

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КОРНЕВИЩ ЗМЕЕВИКА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

К.Н. Ефимова

к.фарм.н., ассистент, кафедра фармакогнозии,
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия
E-mail: ksenia.rasarenova@pharminnotech.com

Е.В. Жохова

к.фарм.н., доцент, кафедра фармакогнозии,
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия
E-mail: elena.zhohova@pharminnotech.com

Предложены методики идентификации фенольных соединений (галловая кислота, хлорогеновая кислота, катехин) в сырье змеевика корневища методом тонкослойной хроматографии; подтверждена их воспроизводимость на трех образцах сырья. Предложенные методики использованы при разработке раздела «Определение основных групп биологически активных веществ. Тонкослойная хроматография» проекта ФС «Змеевика корневища».

Ключевые слова: змеевик, корневища, метод ТСХ, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, галловая кислота, катехин.

Змеевик большой (горец змеиный) – официальный вид, включенный в Государственные фармакопеи РФ и СССР начиная с седьмого издания [1]. На сегодняшний день на сырье змеевика большого действует статья 71 Государственной фармакопеи РФ XI издания «Корневища змеевика».

Активно разрабатываются и выходят в свет частные фармакопейные статьи на лекарственное растительное сырье (ЛРС) в рамках работы по выпуску Государственной фармакопеи нового издания. Исследования представителей рабочей группы по созданию Руководства ВОЗ по надлежащей фармакопейной практике (GPhP) показали целесообразность включения в монографии на ЛРС раздела по определению основных групп биологически активных веществ (БАВ), отвечающих за последующее фармакологическое действие ЛРС. Фитохимические исследования предполагают определение присутствия в ЛРС основных групп БАВ методами химического и физико-химического анализа [2].

Качественный анализ действующих веществ корневищ змеевика, согласно Государственной фармакопее XI издания, осуществляют с помощью реакции на дубильные вещества с раствором квасцов железоаммонийных [3].

Цель исследования – разработка методик качественного анализа фенольных сое-

динений корневищ змеевика физико-химическим методом – методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в свете работы по созданию проекта фармакопейной статьи на сырье змеевика для включения в Государственную фармакопею нового издания.

По литературным данным, в подземных органах змеевика большого обнаружены такие мономеры дубильных веществ, как галловая кислота, хлорогеновая кислота, катехин [4]. В основу разрабатываемой методики идентификации фенолкарбоновых кислот корневищ змеевика (Методика 1) была положена методика определения галловой кислоты в коре дуба [5]. Для разработки методики идентификации катехина в корневищах змеевика (Методика 2) использовали методику обнаружения катехинов в листьях и корневищах бадана [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили промышленные (серийные) образцы сырья в пачках и образец сырья, собранный в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии (СПХФА). Образцы (с указанием места сбора, производителя, даты сбора или выпуска лекарственного средства) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Список исследованных образцов корневищ змеевика

№	Место сбора / поставщик сырья, № серии	Дата сбора / выпуска
1	Ленинградская обл., Всеволожский р-н, окрестности п. Стекланный, питомник лекарственных растений СПХФА	Август, 2014 г.
2	ООО «Азбука трав», г. Барнаул, ул. Попова, 179Б (www.azbukatrav.com)	Январь, 2015 г.
3	ООО «Беловодье», Москва, ул. Стромынка, д.19 (www.altagrass.ru)	Апрель, 2015 г.
4	ИП Гордеев, Россия, Республика Башкортостан, с. Русский Юрмаш, серия 010617 (www.travogor.ru)	Июнь, 2015 г.

Подготовка пробы сырья к анализу и получение извлечения из сырья (испытуемого раствора). Около 5,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 25 мл спирта этилового 95%-ного, нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение пропускали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл, довели раствор спиртом этиловым 95%-ным до метки (испытуемый раствор).

Методика 1. На линию старта аналитической хроматографической пластинки размером 10×10 см на полимерной подложке со слоем силикагеля («Sorbfil», тип ПТСХ-П-А 10×10) наносили 5 мкл испытуемого раствора и по 2 мкл растворов стандартных образцов (СО) кислоты галловой и кислоты хлорогеновой. Пластинку с нанесенными пробами сушили при комнатной температуре в течение 5 мин, помещали в камеру (предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин) со смесью растворителей этилацетат – толуол – кислота муравьиная безводная – вода (30:10:5:2) и хроматографировали восходящим способом.

Когда фронт подвижной фазы прошел примерно 80–90% длины пластинки от линии старта, пластинку вынимали из камеры, сушили до удаления следов растворителей под тягой при комнатной температуре.

Хроматограмму обрабатывали раствором для детектирования 1, сушили, затем обрабатывали раствором для детектирования 2, сушили и просматривали при дневном свете.

Примечание к Методике 1 (приготовление растворов)

Раствор для детектирования 1. Непосредственно перед использованием смешивали 25 мл

0,3%-ного раствора кислоты сульфаниловой в 8%-ной кислоте соляной с 1,5 мл 5%-ного раствора натрия нитрита. Срок годности полученного раствора – не более суток при хранении на льду.

Раствор для детектирования 2. Натрия карбоната раствор 10 %. Срок годности раствора – не более 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кислоты галловой. Около 0,05 г СО кислоты галловой («Завод химических реактивов», г. Харьков, Украина) растворяли в 95%-ном спирте этиловом в мерной колбе вместимостью 50 мл, довели объем раствора до метки 95%-ным спиртом этиловым и перемешивали. Срок годности раствора – не более 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО кислоты хлорогеновой. Около 0,05 г СО кислоты хлорогеновой («ICN Biomedicals», USA) растворяли в 95%-ном спирте этиловом в мерной колбе вместимостью 50 мл, довели объем раствора до метки 95%-ным спиртом и перемешивали. Срок годности раствора – не более 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Методика 2. На линию старта аналитической хроматографической пластинки размером 10×10 см на полимерной подложке со слоем силикагеля («Sorbfil», тип ПТСХ-П-А 10×10) наносили 5 мкл испытуемого раствора и 2 мкл раствора СО (+)-катехина. Пластинку с нанесенными пробами сушили при комнатной температуре в течение 5 мин, помещали в камеру (предварительно насыщенную в течение не менее 40 мин) со смесью растворителей н-бутанол – кислота уксусная безводная – вода (40:10:28) и хроматографировали восходящим способом.

Когда фронт подвижной фазы прошел примерно 80–90% длины пластинки от линии старта, пластинку вынимали из камеры, сушили до удале-

ния следов растворителей под тягой при комнатной температуре.

Хроматограмму обрабатывали раствором для детектирования 3, сушили и просматривали при дневном свете.

Примечание к Методике 2 (приготовление растворов)

Раствор для детектирования 3. Раствор ванилина 5%-ный в 95%-ном спирте этиловом смешивали непосредственно перед опрыскиванием с кислотой хлористоводородной концентрированной в соотношении 4:1 соответственно. Срок годности полученного раствора – не более суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО (+)-катехина. Около 0,05 г СО (+)-катехина (ООО «Фитопанацея», Москва) растворяли в 95%-ном спирте этиловом в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводили объем раствора до метки 95%-ным спиртом этиловом и перемешивали. Срок годности раствора – не более 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате апробации Методики 1 на образце № 1 корневищ змеевика на хроматограмме раствора СО кислоты галловой обнаруживалась зона адсорбции желто-коричневого цвета ($R_f \approx 0,83$), на хроматограмме раствора СО кислоты хлорогеновой – зона адсорбции фиолетово-розового цвета ($R_f \approx 0,33$).

На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживались зона желто-коричневого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО кислоты галловой, зона адсорбции фиолетово-розового цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО кислоты хлорогеновой (рис. 1), а кроме того, зона адсорбции оранжево-желтого цвета ($R_f \approx 0,77$).

Определение воспроизводимости Методики 1 проводили на образцах корневищ змеевика №№ 2, 3, 4 в трех повторностях для каждого образца. Методика 1 показала свою воспроизводимость в указанных условиях.

В результате апробации Методики 2 на образце № 1 корневищ змеевика на хроматограмме раствора СО (+)-катехина обнаруживалась зона адсорбции малиново-розового цвета ($R_f \approx 0,85$).

На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживались зона малиново-розового цвета на уровне зоны раствора СО (+)-катехина, а также другие зоны адсорбции ($R_f \approx 0,82$; $R_f \approx 0$) малиново-розового цвета (рис. 2).

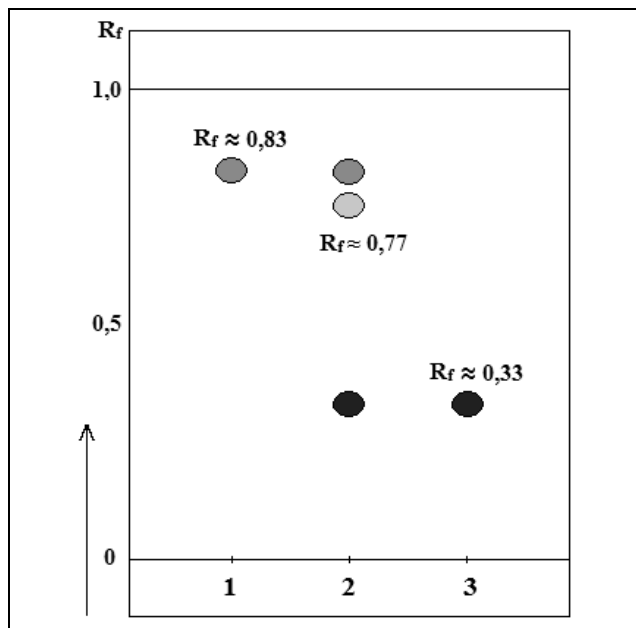


Рис. 1. Схема хроматограммы водного извлечения корневищ змеевика (2) и растворов СО кислоты галловой (1), СО кислоты хлорогеновой (3) в системе этилацетат – толуол – кислота муравьиная безводная – вода (30:10:5:2); обнаружение в видимом свете после последовательной обработки растворами для детектирования 1 и 2

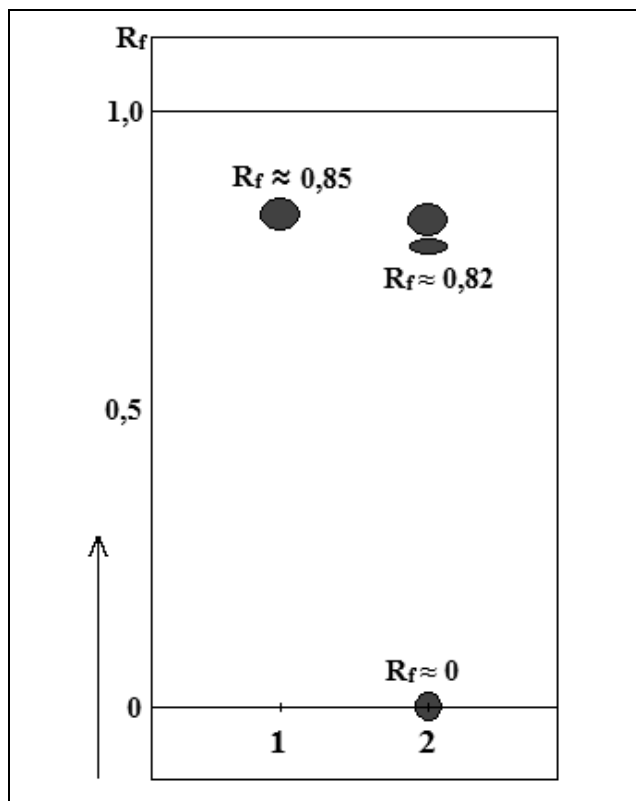


Рис. 2. Схема хроматограммы водного извлечения корневищ змеевика (2) и раствора СО (+)-катехина (1) в системе н-бутанол – кислота уксусная безводная – вода (40:10:28); обнаружение в видимом свете после обработки раствором для детектирования 3

Определение воспроизводимости Методики 2 проводили на образцах корневищ змеевика №№ 2, 3, 4 в трех повторностях для каждого образца. Методика 2 также показала свою воспроизводимость в указанных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики идентификации мономеров дубильных веществ – хлорогеновой кислоты, галловой кислоты и катехина в сырье змеевика корневища методом тонкослойной хроматографии, показана их воспроизводимость.
2. Разработанные методики включены в раздел «Определение основных групп биологически активных веществ. Тонкослойная хроматография» проекта фармакопейной статьи «Змеевика корневища», предназначенного для включения в Государственную фармакопею нового издания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. М.: Изд-во Профсоюзной ассоциации натуротерапевтов. 2009. 295 с.
2. Саканян Е.И., Бунятян Н.Д., Сакаева И.В., Лякина М.Н., Шемерянкина Т.Б., Постоюк Н.А., Рукавицына Н.П. Современные подходы к структуре построения фармакопейных статей на лекарственное растительное сырье // Фармация. 2015. № 4. С. 9–11.
3. Государственная Фармакопея СССР. Изд. 11-е, доп. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. М.: Медицина. 1989. 400 с.
4. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 1. Семейства Magnoliaceae - Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Urticaceae. СПб.-М. 2008. 421 с.
5. Евдокимова О.В. Разработка показателей подлинности коры дуба // Материалы X Междунар. конгр. «Здоровье и образование в XXI веке». Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». 2012. Т. 14. № 7. С. 112–113.
6. Федосеева Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае // Химия растительного сырья. 2005. № 2. С. 45–50.

Поступила после доработки 15 октября 2016 г.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY IDENTIFICATION OF PHENOLIC CONSTITUENTS IN BISTORTA RHIZOMATA

© K.N. Efimova, E.V. Zhokhova, 2017

K.N. Efimova

Ph.D. (Pharm.), Assistant, Department of Pharmacognosy, Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy
E-mail: ksenia.rasarenova@pharminnotech.com

E.V. Zhokhova

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Department of Pharmacognosy, Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy
E-mail: elena.zhokhova@pharminnotech.com

Bistorta major is a medicinal plant included in the State Pharmacopoeia of the USSR in 7th, 8th, 9th, 10th, 11th editions. Monograph «Rhizomata Bistortae» from the 11th edition of the State Pharmacopoeia of the USSR is the current document which determines the quality of *Bistorta* rhizome. In connection with elaborating monographs of new edition of the State Pharmacopoeia of Russian Federation the aim of our investigation was to update the exiting pharmacopeial article for *Bistorta major* rhizome. According to the literature gallic acid, chlorogenic acid, catechin were isolated from the root part of *Bistorta major*.

By taking into account the contribution of phenolic constituents to the pharmacological effects of the investigated raw material in this paper the authors developed procedures for the quantitative determination if the mentioned monomers of tannins. The thin-layer chromatography was used for identifying phenolic constituents (gallic acid, chlorogenic acid, catechin) in rhizome of *Bistorta major*. Chromatographic separation of phenolic acids was achieved on a Sorbfil TLC Plates (PTLC-P-V-UV) using ethyl acetate toluene formic acid water (30:10:5:2) system as the mobile phase and diazotized sulfanilic acid reagent as spot detection. After spraying with reagent the chromatogram of the test solution showed a brownish-yellow and violet-pink areas at the level of standard gallic acid and chlorogenic acid respectively.

Chromatography applying Sorbfil TLC Plates as stationary, butanol acetic acid water solvent system as a mobile phase, vanillin-hydrochloric acid as spot detection reagent allowed the identification of catechin. The chromatogram of the test solution showed a bright red area at the level of standard catechin after detection.

These approaches gave a good reproducibility for three samples of the raw material.

Designed TLC-method was included in the section «The thin-layer chromatography» of the monograph «*Bistorta rhizomata*» of new State Pharmacopoeia of Russian Federation.

Key words: *Bistorta major*, rhizomes, TLC, phenolic constituents, gallic acid, chlorogenic acid, catechin.

References

1. Kiseleva T.L., Smirnova Ju.A. Lekarstvennye rastenija v mirovoj medicinskoj praktike: gosudarstvennoe re-ulirovanie nomenklatury i kachestva. M.: Izd-vo Professional'noj asociacii naturoterapevtov. 2009. 295 s.
2. Sakanjan E.I., Bunjatjan N.D., Sakaeva I.V., Ljakina M.N., Shemerjankina T.B., Postojuk N.A., Rukavicyna N.P. Sovremennye podhody k strukture postroenija farmakopejnyh statej na lekarstvennoe rastitel'noe syr'e // Farmacija. 2015. № 4. S. 9–11.
3. Gosudarstvennaja Farmakopeja SSSR. Izd-e 11-e, dop. Vyp. 2. Obshhie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. M.: Medicina. 1989. 400 s.
4. Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastushhie cvetkovye rastenija, ih komponentnyj sostav i biologicheskaja aktivnost'. Tom 1. Semejstva Magnoliaceae - Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Urticaceae. SPb.-M.: 2008. 421 s.
5. Evdokimova O.V. Razrabotka pokazatelej podlinnosti kory duba // Materialy X Mezhdunar. kongr. «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke». Jelektronnyj nauchno-obrazovatel'nyj vestnik «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke». 2012. T. 14. № 7. S. 112–113.
6. Fedoseeva L.M. Izuchenie dubil'nyh veshhestv podzemnyh i nadzemnyh vegetativnyh organov badana tolstolistnogo (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), proizrasta-jushhego na Altae // Himija rastitel'nogo syr'ja. 2005. № 2. S. 45–50.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»**

приглашает к сотрудничеству
фармпроизводителей и сельхозпредприятия
для совместного продвижения наших научных разработок.
Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
для выращивания в различных регионах России

Тел. Контактa: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru

www.vilarnii.ru