:10 [1].

Для встановлення якісного складу використано загальноприйняті методи досліджень: якісні реакції, паперову хроматографію (ПХ) та тонкошарову хроматографію (ТШХ) [2–5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Хімічний склад лікарської рослинної сировини (ЛРС), що входить до складу Клімаседу, досить широкий: флавоноїди, терпеноїди, сапоніни, вітаміни, полісахариди, кумарини, дубильні речовини, органічні та тритерпенові кислоти, алкалоїди тощо. З даних прогнозу фармакологічної активності за програмою PASS (Prediction of Activity spectra of substances) визначено групи біологічно активних речовин, що мають найбільший внесок у сумарний лікувальний ефект настойки Клімасед.

Оскільки у якості екстрагенту використано етиловий спирт невисокої концентрації (40%), отримані настойки можуть містити *полісахариди*. Для визначення наявності їх класу настойки упарювали до водного залишку й додавали трьохкратну кількість 96% етанолу. У всіх настоянках утворювався аморфний осад, що свідчить про наявність у сировині та настоянках полісахаридів [3].

Наявність *гідроксикоричних кислот і їх похідних* вивчали двомірною ПХ в системах н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2) і 15% оцтова кислота з вірогідним зразком хлорогенової кислоти (Sigma Chemical Company, США), а також методом ТШХ у системі етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (14:1:1:1). Настойки упарювали до водного залишку й фракціювали етилацетатом. Для хроматографування використовували етилацетатні фракції отриманих водних залишків настоек. Сполуки етилацетатної фракції на хроматограмі дають позитивну реакцію з розчином хлориду заліза (III), що свідчить про їх фенольну природу. Сіро-зелений колір, що утворюється при цьому, доводить наявність у молекулах ортодіоксигрупи. З розчином бромкрезолового зеленого ці сполуки набувають синьо-зеленого забарвлення, що підтверджує їх кислотну природу. При хроматографуванні речовини етилацетатної фракції мають в УФ-світлі блакитне забарвлення різної інтенсивності, що посилюється або



змінюється на зелено-блакитне під впливом парів аміаку. Це характерно для похідних коричної кислоти [2,5]. У такий спосіб у настоянках ідентифіковано не менше 3 похідних гідроксикоричної кислоти, в тому числі хлорогенову кислоту (рис. 1).

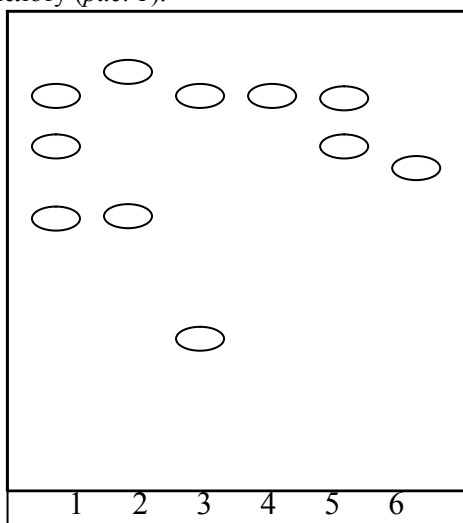


Рис. 1. Схема хроматограми гідроксикоричних кислот складної настойки Клімасед (1), настоянок трави пасифлори (2), материнки (3), меліси (4), листя шавлії (5), квіток липи (6) у системі етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (14:1:1:1).

Крім того, на УФ-спектрах індивідуальних настоянок і препарату Клімасед спостерігається поглинання при 315–330 нм, що характерно для гідроксикоричних кислот і кумаринів.

Для виявлення кумаринів спирто-водні залишки настоянок фракціонували ефіром. Отримані ефірні витяги хроматографували на папері в системах хлороформ–формамід (3:1), гексан–формамід (3:1) і на пластинках Silicagel 60 F 254 (Merck) в системі бензол–етилацетат (3:2). При перегляді хроматограм у фільтрованому УФ-світлі й обробці 10% спиртовим розчином калію гідроксиду та діазореактивом виявлено не менше 4 речовин кумаринової природи.

Для диференціації виявлених речовин кумаринової природи від похідних коричної кислоти проведено реакцію відщеплення різних замісників у кумариновому ядрі йодистоводневою кислотою в середовищі рідкого фенолу і оцтового ангідриду [6].

Для цього ефірні витяги упарювали до видалення розчинників, а залишок змішували з 3 мл суміші кислоти йодистоводневої, рідкого фенолу й оцтового ангідриду, взятих у співвідношенні (6:1:1). Колбу зі зворотним холодильником нагрівали на гліцериновому огрівнику до 130–135°C протягом 2 годин. Реакційну суміш охолоджували, розбавляли водою до об'єму 50 мл, переносили в подільчу лійку, двічі обробляли етилацетатом по 0,1 мл і хроматографували на папері в системі гексан–формамід (3:1) паралельно з достовірним зразком кумарину. Після хроматографування хроматограму висушували й оброблювали 10% спиртовим розчином калію гідроксиду, проглядали в УФ-світлі. При цьому виявлено пляму з блакитно-зеленою флуоресценцією, що збігається за значенням R_f і кольором флуоресценції з достовірним зразком кумарину (Sigma Chemical Company, США). Це свідчить про наявність у досліджуваній

сировині речовин кумаринової природи [6,7].

Наявність флавоноїдів визначено у водно-спиртових настоянках за допомогою загальновідомих якісних реакцій: ціанідинової проби за Бріантом, реакції з 3% розчином хлориду заліза. За результатами реакцій зроблено висновок про наявність глікозидів флавоноїдної природи [2,3,8,9].

Крім того, речовини флавоноїдної природи виявляли ПХ етилацетатних фракцій настоянок у класичних системах н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2) і хлороформ–оцтова кислота–вода (13:6:2), а також ТШХ у системі етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (100:11:11:26). Наявність цієї групи сполук виявлено за флуоресценцією в УФ-світлі до і після обробки хроматограм парами аміаку та борно-цитратним реактивом. Встановлено, що в настоянках міститься не менше 4 сполук флавоноїдної природи.

Хроматографічний аналіз індивідуальних настоянок і складної настойки Клімасед показав, що система етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (100:11:11:26) забезпечує кращий розподіл речовин флавоноїдної природи, ніж класичні системи.

У якості розчину порівняння використовували розчин, що містить 1 мг рутину і 3 мг ізокверцитрину [21637-25-2] (кверцетин-3-β-D-глюкозид, Fluka, BioChemika, №17793) у 10 мл метанолу.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносили 15 мкл препарату Клімасед та індивідуальних настоянок, 10 мкл розчину порівняння. Пластинку сушили на повітрі протягом 5 хв, поміщували у камеру з сумішшю розчинників: етилацетат–мурашина кислота безводна–оцтова кислота льодяна–вода (100:11:11:26). Коли фронт розчинників проходив близько 11 см від лінії старту, пластинку виймали з камери, сушили на повітрі протягом 10 хв. Після цього її обприскували борно-цитратним реактивом, нагрівали при температурі від 100 до 105°C протягом 3 хв і переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. Результати хроматографування наведено на рис. 2.

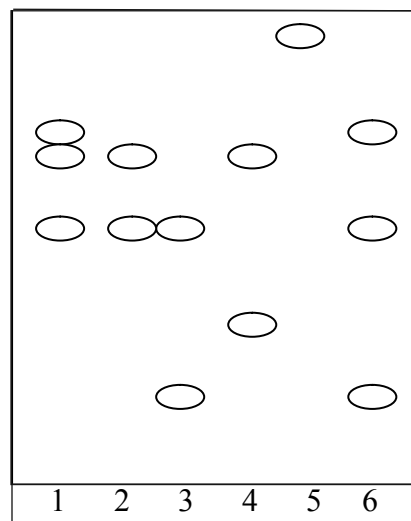


Рис. 2. Схема хроматограми флавоноїдів складної настойки Клімасед (1), настоянок трави пасифлори (2), материнки (3), меліси (4), листя шавлії (5), квіток липи (6) у системі етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (100:11:11:26).

На хроматограмі розчину порівняння проявились рутин ($R_f=0,35$) та ізокверцитрин ($R_f=0,6$) у вигляді зеленувато-жовтих флуоресцентних зон.

На хроматограмі препарату Клімасед проявились 2 зеленувато-жовті флуоресцентні зони, розташовані на рівні зон хроматограми розчину порівняння й приблизно відповідали їм за розміром та інтенсивністю забарвлення (рутин та ізокверцитрин). На хроматограмі препарату також проявились 3 зеленувато-жовті флуоресцентні зони у нижній третині хроматограми та 2 безпосередньо під і над зоною ізокверцитрину, також три блакитні флуоресцентні зони у верхній частині хроматограми.

На хроматограмі препарату також виявлено інші, менш помітні зони.

Отже, у складній настійці Клімасед ідентифіковано 4 речовини флавоноїдної природи з $R_f=0,65$; 0,6; 0,5 і 0,35 відповідно. Аналогічні речовини визначено в індивідуальних настійках трави пасифлори, материнки, меліси, листя шавлії та квіток липи.

Крім того, на УФ-спектрах мононастійок і препарату Клімасед спостерігається поглинання при 350–370 нм, що характерно для бічного фенольного кільця флавоноїдів і вказує на наявність цих речовин.

Оскільки флавоноїди забезпечують седативну і спазмолітичну дію на гладку м'язову тканину [10], що має велике значення для загального терапевтичного ефекту складної настійки Клімасед, при проведенні стандартизації препарату потрібно проводити ідентифікацію флавоноїдів і визначення їх кількісного вмісту.

У розроблених методах контролю якості Клімаседу для ідентифікації флавоноїдів запропоновано використовувати метод ТШХ у системі етилацетат–кислота мурашина–кислота оцтова льодяна–вода (100:11:11:26). У якості речовин-свідків використано розчини ізокверцитрину та рутину. На хроматограмі розчину настійки Клімасед мають виявлятися зеленувато-жовті флуоресцентні зони на рівні зон на хроматограмах розчину ізокверцитрину і розчину рутину.

Терпеноїди. Оскільки для виготовлення складної настійки Клімасед використовують декілька видів ефіромасличних рослин: липа, шавлія, материнка та меліса, проведено ідентифікацію терпеноїдів у складі настійок [10]. Для цього з водних залишків настійок отримували витяги петролейним ефіром, відганяли розчинник, розчиняли в спирті, методом ТШХ хроматографували їх у системі толуол–етилацетат (19:1). Детектування проводили за допомогою сірчанокислого розчину при нагріванні та реактиву ваніліну Р [3,5]. Результати хроматографування наведено на *рис. 3*.

Як розчин порівняння використовували розчин, що містить 1 мг тимолу й 2 мкл цинеолу у 10 мл ацетону.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносили 10 мкл досліджуваного розчину (на відстані не менше 1,5 см від краю) і 5 мкл розчину порівняння (на відстані 1,5 см) й поміщували її у камеру з сумішшю розчинників толуол–етилацетат (19:1). Коли фронт розчинників пройшов 12 см від лінії старту, пластинку виймали з камери і сушили на повітрі до зникнення запаху розчинників.

Пластинку обприскували реактивом ваніліну, нагрівали за температури 100–105°C протягом 3–5 хв і переглядали при денному світлі.

На хроматограмі розчину порівняння проявились слабо рожева $R_f=0,35$ (тимол) і синя плями $R_f=0,7$ (цинеол).

На хроматограмі досліджуваного розчину проявились плями синього й рожевого кольору на рівні відповідних плям тих самих кольорів хроматограми розчину порівняння (тимол, цинеол), а також пляма червоно-фіолетового кольору ($R_f=0,45$) між цинеолом і тимолом (карвакрол). Виявлено й інші, менш помітні плями (*рис. 3*).

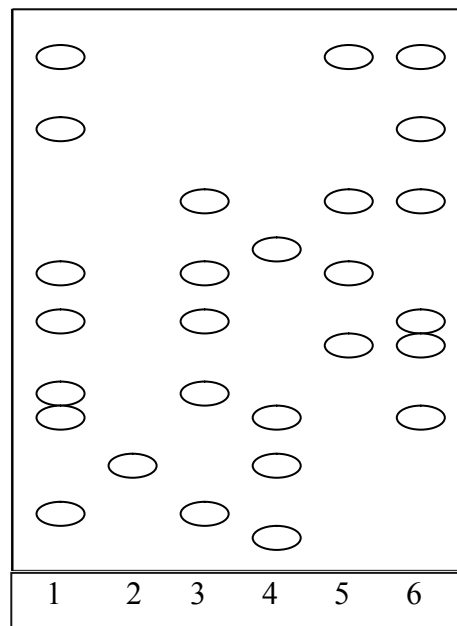


Рис. 3. Схема хроматограми терпеноїдів складної настійки Клімасед (1), настійок трави пасифлори (2), материнки (3), меліси (4), листя шавлії (5), квіток липи (6) у системі толуол Р–етилацетат Р (19:1).

Оскільки терпеноїди мають спектр фармакологічної активності, зокрема забезпечують седативну, антисептичну і спазмолітичну дії [10], що має велике значення для загального терапевтичного ефекту складної настійки Клімасед, ідентифікацію терпеноїдів слід ввести у специфікацію на цей препарат. Для цього запропоновано використовувати метод ТШХ хлороформних витягів препарату у системі розчинників толуол–етилацетат (19:1) за описаною методикою.

Алкалоїди. Оскільки для виготовлення складної настійки Клімасед, згідно пропису, використовують лікарську рослину сировину, що містить індольні алкалоїди (трава пасифлори), проведено ідентифікацію алкалоїдів за допомогою якісних реакцій.

Для цього 5 мл препарату клімасед та індивідуальної настійки упарювали у фарфоровій чашці на водяній бані до об'єму 1–2 мл, охолоджували, додавали 2 мл 2% розчину хлористоводневої кислоти, перемішували скляною паличкою, фільтрували через вату в ділильну лійку на 50 мл і промивали чашку і фільтр 3 мл води. До вмісту ділильної лійки додавали 2 мл розчину аміаку, 3 мл хлороформу, збовтували протягом 3 хв. Після розділення нижній шар переносили



в другу ділильну лійку, а екстракцію повторювали ще з 3 мл хлороформу. До об'єднаних хлороформних екстрактів додавали 2 мл 2% розчину хлористоводневої кислоти і збовтували протягом 3–5 хв. Після відстоювання нижній (хлороформний) шар відкидали, а верхній залишали для проведення ідентифікації алкалоїдів.

До 1 мл отриманого розчину додавали 2 краплі 1% розчину фосфорновольфрамної кислоти (реактив Шейблера), в результаті утворювався світлий аморфний осад.

Оскільки алкалоїди навіть у малих дозах мають значну фармакологічну активність, а у випадку з препаратом Клімасед забезпечують седативну дію [10], при стандартизації препарату необхідно проводити їх ідентифікацію.

ВИСНОВКИ

Вивчено якісний склад настойки Клімасед, де хроматографічними методами і якісними реакціями доведено наявність полісахаридів, кумаринів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, терпеноїдів та алкалоїдів.

Підтверджено наявність у складній настойці Клімасед біологічно активних речовин, що виявляються й в індивідуальних настойках кожного виду лікарської рослинної сировини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
2. Блажей А. Фенольные соединения растительного происхождения / А. Блажей, Л. Шутый – М.: Мир, 1977. – 240 с.
3. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.
4. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам анализа: В 2-х ч. / Под ред. О. Микеши – М.: Мир, 1982. – 781 с.
5. Хроматография. Практическое приложение метода: В 2-х ч., ч. 1 / Э. Хефтман, Т. Кастер, А. Нидервизер и др. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
6. Гиоргобиани Э.Д. Действие йодистоводородной и хлористоводородной кислот на природные кумарины / Э.Д. Гиоргобиани, Н.Ф. Комиссаренко // Сообщ. АН ГрССР. – 1969. – Т. 32, №2. – С. 265–268.
7. Кузнецова Г.А. Природные кумарины и фурукумарины – Л.: Наука, 1967. – 248 с.
8. Георгиевский В.П. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений / В.П. Георгиевский, А.И. Рыбаченко, А.Л. Козаков – Ростов: Изд-во Ростовского ун-та, 1988. – 131 с.
9. Лазуревский Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазуревский, И.В. Терентьева, А.А. Шампури – М.: Высш. шк., 1996. – 335 с.
10. Ковальов В.М. Фармакогнозия з основами біохімії рослин / В.М. Ковальов, О.І. Павлій, Т.І. Ісакова [та ін.] – Х.: Прапор, 2000. – С. 350, 357, 638.

Відомості про автора:

Яковенко В.К., к. фарм. н., доцент каф. промислової фармації та економіки Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ.

Адреса для листування:

Яковенко Володимир Костянтинович. 61002, м. Харків, вул. Пушкіна, 53.
Тел.: (057) 757 55 49.

Рецензенты: проф. С.И. Коваленко
д. фарм. н. Л.О. Омелянчик
Поступила в редакцию 12.10.2010 г.