



О. Г. Смалюх¹, М. І. Нестер¹, С. В. Сур²

Стандартизація цмину піскового квітів за складом і вмістом флавоноїдів

¹ВАТ «ГАЛИЧФАРМ», м. Львів,
²Корпорація «АРТЕРІУМ», м. Київ

Ключові слова: флавоноїди,
цмину піскового квіти,
ідентифікація, кількісне визначення.

Навели результати ідентифікації флавоноїдів хроматографічними методами (ТШХ і ВЕРХ) та їх кількісного визначення у цмину піскового квітах методом спектрофотометрії. Показали, що склад і співвідношення флавоноїдів у досліджуваних зразках суттєво не відрізняються. Вміст флавоноїдів у цих зразках лікарської рослинної сировини становив від 1,1% до 2,0% у перерахунку на ізосаліпурпузид і суху речовину.

Стандартизація бессмертника песчаного цветков по составу и содержанию флавоноидов

О. Г. Смалюх, М. И. Нестер, С. В. Сур

Приведены результаты идентификации флавоноидов хроматографическими методами (ТСХ и ВЭЖХ) и их количественного определения в бессмертника песчаного цветках методом дифференциальной спектрофотометрии. Показано, что качественный состав флавоноидов в образцах цветков бессмертника песчаного существенно не отличается. Содержание флавоноидов в исследованных образцах растительного сырья составляет от 1,1% до 2,0% в пересчете на изосалипурпузид и сухое вещество.

Ключевые слова: флавоноиды, цветки бессмертника песчаного, идентификация, количественное определение.

Standardization of helichrysum arenarium flowers ingredients and content of flavonoids

O. G. Smalyukh, M. I. Nester, S. V. Sur

The results of the flavonoids identification by chromatographic methods (TLC and HPLC) and its quantitative determination by differential spectrophotometry into flowers helichrysum arenarium are represented. It is shown that the qualitative composition of flavonoids in flowers of helichrysum arenarium samples did not differ. It is shown that the flavonoid content in the samples was ranged from 1,1 % to 2,0 % calculated as izosalipurpuzid.

Key words: flavonoids, flowers helichrysi arenarii, identification, assay.

Для розробки готового рослинного лікарського засобу (ГРЛЗ) із передбаченою терапевтичною активністю дуже важливо регламентувати якість лікарської рослинної сировини (ЛРС), з якої він вироблятиметься. Одним із найважливіших етапів стандартизації ЛРС є встановлення якісних і кількісних характеристик її біологічно активних речовин (БАР) або маркерів [1].

У медичній практиці квіти цмину піскового (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) застосовують для виробництва готових лікарських засобів жовчогінної дії. Фармакологічну дію цього виду ЛРС зумовлюють флавоноїди, дубильні, гіркі та інші біологічно активні речовини [2,4]. Флавоноїди (ізосаліпурпузид, нарінгенін і його 5-глюкозиди саліпурпузид, геліхризин; флавонол – апігенін і його 7-глюкозиди; флавонол – кемферол і його 3-глюкозиди) вважають основними діючими речовинами, з якими пов'язують жовчогінну дію лікарських засобів, отриманих із цмину піскового квітів [2,4].

При стандартизації цмину піскового квітів виникають проблеми, що пов'язані з різноманітністю виявлених у них класів фенольних сполук. Так, згідно з монографією «Квітів бессмертника піщаного», котра ввійшла до Державної Фармакопеї XI видання, кількісно флавоноїди визначають методом прямої спектрофотометрії, вимірюючи оптичну густину на плечі кривої світлопоглинання ($\lambda = 315$ нм), що призводить до суттєвого завищення результатів через адитивність оптичної густини, а отже, врахування поглинання інших БАР.

Мета роботи

Вивчення складу флавоноїдів у зразках ЛРС цмину піскового квітів за допомогою хроматографічних методів аналізу, їхнє кількісне визначення та обґрунтування вимог до ідентифікації і кількісного вмісту на основі даних, які отримали під час дослідження різних зразків ЛРС, зібраної у різні роки у багатьох регіонах України.

Матеріали і методи дослідження

Для дослідження використовували зразки цмину піскового квітів (с.010101, с. 020202, с. 010711, с. 010102, с. 060210, с. 251008, с. 060625, с. 361109, с. 014111), що зібрані в 2009–2012 рр. Для дослідження обрали зразки ЛРС, зібраної у західних та центральних регіонах України (Хмельницька та Вінницька обл., зразки 1–6) та південного регіону (Херсонська та Миколаївська обл., зразки 7–8). Зібрані у травні–липні суцвіття бессмертника піщаного висушували повітряно-тіньовим методом до вмісту вологи не більше ніж 12%. Готову сировину зберігали у сухих прохолодних приміщеннях. Термін придатності – три роки. Всі зразки використовували у виробництві екстрактів і готових лікарських засобів, партії – від 2000 до 4000 кг.

Ідентифікацію флавоноїдів у сировині здійснювали методами тонкошарової (ТШХ) та високоефективної рідинної (ВЕРХ) хроматографії.

Для випробування методом ТШХ сировину, подрібнену до розміру частинок, які проходять через сито з

діаметром отворів 5 мм, екстрагували спиртом (50% об/об) під час нагрівання на водяній бані зі зворотним холодильником. Для хроматографування використовували хроматографічні пластинки MERCK Silica gel F₂₅₄ і систему розчинників мурашина кислота безводна – вода – етилацетат (10:10:80). Для проявлення хроматограм використовували розчин 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру в метанолі та 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р. Оцінювали результати шляхом порівняння величин R_f зон на хроматограмі розчину порівняння та випробовуваного розчину. Для приготування розчину порівняння використовували стандартні зразки (Fluka) речовин-свідків: рутин, гіперозид, апігеніну-7-глюкозид, лютеолін, апігенін, ізосаліпурпузид, кверцетин, хлорогенова, цикорієва, кавова, ферулова і розмаринова кислоти.

Під час проведення випробування методом ВЕРХ застосовували розчин стандартних зразків речовин-свідків: хлорогенову, кавову, ферулову, цикорієву і розмаринову кислоти, рутин, гіперозид, апігенін-7-глюкозид, ізосаліпурпузид, лютеолін, кверцетин, нарінгенін, апігенін, кемферол (Fluka). Аналіз виконали на рідинному хроматографі Agilent 1200, хроматографічна колонка XTerra C18, розміром 4,6×250 мм із розміром часток 5 мкм. Рухома фаза А: розчин натрію дигідрофосфату моногідрату 0,6 г/л, доведений до рН 2,5 кислотою фосфорною; рухома фаза В: ацетонітрил. Швидкість рухомої фази – 1 мл/хв, градієнтне елюювання. Детектування виконали за допомогою діодно-матричного детектора при довжині хвилі 330 нм. Об'єм введеної проби – 100 мкл, температура колонки – 25°C, час хроматографування – 60 хв. Ідентифікували речовини шляхом порівняння часів утримування піків на хроматограмі випробовуваного розчину з часами утримування стандартних речовин.

Кількісний вміст флавоноїдів у цмину піскового квітах оцінювали за спектрофотометричним методом. Пробопідготовку сировини виконали згідно з методикою кількісного визначення флавоноїдів, що описана у статті «Квітів безсмертника піщаного» [7]. Після такої пробопідготовки вивчали спектри поглинання отриманих водно-спиртових витягів з алюмінію хлоридом. Як розчин порівняння використовували розчин стандартного зразка ізосаліпурпузиду (Fluka). Вимірювання оптичної густини і записи спектрів поглинання виконали на спектрофотометрі Cary-100 (Varian). Усі використовувані реактиви відповідали вимогам ДФУ, їх розчини готували відповідно до цих вимог [8,9].

Результати і методи дослідження

У результаті аналізу методом ТШХ під час детектування в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм у зразках цмину піскового квітів виявили одинадцять зон із жовто-оранжевою, жовто-зеленою та блакитною флуоресценцією, характерною для фенольних сполук. Через збіг забарвлення та величин R_f зон на хроматограмі розчину порівняння та випробовуваного розчину у зразках ідентифікували хлорогенову і кавову кислоти, апігенін-7-глюкозид, ізосаліпурпузид, лютеолін, апігенін. Фотографії хроматограм наведено на *рис. 1*.

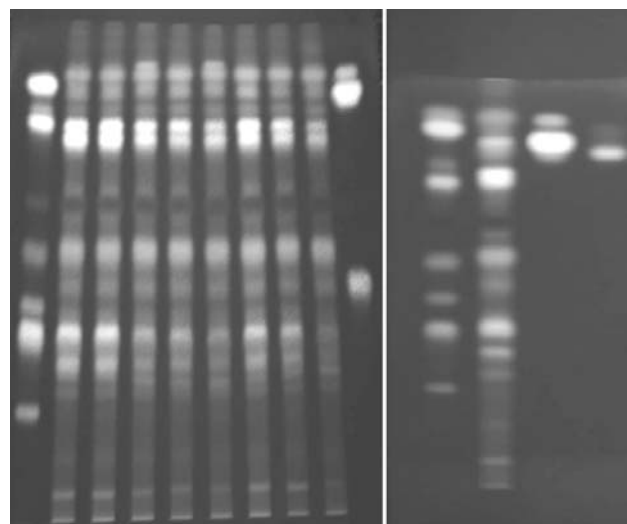


Рис. 1. Фотографії хроматограм, що отримані при ідентифікації флавоноїдів у цмину піскового квітах.

Примітка: А – хроматограма розчину порівняння (рутин, хлорогенова кислота, гіперозид, апігеніну-7-глюкозид, ізосаліпурпузид, цикорієва кислота, лютеолін, знизу вгору); В – хроматограма розчину порівняння (лютеолін-7-глюкозид, кавова кислота, кверцетин, знизу вгору); С – хроматограма розчину порівняння (рутин, хлорогенова кислота, гіперозид, апігеніну-7-глюкозид, ізосаліпурпузид, цикорієва кислота, лютеолін, апігенін, знизу вгору); D – хроматограма розчину порівняння (кавова кислота, кверцетин, знизу вгору); E – хроматограма розчину порівняння (розмаринова кислота, ферулова кислота, знизу вгору); 1–9 – хроматограми спиртових витягів із досліджуваних зразків цмину піскового квітів.

Методом ВЕРХ у зразках цмину піскового квітів через збіг часів утримування піків на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину також ідентифікували хлорогенову, цикорієву і кавову кислоти, апігенін-7-глюкозид, ізосаліпурпузид, нарінгенін, апігенін, кемферол. У випробовуваних зразках 4, 5 і 8 ідентифікували також лютеолін. На хроматограмах усіх зразків, що випробовувалися, спостерігали піки із часом виходу 24,2, 24,9, 30,5 та 31,2 хв. Оцінювання кількісного вмісту кожного ідентифікованого або неідентифікованого компонента виконали методом внутрішньої нормалізації (*табл. 1*), типові хроматограми наведено на *рис. 2.1, 2.2, 2.3*.

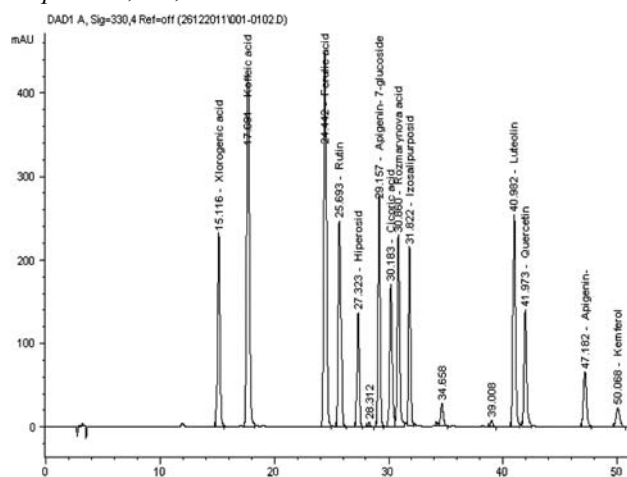


Рис. 2.1. Типова ВЕРХ-хроматограма розчину порівняння.

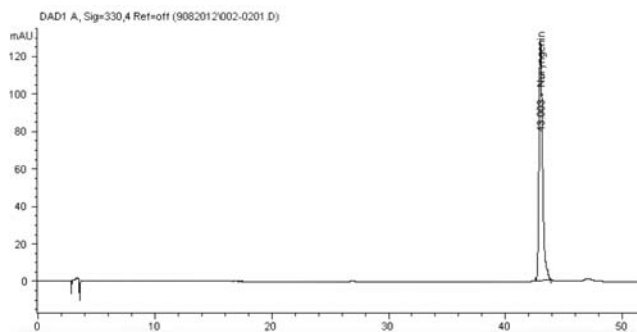


Рис. 2.2. Типова ВЕРХ-хроматограма розчину порівняння нарінгеніну.

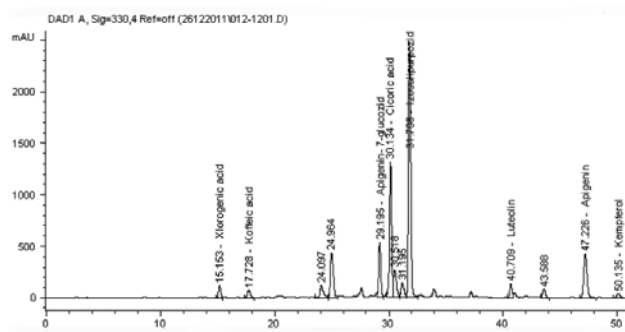


Рис. 2.3. Типова ВЕРХ-хроматограма випробовуваного розчину.

Таблиця 1

Результати ідентифікації флавоноїдів у зразках цмину піскового квітів методом високоефективної рідинної хроматографії

Речовина	Час утримування, хв	Відносний вміст, %									
		Зразок 1 с.010101	Зразок 2 с.020202	Зразок 3 с.010711	Зразок 4 с.060625	Зразок 5 с.014111	Зразок 6 с.251008	Зразок 7 с.010102	Зразок 8 с.361109	Зразок 9 с.060210	
Хлорогенова кислота	15,1	4,6	4,4	3,7	1,8	4,7	8,4	3,5	2,5	3,7	
Кавова кислота	17,7	1,1	1,0	0,7	1,1	1,2	0,9	1,1	1,1	0,7	
Неідентифікований пік	24,2	2,6	2,3	2,4	2,6	2,5	2,3	2,8	2,4	2,4	
Неідентифікований пік	24,9	6,0	7,7	7,4	8,5	6,1	5,6	7,2	7,5	6,9	
Апігенін-7-глюкозид	29,2	5,9	6,3	6,8	7,5	6,6	6,2	6,6	6,4	6,2	
Цикорієва кислота	30,1	16,1	15,6	23,3	18,9	15,9	14,3	17,5	17,1	17,4	
Неідентифікований пік	30,5	6,5	6,6	5,8	5,3	7,6	8,5	6,4	5,5	5,7	
Неідентифікований пік	31,2	3,5	7,6	3,8	2,5	3,7	7,8	2,8	3,6	2,9	
Ізосаліпурпузид	31,8	42,8	38,8	40,0	38,5	38,7	36,9	40,2	40,3	41,5	
Лютеолін	40,7	-	-	-	1,9	1,6	-	-	1,8	-	
Нарінгенін	43,3	1,3	1,2	1,4	1,4	1,0	1,1	1,4	1,4	1,4	
Апігенін	47,2	9,0	7,9	10,5	9,2	9,0	7,1	9,7	8,9	9,3	
Кемпферол	50,1	0,8	1,2	1,4	0,9	0,5	0,6	0,7	1,5	1,4	

Отже, результати ідентифікації методами ТШХ і ВЕРХ підтверджують подібність складу і співвідношення основних компонентів у дев'яти досліджених зразках цмину піскового квітів (за винятком лютеоліну, незначну кількість якого визначили лише у трьох зразках).

За даними рис. 2.1, 2.2, 2.3 і таблиці 1, у зразках цмину піскового квітів, що досліджувалися, найбільшим є вміст ізосаліпурпузиду, котрий і унормований ДФ XI видання [7]. Саме тому ізосаліпурпузид обрали як маркер для ідентифікації та визначення кількісного вмісту флавоноїдів у ЛРС цмину піскового.

Кількісне визначення флавоноїдів виконали методами спектрофотометрії. За обраних умов пробопідготовки випробовуваний розчин, підготовлений для прямої спектрофотометрії шляхом отримання спиртового витягу із сировини, мав два максимуми поглинання при 334 та 295 нм, а розчин порівняння (спиртовий розчин стандартного зразка ізосаліпурпузиду) мав максимум поглинання при 370 нм ($\lambda_{\text{макс}} = 370 \text{ нм}$, рис. 3). У названій ділянці довжин хвиль мають максимуми поглинання інші речовини: хлорогенова кислота – 328 нм, розмаринова кислота – 326 нм, цикорієва кислота – 330 нм, що наявні в досліджуваній сировині й легко екстрагуються спиртом (50% об/об) [3,5,6].

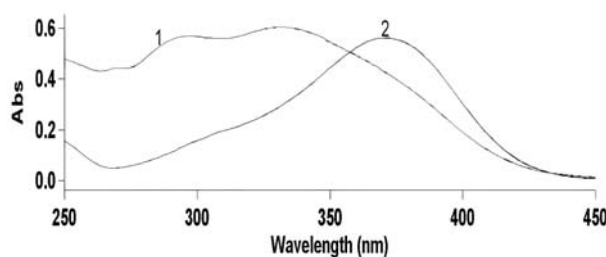


Рис. 3. Електронний спектр поглинання спиртового (50% об/об) витягу із цмину піскового квітів (1) і стандартного зразка ізосаліпурпузиду (2).

У диференційному спектрі поглинання комплекс алюмінію хлориду із флавоноїдами цмину піскового квітів за обраних умов пробопідготовки мав максимум поглинання в діапазоні 412–418 нм, спектр розчину порівняння стандартного зразка ізосаліпурпузиду, котрий отримали за цих самих умов, мав максимум при 418 нм (рис. 4). Коливання положення максимуму поглинання в діапазоні від 412 до 418 нм свідчить про різноманітність і дещо різне співвідношення окремих сполук флавоноїдів цмину піскового квітів у різних зразках сировини, але компонентом, що переважає, є ізосаліпурпузид (табл. 1).

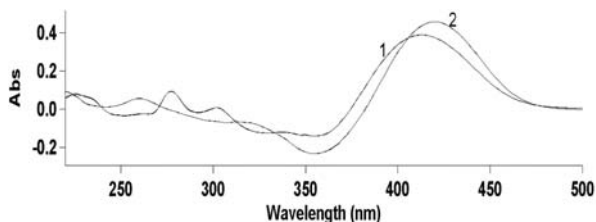


Рис. 4. Диференційний електронний спектр поглинання комплексу алюміній хлориду із флавоноїдами цмину піскового квітів (1) і ізосаліпурпузидом (стандартним зразком) (2).

У результаті дослідження встановили, що сумарний вміст флавоноїдів, визначений у ЛРС цмину піскового квітів, становив від 1,1% до 2,0% у перерахунку на ізосаліпурпузид і суху сировину (табл. 2).

Таблиця 2

Результати визначення вмісту суми флавоноїдів у досліджуваних зразках цмину піскового квітів (P = 0,95; n = 5)

Зразок ЛРС	Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на ізосаліпурпузид і суху сировину, %
1 (с.010101)	1,53 ± 0,02
2 (с.020202)	1,82 ± 0,05
3 (с. 010711)	2,01 ± 0,04
4 (с. 060625)	1,22 ± 0,03
5 (с. 014111)	1,76 ± 0,05
6 (с. 251008)	1,36 ± 0,06
7 (с. 010102)	1,43 ± 0,04
8 (с. 361109)	1,11 ± 0,05
9 (с. 060210)	1,34 ± 0,04

Список літератури

- Guidelines for the assessment of herbal medicines / WHO Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparation. – Thirty-fourth Report. – Geneva: World Health Organization, 1996. – (WHO Technical Report Series, No.863).
- Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзінський. – К.: Голов. ред. УРЕ, 1989. – 544 с.
- Смирнова Л.П. Количественное определение суммы флавоноидов в желчегонном сборе / Л.П. Смирнова, Л.Н. Первых // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33, №3. – С. 37–39.
- Максютина Н.П. Растительные лекарственные средства / Н.П. Максютина, Н.Ф. Комисаренко, А.П. Прокопенко, и др. – К.: Здоров'я, 1985. – 280 с.
- Гриздуб О.І. Особливості фармакопейних підходів щодо

На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що кількісний вміст флавоноїдів у зразках цмину піскового квітів, котрі досліджувалися, істотно не відрізняється, і встановити як кількісний критерій їх вміст не менше ніж 1,0%.

Висновки

1. Методами ТШХ і ВЕРХ у дев'яти зразках цмину піскового квітів, зібраних у різні роки в різних регіонах України, ідентифікували хлорогенову, цикорієву і кавову кислоти, апігенін-7-глюкозид, ізосаліпурпузид, нарінгенін, апігенін, кемферол. Показали, що склад і співвідношення флавоноїдів у досліджуваних зразках, суттєво не відрізняються. У зв'язку із цим запропонували використовувати для ідентифікації ЛРС цмину піскового квітів наявність хлорогенової і цикорієвої кислот, апігенін-7-глюкозиду, ізосаліпурпузиду й апігеніну.

2. Розробили методику кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів із використанням диференційної спектрофотометрії у перерахунку на ізосаліпурпузид.

3. Вміст суми флавоноїдів у дев'яти зразках цмину піскового квітів, відрізнявся незначно в межах 1,1–2,0%. На основі цих результатів запропонували встановити у специфікації на ЛРС вміст флавоноїдів не менше ніж 1,0% у перерахунку на ізосаліпурпузид та суху сировину.

- кількісного визначення лікарської рослинної сировини та сумарних фітопрепаратів / О.І. Гриздуб, О.А. Євтіфеева, К.І. Проскуріна // Фармаком. – 2012. – №3. – С. 7–31.
- Шпичак О.С. Ідентифікація та кількісне визначення фенолкарбонових кислот у препараті «Апісед» методом диференціальної УФ-спектрофотометрії / О.С. Шпичак, О.І. Тихонов // Вісник фармації – 2012. – №3 (71). – С. 32–35.
- Государственная фармакопея СССР. – Выпуск 2. – М., 1990. – С. 244–246.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.

Відомості про авторів:

Смалюх О.Г., начальник аналітичної лабораторії Дослідного центру ВАТ «Галичфарм».
 Нестер М.І., хімік-аналітик аналітичної лабораторії Дослідного центру ВАТ «Галичфарм».
 Сур С.В., д. фарм. н., директор Департаменту з досліджень та розробок корпорації «Артеріум».

Надійшла в редакцію 13.03.2013 р.