

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО – *HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) MOENCH.

А.В. Куркина

ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава» (г. Самара)

РЕЗЮМЕ

Целью исследования является совершенствование методов стандартизации цветков бессмертника песчаного – *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. Исследован флавоноидный состав цветков бессмертника песчаного. Определено, что доминирующим флавоноидом сырья бессмертника песчаного является изосалипурпозид. Предложены объективные методики качественного и количественного анализа по содержанию флавоноидов с использованием ТСХ и дифференциальной спектрофотометрии в присутствии Государственного стандартного образца (ГСО) изосалипурпозид. Метрологические характеристики разработанной методики анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения в сырье бессмертника песчаного составляет $\pm 3,95\%$.

Ключевые слова: Бессмертник песчаный, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench., цветки, флавоноиды, изосалипурпозид, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что флавоноиды как биологически активные соединения обладают широким спектром фармакологического действия и являются уникальным источником желчегонных, гепатопротекторных и антиоксидантных лекарственных средств [1–8]. В настоящее время в ассортименте лекарственных средств, представленных на фармацевтическом рынке РФ, сложилась неблагоприятная ситуация, заключающаяся в доминировании зарубежных препаратов. В связи с этим представляется целесообразным расширение ассортимента отечественных препаратов вышеперечисленного спектра действия. Одним из перспективных источников желчегонного и гепатопротекторного действия являются цветки бессмертника песчаного – *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. [1–5].

Бессмертник песчаный – многолетнее травянистое растение, широко распространенное в степных районах Европейской части России и стран СНГ [1–5]. Цветки и препараты бессмертника песчаного (настой, жидкий экстракт, «Фламин», желчегонные сборы) применяются в медицинской практике в качестве желчегонных лекарственных средств [1–5, 9], однако в отношении химического состава литературные данные противоречивы. Согласно литературным данным, в цветках бессмертника песчаного к преобладающим флавоноидам относятся халкон изосалипурпозид, флаваноны салипурпозид, прунин и нарингенин [1–5], однако нет

единой точки зрения, какой из этих компонентов является доминирующим. В бессмертнике песчаном содержится также ряд сопутствующих веществ, включая кумарины, коричные кислоты, фталиды, полисахариды и др. [1–5].

На наш взгляд, именно сложность химического состава цветков бессмертника песчаного является причиной того обстоятельства, что методики анализа для лекарственного растительного сырья (ЛРС) «Бессмертника песчаного цветки» не соответствуют современным требованиям фармакогнозии и фармакопейного анализа. Так, в фармакопейной статье на данное сырье (ст. 9 ГФ СССР XI издания) раздел «Качественные реакции» представлен только качественной реакцией на флавоноиды [10], которая не позволяет определять отдельные компоненты, характерные для данного растения. Кроме того, в разделе «Количественное определение» фармакопейная методика, по результатам наших предварительных исследований, дает завышение результатов по содержанию флавоноидов приблизительно в 2–3 раза.

Целью настоящего исследования является совершенствование методов стандартизации цветков бессмертника песчаного.

МЕТОДЫ

Исследовали образцы цветков бессмертника песчаного, собранные в различных регионах РФ, а также промышленные образцы сырья производства ОАО «Красногорсклексредства»

(Московская обл.) и ООО ПКФ «Фитофарм» (г. Анапа, Краснодарский край). Для фитохимического исследования ЛРС бессмертника песчаного были использованы методы химического, спектрального и физико-химического анализа, в том числе тонкослойная хроматография, прямая и дифференциальная спектрофотометрия.

В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного изучены УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из данного сырья. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов использовали реакцию комплексообразования с раствором алюминия хлорида для исключения вклада в значение оптической плотности других групп соединений.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр и охлаждают в течение 30 мин. Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95 % этиловым спиртом (испытуемый раствор А). В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный при тех же условиях, но без добавления алюминия хлорида (раствор сравнения А). Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 418 нм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО изосалипурпозиды при длине волны 418 нм, приготовленного по аналогии с испытуемым раствором (см. примечание).

Примечание: Приготовление раствора изосалипурпозиды-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска) изосалипурпозиды помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20–30 мл 95 % этилового спирта и доводят объем раствора 95 % этиловым спиртом до метки (раствор А). 1 мл раствора А изосалипурпозиды помещают в мерную колбу на 50 мл, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора 95 % этиловым спиртом до метки (испытуемый раствор Б). В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А изосалипурпозиды помещают в мерную колбу на 50 мл и доводят объем раствора до метки 95 % этиловым спиртом (раствор сравнения Б).

Содержание суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного в пересчете на изосалипурпозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times V \times V_1 \times 100 \times 100}{m \times D_0 \times V_0 \times V_2 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО изосалипурпозиды;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем испытуемого раствора А, мл;

V_0 – объем раствора А ГСО изосалипурпозиды, мл;

V_2 – объем испытуемого раствора ГСО изосалипурпозиды (раствор Б), мл;

m – масса сырья в граммах, г;

m_0 – масса ГСО изосалипурпозиды, г;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метод ТСХ позволил выявить, что доминирующим флавоноидом цветков бессмертника песчаного является изосалипурпозид. Данное вещество обнаруживается в цветках исследуемого растения в виде пятна желтого цвета с величиной R_f около 0,6. При этом обнаруживаются и другие флавоноиды, характерные для данного растения – салипурпозид (5-О-глюкозид нарингенина) и прунин (7-О-глюкозид нарингенина) в виде одного пятна с фиолетовой флуоресценцией в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме просматриваются также пятна кумаринов и коричневых кислот, имеющих голубую флуоресценцию при длине

Таблица 1

**Влияние условий экстракции на извлечение флавоноидов
из цветков бессмертника песчаного**

№ п/п	Экстрагент	Соотношение «сырье-экст- рагент»	Время экстрак- ции	Содержание суммы фла- воноидов в пересчете на изосалипурпозид, %	
				при длине волны 315 нм*	при длине волны 418 нм
1.	40 % этиловый спирт	1:50	1 ч	8,90 ± 0,08	2,21 ± 0,02
2.	50 % этиловый спирт	1:50	1 ч	8,30 ± 0,07	2,50 ± 0,03
3.	60 % этиловый спирт	1:50	1 ч	7,29 ± 0,03	2,37 ± 0,02
4.	70 % этиловый спирт	1:50	1 ч	10,10 ± 0,12	3,10 ± 0,03
5.	80 % этиловый спирт	1:50	1 ч	8,53 ± 0,09	2,82 ± 0,02

Примечание: * – фармакопейная методика [1].

волны 366 нм. Последующее проявление хроматограммы раствором диазобензолсульфокислоты позволяет еще более четко обнаружить доминирующее пятно изосалипурпоза на уровне пятна ГСО изосалипурпоза. С учетом отсутствия в РФ ГСО изосалипурпоза нами разработана схема выделения изосалипурпоза, который изучается в настоящее время в плане подготовки к государственной регистрации нормативной документации (НД) на данный стандарт. Следовательно, возникает перспектива использования метода ТСХ для определения подлинности цветков бессмертника песчаного путем обнаружения доминирующего и диагностического флавоноида – изосалипурпоза в присутствии соответствующего стандартного образца.

С целью совершенствования методики количественного определения нами изучены условия экстракции флавоноидов из цветков бессмертника песчаного. Показано, что оптимальным экстрагентом является 70 % этиловый спирт, в то время как в ГФ XI используется 50 % этиловый спирт (табл. 1). Для экстракции сырья использовали 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % этиловый спирт (табл. 1). В основу разработанной нами методики количественного определения положены следующие оптимальные параметры: экстракция сырья 70 % этиловым спиртом в течение 1 часа в условиях кипения в соотношении 1:50, измерение оптической плотности при длине волны 418 нм в условиях дифференциальной спектрофотометрии.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В УФ-спектре водно-спиртового извлечения обнаружены два наиболее характерных максимумов поглощения в области 295 нм и 335 нм (рис. 1). Следует отметить, что в соответствующей фармакопейной статье в качестве аналитической длины волны выбрана величина 315 нм, т.е. область одного из минимумов кривой поглощения (рис. 1). На наш взгляд, завышение результатов имеет место за счет наличия сопутствующих веществ – гидроксикоричных кислот (максимум поглощения 290, 327 нм), кумаринов (максимум поглощения около 340 нм) и фталидов (максимум поглощения 270,

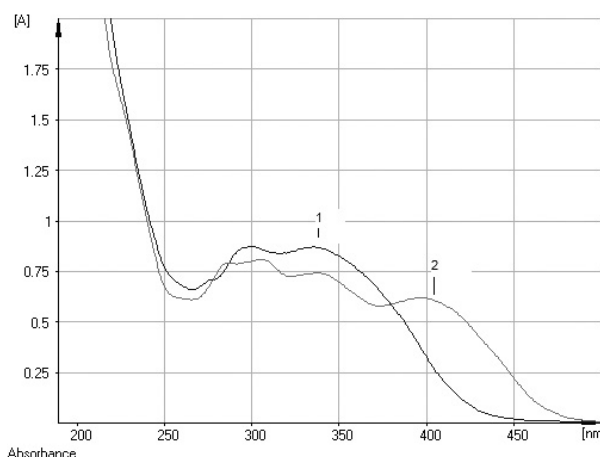


Рис. 1. УФ-спектры растворов водно-спиртового извлечения из цветков бессмертника песчаного. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор в присутствии $AlCl_3$.

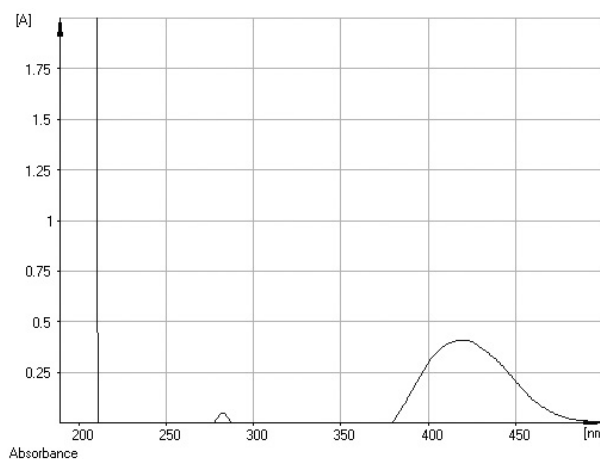


Рис. 2. УФ-спектр раствора водно-спиртового извлечения из цветков бессмертника песчаного с добавлением $AlCl_3$ (дифференциальная спектрофотометрия).

290 нм). Кроме того, в методике не используется ГСО изосалипурпоза, а применяется калибровочный график. На наш взгляд, в мето-

дике анализа целесообразно использовать вариант дифференциальной УФ-спектроскопии, позволяющей за счет образования комплекса флавоноидов с $AlCl_3$ минимизировать вклад сопутствующих веществ в оптическую плотность исследуемых растворов (рис. 2).

Изучение УФ-спектра водно-спиртового извлечения в присутствии $AlCl_3$ показало, что основной максимум поглощения наблюдается при длине волны 418 нм (рис. 2). Причем характер поглощения этого спектра коррелирует с УФ-спектром изосалипурпозиды: в присутствии $AlCl_3$ наблюдается bathochromic сдвиг максимума при 370 нм в область 418 нм (рис. 3 и 4). Это позволяет сделать вывод о том, что в присутствии $AlCl_3$ характер кривой поглощения УФ-спектра водно-спиртового извлечения цветков бессмертника обусловлен в основном изосалипурпозидом. На этом основании разработан метод определения суммы флавоноидов с использованием аналитической длины волны 418 нм в варианте дифференциальной УФ-спектроскопии.

С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов цветков бессмертника песчаного (табл. 2). Содержание суммы флавоноидов в различных образцах цветков бессмертника находится в пределах 2,90–3,50 % (в пересчете на изосалипурпозид).

Таблица 2

Содержание суммы флавоноидов в различных образцах цветков бессмертника песчаного

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид и абсолютно сухое сырье (в %)
1.	ОАО «Красногорсклексредства»	3,10 ± 0,05
2.	ООО ПКФ «Фитофарм» (г. Анапа)	2,95 ± 0,04
3.	Самарская обл. (с. Переволоки, 2008 г.)	3,04 ± 0,06
4.	Ульяновская обл. (г. Барыш, 2008 г.)	2,90 ± 0,04
5.	Пензенская обл. (с. Новая Елюзань, 2005 г.)	3,50 ± 0,07
6.	Саратовская обл. (с. Усовка, 2008 г.)	3,20 ± 0,05

Таблица 3

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного

f	X	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
10	3,10	0,0549	95	2,23	0,122	±3,95

Метрологические характеристики разработанных методик анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в сырье бессмертника песчаного составляет ±3,95 % (табл. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований пересмотрены данные о химическом составе цветков бессмертника песчаного, определено доминирующее вещество сырья изучаемого лекарственного растения (изосалипурпозид), предложены объективные методики качественного и количественного анализа характеристики по содержанию флавоноидов с использованием ТСХ и дифференциальной спектрофотометрии в присутствии ГСО изосалипурпозиды. Разработанные методики включены в проект фармакопейной статьи «Бессмертника песчаного цветки».

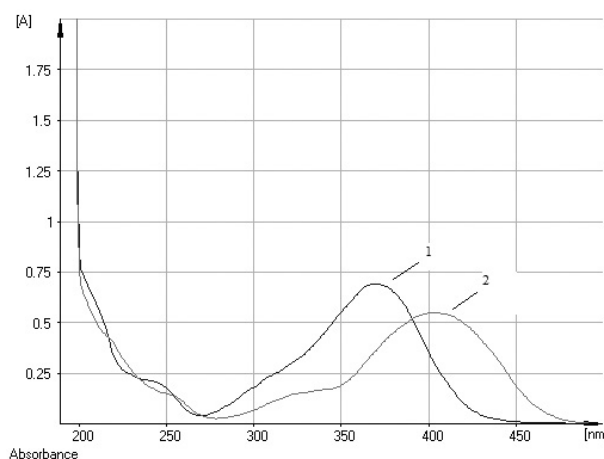


Рис. 3. УФ-спектры растворов изосалипурпозиды. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор в присутствии $AlCl_3$.

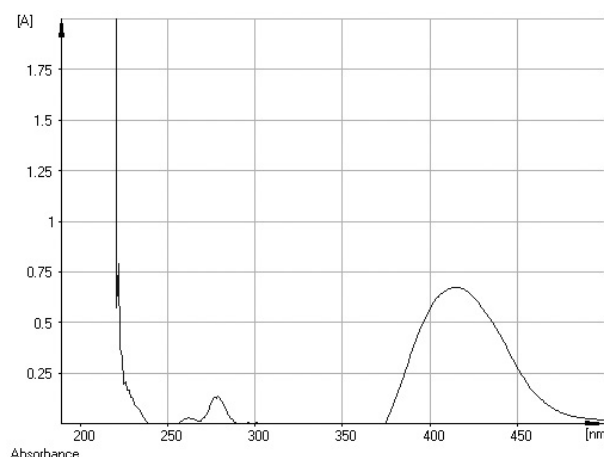


Рис. 4. УФ-спектр раствора изосалипурпозиды с добавлением $AlCl_3$ (дифференциальная спектрофотометрия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Издательство СПХФА, 2001. – С. 74–81.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.
3. Куркин В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Astera-ceae (Compositae). – СПб.: наука, 1993. – С. 120–123.
5. Тюкавкина Н.А. Актовая речь. Биофлавоноиды. Химия, пища, лекарство, здоровье. – М., 2002. – 56 с.
6. Фитотерапия: методические рекомендации № 2000/63: [утв. М-вом здравоохранения Российской Федерации] / Карпеев А.А., Киселева Т.Л., Коршикова Ю.И., Лесиовская Е.Е., Саканян Е.И.; Науч.-практ. центр традиц. мед. и гомеопатии. – М., 2000. – 28 с.
7. Фитотерапия: нормативные документы // Учебно-методическое пособие / Под общ. ред. А.А. Карпеева, Т.Л. Киселевой. – Изд-во ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2006. – 362 с.
8. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. – Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag, 1993. – 522 s.
9. Государственный реестр лекарственных средств. – Т. 1, 2. Официальное издание. – М., 2008.
10. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье/ МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

Адрес автора

К.ф.н., Куркина А.В.

Кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава»

Annushkae@yandex.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕБОВАНИЙ ЗАРУБЕЖНЫХ ФАРМАКОПЕЙ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ПО СОДЕРЖАНИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И.В. Гравель, Е.А. Плыкина

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова (г. Москва)

РЕЗЮМЕ

В результате загрязнения окружающей среды в лекарственных растениях накапливаются различные экотоксиканты, среди которых одни из наиболее опасных – тяжелые металлы. Как было установлено ранее, содержание тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье может достигать высоких концентраций и превышать их содержание в пищевых продуктах. Однако в отечественной фармакопее содержание тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье не нормируется. В статье представлены аналитические материалы по уровням содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье, поступающем на мировой фармацевтический рынок из разных стран в 1978–2008 гг., и анализ требований ряда зарубежных фармакопей (Европейской, Великобритании, Японии, Республики Беларусь, США) к качеству лекарственного растительного сырья по содержанию тяжелых металлов, методы определения, пределы содержания.

Ключевые слова: тяжелые металлы, лекарственное растительное сырье, требования к качеству.

Современные экологические условия приводят к накоплению в лекарственных растениях различных экотоксикантов, среди которых одни из наиболее опасных – тяжелые металлы (ТМ) [8]. Они могут поступать в лекарственные растения в результате антропогенного загрязнения окружающей среды (промышленные выбросы, сбросы и отходы, транспорт, применение минеральных и органических удобрений, мелиорантов, средств

защиты растений), а также различных природных процессов (выветривания горных пород и минералов, эрозии почв, вулканической деятельности, тектонических сдвигов, лесных и степных пожаров) [1, 6, 7, 10]. Экологические исследования лекарственных растений начались в 60-е годы прошлого века в Германии. Именно в них было установлено, что содержание ТМ в лекарственном растительном сырье (ЛРС) может достигать более высоких