

УДК 615.322:615.072:615.451.16

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЦВЕТКОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (*HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) MOENCH) В РАСТИТЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ.

© 2013 Гудзенко А.В., Цуркан А.А.

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев.

Определен маркер по наличию и количественному содержанию которого возможна качественная и количественная стандартизация в растительных смесях цветков бессмертника песчаного. В качестве маркера данного сырья может быть использован флавоноид апигенин. С использования метода ВЭЖХ разработана методика определения флавоноида апигенина в сырье и растительных смесях цветков бессмертника песчаного. Содержание апигенина в сырье цветков растения лежит в пределах от $0,1453 \pm 0,0068\%$ до $0,1657 \pm 0,0085\%$ в пересчете на высушенное сырье. Показана возможность проведения качественной и количественной стандартизации цветков бессмертника песчаного по содержанию флавоноида апигенина в присутствии биологически активных веществ плодов боярышника колючего, корней алтея лекарственного, корней солодки голой, корней цикория дикого, корней одуванчика лекарственного, шишек хмеля, травы пустырника, листьев и цветков боярышника колючего, травы зверобоя продырявленного и семян льна.

Ключевые слова: цветки бессмертника песчаного, стандартизация, апигенин, многокомпонентные растительные смеси, высокоэффективная жидкостная хроматография

ELABORATION OF APPROACHES TO THE STANDARTIZ OFATION *HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) MOENCH IN PLANT MIXTURES

A.V. Goudzenko, A.A. Tsourkan

Institute of pharmacologie and toxocologie of Ukraine, Kiev

Marker for qualitative and quantitative standardization of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. flowers in the plant mixtures was determine. As a marker of *Helichrysum arenarium* Moench. flowers can be used flavonoid apigenin. HPLC method of determination flavonoid apigenin in raw materials and plant mixtures of flowers *Helichrysum arenarium* (L.) Moench was developed. Contents of apigenin in the raw plant flowers were in the range from $0,1453 \pm 0,0068\%$ to $0,1657 \pm 0,0085\%$, in terms of the dried materials. It is shown, that the presence and content of apigenin flowers *Helichrysum arenarium* (L.) Moench can be standardized in the mixtures with the following plant: flowers, leaves and fruits of genus *Crataegus* L., roots of *Althaea officinalis* L., roots of *Glycyrrhiza glabra* L., roots of *Cichorium intybus* L., roots of *Taraxacum officinale* Web., cones of *Humulus lupulus* L., herb of *Leonurus cardiaca* L., herb of *Hypericum perforatum* L. and seeds of *Linum usitatissimum* L.

Key words: *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. flowers, standardization, apigenin, multicomponent plant composition, HPLC

В последние годы в мировой фитотерапии наблюдается тенденция к более широкому использованию многокомпонентных лекарственных средств растительного происхождения (МЛСРП). Существующие в настоящее время методики анализа вышеупомянутых фитопрепаратов в большинстве своем не отвечают современным фармакопейным требованиям, они не являются специфическими, не дают возможности проведения идентификации и определения количественного содержания отдельных компонентов смеси.

Одно из перспективных направлений дальнейшего совершенствования процедуры стандартизации многокомпонентных фитопрепаратов – использование так называемых «маркерных соединений», или маркеров – веществ, присутствие которых характерно только для определенного лекарственного сырья. Внедрение методик качественного и количественного анализа, основанных на использовании маркеров, имеет не только большое практическое значение, но и существенную научную целесообразность.

При этом следует отметить отличие терминов «хемотаксономический маркер» и «маркер для стандартизации растительных смесей». Выбор маркера для анализа определенного компонента в растительной смеси определяется исключительно составом данной смеси. И поэтому один и тот же компонент может быть стандартизирован в растительных смесях, отличающихся по своему составу, по наличию различных биологически активных веществ [2].

Одним из наиболее распространенных компонентов МЛСРП является бессмертник песчаный [6, 7]. Это лекарственное сырье стандартизируется согласно ГФ XI по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид [1, 3, 4], который наряду с салипурпозидом, является мажоритарным представителем фракции флавоноидов в растении [3, 4]. Исходя из вышесказанного, целесообразным было бы рассмотреть возможность использования именно данных веществ в качестве маркеров цветков бессмертника песчаного. Однако, исходя из того, что изосалипурпозид и салипурпозид являются гликозидами флавоноидов, существуют определенные проблемы при использовании их в качестве маркера данного сырья, поскольку современные сорбенты, применяемые в жидкостной хроматографии, в большинстве своем лишь ограниченно приспособлены к разделению гликозидов флавоноидов. Исходя из этого, считалось целесообразным предложить для стандартизации цветков бессмертника песчаного в растительных смесях альтернативный маркер – флавоновый агликон апигенин, который в значительной концентрации присутствует в данном растительном сырье и обладает широким спектром биологической активности [5, 8–12].

Цель исследования – разработать методологию использования флавоноида апигенина в качестве маркера цветков бессмертника песчаного при анализе растительных смесей.

Материалы и методы

Объектами исследования были следующие лекарственные средства и растительные смеси: цветки бессмертника песчаного в пачках по 50 г (производитель ЗАО «Лектравы», г. Житомир, Украина (серии: 101111, 111211, 30212, 40212); цветки бессмертника песчаного в пачках по 20 г (производитель ЗАО ФФ «Виола», г. Запорожье, Украина (серия 231110)); модельная смесь с содержанием цветков бессмертника песчаного: цветков бессмертника песчаного – 1 г, плодов боярышника колючего – 1 г, корней алтея лекарственного – 1 г, корней солодки голой – 1 г, корней цикория – 1 г, корней одуванчика лекарственного – 1 г, соплодий хмеля – 1 г, травы пустырника – 1 г, листьев и цветков боярышника колючего – 1 г, травы зверобоя – 1 г, семян льна – 1 г; модельная смесь без содержания бессмертника песчаного: плодов боярышника колючего – 1 г, корней алтея лекарственного – 1 г, корней солодки голой – 1 г, корней цикория – 1 г, корней одуванчика лекарственного – 1 г, соплодий хмеля – 1 г, травы пустырника – 1 г, листьев и цветков боярышника колючего – 1 г, травы зверобоя – 1 г, семян льна – 1 г.

Экстракция биологически активных веществ (БАВ) в исследуемых объектах проводилась с использованием 50% этилового спирта. Выбор данного экстрагента обусловлен его универсальностью, так как мы предполагали возможность использования разработанной нами методики для определения других компонентов исследуемой модельной смеси по содержанию веществ-маркеров с отличной от апигенина гидрофобностью.

Экстракцию БАВ в исследуемых объектах проводили следующим образом: 1 г (точная навеска) измельченного моносырья или 5 г (точная навеска) растительной смеси вносили в коническую колбу, оборудованную обратным холодильником, добавляли 50 мл 50 % спирта этилового и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 45 минут. После этого экстракт охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через фильтр «красная лента» в мерную колбу объемом 100 мл. Экстракцию проводили еще раз и доводили объем колбы до 100 мл 50 % спиртом этиловым. К 5 мл полученного раствора добавляли такое количество воды, чтобы

концентрация спирта этилового составляла 15%, и пропускали полученный образец через предварительно активированный (метанол 5 мл) и промытый 10 мл воды патрон для твердофазной экстракции "Superclean LC-18 SPE Tubes 2 ml" производства фирмы Supelco (США). Патрон промывали 10 мл 15 % спирта этилового. Пробу из патрона вымывали 10 мл спирта метилового. Полученный анализ концентрировали посредством испарения до объема 5 мл и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Хроматографическое изучение исследуемых экстрактов и растворов сравнения апигенина проводили на хроматографе Shimadzu ser. 20, оборудованном диодно-матричным детектором в следующих условиях: колонка Phenomenex Luna C18 (2), размером 250 мм x 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, температура колонки - 35⁰С, длина волны детектирования – 330 нм, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, объем инъектирования - 5мкл; подвижная фаза:

Таблица 1 – Условия хроматографирования

Время хроматографирования (мин.)	Элюент А, %	Элюент Б, %
0–5	95	5
5–35	95 → 75	5 → 25
35–40	75	25
40–60	75 → 50	25 → 50
60–65	50 → 20	50 → 80
65–70	20	80
70–85	95	5

Элюент А: 0.1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде;

Элюент Б: 0.1 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле.

При выполнении работы использовали реактивы: ацетонитрил для градиентного хроматографирования (FLUKA, Германия); трифторуксусную кислоту (FLUKA, Германия); спирт этиловый ректифицированный фармакопейного качества; воду бидистиллированную.

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 представлены хроматограммы раствора сравнения апигенина (А) и экстракта цветков бессмертника песчаного (Б).

Как можно видеть, время выхода пика апигенина в указанных выше условиях составляет около 33,3 минуты. Данный пик присутствует как на хроматограмме раствора сравнения апигенина, так и на хроматограмме экстракта цветков бессмертника песчаного.

С использованием разработанной методики были проанализированы препараты бессмертника песчаного различных производителей: цветки бессмертника песчаного в пачках по 50 г (производитель: ЗАО «Лектравы», г. Житомир (серии: 101111, 111211, 30212, 40212) и цветки бессмертника песчаного в пачках по 20 г (производитель: ЗАО ФФ «Виола», г. Запорожье (серия 231110)).

Содержание апигенина в разных сериях цветков бессмертника песчаного представлено в таблице 2.

Согласно данным, представленным в таблице 2, во всех пробах был идентифицирован и количественно определен флавоноид апигенин, содержание которого в исследуемом сырье находится в пределах от $0,1453 \pm 0,0068\%$ до $0,1657 \pm 0,0085\%$ в пересчете на высушенное сырье.

В данных условиях был проведен анализ растительного сырья, которое часто входит в состав многокомпонентных препаратов бессмертника песчаного, а именно плодов боярышника колючего, корней алтея.

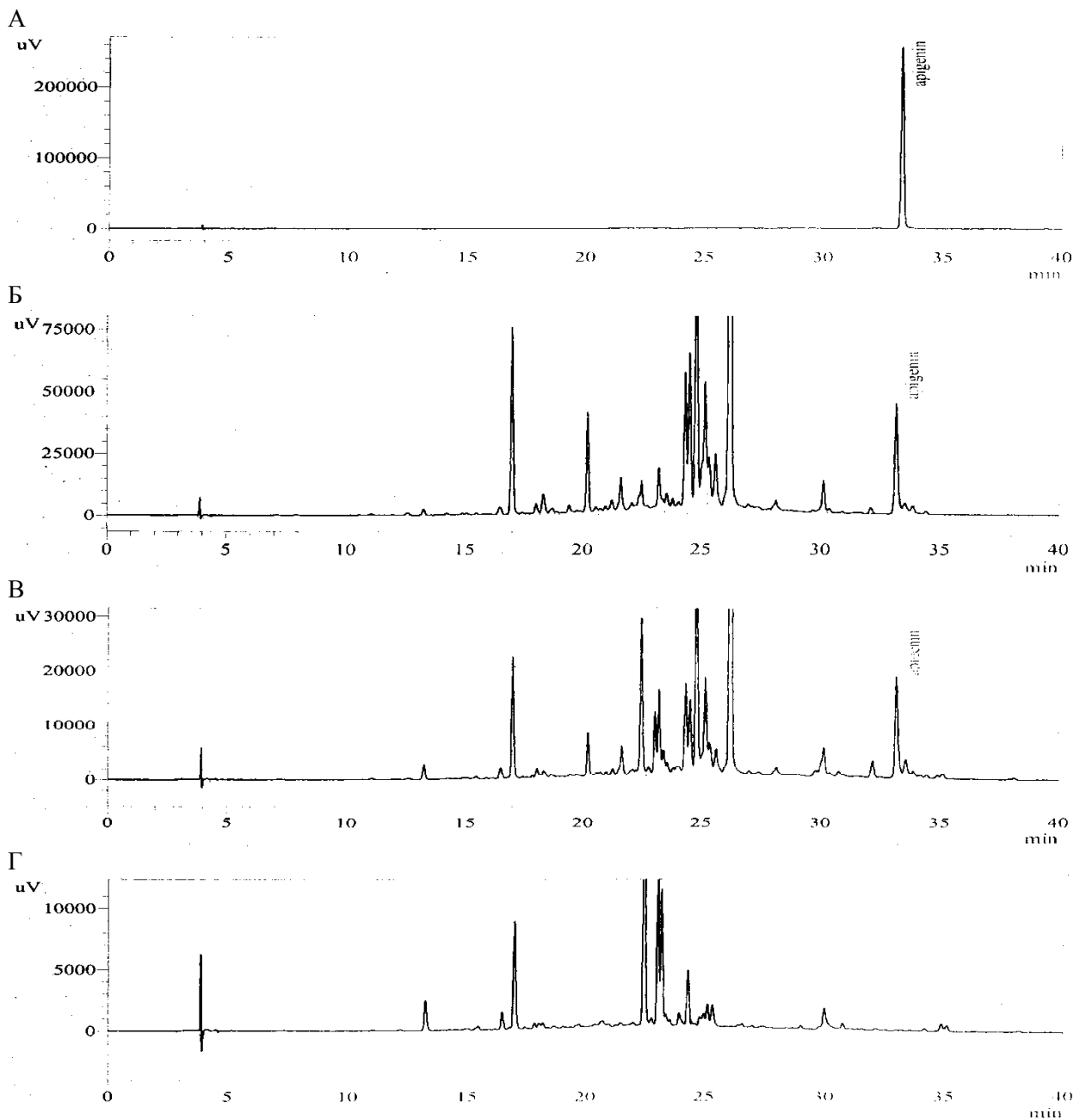


Рисунок 1 - Хроматограммы исследуемых растворов: А - раствора сравнения апигенина; Б - экстракта цветков бессмертника песчаного; В - экстракта модельной смеси с содержанием цветков бессмертника; Г - экстракта модельной смеси без содержания цветков бессмертника

Таблица 2 - Содержание апигенина в исследуемых препаратах бессмертника песчаного.

№ п/п	Препарат	Производитель, № серии	Содержание апигенина (в %) в перерасчете на высушенное сырье
1	Цветки бессмертника песчаного в пачке по 50 г	ЗАТ «Лектравы», серия 111211	0,1575±0,0073
2	Цветки бессмертника песчаного в пачке по 50 г	ЗАТ «Лектравы», серия 101111	0,1570±0,081
3	Цветки бессмертника песчаного в пачке по 50 г	ЗАТ «Лектравы», серия 30212	0,1657±0,0085
4	Цветки бессмертника песчаного в пачке по 50 г	ЗАТ «Лектравы», серия 40212	0,1453±0,0068
5	Цветки бессмертника песчаного в пачке по 20 г	ЗАТ ФФ «Виола», серия 081011	0,1608±0,0083

В доступной нам литературе данные о наличии апигенина в другом исследуемом нами сырье, кроме бессмертника песчаного, отсутствуют. С целью проверки возможности стандартизации цветков бессмертника песчаного в МЛСРП по наличию и содержанию флавоноида апигенина, была изучена возможность стандартизации цветков бессмертника песчаного в присутствии каждого из исследуемых растительных компонентов.

Для подтверждения возможности стандартизации цветков бессмертника песчаного по наличию и содержанию флавоноида апигенина в присутствии указанного выше сырья были изготовлены модельные смеси с содержанием и без содержания цветков бессмертника песчаного.

Указанные модельные смеси были проанализированы в условиях разработанной хроматографической методики. Хроматограммы раствора сравнения апигенина, экстракта цветков бессмертника песчаного и экстрактов указанных смесей представлены на рисунке 1.

На хроматограммах раствора сравнения апигенина (А), экстракта цветков бессмертника песчаного (Б), растительной модельной смеси с содержанием бессмертника (В) присутствует пик апигенина, время выхода которого составляет 33,3 минуты. На хроматограмме растительной модельной смеси без содержания бессмертника песчаного (Г) данный пик отсутствует.

Таким образом, показана возможность качественной и количественной стандартизации цветков бессмертника песчаного в растительных смесях, содержащих плоды боярышника колючего, корни алтея лекарственного, корни солодки голой, корни цикория, корни одуванчика лекарственного, соплодия хмеля, траву пустырника, листья и цветки боярышника колючего, траву зверобоя продырявленного и семена льна по наличию и количественному содержанию флавоноида апигенина. Количественное содержание апигенина в модельной смеси с содержанием бессмертника песчаного в условиях нашего эксперимента составило 0,01516±0,0004% в перерасчете на высушенное сырье.

Выводы:

1. С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии разработана методология стандартизации цветков бессмертника песчаного в растительных смесях.
2. Показана возможность проведения качественной и количественной стандартизации цветков бессмертника песчаного по содержанию флавоноида апигенина в присутствии биологически активных веществ плодов боярышника колючего, корней алтея лекарственного, корней солодки голой, корней цикория, корней одуванчика лекарственного, соплодий хмеля, травы пустырника, листьев и цветков боярышника колючего, травы зверобоя продырявленного и семян льна.

Литература

1. Государственная фармакопея СССР. - Вып.2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1989-400 с.
2. Гудзенко, А.В.. Використання речовин-маркерів – сучасний підхід до стандартизації багатокомпонентних лікарських засобів рослинного походження / Фармацевтичний журнал. - 2011.-№ 5.-С. 87-91.
3. Куркина А.В. Исследование компонентного состава цветков *Helichrysum arenarium* (L.) Moench // Химия растительного сырья.-2011.-№2.-С. 113-116.
4. Куркина А.В. Новые подходы к стандартизации сырья бессмертника песчаного - *Helichrysum arenarium* (L.) Moench // Традиционная медицина.-2010.-№ 1.-С. 45-49.
5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae) / Под ред. П.Д. Соколова.-СПб.: Наука, 1993.-351с.
6. Справочник «Компендиум-2011 – лекарственные препараты» / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова.-Киев: Морион, 2011.-2270 с.
7. Справочник лекарственных средств, зарегистрированных в Украине состоянием на 01.01.2011. Режим доступа: [www.Pharma-center.kiev.ua] (дата обращения 11.05.2011).
8. Clere, N.. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis / Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 2011. Vol. 9(2). P. 62-77.
9. Cushnie T., Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids / Int. J. Antimicrob. Agents. 2005. Vol. 26(5). P. 343-356.
10. Sandhar H., Kumar B., Prasher S. et al. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids / Int. Pharm. Sci.-2011. Vol. 1(1).-P. 25-41.
11. Shukla S., Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention // Pharm. Res. 2010. Vol. 27(6). P. 962-978.
12. Sroka Z., Kuta I., Cisowski W. et al. Antiradical activity of hydrolyzed and non-hydrolyzed extracts from *Helichrysi inflorescentia* and its phenolic contents / Z. Naturforsch.-2004.-Vol. 59, N.5-6.-P. 363-367.

Гудзенко Андей Викторович – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник Государственной лаборатории по контролю качества лекарственных средств ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины». Область научных интересов: анализ многокомпонентных лекарственных средств растительного происхождения, хроматографические методы анализа, создание новых растительных лекарственных средств. Электронная почта: ganvi@yandex.ru.

Цуркан Александр Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий Государственной лабораторией по контролю качества лекарственных средств ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины». Область научных интересов: анализ лекарственных средств, фитохимический анализ, хроматографические методы анализа, создание новых растительных лекарственных средств. Электронная почта: ganvi@yandex.ru.