



Л.І. Шульга, В.С. Кисличенко, О.Ф. Пімінов

Застосування тривимірної флуоресцентної спектроскопії для якісної ідентифікації складної настойки

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: лікарська рослинна сировина, складна настойка, якісна ідентифікація, тривимірна флуоресцентна спектроскопія.

Наведено результати аналізу флуоресціюючих речовин рослинного засобу «Касдент» та однокомпонентних настоек, отриманих з кожного окремого компонента розробленої складної настойки за допомогою методу тривимірної флуоресцентної спектроскопії. Здійсненими дослідженнями встановлено наявність у розробленому фітозасобі суміші простих фенолів і агліконів флавоноїдів.

Использование трехмерной флуоресцентной спектроскопии для качественной идентификации сложной настойки

Л.И. Шульга, В.С. Кисличенко, А.Ф. Пиминов

Приведены результаты анализа флуоресцирующих веществ лекарственного средства «Касдент» и однокомпонентных настоек, полученных из каждого отдельно взятого компонента разработанной сложной настойки при помощи метода трехмерной флуоресцентной спектроскопии. Проведенным исследованием установлено наличие в разработанном фитосредстве смеси простых фенолов и агликонов флавоноидов.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, сложная настойка, качественная идентификация, трехмерная флуоресцентная спектроскопия.

The use of three-dimensional fluorescence spectroscopy for qualitative identification of complex infusion

L.I. Shulga, V.S. Kislichenko, A.F. Piminov

The article presents results of analysis of fluorescent substances of the remedy Casdent, as well as of single-component tinctures which were obtained from each of the components of the developed complex tincture, by the method of three-dimensional fluorescence spectroscopy. The conducted research ascertained presence of simple phenols and aglycones of flavonoids in the developed remedy.

Key words: plant raw materials, complex tincture, qualitative identification, three-dimensional fluorescent spectroscopy.

Останнім часом першорядного значення набуває пошук і створення нових лікарських препаратів, що характеризуються комплексною лікувально-профілактичною дією, серед яких засоби на основі лікарської рослинної сировини (ЛРС). Вибір об'єктів дослідження слід пов'язувати з потенційними можливостями подальшого практичного використання препарату для лікування запальних захворювань порожнини рота. Тому на основі аналізу публікацій відносно до застосування ЛРС у сучасній стоматології, а також власних експериментальних досліджень обґрунтовано склад фітозасобу «Касдент» [9].

Ефективність застосування комплексних засобів рослинного походження у медичній практиці зумовлює спектр біологічно активних сполук. Розроблена настойка являє собою складну фітокомпозицію, утворену з кореневищ і коренів родовика, кореневищ айру, коренів солодки, і тому поєднує діючі речовини, що належать до різних класів хімічних сполук [12]. Отже, ідентифікація складових рослинного засобу необхідна для визначення основних груп біологічно активних сполук, подальшого встановлення взаємозв'язків «структура – фармакологічна активність» і є виправданою в аспекті передбачення кола фармакологічної дії.

Питанням розробки методів контролю якості лікарських засобів у системі забезпечення якості фармацевтичної продукції постійно приділяється увага. Якісна ідентифікація та кількісне визначення всіх інгредієнтів фітозасобу є складною задачею з огляду вибору методу

аналізу та його інструментального супроводження, що потребує використання досконалих методів і методик стандартизації із застосуванням найсучаснішого обладнання. Дійсно ґрунтовним розв'язанням означених завдань є встановлення біологічно активних сполук за найбільш вагомих або характерним компонентом. З цією метою для розробленого засобу проведені якісні реакції, за результатами яких складено уявлення про основні групи діючих речовин і підтверджено наявність флавоноїдів.

Рослини, що містять флавоноїди, привертають увагу дослідників внаслідок перспективності в отриманні лікарських засобів полівалентної дії [7]. Відомо, що деякі флавоноїди (флаволи, флавоноли, антоціани, ауруни, халкони) належать до групи рослинних пігментів. Антоціани – пігменти, що містяться у клітинному соку багатьох рослин і зумовлюють забарвлення у різні відтінки червоного, синього, фіолетового кольорів, а флаволи – жовтого й оранжевого [4,8]. Якісний аналіз багатокомпонентних сумішей, серед яких субстанції, рослинні екстракти, вилучені ліпофільні сполуки або фракції, лікарські засоби, що містять флуоресціюючі інгредієнти, проводять за допомогою люмінесцентного аналізу [1–3,6,8,10,11]. Для діагностики складу препаратів, у структурі яких є ароматичні кільця, можливе застосування методу флуоресцентного аналізу [5,10].

Мета роботи

Виконати якісну ідентифікацію флуоресціюючих речовин складної настойки «Касдент» порівняно з відпо-

відними сполуками настоек її складових компонентів із застосуванням методу тривимірної флуоресцентної спектроскопії (3-DF-спектроскопії), що дозволить охарактеризувати якість проведення процесу екстракції та оцінити повноту вилучення з ЛРС досліджуваних біологічно активних сполук.

Матеріали і методи дослідження

Матеріал для вивчення – ЛРС (кореневища та корені родовика – *rhizomata et radices Sanguisorbae*, кореневища айру – *rhizomata Calami*, корені солодки – *radices Glycyrrhizae*), придбана через аптечну мережу м. Харкова у листопаді 2011 року.

Об'єкти дослідження – отримані методом мацерації однокомпонентні настоек (настойка кореневищ і коренів родовика, настойка кореневищ айру, настойка коренів солодки) та складна настойка «Касдент», отримана з 3-компонентної рослинної суміші за розробленою технологією. 3-DF-спектри як однокомпонентних настоек, так складної настойки фіксували в ультрафіолетовому та видимому діапазоні за допомогою спектрофлуориметра Hitachi F 4010.

Зняття спектрів розчинів досліджуваних об'єктів та власне розчинника проводили при наступних параметрах вимірювань: інтервал довжин хвиль збудженого світла (excitation) від 220 до 750 нм; діапазон довжин хвиль сканування випромінювання (emission) – 220–800 нм; розчинник – вода очищена. Крок сканування становив 10 нм, а щільності збудження/флуоресценція – 5/5 нм.

Для запобігання перепоглинання флуоресценції речовинами попередньо проводили підготовку всіх досліджуваних зразків настоек: їх розводили розчинником і спектрофотометрично контролювали оптичну густину на приладі Hitachi U 3210.

Подальшу обробку зареєстрованих даних аналізу та будовання 3-DF-спектрів з виглядом поверхні, що

характеризується функцією $I = f(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$, здійснено із застосуванням пакету програмного забезпечення Spectral Data Lab, розробленого на базі Науково-дослідного інституту хімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна.

За допомогою програмного середовища з пакету прикладних програм Excel проводили обробку даних і отримували 3-DF-спектри розчинів об'єктів у вигляді значень інтенсивності флуоресценції зразка у квадратній матриці з осями λ_{exc} , λ_{em} .

Розрахунки проводили за загальною формулою:

$$I = I_{\text{розчину}} - I_{\text{розчинника}} \cdot K,$$

де: I – показник інтенсивності флуоресценції;

$I_{\text{розчину}}$ – інтенсивність флуоресценції розчину досліджуваного об'єкта;

$I_{\text{розчинника}}$ – інтенсивність флуоресценції розчинника;

K – константа.

Тривимірне зображення результуючого 3-DF-спектра отримано в програмі Origin 6.0, у якій за налаштуванням оператора встановлювали розташування осей координат, ціну розподілу та кут нахилу діаграм.

Для кожного тривимірного спектра флуоресціюючих речовин досліджуваних зразків паралельно відображали його логарифмічну проекцію на площину λ_{exc} , λ_{em} , що сприяло вичерпнішому представленню якісного складу настоек.

Результати та їх обговорення

На основі аналізу отриманих тривимірних спектрів скануючої спектрофлуориметрії в настійці кореневищ і коренів родовика (рис. 1) встановлено наявність наступних речовин: агліконів і глікозидів флавонолів, для яких характерні піки у ділянках $\lambda_{exc} = 310\text{--}390$ нм, $\lambda_{em} = 400\text{--}540$ нм; жовтогарячого пігменту, який може бути представником флавонів, з притаманними піками в ділянках $\lambda_{exc} = 460\text{--}530$ нм, $\lambda_{em} = 520\text{--}600$ нм.

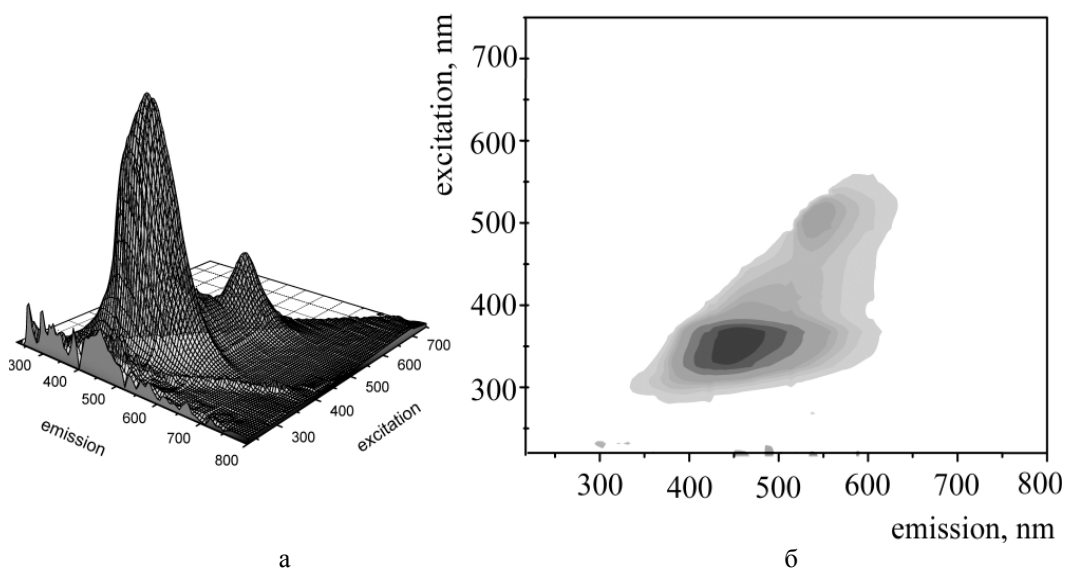


Рис. 1. Тривимірний спектр (а) та його логарифмічна проекція на площину збудження/емісії (б) для настойки кореневищ і коренів родовика.

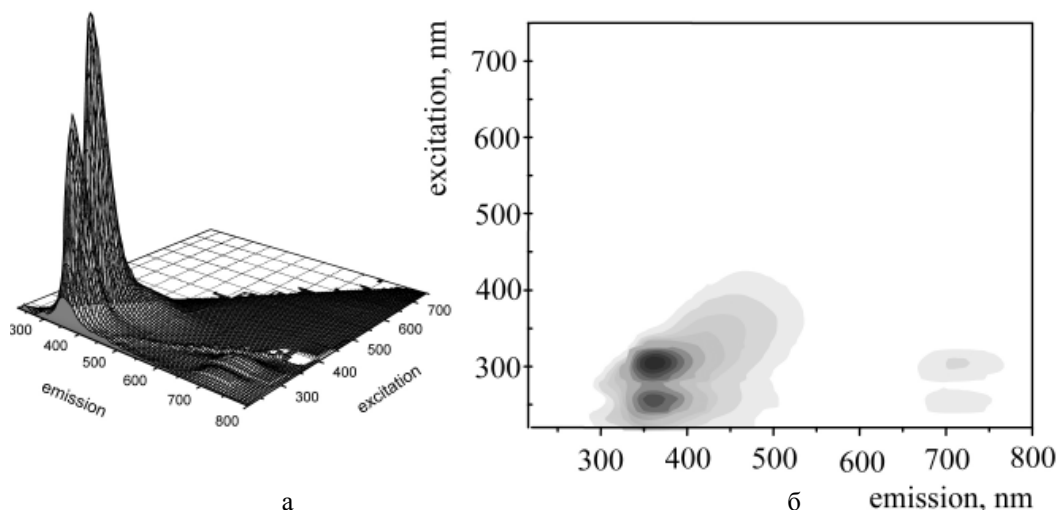


Рис. 2. Тривимірний спектр (а) та його логарифмічна проекція на площину збудження/емісії (б) для настоянки кореневищ айру.

На рис. 2 наведено 3DF-спектр з проекцією на площину (λ_{exc} , λ_{em}) наступного об'єкту дослідження – настоянки кореневищ айру. Експериментально визначено двосмугасту флуоресціюючу сполуку, довгохвильова смуга випромінювання якої мала аномально високий Стоксів зсув – близько 18000 cm^{-1} .

Виявленій речовині притаманні два інтенсивних піки у діапазоні довжин хвиль збудженого світла ($\lambda_{exc} = 240\text{--}270, 280\text{--}320\text{ nm}$) та випромінювання ($\lambda_{em} = 330\text{--}410, 680\text{--}740\text{ nm}$).

На рис. 3 відображена проекція тривимірного спектру флуоресценції на площину (λ_{exc} , λ_{em}) настоянки коренів

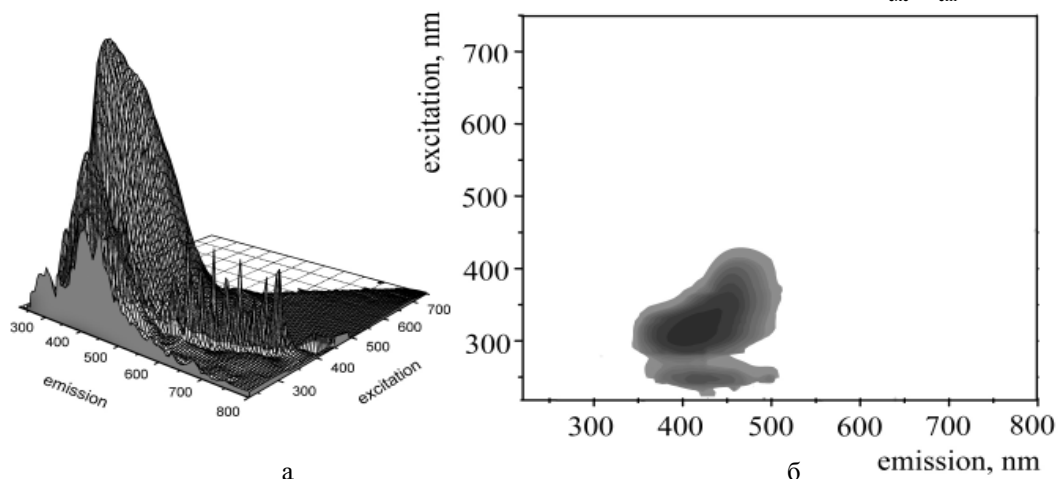


Рис. 3. Тривимірний спектр (а) та його логарифмічна проекція на площину збудження/емісії (б) для настоянки коренів солодки.

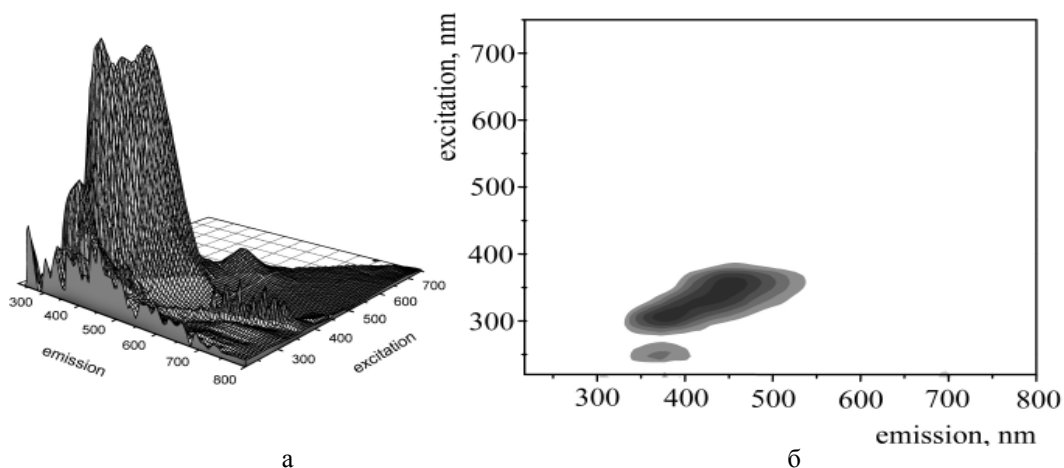


Рис. 4. Тривимірний спектр (а) та його логарифмічна проекція на площину збудження/емісії (б) для складної настоянки.

солодки, а також його логарифмічна проекція. Аналізом 3-DF-спектра цієї настойки встановлено піменти з характерними піками у ділянках $\lambda_{\text{exc}} = 240\text{--}270$, $280\text{--}400$ нм та $\lambda_{\text{em}} = 360\text{--}500$ нм, властиві для суміші простих фенолів.

Використання методу тривимірної флуоресцентної спектроскопії для якісної ідентифікації пігментних речовин складної настойки (рис. 4) дозволило встановити піки в області збудження $\lambda_{\text{exc}} = 240\text{--}270$, $280\text{--}340$ нм і випромінювання у діапазоні $\lambda_{\text{em}} = 340\text{--}420$ нм. Зазначені піки свідчать про наявність у рідкій лікарській формі суміші простих фенолів, наявність яких визначено спектральним аналізом настойки солодки.

Також у комплексному фітозасобі виявлено піки в інтервалах збудження $\lambda_{\text{exc}} = 340\text{--}370$ та випромінювання $\lambda_{\text{em}} = 420\text{--}500$ нм, характерні для агліконів флавоноїдів, наявних у кореневищах і коренях родовика.

Наведені факти опосередковано свідчать про якість технологічного процесу отримання екстракційного засо-

бу, оскільки підтверджують наявність і характеризують вилучення з кореневищ і коренів родовика та коренів солодки флуоресціюючих біологічно активних сполук.

Результати аналізу передбачені та відповідають очікуваним. У складній настойці не виявлено сполуку, яку відзначали при дослідженні об'єкта – настойка кореневищ айру, що може бути пояснено найменшою часткою цього виду ЛРС у складі розробленої фітокомпозиції.

Висновки

Вперше визначено флуоресціюючі речовини рослинних об'єктів – настойки кореневищ і коренів родовика, настойки кореневищ айру, настойки коренів солодки і складної настойки «Касдент» методом тривимірної флуоресцентної спектроскопії.

Отримано тривимірні спектри та їх логарифмічні проекції на площину збудження/емісії для всіх досліджуваних рослинних об'єктів, проаналізовано зареєстровані діапазони піків, висвітлено їх кореляційні зв'язки з групами біологічно активних сполук.

Список літератури

1. Дослідження ліпофільної фракції з листя *Iris pseudacorus* / О.О. Затильнікова, С.В. Ковальов, Т.П. Осолодченко, Е.Ю. Ахмедов // Вісник фармації. – 2012. – №3. – С. 57–59.
2. Карпюк У.В. Дослідження ліпофільного екстракту надземної частини сої щетинистої / У.В. Карпюк, В.С. Кисличенко // Український медичний альманах. – 2010. – Т.13, №4. – С. 93–95.
3. Ліпофільні сполуки *Populus tremula* L. / В.М. Ковальов, Н.В. Бородіна, А.М. Рудник, В.В. Альхусейн // Фармацевтичний часопис. – 2008. – №2. – С. 51–56.
4. Пасемків Ю.А. Аналіз пігментного складу трави змієголовника великоквіткового (*Dracopis grandiflorum* L.) / Ю.А. Пасемків, М.І. Шанайда // Медична хімія. – 2010. – Т. 12, №1. – С. 57–59.
5. Разностная флуоресцентная спектроскопия структуры и состава биоактивных препаратов / Ю.П. Войнов, В.С. Горелик, М.Ф. Умаров, С.В. Морозова // Краткие сообщения по физике ФИАН. – 2011. – №11. – С. 13–19.
6. Тернинко І.І. Фітохімічне вивчення ліпофільних фракцій з трави *Calendula officinalis* (L.) та *Chamomilla recutita* (L.) / І.І. Тернинко, В.С. Кисличенко // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2011. – №3. – С. 82–85.
7. Чекман І.С. Флавоноїди: фармакотерапевтичний аспект / І.С. Чекман, І.В. Завалько // Фітотерапія. Часопис. – 2008. – №1. – С. 3–11.
8. Шанайда М.І. Пігментний склад надземної частини *Monarda fistulosa* L. / М.І. Шанайда, С.М. Марчишин // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – №2. – С. 31–32.
9. Шульга Л.І. Розробка складу рідкої лікарської форми для терапевтичної стоматології / Л.І. Шульга // Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація. – 2011. – №1–2. – С. 161–165.
10. Ulu S.T. Spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in pharmaceutical preparations / S.T. Ulu // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – Vol. 72, №1. – P. 138–143.
11. Using three-dimensional fluorescent spectroscopy while studying drugs on the basis of apiculture products / A.M. Kotenko, A.I. Tikhonov, Yu.V. Chernykh [et al.] // Pharmacia. – 2007. – Т. LIV, № 3–4. – P. 3–8.
12. Shulga L.I. Experimental substantiation of herb material selection in the making of complex tincture for periodontics / L.I. Shulga, S.V. Biriukova, O.F. Piminov // Annals of Mechnikov Institute. [Електр. ресурс]. – 2011. – №1. – P. 30–33.

Відомості про авторів:

Шульга Л.І., к. фарм. н., доцент каф. загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ.

Кисличенко В.С., д. фарм. н., професор, зав. каф. хімії природних сполук НФаУ.

Пімінов О.Ф., д. фарм. н., професор, зав. каф. загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ, директор ІПКСФ НФаУ.

Надійшла в редакцію 30.10.2012 р.