

ЯКІСНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН СУБЛІМОВАНОГО ПОРОШКУ АРОНІЇ

У статті наведено результати якісної ідентифікації біологічно активних речовин сублімованого порошку аронії методом високоефективної рідинної хроматографії. За результатами проведених досліджень, у сублімованому порошку аронії було якісно ідентифіковано 16 індивідуальних речовин, які належать до різних класів хімічних сполук: вітаміни, органічні кислоти, біофлавоноїди, речовини фенольної природи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сублімований порошок аронії, високоефективна рідинна хроматографія, біологічно активні речовини.

ВСТУП. Контроль якості багатокомпонентних лікарських субстанцій, особливо рослинного походження, на сьогодні можливий лише з використанням аналітичних методів, що мають високу селективність та чутливість стосовно речовин, які визначають [2, 9–11]. При аналізі фітосубстанцій та лікарських препаратів на основі рослинної сировини широко застосовують високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) – метод, який дозволяє розділяти близькі за фізико-хімічними властивостями сполуки та проводити їх кількісне визначення в дуже низьких концентраціях [5, 6, 12].

На кафедрі технології ліків Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського було отримано нову фітосубстанцію – сублімований порошок аронії [1, 3, 4, 7, 8]. Активні компоненти фітосубстанції аронії можна віднести до класу полярних сполук, які, завдяки наявності у своїй структурі певних хромофорних груп, добре поглинають світло в УФ-ділянці спектра. Враховуючи це, для проведення аналізу ми запропонували використовувати оберненофазний варіант ВЕРХ.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на хроматографі “Міліхром А-02” (ЗАТ “ЕкоНова”, Новосибірськ, РФ), що має двошприцевий градієнтний насос, УФ-спектрофотометричний детектор, автоінжектор і термостат колонки та виготовляється за технологією, яка гарантує збереження його основних технічних характеристик. Важлива особливість хроматографа “Міліхром А-02” – це робота з мікроколонками ($V=0,2$ мл) $\varnothing 2 \times 75$ мм, що

укомплектовані оберненою фазою ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ (“Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH”, Німеччина) і мають ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок. Градієнтне елюювання виконують шляхом змішування двох елюентів: елюенту А – $[0,2$ М LiClO_4 – $0,005$ М HClO_4]; елюенту Б – ацетонітрилу “для ВЕРХ”. Ці елюенти мають високу прозорість у короткохвильовій ділянці УФ-спектра та не містять УФ-поглинаючих домішок, які виявляють у вигляді додаткових піків на хроматограмі. Наявність у рухомій фазі кислоти ($\text{pH}=2,8$) поліпшує хроматографування карбонових кислот, а високий вміст іонів літію покращує хроматографування амінів. ВЕРХ-аналіз виконували за таких умов: швидкість потоку – 100 мкл/хв; елюювання – лінійний градієнт від 5 до 100 % ацетонітрилу за 40 хв, потім 100 % ацетонітрил протягом 3 хв; температура колонки – 40°C ; об’єм проби – 4 мкл. Перед початком аналізу колонку регенерували протягом 10 хв елюентом А. УФ-детектування проводили одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм, тому кожній речовині на хроматограмі відповідали 8 піків з однаковим часом утримування, але з різними амплітудами, що прямо пропорційні абсорбції речовини. Для кожної речовини розраховували 7 характерних нормованих спектральних параметрів – відношення площ піків при довжинах хвиль λ_2 – λ_8 до площі піку при довжині хвилі $\lambda_1=210$ нм ($R=S_{\lambda}/S_{210}$). Сукупність цих спектральних відношень R разом із величиною об’єму утримування (V_R) використовують для ідентифікації піку речовини на хроматограмі.

Попередню ідентифікацію речовин проводили за інформацією, що є в базі даних приладу, більш точну ідентифікацію виконували шляхом порівняння з хроматограмами розчинів стандартних зразків. Наведена методика ідентифікації є уніфікованою. Правильність методики аналізу періодично контролювали шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину, що складається з бромід-іона, уридину, кофеїну, прозерину, *m*-нітроаніліну, *p*-нітроаніліну і трифтазину.

Роботу з хроматографом "Міліхром А-02" та обробку хроматограм виконували за допомогою програми "Аналітика – Chrom" на базі установи-розробника НВФ "Аналітика" (м. Харків).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Спочатку було проведено хроматографування індивідуальних стандартних зразків, потім розчину суми стандартних зразків. Це дало змогу виконувати якісну ідентифікацію зразків сублімованого порошку аронії більш експресно.

На рисунку 1 наведено хроматограму розчину суми стандартних зразків.

На хроматограмі за базою даних часу утримування та спектральними параметрами піків було ідентифіковано речовини, які наведено в таблиці 1.

За результатами проведених досліджень, було встановлено якісні характеристики стан-

дартних зразків, з якими працювали в подальшому.

Попередню ідентифікацію піків на хроматограмах досліджуваного зразка – розчину сублімованого порошку аронії проводили за часом утримування та спектральними відношеннями піків.

На рисунку 2 наведено хроматограму розчину сублімованого порошку аронії.

На хроматограмі сублімованого порошку аронії (рис. 2.) за базою даних часу утримування було попередньо ідентифіковано такі речовини: 1– t_R =1,81 хв – кислота аскорбінова; 2– t_R =2,22 хв – нікотинамід; 3– t_R =2,31 хв – кислота нікотина; 4– t_R =3,79 хв – тіамін; 5– t_R =4,23 хв – кислота лимонна; 6– t_R =4,87 хв – кислота бурштинова; 7– t_R =5,12 хв – кислота яблучна; 8– t_R =7,62 хв – кислота фолієва; 9– t_R =9,37 хв – рибофлавін; 10– t_R =11,57 хв – дигідрокверцетин; 11– t_R =16,55 хв – кверцетин; 12– t_R =17,90 хв – гесперидин; 13– t_R =19,45 хв – рутин; 14– t_R =22,13 хв – кислота хлорогенова; 15– t_R =23,45 хв – кислота ферулова; 16– t_R =24,61 хв – кислота кавава. Піки, які не позначено відповідними номерами, ідентифікувати не вдалося.

Для більш точної ідентифікації ми змішували розчин сублімованого порошку аронії з розчином суми стандартних зразків речовин, попередньо ідентифікованих для даного досліджуваного зразка.

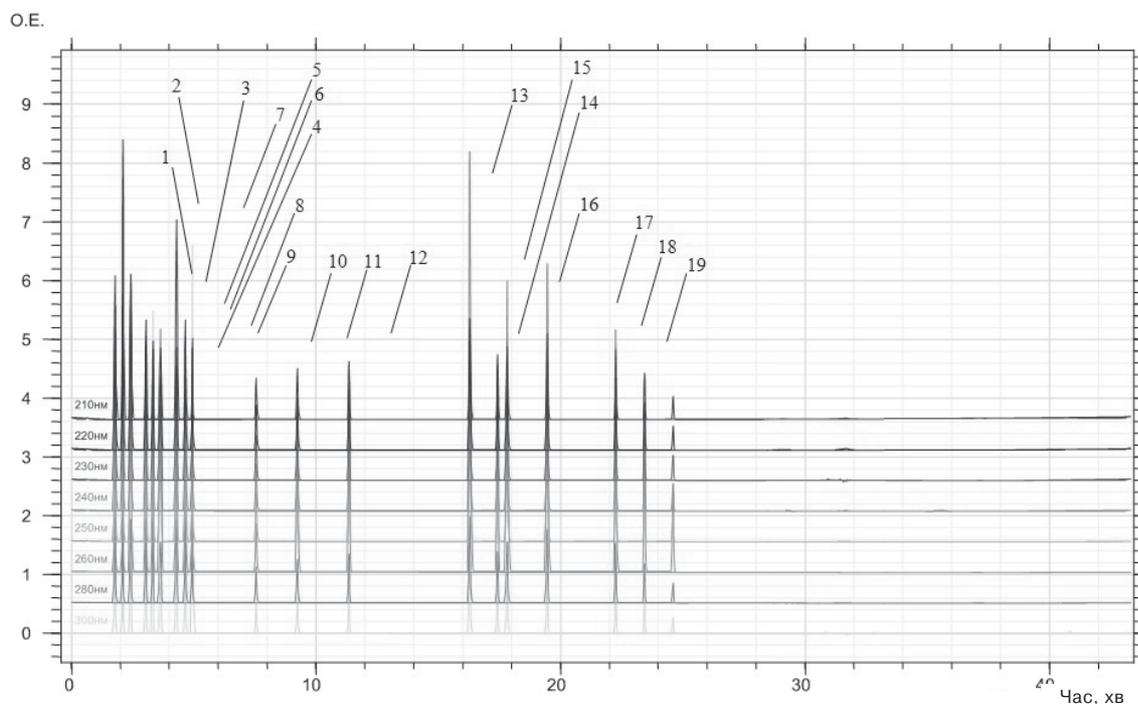


Рис. 1. Хроматограма розчину суми стандартних зразків.

На рисунку 3 наведено хроматограму розчину сублімованого порошку аронії в суміші з розчином суми стандартних зразків ідентифікованих речовин.

На хроматограмі (рис. 3) за базу даних часу утримування та спектральними параметрами піків, що збільшилися за висотою, було ідентифіковано речовини, які наведено в таблиці 2.

ВИСНОВОК. Методом вискоєфективної рідинної хроматографії в сублімованому порошку аронії ідентифіковано 16 індивідуальних сполук, які належать до різних класів біологічно активних речовин, більшість яких – із потужними антиоксидантними властивостями (кислота аскорбінова, дигідрокверцетин, кверцетин, геспередин, рутин, кислота хлорогенова, кислота ферулова тощо).

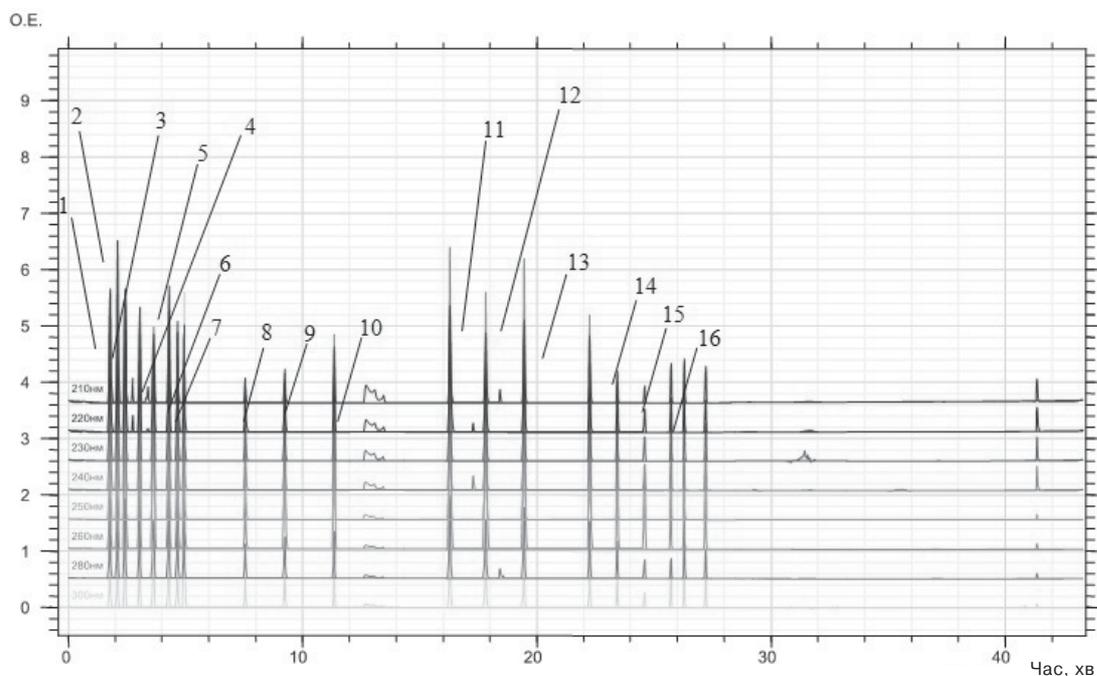


Рис. 2. Хроматограма розчину сублімованого порошку аронії.

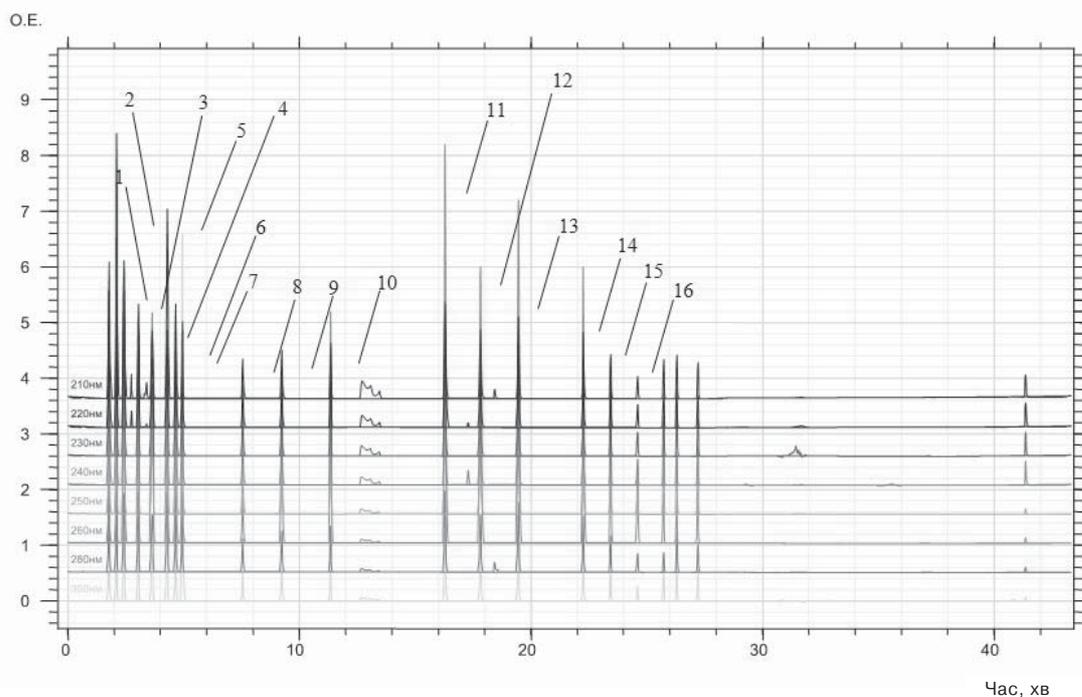


Рис. 3. Хроматограма розчину сублімованого порошку аронії в суміші з розчином суми стандартних зразків ідентифікованих речовин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барна О. М. Фізико-хімічне дослідження сублімованих екстрактів аронії з різними структуроутворювачами / О. М. Барна, Л. В. Соколова // Мед. хімія. – 2005. – 7, № 4. – С. 22–26.
2. Киселев А. В. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии / А. В. Киселев, Д. П. Пошкус, Я. И. Яшин. – М.: Химия, 2006. – 272 с.
3. Пат. 43236 А Україна, А 61 К 36/00. Спосіб отримання фітосубстанції на основі аронії чорноплідної / Барна О. М., Соколова Л. В. – № 02081; заявл. 10.03.09; опубл. 10.08.09, Бюл. № 15. – 4 с.
4. Протизапальні властивості сублімованого гранульованого порошку аронії / О. А. Подплетня, В. Ю. Слесарчук, Л. В. Соколова, Т. В. Дорофеева // Фармац. часопис. – 2011. – № 4. – С. 100–102.
5. Сегуру Н. В. Качественное и количественное определение компонентов, входящих в состав таблеток “Паглюферал”, методом ВЭЖХ / Н. В. Сегуру // VI Рос. нац. конгресс “Человек и лекарство”, 19–21 апр. 1999 г. – М., 1999. – С. 468.
6. Серегина Е. В. Применение ВЭЖХ в контроле качества алкалоидов из группы тропана / Е. В. Серегина, А. Х. Лайпанов // Фармация. – 2004. – № 1. – С. 44–47.
7. Соколова Л. В. Вивчення кристалографічних характеристик і фракційного складу ліофілізованих порошків аронії чорноплідної з різними структуроутворювачами / Л. В. Соколова, О. М. Барна // Вісник фармації. – 2007. – № 4. – С. 32–36.
8. Соколова Л. В. Вплив методу заморожування перед сублімацією на фармако-технологічні характеристики порошків аронії / Л. В. Соколова, О. М. Барна // Фармац. часопис. – 2009. – № 4. – С. 44–46.
9. Халикова М. А. Применение метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения смеси и идентификации таурина, карнозина и глутатиона / М. А. Халикова, Д. А. Фадеева, А. А. Зинченко // Научные ведомости БелГУ, Серия “Медицина. Фармация”. – 2010. – № 22 (93). – Вып. 12. – С. 157–160.
10. Ahmed A. N. Use of chemically-bonded cyclodextrin stationary phase for high performance liquid chromatographic determination of feldene capsules / A. N. Ahmed, S. M. El-Gizawy // J. Chromatogr. Sci. – 2000. – 25, № 9. – P. 424–426.
11. Analysis of opiates in human hair by high-performance liquid-chromatography / S. Pichini, I. Altieri, M. Pellegrini [et al.] // J. Liquid Chromatogr. ± Related Technol. – 2009. – 22, № 6. – P. 873–884.
12. Wang H. F. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC / H. F. Wang, K. Helliwell, X. Q. You // Food Chemistry. – 2002. – 68, № 1. – P. 115–121.

Л. В. Соколова

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

КАЧЕСТВЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СУБЛИМИРОВАННОГО ПОРОШКА АРОНИИ

Резюме

В статье представлены результаты качественной идентификации биологически активных веществ сублимированного порошка аронии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. По результатам проведенных исследований, в сублимированном порошке аронии было качественно идентифицировано 16 индивидуальных веществ, которые относятся к разным классам химических соединений: витамины, органические кислоты, биофлавоноиды, вещества фенольной природы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сублимированный порошок аронии, высокоэффективная жидкостная хроматография, биологически активные вещества.

L. V. Sokolova

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

HIGH-QUALITY IDENTIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE SUBLIMATED POWDER OF CHOKEBERRY

Summary

This article describes the results of high-quality identification of biologically active substances of the sublimated powder of chokeberry obtained by the method of high-efficiency liquid chromatography. The results of researches of sublimated powder of chokeberry identified 16 individual substances that belong to separate classes of chemical compounds such as vitamins, organic acids, bioflavonoidss, substances with phenol nature.

KEY WORDS: sublimated powder of chokeberry, high-efficiency liquid chromatography, biologically active substances.

Отримано 09.01.13

Адреса для листування: Л. В. Соколова, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.