

Рекомендована д.ф.н., професором О.П.Хворост

УДК 615.32:615.453.3:543.544

ХРОМАТОГРАФІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГРАНУЛ НА ОСНОВІ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ

С.В.Спиридонов, А.Г.Котов

Національний фармацевтичний університет
Державне підприємство «Фармакопейний центр України»

З метою розробки методик контролю якості препарату у вигляді гранул під умовною назвою «ШКТ-1» для застосування у гастроентерології проведені дослідження з ідентифікації деяких характерних біологічно активних сполук ЛРС, що входять до його складу.

Останнім часом велика увага приділяється препаратам на основі нативної лікарської рослинної сировини (ЛРС), які мають високу біодоступність, широту та м'якість дії, малу кількість баластних допоміжних речовин або ж їх відсутність [2].

На теперішній час на ринку України спостерігається нестача таких лікарських засобів для лікування гастроентерологічних захворювань, що спонукало нас до розробки препарату на основі ЛРС у вигляді гранул під умовною назвою «ШКТ-1», який містить у своєму складі цмину квітки, кукурудзяні рильця, гіркокаштану насіння, хвоща стебла, спориш, солодки голої коріння та висівки пшеничні.

Невід'ємною частиною роботи зі створення препарату є розробка методик його ідентифікації за допомогою краплинних реакцій, а також різних хроматографічних методів. Мета даної роботи – дослідження гранул «ШКТ-1» за допомогою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) для визначення можливості ідентифікації та подальшого введення даних методик у нормативну документацію.

Експериментальна частина

Дослідження проводили за допомогою методу ТШХ висхідним способом на пластинах «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» та використовували методики, наведені в монографіях фармакопей [3, 4, 5, 10], а також у довідкових виданнях [6, 9, 18].

Випробовувані розчини (спиртові розчини споришу, хвоща стебел, солодки коренів, гіркокаштану насіння) і розчини порівняння (спиртові розчини гіперозиду, рутину, ізосаліпурпозиду, кислот: гліциретинової, кавової і хлорогенової, есцину) готували, як зазначено у відповідних монографіях або статтях на ЛРС.

До складу препарату входить ЛРС, що містить похідні фенілпропану і дифенілпропану. Для визначення даного класу сполук використовували систему розчинників, таких як кислота мурашина – кислота оцтова льодяна – вода дистильована – етилацетат у

співвідношенні 8:7:13:72. Ця система розчинників обрана після попередніх досліджень спиртових розчинів ЛРС і розчинів порівняння як система, що дає незначні відмінності в хроматографічному профілі в порівнянні з описаною в тій чи іншій монографії на дані класи сполук. В якості розчинів порівняння були використані спиртові розчини вищеописаних флавоноїдів та фенілкарбонових кислот. Детектування проводили в денному, УФ-світлі ($\lambda = 365, 254$ нм) до і після обробки хроматограм спиртовим розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі.

Для визначення сапонінів насіння каштану кінського (по есцину) в якості рухомої фази використовували верхню фазу суміші: кислота оцтова (98%) Р – вода дистильована – 1-бутанол Р у співвідношенні 10:40:50. В якості розчину порівняння використовували есцин. Обприскування пластин проводили спиртовим розчином анісового альдегіду. Після нагрівання хроматограми розглядали в денному світлі.

Для визначення тритерпенових глікозидів коренів солодки в якості системи розчинників використовували розчин: аміак концентрований – вода дистильована – спирт етиловий – етилацетат у співвідношенні 1:9:25:65. Розчин порівняння – спиртовий розчин гліциретинової кислоти. Обприскування пластин проводили також спиртовим розчином анісового альдегіду. Після нагрівання хроматограми розглядали в денному світлі.

Результати та їх обговорення

Порівняння ідентифікованих зон на випробовуваних розчинах проводили відносно зон розчинів порівняння. Кислота кавова (рис. 1, поз. 22) виявляється у вигляді синьо-блакитної зони у верхній частині хроматографічної пластини недалеко від лінії фінішу. Дещо нижче за неї виявляється жовто-оранжева зона, яка відповідає ізосаліпурпозиду (рис. 1, поз. 23). У середній частині хроматографічної пластини виявляється жовто-коричнева зона, яка відповідає гіперозиду (рис. 1, поз. 24). Нижче за неї виявляється світло-блакитна зона, яка відповідає кислоті хлорогеновій (рис. 1, поз. 25), а нижче – жовто-коричнева зона, яка відповідає рутину (рис. 1, поз. 26).

На хроматограмі розчину хвоща стебел виявляються наступні зони (в УФ світлі, $\lambda = 365$ нм): дві червоні флюоресціюючі у верхній частині хромато-

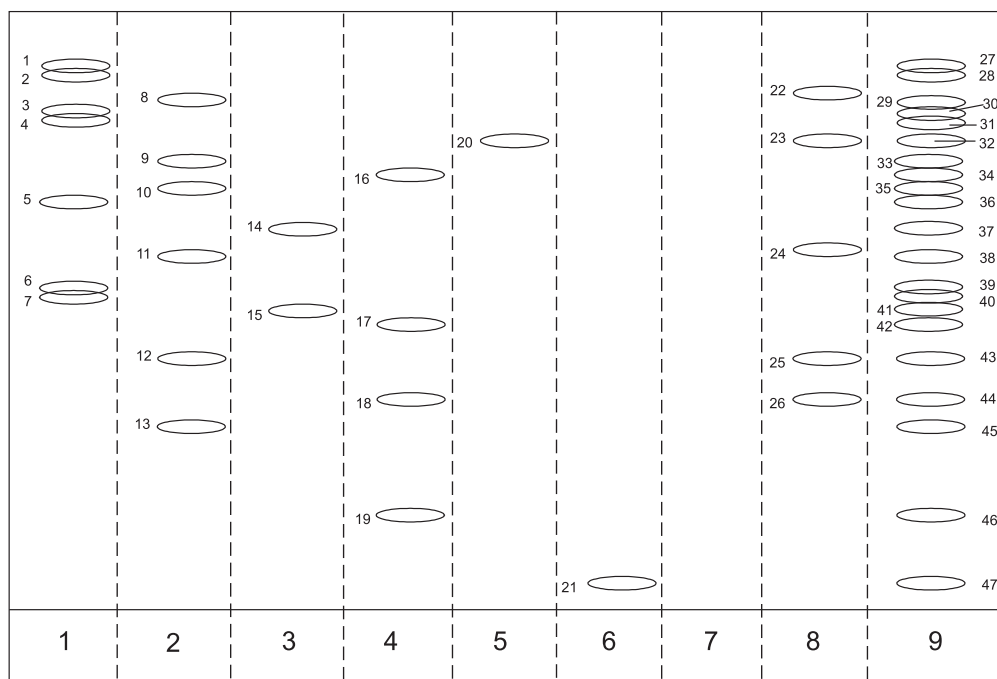


Рис. 1. ТШХ ідентифікація гранул препарату «ШКТ-1» за наявності фенольних сполук. Випробувані розчини: хвоща стебел (1), спориша трави (2), кукурудзяних приймочок (3), солодки коренів (4), цмину квіток (5), гіркокаштану насіння (6), висівок пшеничних (7); розчини порівняння (8), розчин препарату (9). Пояснення у тексті.

грами поблизу лінії фінішу вище рівня кислоти кавової (рис. 1, поз. 1, 2), дві зеленувато-сині флюоресціюючі зони у верхній частині хроматограми нижче рівня кислоти кавової, зона помаранчевої флюоресценції у верхній частині пластини вище рівня гіперозиду (рис. 1, поз. 5), дві зони зеленувато-синьої флюоресценції в середній частині пластини між зонами гіперозиду та кислоти хлорогенової (рис. 1, поз. 6, 7). Дані зони виявляються також у випробуваному розчині досліджуваного препарату (рис. 1, відповідно поз. 27, 28, 30, 31, 36, 39, 40). Таким чином, у результаті проведеної роботи вищеописане розташування зон на хроматограмах узгоджується з вимогами відповідної монографії ДФУ [5] на хвоща стебла і підтверджує можливість їх ідентифікації у досліджуваному препараті.

При дослідженні хроматографічного профілю споришу виявляються наступні зони (УФ-світло, $\lambda = 365$ нм): синьої флюоресценції (рис. 1, поз. 8) у верхній частині пластини на рівні кислоти кавової і нижче жовто-зеленої (рис. 1, поз. 9) і жовтої флюоресценції (рис. 1, поз. 10). У середній частині хроматограми нижче за зону гіперозиду виявляється зона жовто-коричневої флюоресценції (рис. 1, поз. 11), а на рівні зони кислоти кавової - зона світло-блакитної флюоресценції (рис. 1, поз. 12) і в нижній частині пластини зона жовто-коричневої флюоресценції. У випробуваному розчині препарату дані зони виявлені у відповідних позиціях 29, 33, 35, 38, 43, 45. Це узгоджується з вимогами відповідної монографії ДФУ [5], що дає можливість підтвердження наявності трави споришу в досліджуваному препараті.

Гіркокаштан, як сировину, що містить сапоніни, ДАВ та «ТУ 64-4-75-96. Семена конського каштана

обыкновенного» [10] рекомендують ідентифікувати для виявлення есцину. Крім цього, насіння даного виду ЛРС містить також флавоноїдний комплекс [8, 9, 11], який у вищеописаних умовах виявляється у вигляді зони жовто-зеленої флюоресценції поблизу лінії старту (УФ світло, $\lambda = 365$ нм). Дана зона також присутня і у випробуваному розчині препарату (рис. 1, поз. 21, 47).

На момент проведення досліджень необхідно відзначити відсутність методик ідентифікації на кукурудзяні рильця як у нормативній документації, так і в літературних джерелах. Однак ідентифікацію даного виду ЛРС у препараті можна здійснити методом ТШХ по виявленню зон ясно-жовтої флюоресценції в середній частині хроматограми вище і нижче за зону гіперозиду (рис. 1, поз. 14, 15). Також дані зони виявляються у випробуваному розчині препарату (рис. 1, поз. 37, 41). Це узгоджується з літературними даними [3, 9] і ще раз доводить наявність речовин флавоноїдної природи в кукурудзяних рильцях.

Відомо, що солодки голої коріння містить крім тритерпенових сапонінів також речовини флавоноїдної природи (ліквіритигенін, ліквіритин) [1, 13, 18]. Нами виявлені на розчинах порівняння наступні чітко виражені зони: жовта флюоресціююча нижче рівня ізосаліпурпозиду (рис. 1, поз. 16), жовто-коричнева флюоресціююча нижче зони гіперозиду (рис. 1, поз. 17), а також блакитна флюоресціююча нижче зони кислоти хлорогенової (рис. 1, поз. 18) і зеленувато-синя флюоресціююча в нижній частині хроматограми (рис. 1, поз. 19). Такі ж зони також виявляються в розчині препарату (рис. 1, поз. 34, 42, 44, 46).

У зв'язку з відсутністю монографії на цмину квітки в ДФУ ідентифікація даного виду сировини була

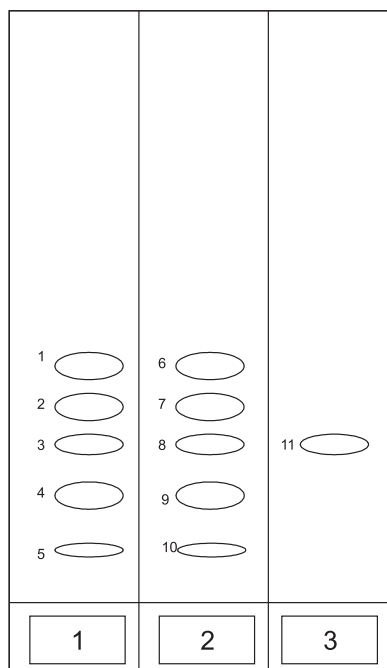


Рис. 2. ТШХ ідентифікація сапонінів насіння гіркокаштану у складі гранул «ШКТ-1». Випробуваний розчин насіння гіркокаштану (1), розчин препарату (2), розчин порівняння (3). Пояснення у тексті.

проведена відповідно до DAC [16]. Ідентифікацію даного виду ЛРС у препараті проводили по виявленню зони ізосаліпурпозиду (рис. 1, поз. 23) жовто-помаранчевої флуоресценції, яка відповідає на хроматограмі зоні розчину порівняння ізосаліпурпозиду (рис. 1, поз. 20). У випробуваному розчині препарату (рис. 1, поз. 32) також виявлена відповідна зона.

Дослідження хроматографічного профілю гіркокаштану насіння на вміст сапонінів показало наявність наступних зон: на рівні розчину порівняння есцину (рис. 2, поз. 11) зона синьо-фіолетового забарв-

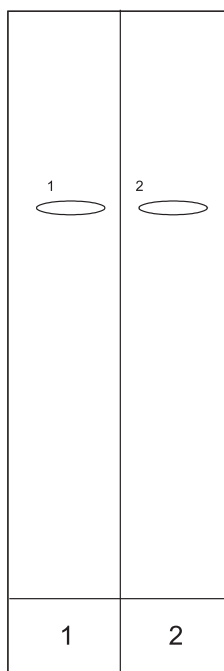


Рис. 3. ТШХ ідентифікація солодки коренів у складі гранул «ШКТ-1» за наявністю кислоти гліциретинової. Розчин препарату (1), розчин порівняння (2). Пояснення у тексті.

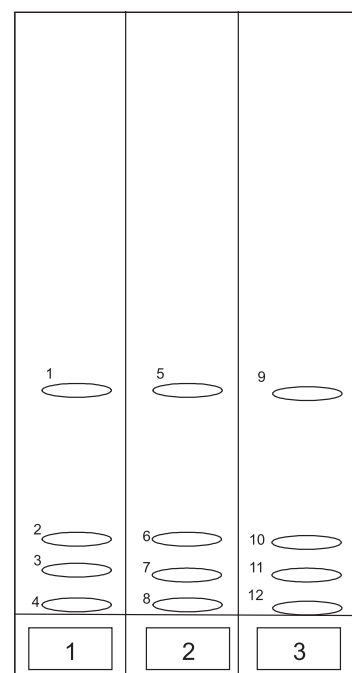


Рис. 4. ТШХ ідентифікація висівок пшеничних у складі гранул «ШКТ-1» за наявністю амінокислот. Випробуваний розчин (1), розчин препарату (2), розчини порівняння (3). Пояснення у тексті.

лення (рис. 2, поз. 3), розташовані вище зони світло-коричневого (рис. 2, поз. 2) і коричнево-червоного забарвлення (рис. 2, поз. 1). Трохи нижче за зону есцину виявляються зони коричнево-сірого (рис. 2, поз. 4) і коричневого (рис. 2, поз. 5) забарвлення. Такі ж зони виявлені також у розчині препарату (рис. 1, відповідно поз. 8, 7, 6, 9, 10).

При дослідженні хроматографічного профілю солодки голої коренів на наявність сапонінів виявляється зона фіолетового забарвлення на рівні кислоти гліциретинової на хроматограмі розчину порівняння (рис. 3, поз. 2). У випробуваному розчині препарату також виявляється ідентична зона (рис. 3, поз. 1).

При дослідженні розчину висівок пшеничних зон, які б відповідали фенольним сполукам, не було виявлено, що узгоджується з літературними даними [7, 12, 13, 15].

Висівки пшеничні все частіше входять до складу фармацевтичних композицій, проте досі не існує будь-якої розробленої нормативної документації або унікальної методики їх визначення. Існуючі «ГОСТ 7169-66. Отруби пшеничные. Технические условия» та «ДСТУ 3016-25. Отруби кормовые пшеничные и ржаные» не можуть дати повного обсягу необхідної аналітичної інформації. Однак у цьому документі, як і в деяких інших літературних джерелах [7, 12, 14, 15, 17], наводяться дані про вміст широкого діапазону амінокислот у складі висівок (лейцин, аланін, кислота аспарагінова, аргінін, валін, гліцин, пролін та інші).

У зв'язку з цим досить цікавим було дослідження амінокислотного комплексу висівок, що входять до складу препарату, з метою їх ідентифікації з використанням методу ТШХ. Випробуваний розчин висівок пшеничних і досліджуваного препарату готували шляхом обробки наважки метанолом при темпе-

ратурі 60°C протягом 40 хв. Суміш охолоджували і фільтрували. В якості розчину порівняння використовували спиртові розчини лейцину, аланіну, кислоти аспарагінової, аргініну. На лінію старту наносили по 10 мкл отриманих розчинів, поміщали в систему розчинників: кислота оцтова (98%) Р – вода дистильована – 1-бутанол Р у співвідношенні 10:40:50 (верхня фаза). Після досягнення фронтом розчинників відстані 10 см пластину виймали з камери, висушували на повітрі і обприскували 2% розчином нінгідрину в етанолі. Амінокислотний комплекс ідентифікували по виявленню зон амінокислот, забарвлених у фіолетово-червоний колір.

З рис. 4 в середній частині хроматограми на одному рівні чітко виявляються зони випробуваного розчину, що відповідають зонам розчину препарату

та розчинів порівняння: фіолетові зони 1 і 5 відповідають зоні лейцину 9, фіолетово-червоні зони 2 і 6 – зоні аланіну 10, світло-фіолетові зони 3 і 7 – зоні кислоти аспарагінової 11, блідо-фіолетові зони 4 і 8 – зоні аргініну 12, що підтверджує наявність висівок пшеничних у складі препарату. Таким чином, ідентифікація амінокислотного комплексу може стати невід'ємною частиною якісної оцінки препарату.

ВИСНОВКИ

1. Методом тонкошарової хроматографії проведені дослідження з ідентифікації деяких характерних біологічно активних сполук ЛРС, які входять до складу препарату у вигляді гранул під умовною назвою «ШКТ-1».

2. Отримані дані можуть бути використані при розробці методик контролю якості на даний препарат.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аммосов А.С., Литвиненко В.И. // *Фармаком.* – 2003. – №2. – С. 34-80.
2. Гарна С.В., Ветров П.П., Русинов О.І., Георгіяц В.А. // *Запорожский мед. журн.* – 2010. – Т. 12, №3. – С. 92-94.
3. *Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.*
4. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доп. 2. – Х.: РИРЕГ, 2008. – 620 с.*
5. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доп. 3. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.*
6. Котов Г.Н., Конев Ф.А., Ковалев И.П. *Технология и стандартизация лекарств.* – Т. 2. – Х.: ИГ «РИРЕГ», 2000. – С. 249-260.
7. Butt M.S., Qamar M.I., Anjum F.M. et al. // *Internet J. of Food Safety.* – 2004. – Vol. 3. – P. 15-20.
8. Costantini A. // *Il Farmaco.* – 1999. – Vol. 54. – P. 728-732.
9. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.* – Edinburgh: Churchill Livingstone; Elsevier, 2012. – 336 p.
10. *Hippocastani semen // Deutsches Arzneibuch.* – Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1999.
11. Hostettmann K., Marston A. *Saponins.* – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
12. Kew M.C., Kwang S.C., Bong D.H. et al. // *J. Asian-Aust. Anim. Sci.* – 2005. – Vol. 18, №6. – P. 861-867.
13. Moerman D.E. *Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary.* – Portland.: Timber press, 2009. – 800 p.
14. Nadeem M.A., Gilani A.H., Khan and Mahr-Un-Nisa A.G. // *Int. J. Agricol. Biol.* – 2005. – Vol. 7, №6. – P. 985-989.
15. Ribeiro F.B., Lanna E.A., Bomfim M.A. et al. // *R. Bras. Zootec.* – 2011. – Vol. 40, №5. – P. 939-946.
16. *Ruhrkrautbluten // Deutsches Arzneimittel Codex.* – Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2000.
17. Steele E. *Determination of the generally recognized as safe (gras) status of wheat bran extract as a food ingredient.* – Belgium.: Fugeia NV, 2010. – 120 p.
18. *Trease and Evans' Pharmacognosy.* – 16th ed. Evans W. – Edinburgh: Saunders; Elsevier, 2009. – 616 p.

УДК 615.32:615.453.3:543.544

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРАНУЛ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ

С.В.Спиридонов, А.Г.Котов

С целью разработки методик контроля качества препарата в виде гранул под условным названием «ЖКТ-1» для применения в гастроэнтерологии проведены исследования по идентификации некоторых характерных биологически активных соединений ЛРС, входящих в его состав.

UDC 615.32:615.453.3:543.544

CHROMATOGRAPHIC RESEARCH OF GRANULES FROM MEDICINAL VEGETABLE RAW MATERIALS FOR USE IN GASTROENTEROLOGY

S.V.Spiridonov, A.G.Kotov

In order to develop methods of quality control the drug in the form of granules codenamed «ШКТ-1» for use in gastroenterology researches which identify some characteristic vegetable raw materials of biologically active compounds of its structure have been carried out.